



EBV DNA QUANTITATION (QT)

Real-Time PCR per la quantificazione del genoma del virus di Epstein-Barr (EBV)

EBV DNA

A. USO PREVISTO

Il kit di real-time PCR **EBV DNA Quantitation (QT)**, codificato **EBVDNAQT.CE**, è finalizzato alla determinazione quantitativa del DNA del virus di Epstein-Barr in campioni umani di plasma e sangue intero raccolti in EDTA. La presenza di un controllo interno (IC) di estrazione/amplificazione permette di monitorare l'intero processo.

Il saggio EBVDNAQT.CE è stato standardizzato verso il primo WHO Standard Internazionale per EBV (Codice NIBSC 09/260) al fine di esprimere la concentrazione dei campioni anche in Unità Internazionali (UI/ml).

L'utilizzo del kit è compatibile con strumenti real-time ABI 7500 Sequence Detection System® (Software SDS version 1.3.1, Applied Biosystems™*), MX3000P® (Software MxPro version 4.01, Stratagene™***) e CFX96 (Software CFX manager version 1.7, Biorad™**).

* Applied Biosystems è un marchio registrato e ABI PRISM® è un marchio di proprietà di Applied Biosystems o delle sue consociate negli USA e/o altri paesi.

** Biorad è un marchio registrato.

***Stratagene è un marchio registrato.

B. INTRODUZIONE

Il virus di Epstein-Barr (EBV), appartiene alla famiglia herpes virus (classe γ) e infetta più del 90% della popolazione mondiale. Sebbene la maggior parte delle infezioni primarie da EBV sia asintomatica, il virus (soprattutto nei soggetti immunocompromessi come i trapiantati e i malati di AIDS) è il principale fattore predisponente per lo sviluppo di un'ampia serie di disordini linfoproliferativi dei linfociti B (linfoma di Burkitt, carcinoma nasofaringeo e linfomi Hodgkin e non Hodgkin).

Il genoma dell'EBV è una molecola a DNA lineare a doppio filamento di circa 175 paia di chilobasi. b. Codifica per una serie di prodotti interagendo con o presentando omologia per un'ampia varietà di molecole anti-apoptotiche, citochine e trasduttori di segnali, favorendo così infezioni da EBV, immortalizzazione e trasformazione.

La determinazione precoce dell'EBV è fondamentale per il trattamento efficace e la modifica della terapia farmacologica immunosoppressiva che possono indurre una regressione della malattia proliferativa.

Le strategie terapeutiche per i disturbi linfoproliferativi post-trapianto associati all'EBV comprendono la riduzione dell'immunosoppressione, che è spesso efficace nel trapianto d'organo solido, l'uso di anticorpi monoclonali anti-linfociti B, la chemioterapia convenzionale e la radioterapia. Le attuali terapie per i linfomi non Hodgkin associati all'EBV comprendono la chemioterapia e la radioterapia.

I dosaggi molecolari come i test di PCR real-time si sono rivelati uno strumento utile per la diagnosi dell'infezione primaria da EBV, grazie a sensibilità elevata, specificità, facilità d'uso e rapidità del metodo.

La misurazione quantitativa del DNA dell'EBV è essenziale per differenziare l'infezione di basso livello dei portatori sani dai livelli elevati caratteristici della patologia correlata all'EBV.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit EBVDNAQT.CE si basa su una chimica real-time che utilizza primer e probe specifici.

Il **DNA dell'EBV**, purificato dal campione biologico in esame attraverso una fase di estrazione, viene amplificato utilizzando il sistema di amplificazione real-time. Il prodotto amplificato viene determinato e quantificato sulla base di una curva standard mediante probe marcato con sostanze fluorescenti (reporter dye) specifico per una sequenza genomica unica dell'EBV.

Il controllo interno (IC) eterologo funge da controllo di estrazione/amplificazione per ogni singolo campione, con l'obiettivo di identificare eventuali inibitori della reazione.

Viene fornita una curva standard per permettere la determinazione del carico virale.

D. COMPONENTI

Il formato standard del prodotto codificato come EBVDNAQT.CE contiene reagenti per 50 test.

Componente	Contenuto	EBVDNAQT.CE 50 reazioni
A CODIFICATO: ALL/MM-4 CODICE COLORE: TRASPARENTE	Master mix	N°1 provette/ 0.825 ml
B CODIFICATO: EBV/CB CODICE COLORE: GIALLO	Primer/probe liofilizzati	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
C CODIFICATO: ALL/C CODICE COLORE: ROSSO	Acqua MG	N°5 provette/1.5 ml
NTC CODIFICATO: ALL/NTC CODICE COLORE: BIANCO	Controllo negativo	n°1 provette/1.5 ml
STD Standard di quantificazione (6.72×10^4 copie/μl or 6.72×10^4 IU/μl) CODIFICATO: EBV/STD CODICE COLORE: ROSSO	Standard quantitativo liofilizzato	N° 6 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
I.C. Controllo interno CODIFICATO: ALL/IC CODICE COLORE: VERDE	Controllo interno liofilizzato	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
Foglietto illustrativo	Istruzioni per l'uso	1

