

راهنمای کیت EBV RQ

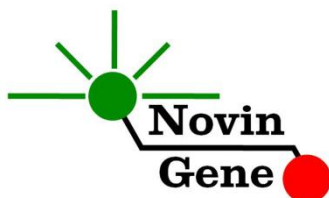
جهت تشخیص و کمیت سنجی ویروس اپشتین بار
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-32-100

ویرایش ۱/۰

زمستان ۱۳۹۸



فهرست مندرجات:

۱.مقدمه.....	۲
۲. محتویات کیت.....	۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت.....	۳
۴. سایر موارد مورد نیاز.....	۴
۵. نکات قابل توجه.....	۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۵
۷. عوامل مزاحم.....	۵
۸. کنترل داخلی.....	۶
۹. استخراج DNA.....	۶
۱۰. دستور کار PCR.....	۷
۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۸
۱۲. تنظیم دستگاه StepOne.....	۸
۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۹
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۹
۱۵. آنالیز نتایج StepOne.....	۱۲
۱۶. محاسبه تیترو ویروس.....	۱۴
۱۷. محدوده خطی.....	۱۴
۱۸. میزان حساسیت.....	۱۴

کیت EBV RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne به منظور تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس اپشتین بار در نمونه می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

ویروس اپشتین بار (Epstein-Barr virus/EBV) از ویروس های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae, human herepesvirus 4/HHV-4) است و ژنومی متشکل از DNA دو رشته ای دارد. عفونت با این ویروس بسیار شایع بوده و در ابتدای سنین کودکی و عموماً بدون علائم بالینی واضح اتفاق می افتد، گرچه عفونت در نوجوانان و جوانان می تواند منجر به بیماری مونونوکلئوز عفونی نیز بشود. پس از آن ویروس به صورت غیرفعال در بدن فرد باقی می ماند به گونه ای که حدود ۹۰٪ جمعیت بزرگسال به این ویروس مبتلا هستند. در صورت بروز ضعف سیستم ایمنی و یا در افرادی که پیوند عضو شده اند، امکان فعال شدن این ویروس نیز وجود دارد. این ویروس با انواع سرطان از جمله لنفوم بورکیت، بیماری هوچکین، سرطان حلق و حنجره و برخی دیگر انواع سرطان مرتبط است. تعیین تیترو ویروس در نمونه بیمار پس از پیوند عضو و یا پس از درمان سرطان نقش مهمی در مراقبت و تعیین پیش آگهی بیماری دارد.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیترو ویروس اپشتین بار را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. این روش در مقایسه با سایر روش های ارزیابی میزان ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیع ترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود. بر همین اساس می توان تعداد ویروس را در نمونه مورد بررسی تعیین نمود، بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به این که در این روش نیازی به بررسی

محصول PCR وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می‌باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از ناکارآمدی استخراج DNA یا مهار PCR پیشگیری می‌کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
EBV Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
EBV S1	استاندارد ۱: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
EBV S2	استاندارد ۲: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
EBV S3	استاندارد ۳: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
EBV S4	استاندارد ۴: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
EBV IC	کنترل داخلی	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می‌باشند. از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می‌شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله ها) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله ها) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آن‌ها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، می تواند پلاسمای خون محیطی (peripheral blood)، مایع مغزی نخاعی و یا بافت باشد. نمونه را می توان در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود و در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیترو ویروس در آن ثابت می ماند.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمیکند.

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد.

کنترل داخلی را می‌توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا صرفاً در مرحله PCR آن را به EBV Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می‌باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می‌باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می‌کنید، ۱۰ میکرولیتر از کنترل داخلی را به مخلوط نمونه و بافر Lysis اضافه نمایید. **توجه داشته باشید که کنترل داخلی نباید مستقیماً به نمونه بیمار (یعنی پیش از افزودن بافر lysis) اضافه شود زیرا کارایی خود را از دست خواهد داد.**

در صورتی که کنترل داخلی را به EBV Mix اضافه می‌نمایید، تنها می‌توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به EBV Mix اضافه نمایید. به طور مثال برای ۱۰ واکنش به ۱۵۰ میکرولیتر از میکس، ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنید و مخلوط حاصل را مطابق توضیحات قسمت ۱۰ استفاده نمایید. در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۴ می‌شود.

