

VIASURE

Real Time PCR Detection

Reagents RUO



EBV q

RUO

For Research Use Only (RUO)

This product has no declared clinical intended purpose and is not for clinical diagnostic use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Este producto no tiene un propósito clínico declarado y no es para uso en diagnóstico clínico. No existe la pretensión o representación de proporcionar información para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad.

These instructions for use apply to the following references / *Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:*

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, low profile	VS-EBV106LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, high profile	VS-EBV106HRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, low profile	VS-EBV112LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, high profile	VS-EBV112HRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, low profile	VS-EBV113LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, high profile	VS-EBV113HRUO

Table A 1. References for Open format with internal control products. / *Referencias para productos Open Format con control interno.*

Content

1.	Use	5
2.	Principle of the procedure	5
3.	Reagents provided	5
4.	Reagents and equipment to be supplied by the user	5
5.	Transport and storage conditions.....	6
6.	Additional Information	6
7.	Test procedure	7
7.1.	Sample collection, storage and transport.....	7
7.2.	DNA extraction	7
7.3.	Reference workflow of VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO for Conversion Factor (CF) calculation	8
7.4.	Standard curve preparation for quantitative assay	9
8.	Result interpretation	10
9.	Limitations of the test	12
10.	Quality control	13
	ANNEX 1	14
A1.1	Principle of the procedure.....	14
A1.2	Reagents provided.....	14
A1.3	Test procedure	15
A1.3.1	Conversion factor protocol	15
A1.3.2	Lyophilized quantitative standards	16
A1.3.3	PCR protocol.....	16

Contenido

1.	Uso	18
2.	Procedimiento	18
3.	Reactivos suministrados.....	18
4.	Material requerido y no suministrado	19
5.	Condiciones de transporte y almacenamiento	19
6.	Información Adicional	19
7.	Procedimiento del test	21
7.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	21
7.2.	Extracción de DNA	21

7.3.	Flujo de trabajo de referencia de VIASURE <i>EBV q</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO para el cálculo del Factor de Conversión (FC)	21
7.4.	Preparación de la curva estándar para el ensayo cuantitativo	22
8.	Interpretación de resultados.....	23
9.	Limitaciones del test	26
10.	Control de calidad	27
	ANEXO 1	28
A1.1	Procedimiento	28
A1.2	Reactivos suministrados	28
A1.3	Procedimiento del test	29
A1.3.1	Protocolo para el Factor de Conversión	29
A1.3.2	Estándares cuantitativos liofilizado	30
A1.3.3	Protocolo PCR	30
	Symbols for components and reagents/Símbolos para reactivos y productos	32
	Trademarks.....	32

ENGLISH

1. Use

For Research Use Only (RUO). Not for use in diagnostic procedures.

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO is a non-automatized qPCR test designed for the specific detection and quantitation of Epstein-Barr virus viral load in human samples (see section 7.2).

This test must be used for research purposes and has no medical objective.

2. Principle of the procedure

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO is a qPCR test designed for the quantitative detection of EBV DNA in human EDTA-plasma samples. After DNA isolation, the detection of EBV is performed by the amplification of a conserved region of the *BNRF1* gen, using specific primers and fluorescent-labelled probes.

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an **endogenous internal control** to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous internal control (EIC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

In addition, this kit contains 5 lyophilized vials (EBV1Q1 to EBV1Q5) with different standardized concentrations of EBV specific DNA (EBV q Quantitative Standards) for the quantification of EBV viral DNA in research samples. These quantitative standards are calibrated against the 1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260), ensuring the quality of the results and the comparison with results from other laboratories.

3. Reagents provided

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open format products with endogenous internal control.

4. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).

- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

Optional:

- 1st WHO International Standard for EBV DNA (NIBSC code 09/260), or another reference material (in case the final user needs to calculate its own conversion factor when using a different workflow with VIASURE *EBV q* Real Time PCR Detection Kit).

5. Transport and storage conditions

- The RUO kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the *EBV q* Quantitative Standards has been re-suspended, they are stable at room temperature during the time needed to dispense a 96-well plate, but they should be stored at 4 °C for up to 3 months, or at -20° C or lower for longer period of time. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Quantitative Standards have been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.

6. Additional Information

- This VIASURE *EBV q* Real Time PCR Detection Reagents RUO is for Research Use Only. It is not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-EBV113LRUO and VS-EBV113HRUO). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- **Do not mix *EBV q* Quantitative Standards from different kits and / or lots.** Each quantitative standard set has been validated for each lot of master mix with which it is supplied.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.

- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *EBV q* Real Time PCR Detection Reagents RUO and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Use calibrated micropipettes and proper tips with VIASURE *EBV q* Real Time PCR Detection Reagents RUO and stick to test procedure of this instructions of use. Inaccurate volumes due to imprecise pipetting or malpractices may result in an erroneous quantification.
- Standard curve should be included in the same run of samples to be quantify and should be generated by running each of *EBV q* Quantitative Standard in triplicate.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.
- When using 1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260), please note that the stability of this standard can be affected by some use practices. Therefore, it is recommended to reconstitute the standard and prepared the aliquots maintaining the cold chain. Additionally, aliquots should be for single use only since freeze-thawing cycles affect the integrity of the reference material.

7. Test procedure

Please, see Annex 1 for Open format products with endogenous internal control Test Procedure.

