

# Istruzioni d'uso


ver. 1 del 02/04/2021

Biologia Molecolare

Estrazione non inclusa

# EBV REAL TIME

**REF** AA1572/48  
GA031/2

 48 TEST  
2 TEST

**CND** W0105040403

CE

IVD



**NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.**

SEDE LEGALE: Via Cascina Conighetto - UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALIA

Tel.: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: [www.nlm.it](http://www.nlm.it) - E-MAIL: [segreteria@nlm.it](mailto:segreteria@nlm.it)

Organizzazione con Sistema di gestione qualità certificata ISO 9001 e Sistema di gestione qualità settore medicale certificato ISO 13485 (organismo di certificazione IMQ - Certificazione CSQ).

## UTILIZZO

**EBV REAL TIME** fornisce i reagenti necessari per la determinazione qualitativa del Epstein Barr Virus umano (EBV DNA) in campioni di sangue, plasma e liquido cefalo-rachidiano (CSF) e l'analisi qualitativa e quantitativa in campioni di sangue e plasma mediante amplificazione in Real Time PCR.

- L'analisi qualitativa prevede l'utilizzo di un Controllo Positivo, da utilizzare in fase di amplificazione e di un Controllo Negativo (NTC), che può essere estratto insieme ai campioni o direttamente amplificato;
- L'analisi quantitativa prevede l'utilizzo del kit **EBV REAL TIME** in combinazione con il kit **EBV Curva Standard** (cod. NLM GA031/2), fornito separatamente

Questo prodotto è validato e compatibile con il kit di estrazione su colonnina (cod. NLM AA1001) ed i più comuni sistemi di estrazione automatica: MagCore (Cod. NLM AA1185 e Cod.NLM AA1186), QiaSymphony (cod. NLM AA1440/96 e cod. NLM AA1439/192).

Per la Real Time PCR gli strumenti validati e compatibili sono: CFX96 (BioRad), ABI7500 Fast (Applied Biosystems) e RotorgeneQ (Qiagen).

**EBV REAL TIME** è indicato, insieme agli altri parametri di laboratorio ed al quadro clinico dei pazienti, per la gestione clinica dei soggetti affetti da EBV.

Il test può essere utilizzato sia per un'analisi qualitativa sia per valutare la risposta virale al trattamento farmacologico, espresso dalla variazione della quantità di DNA target nei campioni biologici.

Il kit prevede l'utilizzo dell'enzima Uracil-N-glicosidasi (UNG) per prevenire la contaminazione da amplificato e conseguenti risultati falsi positivi.

Il kit è da ritenersi per il solo uso professionale.

## INTRODUZIONE

Herpesvirus tipo-4, o Epstein Barr Virus (EBV), è un virus a doppio filamento di DNA con un genoma di 170 kb. EBV infetta il 90% della popolazione adulta mondiale (*Santpere et al., 2014*). L'infezione primaria si manifesta in età precoce, spesso asintomatica nei bambini, mentre causa mononucleosi infettiva (IM) nei giovani adulti.

EBV attacca preferenzialmente i linfociti B e resta latente a lungo in forma di episomi residenti nel nucleo della cellula ospite. Durante questa fase vengono espresse solo 6 proteine nucleari (tra cui EBNA-1) e 3 proteine di membrana. EBNA1 è la sola proteina richiesta per la replicazione e segregazione dei genomi virali in latenza; queste funzioni richiedono che EBNA1 si leghi all'origine di replicazione specifica per la latenza, detta *oriP* (*Mansouri et al., 2014*).

L'infezione da EBV è correlata a malattie complesse, inclusa la Sclerosi Multipla e diversi tipi di cancro, tra cui il linfoma di Hodgkin, il linfoma di Burkitt, il carcinoma della faringe e il carcinoma gastrico. EBV risulta essere inoltre una delle cause dei disordini linfoproliferativi post-trapianto, associati ad alto tasso di mortalità in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Diventa quindi cruciale la quantificazione della carica virale tramite tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) (*Fryer et al., 2016*).

## BIBLIOGRAFIA

1. María Dolores Fellner et al., **Duplex realtime PCR method for Epstein–Barr virus and human DNA quantification: its application for post-transplant lymphoproliferative disorders detection**, *brazjinfecdis.2014;18(3):271–280*
2. Roberta M. Madej et al., **International Standards and Reference Materials for Quantitative Molecular Infectious Disease Testing** *Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 12, No. 2, March 2010*
3. J. Styczynski et al., **Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines**, *haematologica | 2016; 101(7)*
4. Gabriel Santpere et al., **Genome-Wide Analysis of Wild-Type Epstein–Barr Virus Genomes Derived from Healthy Individuals of the 1000 Genomes Project**, *Genome Biol. Evol. 6(4):846–860*
5. Jacqueline F. Fryer et al., **A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques**, *Biologicals 44 (2016) 423e433*
6. Myung-Soo Kang et al., **Epstein–Barr virus latent genes**, *Experimental & Molecular Medicine (2015) 47, e131*

7. Ming-Han Tsai et al., **The biological properties of different Epstein-Barr virus strains explain their association with various types of cancers**, *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 6), pp: 10238-10254
8. Servi J. C. Stevens et al., **Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus DNA in Clinical Specimens by Rapid Real-Time PCR Targeting a Highly Conserved Region of EBNA-1**, *Methods in Molecular Biology*, vol. 292: *DNA Viruses: Methods and Protocols*
9. D. E. Tsai et al., **EBV PCR in the Diagnosis and Monitoring of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder: Results of a Two-Arm Prospective Trial**, *American Journal of Transplantation* 2008; 8: 1016–1024
10. Mansouri Sheila et al., **Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein Regulates Viral Latency through Effects on let-7 MicroRNA and Dicer**, *Journal of Virology* p. 11166 –11177 October 2014 Volume 88 Number 19

## PRINCIPIO DEL TEST

Il test EBV REAL TIME si basa su due processi:

1. Estrazione del DNA virale
2. Amplificazione e rilevazione della sequenza bersaglio mediante Real Time PCR

Il Controllo Interno (GAPDH) viene estratto insieme al campione e permette di monitorare l'andamento di tutto il saggio. Per matrici scarsamente cellularizzate (CSF e, talvolta, plasma) è possibile aggiungere il Controllo Interno Esogeno Liquido direttamente al campione biologico in fase di estrazione.

Vengono inoltre forniti due controlli: uno negativo, per le fasi di estrazione ed amplificazione ed uno positivo per la sola fase di amplificazione.

Per l'analisi quantitativa è previsto l'utilizzo di un pannello di quattro calibratori fornito separatamente (cod. NLM GA031/2).

### 1. Estrazione del DNA

Il DNA di EBV e del Controllo Interno (CI) può essere estratto a partire da diverse tipologie di campioni (sangue intero, plasma, CSF), utilizzando il sistema manuale di estrazione su colonnina (cod. NLM AA1001) oppure in automatico con strumento MagCore (Cod. NLM AA1185 e Cod. NLM AA1186) e con strumento QIASymphony (cod. NLM AA1439/192 e cod. NLM AA1440/96).

### 2. Amplificazione e rilevazione

#### Target selezionato per l'amplificazione

L'amplificazione e la rilevazione del **gene EBNA1 di EBV** (Epstein-Barr nuclear antigen 1) permette di determinare la presenza del DNA virale (amplicone: 181 bp).

Contemporaneamente viene amplificata anche una regione dell'introne 2 del gene GAPDH umano (amplicone: 234 bp), sia come controllo interno endogeno che esogeno. Il controllo interno viene estratto ed amplificato in ogni campione al fine di monitorare l'intera procedura.

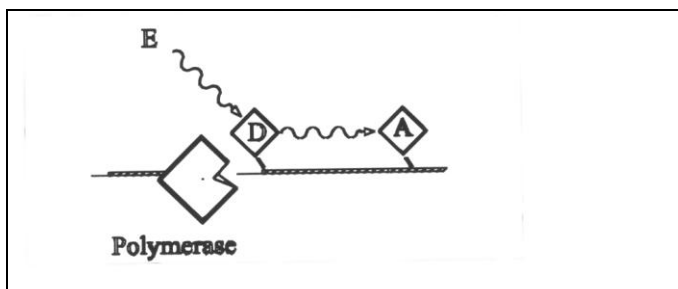
Il Controllo Positivo e i calibratori sono costituiti da DNA sintetico clonato del gene EBNA1 e sono forniti in formato liquido pronto-uso.

#### Amplificazione

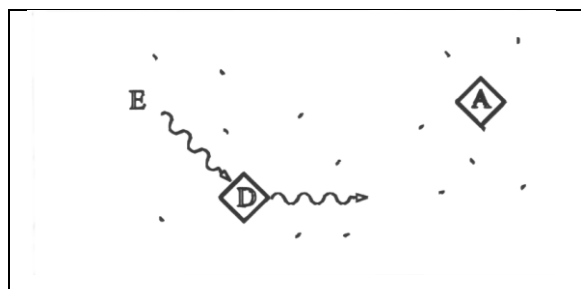
Successivamente alla fase di estrazione il DNA di EBV e del CI sono amplificati mediante Real Time PCR, utilizzando enzimi e reagenti opportunamente selezionati.

#### Rivelazione

Il test si basa sulla Real-Time PCR tecnica che permette di monitorare in tempo reale l'amplificazione delle sequenze target utilizzando opportune sonde marcate con molecole fluorescenti. Nella mix di amplificazione ci sono due sonde specifiche rispettivamente per la regione target del genoma virale e per una regione del genoma umano che funge da Controllo Interno (GAPDH), marcate ciascuna con un fluoroforo donatore ed un fluoroforo accettore (secondo la chimica "dual labeled probe"). Il fluoroforo donatore è diverso per le due sonde: FAM per EBV e JOE/HEX per il CI. In presenza di una fonte luminosa, quando le sonde sono integre la fluorescenza emessa dal fluoroforo donatore è assorbita dal fluoroforo accettore. Durante l'amplificazione le sonde si appaiano ciascuna al proprio target specifico e successivamente vengono degradate dall'attività 5'→3' esonucleasica della DNA polimerasi. Quando i fluorofori donatore ed accettore sono separati, la fluorescenza del donatore può essere rilevata alla sua lunghezza d'onda specifica: in questo modo l'amplificazione del DNA virale e del CI può essere monitorata nel corso della reazione.



a) Energia (E) emessa dal fluoroforo "donor" (D) è assorbita dal fluoroforo "acceptor(A).



b) L'attività esonucleasica della DNA polimerasi separa il fluoroforo D dal fluoroforo A tramite idrolisi con conseguente incremento del segnale fluorescenza.

## COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO (Conservare a -25/-15°C)

AA1572/48	Quantità
<b>EBV Mix</b> (comprensiva di primer, sonde, enzima di amplificazione ed UNG)	2x 500 µl
<b>Controllo Positivo (CP EBV)</b> (DNA sintetico delle regioni target; formato liquido pronto uso)	2 x 30 µl
<b>No Template Control (NTC)</b> (Acqua da utilizzare come NTC, a partire dallo step di purificazione)	2 x 700 µl
<b>Controllo interno esogeno (exIC)</b> (DNA sintetico del IC, formato liquido pronto uso)	2 x 350 µl

GA031/2	Quantità
<b>EBV curva Standard</b>	<b>2 set</b>
CALIBRATORE 1 EBV (DNA sintetico, formato liquido pronto uso)	2 x 30 µl
CALIBRATORE 2 EBV (DNA sintetico, formato liquido pronto uso)	2 x 30 µl
CALIBRATORE 3 EBV (DNA sintetico, formato liquido pronto uso)	2 x 30 µl
CALIBRATORE 4 EBV (DNA sintetico, formato liquido pronto uso)	2 x 30 µl

I volumi dei componenti indicati precedentemente sono riferiti alla pezzatura standard del kit.

Confezionamenti ridotti sono disponibili su richiesta per valutazione e/o dimostrazione del prodotto.

## STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- EBV Mix, CP, NTC, Controllo Interno Esogeno e Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati alla temperatura indicata (-25/-15°C).
- Scongellare tutti i reagenti in ghiaccio o a +2/+8°C.
- La EBV Mix può essere scongelata e ricongelata fino a 5 volte. Per utilizzi più frequenti, si consiglia di aliquotare la mix.
- Le sonde contenute nella **EBV Mix** sono fotosensibili: evitare l'esposizione prolungata alla luce.
- Il **CP ed i calibratori** sono pronti all'uso; si raccomanda di dispensarli nelle provette/piastra di amplificazione dopo aver dispensato i campioni, onde evitare possibili contaminazioni. Ciascuna aliquota è monouso: dopo il primo utilizzo scartare l'avanzo

## PRECAUZIONI

- La procedura va eseguita da personale competente utilizzando le buone pratiche di laboratorio ed i comuni dispositivi di protezione individuale.
- L'utilizzo delle seguenti soluzioni, insieme alla presenza dell'UNG, permette di ridurre al minimo il rischio di cross-contaminazione:
- Separare fisicamente le due aree di lavoro:

- Zona 1: pre-PCR (manipolazione dei campioni, estrazione e PCR setup)  
Prestare attenzione a non contaminare i reagenti durante la dispensazione
- Zona 2: post PCR (Real Time PCR)  
Ogni area deve essere rifornita di attrezzatura e consumabili dedicati (camici da laboratorio, centrifughe, pipette, provette, etc).
- L'ambiente di lavoro deve essere organizzato in modo che il flusso proceda in modo unidirezionale, dalla zona di pre-PCR all'area post-PCR
- Si raccomanda di pulire le aree di lavoro (banconi e cappe) con candeggina diluita al 5-10%, preparata al momento (la concentrazione finale di ipoclorito di sodio deve essere 0,5% w/v), al termine della procedura. Per la pulizia degli strumenti fare riferimento alle raccomandazioni fornite dal fabbricante.
- Tutti i consumabili (puntali e provette) devono essere privi di DNasi ed RNasi. I puntali devono avere il filtro per evitare la contaminazione delle pipette. Sostituire i puntali dopo ogni trasferimento di liquido.
- Utilizzo di cappe a flusso laminare verticale dotate di UV
- Cambiare i guanti frequentemente
- L'assenza di contaminazione può essere monitorata mediante l'utilizzo in ogni seduta di un NTC, a partire dalla fase di estrazione.
- Smaltire il materiale utilizzato secondo i regolamenti locali e nazionali vigenti
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree preposte all'esecuzione del test.
- Se vi è esposizione di occhi, cute o mucose alle sostanze utilizzate, lavare abbondantemente con acqua e contattare al più presto un medico.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Non utilizzare il kit se la confezione è danneggiata. Contattare il fornitore.
- E' opportuno assicurare una temperatura il più possibile costante ed uniforme in laboratorio ed evitare di posizionare gli strumenti in prossimità di fonti di calore/raffreddamento che possano comprometterne il corretto funzionamento.

## **MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO**

### **ZONA 1**

Kit di estrazione per DNA  
Cappa a flusso laminare verticale  
Set dedicato di pipette a volume variabile  
Puntali con filtro monouso  
Provette da 2 e da 1,5 ml DNasi RNasi free

### **ZONA 2**

EBV Curva Standard (cod. NLM GA031/2) per analisi quantitativa  
Cappa a flusso laminare verticale  
Set dedicato di pipette a volume variabile  
Puntali con filtro monouso  
Provette, strip o piastre specifiche per lo strumento Real Time utilizzato  
Strumento per amplificazione in Real Time

## **RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI**

- Campioni di sangue intero e plasma: devono essere preparati e conservati secondo le indicazioni del laboratorio.  
Salvo diverse indicazioni, si suggerisce di conservare a +2/+8°C per un massimo di tre giorni, diversamente si consiglia di riporre a -18°/-25°C. Si consiglia inoltre di non congelare prima della separazione del plasma da campioni di sangue intero.
- Campioni di liquido cefalo-rachidiano: devono essere preparati e conservati secondo le indicazioni del laboratorio. Conservare a -25/-15°C.