Nota importante: su richiesta Dia.Pro può fornire reagenti per 25, 100, 150 test, come riportato nella tabella sottostante:

1. Componente A	n°1 provetta/0.4ml	n°2 provette/0.825ml	n°3 provette/0.825ml
2. Componente B	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
3. Componente C	n°3 provetta/1.5 ml	n°4 provette/1.5 ml	n°7 provette/1.5 ml
4. NTC	n°1 provetta/1.5 ml	n°1 provetta/1.5 ml	n°1 provetta/1.5 ml
5. IC	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
6. STD	n°3 provetta	n°4 provette	n°6 provette
7. Foglietto illustrativo	n° 1	n° 1	n° 1
Numero di test	25	100	150
Codice	EBVDNAQT.CE.25	EBVDNAQT.CE.100	EBVDNAQT.CE.150

E. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il kit codificato EBVDNAQT.CE deve essere conservato a $+2...8^{\circ}\text{C}$.

Una volta risospeso il **Componente B** (codice EBV/CB) e il **Componente IC** (codice ALL/IC) sono stabili 4 mesi a -20°C . Una volta risospeso il **Componente STD** (codice EBV/STD) è stabile 2 settimane a -20°C . Se i componenti risospesi devono essere usati più volte si raccomanda di preparare aliquote, ripetuti congelamenti e scongelamenti devono essere evitati. Solo uno scongelamento è ammesso.

F. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate ($0,5\ \mu\text{l}$ < volume < $1000\ \mu\text{l}$)
2. Kit di estrazione del DNA
3. MG EtOH
4. Blocco termico
5. Microcentrifuga
6. Portaprovette
7. Puntali sterili con filtro con barriera aerosol
8. Microprovette prive di nucleasi
9. Microprovette da $0,2\ \text{ml}$ o micropiastre per PCR raccomandate dai produttori di strumenti per PCR real-time
10. Guanti monouso non talcati
11. Termociclatore per PCR real-time (*)
12. Fazzoletti di carta assorbente
13. Vortex o miscelatori simili

(*) **Attenzione:** deve essere effettuata regolarmente una calibrazione valida di pure dyes (Pure Spectra Component File) e background (Background Component File).

G. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico esperto ed adeguatamente addestrato, dietro supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere specificamente addestrato all'uso dei termociclatori real-time, nonché alla manipolazione dei reagenti per biologica molecolare e deve avere familiarità con i protocolli di amplificazione per PCR real-time.
3. Per effettuare questo tipo di analisi, il kit deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale di settore (Ministero della Salute o ente simile).
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti non talcati ed occhiali. Evitare di utilizzare oggetti appuntiti (aghi) e taglienti (lame). Tutto il personale interessato deve essere addestrato alle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA, e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Tutto il personale impiegato nel trattamento dei campioni deve essere vaccinato contro HBV e HAV, per i quali sono disponibili vaccini sicuri ed efficaci.
6. L'ambiente di laboratorio deve essere controllato per evitare contaminanti come polvere o agenti microbici a trasmissione per via aerea, al momento dell'apertura dei flaconcini dei kit e dei componenti e dell'esecuzione del test.
7. I componenti A e B sono fotosensibili. Occorre quindi proteggerli dall'esposizione a luce intensa.
8. Evitare vibrazioni sulla superficie del banco dove viene eseguita l'analisi.
9. Al ricevimento, riporre il kit in un frigorifero a temperatura controllata o in una camera fredda a una temperatura di $+2/+8^{\circ}\text{C}$.
10. Non mischiare i componenti dei kit di diversi lotti. Si raccomanda anche di non scambiare componenti tra kit dello stesso lotto.
11. Assicurarsi che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti visibili o aggregati. In caso contrario, informare il supervisore del laboratorio per avviare le procedure necessarie alla sostituzione del kit.
12. Evitare la contaminazione crociata tra campioni, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione.

13. Evitare la contaminazione crociata tra reagenti del kit, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni uso.

14. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta del confezionamento esterno.

15. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di siero/plasma umano devono essere trattati al livello 2 delle norme di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA e nel rispetto delle norme riportate nella pubblicazione degli Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

16. Conservare ed estrarre i campioni separatamente da altri reagenti e usare una stanza separata per la loro manipolazione.

17. Dissolvere i reagenti liofilizzati con la quantità corretta, riportata sulle etichette, del componente C (Codice: ALL/C) in dotazione nel kit.

18. Effettuare tutte le necessarie operazioni nel minor tempo possibile, conservando i componenti in ghiaccio o in un blocco refrigerante.