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۰. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۴ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

در صورتی که کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از **EBV Mix** اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **EBV Mix** اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت ۹ کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۱۰ میکرولیتر از **DNA** استخراج شده، **استاندارد** یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل EBV 0.2 یا EBV 0.1 (با توجه به لوله های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و سپس فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه چهار استاندارد و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای اینکار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear)

می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی **Define Targets and Samples** می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات، دکمه **Start Run** را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳. تنظیم سایر دستگاهها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاههای **Real-Time PCR** استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

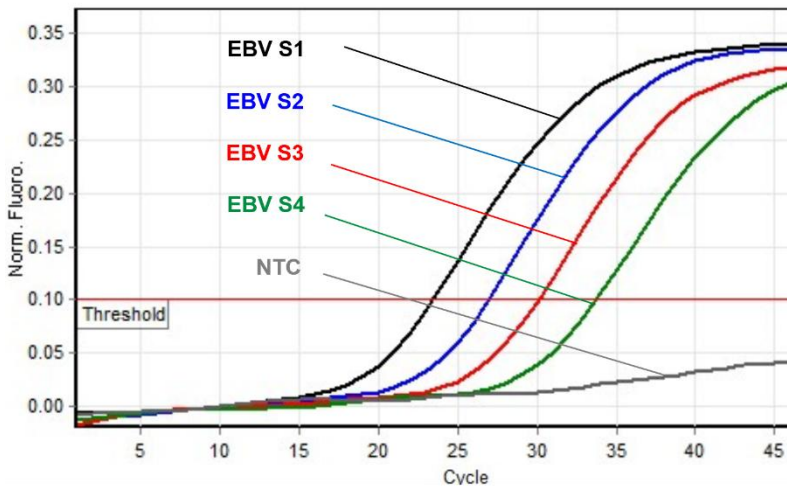
Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگهای **FAM** و **VIC** تنظیم شود. **EBV Mix** موجود در کیت حاوی **ROX** می باشد. غلظت نهایی **ROX** در واکنش 300nM می باشد.

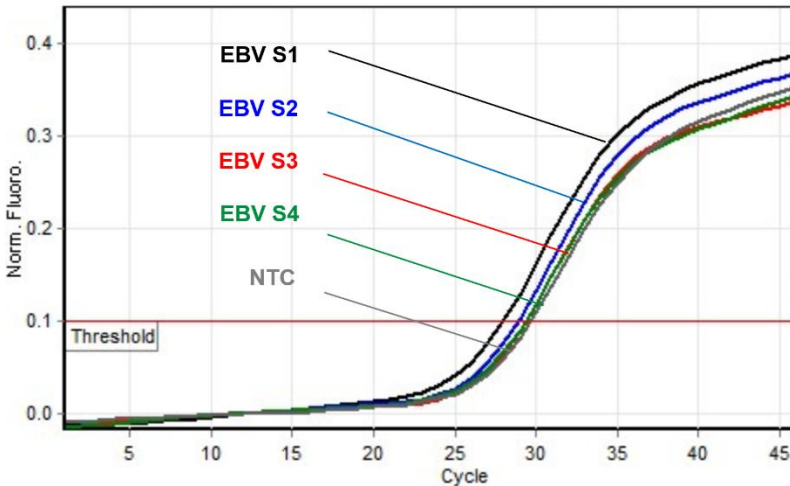
۱۴. آنالیز نتایج **Rotor-Gene**

برای آنالیز نتایج به راهنمای **Rotor-Gene** مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی **Quantitation Analysis** را انتخاب کرده و روی **Green** دوبار کلیک کنید. در پنجره **autofind threshold** حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه **OK** را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می توانید به طور ساده آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی **Analysis** مجدداً

Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱. منحنی استانداردهای EBV در کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲. منحنی استاندارد های EBV در کانال زرد دستگاه روتورژن

توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به EBV و افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب میشود و CT آندر صورت وجود فاقد ارزش میباشد.