## PROCEDIMENTO

### ISOLAMENTO DEL DNA VIRALE

#### Kit di estrazione da utilizzare:

- ESTRAZIONE MANUALE cod. NLM AA1001.
- ESTRAZIONE AUTOMATICA cod. AA1185, AA1186, AA1439/192 e AA1440/96.

Per la preparazione, l'utilizzo e lo smaltimento dei reagenti fare riferimento alle istruzioni d'uso specifiche del sistema di estrazione utilizzato.

Possono essere utilizzati come campioni il sangue intero in EDTA, il plasma e il CSF. Per la preparazione dei campioni è necessario attenersi al protocollo relativo alla metodica specifica.

Utilizzare i volumi indicati in tabella:

Sistema di estrazione	Volume di partenza	Volume di eluizione
estrazione in manuale su colonnina (cod. NLM AA1001)	200 µl	100 µl
estrazione con MagCore (Diatech/MGB 400-02, cod. NLM AA1185 e Diatech/MVN400-04, cod. NLM AA1186)	400 µl	100 µl
estrazione con QIASymphony (Qiagen/937055, cod. NLM AA1440/96 – protocollo Cell free 500)	700 µl	110 µl
estrazione con QIASymphony (Qiagen/931236,-cod. NLM AA1439/192 – protocollo DNA Blood)	300 µl	

Se i campioni di DNA non vengono utilizzati immediatamente per l'amplificazione, conservarli a -25/-15°C.

In caso vengano estratti campioni biologici scarsamente cellularizzati (CSF) è possibile aggiungere il **Controllo Interno Esogeno (ex IC)**, presente nel kit.

Aggiungere 15 µl di ex IC, alla matrice biologica, per qualunque tipologia di estrazione utilizzata, indipendentemente dal volume di partenza, così che venga sempre garantita l'amplificazione del controllo interno. In caso di campioni EBV positivi l'aggiunta del ex IC non altera il segnale del target specifico.

### REAL-TIME PCR

- Impostare il profilo termico prima di preparare la mix.
- **Miscelare bene la mix prima del suo utilizzo.**
- Dispensare 15 µl di **EBV Mix** per ciascun campione estratto, per il CP (per analisi qualitativa) o per i quattro calibratori (per analisi quantitativa) e per l'NTC.
- Aggiungere 15 µl di DNA, di NTC, di CP liquido o dei 4 calibratori liquidi alla miscela e mescolare pipettando.

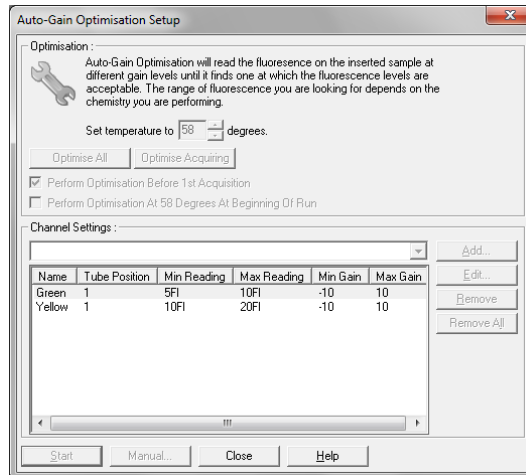
Se si esegue il PCR SETUP con il Qiasymphony centrifugare le provette prima di posizionarle sullo strumento per raccogliere eventuali gocce presenti sulle pareti. Il liquido contenuto deve essere tutto posizionato sul fondo delle provette.

**ATTENZIONE:** dispensare e miscelare la mix e i campioni molto attentamente, evitando la formazione di bolle. Se possibile, centrifugare brevemente la piastra o strip prima di posizionarla nello strumento di Real Time PCR. Si consiglia inoltre di dispensare i calibratori ed il CP per ultimi onde evitare contaminazioni.

## IMPOSTAZIONE DEL PROFILO TERMICO E ANALISI DEI RISULTATI

### ROTORGENE Q

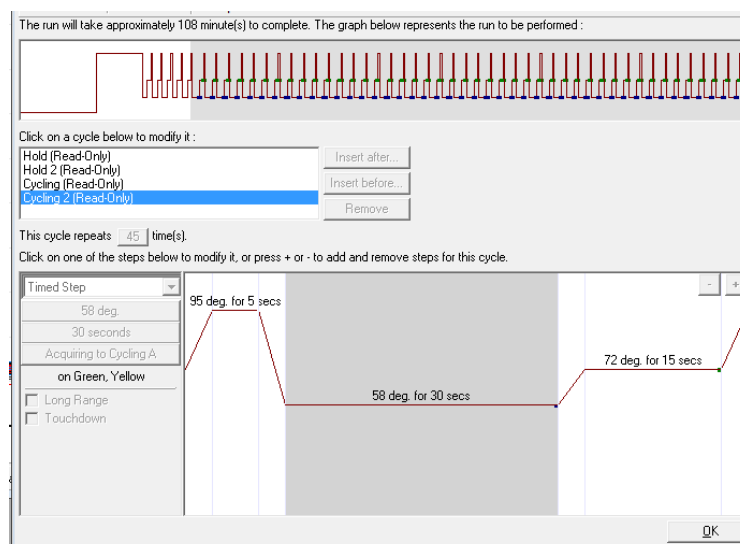
- Utilizzando la funzione “Edit Samples” programmare la posizione delle provette ed il “Type”: Standard, Positive Control, NTC o Unknown.
- Nella funzione “Setting” impostare il volume di reazione (30 µl) ed il rotore utilizzato (36/72 pozzetti); controllare che nella finestra “Channels” siano riportati i canali Green e Yellow, altrimenti impostarli cliccando su “Create new”.
- Nella funzione “View → gain optimisation” impostare l’autocalibrazione a 58°C per i canali riportati sopra (**FAM: Min reading 5 FI, Max reading 10 FI; JOE/ HEX: Min reading 10 FI, Max reading 20 FI**) e selezionare l'icona “Perform optimisation before first acquisition”.



- Nella funzione “Profile” impostare il seguente profilo termico:

Cycle	Cycle Point
45°C, 5 min	
95°C, 3 min	
Cycling (5 repeats)	95°C, 5 sec
	58°C, 20 sec
	72°C, 15 sec
Cycling (45 repeats)	95°C, 5 sec
	<b>58°C, 30 sec; acquiring to Green and Yellow</b>
	72°C, 15 sec

- Posizionare le provette nel rotore del RotorGene e chiudere il coperchio dello strumento.
- Avviare l’esperimento cliccando su “Start”.

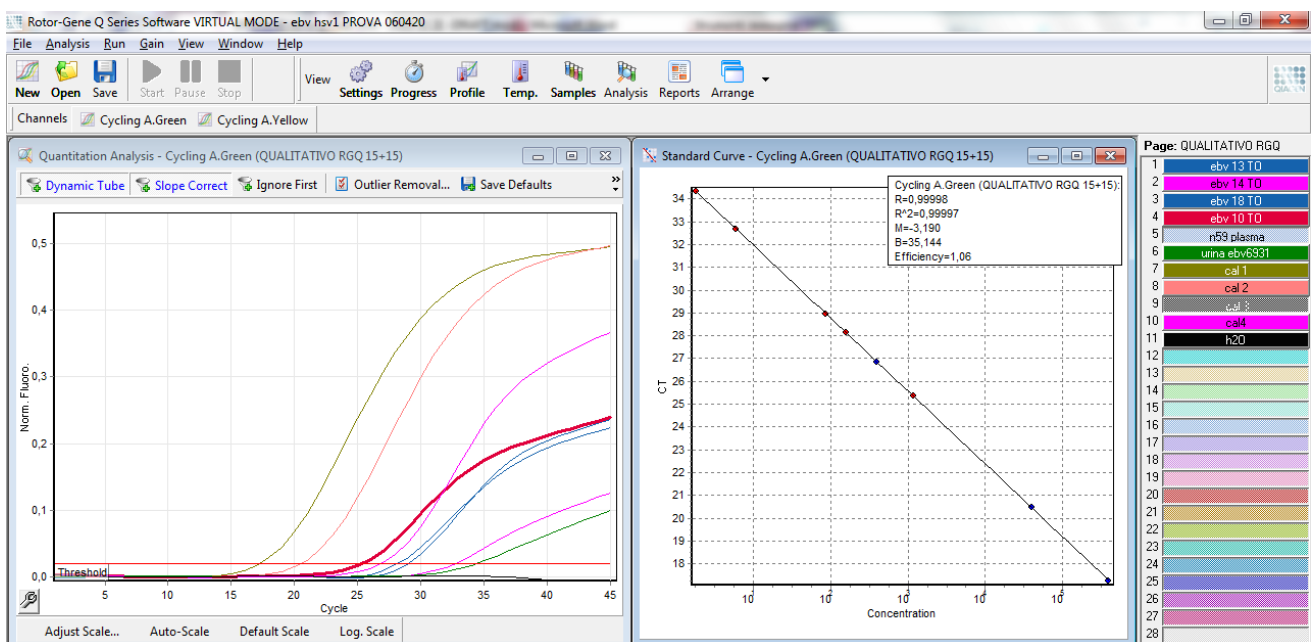


## ANALISI DEI DATI

### Canale Green (EBV)

- Selezionare “Analysis”, “Quantitation”, “Cycling A.Green”, “Show”.
- Quando compare la finestra di analisi con il grafico, selezionare “Dynamic Tube” e “Slope Correct”; se necessario, impostare “outlier removal” al 10%.
- Inserire nella finestra “Threshold” il valore 0,05 e, se necessario, eliminare i primi 10-12 cicli: l’intersezione tra la linea di soglia e la curva del campione rappresenta il valore di Ct.
- Analisi qualitativa: nella finestra “Results” compare il valore di Ct per i campioni positivi per EBV e per il controllo positivo.
- Analisi quantitativa: per i punti della Curva Standard scegliere “Type” → “Samples” → “Standard”. Successivamente è possibile impostare la concentrazione relativa ad ogni calibratore, “Given Conc.” → “Samples” e digitare il numero di IU/ml (per scegliere l’unità di misura portarsi su “Unit” in alto a destra e scegliere “IU/ml” dal menù a tendina). Comparirà la retta relativa alla curva standard e, per ogni campione positivo, la carica virale attribuita.

Esempio:

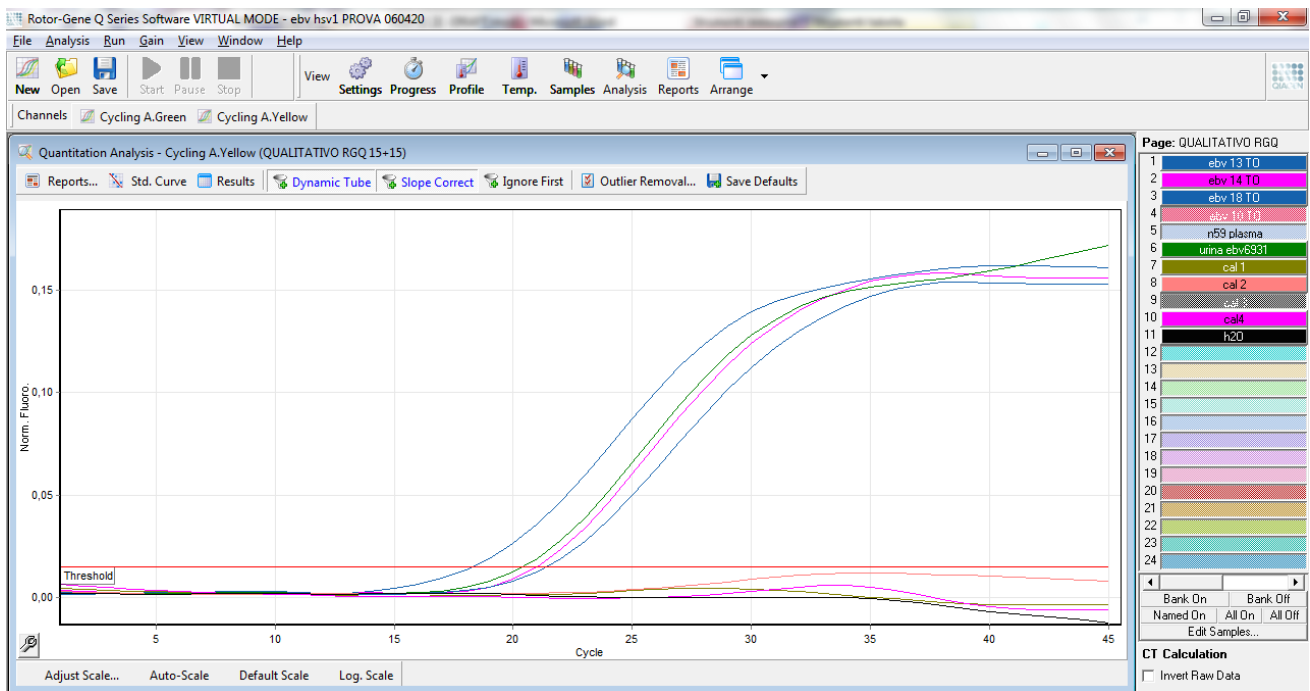


### Canale yellow (CI)

- Selezionare “Analysis”, “Quantitation”, “Cycling A.Yellow”, “Show”.
- Quando compare la finestra di analisi con il grafico, selezionare “Dynamic Tube” e “Slope Correct”, se necessario, impostare “outlier removal” al 10%.
- Inserire nella finestra “Threshold” il valore 0,03 e, se necessario, eliminare i primi 10-12 cicli: l’intersezione tra la linea di soglia e la curva del campione rappresenta il valore di CT.



## Esempio:



## CFX 96

- Aprire il Software specifico
- Nella finestra selezionare *Create new run* e scegliere il modello di CFX.
- Cliccare OK.
- Si apre la pagina *Run Setup*

## PROTOCOLLO

E' possibile creare un nuovo protocollo o selezionare/modificare un protocollo già esistente.

### Creare un nuovo protocollo

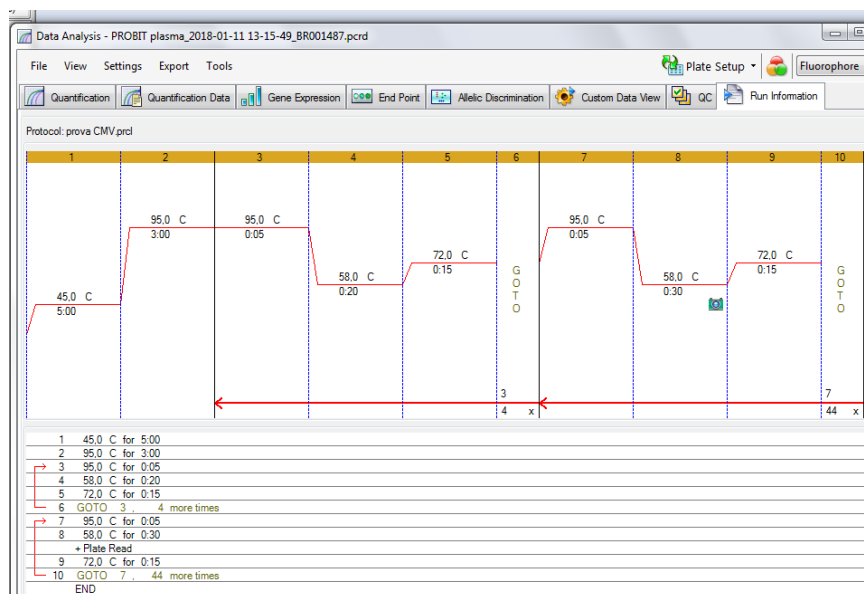
- *Protocol* → *create New*
- Si apre la nuova finestra *Protocol Editor – new*
- Inserire il volume della reazione nella casella *Sample Volume (30 µl)*
- Inserire il seguente profilo termico:

Cycle	Cycle Point
45°C, 5 min	
95°C, 3 min	
Cycling (5 repeats)	95°C, 5 sec
	58°C, 20 sec
	72°C, 15 sec
Cycling (45 repeats)	95°C, 5 sec
	<b>58°C, 30 sec; Plate Read</b>
	72°C, 15 sec

- Per aggiungere uno step si deve cliccare *Insert Step* nella parte sinistra della finestra. Lo step verrà aggiunto in posizione successiva allo step selezionato.
- E' possibile modificare le temperature e la durata degli step dal grafico o nel testo scritto sotto con un doppio clic.
- Controllare che nello step di annealing il simbolo della macchina fotografica sia presente nel grafico e la scritta *+ Plate Read* sia presente nel testo. In caso contrario, aggiungerli cliccando *Add Plate Read to Step*.
- Cliccare OK. Salvare il nuovo protocollo.