7.1. Sample collection, storage and transport

Collection, storage, and transport of samples should be maintained per the conditions validated by the user and according to appropriate laboratory guidelines.

7.2. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

VIASURE *EBV q* Real Time PCR Detection Reagents RUO has been tested with EDTA-plasma samples extracted with MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and amplified on CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System or CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) (indistinctly).

However, although they are not considered as reference workflows, other extraction-amplification workflows have been tested when using EDTA-plasma samples (hereinafter referred to as VIASURE EBV q reference workflow in this document).

	Matrix	Workflow
1 (recommended)	EDTA-Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2 (recommended)	EDTA-Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)
3	EDTA-Plasma	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)

Table 1. Sample matrix extraction-amplification methods (workflows) tested using VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO.

7.3. Reference workflow of VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO for Conversion Factor (CF) calculation

Before EBV quantification, an extraction-amplification procedure (workflow) must be decided in advance and maintained for further analysis. Because EBV concentration must be expressed in International Units (IU), and the quantitative results are obtained in copies per mL after interpolation in the linear calibration curve, a conversion factor (CF) is required to be calculated in order to relate copies/mL values with IU/mL data. **The conversion factor (CF) depends on the type of sample tested and the extraction and amplification procedure used (workflow).**

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO has been tested using EDTA-plasma samples extracted with MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and run on CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System or CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) (indistinctly). The conversion factor value was calculated using the 1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260) and established at **0.807 IU/copies**.

$$\text{IU/mL} = \text{copies/mL} \times 0.807$$

For instance, an EBV viral load determined at 10,000 copies/mL in a sample would correspond to 8,070 IU/mL.

Other workflows were tested using VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO. The CF value obtained for each one is summarized in table A1.5 (see Annexes 1), but please note that these CF values are applicable only for EDTA-plasma samples as sample matrix. Nevertheless, **each laboratory must establish its own conversion factor**.

If you wish to have a quick guide for how to calculate your CF value and an excel template to obtain the viral load in IU/mL (if VIASURE EBV q reference workflow is used), visit the website www.certest.es.

NOTE: It has been noticed that the **stability of WHO International Standard can be affected by some use practices**. Therefore, it is recommended to reconstitute the standard and prepared the aliquots maintaining the cold chain. Additionally, aliquots should be for single use only since freeze-thawing cycles affect the integrity of the reference material.

7.4. Standard curve preparation for quantitative assay

This kit contains 5 lyophilized vials (EBV1Q1 to EBV1Q5) with different standardized concentrations of EBV specific DNA (EBV q Quantitative Standards) for the quantification of EBV viral DNA in research samples. These Quantitative Standards were calibrated against the 1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260) and can be used individually as positive controls, or together to generate a standard curve with which to determine the amount of EBV viral DNA in a sample in IU/mL. Lyophilized EBV q Quantitative Standard panel of VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO are ready to use after being reconstituted in RNase/DNase free Water.

The EBV q Quantitative Standards have the following concentrations:

EBV q Quantitative Standard	Concentration (copies/mL)
EBV1Q1	1x10 ⁷ cop/mL
EBV1Q2	1x10 ⁶ cop/mL
EBV1Q3	1x10 ⁵ cop/mL
EBV1Q4	1x10 ⁴ cop/mL
EBV1Q5	1x10 ³ cop/mL

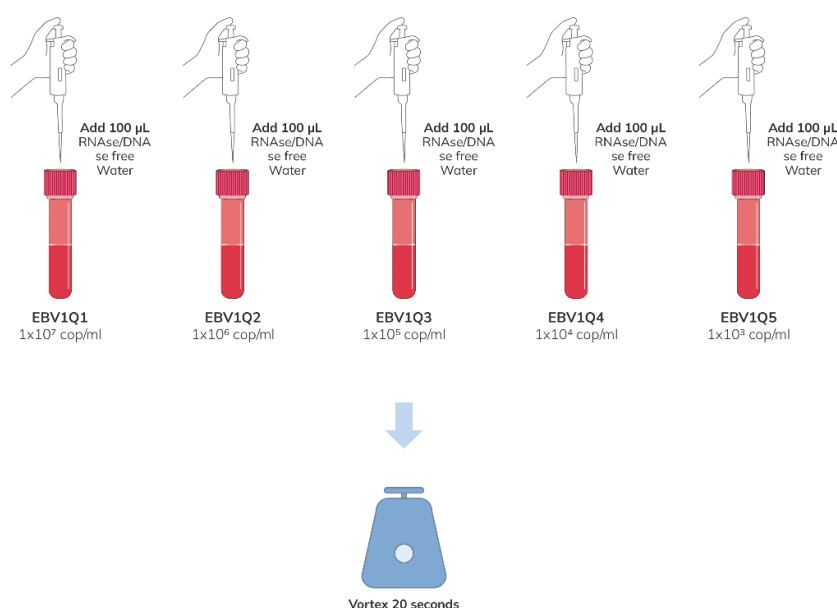
Table 2. EBV q Quantitative Standards and concentrations.

To perform a quantitative assay, take EBV q Quantitative Standard set (aluminium pouches, red vials), and prepare the standard curve as follows:

- Rehydrate EBV q Quantitative Standard set. Pipette 100 µL of RNase/DNase free Water in each lyophilized EBV q Quantitative Standard, changing the micropipette tip between vials.
- Vortex each vial for 20 seconds.