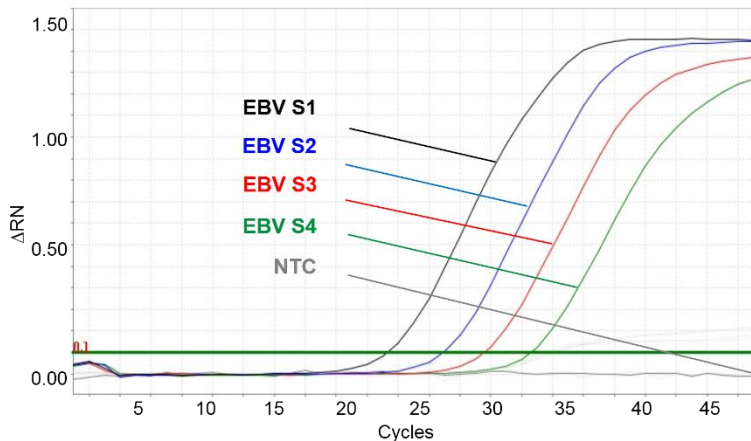
نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموئیدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را مثبت تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.

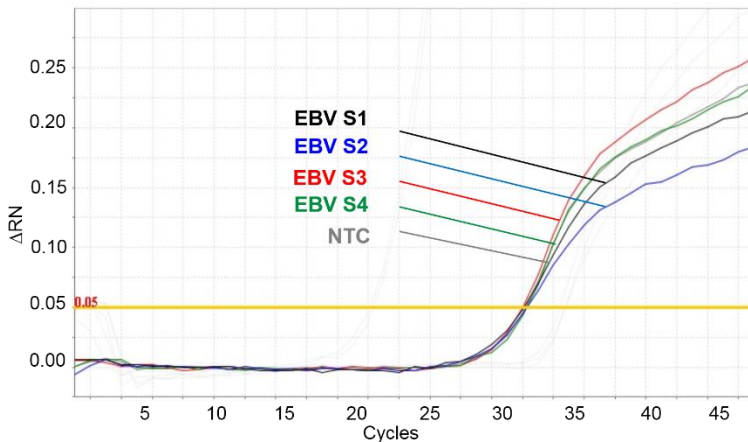
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۷ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای EBV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/MC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۳. منحنی استانداردهای EBV در کانال FAM دستگاه استپ وان



تصویر ۴. منحنی استاندارد های EBV در کانال VIC دستگاه استپ وان

توجه داشته باشید که افزایش **تابش EBV/FAM** مربوط به **EBV** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت **CT** معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و **CT** آن در صورت وجود فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال EBV/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.

- در صورتی که یک نمونه در کانال EBV/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۷ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال EBV/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۶. محاسبه تیترو ویروس

هر کیت حاوی ۴ استاندارد کمتی با غلظت مشخص می باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه بیمار معین می شود. استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر (copy/μl) مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

۱۷. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با است با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و شامل بازه یک میلیون کپی در میکرولیتر تا یک کپی در میکرولیتر می باشد.

۱۸. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و معادل نیم کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪

مواردی که تیتر ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

EBV RQ Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection and
Quantitation of Epstein-Barr virus
(EBV) DNA**

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-32-100
Version 1.0
Winter 2020

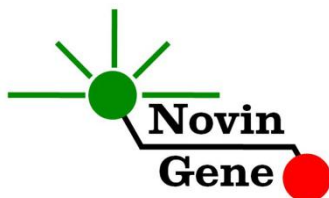


Table of Contents:

1. Introduction	2
2. Kit Contents	3
3. Storage and Stability	3
4. General Precautions.....	3
5. Additionally Required Materials	4
6. Specimen, storage and transport.....	4
7. Interfering substances	5
8. Internal control (IC).....	5
9. DNA isolation.....	6
10. PCR Protocol.....	6
11. Programming of the Rotor-Gene	7
12. Programming of StepOne(/Plus)	7
13. Programming other machines	7
14. Data Analysis: Rotor-Gene.....	8
15 Data Analysis: StepOne	10
16. Quantitation.....	12
17. Linear Range.....	13
18. Sensitivity.....	13

EBV RQ kit is intended for use with Rotor-Gene or StepOne machines and for the quantitative detection of EBV DNA. This kit is for research use only.