## Selezionare/modificare un protocollo esistente

- E' possibile importare un profilo termico dai profili salvati e conservati nel PC (\*.pcrd): per ottenere ciò, cliccare *Select Existing* nella pagina *Protocol, Run Setup*.
- Se si vuole modificare un protocollo esistente, cliccare *Select Existing* e *Edit Select*. Procedere quindi come descritto sopra.



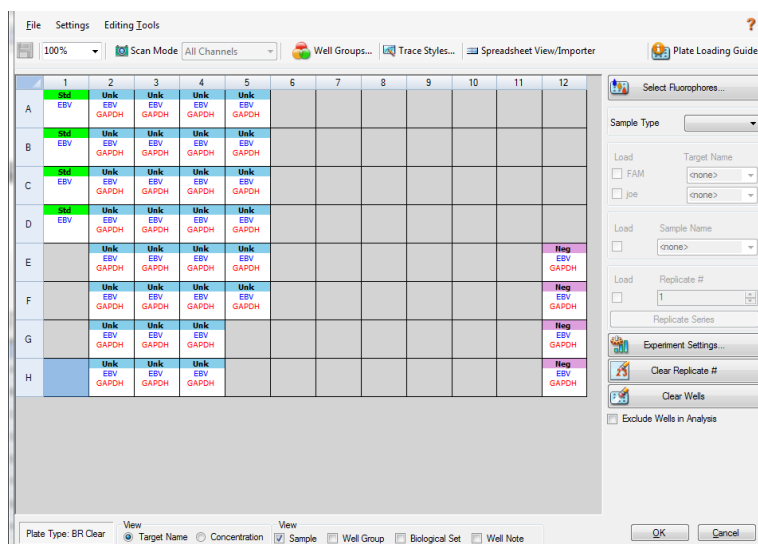
## PIASTRA

Selezionare *Plate* nella finestra *Run Setup*.

E' possibile creare una nuova piastra o selezionare/modificare una piastra esistente.

### Creare una nuova piastra

- *Plate* → *create New*
- Si apre la finestra *Plate Editor – new*
- Impostare il tipo di piastra selezionando *Settings* → *View/Edit Plate* → *Settings* → *Plate Type* e spuntare *BR Clear*
- Selezionare *Scan Mode* → *All channels*
- Cliccare *Select Fluorophores* per scegliere i fluorofori e selezionare il canale FAM e JOE/HEX (se non è presente JOE, selezionare il fluoroforo equivalente HEX).
- Selezionare i pozzetti
- Impostare *Sample Type* → *Unknown*, *Standard*, *Positive* o *NTC* a seconda della tipologia di campione
- Scrivere in *Target Name* il nome del fluoroforo e cliccare *load* per associare i fluorofori ai pozzetti, EBV per FAM e GAPDH per JOE/HEX. Tutti i campioni verranno analizzati per FAM e JOE/HEX, mentre il Controllo Positivo e i punti della curva standard (laddove venisse scelta l'opzione di Analisi Quantitativa) saranno analizzati solo per FAM.
- Scrivere in *Sample Name* il nome del campione e cliccare *load* per associare il nome ai pozzetti.
- Per i calibratori inserire i corrispondenti valori di concentrazione riportati nell'etichetta interna alla scatola del lotto di appartenenza. Spuntare la casella "Load" per confermare.
- *Cliccare OK. Salvare la piastra.*



### Selezionare/modificare una piastra esistente

- E' possibile importare una piastra dai profili salvati e conservati nel PC (\*.pcrd): per ottenere ciò, cliccare *Select Existing* nella pagina *Plate*.
- Se si vuole modificare una piastra esistente, cliccare *Select Existing* e *Edit Select*. Procedere quindi come descritto sopra.

### INIZIO DELLA SEDUTA

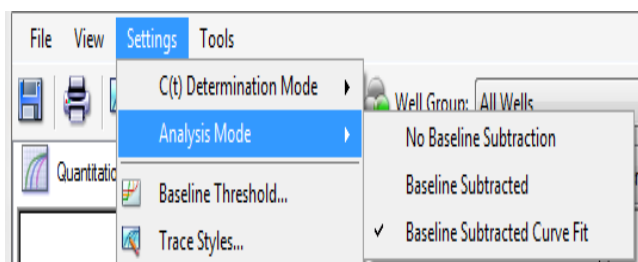
- Selezionare nella pagina *Run Setup, Start Run*.
- Lo strumento è ora pronto per lavorare. Preparare le piastre/strips con i campioni e le mix.
- Aprire il coperchio cliccando il pulsante *Open Lid* e sistemare la piastra/strip nello strumento; chiudere il coperchio cliccando il pulsante *Close Lid*.
- Cliccare *Start Run* per iniziare la seduta.
- Si apre la finestra *Run Details*. Spostarsi nella pagina *Real Time Status* per monitorare l'andamento del dato grezzo della seduta.

### ANALISI DEI DATI

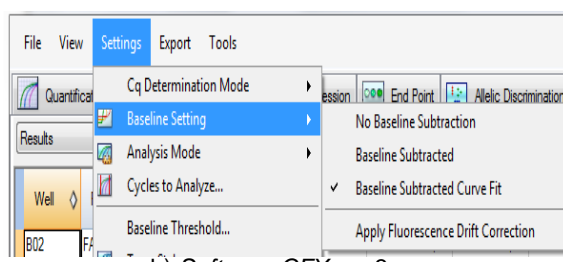
Al termine della seduta si apre automaticamente la finestra *Data Analysis* → *Quantification*. Per escludere un campione/calibratore dall'analisi, andare in "*plate setup-view/edit plate*" (in alto a destra nella schermata), selezionare il pozzetto corrispondente e spuntare la casella "*Exclude well in analysis*" in basso a destra

In alto a sinistra selezionare *Settings* e impostare:

- *Cq determination mode: single threshold*
- *Settings – analysis mode (ver 1.6)/ Baseline Setting (ver.3.x): Baseline subtracted curve fit (per CFX Manager ver. 1.6 e seguenti)*



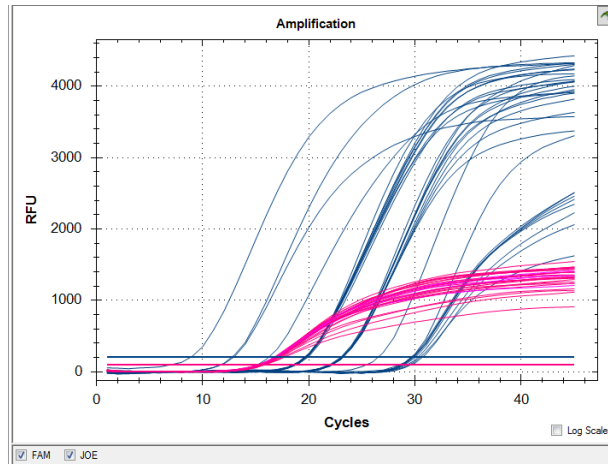
a) Software CFX ver 1.6



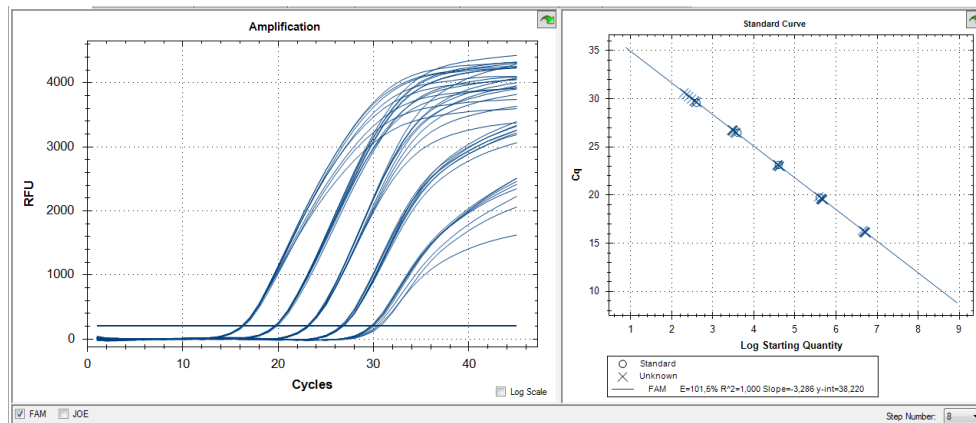
b) Software CFX ver 3.x

Per l'impostazione della threshold selezionare un fluoroforo per volta:

- **FAM:** *Baseline threshold, Single Threshold-User defined*-impostare il valore 200, cliccare OK.
- **JOE/HEX:** *Baseline threshold: Single Threshold-User defined*-impostare il valore 100, cliccare OK.



## Analisi Quantitativa

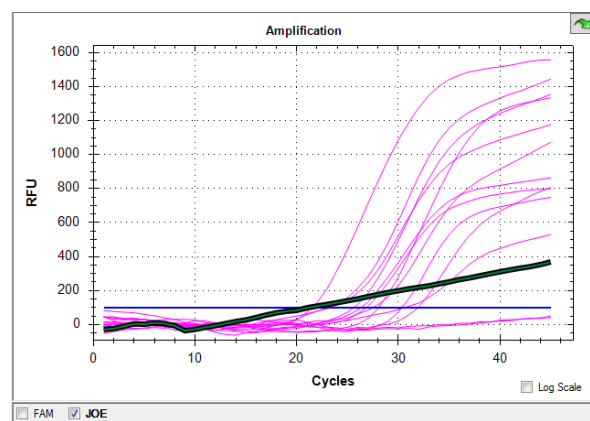


Il grafico sulla sinistra mostra il dato di amplificazione, il grafico a destra mostra la curva standard.

- Per creare un report finale digitare “*Tools → Reports*” e selezionare/deselezionare le informazioni di interesse.

**AVVERTENZE:** per una corretta interpretazione dei risultati, prestare *sempre* attenzione al grafico della seduta.

**Esempio:** nella figura sotto riportata il campione evidenziato in verde sembra mostrare un Ct positivo, ma dal dato grafico si evidenzia un artefatto strumentale. Il valore trovato di Ct non deve essere preso in considerazione ed il campione deve essere ripetuto.



## ABI 7500 FAST

- Aprire il relativo software (versione 2.x) e cliccare *Advanced Setup* nella parte sinistra dello schermo: si apre una nuova finestra.
- Nel menù *Setup*, a sinistra, selezionare *Experiment Properties*, inserire il nome dell'esperimento e selezionare lo strumento *7500 Fast (96 wells)*, *Quantitation Standard Curve*, *TaqMan Reagents* e *Standard (2 hours to complete a run)*.

The screenshot displays the 'Advanced Setup' window of the ABI 7500 FAST software, divided into three sections:

- What type of experiment do you want to set up?**
  - Buttons: Quantitation - Standard Curve (selected), Quantitation - Relative Standard Curve, Quantitation - Comparative Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ), Melt Curve, Genotyping, Presence/Absence.
  - Text: Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples.
- Which reagents do you want to use to detect the target sequence?**
  - Buttons: TaqMan® Reagents (selected), SYBR® Green Reagents, Other.
  - Text: The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence.
- Which ramp speed do you want to use in the instrument run?**
  - Buttons: Standard (~ 2 hours to complete a run) (selected), Fast (~ 40 minutes to complete a run).
  - Text: For optimal results with the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends using standard reagents for your PCR reactions.


## IMPOSTAZIONE DELLA PIASTRA

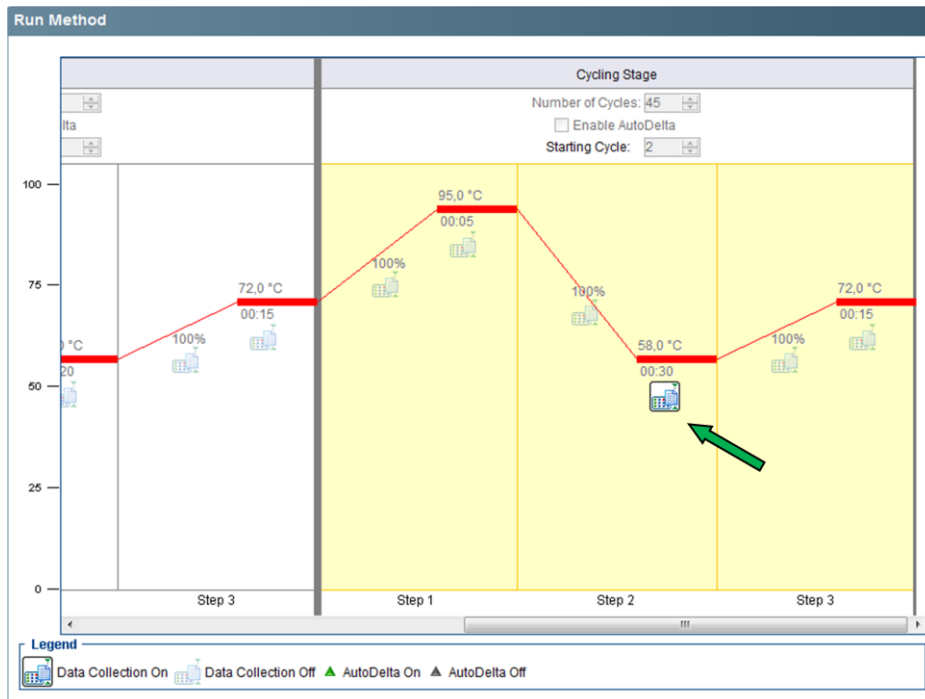
- Nel menù *Setup*, a sinistra, selezionare *Plate Setup*
- Selezionare *define targets and samples* in alto.
- Nella parte sinistra della pagina (define targets) selezionare *add new target* e inserire il nome del target; dal menù a tendina selezionare *FAM* (per EBV) come reporter e *NFQ-MGB* (*non-fluorescence quencer-minor groove binder*) come quencher e un colore. Ripetere l'operazione ma inserendo *JOE/HEX* (per GAPDH) come reporter.
- Nella parte destra della pagina (define samples) selezionare *add new sample* per ogni campione che si deve analizzare e inserire *il nome del campione*.
- Selezionare *assign targets and samples* in alto.
- Selezionare le posizioni utilizzate per la seduta nella piastra e associare il fluoroforo, spuntando il target a sinistra (assign). Indicare anche alla voce *Task* il tipo di campione che si analizza in quella determinata posizione: *Positive control*, *NTC* o *Unknown* (per i campioni) o prevedere anche le posizioni per gli *Standard* nel caso di analisi quantitativa.
- Per l'analisi quantitativa: selezionare i pozzetti destinati ai calibratori e cliccare "S" nella finestra "Task", impostare quindi la concentrazione nella casella dedicata "Quantity" a destra. Cliccando su *Analyse*, il software assegnerà un valore espresso in UI/ml.
- Selezionare *NONE* alla voce *select the dye to use as the passive reference*

## PROFILO TERMICO

- Selezionare a sinistra *Run Method*.
- Selezionare *Graphical View* in alto.
- Inserire 30  $\mu$ l come *Reaction volume per well*.
- Impostare il profilo termico specifico
- Selezionare dal menù a tendina *Add stage* Holding o *Cycling* per aggiungere uno stage, mentre per aggiungere Step nel medesimo stage utilizzare il menù *Add Step*.
- Rampe: Tutte le rampe vanno lasciate al 100% come da impostazione predefinita.
- Impostare l'acquisizione del segnale di fluorescenza solo in fase di annealing nei cicli di PCR.
- Lasciare deselezionato *Enable AutoDelta*

Cycle	Cycle Point
45°C, 5 min	
95°C, 3 min	
Cycling (5 repeats)	95°C, 5 sec
	58°C, 20 sec
	72°C, 15 sec
Cycling (45 repeats)	95°C, 5 sec
	<b>58°C, 30 sec; Plate Read*</b>
	72°C, 15 sec

\*Data collection on  (icona attivata)



- Verificare nella finestra *Run* e controllare che *l'Instrument Status* risulti connesso: lo strumento è quindi pronto per lavorare.