19. Il flusso di lavoro del laboratorio deve procedere in maniera unidirezionale, partendo dall'area di estrazione e spostandosi verso le aree di amplificazione e di analisi dati. Non riportare campioni, attrezzatura e reagenti nell'area dove sono stati compiuti i passaggi operativi precedenti.

20. Si raccomanda l'uso di materiale monouso in plastica per la preparazione dei componenti liquidi o per il trasferimento dei componenti nelle stazioni di lavoro automatiche, per evitare la contaminazione crociata.

21. I materiali di rifiuto prodotti utilizzando il kit devono essere smaltiti e trattati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolamentano il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalle procedure di estrazione dei campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima dello smaltimento. Evitare il contatto dei rifiuti di estrazione con candeggina.

22. Spargimenti accidentali da campioni o da operazioni in corso devono essere eliminati con carta assorbente imbevuta di candeggina per uso domestico e poi con acqua. La carta assorbente utilizzata deve essere gettata negli appositi contenitori per rifiuti di laboratorio od ospedalieri.

23. Gli altri materiali di rifiuto generati (ad esempio: puntali usati per campioni) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti in conformità alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

H. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue deve essere prelevato da una vena in asepsi, mentre il plasma (o il siero) deve essere preparato utilizzando le tecniche standard per il trattamento dei campioni per analisi cliniche di laboratorio.

2. Non è stata osservata alcuna influenza nella preparazione del campione in presenza di citrato, EDTA.

Attenzione: l'eparina ($\geq 10\ \text{UI/ml}$) condiziona le reazioni di PCR.

Non usare campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante. Inoltre, non usare campioni di pazienti eparinizzati.

3. Evitare qualsiasi aggiunta di conservanti ai campioni.

4. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati.

5. I campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattescenti) devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati. I campioni contenenti residui di fibrina, particelle pesanti o filamenti e corpuscoli microbici devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati.

6. Se non utilizzato immediatamente, il plasma deve essere aliquotato e conservato a $-20^{\circ}/-80^{\circ}\text{C}$ dopo la raccolta. I campioni possono essere conservati congelati a $-20^{\circ}/-80^{\circ}\text{C}$ per diversi mesi. Qualsiasi campione congelato non deve essere congelato/scongelato più di una volta, perché questo potrebbe inficiare il risultato del test.

7. I campioni di plasma per estrazione del DNA devono essere raccolti secondo le comuni procedure di laboratorio, trasportati e conservati a $+2/+8^{\circ}\text{C}$ per un periodo massimo di 4 ore. I

campioni di plasma possono essere conservati congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70 °C per periodi più lunghi.

8. Per una conservazione ottimale dei campioni, si raccomanda di suddividerli in più aliquote (volume minimo 300 µl) e di conservarli congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi. Evitare cicli di congelamento/scongelo ripetuti.

9. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelarli appena prima dell'estrazione per evitare una possibile degradazione dell'acido nucleico.

10. I campioni di sangue periferico intero per estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA in conformità ai regolamenti del laboratorio, trasportati e conservati a +2°C/+8°C per un periodo massimo di 3 giorni. Non congelare i campioni di sangue periferico intero per evitare lisi cellulare e perdita del titolo virale.

I. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

Master mix:

Componente A. Pronto all'uso. Miscelare bene nel Vortex prima dell'uso e centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume.

ATTENZIONE: il componente A è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

Primer/probe:

Componente B.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il componente B liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (15°C < temp. amb. < 25°C).
- Vortexare brevemente

ATTENZIONE: il componente B è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

Acqua MG:

Componente C. Pronto all'uso.

Controllo negativo:

NTC. Pronto all'uso.

Curva Standard:

STD.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente l'STD liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (15°C < temp. amb. < 25°C).
- Vortexare brevemente
- Preparare 4 provette prive di nucleasi per la preparazione della curva standard
- Per ottenere i punti della curva standard, preparare una diluizione seriale 1:10 di STD utilizzando il componente C come descritto nella tabella sottostante:

Preparazione della curva standard		
STD	Calibratore 67200 copie/µl o 67200 IU/µl	Volume del componente C (acqua MG) come riportato sull'etichetta della provetta
STD 1	6720 copie/ µl o 6720 IU/µl	10 µl (STD) + 90 µl componente C (acqua MG)
STD 2	672 copie/µl o 672 IU/µl	10 µl (STD 1) + 90 µl componente C (acqua MG)
STD 3	67.2 copie/µl o 67.2 IU/µl	10 µl (STD 2) + 90 µl componente C (acqua MG)
STD 4	6.72 copie/ µl o 6.72 IU/µl	10 µl (STD 3) + 90 µl componente C (acqua MG)

Controllo interno:

I.C.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente l'IC liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (15°C < temp. amb. < 25°C).
- Vortexare brevemente