EBV q Quantitative Standards should be manipulated in an area separated from the extraction procedure, and it is recommended to have them ready to be added for when samples are to be loaded.

Figure 1. Preparation of EBV q Quantitative Standard set for quantitative assay.



8. Result interpretation

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Check Endogenous Internal Control (EIC) signal to verify the extraction and correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. Use the *EBV q* Quantification Standards amplification curves as a starting point during the run validation (before than interpretation of research sample results), in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of *EBV q* Quantitative Standards and negative control in each run validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal (i.e. exponential) in *EBV q* Quantitative Standards wells.

For a valid test run, the following control conditions must be met:

Controls	Epstein-Barr (FAM) ¹	Endogenous Internal Control (EIC) (HEX) ²	Interpretation of Controls
<i>EBV q</i> Quantitative Standards (EBV1Q1-EBV1Q5)	≤40	>40 or no signal	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	>40 or no signal	Valid

Table 3. Expected Performance of Controls

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the *EBV q* Quantitative Standards wells for the target channel), all results are reported as 'Invalid' and retesting is required.

2 Due to human housekeeping *RNase P* gene target is present in nucleated human cells, amplification signal of Endogenous Internal Control (EIC) is not expected in control wells (*EBV q* Quantitative Standards and Negative Control (NC)).

Assessment of research samples test results should be performed after the *EBV q* Quantitative Standards and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the results cannot be interpreted.

A standard curve can be generated from the dilution series of *EBV q* Quantitative Standards (EBV1Q1-5) following the formula:

$$Ct = m \log (Q) + b$$

Where: Ct = Threshold Cycle; m = Slope; Q = Concentration; and b = Intercept.

Positive samples of unknown concentration can be quantified by interpolating their Ct value in the standard curve according to the formula:

$$Q = 10^{(Ct-b)/m}$$

The obtained quantification result is reported in the concentration units of the calibrators set.

NOTE: Standard curve should be included in the same run of samples to be quantify and should be generated by running each of *EBV q* Quantitative Standard in triplicate.

The quantification results are valid if the generated standard curve reaches the following control parameter values:

- Efficiency: 80 - 120%
- R^2 : ≥ 0.98

The concentration of your "Positive sample" refers to the concentration in the eluted DNA after extraction, not to the original clinical sample. **To determine the target concentration of the original sample, consider the dilutions of the extraction procedure and PCR Set-up.**

For interpretation of sample results, use the following table, read and analyzed the results if the following reference workflow has been used for VIASURE *EBV q* Real Time PCR Detection Reagents RUO: MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and run on CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System or CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) (indistinctly):

Epstein-Barr (FAM)	Endogenous internal control (HEX)	Interpretation of samples	
< 490.83 IU/mL	≤ 40 or no signal	Valid	Non-quantifiable EBV positive sample
490.83 to 807 IU/mL	≤ 40 or no signal	Valid	Quantifiable EBV positive sample by extrapolation ¹
807 to 8.07×10^6 IU/mL	≤ 40 or no signal	Valid	Quantifiable EBV positive sample in the quantification range
$> 8.07 \times 10^6$ IU/mL	≤ 40 or no signal	Valid	Non-quantifiable EBV positive sample ²
No signal	≤ 35 ³	Valid	Target not detected
No signal	> 35 or no signal ³	Invalid	Test Failure – Repeat Testing ³

Table 4. Interpretation of sample results. No signal = no amplification curves.

1 EBV target genes positive below the quantification range let quantification of EBV viral load by extrapolation of the standard curve, but results could not be accurate.

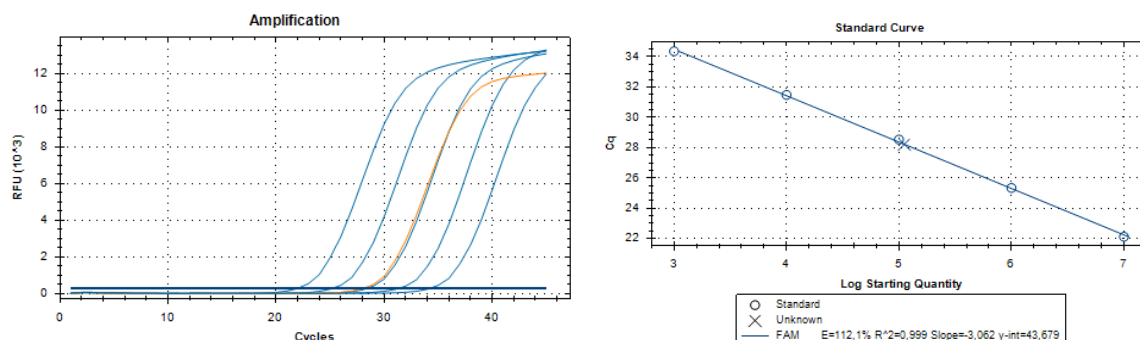
2 It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100 and thus be a quantifiable EBV-positive sample in the range of quantification.