## AVVIO DELLA SEDUTA

- Preparare la piastra con i campioni e la mix, sigillarla con cura facendo attenzione a non creare bolle d'aria. Centrifugare la piastra qualche secondo per eliminare eventuali bolle nei pozzetti che potrebbero falsare la lettura.
- Aprire lo strumento e posizionare la piastra sul supporto, con la posizione A1 in alto a sinistra.
- Per ogni eventuale altra indicazione, fare riferimento al manuale d'uso dello strumento.
- Salvare la seduta.
- Per salvare il template, selezionare *File, Save as template*. Nelle sedute successive sarà così possibile richiamare e modificare il template selezionando *File, New experiment, From template*.
- Premere *Start* per cominciare.

## ANALISI DEI DATI

- Selezionare Analysis a sinistra della pagina.
- Per visualizzare le curve di amplificazione, in Plot settings selezionare *Amplification plot* ed impostare plot type: *dRn vs Cycle*, graph type: *Linear* e color: *target*
- Se si desidera visualizzare un target alla volta, in Options scegliere il target d'interesse
- Per modificare Baseline e Threshold, selezionare nel pannello in alto *Analysis Settings* ed aprire la finestra *Ct Settings*, a questo punto selezionare il *Target* che si desidera modificare:
  - de-selezionare *Use Default Settings*
  - impostare i seguenti parametri:

	<b>Piastra</b>	<b>Strip</b>
<b>FAM</b>	200.000	100.000
<b>JOE/HEX</b>	60.000	15.000
<b>Autobaseline selection</b>	<b>NO (Start=3; End=15)</b>	<b>NO (Start=3; End=15)</b>

- selezionare *Apply Analysis Settings*.

- cliccare sempre *Reanalyse*
- Nella finestra *View Well Table* è possibile visualizzare Ct e Titoli di ciascun campione.
- Cliccando su Standard Curve a sinistra è possibile visualizzare le caratteristiche della corsa in termini di efficienza di reazione, nel caso in cui si sia scelta l'opzione di Analisi Quantitativa; diversamente sarà possibile valutare la corsa sulla base dei Ct dei campioni e del Controllo Positivo (analisi qualitativa).
- Per generare un Report, cliccare su "Print Report" e selezionare le informazioni di interesse.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per ogni tipologia di campione interpretare come segue:

	<b>Fam Ct</b>	<b>JOE/HEX Ct</b>	<b>Interpretazione</b>
<b>Campione</b>	Presente	Presente	EBV rilevato- risultato valido
	Assente	Presente	EBV non rilevato – risultato valido
	Presente/Assente	Assente	Ripetere il test*

	<b>Fam Ct</b>	<b>JOE/HEX Ct</b>	<b>Interpretazione</b>
<b>Controllo Positivo/ Calibratori</b>	Presente	Non rilevato	Risultato valido
	Assente	Assente	Risultato non valido**

(\*) In caso di campione scarsamente cellularizzato (CSF), aggiungere 15 µl di ex IC in fase di estrazione.

(\*\*) L'assenza di segnale nel Controllo Positivo e/o nei calibratori è imputabile a possibile degradazione del DNA target e/o presenza di errori procedurali.

Se nella seduta viene analizzato anche il No Template Control (NTC), interpretare i risultati come segue:

	<b>FAM Ct</b>	<b>JOE/HEX Ct</b>	<b>Interpretazione</b>
<b>No Template Control (NTC)</b>	Assente	Assente	Risultato Valido
	Assente	Presente	Risultato Non Valido*
	Presente	Presente	Risultato Non Valido *

(\*) Ipotesi di contaminazione

In caso di contaminazione è importante risalire all'origine (fase di estrazione e/o PCR). L'utilizzo dei controlli forniti può essere d'aiuto per assicurare le corrette prestazioni del test e per identificare l'origine di tale problema.

#### ANALISI QUANTITATIVA

- Affinché la seduta sia ottimale prestare attenzione alla curva standard. Nel grafico ad essa relativo è indicata la Slope e la Efficienza di reazione. Per un'efficienza del 100%, la slope è - 3.32. Una buona reazione dovrebbe avere un'efficienza compresa tra 90% e 110% e una slope compresa tra -3.58 e - 3.10.
- Se la retta di interpolazione non si adatta bene ad uno dei quattro calibratori (ad es. in presenza di un Ct al di fuori del corrispondente RANGE di accettabilità riportato all'interno della confezione), quel calibratore può essere escluso dall'analisi in modo da ottenere una migliore approssimazione della retta stessa ai punti rimanenti; questo permette una quantificazione più precisa dei campioni, senza alterare il significato clinico del risultato.
- Se la retta di interpolazione non si adatta a più di un calibratore, la curva standard non può essere utilizzata e la seduta va ripetuta.
- I valori di concentrazione che ricadono all'esterno dell'intervallo lineare del saggio non possono essere considerati accurati, pertanto devono essere interpretati con cautela. Se la concentrazione calcolata è al di sopra del limite superiore di rilevazione, riportare il risultato come EBV DNA > 4,5E+08 UI/ml. Se si vuole ottenere un risultato più accurato, il test va ripetuto utilizzando il campione di partenza diluito con un campione negativo della stessa matrice. Moltiplicando per il fattore di diluizione applicato, si otterrà la concentrazione iniziale.
- Qualora per un campione la concentrazione (UI/ml) del target fosse inferiore al limite di rilevazione, la riproducibilità del risultato positivo non è garantita.



## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

### Specificità Diagnostica

La specificità del kit EBV REAL TIME è stata determinata analizzando 95 campioni di sangue, plasma, e CSF negativi per EBV, secondo il manuale d'uso .

In accordo con i dati ottenuti, la specificità del kit è pari al 100%

### Sensibilità analitica

#### 1) Sangue intero

La sensibilità è stata determinata analizzando quattro diluizioni scalari del Primo Standard Internazionale EBV WHO (NIBSC codice 09/260). Per le diluizioni è stato utilizzato un campione di sangue negativo per EBV DNA. L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, estrazione compresa. Nelle tabelle sottostanti, sono indicati i limiti di rilevazione per EBV REAL TIME nel sangue intero.

QIASymphony AA1439/192:

Diluizioni	Positivi/Repliche	Frequenza positivi
50 IU/ml	20/20	100%
25 IU/ml	17/20	85%
8,3 IU/ml	12/20	60%
4,2 IU/ml	5/20	25%
<b>LOD= 36,35 IU/ml</b>		

Tabella 1 Analisi Probit effettuata utilizzando il programma XLStatPlus 2014

MagCore AA1185:

Diluizioni	Positivi/Repliche	Frequenza positivi
100 IU/ml	20/20	100%
50 IU/ml	16/20	80%
25 IU/ml	12/20	60%
8,3 IU/ml	5/20	25%
<b>LOD= 74,82 IU/ml</b>		

Tabella 2 Analisi Probit effettuata utilizzando il programma XLStatPlus 2014

#### 2) Plasma

La sensibilità è stata determinata analizzando quattro diluizioni scalari del Primo Standard Internazionale EBV WHO (NIBSC codice 09/260). Per le diluizioni è stato utilizzato un campione di plasma negativo per EBV DNA. L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, estrazione compresa. Nella tabella sottostante, è indicato il limite di rilevazione per EBV REAL TIME nel plasma.

QIASymphony AA1440/96:

Diluizioni	Positivi/Repliche	Frequenza positivi
500 IU/ml	20/20	100%
250 IU/ml	19/20	95%
125 IU/ml	17/20	85%
62,5 IU/ml	10/20	50%
<b>LOD= 212,06 IU/ml</b>		

Tabella 3 Analisi Probit effettuata utilizzando il programma XLStatPlus 2014

### Intervallo di linearità

Per valutare l'intervallo di linearità di quantificazione del dispositivo sono stati preparati 8 punti di diluizioni seriali partendo da un template sintetico di EBV DNA (calibrato con il 1<sup>st</sup> WHO International Standard NIBSC 09/260) diluito in plasma e sangue umano EBV negativo. L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, con entrambe le estrazioni, utilizzando due differenti lotti di reagenti. Per ciascun punto di diluizione sono state testate 12 repliche.

L'ultimo punto di diluizione cambia in base alla matrice e al tipo di estrazione, in quanto sangue intero e plasma presentano una sensibilità analitica significativamente differente

Diluizione	Sangue	Plasma
	Titolo (UI/ml)	Titolo (UI/ml)
A	$4,5 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
B	$4,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$
C	$4,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
D	$4,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
E	$4,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
F	$4,5 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$
G	$4,5 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$
H	2,25 $\times 10^2$ per AA1185 9,0 $\times 10^1$ per AA1439/192	/

Tabella 4

Come mostrato nelle figure sottostanti (Figura 1 e Figura 2), il kit EBV REAL TIME ha fornito una risposta lineare nel sangue da  $9,0E+01$  UI/ml fino ad almeno  $4,50E+08$  UI/ml, utilizzando come criterio di accettazione il valore  $\pm 0,3 \log_{10}$ . Nel plasma la risposta lineare con il medesimo criterio di accettazione è compresa tra  $4,5E+02$  UI/ml e  $4,50E+08$  UI/ml (Figura 3).

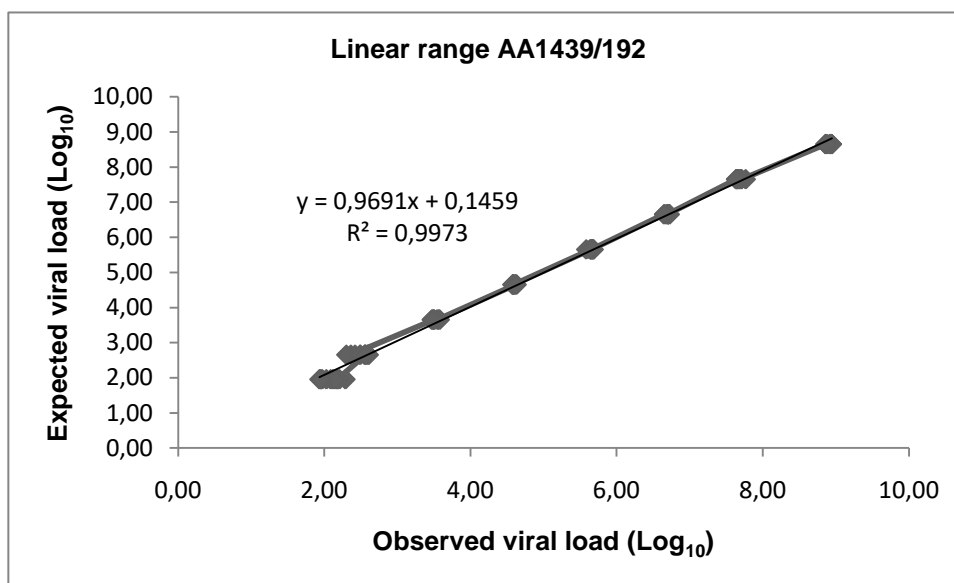


Figura 1 Intervallo di linearità con QIASymphony cod. NLM AA1439/192

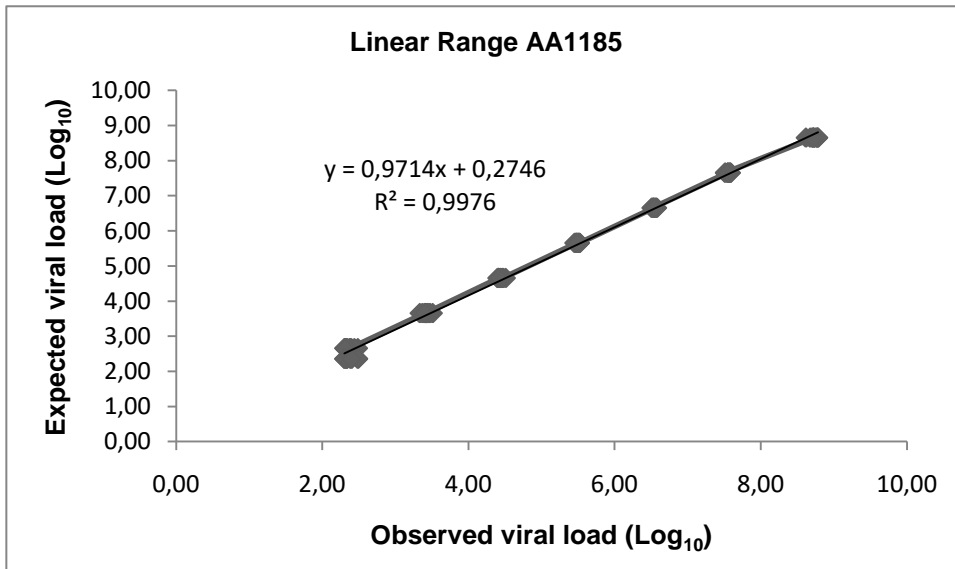


Figura 2 Intervallo di linearità con MagCore cod. NLM AA1185

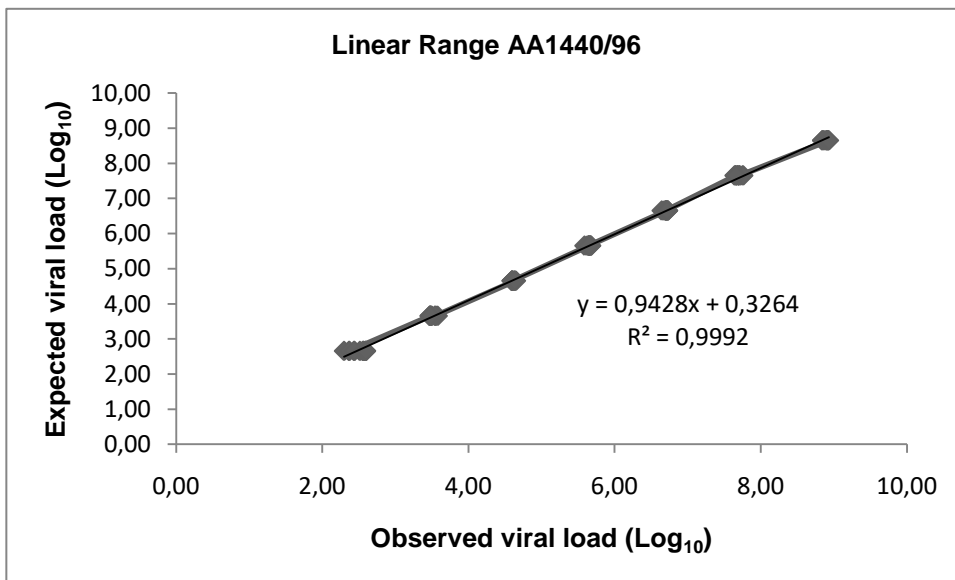


Figura 3 Intervallo di linearità con QIASymphony cod. NLM AA1440/96

## Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit EBV REAL TIME è stata valutata analizzando 75 campioni a positività nota, estratti con cod. NLM AA1185, AA1186, AA1439/192 o AA1440/96 ed amplificati con CFX.

Alla luce dei risultati ottenuti, la sensibilità diagnostica del dispositivo è pari al 100%.