L. STRUMENTI E ACCESSORI USATI IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. **Micropipette:** devono essere calibrate per fornire il volume corretto richiesto dall'analisi ed essere regolarmente decontaminate (alcohol ad uso domestico, 10% soluzione di candeggina domestica, disinfettanti ad uso ospedaliero) nelle parti che possono accidentalmente venire in contatto con il campione. Devono inoltre essere regolarmente controllate per garantire una precisione dell'1% e un'esattezza di +/-5%.
2. **Dispositivo di estrazione:** Il kit EBVDNAQT.CE è destinato all'uso solo insieme a QIAamp DNA Minikit Codice: 51306 (QIAGEN), Nucleospin Blood kit Codice: 740951 (Macherey-Nagel), NA Body Fluid Kit Codice: D-2021 (Chemagen distribuito da Dia.Pro) e al sistema di estrazione automatica nucliSENS easyMAG (Biomérieux). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.
3. **Termociclatori Real Time:** Il kit EBVDNAQT.CE è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con i termociclatori real-time ABI 7500 (Software SDS version 1.3.1, Applied Biosystems), MX3000P (Software MxPro version 4.01, Stratagene) e CFX96 RTS (Software CFX manager version 1.7, Biorad). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.

M. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE-ANALISI

1. Verificare la data di scadenza stampata sull'etichetta esterna della scatola contenente il kit. Non utilizzare il kit se è scaduto.
2. Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle visibili ad occhio nudo o aggregati. Controllare che sul fondo dei flaconi contenenti i componenti liofilizzati sia presente un aggregato ben formato. Accertarsi che il prodotto non si sia danneggiato durante il trasporto e che non sia presente alcuna fuoriuscita di liquidi all'interno della scatola.
3. Dissolvere i componenti liofilizzati con la giusta quantità di Componente C (acqua "Molecular Grade") come descritto nel relativo paragrafo I).
4. Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni ed assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
5. Seguire rigorosamente le istruzioni contenute nel manuale dello strumento fornito dai produttori per la corretta impostazione dei termociclatori real-time.
6. Verificare che le micropipette siano impostate sul volume corretto.
7. Controllare che tutto il resto dell'attrezzatura sia disponibile e pronto all'uso.
8. In caso di problemi, sospendere il test ed informare il supervisore.

N. PROCEDURA D'ANALISI

Il test deve essere eseguito secondo le istruzioni di seguito riportate.

N.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA genomico dell'EBV deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con i seguenti kit:

Estrazione Manuale

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
Plasma/sangue	Nucleospin Blood	740951	MN™
Plasma/sangue	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™

Estrazione Automatica

Material e	Descrizione	Codice del kit	Produttore	Strumento
Plasma/sangue	NA Body Fluid Kit	D-2021	Chemagen distributed by Dia.Pro	DIA.FASTEX
Sangue	Generic protocol		Biomerieux	NucliSENS easyMAG

L'isolamento del DNA deve essere realizzato esclusivamente in conformità al manuale di istruzioni (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro Biomerieux).

ATTENZIONE: Utilizzare esclusivamente i seguenti volumi nelle procedure di estrazione:

Descrizione	Volume di campione (µl)	Volume di eluizione (µl)
Nucleospin Blood	200	100
QIAamp DNA mini kit®	200	100
NA Body Fluid Kit	200	100
NucliSENS easyMAG System	100	55

Il DNA estratto dai campioni, non utilizzato nella sessione di analisi, deve essere conservato adeguatamente nello stato congelato (da -20°C a -80°C).

Nota importante: l'IC del kit EBVDNAQT.CE può essere usato nella procedura d'isolamento come controllo di estrazione.

Il valore Ct del controllo interno viene usato per stabilire se la procedura di estrazione del DNA è stata eseguita correttamente (vedere il paragrafo Q).

Per questa applicazione:

- **Nucleospin Blood e QIAamp DNA mini kit:** aggiungere 5 µl di IC alla miscela del tampone di lisi e campione e procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione.

- **NA Body Fluid Kit:** aggiungere 5 µl di IC al sangue (protocollo per il sangue) o alla miscela del tampone di lisi e campione (protocollo per il plasma) e procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione.

N.2 Impostazione della reazione

Il kit **EBVDNAQT.CE** è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con ABI 7500 standard (Software SDS version 1.3.1, Applied Biosystem), MX3000P (Software MxPro version 4.01, Stratagene) e CFX96 (CFX manager version 1.7, Biorad).

N.2.1 Preparazione della PCR

Importante: nel paragrafo O è riportato un esempio di schema di dispensazione, che occorre consultare prima di iniziare le operazioni descritte di seguito.

- Preparare i componenti come descritto nel paragrafo I.
- Preparare il numero richiesto di provette di reazione oppure una piastra di reazione a 96 pozzetti per i campioni in esame e per la curva standard (preparati come descritto nel paragrafo I).

Nota importante: Usare solo provette ottiche o micropiastre consigliate dai produttori di termociclatori real-time.