3 In the case of EBV target genes negative, EIC must show an amplification signal with $C_t \leq 35$. The C_t value could be very variable due to the endogenous internal control is a human housekeeping gene that should be present in all human nucleated cells in the original samples. If there is an absence of signal or C_t value > 35 of the endogenous internal control, the result is considered as 'invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use; the correct performance of each workflow steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

Figure 2. Standard curve from the dilution series (blue) and quantification of a positive sample of unknown concentration (orange) run on the CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



9. Limitations of the test

- Although this assay can be used with other types of samples, it has been tested with DNA extracted EDTA-plasma samples from patients with signs and symptoms of EBV infection undergoing antiviral treatment.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- Lower levels of target below the low limit of quantification might be detected, but results may not be accurately quantifiable.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by EBV, either the high number of DNA template copies which contains each EBV q Quantitative Standard vial, samples containing high concentrations of target DNA, or contamination due to PCR products from previous reactions.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the viral DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown EBV variants.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent infection of EBV or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Inaccurate viral DNA results (loss of viral load) may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Improper maintenance of commonly used equipment, especially micropipettes and extraction/amplification systems.

-
- Use of uncalibrated micropipettes and/or improper tips.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
 - Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.
 - The conversion factor (CF) depends on the type of sample tested and the extraction and amplification instruments used (workflow). Therefore, each sample type-extraction-amplification workflow requires the calculation of its own CF.

10. Quality control

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO contains EBV q Quantitative Standards and a negative control that must be included in each run to correctly interpret and quantify the results. Also, the endogenous internal control (EIC) in each well confirms the correct performance of the technique.

ANNEX 1

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, low profile	VS-EBV106LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, high profile	VS-EBV106HRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, low profile	VS-EBV112LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, high profile	VS-EBV112HRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, low profile	VS-EBV113LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, high profile	VS-EBV113HRUO

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

In addition, this kit contains 5 lyophilized vials (EBV1Q1 to EBV1Q5) with different standardized concentrations of EBV specific DNA (EBV q Quantitative Standards). The Quantitation Standards could be used individually as positive controls, or together to generate a standard curve for the quantification of EBV viral DNA in individual samples. These quantitative standards are calibrated against the 1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260), ensuring the quality of the results and the comparison with results from other laboratories.

Target	Channel	Gene
EBV	FAM	<i>BNRF1</i> gene
Endogenous Internal control (EIC)	HEX*	human <i>RNase P</i>

Table A1 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.cerfest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3 and A1.4. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
EBV q 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
EBV q Quantitative Standards (EBV1Q1-EBV1Q5)	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	5 (1 vial per concentration)
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO Kit with Ref. VS-EBV106LRUO, VS-EBV106HRUO, VS-EBV112LRUO and VS-EBV112HRUO.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
EBV q 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
EBV q Quantitative Standards (EBV1Q1-EBV1Q5)	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	5 (1 vial per concentration)
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO with Ref. VS-EBV113LRUO and VS-EBV113HRUO.

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Conversion factor protocol

EBV q Quantitative Standards has been calibrated against the 1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260) and can be used to generate a standard curve with which to determine the EBV viral DNA in a sample in International Units (IU) per mL after calculating the conversion factor (CF). **The conversion factor (CF) depends on the type of sample tested and the extraction and amplification instruments used (workflow).** Therefore, the combination for which the conversion factor is to be tested must be decided in advance and maintained in all corresponding analyses.

The reference workflow established to use with VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO is EDTA-plasma samples extracted with **MagDEA Dx SV kit / MagLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and run on CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System or CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) (indistinctly)**. If this workflow is performed, the concentration of samples in IU/mL can be calculated using the CF value **0.807 IU/copies** as shown in the following formula:

$$\text{IU/mL} = \text{copies/mL} \times 0.807$$

Other alternative workflows were tested using VIASURE EBV *q* Real Time PCR Detection Reagents RUO. The CF value obtaining for each one is summarized in table A1.5:

	Matrix	Workflow	Conversion Factor (CF) (IU/copies)
1 (recommended)	EDTA- Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	0.807
2 (recommended)	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)	0.807
3	EDTA- Plasma	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)	1.338

Table A1 5. Calculation of conversion factor (CF) with different extraction-amplification methods using EDTA-plasma samples spiked with a known concentration of 4th WHO International Standard for EBV DNA (NIBSC code 09/260). (IU) = International Units.

If another workflow is followed, then CF value must be calculated by the user. If you wish to have a quick guide for how to calculate your CF value and an excel template to obtain the viral load in IU/mL (if VIASURE EBV *q* reference workflow is used), visit the website www.certes.es.

A1.3.2 Lyophilized quantitative standards

EBV *q* Quantitative Standards contain high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized EBV *q* Quantitative Standards (red vials) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) into each vial and vortex thoroughly for 20 seconds.

Once the EBV *q* Quantitative Standards has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A1.3.3 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. At least one replicate of each EBV *q* Quantitative Standard and one replicate of negative control must be included in each run for each assay. However, standard curve should be generated by running each of EBV *q* Quantitative Standard in triplicate, as well as to be included in the same run of samples to be quantified.

Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, each reconstituted EBV *q* Quantitative Standards (EBV1Q1-5) (aluminium pouches, red vials), and Negative Control (violet vial) and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler.

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A1.6. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Epstein-Barr virus DNA) and HEX (Endogenous Internal Control (EIC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Uso

Sólo para uso en investigación (RUO). No para uso en procedimientos de diagnóstico.