## Marcatori potenzialmente cross reattivi

Per valutare la potenziale cross reattività di EBV REAL TIME con altri patogeni sono stati analizzati 24 campioni provenienti da pazienti infetti, positivi per virus appartenenti alla famiglia degli Herpesvirus, ma diversi da EBV.

Altri patogeni	N° di campioni	Positivi con EBV Real-Time AA1572/48
CMV	6	0/6
BKV	3	0/3
HHV-6	4	0/4
HSV-1	3	0/3
HSV-2	4	0/4
VZV	4	0/4

Tabella 5

Tutti i campioni hanno dato il risultato atteso. EBV REAL TIME non presenta cross-reattività con altri Herpesvirus

## Precisione

### Precisione intra-saggio

La precisione intra-saggio è stata valutata utilizzando 4 campioni di sangue positivi con titoli differenti.

Due differenti operatori hanno testato tre replicati per ogni punto di diluizione utilizzando lo stesso lotto di reagenti. I risultati delle prove di precisione intra-saggio sono riportati nella tabella sottostante.

Titolo IU/ml	1,20E10+05	1,00E+04	1,00E+03	3,00E+02
CV%	6,48	7,04	9,70	9,54

Tabella 6

### Precisione inter-saggio

La precisione inter-saggio è stata valutata utilizzando gli stessi campioni usati per la precisione intra-saggio.

Due differenti operatori hanno testato tre repliche per ogni punto di diluizione in differenti sedute eseguite in diversi giorni, utilizzando tre differenti lotti di reagenti.

L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, usando indifferentemente entrambe le estrazioni; in questo modo la precisione è stata valutata per tutti i passaggi della procedura.

I risultati delle prove di precisione inter-saggio sono riportati nella tabella sottostante.

Titolo IU/ml	1,20E10+05	1,00E+04	1,00E+03	3,00E+02
CV%	5,14	5,69	11,27	8,17

Tabella 7

### Tasso globale di errore del sistema che porta a risultati falsi-negativi

Per valutare la possibilità della presenza di falsi negativi sono stati analizzati 112 campioni, con titolo circa 3 volte superiore al limite di rilevazione:

I risultati sono riportati nella tabella seguente, con un tasso globale di errore <1%

<b>Positive results</b>	112
<b>Negative Results for Positive Sample</b>	0

Tabella 8

### Cross-contaminazione

L'assenza di cross-contaminazione fra i campioni per l'intero flusso di lavoro è stata dimostrata analizzando 30 campioni di diversa matrice in due differenti corse come da metodica, alternando campioni ad alta carica virale e campioni negativi.

Tutti i campioni negativi testati hanno dato il risultato atteso negativo.

Il test EBV REAL TIME non ha evidenziato alcuna cross-contaminazione fra i campioni.

### SOSTANZE INTERFERENTI

Dati non disponibili.

### Confronto con il sistema EBV ELITE MGB® Kit in campioni della routine

Le prestazioni del dispositivo EBV REAL TIME sono state confrontate con quelle del sistema **EBV ELITE MGB® Kit** mediante l'analisi di 53 campioni provenienti dalla routine di un ospedale. L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, estrazione inclusa.

I risultati ottenuti mostrano una buona correlazione tra i due dispositivi, come rappresentato nella figura di seguito riportata:

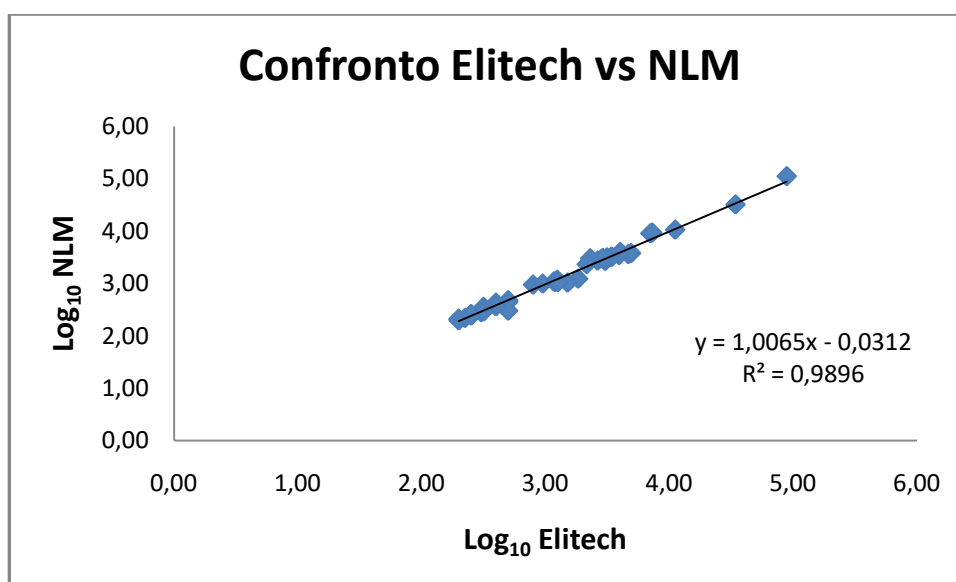












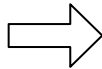


Figura 4

						
Numero di lotto	Codice	Limiti di temperatura	Usare entro	Monouso	Controllo Positivo	Consultare le istruzioni per l'uso
						
Conformità Europea	Prodotto da	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	Contenuto sufficiente per <x> tests	No Template Control	Testo modificato rispetto alla precedente versione	

# Instructions for Use

ver. 1 - 02/04/2021

Molecular Biology

Extraction not included

## EBV REAL TIME

	AA1572/48 GA031/2	
	48 TEST 2 TEST	
GMDN	49653	



### NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

HEADQUARTER: Via Cascina Conighetto – BUSINESS OFFICES: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALY

Phone: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: [www.nlm.it](http://www.nlm.it) - E-MAIL: [segreteria@nlm.it](mailto:segreteria@nlm.it)

ISO 9001 Quality Management System Organization certified and ISO 13485 Medical Sector Quality Management System certified (IMQ certification body - CSQ certification).

## INTENDED USE

**EBV REAL TIME** provides reagents for the qualitative determination of the human Epstein-Barr Virus (EBV DNA) in blood, plasma and CSF specimens, and for qualitative and quantitative determination in blood and plasma samples by Real Time PCR.

- Qualitative analysis involves the use of a Positive Control for the amplification step and of a Negative Control (NTC) that can be extracted together with the samples or directly amplified.
- Quantitative analysis involves the use of **EBV REAL TIME** kit together with **EBV Standard curve** kit (NLM code GA031/2), supplied separately.

This product is validated and compatible with the extraction kit on column (NLM code AA1001) and the most common automatic extraction systems: MagCore (NLM code AA1185 and NLM code AA1186), QiaSymphony (NLM code AA1440/96 and NLM code AA1439/192).

For Real Time PCR validated and compatible instruments are: CFX 96 (BioRad), ABI7500 Fast (Applied Biosystems) and RotorgeneQ (Qiagen).

**EBV REAL TIME** is indicated, together with the other laboratory parameters and the medical case of the patients, for the clinical management of EBV patients.

The test can be used both for a qualitative analysis and to evaluate the response to pharmacological treatment, expressed by the variation of the amount of viral DNA in biological samples.

The device includes the use of the enzyme Uracil-N-Glycosidase (UNG) to prevent contamination and false positive results.

The kit is to be considered for professional use only.

## INTRODUCTION

Herpesvirus type-4, or Epstein Barr Virus (EBV), is a double-stranded DNA virus with a 170 kb genome. EBV infects 90% of the world's adult population (Santpere et al., 2014). Primary infection occurs at an early age, often asymptomatic in children, while it causes infectious mononucleosis (IM) in young adults. EBV preferentially attacks B lymphocytes; it remains latent for a long time in the form of episomes resident in the nucleus of the host cell. During this phase only 6 nuclear proteins (including EBNA-1) and 3 membrane proteins are expressed.

EBNA1 is the only protein required for latent viral replication and segregation. These functions require EBNA1 to bind to the specific replication origin for latency, called oriP (Mansouri et al., 2014). EBV infection is related to complex diseases, including multiple sclerosis and various types of cancer, including Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma or nasopharyngeal carcinoma and gastric carcinoma. EBV is also one of the causes of post-transplant lymphoproliferative disorders, associated with a high rate of morbidity and mortality in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Therefore, the quantification of the viral load becomes crucial, through nucleic acid amplification techniques (NAT) (Fryer et al., 2016).

## REFERENCES

1. María Dolores Fellner et al., **Duplex realtime PCR method for Epstein–Barr virus and human DNA quantification: its application for post-transplant lymphoproliferative disorders detection**, *brazjinfectedis.2014*; 18(3):271–280
2. Roberta M. Madej et al., **International Standards and Reference Materials for Quantitative Molecular Infectious Disease Testing** *Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 12, No. 2, March 2010*
3. J. Styczynski et al. , **Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines**, *haematologica* | 2016; 101(7)
4. Gabriel Santpere et al., **Genome-Wide Analysis of Wild-Type Epstein–Barr Virus Genomes Derived from Healthy Individuals of the 1000 Genomes Project**, *Genome Biol. Evol.* 6(4):846–860
5. Jacqueline F. Fryer et al., **A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques**, *Biologicals* 44 (2016) 423e433
6. Myung-Soo Kang et al., **Epstein–Barr virus latent genes**, *Experimental & Molecular Medicine* (2015) 47, e131



7. Ming-Han Tsai et al., **The biological properties of different Epstein-Barr virus strains explain their association with various types of cancers**, *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 6), pp: 10238-10254
8. Servi J. C. Stevens et al., **Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus DNA in Clinical Specimens by Rapid Real-Time PCR Targeting a Highly Conserved Region of EBNA-1**, *Methods in Molecular Biology*, vol. 292: *DNA Viruses: Methods and Protocols*
9. D. E. Tsai et al., **EBV PCR in the Diagnosis and Monitoring of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder: Results of a Two-Arm Prospective Trial**, *American Journal of Transplantation* 2008; 8: 1016–1024
10. Mansouri Sheila et al., **Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein Regulates Viral Latency through Effects on let-7 MicroRNA and Dicer**, *Journal of Virology* p. 11166 –11177 October 2014 Volume 88 Number 19

## PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The test is based on Real-Time PCR technique that includes two steps:

1. Viral DNA Extraction
2. Amplification and detection of the target sequence by Real Time PCR

The Internal Control (GAPDH DNA) is purified with the target and allows to monitor the assay. In case of poorly cellularised matrix (CSF and, sometimes, plasma) it is possible to add the exogenous Internal Control directly to the sample before the extraction step.

Two different controls are supplied: a negative control, for the extraction and amplification steps, and a positive control specific only for the PCR phase.

For quantitative analysis a panel of four calibrators is provided in liquid ready-to-use form, supplied separately (NLM code GA031/2).

### 1. DNA Extraction

The DNA of EBV and Internal Control (IC) can be extracted by different kind of specimens (blood, plasma, cerebrospinal fluid), using manual extraction through column system (NLM code AA1001) or by automatic system like MagCore (NLM code AA1185 and-NLM code AA1186) with QIASymphony instrument (NLM code AA1439/192 and NLM code AA1440/96).

### 2. Amplification and Detection

#### Specific target for the amplification

The amplification and the detection of the **EBNA1 gene of EBV** (Epstein-Barr nuclear antigen 1) allows to determine the viral DNA presence (amplicon: 181 bp).

At the same time the device amplifies the intron 2 of GAPDH gene (amplicon: 234 bp) as endogenous or exogenous Internal Control.

The Internal control is extracted and amplified in each sample to monitor the whole procedure.

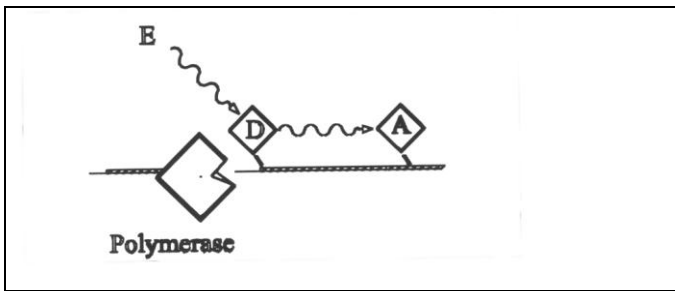
The positive control and calibrators consist of cloned synthetic DNA of EBNA1 gene and are supplied in liquid ready-to-use form.

#### Amplification

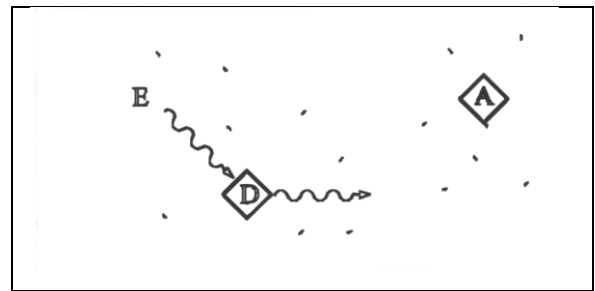
Following the extraction step DNA of EBV and IC is amplified by Real-Time PCR, using appropriate enzymes and specific reagents.

#### Detection

The test is based on Real Time PCR technique that allows to monitor in real time the amplification of the target sequences using appropriate probes marked with fluorescent molecules. In the amplification mix there are two specific probes respectively for the viral genome target region and for a human genome region that acts as Internal Control (GAPDH), each labeled with a donor fluorophore and a fluorophore acceptor (according to the "dual labeled" chemistry probe). The donor fluorophore is different for the two probes: FAM for EBV and JOE/HEX for IC. In the presence of a light source, when the probes are intact the fluorescence emitted by the donor fluorophore is absorbed by the acceptor fluorophore. During amplification, the probes pair up each to their specific target and subsequently are degraded by the 5' → 3' exonuclease activity of the DNA polymerase. When the donor and acceptor fluorophores are separated, the donor fluorescence can be detected at its specific wavelength: in this way the amplification of the viral DNA and IC can be monitored during the reaction.



a) Energy (E) emitted from the “donor” fluorophore (D) is absorbed by the “acceptor” (A) fluorophore.



b) The exonuclease activity of the DNA polymerase separates the fluorophore D from the fluorophore A through hydrolysis with a consequent increase in the fluorescence signal.

## REAGENTS COMPOSITION (Store at -25/-15°C)

AA1572/48	Quantity
<b>EBV Mix</b> (including primers, probes, amplification enzyme and UNG)	2 x 500 µl
<b>Positive Control (CP EBV)</b> (synthetic DNA of target region; liquid ready-to-use form)	2 x 30 µl
<b>No template Control (NTC)</b> (Water to be used as NTC from extraction step)	2 x 700 µl
<b>Exogenous Internal Control (exIC)</b> (Synthetic DNA of IC; liquid ready-to-use form)	2 x 350 µl

GA031/2	Quantity
<b>EBV Standard curve</b>	<b>2 set</b>
CALIBRATORE 1 EBV (Synthetic DNA, liquid ready-to-use form)	2 x 30 µl
CALIBRATORE 2 EBV (Synthetic DNA, liquid ready-to-use form)	2 x 30 µl
CALIBRATORE 3 EBV (Synthetic DNA, liquid ready-to-use form)	2 x 30 µl
CALIBRATORE 4 EBV (Synthetic DNA, liquid ready-to-use form)	2 x 30 µl

The components volumes show above refer to the standard size of the kit.

Reduced packaging of the kit are available on request for evaluation and/demonstration of the product.

## STABILITY AND STORAGE

- EBV Mix, NTC, Exogenous Internal Control, CP and Calibrators are stable until the expiration date on the label when stored at the indicated temperature (-25/-15° C).
- Thaw all reagents on ice or at +2/+8° C.
- Mix can be subjected to maximum of five freeze-thawing cycles. Prepare aliquots if more freeze-thawing cycles are expected.
- The probes in the EBV Mix are photosensitive: avoid prolonged exposure to light.
- Positive control and calibrators are ready to use; it is recommended to dispense them into the tubes / amplification plate after the samples, to avoid possible contamination. Each aliquot is disposable: after the first use discard the remaining volume.