1. Introduction

Human Herpesvirus 4 (HHV-4) known as Epstein-Barr virus (EBV) is a double-stranded DNA virus and a member of Herpesviridae family. Infection occurs mostly in early childhood and without clinical symptoms. However, infection in teens and young adults may cause infectious mononucleosis. The primary infection is followed by the life long latent infection and about 90% of adult population are infected with this virus. EBV has also been linked to a variety of cancers including lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. It also can be reactivated in immunocompromised hosts, after transplantation or following therapy in cancer patients leading to lymphoproliferative disorders. Therefore, viral load monitoring is important in these patients.

EBV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of Epstein barr virus with Rotor-Gene or StepOne machines. This method provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other available methods. In this method application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product.

Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantitation of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

This kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to identify possible DNA extraction failure or PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual or quick guide, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
EBV Mix	PCR Master mix*	360 µl
EBV S1	Standard 1: 10,000 copy/µl	150 µl
EBV S2	Standard 2: 1,000 copy/µl	150 µl
EBV S3	Standard 3: 100 copy/µl	150 µl
EBV S4	Standard 4: 10 copy/µl	150 µl
EBV IC	Internal control	250 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits, respectively.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent

preparation where the master-mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.

- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components **on ice** completely, mix by flickering followed by a quick spin and **store on crushed ice** after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood plasma, CSF or tissue should be collected in sterile condition in proper and sterile containers. Samples can be stored at +4°C for few days or stored at -20°C for up to few weeks.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinized patients must not be used as well. Elevated levels of bilirubin (≤ 4.5 mg/dl) and lipids (≤ 1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. Internal Control (IC)

In order to evaluate the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, EBV RQ kit contains internal control (IC). IC can be used during extraction process or simply added to EBV Mix.

To monitor both DNA extraction and PCR reaction, internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. Required volume of internal control is 10% of elution buffer. For instance if extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. **Please note that internal control should not be added directly to the patient sample (i.e. before addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.**

If IC is added to EBV Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of IC reagent should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 15ul of internal control should be added to 150ul of EBV Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, IC should generate a CT of 27-34 in Yellow/VIC Channel.

9. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

If IC is introduced during extraction process, pipette 15µl of EBV Mix to each PCR tube.

If IC is added to the EBV Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 9) to each PCR tube.

Then add 10ul of extracted DNA, standard or water to each tube.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

11. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on EBV 0.2 or EBV 0.1 according to the tubes used. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 4 standards and fewl samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample names on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The EBV Mix contains ROX. Final concentration of ROX in reaction is 300nM.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as "standard" and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **EBV (Green channel)** and qualitative analysis for **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green.

In the pop up for Automatic Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then click on OK. . You may also, simply set the threshold at 0.1. Repeat the above for Cycling A. Yellow, cancel the Automatic Threshold and manually put threshold on 0.1. Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