- Prendere in considerazione il fatto che i campioni dovrebbero essere possibilmente analizzati in duplicato.
- Includere almeno 1 provetta per il controllo negativo (NTC).
- Preparare la **miscela di amplificazione** per campioni, **NTC e curva standard** come da tabella seguente:

Preparazione della miscela di amplificazione
(I.C. come controllo di amplificazione)

Numero di reazioni		x1	x12
A	Master mix	15 µl	180 µl
B	Primer/probe	2 µl	24 µl
I.C.	Controllo interno	0.5 µl	6 µl
C	Acqua MG	2.5 µl	30 µl
Volume tot		20 µl	240 µl

Nota importante: Se il controllo interno è stato aggiunto durante la procedura d'isolamento del DNA, preparare la **miscela di amplificazione** per i **campioni** come indicato nella tabella seguente:

Preparazione della miscela di amplificazione
(I.C. come controllo di estrazione/amplificazione)

Numero di reazioni		x1	x12
A	Master mix	15 µl	180 µl
B	Primer/probe	2 µl	24 µl
C	Acqua MG	3 µl	36 µl
Volume tot		20 µl	240 µl

N.2.2 Procedura di amplificazione

- Dispensare 20 µl di miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastra.
- Aggiungere 10 µl di **campioni, NTC e curva standard** alle provette di reazione.
- Chiudere bene le provette di reazione.
- Centrifugare brevemente le provette di reazione a 2000 giri/min.
- Non lasciare le provette di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti ed esposte alla luce (coprire le provette).
- Caricare le provette di reazione nel termoblocco dello strumento real-time.
- Dopo aver impostato lo strumento real-time come descritto nel paragrafo N3 (programmazione dello strumento), procedere con la sessione di analisi.

Nota importante: Dopo risospensione nel componente C (Acqua MG), i componenti liofilizzati sono stabili per non più di 3 ore, se conservati in ghiaccio oppure a una temperatura di 2°-8°C.

Alla fine della giornata di lavoro, smaltire il materiale rimasto dai punti di diluizione STD in modo appropriato.

Il volume non utilizzato di componente B, STD e I.C. può essere congelato a -20°C ed utilizzato come descritto nella Sezione E.

N.3 Programmazione dello strumento

Per la programmazione dello strumento, fare riferimento al manuale d'istruzioni della strumentazione fornito dai produttori.

Nota importante: per il set Mx3000P, "Impostazioni di guadagno del set filtrante": ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (vedere il manuale d'istruzioni del software MxPro™ QPCR, pag. 41)

N.3.1 Profilo termico

Il **profilo termico** è riportato nella seguente tabella:

Fase	Ciclo	Temp.	Durata
1	1	50°C	2 min
2	1	95°C	10 min
3	50	95°C	15 sec
		60°C (*)	1 min

NOTA IMPORTANTE: (*) fase per la raccolta dei dati in tempo reale

ATTENZIONE: prestare attenzione a configurare il termociclatore real-time con il profilo termico corretto, seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

Impostare il termociclatore Real-Time con il profilo termico corretto, seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

N.3.2 Scelta dei fluorofori

Seguendo le istruzioni contenute nei manuali dei termociclatori Real-Time (ABI 7500, MX3000P Stratagene e BioRad CFX96), selezionare i fluorofori indicati nella tabella seguente:

Determinazione	Reporter	Quencher
EBV	FAM	Non fluorescente
Controllo interno (I.C.)	JOE/VIC	Non fluorescente
Passive Reference	ROX	Non presente

ATTENZIONE: prestare attenzione durante la configurazione del termociclatore real-time con le impostazioni corrette, seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

O. SCHEMA DEL TEST

Un esempio di schema di dispensazione per l'Analisi Quantitativa è riportato sotto:

Micropiastra o provette

	1	2	3
A	STD 1	Campione 4	
B	STD 2	Campione 5	
C	STD 3	Campione 6	
D	STD 4	Campione 7	
E	NTC	Campione 8	
F	Campione 1	Campione 9	
G	Campione 2	Campione 10	
H	Campione 3	Campione 11	

Legenda: NTC = controllo negativo STD 1,2,3,4 = curva standard del DNA del EBV, campione 1,2,3 = campioni in esame.

P. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

P.1 Impostazione preanalisi

Prima di iniziare l'analisi:

- impostare il "baseline" (livello di fluorescenza di base) come indicato sotto:

"Baseline"	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Automatic Baseline
STRATAGENE™ MX3000P®	Adaptive Baseline (non usare l'algoritmo da Mx4000 v1.00 a v3.00)
BIORAD™ CFX96®	Auto Calculated Baseline

- Impostare manualmente la "soglia" di fluorescenza FAM/JOE/VIC.

"Threshold" di fluorescenza FAM	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ MX3000P®	0.15
BIORAD™ CFX96®	300

"Threshold" di fluorescenza JOE/VIC	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02
BIORAD™ CFX96®	200

P.2 Analisi dei dati

Si effettua un controllo sui calibratori STD ogni volta che il kit viene usato per verificare se i loro valori Ct sono quelli previsti e riportati nella tabella seguente.