## PRECAUTIONS

- Only professional and opportunely trained personnel should carry out the procedure using good laboratory practices and common protective equipment.
- The use of the following solutions, together with the presence of UNG enzyme, allows to minimize the risk of cross-contamination:
- It is recommended to perform the assay in two different areas:

- Area 1: pre-PCR (samples handling, extraction and PCR set up)

Pay attention not to contaminate the reagents during handling.

- Area 2: post-PCR (Real Time PCR)

Each area should be provided with dedicated equipment and consumables (lab coats, centrifuge, tubes, pipettes, etc).

- Workspace should be organized to ensure that the workflow occurs in one direction, from pre-PCR area to post-PCR area.
- At the end of the procedure it's recommended to clean the working surfaces (bench and vertical downflow airbox) with 5-10% bleach (final concentration of sodium hypochlorite: 0,5% w/v), freshly prepared. Follow the manufacturer recommendations to clean the instruments.
- All disposable items (tips and tubes) must be DNase, RNase free. Use aerosol-resistant pipette tips to avoid pipettes contamination. Use a new tip every time a volume is dispensed.
- Use vertical downflow airbox with UV lamp
- Change gloves frequently
- The absence of contamination can be monitored by the use of the NTC in each run, starting from the purification step.
- Discard all used material in accordance with local and national regulations in force.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where reagents or specimens are handled.
- In case of contact with reagents rinse immediately with water and seek medical advice.
- Do not use device after its expiration date.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not use the device if the box is damaged; contact the supplier.
- It is advisable to have constant and uniform laboratory temperature, avoid to place the instruments near heating/cooling sources that may compromise the right working.

## **MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

### **AREA 1**

DNA extraction kit

Vertical downflow airbox

Dedicated adjustable volume pipettes set and aerosol barrier tips

Filter tips

2 ml and 1.5 ml DNase, RNase free tubes

### **AREA 2**

EBV Standard Curve (NLM code GA031/2) for quantitative analysis

Vertical downflow airbox

Dedicated adjustable volume pipettes set

Aerosol barrier tips DNase, RNase free

DNase, RNase free tubes, strips or plates, specific for the Real Time PCR instrument used

Real Time PCR Instrument

## **COLLECTION AND STORAGE**

- Whole blood and plasma samples must be prepared and stored according to laboratory directions.

Unless otherwise stated, it is suggested to store at +2/+8° C for up to three days and do not freeze them to avoid cell lysis and loss of bacterial DNA titre. It is also advised not to freeze for plasma separation from whole blood samples.

- Cerebrospinal fluid samples: they must be prepared and stored according to the the laboratory instruction. Store at -25/-15° C.

## ASSAY PROCEDURE

### VIRAL DNA EXTRACTION

#### Extraction methods:

- MANUAL EXTRACTION **cod. NLM AA1001**.
- AUTOMATIC EXTRACTION **cod. NLM, AA1185, AA1186, AA1439/192 and AA1440/96**.

For preparation, use and disposal of the reagents, refer to the specific instructions for use. The possible specimen to use are: EDTA whole blood, plasma, cerebrospinal fluid. For samples preparation it is necessary to follow the protocol concerning the specific method.

For beginning and elution volumes refer to table below:

Extraction method	Beginning volume	Elution volume
Manual extraction (cod. NLM <b>AA1001</b> ).	200 µl	100 µl
Automatic extraction with MagCore (Diatech/MGB 400-02, cod. NLM <b>AA1185</b> e Diatech/ MVN400-04, cod. NLM <b>AA1186</b> )	400 µl	100 µl
Automatic extraction with QIASymphony (Qiagen/937055, cod. NLM <b>AA1440/96</b> – protocollo <b>Cell free 500</b> )	700 µl	110 µl
Automatic extraction with QIASymphony (Qiagen/931236,-cod. NLM <b>AA1439/192</b> – protocollo <b>DNA Blood</b> )	300 µl	

Store the extracted DNA at -25/-15° C, if it is not used immediately for amplification.

In case of extraction from poorly cellularised matrix (CSF) it is possible to add the **Exogenous Internal Control (ex IC)**, supplied with the device.

Add 15 µl of ex IC to biological matrix with every extraction method independently from the sample volume in order to ensure the internal control amplification. In case of CMV positive sample the addition of ex IC does not affect the specific target signal.

### REAL-TIME PCR

- Set the thermal profile before preparing the mix.
- **Shake the mix well before using it.**
- Dispense 15 µl of **EBV Mix** for the number of samples to analyze and for Positive Control (for qualitative analysis) or the four calibrators (for quantitative analysis) and for NTC.
- Add 15 µl of DNA, of NTC, of PC or calibrators to the EBV Mix, and mix carefully by pipetting.

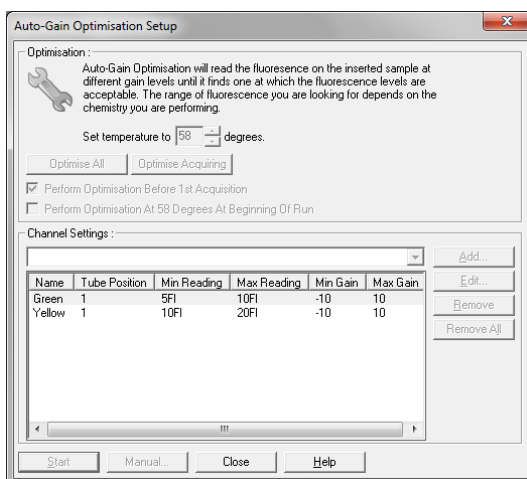
In case of QIASymphony PCR setup, centrifuge the tubes before placing into the real time instrument to collect all drops. The solution has to be placed onto the bottom of the tube

**CAUTION:** mix and dispense carefully samples and EBV Mix, avoiding the formation of bubbles. If possible, briefly centrifuge the plate or strips before placing them into the Real Time instrument. It is suggested to dispense calibrators and the positive control after the samples, to avoid cross contamination.

## RUN SET UP AND DATA ANALYSIS

### ROTORGENE Q

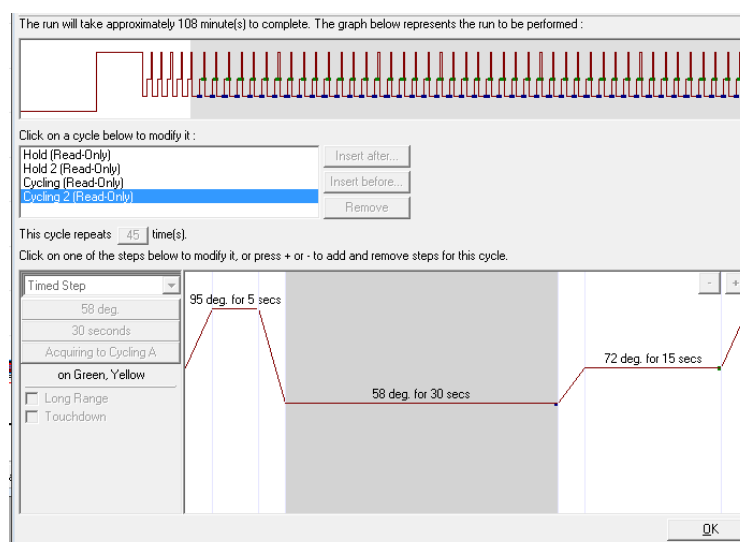
- Click the button "Edit Samples" to set the position of the tubes and the "Type": Standard, Positive Control, NTC or Unknown"
- In the "Setting" function, set the reaction volume (30 µl) and the rotor used (36/72 wells); check that the Green and Yellow channels are shown in the "Channels" window, otherwise set them by clicking on "Create new".
- In the "View → gain optimization" function set the auto calibration to 58°C for the above channels (FAM: **Min reading 5 FI, Max reading 10 FI**; JOE/HEX: **Min reading 10 FI, Max reading 20 FI**) and select "Perform optimization before first acquisition".



- Set the following thermal profile in the "Profile" function:

Cycle	Cycle Point
45°C, 5 min	
95°C, 3 min	
Cycling (5 repeats)	95°C, 5 sec
	58°C, 20 sec
	72°C, 15 sec
Cycling (45 repeats)	95°C, 5 sec
	<b>58°C, 30 sec; acquiring to Green and Yellow</b>
	72°C, 15 sec

- Place the tubes in the rotor of the RotorGene and close the lid of the instrument.
- Start the experiment by clicking on "Start".



## DATA ANALYSIS

### Green Channel (EBV)

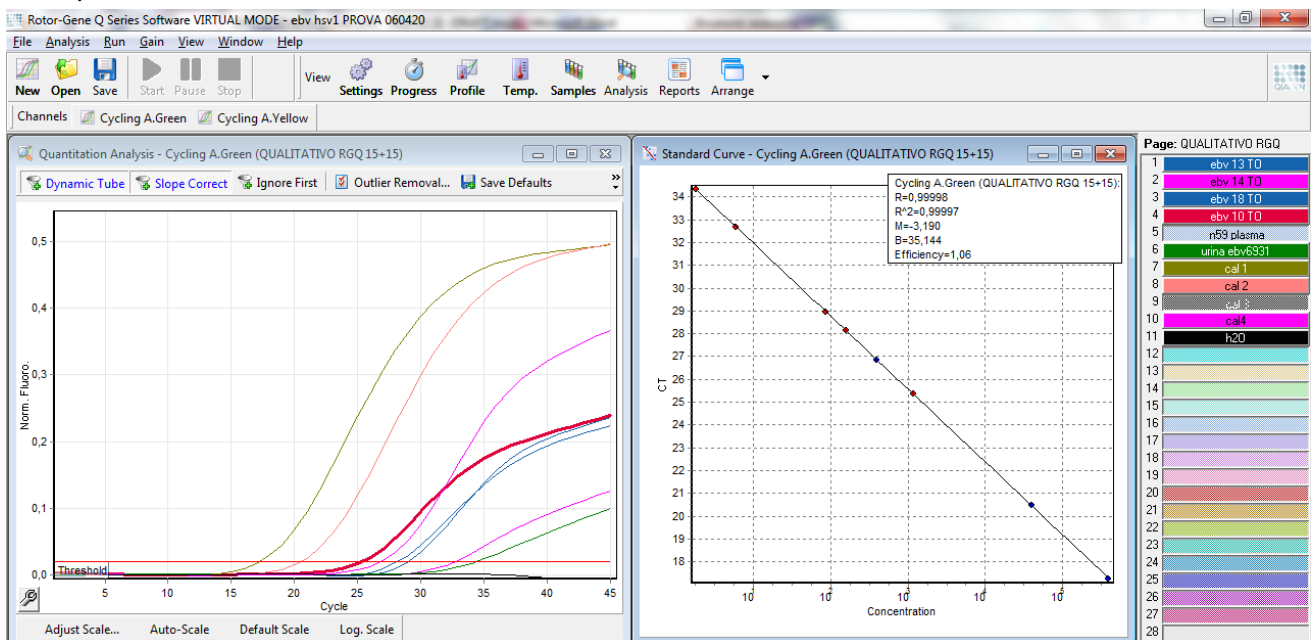
- Select "Analysis", "Quantitation", "Cycling A.Green", "Show".
- When the analysis window appears with the graph, select "Dynamic Tube" and "Slope Correct" and, if necessary, set "outlier removal" at 10%.
- Enter the value 0.05 in the "Threshold" window and, if necessary, delete the first 10-12 cycles: the intersection between the threshold line and the sample curve represents the Ct value.

Qualitative Analysis: the "Results" window shows the Ct values of the EBV positive samples and of the Positive Control

Quantitative Analysis: to set Standard Curve points select "Type" → "Samples" → "Standard". Then set the concentration for each calibrator, select "Given Conc." → "Samples" and enter the number of IU/ml (to choose the unit of measure go to "Unit" at the top right and choose "IU/ml" from the drop-down menu).

The screen of the standard curve will appear and the viral load will be assigned to each positive sample.

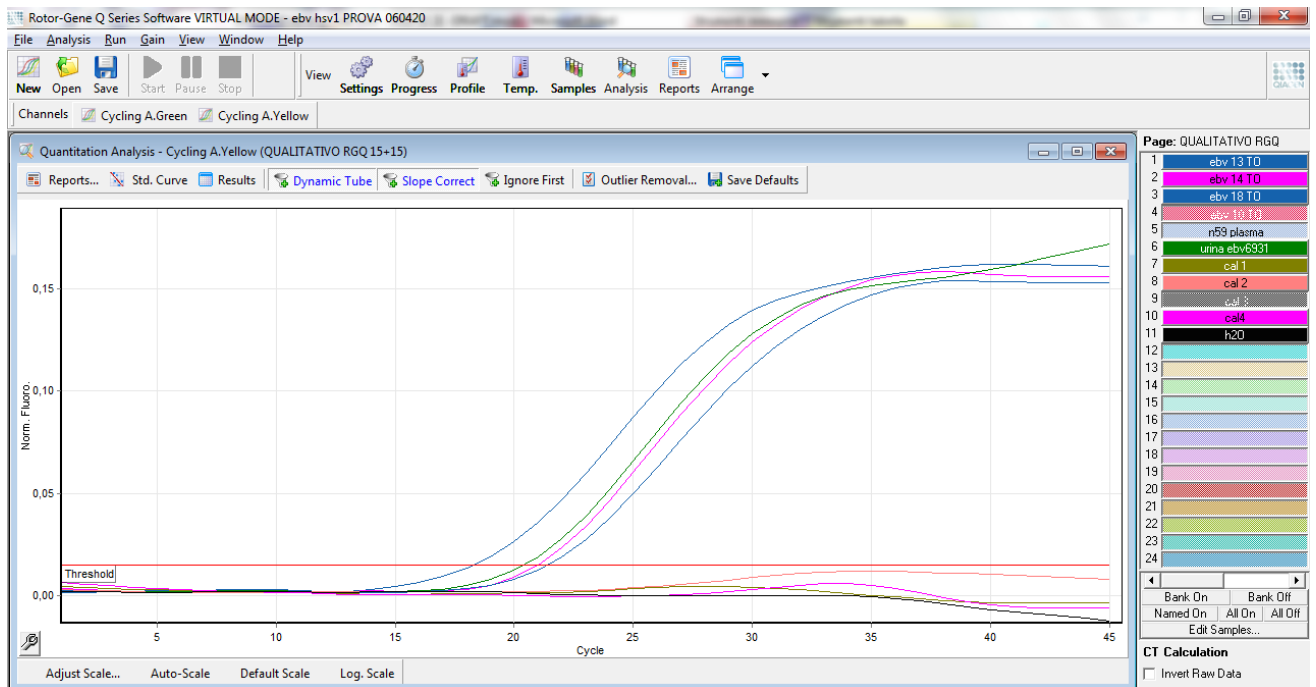
Example:



### Yellow Chanel (IC)

- Select "Analysis", "Quantitation", "Cycling A.Yellow", "Show".
- When the analysis window appears with the graph, select "Dynamic Tube" and "Slope Correct", if necessary, set "outlier removal" at 10%.
- Enter the value 0.03 in the "Threshold" window and, if necessary, delete the first 10-12 cycles: the intersection between the threshold line and the sample curve represents the CT value.

Example:



## CFX 96

- Open the Bio-Rad CFX Manager specific software.
- Select *Create new run* and choose the CFX model.
- Click OK.
- The Run Setup page opens

## PROTOCOL

It is possible to create a new protocol or select/modify an existing protocol.