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO es un test de RT-qPCR no automatizado diseñado para la detección específica y cuantificación de la carga viral del virus Epstein-Barr en muestras humanas (ver sección 7.2).

Este test debe ser utilizado para fines de investigación y no tiene ningún objetivo médico.

2. Procedimiento

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO es una prueba de qPCR diseñada para la detección cuantitativa del DNA del virus Epstein-Barr (EBV) en muestras humanas de EDTA-plasma. Tras el aislamiento del DNA, la detección de EBV se lleva a cabo mediante la amplificación de la región conservada del gen *BNRF1*, usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO utiliza la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un **Control Interno endógeno** para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza el gen humano *housekeeping* como **Control Interno Endógeno (CIE)** (gen *RNasa P* presente en el DNA humano). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Además, este kit contiene 5 viales liofilizados (EBV1Q1 a EBV1Q5) con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico de EBV (*EBV q Quantitative Standards*) para la cuantificación del DNA viral de EBV en muestras de investigación. Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260)", asegurando así la calidad de los resultados y la comparativa con los procedentes de otros laboratorios.

3. Reactivos suministrados

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para productos "open format" con control interno endógeno.

4. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 μL , 20-200 μL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

Opcional:

- Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for EBV DNA (NIBSC code: 09/260)", u otro material de referencia (en caso de que el usuario final necesite calcular su propio factor de conversión si utiliza un flujo de trabajo diferente).

5. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits RUO puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Una vez que los EBV q Quantitative Standards han sido resuspendidos, son estables a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para dispensar una placa de 96 pocillos, pero deberían guardarse a 4° C (hasta 3 meses), o a -20° C o menos períodos de tiempo prolongados. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad de los Estándares Cuantitativos tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

6. Información Adicional

- VIASURE EBV q Real Time PCR Reagents RUO es solo para uso en investigación. No es para uso en procesos de diagnóstico o terapéuticos.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio está roto o dañado.

- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- No utilizar reactivos si el desecante no está presente o está roto dentro de los sobres del reactivo.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-EBV113LRUO y VS-EBV113HRUO). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los reactivos si el sellado se ha roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- **No mezclar EBV q Quantitative Standards de diferentes kits y / o lotes.** Cada set de estándares cuantitativos ha sido validado para cada lote de mezcla de reacción con la que es proporcionado.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Use micropipetas calibradas y puntas apropiadas con VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO y siga el procedimiento del test recogido en estas instrucciones de uso. Un pipeteo impreciso o mala praxis que conlleve la dispensación de volúmenes inexactos puede resultar en una cuantificación errónea.
- La curva estándar debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas, y debería de generarse añadiendo cada EBV q Quantitative Standard por triplicado.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- Si se utiliza el Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260)", tenga en cuenta que la estabilidad de este estándar puede verse afectada debido a determinadas prácticas. Por ello, se recomienda reconstituirlo y alícuotarlo manteniendo la cadena de frío. Además, las alícuotas deberían ser de un único uso, ya que los ciclos de congelación-descongelación afectan la integridad del material de referencia.

7. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para productos “open format” con control interno endógeno.

7.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

La recolección, el almacenamiento y el transporte de muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario y de acuerdo con las guías de laboratorio correspondientes.

7.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO ha sido testado con muestras de plasma en EDTA extraídas con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y amplificadas en CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System o CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) (indistintamente).

No obstante, aunque no se consideren flujos de trabajo de referencia, también se han testado otros procedimientos de extracción-amplificación empleado muestras de plasma en EDTA (en adelante mencionado en este documento como flujo de trabajo VIASURE EBV q).

	Matriz	Flujo de trabajo
1 (recommended)	EDTA-Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2 (recommended)	EDTA-Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)
3	EDTA-Plasma	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)

Tabla 1. Método (flujo de trabajo) de matriz-extracción-amplificación testado con VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO.

7.3. Flujo de trabajo de referencia de VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO para el cálculo del Factor de Conversión (FC)

Antes de proceder con la cuantificación de EBV, se debe decidir de antemano el procedimiento de extracción-amplificación (flujo de trabajo) a seguir y mantenerlo en los análisis posteriores. Debido a que la concentración de EBV debe expresarse en Unidades Internacionales (International Units – IU-) y que los resultados cuantitativos se obtienen en copias por mL tras la interpolación sobre la curva de calibración, es necesario el cálculo de un factor de conversión (FC) para transformar los datos obtenidos en copias/mL a IU/mL. **El factor de conversión (FC) es dependiente del tipo de muestra testada y de los procedimientos de extracción y amplificación empleados (flujo de trabajo).**

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO ha sido testado con muestras de plasma en EDTA extraídas con MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y amplificadas con CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System o CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)

(indistintamente). El factor de conversión se calculó empleando el Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260)", estableciéndose en un valor de **0,807 IU/copias**.

$$\text{IU/mL} = \text{copias/mL} \times 0,807$$

Por ejemplo, una carga viral establecida a 10.000 copias/mL en una muestra se corresponde con 8.070 IU/mL.

Otros flujos de trabajo fueron testados con VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO. El FC obtenido para cada uno se recoge en la tabla A1.5 (ver Anexo 1), pero tenga en cuenta que estos valores FC son aplicables solo con muestras de plasma en EDTA como matriz. No obstante, **cada laboratorio debe establecer su propio factor de conversión**.