ABI™PRISM® 7500 SDS/ STRATAGENE™ MX3000P®/ BIORAD™ CFX RT System	
Controllo FAM	Requisiti
STD 1	22 < Ct (Threshold Cycle) < 24.5

Inoltre, vengono controllati i valori di slope e R² per verificare la qualità della sessione di analisi. Devono essere soddisfatti i requisiti seguenti:

Controllo FAM	Requisiti
Slope	-3.1 < slope < -3.9
Efficienza	R ² > 0.98

Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per ogni campione, si parte dal presupposto che la fluorescenza FAM (valore Ct positivo/negativo) e la fluorescenza JOE/VIC del controllo interno convalidino la determinazione del DNA di EBV come descritto nella tabella seguente:

EBV FAM	JOE/VIC controllo interno	Risultato del test
CAMPIONE POSITIVO	24 < Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	NON VALIDO**
CAMPIONE NEGATIVO	24 < Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	NON VALIDO**

IMPORTANTE: Una concentrazione iniziale elevata del DNA dell'EBV nel campione (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.

**In questo caso potrebbero essersi verificati problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficace o assente) o durante la fase di estrazione (presenza di inibitori o campione iniziale contenente un numero di cellule insufficienti) che possono portare a risultati non corretti o a falsi negativi. La procedura di analisi deve essere ripetuta partendo dalla fase di estrazione con un nuovo campione proveniente dallo stesso paziente.

Per ogni campione positivo rilevato con il kit EBVDNAQT.CE una corretta quantificazione del carico virale di EBV può essere applicata come riportato nella tabella sottostante:

DATI ANALITICI	DATI DIAGNOSTICI
Dati campione della sessione di analisi per l'EBV (IU/μl- copies/ul)	Carico virale EBV (IU/ml-copies/ml)
Quantità > 1E+04	Carico virale EBV > 5E+06
2E00 ≤ Quantità ≤ 1E+04	QUANTIFICAZIONE
Quantità < 2E+00	Carico virale EBV < 1E+03

NOTA IMPORTANTE: per la quantificazione dei campioni, consultare il paragrafo R.

I risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione la condizione clinica e le informazioni provenienti da altre analisi di laboratorio inerenti il paziente.

Sono possibili i seguenti risultati:

Tabella di risoluzione dei problemi

	FAM	JOE/VIC	Risultato	CONTROLLO
CAMPIONE sconosciuto	+	+	RISULTATO CORRETTO <u>Positivo</u>	IMPORTANTE: Una concentrazione iniziale elevata del DNA dell'EBV (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE

				del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.
CAMPIONE sconosciuto	+/-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: inibizione, errore nella procedura o mancato funzionamento degli strumenti	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti: FAM per la determinazione dell'EBV e JOE/VIC per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente. 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta. 7. la procedura di estrazione sia stata eseguita correttamente.
CAMPIONE sconosciuto	-	+	RISULTATO CORRETTO Negativo	
STD	+	+/-	RISULTATO CORRETTO	Un segnale JOE/VIC negativo è corretto solo se il controllo interno IC è usato come controllo di estrazione
STD	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti: FAM per la determinazione dell'EBV e JOE/VIC per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente. 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta.
STD	-	+	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti: FAM per la determinazione dell'EBV e JOE/VIC per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente.
NTC	-	+/-	RISULTATO CORRETTO	Un segnale JOE/VIC negativo è corretto solo se il controllo interno IC è usato come controllo di estrazione
NTC	+	+/-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: contaminazione	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. lo spazio di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a regolari intervalli; 4. il kit sia stato conservato correttamente.

Note importanti:

1. l'interpretazione dei risultati dovrebbe essere effettuata dietro supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio e interpretazioni errate.
2. Al momento della trasmissione dei risultati del test dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione a evitare trasferimenti di dati erranei.

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti del **RISULTATO DEL TEST CORRETTO** indicati sopra, procedere alla sezione seguente.

Se si presentano uno o più problemi tra quelli precedentemente descritti, dopo il controllo informate il supervisore di qualsiasi problema residuo per l'eventuale adozione di ulteriori misure.

R. QUANTIFICAZIONE

I calibratori STD vengono trattati come campioni dei pazienti e si utilizza lo stesso volume, 10µl, usato durante la fase di amplificazione.

La concentrazione dei calibratori STD viene espressa in copie/µl.