### Create new protocol

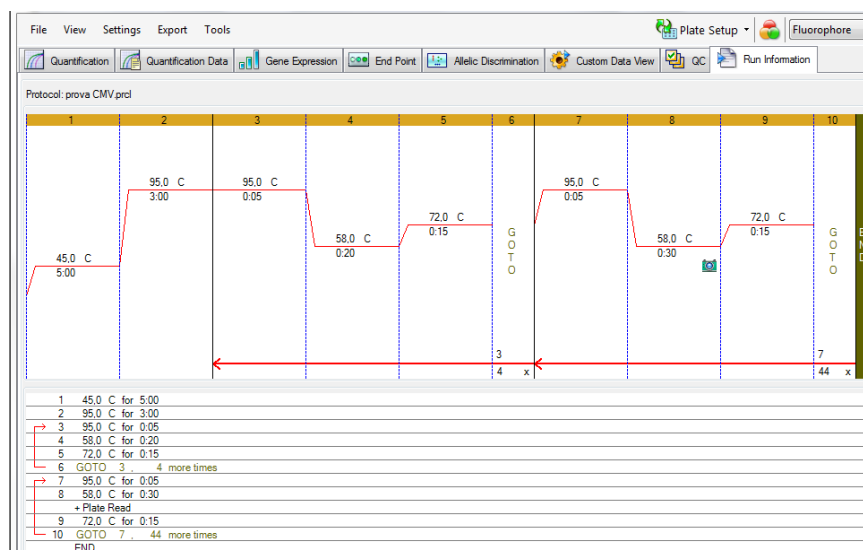
- *Protocol* → *create New*
- Open the window *Protocol Editor – new*
- Insert the volume of the reaction in the *Sample Volume* box (30  $\mu$ l)
- Set the thermal protocol as below:

Cycle	Cycle Point
45°C, 5 min	
95°C, 3 min	
Cycling (5 repeats)	95°C, 5 sec
	58°C, 20 sec
	72°C, 15 sec
Cycling (45 repeats)	95°C, 5 sec
	<b>58°C, 30 sec; Plate Read</b>
	72°C, 15 sec

- To add a step, click *Insert Step* on the left side of the window. The step will be added to the position following the selected step.
- It is possible to change temperatures and time of each step, directly, from the screen or in the text below, by a double click on them.
- Check the presence of the symbol of a camera in the annealing step of the screen and the presence in the text below of the written “+ Plate Read”. If not, add them by clicking “Add Plate Read to Step”.
- Click OK. Save the new protocol.

## Select / modify an existing protocol

- It is possible to import a thermal profile from saved profiles stored in the PC (\* .pcrd): click *Select Existing* in the *Protocol* page, *Run Setup*.
- If you want to modify an existing protocol, click *Select Existing and Edit Select*. Then proceed as described above.



## PLATE

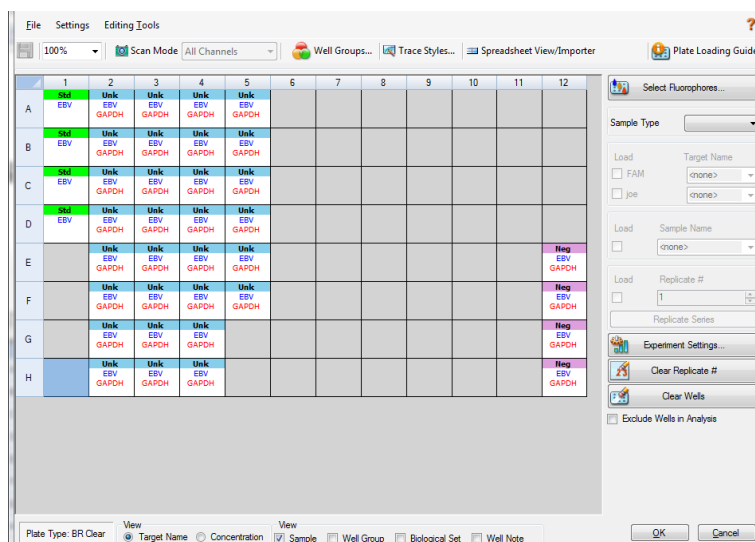
Select *Plate* in the window *Run Setup*.

It is possible to create a new plate or select/modify an existing plate.

### Create new plate

- *Plate* → *create New*
- Open the window *Plate Editor – new*
- Set the type of plate selecting *Settings* → *View/Edit Plate* → *Settings* → *Plate Type* and check *BR Clear*
- Select *Scan Mode* → *All channels*
- Click *Select Fluorophores* and choose FAM and JOE channels. (CAUTION: If JOE is not present, select the equivalent HEX fluorophore)
- Select the wells
- Set *Sample Type* → *Unknown, Standard, Positive or NTC* depending on the type of sample
- Write in *Target Name* the fluorophore name and click *load* to link the fluorophores to the wells: EBV for FAM and GAPDH for JOE/HEX. All samples will be analyzed for both fluorophores while Positive Control and calibrators will be analyzed only for FAM.
- Write the name of the samples in *Sample Name* and click *load* to associate the name with the wells.
- For the calibrators, enter the declared concentration values found in the box label and click on *Load* to confirm.
- Click *OK*. Save the plate.





### Select/modify an existing plate

- It is possible to import a plate from the profiles saved and stored in the PC (\* .pcrd): click *Select Existing* on the page *Plate*.
- Click *Edit Select*. Then proceed as described above.

### START RUN

- Select *Start Run* in the *Run Setup* window.
- The instrument is now ready to work. Prepare the plates / strips with EBV Mix and samples.
- Open the lid by clicking the *Open Lid* button and place the plate / strips in the instrument; close the lid by clicking the *Close Lid* button.
- Click *Start Run* to start the session.
- The *Run Details* window opens. Move to the *Real Time Status* page, to monitor the run.

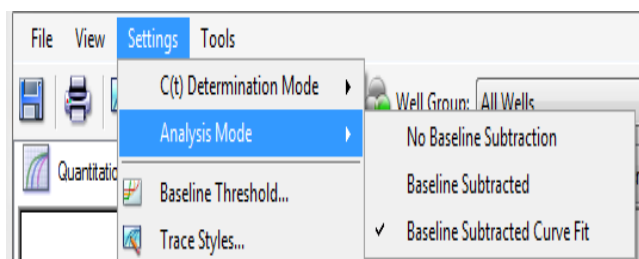
### DATA ANALYSIS

At the end of the run the window *Data Analysis* → *Quantification* is shown.

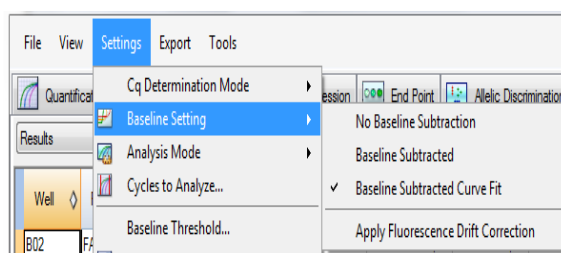
To exclude a sample/calibrator from the analysis, go to “*plate setup-view/edit plate*” (at the top right of the screen), select the corresponding well and click on “*Exclude well in analysis*” at the bottom right.

At the top left of the screen select *Settings* and set:

- *Cq determination mode: single threshold*
- *Settings-Analysis Mode (version 1.6)/Baseline Setting (versions 3.x): Baseline subtracted curve fit* (for CFX Manager v1.6 and following versions)



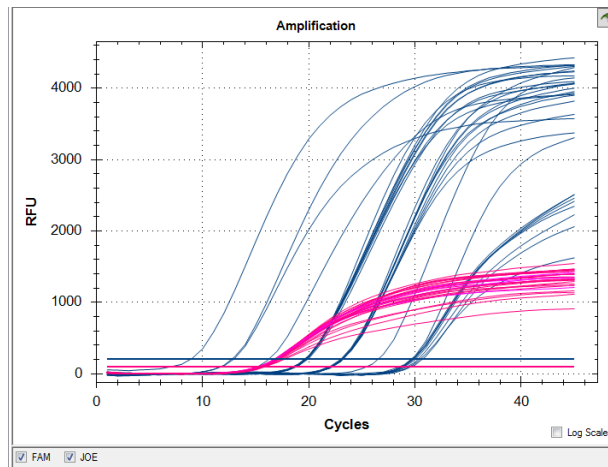
a) CFX Software ver. 1.6



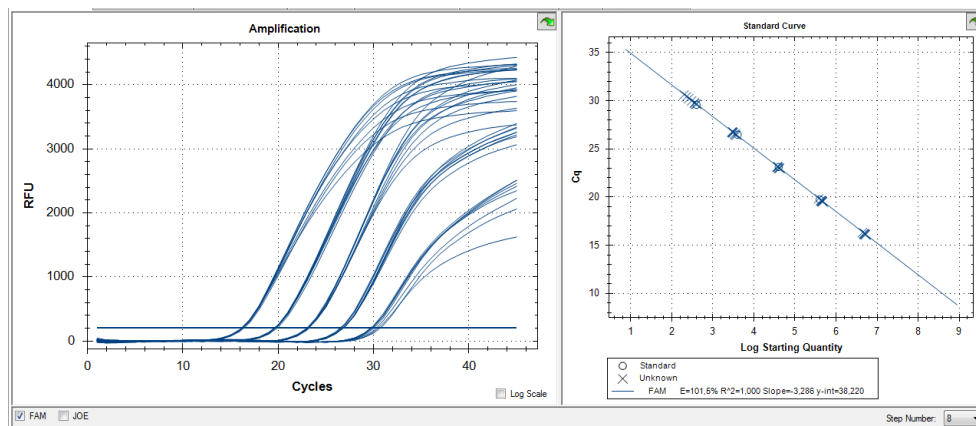
b) CFX Software ver 3.x

To set the threshold select one fluorophore at a time.

- **FAM:** *Baseline threshold, Single Threshold-User defined*-set the value **200**, click **OK**.
- **JOE/HEX:** *Baseline threshold: Single Threshold-User defined*- set the value **100**, click **OK**.



## Quantitative Analysis

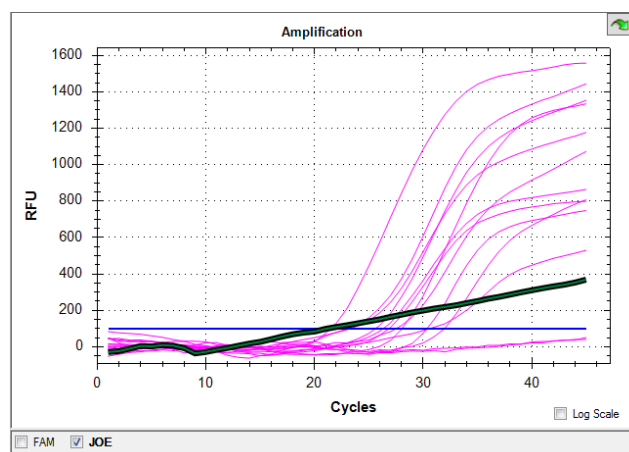


The screen on the left shows the amplification data (linear scale or log), the screen on the right shows the standard curve.

- To create a final report select "*Tools → Reports*" and select/deselect the information of interest.

**WARNINGS:** For a correct interpretation of the results, always pay attention to the screen of the run.

Example: in the image below the sample highlighted in green seems to show a positive Ct, but from the graphical data an instrumental artifact is evident. The result cannot be considered as valid and the sample must be repeated.



## ABI 7500 FAST

- Open the software (version v2.x) and click *Advanced Setup* on the left side of the screen to open a new window.
- In the Setup menu, on the left, select *Experiment Properties*, enter the experiment name and select the *7500 Fast (96 wells)*, *Quantitation Standard Curve*, *TaqMan® Reagents* and *Standard (2 hours to complete a run)*.

The screenshot displays three configuration panels from the ABI 7500 FAST software:

- What type of experiment do you want to set up?**
  - Buttons: *Quantitation - Standard Curve* (selected), *Quantitation - Relative Standard Curve*, *Quantitation - Comparative Ct (ΔΔCt)*, *Melt Curve*, *Genotyping*, *Presence/Absence*.
  - Text: "Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples."
- Which reagents do you want to use to detect the target sequence?**
  - Buttons: *TaqMan® Reagents* (selected), *SYBR® Green Reagents*, *Other*.
  - Text: "The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence."
- Which ramp speed do you want to use in the instrument run?**
  - Buttons: *Standard (~ 2 hours to complete a run)* (selected), *Fast (~ 40 minutes to complete a run)*.
  - Text: "For optimal results with the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends using standard reagents for your PCR reactions."

## PLATE SETTINGS

- In the *Setup* menu, on the left, select *Plate Setup*
- Select *define targets and samples* at the top.
- In the left part of the page (define targets) select *add new target* and enter the name of the target; from the dropdown menu select FAM (for EBV) as a reporter and NFQ-MGB (non-fluorescence quencher-minor groove binder) as a quencher and a *color*. Repeat the operation inserting JOE/HEX as a reporter (for GAPDH).
- On the right side of the window (define samples) select *add new sample* for each sample to be analyzed and enter the *sample name*.
- On the top select *assign targets and samples*.
- Select the positions used in the plate and associate the fluorophore, checking the target on the left (assign). Also indicate in the *Task* entry the type of sample present in that particular position: *Positive Control*, *NTC* or *Unknown* (for samples), or, for quantitative analysis, consider the position for the *Standards*.
- For quantitative analysis: select the wells for the calibrators and click "S" in the "Task" window, then set the concentration in the "Quantity" box on the right. By clicking on Analyze, the software will assign a value expressed in IU/ml.
- Select *NONE* relatively *the dye to use as the passive reference*.

## THERMAL PROFILE

- Select on the left *Run Method*.
- Select on the top *Graphical View*.
- Set 30 µl in *Reaction volume for well*.
- Set the thermal profile
- Select *Add stage* Holding or *Cycling* from the drop-down menu to add a stage, while to add Step in the same stage use the *Add Step* menu.
- Ramps: All ramps must be left at 100%.
- Set fluorescence signal acquisition during annealing only in PCR cycles.
- Leave the *Enable AutoDelta* unselected

Cycle	Cycle Point
45°C, 5 min	
95°C, 3 min	
Cycling (5 repeats)	95°C, 5 sec
	58°C, 20 sec
	72°C, 15 sec
Cycling (45 repeats)	95°C, 5 sec
	<b>58°C, 30 sec; Plate Read</b>
	72°C, 15 sec

\* Data collection on  (activated icon)



- Check in the Run window that the Instrument Status is connected: the instrument is then ready to work.

## START RUN

- Prepare the plate with the EBV Mix and samples, seal it carefully taking care not to create air bubbles. Centrifuge the plate a few seconds to remove any bubbles.
- Open the instrument and place the plate on the support, with the A1 position at the top left.
- For any other indication, refer to the instrument user manual
- Save the run.
- To save the template, select File, Save as template. In the following sessions it will be possible to recall and modify the template by selecting File, New experiment, From template
- Press Start.

## DATA ANALYSIS

- Select Analysis on the left of the window
- To visualize amplification curves, select *Amplification plot* and set *dRn vs Cycle* for plot type, *Linear* for graph type and the *target* that you want to analyze.
- If you want to view one target at a time, choose the target of interest in “Options”.
- To modify Baseline and Threshold, select on the top right *Analysis, Analysis Settings* and open the Ct Settings window: select the target you want to modify:
  - de-select *Use Default Settings*
  - set these parameters:

	<b>Plate</b>	<b>Strip</b>
<b>FAM</b>	200.000	100.000
<b>JOE/HEX</b>	60.000	15.000
<b>Autobaseline selection</b>	<b>NO (Start=3; End=15)</b>	<b>NO (Start=3; End=15)</b>

- select *Apply Analysis Settings*.

- click *Re-analyze*
- In the window *View Well Table* it is possible to visualize the Ct value and the viral load of each sample.
- Clicking on Standard Curve, on the left, it is possible to visualize the reaction efficiency, in case of Quantitative Analysis; otherwise it is possible to evaluate the run on the basis of the Ct of the samples and of the Positive Control (qualitative analysis).
- To generate a report, click on “Print report” and select the information of interest.