Si desea disponer de una guía rápida para calcular su valor FC y una plantilla (en formato Excel) para obtener la carga viral en IU/mL (si se emplea el flujo de trabajo VIASURE EBV q), visite el sitio web www.certest.es.

NOTA: Se ha observado que la **estabilidad del Estándar Internacional de la OMS puede verse afectada debido a determinadas prácticas**. Por ello, se recomienda reconstituirlo y alicuotarlo manteniendo la cadena de frío. Además, las alícuotas deberían ser de un único uso, ya que los ciclos de congelación-descongelación afectan la integridad del material de referencia.

7.4. Preparación de la curva estándar para el ensayo cuantitativo

Este kit contiene 5 viales liofilizados (EBV1Q1 a EBV1Q5) con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico de EBV (EBV q Quantitative Standards) para la cuantificación del DNA viral de EBV en muestras de investigación. Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260)", y pueden usarse individualmente como control positivo, o juntos para generar una curva estándar con la que determinar la cantidad de DNA viral de EBV de una muestra en IU/mL. El panel liofilizado de EBV q Quantitative Standards de VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO está listo para su uso tras reconstituirlo en agua libre de RNAsa/DNAsa.

Los EBV q Quantitative Standards tienen las siguientes concentraciones:

EBV q Quantitative Standard	Concentración (copias/mL)
EBV1Q1	1x10 ⁷ cop/mL
EBV1Q2	1x10 ⁶ cop/mL
EBV1Q3	1x10 ⁵ cop/mL
EBV1Q4	1x10 ⁴ cop/mL
EBV1Q5	1x10 ³ cop/mL

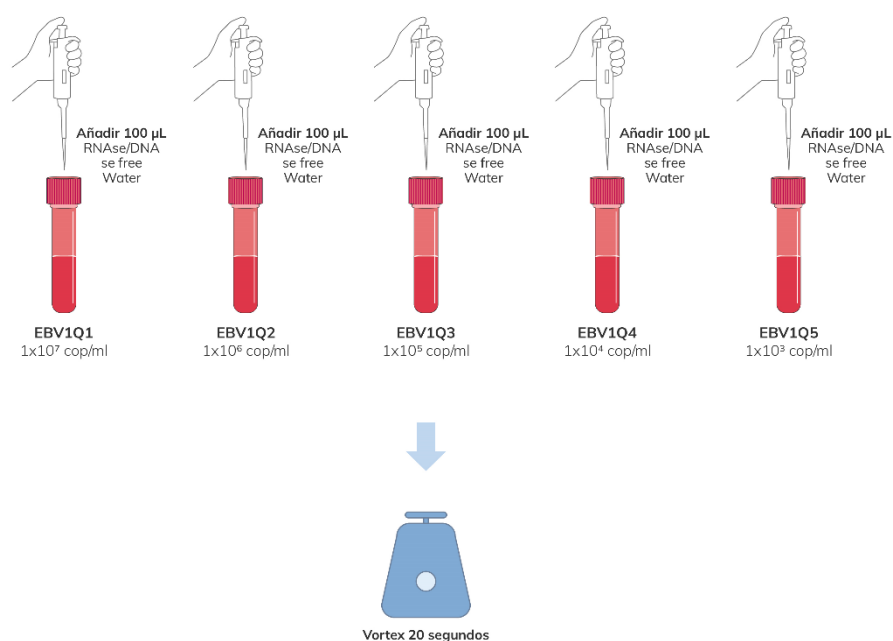
Tabla 2. EBV q Quantitative Standards y concentraciones.

Para la realización de un ensayo cuantitativo, coja el set de EBV q Quantitative Standards (sobres de aluminio, viales rojos), y prepare la curva estándar como se indica a continuación:

- Rehidrate el set de *EBV q* Quantitative Standards. Pipetee 100 µL de agua libre de RNAsa/DNAsa en cada *EBV q* Quantitative Standard liofilizado, cambiando la punta de la micropipeta entre viales.
- Agite cada vial en el vortex durante 20 segundos.

Los *EBV q* Quantitative Standards deben manipularse en un área del laboratorio separada del proceso de extracción, y se recomienda tenerlos rehidratados y vortexeados para cuando las muestras vayan a ser dispensados.

Figura 1. Preparación del set de *EBV q* Quantitative Standard para el ensayo cuantitativo.



8. Interpretación de resultados

Sólo para uso en investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico.

Compruebe la señal de control interno endógeno (CIE) para verificar el correcto funcionamiento de la extracción y la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilizar la curva de amplificación de los *EBV q* Quantification Standards como punto de partida durante la validación de la ejecución (antes de la interpretación de los resultados de la muestra de investigación), para asegurarse de que los umbrales caen dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a diferentes intensidades de señal.

El uso de los *EBV q* Quantitative Standards y del control negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal (es decir, exponencial) en los pocillos de los *EBV q* Quantitative Standards.