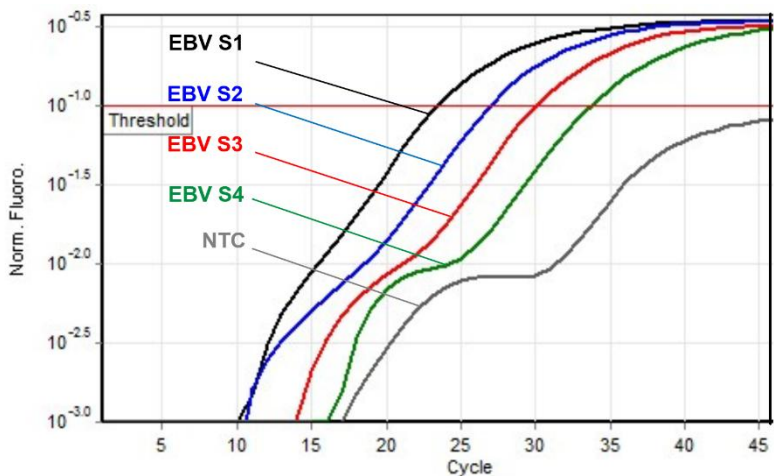


Fig 1. Typical EBV graph in Green channel for Rotor-Gene

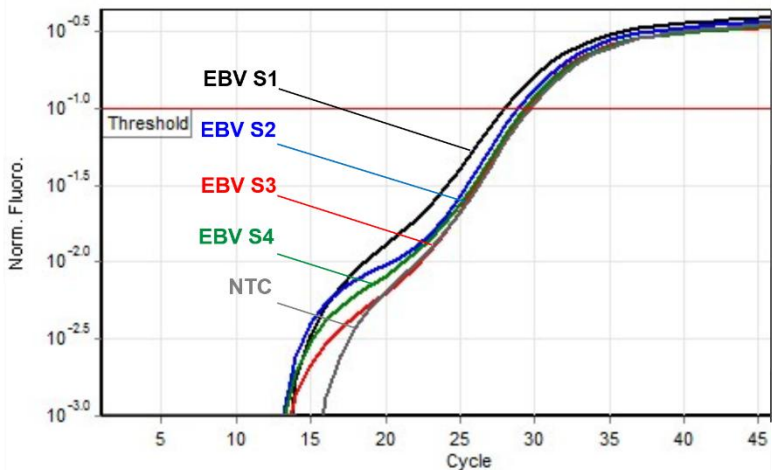


Fig 2. Typical EBV graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 27-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green and Yellow channels.

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for EBV/FAM at 0.1 and at 0.05 for IC/VIC.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

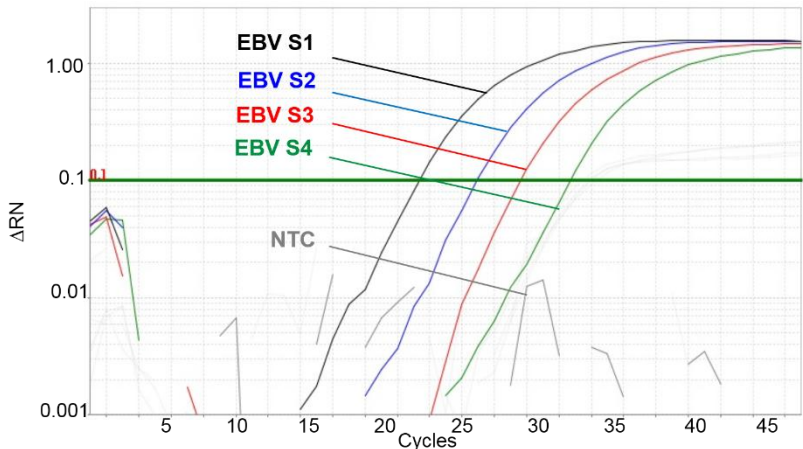


Fig 3. Typical EBV graph in FAM channel for StepOne

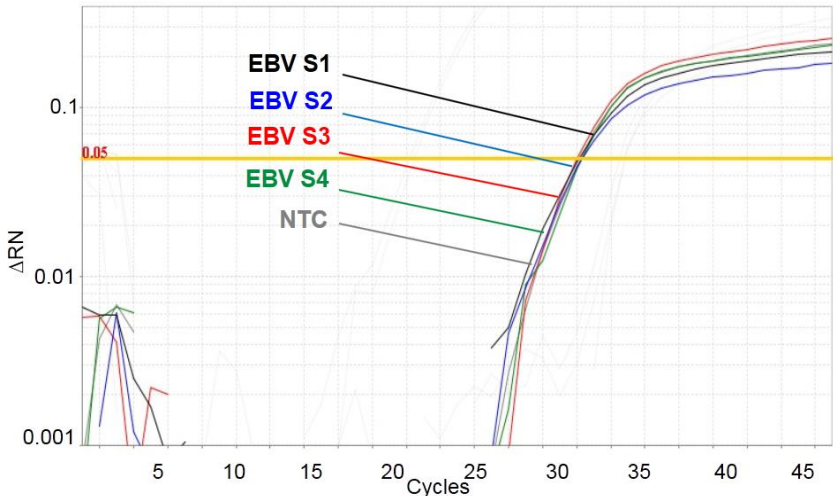


Fig 4. Typical EBV graph in VIC channel for StepOne

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in FAM/EBV channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM/EBV channel while it is positive in VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 27-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of FAM/EBV and VIC/IC channels.

16. Quantitation

The kit provides 4 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples viral load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently using all five standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as copy/ μ l. To convert the result to copy/ml following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result(copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the plasma volume used for DNA isolation and
“Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or
dissolve isolated DNA.

17. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed to be linear in the range of 1,000,000 copies/ μl to 1 copy/ μl .

18. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 0.5 copy/ μl .