## INTERPRETATION OF THE RESULTS

For each type of samples perform the analysis as follows:

	<b>Fam Ct</b>	<b>JOE/HEX Ct</b>	<b>Result</b>
<b>Sample</b>	Present	Present	EBV detected- valid result
	Absent	Present	EBV not detected – valid result
	Present/Absent	Absent	Repeat the test*

	<b>Fam Ct</b>	<b>JOE/HEX Ct</b>	<b>Result</b>
<b>PositiveControl/ Calibrators</b>	Present	Absent	Valid result
	Absent	Absent	Not valid result**

(\*) In case of poorly cellularized sample (CSF), add 15 µl of ex IC before the extraction phase.

(\*\*) The absence of the FAM signal in the Positive Control and / or the calibrators could be due to possible DNA target degradation and/or procedure error.

If the No Template Control (NTC) is also analyzed in the run, read the results as follows:

	<b>FAM Ct</b>	<b>JOE/HEX Ct</b>	<b>Result</b>
<b>No Template Control</b>	Absent	Absent	Valid
	Absent	Present	Not Valid*
	Present	Present	Not Valid*

(\*)Hypothesis of contamination

In case of contamination it is important to recognize the source (the extraction and/or PCR phase). The use of the controls can be a valid aid to ensure the correct performance of the test and to identify the origin of this problem

### QUANTITATIVE ANALYSIS

- In order to obtain an optimal result, pay attention to the standard curve. The Slope and the Reaction Efficiency are indicated in the relative screen. For a 100% efficiency, the slope is -3.32. A good reaction should have an efficiency between 90% and 110% and a slope between -3.58 and -3.10.
- If the interpolation line does not fit well with one of the four calibrators (eg in the presence of a Ct outside the corresponding acceptable RANGE shown inside the package), that calibrator can be excluded from the analysis, in a way to obtain a better approximation of the straight line to the remaining points; this allows a more precise quantification of the samples, without altering the clinical significance of the result.
- If the interpolation line is not suitable for more than one calibrator, the standard curve can not be used and the run must be repeated.
- The concentration values out of the linear range of the assay cannot be considered accurate, so they must be interpreted with caution. If the calculated concentration is above the upper detection limit, report the result as EBV DNA > 4,5E + 08 IU/ml. To obtain a more accurate result, the test must be repeated using the starting sample diluted with a negative sample of the same matrix. Multiplying by the dilution factor applied, the initial concentration will be obtained.
- In case of samples with viral load lower than the limit of detection, the reproducibility of the results is not guaranteed.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Diagnostic specificity

The diagnostic specificity of the kit EBV REAL TIME was determined by analyzing, following the instruction for use, 95 EBV negative samples of blood, plasma and cerebrospinal fluid. In agreement with these data, the diagnostic specificity is 100%.

### Analytical sensitivity

#### 1) Whole Blood

The analytical sensitivity was determined analyzing four serial dilutions of the First International EBV WHO Standard (NIBSC code 09/260). For serial dilutions a negative EBV human blood was used. The analysis was carried out according to user manual, extraction included. The detection limits for EBV REAL TIME with whole blood samples are listed in the tables below.

#### QIA Symphony AA1439/192:

Dilutions	Positive/Replicates	Frequency of positive
50 IU/ml	20/20	100%
25 IU/ml	17/20	85%
8.3 IU/ml	12/20	60%
4.2 IU/ml	5/20	25%
<b>LOD= 36.35 IU/ml</b>		

Table 1 Probit analysis was performed using XLStatPlus 2014 program

#### MagCore AA1185:

Dilutions	Positive/Replicates	Frequency of positive
100 IU/ml	20/20	100%
50 IU/ml	16/20	80%
25 IU/ml	12/20	60%
8.3 IU/ml	5/20	25%
<b>LOD= 74.82 IU/ml</b>		

Table 2 Probit analysis was performed using XLStatPlus 2014 program

#### 2) Plasma

The analytical sensitivity was determined analyzing four serial First International EBV WHO Standard (NIBSC code 09/260). For serial dilutions a negative EBV human plasma was used. The analysis was carried out according to user manual, extraction included. The detection limits for EBV REAL TIME with plasma samples are listed in the table below.

#### QIA Symphony AA1440/96:

Dilutions	Positive/Replicates	Frequency of positive
500 IU/ml	20/20	100%
250 IU/ml	19/20	95%
125 IU/ml	19/20	85%
62.5 IU/ml	10/20	50%
<b>LOD= 212.06 IU/ml</b>		

Table 3 Probit analysis was performed using XLStatPlus 2014 program

## Linear Range

To evaluate the linear range of the device, 8 dilution levels were prepared using an EBV DNA template (calibrated against the 1<sup>st</sup> WHO International Standard NIBSC 09/260) diluted in EBV negative human plasma and whole blood. The test was performed according to the instructions for use, with both the extractions, using two different lots of reagents. Each dilution level has been tested at least in 12 replicates.

The last dilution changes based on the matrix and the extraction method, since whole blood and plasma showed significant different LOD.

Dilution	Whole blood	Plasma
	Viral Load (IU/ml)	Viral Load (IU/ml)
A	$4.5 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$
B	$4.5 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$
C	$4.5 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$
D	$4.5 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$
E	$4.5 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$
F	$4.5 \times 10^3$	$4.5 \times 10^3$
G	$4.5 \times 10^2$	$4.5 \times 10^2$
H	$2.25 \times 10^2$ for AA1185 $9.0 \times 10^1$ for AA1439/192	/

Table 4

As shown in figures below (Figure 1 and Figure 2), EBV REAL showed a linear response with blood from  $9.0\text{E}+01$  IU/ml to at least  $4.50\text{E}+08$  IU/ml, using the accuracy acceptance criterion of  $\pm 0.3 \log 10$ . On plasma samples, using the same criteria, the linear response is included in the range  $4.5\text{E}+02$  IU/ml-  $4.50\text{E}+08$  IU/ml (Figure 3).

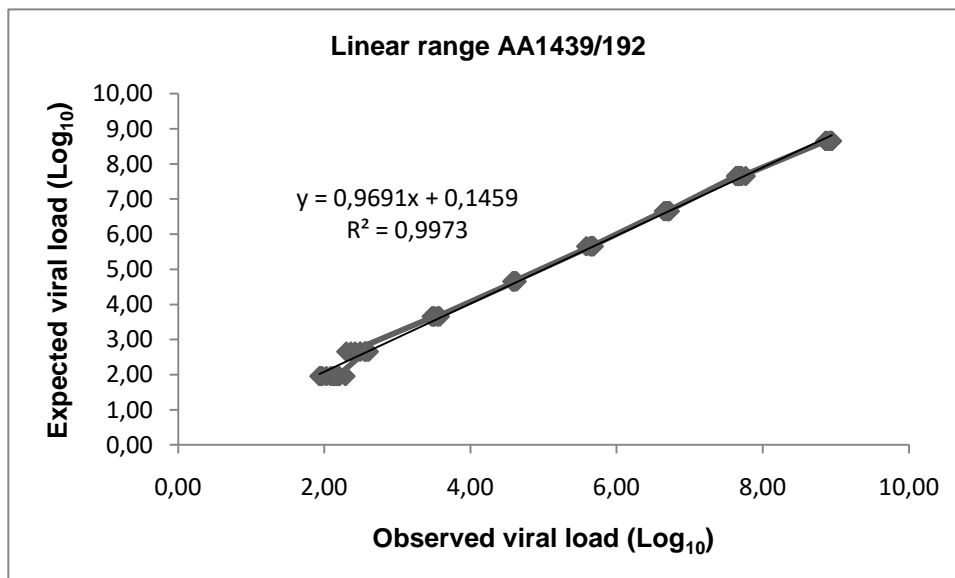


Figure 1 Linear range with QIASymphony cod. NLM AA1439/192



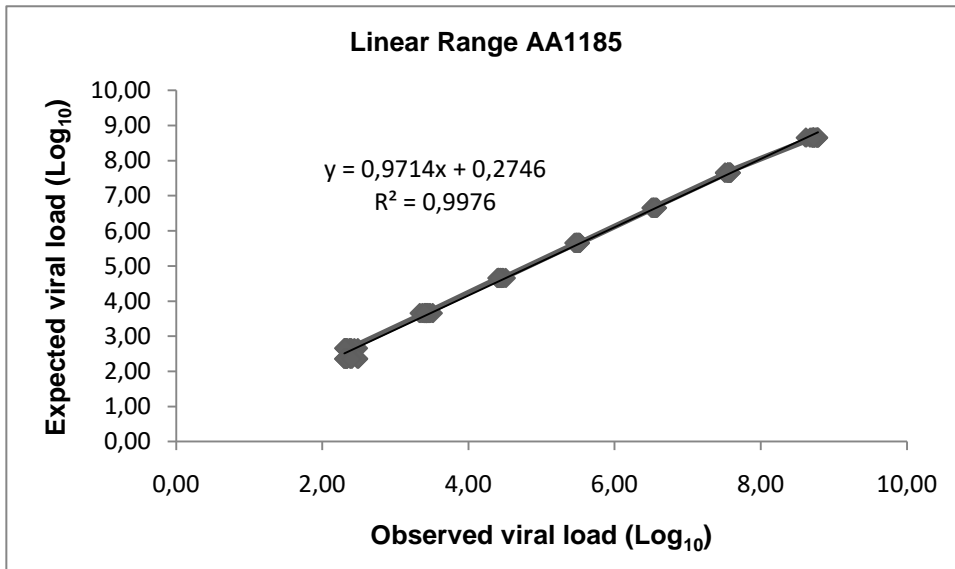


Figure 2 Linear range with MagCore cod. NLM AA1185

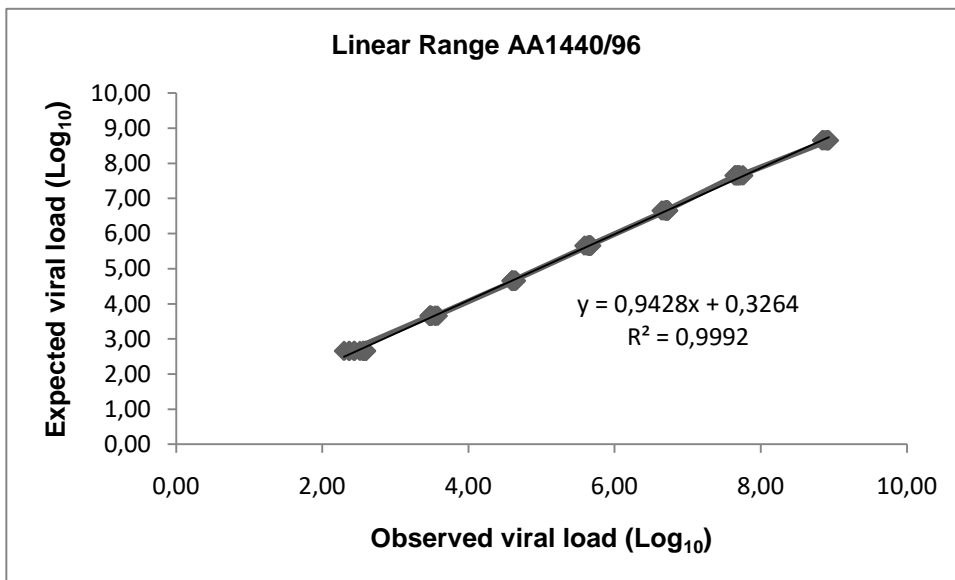


Figure 3 Linear range with QIASymphony cod. NLM AA1440/96

## Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity of the EBV REAL TIME kit was evaluated by analyzing 75 samples with a known positivity, extracted by NLM code AA1185, AA1186, AA1439/192 o AA1440/96 and amplified with CFX.

The diagnostic sensitivity of the device is 100%.

## Potentially cross reactive markers

To evaluate the potential cross reactivity of EBV REAL TIME with other pathogens, 24 samples positive for Herpesvirus, different from EBV, were tested.

Other pathogens	N° of samples	Positive with EBV Real-Time AA1489/48
CMV	6	0/6
BKV	3	0/3
HHV-6	4	0/4
HSV-1	3	0/3
HSV-2	4	0/4
VZV	4	0/4

Table 5

All the samples gave the expected result. EBV REAL TIME did not show cross-reactivity with other Herpesvirus

## Precision

### Intra-assay precision

Intra-assay precision was evaluated by using 6 positive samples with different viral load. Two different operators tested three replicates per dilution level using the same lot of reagents. Results of intra-assay tests are showed in the table below.

Viral load IU/ml	1.20E10+05	1.00E+04	1.00E+03	3.00E+02
CV%	6.48	7.04	9.70	9.54

Table 6

### Inter-assay precision

Inter-assay precision was evaluated by using the same samples used in the intra-assay study.

Two different operators tested three replicates per dilution level, in different runs and days, using 3 different lots of reagents.

The test was performed according to the instructions for use, using both the extractions; in this way the precision was evaluated for all the steps of the procedure.

Results of inter-assay tests are showed in the table below.

Viral load IU/ml	1,20E10+05	1,00E+04	1,00E+03	3,00E+02
CV%	5,14	5,69	11,27	8,17

Table 7

### Global error rate of the system leading to false-negative results

To evaluate the possibility of the presence of false negatives, 112 samples were analyzed, with viral load about 3 times higher than the detection limit for EBV.

The results are listed below and show a whole system failure rate <1%.

<b>Positive results</b>	112
<b>Negative Results for Positive Sample</b>	0

Table 8

### Cross-contamination

The absence of cross-contamination between samples for the entire workflow was demonstrated by analyzing 30 samples from different matrix in 2 runs, alternating negative and viral loads samples. All negative samples tested gave the expected negative result.

The EBV REAL TIME test did not show any cross-contamination between samples.

### INTERFERENT SUBSTANCES

Data not available.

### Comparison with the EBV ELITE MGB® Kit in routine samples

The performance of the EBV REAL TIME device was compared to the EBV ELITE MGB® Kit system through the analysis of 53 samples reflecting the hospital routine conditions. The analysis was carried out in accordance with the user manual, including extraction.

The results revealed a good correlation between the two devices, as shown in the figure below:

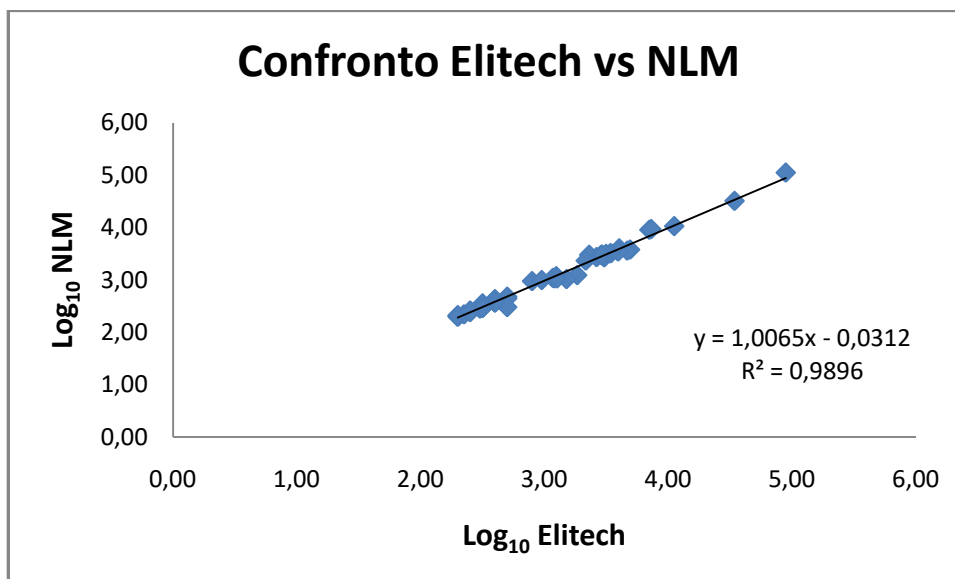












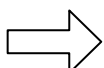


Figure 4

						
Lot Number	Catalogue Number	Temperature Limitation	Use by	Single use	Positive Control	Consult Instructions for use
						
European Conformity	Manufacturer	<i>in vitro</i> diagnostic device	Sufficient for	No Template Control	Modified text compared with the previous version	