Para una prueba válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Epstein-Barr (FAM) ¹	Control Interno Endógeno (CIE) (HEX) ²	Interpretación de los controles
EBV q Quantitative Standards (EBV1Q1-EBV1Q5)	≤40	>40 o sin señal	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	>40 o sin señal	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en los pocillos de los EBV q Quantitative Standards para el canal diana), todos los resultados se consideran "no válidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 Debido a que el gen *housekeeping* diana *RNAse P* está presente en células humanas nucleadas, no se espera que exista señal de amplificación para el control interno endógeno (CIE) en los pocillos de control (EBV q Quantitative Standards y Control Negativo (CN)).

La valoración de los resultados de las muestras de investigación debe realizarse tras el examen de los resultados de los EBV q Quantitative Standards y control negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados no se pueden interpretar.

La curva estándar puede generarse a partir de diluciones seriadas de los EBV q Quantitative Standards (EBV1Q1-5) empleando la fórmula:

$$Ct = m \log (Q) + b$$

Donde Ct = ciclo umbral; m = pendiente; Q = concentración; y b = intersección.

Las muestras positivas de concentración desconocida pueden cuantificarse interpolando su valor de Ct en la curva estándar siguiendo la fórmula:

$$Q = 10^{(Ct-b)/m}$$

Los resultados de cuantificación obtenidos se obtienen en las unidades de concentración del set de calibración.

NOTA: La curva estándar debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas, y debería de generarse añadiendo cada EBV q Quantitative Standard por triplicado.

Los resultados de la cuantificación son válidos si la curva estándar generada cumple con los siguientes parámetros de control:

- Eficiencia: 80-120%.
- $R^2 \geq 0,98$

La concentración de su "Muestra positiva" hace referencia a la concentración del DNA eluido tras la extracción, no de la muestra clínica original. **Para determinar la concentración de la muestra original, tenga en cuenta las diluciones correspondientes a la extracción y a la preparación de la PCR.**

Para la interpretación de los resultados de la muestra, use la siguiente tabla si el flujo de trabajo utilizado para VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO ha sido: MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y amplificado en CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System or CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) (indistintamente):

Epstein-Barr (FAM)	Control Interno Endógeno (HEX)	Interpretación para muestras	
< 490.83 IU/mL	≤40 o sin señal	Válido	Muestra EBV positiva no cuantificable
490.83 a 807 IU/mL	≤40 o sin señal	Válido	Muestra EBV positiva cuantificable mediante extrapolación ¹
807 a 8.07 x 10 ⁶ IU/mL	≤40 o sin señal	Válido	Muestra EBV positiva cuantificable en el rango de cuantificación
> 8.07 x 10 ⁶ IU/mL	≤40 o sin señal	Válido	Muestra EBV positiva no cuantificable ²
Sin señal	≤ 35 ³	Válido	Diana no detectada
Sin señal	>35 o sin señal ³	Inválido	Test Fallido – Repita el test ³

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras. Ct valores, no señal = sin curva de amplificación.

1 Un resultado positivo para el gen diana de EBV por debajo del rango de cuantificación permite una cuantificación de la carga viral de EBV mediante extrapolación de la curva estándar, pero los resultados pueden no ser precisos.

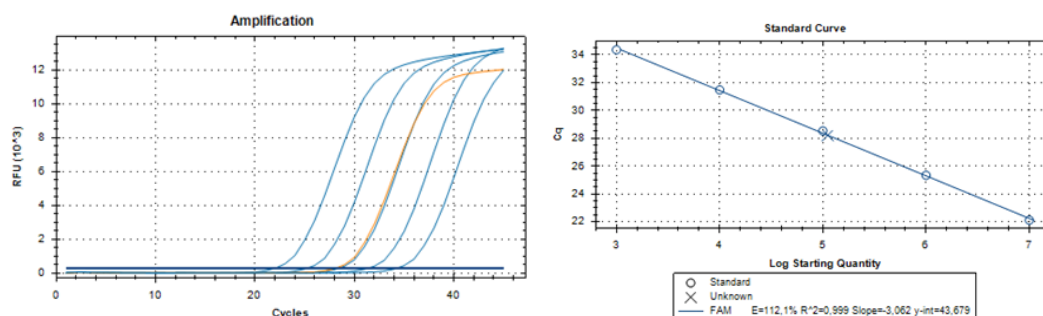
2 Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de ADN 1:10 y/o 1:100 consiguiendo así una muestra positiva al EBV cuantificable en el rango de cuantificación.

3 En el caso de que el gen diana de EBV resulte negativo, el CIE debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤35. El valor de Ct podría ser muy variable debido a que el control interno endógeno es un gen humano *housekeeping* que debería estar presente en todas las células nucleadas humanas en la muestra original. En el caso de ausencia de señal o un valor de Ct >35 del control interno endógeno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el correcto rendimiento de cada etapa del flujo de trabajo, y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA asilado, o
- Volver a extraer y analizar otra alícuota de la misma muestra, o
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 2. Ejemplo de gráfica de curva estándar a partir de diluciones seriadas (azul) y cuantificación de una muestra positiva de concentración desconocida (naranja). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



9. Limitaciones del test

- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido testado con DNA extraído de muestras de EDTA-plasma procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por EBV en tratamiento antiviral.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar niveles de copias molde diana por debajo del límite de cuantificación, pero los resultados pueden no ser cuantificables con precisión.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con EBV, ya sea por el gran número de copias de molde DNA que contiene cada vial de *EBV q Quantitative Standard set*, muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana, o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA viral durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de EBV.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones por EBV o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a valores imprecisos de DNA viral (pérdida de carga viral), incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Mantenimiento incorrecto de equipos usados comúnmente, especialmente micropipetas y sistemas de extracción/amplificación.
 - Uso de micropipetas no calibradas y /o puntas no apropiadas.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestras, tratamiento previo de la muestra etc... entre otros.