La **concentrazione del genoma virale per ml** del campione di ogni paziente si calcola applicando la formula seguente:

$$\text{Risultati (copie/ml)} = \frac{\text{copie/}\mu\text{l (dati run analisi)} \times \text{vol campione di eluizione (}\mu\text{l)}}{\text{Volume di estrazione dei campioni (ml)}}$$

Esempio:

$$\text{Risultati (copie/ml)} = \frac{1500 \times 100}{0.2}$$

$$\text{Risultati (copie/ml)} = 7.5 \text{ E}+05$$

Per convertire la carica virale dei campioni da copie/ml a UI/ml il fattore di conversione è **1.0**

$$\text{Results: } 1.0 \text{ copia/ml} = 1.0 \text{ IU/ml}$$

S. PERFORMANCE

La valutazione delle performance è stata eseguita in conformità a quanto indicato nelle specifiche tecniche interne o ITS.

La valutazione delle performance è stata condotta presso i laboratori di DiaPro su materiali forniti dai laboratori medici di riferimento.

S.1 SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica può essere espresso come **limite di determinazione** e come **limite di quantificazione**.

Limite di determinazione (Limit of detection-LOD): è la quantità minima del target che può essere determinate da un sistema con una probabilità dichiarata.

Per i test NAT, viene espresso come concentrazione minima dell'analita che, dopo ripetizioni multiple del test, fornisce un risultato positivo.

Il **limite di determinazione (LOD)** si stabilisce analizzando diluizioni seriali contenenti concentrazioni note dell'analita.

Il **LOD** è la concentrazione minima di analita che può essere determinate in maniera coerente (ad es. in > 95% dei campioni in condizioni di laboratorio di routine).

Nel kit EBVDNAQT.CE, il limite quantitativo **LOD** è stato determinato mediante analisi di 24 replicati (8 replicati in tre run diversi), della diluizione massima dell'analita che può essere rilevata nel 100% di essi.

I risultati sono i seguenti:

Limite di rivelazione	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.6 copie/ µl
STRATAGENE™ MX3000P®	0.6 copie/ µl
BIORAD™ CFX96®	0.6 copie/ µl

Questo significa che sussiste una probabilità del 100% di rilevare una concentrazione di 0.6E+00 copie/µl con gli strumenti di cui sopra.

S.1.1 Limite di quantificazione

Il **limite di quantificazione** è stato stabilito misurando la **linearità**, il **range dinamico** e la **riproducibilità**.

La **linearità** è la misura del grado al quale una curva si avvicina ad una linea retta. Viene espressa con il valore **SLOPE**.

Il **range dinamico** è l'intervallo delle concentrazioni di analita per le quali il valore di output finale (ciclo di soglia Ct) del sistema è direttamente proporzionale alla concentrazione di analita, con esattezza e precisione accettabili.

I limiti del range dinamico sono i limiti di quantificazione inferiore e superiore (**Limite di quantificazione**).

Per il kit EBVDNAQT.CE è stata preparata una curva di diluizione del 1st WHO International Standard per Epstein-Barr Virus (NIBSC codice 09/260) a concentrazione definita di EBV UI/ml. I punti di diluizione sono stati analizzati nel sistema analitico ed è stato determinato il loro Ct (ciclo di soglia).

Il **limite di quantificazione** superiore è di 6.70log₁₀ (5E+06 IU/ml), mentre il limite di quantificazione inferiore è di 3.0log₁₀ (1E+03 IU/ml).

S.2 SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica è la capacità di un metodo di rilevare e quantificare solo il marker bersaglio.

La specificità analitica dell'analisi del DNA dell'EBV è stata studiata come segue:

1. Il set di primer/probe è stato scelto analizzando la sequenza target del genoma con un software appropriato (LionSoft v.1.0 fornito da Biotools e Primer Express v.3.0" fornito da Applied Biosystem Inc.).
2. Il set primer/probe e la sequenza target del genoma sono stati controllati con il software "BLAST", per verificare se una qualsiasi delle sequenze di nucleotidi depositate nelle banche dei genomi in tutto il mondo presenti qualunque omologia con l'EBV, nonché con il software "ClustalX" per confrontare le sequenze target del genoma dei diversi genotipi dell'EBV.
3. La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
4. I campioni di pazienti con infezioni dovute a organismi potenzialmente interferenti sono stati ottenuti da un centro medico di riferimento.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Organismo	Risultato
CMV	negativo
VZV	negativo
HHV8	negativo
HHV6	negativo
HSV1	negativo
HSV2	negativo

S.3 SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ

S.3.1 Specificità diagnostica:

La specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato negativo in assenza di un marker target. In

questo modo, il risultato **vero negativo** è un campione sicuramente negativo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Questo parametro è stato studiato esaminando 12 campioni di plasma e 28 campioni di sangue negativi per il DNA dell'EBV.

VERI NEGATIVI	40
FALSI POSITIVI	0
CAMPIONI TOTALI	40
SPECIFICITÀ %	100

Sulla base dei risultati ottenuti, la specificità diagnostica del sistema è stata calcolata come 100%.

S.3.2 Sensibilità diagnostica

La **sensibilità diagnostica** è la probabilità che il dispositivo dia un risultato positivo in presenza del marker bersaglio. In questo modo, il risultato **vero positivo** è un campione sicuramente positivo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Per il kit EBVDNAQT.CE, questo parametro è stato studiato esaminando 3 campioni di plasma e 10 campioni di sangue positivi per il DNA dell'EBV.

VERI POSITIVI	13
FALSI NEGATIVI	0
CAMPIONI TOTALI	13
SENSIBILITÀ %	100

Inoltre, sono stati analizzati campioni del pannello Epstein-Barr Virus QCMD 2005 e del pannello Epstein-Barr Virus QCMD 2010. Il pannello QCMD 2005 contiene 7 campioni di plasma positivi e 1 campione di plasma negativo, il pannello QCMD 2010 contiene 9 campioni di plasma positivi e 1 campione di plasma negativo.

Sulla base dei risultati ottenuti, la sensibilità diagnostica del sistema è stata calcolata come 100%.

Sensibilità diagnostica	100 %
Specificità diagnostica	100 %

S.4 PRECISIONE

La precisione mostra il grado di attendibilità del sistema. Ogni procedura di misurazione ha una variazione casuale intrinseca chiamata "errore casuale". L'errore casuale non ha un valore numerico, ma è determinato dalla dispersione della misurazione espressa come deviazione standard (DevST) e coefficiente di variazione (CV%). Normalmente, la precisione di un test si riferisce alla concordanza tra le misurazioni ripetute dello stesso materiale.

Per il kit EBVDNAQT.CE, la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. 4 punti di diluizione in 8 replicati sono stati analizzati nella stessa sessione (intra-assay) e in tre sessioni diverse (inter-assay).

Le variabilità intra-assay e inter-assay sono state calcolate sulla base dei risultati ottenuti.

In assenza di parametri stabiliti nella Direttiva Europea IVD CTS abbiamo identificato il seguente valore di accettabilità per il DNA dell'EBV:

coefficiente di variazione intra-assay (CV%) ≤ 10%;
coefficiente di variazione inter-assay (CV%) ≤ 10%.

T. LIMITAZIONI

Si consiglia all'utilizzatore di questo kit di leggere attentamente e comprendere l'insero allegato alla confezione. È necessaria la massima osservanza del protocollo per ottenere risultati attendibili. In particolare, un'accurata operazione di pipettaggio del campione e del reagente, l'applicazione di un corretto flusso di lavoro e un'attenta programmazione della fase di termociclazione sono fondamentali per una determinazione e una quantificazione accurate e riproducibili del DNA del EBV.

La determinazione del DNA dell'EBV nel campione di un paziente ha vaste implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche.

Si raccomanda quindi che riservatezza, supporto appropriato e valutazione medica siano considerati come aspetti essenziali della sequenza analitica.

U. BIBLIOGRAFIA

1. Monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in peripheral blood by quantitative competitive PCR. Stevens SJC, Vervoort MBHJ, van de Brule AJC, Meenhorst PL, Meijer CJLM, and Middeldorp JM. J Clin Microbiol Sept 1999: 2852-2857.
2. Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. Hayden RT, Hokanson KM, Pounds SB, Bankowski MJ, Belzer SW, Carr J, Diorio D, Forman MS, Joshi Y, Hillyard D, Hodinka RL, Nikiforova MN, Romain CA, Stevenson J, Valsamakis A, and Balfour HH. J Clin Microbiol. Jan 2008: 157-163.
3. Comparison of commercial real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus DNA. Ruiz G, Pena P, de Ory F, and Echevarria JE. J Clin Microbiol. May 2005: 2053-2057.
4. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, and Human Herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, Ono Y, Ando H, Fujimoto Y, Kiuchi T, Kojima S, Nishiyama Y, and Kimura H. J Clin Microbiol. May 2007: 1426-1432.
5. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. Carbone A, Gloghini A, Dotti G. The Oncologist 2008; 13: 577-585.
6. Current understanding of the role of Epstein-Barr virus (EBV) in lymphomagenesis and therapeutic approaches to EBV-associated lymphomas. Cohen JI, Bollard CM, Khanna R, and Pittaluga S. Leuk Lymphoma 2008; 49 (Suppl 1): 27-34.

Simboli

LEGENDA			
	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
	Dispositivo diagnostico in vitro		Vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto		Fabbricante
	Data di scadenza		Numero di test
	Marchio di conformità CE		Data di produzione

Tutti i Prodotti IVD sono fabbricati dall'Azienda nell'ambito e sotto il controllo di un Sistema di Qualità certificato conforme alla Norma ISO 13485. Ogni lotto è sottoposto ad una procedura di Controllo di Qualità e rilasciato alle vendite solo se conforme alle specifiche tecniche comuni Europee e ai criteri di accettabilità definiti.





CONTATTI DISTRIBUTORE

4BShop Lab Srls

-  info@4BShopLab.com
-  www.4BShopLab.com
-  +39.0371.18.56.643

FABBRICANTE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl

 **MADE IN ITALY**

EN ISO 13485:2013 Certified