- El factor de conversión (FC) es dependiente del tipo de muestra testada y de los procedimientos de extracción y amplificación empleados (flujo de trabajo). Por ello, cada tipo de muestra-extracción-amplificación (flujo de trabajo) requiere del cálculo de su propio FC.

10. Control de calidad

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO contiene EBV q Quantitative Standards y un control negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar y cuantificar correctamente los resultados. Además, el control interno endógeno (CIE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

ANEXO 1

OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, low profile	VS-EBV106LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, high profile	VS-EBV106HRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, low profile	VS-EBV112LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, high profile	VS-EBV112HRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, low profile	VS-EBV113LRUO
VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, high profile	VS-EBV113HRUO

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como control Interno Endógeno (CIE) (gen *RNasa P* presente en el DNA humano). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Además, este kit contiene 5 viales liofilizados (EBV1Q1 a EBV1Q5) con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico de EBV (*EBV q Quantitative Standards*). Los estándares de cuantificación pueden utilizarse individualmente como controles positivos, o juntos para generar una curva estándar para la cuantificación del ADN viral del VHB en muestras individuales. Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260)", asegurando así la calidad de los resultados y la comparativa con los procedentes de otros laboratorios.

Diana	Canal	Gen
EBV	FAM	Gen <i>BNRF1</i>
Control Interno Endógeno (CIE)	HEX*	<i>RNasa P</i> humana

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.cerest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3 y A1.4. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos

compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
EBV q 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
EBV q Quantitative Standards (EBV1Q1-EBV1Q5)	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	5 (1 vial por concentración)
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO con Ref.VS-EBV106LRUO, VS-EBV106HRUO, VS-EBV112LRUO y VS-EBV112HRUO.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
EBV q 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
EBV q Quantitative Standards (EBV1Q1-EBV1Q5)	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	5 (1 vial por concentración)
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO con Ref. VS-EBV113LRUO y VS-EBV113HRUO.

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Protocolo para el Factor de Conversión

EBV q Quantitative Standards están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for EBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/260)", y pueden usarse para generar una curva estándar con la que determinar la cantidad de DNA viral de EBV de una muestra en IU/mL tras calcular el factor de conversión (FC). **El factor de conversión (FC) es dependiente del tipo de muestra testada y de los procedimientos de extracción y amplificación empleados (flujo de trabajo).** Por ello, se debe decidir y establecer de antemano el procedimiento de extracción-amplificación (flujo de trabajo) para el que se vaya a calcular dicho FC, y mantenerlo en los análisis posteriores.

El flujo de trabajo de referencia establecido a usar con VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO es el que combina muestras de plasma en EDTA extraídas con **MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument**

(Precision System Science Co.) y amplificadas en CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System o CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) (indistintamente). Si se establece este flujo de trabajo, la concentración de las muestras en IU/mL puede calcularse empleando el valor FC igual a **0,807IU/copias**, tal y como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{IU/mL} = \text{copias/mL} \times 0,807$$

Otros flujos de trabajo fueron testados con VIASURE EBV q Real Time PCR Detection Reagents RUO. El FC obtenido para cada uno se recoge en la tabla A1.5:

	Matriz	Flujo de trabajo	Factor de Conversión (FC) (IU/copias)
1 (recomendado)	EDTA-Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	0,807
2 (recomendado)	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)	0,807
3	EDTA-Plasma	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)	1.338

Tabla A1 5. Cálculo del Factor de Conversión (FC) con diferentes métodos de extracción-amplificación utilizando muestras de plasma en EDTA contaminado con una concentración conocida del Estándar Internacional de la OMS "4th WHO International Standard for EBV DNA (NIBSC code 09/260)". (IU) = International Units.

Si se establece otro flujo de trabajo, entonces el valor FC debe ser calculado por el usuario. Si desea disponer de una guía rápida para calcular su valor FC y una plantilla (en formato Excel) para obtener la carga viral en IU/mL (si se emplea el flujo de trabajo VIASURE EBV q), visite el sitio web www.certest.es.

A1.3.2 Estándares cuantitativos liofilizado

EBV q Quantitative Standards contienen una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir los EBV q Quantitative Standards liofilizados (viales rojos) añadiendo a cada vial 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex durante 20 segundos.

Almacenar EBV q Quantitative Standards a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. Se requiere incluir al menos una réplica de cada EBV q Quantitative Standard y una réplica del control negativo en cada carrera para cada ensayo. Sin embargo, la curva estándar debería de generarse añadiendo cada EBV q Quantitative Standard por triplicado, al igual que debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas.

Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de la muestra, cada uno de los EBV q Quantitative Standards reconstituidos (EBV1Q1-5) (sobre de aluminio, vial rojo) y el Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (DNA del virus Epstein-Barr) y HEX (Control Interno Endógeno (CIE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Symbols for components and reagents/Símbolos para reactivos y productos

	Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Catalogue number Número de referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	06/07/2023

Table A 2. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 6th July 2023

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev02