



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA: INDIRIZZO  
BIOMEDICO-BIOMOLECOLARE**

*“Diagnosi molecolare da infezione da Epstein-Barr Virus. Performance cliniche del test Fusion EBV rispetto allo standard di laboratorio su campione di sangue intero”.*

**Relatrice: Giorgia Novello**

**Correlatore: Andrea Rocchetti**

**Correlatore: Paolo Bottino**

**Candidata: Camilla Zanaga**

**Anno accademico 2024/2025**







UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE


DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA: INDIRIZZO  
BIOMEDICO-BIOMOLECOLARE

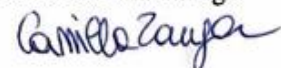
*“Diagnosi molecolare da infezione da Epstein-Barr Virus. Performance cliniche del test Fusion EBV rispetto allo standard di laboratorio su campione di sangue intero”.*

Relatrice: Giorgia Novello 

Correlatore: Andrea Rocchetti 

Correlatore: Paolo Bottino 

Candidata: Camilla Zanaga



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>6</b>
1.1 Storia .....	6
1.2 Struttura .....	6
1.3 Ciclo replicativo e patogenesi .....	9
1.3.1 Ingresso del virus nella cellula ospite.....	10
1.3.2 Latenza e riattivazione dell'EBV .....	12
1.4 Malattie associate all'ebv .....	13
1.4.1 Mononucleosi infettiva.....	14
1.4.2 Linfoma di Burkitt.....	14
1.4.3 Linfoma di Hodgkin .....	15
1.4.4 Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL).....	16
1.4.5 Carcinoma nasofaringeo .....	16
1.4.6 Carcinoma gastrico associato a EBV .....	17
1.5 Epidemiologia globale ebv .....	18
1.6 Diagnostica di laboratorio .....	19
1.6.1 Colture cellulari per la dimostrazione del virus .....	19
1.6.2 Test sierologici.....	19
1.6.3 Test molecolari.....	21
1.7 Terapia e nuovi approcci terapeutici .....	22
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>25</b>
3.1 Metodica di routine: piattaforme ELITech InGenius® / BeGenius®.....	25
3.1.1 Raccolta dei campioni e gestione della fase preanalitica .....	26
3.1.2 Preparazione dello strumento e della seduta analitica .....	27
3.1.3 Flusso di lavoro.....	31
3.1.4 Prestazioni analitiche: limite minimo e massimo .....	33
3.1.5 Sensibilità, specificità e interferenze.....	34
3.2 Sistema Panther Fusion – Hologic .....	34
3.2.1 Manipolazione dei campioni biologici di sangue intero .....	36

3.2.2 Calibratori, controlli e controllo di qualità .....	38
3.2.3 Interpretazione dei risultati del test EBV Quant Assay .....	39
3.4 Confronto analitico tra Panther Fusion ed Elitech.....	42
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>43</b>
4.1 Distribuzione dei risultati e analisi della concordanza tra le metodiche .....	47
4.2 Valutazione dinamica della cinetica della viremia nei pazienti sottoposti a monitoraggio .....	49
4.2.1 Monitoraggio viremia paziente 1 .....	49
4.2.2 Monitoraggio viremia paziente 2.....	51
4.2.3 Monitoraggio viremia paziente 3 .....	53
4.2.4 Monitoraggio viremia paziente 4 .....	55
4.2.5 Monitoraggio viremia paziente 5 .....	57
4.2.6 Monitoraggio viremia paziente 6 .....	59
4.2.7 Monitoraggio viremia paziente 7 .....	61
4.2.8 Monitoraggio viremia paziente 8 .....	63
4.2.9 Monitoraggio viremia paziente 9.....	65
4.3 Valutazione della relazione quantitativa globale tra le metodiche ELITECH e HOLOGIC .....	66
4.4 Distribuzione dei valori di carica virale EBV espressi in log <sub>10</sub> UI/mL (metodica ELITECH).....	69
4.5 Analisi di concordanza tra le metodiche ELITECH e HOLOGIC mediante diagramma di Bland–Altman .....	71
<b>5.DISCUSSIONE.....</b>	<b>74</b>
5.1 Concordanza tra ELITECH e HOLOGIC.....	74
5.2 Cinetica virale nei pazienti ematologici .....	80
5.3 Cinetica virale nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido .....	82
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>85</b>
<b>7. BIBIOGRAFIA .....</b>	<b>87</b>
<b>8. SITOGRAFIA MANUALI:.....</b>	<b>92</b>



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Storia

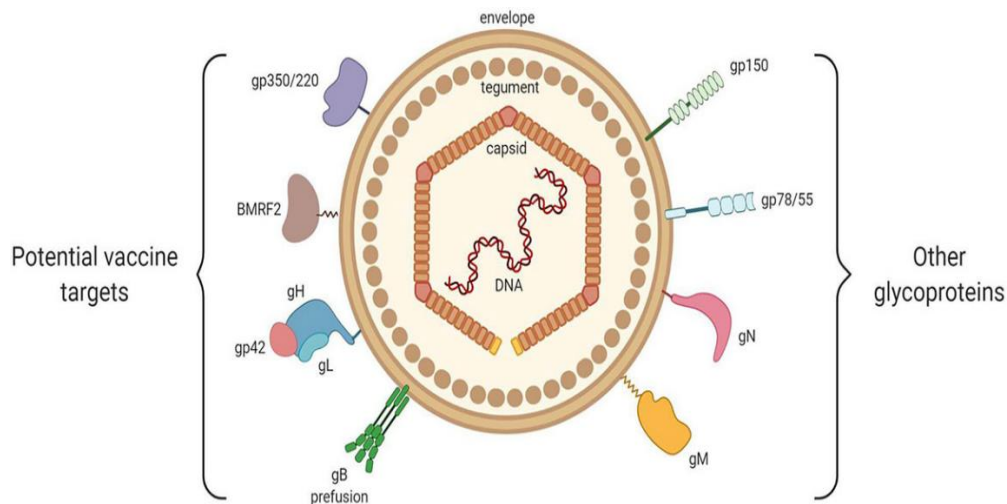
Il virus di Epstein-Barr fu identificato nei primi anni Sessanta nell'ambito di studi finalizzati a comprendere l'eziologia del linfoma di Burkitt, una neoplasia pediatrica caratterizzata da un'elevata incidenza in specifiche regioni dell'Africa equatoriale. Sebbene questa patologia fosse già nota in letteratura, fu solo grazie a indagini cliniche ed epidemiologiche sistematiche che emerse l'ipotesi di un possibile coinvolgimento di un agente infettivo nel suo sviluppo.

Un passo decisivo verso l'identificazione del virus fu rappresentato dall'allestimento di linee cellulari ottenute da biopsie di linfoma. L'analisi di tali colture mediante microscopia elettronica consentì di osservare particelle virali con caratteristiche morfologiche compatibili con quelle degli Herpesvirus, fornendo le prime evidenze dirette dell'esistenza di un nuovo agente virale associato alla malattia.

Successivamente, il virus fu identificato anche in colture cellulari ottenute da pazienti con mononucleosi infettiva e da individui asintomatici, evidenziando la sua ampia diffusione nella popolazione. Studi sierologici confermarono il ruolo eziologico dell'EBV nella mononucleosi infettiva. Inoltre, esperimenti in vitro dimostrarono la capacità del virus di indurre una proliferazione persistente dei linfociti, suggerendo un potenziale effetto trasformante e chiarendo il suo possibile coinvolgimento in patologie neoplastiche (Burkitt, 1958).

## 1.2 Struttura

Il virus di Epstein-Barr (EBV) appartiene alla famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Gammaherpesvirinae*, ed è classificato come Herpesvirus umano 4. È un virus a DNA di grandi dimensioni, con un diametro complessivo compreso tra 150 e 200 nm, la cui organizzazione strutturale è sovrapponibile a quella degli altri herpesvirus. Il virione è costituito da un genoma virale associato a un core proteico di forma toroide, racchiuso in un capside a simmetria icosaedrica di circa 100 nm di diametro, formato da 162 capsomeri. (Thompson & Kurzrock, 2004)



*Figura 1: struttura dell'EBV (Jean-Pierre et al., 2021)*

Tra il nucleocapside e l'involucro esterno è presente il tegumento, uno strato proteico intermedio che svolge un ruolo rilevante nelle fasi precoci dell'infezione. L'involucro lipidico, acquisito durante la gemmazione dalla membrana plasmatica della cellula ospite, è arricchito da numerose glicoproteine di superficie, fondamentali per il riconoscimento della cellula bersaglio e per l'ingresso del virus. (Yates et al., 1984)

Il genoma dell'EBV è costituito da una molecola di DNA a doppio filamento lineare di circa 172 kb, con una capacità di codifica superiore a 85 geni. Dal punto di vista organizzativo, esso comprende una regione lunga e una regione corta uniche, entrambe delimitate da sequenze terminali ripetute e da ripetizioni interne di dimensioni maggiori. Tali elementi strutturali favoriscono la circolarizzazione del DNA una volta all'interno della cellula infetta e rappresentano un utile strumento per l'analisi clonale dell'infezione. Il DNA virale, caratterizzato all'inizio degli anni Settanta, presenta un contenuto in guanina e citosina pari a circa il 59%, che consente di distinguerlo facilmente dal DNA cellulare.

L'utilizzo del DNA dell'EBV come sonda molecolare ha permesso di dimostrare la frequente presenza del genoma virale nel linfoma di Burkitt e nel carcinoma nasofaringeo. Studi di ibridizzazione degli acidi nucleici hanno inoltre evidenziato che, in alcune linee cellulari di linfoma di Burkitt trasformate in vitro ma non produttrici di particelle virali mature, il genoma dell'EBV è presente in forma circolare extracromosomiale, in uno stato di latenza. (Delecluse et al., 1993)

La nomenclatura dei geni dell'EBV deriva dalla mappa di restrizione BamHI, in base alla quale i frammenti genomici sono stati identificati e successivamente classificati come geni espressi durante la fase litica o durante la latenza. La maggior parte delle proteine codificate dal genoma virale è coinvolta in processi essenziali quali la replicazione del DNA, il metabolismo dei nucleotidi e l'assemblaggio delle strutture del virione, inclusi capsidi, tegumento e involucro. Accanto a questi, il genoma comprende geni latenti e RNA non codificanti, la cui espressione è limitata alle fasi di latenza ed è cruciale per la persistenza dell'infezione.

Durante l'infezione latente, il DNA dell'EBV persiste nel nucleo della cellula infetta prevalentemente sotto forma di episomi circolari multipli, mantenuti stabilmente nel corso delle divisioni cellulari grazie all'azione coordinata dell'origine di replicazione virale oriP e di una proteina nucleare codificata dal virus. In questa fase vengono espressi solo pochi geni virali, tra cui le proteine nucleari EBNA e le proteine latenti di membrana LMP, che svolgono un ruolo centrale nel mantenimento del genoma virale e nella modulazione dei segnali cellulari. Sebbene la persistenza episomale rappresenti la modalità più comune, in specifiche condizioni il genoma dell'EBV può anche integrarsi nel DNA cromosomico della cellula ospite.

Infine, alla fine degli anni Settanta, il DNA di diversi ceppi di EBV propagati in cellule di primati non umani fu clonato in plasmidi batterici o in fagi  $\lambda$ . La successiva determinazione della sequenza completa del genoma ha rappresentato un passaggio fondamentale per l'approfondimento dei meccanismi molecolari alla base dell'infezione, della latenza e della patogenicità del virus. (Thompson & Kurzrock, 2004)

### 1.3 Ciclo replicativo e patogenesi

Il ciclo replicativo del Virus di Epstein-Barr comprende tre fasi principali: infezione primaria, latenza e riattivazione litica. La capacità del virus di persistere per tutta la vita dell'ospite è il risultato dell'evoluzione di meccanismi altamente efficaci di evasione della risposta immunitaria. L'infezione primaria si verifica generalmente durante l'infanzia ed è spesso asintomatica, in particolare in contesti caratterizzati da condizioni igienico-sanitarie meno rigorose. Quando invece il primo contatto avviene in adolescenza o in età adulta, l'infezione può manifestarsi clinicamente come mononucleosi infettiva, tipicamente associata alla trasmissione salivare attraverso il contatto diretto. Ulteriori vie di trasmissione comprendono i rapporti sessuali, le trasfusioni di sangue e il trapianto di organi. (Tonoyan et al., 2019)

Superata la fase acuta, l'EBV instaura un'infezione latente prevalentemente nei linfociti B circolanti, riducendo drasticamente l'espressione genica virale e la produzione di nuove particelle infettive, al fine di sfuggire al controllo immunitario. Periodiche riattivazioni litiche consentono tuttavia la produzione di virioni e la trasmissione del virus ad altri individui.

Le principali cellule bersaglio dell'EBV sono i linfociti B e le cellule epiteliali dell'orofaringe. Rimane tuttora oggetto di dibattito quale di questi compartimenti cellulari venga infettato per primo in seguito alla trasmissione salivare. Secondo un'ipotesi, il virus si replica inizialmente nelle cellule epiteliali orofaringee, per poi infettare i linfociti B presenti nei tessuti linfoidei dell'anello di Waldeyer. (Crawford, 2001)

Un'ipotesi alternativa suggerisce invece che l'EBV infetti direttamente i linfociti B naïve a livello tonsillare, che rappresenterebbero il principale serbatoio virale nelle fasi iniziali dell'infezione. (Dunmire et al., 2015)

In accordo con tali modelli, la saliva rappresenta la principale via di trasmissione dell'EBV. Dopo l'esposizione della mucosa orale, il virus può infettare le cellule epiteliali dell'orofaringe, nelle quali è in grado di replicarsi attivamente e generare nuovi virioni. Questi possono successivamente infettare i linfociti B che transitano o risiedono nei tessuti linfoidei associati alla cavità orale. In alternativa, l'EBV presente

nella saliva può attraversare la barriera epiteliale mediante meccanismi di transcitosi, entrando direttamente in contatto con i linfociti B sottostanti e avviando l'infezione senza una fase preliminare di replicazione epiteliale. (Fox et al., 2011)

### 1.3.1 Ingresso del virus nella cellula ospite

L'ingresso dell'EBV nella cellula ospite è un processo complesso e fortemente dipendente dal tipo cellulare coinvolto, poiché richiede l'interazione coordinata di diverse glicoproteine virali con specifici recettori dell'ospite.

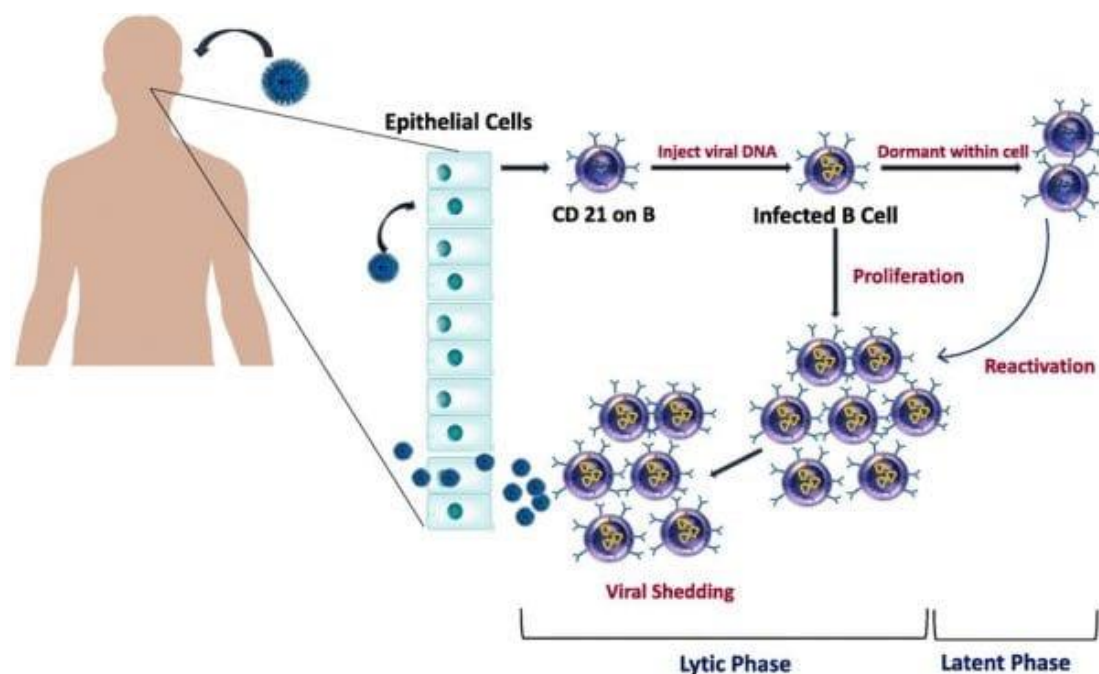


Figura 2: Schema semplificato del ciclo replicativo dell'EBV tra cellule epiteliali orofaringee e linfociti B. (Young & Rickinson, 2004)

Nei linfociti B, la fase di adesione è mediata principalmente dalla glicoproteina gp350/220, che si lega al recettore del complemento CD21, con un possibile contributo anche del recettore CD35. Poiché CD21 è espresso anche da altre popolazioni cellulari, come alcune cellule T, tale recettore può occasionalmente consentire l'infezione anche di questi tipi cellulari.

Le cellule epiteliali, che non esprimono CD21, utilizzano meccanismi alternativi di adesione e ingresso. In questo contesto, un ruolo centrale è svolto dal complesso di glicoproteine gH–gL, che consente l'interazione con specifici recettori presenti sulla superficie delle cellule epiteliali. Dopo l'adesione iniziale, la fusione della membrana virale richiede l'azione concertata delle glicoproteine gH, gL e gB.

Nei linfociti B, la glicoproteina gp42 è essenziale per l'ingresso, poiché interagisce con le molecole MHC di classe II e favorisce la fusione tra l'involucro virale e la membrana cellulare. Nelle cellule epiteliali, al contrario, l'ingresso avviene in modo indipendente da gp42 ed è mediato prevalentemente dal complesso gH–gL.(Kuri et al., 2020)(Lunn et al., 2017)

Un ulteriore aspetto rilevante dell'infezione da EBV riguarda la composizione delle particelle virali neoformate, che varia in funzione del tipo di cellula in cui avviene la replicazione. Quando il virus si replica nelle cellule epiteliali, gp42 viene incorporata nei virioni, rendendoli particolarmente efficienti nell'infettare i linfociti B.

Al contrario, durante la replicazione nei linfociti B, gp42 viene sequestrata dalle molecole MHC di classe II e risulta assente nei nuovi virioni, che mostrano quindi una maggiore capacità di infettare le cellule epiteliali. Questo meccanismo favorisce il passaggio ciclico del virus tra compartimento epiteliale e linfocitario, contribuendo alla persistenza dell'infezione nell'ospite. Dopo l'ingresso nei linfociti B, l'EBV viene internalizzato mediante endocitosi e la fusione della membrana virale avviene a livello endosomiale, un processo mediato principalmente dalle glicoproteine gB e gH–gL. Nelle cellule epiteliali, sebbene inizialmente si ritenesse che l'ingresso avvenisse esclusivamente per fusione diretta con la membrana plasmatica, è stato successivamente dimostrato che il virus può sfruttare anche vie endocitiche, incluse l'endocitosi dipendente da zattere lipidiche e la micropinocitosi. In questo contesto, diverse proteine dell'ospite, tra cui integrine, neuropilina-1 e il recettore EphA2, contribuiscono all'adesione e all'ingresso virale, con EphA2 che sembra svolgere un ruolo particolarmente rilevante nell'infezione delle cellule epiteliali.(Cohen, 2000) (J. Chen & Longnecker, 2019)

### 1.3.2 Latenza e riattivazione dell'EBV

Dopo l'ingresso nei linfociti B, il virus di Epstein-Barr (EBV) può stabilire una fase di latenza, durante la quale il genoma virale viene mantenuto nel nucleo della cellula ospite in forma episomiale e non si verifica la produzione di nuove particelle virali. Questa modalità infettiva consente al virus di persistere a lungo nell'ospite evitando il riconoscimento da parte del sistema immunitario. Sebbene l'EBV possa infettare anche altri tipi cellulari, la latenza stabile si instaura prevalentemente nei linfociti B, in particolare nelle cellule della memoria, che offrono un contesto biologico favorevole alla persistenza del genoma virale e alla sua trasmissione alle cellule figlie. (Yu & Robertson, 2023)

Durante la latenza, l'espressione genica virale è ridotta a un numero limitato di prodotti, selezionati per garantire il mantenimento dell'episoma e la sopravvivenza della cellula infetta. Gli antigeni nucleari dell'EBV svolgono un ruolo chiave nella replicazione e nella corretta segregazione del genoma virale durante la divisione cellulare, mentre le proteine latenti di membrana contribuiscono alla modulazione dei segnali intracellulari, promuovendo la sopravvivenza cellulare e inibendo l'apoptosi. A questi meccanismi si affianca l'espressione di RNA non codificanti, tra cui gli EBER e numerosi microRNA, che partecipano alla regolazione della risposta immunitaria e all'adattamento del microambiente cellulare. (Tzellos et al., 2014)

In base al repertorio di geni latenti espressi, l'infezione latente da EBV è ulteriormente suddivisa in distinti programmi di latenza. Nella latenza di tipo I è espressa esclusivamente la proteina nucleare EBNA1, necessaria per il mantenimento dell'episoma virale. La latenza di tipo II è caratterizzata dall'espressione di EBNA1 associata alle proteine latenti di membrana LMP, coinvolte nell'attivazione di segnali di sopravvivenza cellulare. La latenza di tipo III, infine, prevede l'espressione completa degli antigeni nucleari e delle proteine latenti di membrana, configurando un programma altamente proliferativo.

La latenza rappresenta tuttavia uno stato dinamico e reversibile. In presenza di specifici segnali cellulari, come l'attivazione del recettore delle cellule B o la differenziazione in plasmacellule, l'EBV può riattivarsi ed entrare nella fase litica dell'infezione. In questo contesto, i geni litici vengono espressi secondo una sequenza

temporale ben definita. La transizione alla fase litica è avviata dall'espressione dei geni immediati-precoci BZLF1 e BRLF1, che codificano fattori di trascrizione virali capaci di attivare l'espressione dei geni litici precoci.(J. Chen & Longnecker, 2019)

I geni litici precoci includono quelli necessari per la replicazione del DNA virale, come la DNA polimerasi codificata dal gene BALF5, che consente la duplicazione del genoma a partire dall'origine di replicazione litica (OriLyt). Una volta completata la replicazione del DNA, vengono espressi i geni litici tardivi, che codificano le proteine strutturali del virione e permettono l'assemblaggio delle nuove particelle virali. I virioni maturi vengono successivamente rilasciati dalla cellula infetta attraverso il sistema secretorio, rendendosi disponibili per l'infezione di nuove cellule.

Il passaggio dalla latenza alla fase litica è strettamente controllato da fattori cellulari e dallo stato epigenetico del genoma virale. Durante la latenza, il DNA dell'EBV è mantenuto in una conformazione trascrizionalmente repressiva; in risposta a specifici stimoli cellulari, tale repressione può essere parzialmente rimossa, consentendo l'attivazione dei promotori litici e l'avvio della replicazione produttiva. Questa capacità di alternare in modo controllato tra latenza e fase litica rappresenta un elemento centrale della biologia dell'EBV e della sua persistenza nell'ospite.(Yu & Robertson, 2023).

#### 1.4 Malattie associate all'ebv

La capacità del virus di Epstein-Barr di stabilire un'infezione persistente e di modulare l'espressione genica virale consente al patogeno di rimanere a lungo nell'ospite e, in alcuni casi, di contribuire allo sviluppo di condizioni patologiche. In base al contesto cellulare e immunologico, l'infezione da EBV può manifestarsi con quadri clinici eterogenei, che spaziano da forme acute autolimitanti a disordini linfoproliferativi e neoplasie. Le principali patologie EBV-correlate verranno descritte nei paragrafi seguenti.

### 1.4.1 Mononucleosi infettiva

La mononucleosi infettiva è una manifestazione clinica acuta dell'infezione primaria da virus di Epstein-Barr, che si osserva più frequentemente negli adolescenti e nei giovani adulti. La trasmissione avviene principalmente attraverso il contatto diretto con la saliva e il periodo di incubazione è di alcune settimane. Il quadro clinico tipico è caratterizzato da febbre, marcata astenia, faringodinia e linfadenopatia, in particolare a carico delle stazioni laterocervicali; in una quota di pazienti possono essere presenti anche splenomegalia ed epatomegalia di entità variabile. Dal punto di vista laboratoristico, la malattia è associata a leucocitosi con aumento delle cellule mononucleate e alla comparsa di linfociti atipici nel sangue periferico, che corrispondono prevalentemente a linfociti T reattivi attivati in risposta all'infezione. La diagnosi si basa sulla valutazione clinica supportata da test sierologici, in particolare dalla rilevazione di anticorpi IgM diretti contro l'antigene del capsido virale, e dal test eterofilo, che risulta positivo nella maggior parte dei casi. Nonostante la sintomatologia possa persistere per diverse settimane, la mononucleosi infettiva è generalmente una malattia benigna e autolimitante, con risoluzione spontanea nei soggetti immunocompetenti; le complicanze sono rare e la prognosi è generalmente favorevole. (Damania et al., 2022)

### 1.4.2 Linfoma di Burkitt

Il Linfoma di Burkitt è una neoplasia aggressiva a cellule B la cui associazione con il Virus di Epstein-Barr varia in base al contesto geografico ed epidemiologico. La forma endemica, diffusa prevalentemente nell'Africa subsahariana, è fortemente correlata all'infezione da EBV e colpisce soprattutto l'età pediatrica, con frequente localizzazione a livello maxillo-facciale. Nei Paesi non endemici, invece, il linfoma di Burkitt si presenta più spesso in forma sporadica ed è meno frequentemente associato al virus. (White et al., 2012)

Dal punto di vista patogenetico, un evento centrale è rappresentato dalla traslocazione cromosomica che coinvolge l'oncogene *c-myc*, la quale ne determina la sovraespressione sotto il controllo degli enhancer delle immunoglobuline. Tali alterazioni si verificano verosimilmente durante la reazione del centro germinativo, una fase della maturazione dei linfociti B caratterizzata da intensa attività di

riorganizzazione del DNA. In questo contesto, l'enzima AID che è fisiologicamente coinvolto nei processi di maturazione anticorpale, può contribuire all'instabilità genomica e favorire l'insorgenza di traslocazioni onco geniche. (Kuri et al., 2020)

Nelle aree endemiche, l'infezione cronica da *Plasmodium falciparum* rappresenta un importante cofattore, poiché induce un'attivazione persistente delle cellule B, aumenta l'espressione di AID e riduce l'efficacia del controllo immunitario sull'EBV, favorendo l'espansione di cellule B infettate. Il contributo dell'EBV allo sviluppo del linfoma di Burkitt è inoltre legato alla sua capacità di promuovere la sopravvivenza delle cellule B geneticamente alterate, in particolare attraverso meccanismi di inibizione dell'apoptosi. Nel complesso, il linfoma di Burkitt costituisce un modello paradigmatico di neoplasia in cui fattori virali, genetici e ambientali cooperano nel processo di trasformazione neoplastica. (Thorley-Lawson & Allday, 2008)

### 1.4.3 Linfoma di Hodgkin

Il Linfoma di Hodgkin classico è una neoplasia linfoproliferativa in cui l'infezione da Virus di Epstein-Barr è riscontrabile in circa il 30–40% dei casi. Il tumore è caratterizzato dalla presenza di cellule di Reed-Sternberg, immerse in un microambiente infiammatorio ricco di cellule immunitarie non neoplastiche che contribuiscono al supporto della crescita tumorale. (Damania et al., 2022)

Nei casi EBV-positivi, il virus persiste nelle cellule neoplastiche secondo un programma di latenza di tipo II, caratterizzato dall'espressione delle proteine virali LMP1 e LMP2A. Le cellule di Reed-Sternberg derivano da linfociti B post-centro germinativo, ma presentano una marcata perdita dei marcatori tipici delle cellule B. Dal punto di vista molecolare, l'EBV contribuisce alla trasformazione neoplastica attraverso l'attivazione di vie di segnalazione coinvolte nella sopravvivenza cellulare, in particolare NF- $\kappa$ B e JAK/STAT. In questo contesto, LMP2A può sostituire i segnali del recettore delle cellule B, consentendo la sopravvivenza di cellule altrimenti destinate all'apoptosi. (Coates et al., 1991)

#### 1.4.4 Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL)

Il Linfoma diffuso a grandi cellule B rappresenta la forma più comune di linfoma non-Hodgkin; circa il 10% dei casi risulta associato all'infezione da Virus di Epstein-Barr ed è attualmente classificato come DLBCL EBV-positivo, non altrimenti specificato (EBV+ NOS). L'associazione con il virus è più frequente nei soggetti anziani e negli individui immunocompromessi.

Nei DLBCL EBV-positivi, il virus persiste prevalentemente secondo un programma di latenza di tipo II, mentre una latenza di tipo III può essere osservata in contesti di marcata immunodepressione. L'infezione da EBV è riscontrabile sia nei DLBCL di origine centro-germinativa sia in quelli di tipo cellule B attivate, risultando tuttavia più comune in quest'ultimo sottotipo.

Dal punto di vista biologico, queste neoplasie mostrano frequentemente l'attivazione delle vie di segnalazione NF- $\kappa$ B e JAK/STAT, in linea con la capacità delle proteine virali LMP1 e LMP2A di stimolare tali pathway. Rispetto ai DLBCL EBV-negativi, le forme EBV-positive presentano meno frequentemente mutazioni nei geni coinvolti nella segnalazione del recettore delle cellule B, suggerendo che l'attività delle proteine virali possa in parte compensare l'assenza di specifiche alterazioni genetiche cellulari. (White et al., 2012)(Damania et al., 2022)

#### 1.4.5 Carcinoma nasofaringeo

Il Carcinoma nasofaringeo è una neoplasia epiteliale fortemente associata all'infezione da Virus di Epstein-Barr. Tale associazione è supportata dalla presenza di elevati titoli sierici di anticorpi, in particolare IgA dirette contro antigeni virali, utilizzati come marcatori per la diagnosi, il monitoraggio clinico e l'identificazione delle recidive.

Il carcinoma nasofaringeo presenta una distribuzione geografica caratteristica, con un'elevata incidenza nelle regioni della Cina meridionale e una maggiore frequenza anche in alcune popolazioni del bacino mediterraneo, del Medio Oriente e tra le popolazioni Inuit. L'EBV è rilevabile in tutti i principali sottotipi istologici di NPC ed è presente in modo clonale esclusivamente nelle cellule epiteliali maligne, indicando un'infezione precoce coinvolta nell'origine del tumore. (Yu & Robertson, 2023) (Cohen, 2000)

Nei tumori NPC, l'EBV persiste secondo un programma di latenza di tipo II, caratterizzato dall'espressione delle proteine virali LMP1 e LMP2. L'interazione tra fattori ambientali e infezione virale favorisce la trasformazione neoplastica, mentre l'EBV contribuisce alla patogenesi modulando direttamente vie di segnalazione coinvolte nella sopravvivenza e nella proliferazione cellulare. Un ulteriore contributo è fornito dai microRNA virali della regione BART, che svolgono un ruolo rilevante nella regolazione dell'apoptosi, nell'elusione della risposta immunitaria e nella progressione tumorale. (Murphy et al., 2009)

#### 1.4.6 Carcinoma gastrico associato a EBV

Il Carcinoma gastrico associato a EBV rappresenta una sottoclasse distinta di carcinoma gastrico e costituisce circa il 10% dei casi a livello globale. A differenza del carcinoma nasofaringeo, non presenta una distribuzione geografica endemica, ma si caratterizza per specifiche peculiarità biologiche e molecolari. Dal punto di vista istologico, questi tumori mostrano frequentemente un marcato infiltrato linfoide, costituito prevalentemente da linfociti T, che riflette una risposta immunitaria locale nei confronti delle cellule tumorali.

Una caratteristica distintiva del carcinoma gastrico EBV-positivo è l'elevato grado di metilazione del DNA, noto come fenotipo metilatore delle isole CpG (CIMP), che contribuisce sia alla regolazione dell'espressione genica cellulare sia al mantenimento della latenza virale. In questo contesto, il Virus di Epstein-Barr persiste generalmente secondo programmi di latenza di tipo I o II ed è in grado di modulare direttamente lo stato epigenetico delle cellule epiteliali infettate.

Dal punto di vista molecolare, queste neoplasie presentano un basso tasso di mutazioni di *p53*, mentre sono frequentemente riscontrate alterazioni della via PI3K e amplificazioni dei loci *PD-L1* e *PD-L2*. Dal punto di vista clinico, il carcinoma gastrico EBV-positivo è associato a una prognosi relativamente più favorevole rispetto alle forme EBV-negative e mostra una particolare sensibilità alle terapie basate sugli inibitori dei checkpoint immunitari, conferendo allo stato di infezione da EBV un potenziale valore diagnostico e terapeutico. (Damania et al., 2022)

## 1.5 Epidemiologia globale ebv

L'infezione da virus di Epstein-Barr (EBV) rappresenta una delle infezioni virali persistenti più diffuse nella popolazione umana. Studi sierologici condotti a livello mondiale indicano che oltre il 90% della popolazione adulta risulta sieropositiva per EBV, a testimonianza di un'esposizione estremamente comune e generalmente acquisita nel corso della vita. La sieroprevalenza aumenta progressivamente con l'età e riflette in modo significativo le condizioni socioeconomiche e ambientali delle diverse popolazioni. Nei Paesi a basso e medio reddito, caratterizzati da elevata densità abitativa e da una trasmissione interpersonale precoce, l'infezione primaria avviene prevalentemente durante l'infanzia ed è spesso asintomatica. Al contrario, nei Paesi industrializzati, l'esposizione al virus tende a verificarsi più tardivamente, durante l'adolescenza o la prima età adulta, con una maggiore probabilità di manifestazioni cliniche evidenti.(Blazquez et al., 2025)

Accanto a questo quadro sierologico globale, l'EBV presenta una rilevante variabilità genetica, che ha portato all'identificazione di due principali tipi virali, EBV di tipo 1 ed EBV di tipo 2. Analisi genomiche comparative su ceppi isolati in diverse aree del mondo mostrano come l'EBV di tipo 1 rappresenti la variante largamente predominante a livello globale, mentre l'EBV di tipo 2 risulti meno frequente e maggiormente concentrato in specifici contesti geografici, in particolare in alcune regioni dell'Africa e del Medio Oriente. Le differenze tra i due tipi riguardano principalmente geni coinvolti nella latenza e nella trasformazione cellulare, suggerendo percorsi evolutivi distinti del virus in relazione alle popolazioni ospiti.(Musawi et al., 2025)

Dati di epidemiologia molecolare provenienti da studi regionali, come quelli condotti nella regione sudoccidentale dell'Arabia Saudita, confermano come l'infezione da EBV sia ampiamente diffusa anche a livello locale e mostrino un coinvolgimento prevalente della popolazione pediatrica, indicativo di un'acquisizione precoce dell'infezione in specifici contesti ambientali e sociosanitari. Nel loro insieme, questi dati sottolineano come l'epidemiologia dell'EBV debba essere interpretata su scala globale tenendo conto sia dell'elevata sieroprevalenza mondiale, sia della variabilità

genetica dei ceppi circolanti e delle differenze demografiche e ambientali tra le popolazioni.(Musawi et al., 2025)

## 1.6 Diagnostica di laboratorio

La diagnosi dell'infezione da Epstein–Barr virus (EBV) si basa su diversi approcci di laboratorio che riflettono differenti aspetti del ciclo biologico del virus e della risposta dell'ospite. Storicamente, la dimostrazione diretta del virus mediante coltura cellulare ha rappresentato uno dei primi strumenti diagnostici disponibili; successivamente, lo sviluppo della sierologia ha consentito una più agevole classificazione dello stato infettivo, mentre le tecniche di biologia molecolare hanno permesso la rilevazione e la quantificazione del genoma virale. Ciascuna metodica presenta specifici vantaggi e limiti e trova applicazione in contesti clinici differenti.

### 1.6.1 Colture cellulari per la dimostrazione del virus

La dimostrazione diretta di EBV biologicamente attivo può essere effettuata sfruttando la capacità del virus di infettare e immortalizzare i linfociti B umani in coltura. Il virus può essere isolato a partire da diverse matrici biologiche, tra cui saliva, sangue periferico e tessuto linfoide, e la sua presenza viene evidenziata attraverso la trasformazione dei linfociti in linee linfoblastoidi capaci di proliferare indefinitamente in vitro.

Questa metodica richiede tempi prolungati, generalmente 6–8 settimane, nonché infrastrutture e competenze specifiche per la gestione delle colture cellulari, rendendola poco adatta alla routine diagnostica dei laboratori clinici. Inoltre, la coltura cellulare è teoricamente in grado di rilevare EBV infettivo anche in soggetti sieropositivi asintomatici, nei quali il virus persiste in forma latente o può andare incontro a riattivazione, limitandone ulteriormente la specificità diagnostica. Per tali ragioni, l'isolamento del virus in coltura è oggi considerato principalmente uno strumento di ricerca e di riferimento, piuttosto che una metodica di uso clinico corrente.(Gulley & Tang, 2008)

### 1.6.2 Test sierologici

La diagnostica sierologica dell'infezione da Epstein–Barr virus (EBV) si basa sulla ricerca di anticorpi prodotti dall'ospite in risposta ai diversi antigeni virali. Tale

approccio consente di identificare l'infezione e di definirne lo stadio, ma richiede una corretta interpretazione dei risultati in relazione alla cinetica anticorpale e ai limiti delle singole metodiche.

Tra i test sierologici aspecifici rientra la ricerca degli anticorpi eterofili, immunoglobuline in grado di agglutinare eritrociti di specie animali diverse. Questi anticorpi sono tipicamente associati alla mononucleosi infettiva da EBV e compaiono nel corso dell'infezione primaria, raggiungendo un picco alcune settimane dopo l'esordio dei sintomi per poi ridursi progressivamente. La loro rilevabilità è elevata negli adolescenti e negli adulti, mentre risulta significativamente inferiore nei bambini piccoli, con una conseguente maggiore frequenza di risultati falsamente negativi. I test eterofili, basati su reazioni di agglutinazione o su metodiche più recenti come il Monospot, sono semplici e rapidi, ma un risultato negativo non esclude l'infezione e deve essere seguito da test sierologici specifici. (Kimura et al., 1999)

La sierologia specifica anti-EBV si fonda sulla determinazione degli anticorpi diretti contro antigeni virali definiti, in particolare il Viral Capsid Antigen (VCA), l'Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA-1) e l'antigene precoce (EA). I test di screening vengono eseguiti mediante immunofluorescenza indiretta o saggi immunoenzimatici automatizzati, come ELISA e CLIA, che utilizzano antigeni nativi o ricombinanti. Le differenze nella preparazione degli antigeni e nei cut-off applicati contribuiscono alla variabilità di sensibilità e specificità tra i diversi test, ma le metodiche automatizzate risultano oggi particolarmente adatte alla routine di laboratorio.

In presenza di risultati sierologici discordanti o difficili da interpretare, può essere utilizzato l'immunoblotting come test di conferma. Questa metodica consente di valutare la risposta anticorpale verso singoli antigeni virali, migliorando la distinzione tra infezione acuta e infezione pregressa, soprattutto nei casi con profili sierologici atipici. (Bauer, 2001)

Un ulteriore supporto diagnostico è rappresentato dal test di avidità delle IgG, che permette di valutare il grado di maturazione della risposta anticorpale. Nelle fasi iniziali dell'infezione primaria le IgG presentano una bassa avidità, che aumenta progressivamente nel tempo. La determinazione dell'avidità può quindi contribuire a

distinguere un'infezione recente da una passata, pur tenendo conto delle differenze di cinetica tra i diversi anticorpi analizzati.(De Paschale & Clerici, 2012)

### 1.6.3 Test molecolari

La PCR quantitativa in tempo reale costituisce oggi uno degli strumenti più importanti nella diagnostica molecolare dell'infezione da Epstein–Barr virus (EBV), in quanto consente di rilevare e quantificare il DNA virale con elevata sensibilità. Questa metodica può essere applicata a diverse matrici biologiche, tra cui sangue intero, cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e plasma o siero, e il significato diagnostico del risultato varia in relazione alla fase dell'infezione e al compartimento analizzato.(Gulley & Tang, 2008)

Nel corso dell'infezione primaria, il DNA dell'EBV può essere rilevato precocemente nel sangue periferico, spesso entro le prime due settimane dall'esordio dei sintomi. In questa fase, il genoma virale può essere presente sia nel compartimento cellulare, sotto forma di linfociti B infettati, sia nel plasma o nel siero, come DNA libero o associato a virioni circolanti. Con l'instaurarsi della risposta immunitaria dell'ospite, la carica virale tende a ridursi progressivamente: nel plasma e nel siero il DNA dell'EBV diminuisce rapidamente fino a diventare non rilevabile nel giro di poche settimane, mentre nelle PBMC la riduzione è più lenta, riflettendo la persistenza del virus in forma latente nelle cellule della memoria.(Kimura et al., 1999)

Nei soggetti portatori sani, il DNA dell'EBV è generalmente rilevabile solo a bassi livelli nel compartimento cellulare, mentre risulta assente nel plasma o nel siero. Al contrario, la presenza di DNA virale nel plasma o nel siero è considerata indicativa di un'infezione attiva, primaria o riattivata, e tende a correlare con la gravità della malattia. Tuttavia, l'interpretazione dei risultati della PCR rimane complessa, poiché dipende dalla matrice biologica analizzata, dal target genomico amplificato e dalla mancanza di soglie di carica virale universalmente condivise.

Per questi motivi, sebbene la PCR rappresenti uno strumento estremamente utile, soprattutto nei pazienti immunocompromessi o a rischio di patologie EBV-correlate, i

risultati devono essere sempre interpretati nel contesto clinico complessivo e integrati con i dati sierologici.(De Paschale & Clerici, 2012)

### 1.7 Terapia e nuovi approcci terapeutici

L'approccio terapeutico all'infezione da Epstein–Barr virus (EBV) varia in modo significativo in base al contesto clinico, che può spaziare da forme benigne e autolimitanti, come la mononucleosi infettiva, fino a patologie neoplastiche EBV-associate. Nelle infezioni acute non complicate, la gestione è essenzialmente di supporto, poiché, trattandosi di un'infezione virale, la terapia antibiotica non è indicata.

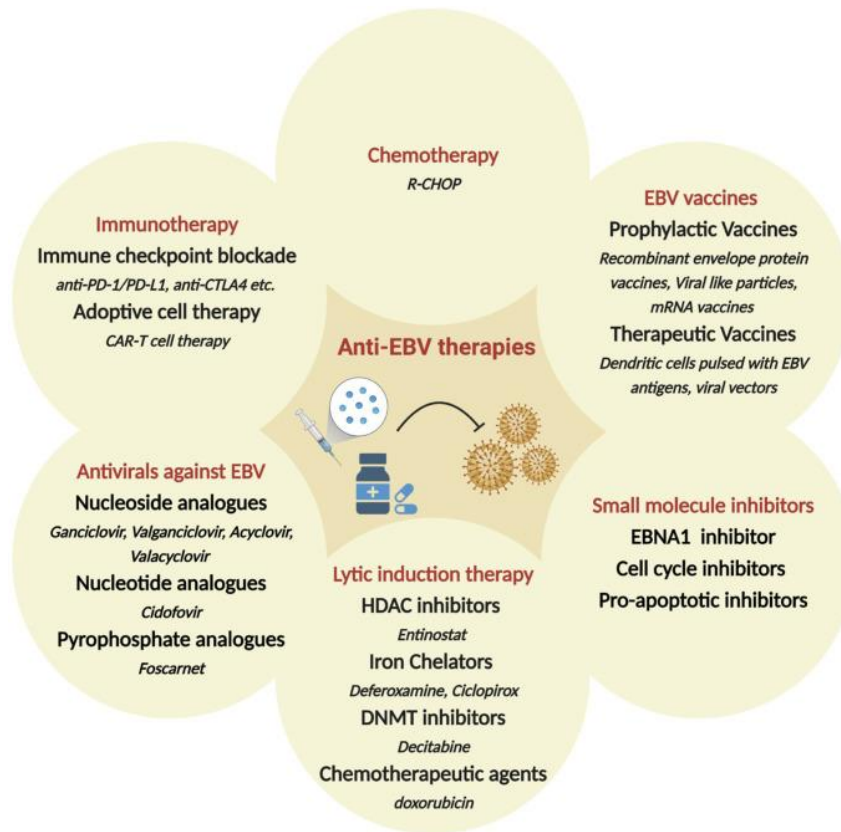


Figura 3: approcci terapeutici (Chakravorty et al., 2023.)

Il trattamento si basa quindi sull'impiego di antipiretici, analgesici e misure di supporto generale volte al controllo dei sintomi; l'uso di farmaci antivirali, quali aciclovir, valaciclovir e ganciclovir, può determinare una riduzione transitoria della

replicazione virale, ma non incide in modo sostanziale sull'evoluzione clinica della malattia, poiché questi farmaci agiscono prevalentemente durante la fase litica del ciclo virale.(Cui & Snapper, 2021)

Nei tumori associati all'EBV, la chemioterapia convenzionale rappresenta tuttora una componente centrale del trattamento e agisce principalmente su bersagli cellulari coinvolti nella proliferazione, nel ciclo cellulare e nei meccanismi di sopravvivenza delle cellule neoplastiche. Tuttavia, tali strategie risultano insufficienti per eliminare l'infezione virale, che persiste in forma latente all'interno delle cellule tumorali. Questo limite ha stimolato lo sviluppo di approcci più mirati, diretti contro specifici target virali e molecolari. Oltre agli antivirali già citati, altri farmaci come cidofovir e foscarnet sono stati valutati in contesti selezionati, soprattutto nei pazienti immunocompromessi, grazie alla loro capacità di inibire la DNA polimerasi virale indipendentemente, in alcuni casi, dall'attivazione enzimatica virale. Poiché la latenza virale rappresenta una caratteristica chiave delle neoplasie EBV-positivo, sono state proposte strategie di induzione del ciclo litico, volte a riattivare l'espressione dei geni virali litici e a rendere le cellule infette più suscettibili sia all'azione antivirale sia al riconoscimento immunitario.(Chakravorty et al., 2022)

Accanto a questi approcci, sono in fase di studio inibitori a piccola molecola diretti contro proteine virali di latenza fondamentali, come EBNA1 e LMP1/LMP2, coinvolte nel mantenimento dell'episoma virale e nell'attivazione di vie oncogeniche, nonché farmaci mirati a bersagli cellulari deregolati dall'infezione. Un ruolo sempre più rilevante è inoltre attribuito alle immunoterapie, che mirano a potenziare la risposta immunitaria dell'ospite contro gli antigeni virali espressi dalle cellule EBV-positivo. Parallelamente, grande interesse è rivolto allo sviluppo di vaccini anti-EBV, che al momento non sono ancora disponibili per l'uso clinico: i vaccini profilattici sono progettati per prevenire l'infezione inducendo anticorpi neutralizzanti contro le glicoproteine dell'involucro virale coinvolte nell'ingresso del virus nelle cellule bersaglio, mentre i vaccini terapeutici mirano a stimolare una risposta immunitaria cellulo-mediata contro antigeni di latenza espressi nelle cellule tumorali. Nel complesso, l'evoluzione delle strategie terapeutiche per le patologie EBV-correlate riflette una progressiva transizione verso approcci integrati e personalizzati, che

combinano terapie di supporto, trattamenti citotossici e interventi antivirali e immunologici mirati (Chakravorty et al., 2022; Cui & Snapper, 2021)

## **2. SCOPO DELLA TESI**

La presente tesi nasce dall'esigenza di valutare l'affidabilità e la comparabilità di nuove piattaforme di diagnostica molecolare per il monitoraggio dell'infezione da Epstein-Barr virus (EBV), un ambito di particolare rilevanza clinica soprattutto nei pazienti immunocompromessi e in quelli sottoposti a terapie immunosoppressive. In questi contesti, la quantificazione del DNA di EBV rappresenta uno strumento essenziale per la diagnosi, il follow-up e la gestione clinica dell'infezione, rendendo necessaria la disponibilità di metodiche analitiche affidabili, riproducibili e facilmente integrabili nella pratica di laboratorio.

In questo quadro, l'obiettivo del presente lavoro è confrontare le prestazioni del sistema completamente automatizzato Panther Fusion (Hologic) con quelle della metodica di routine attualmente utilizzata presso il reparto di Microbiologia dell'Ospedale di Alessandria, basata sulle piattaforme Elitech BeGenius® e InGenius®, impiegate per la quantificazione del DNA di EBV su campioni di sangue intero. Entrambe le metodiche si basano su tecniche di PCR quantitativa, ma presentano differenze significative in termini di livello di automazione, gestione del campione e organizzazione del flusso di lavoro laboratoristico.

A tal fine, gli stessi campioni di sangue intero sono stati analizzati in parallelo mediante entrambe le piattaforme, con l'obiettivo di valutare la concordanza qualitativa dei risultati e di confrontare le misurazioni della carica virale ottenute con i due sistemi. Lo studio si propone quindi di verificare se il sistema Panther Fusion possa rappresentare un'alternativa affidabile alla metodica di riferimento attualmente in uso, contribuendo potenzialmente all'ottimizzazione dei flussi diagnostici e al miglioramento del monitoraggio virologico dell'infezione da EBV nella pratica clinica di routine.

### 3. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale di Alessandria ed è stato impostato come studio osservazionale comparativo. I campioni analizzati provenivano dall'attività diagnostica di routine per la determinazione della carica virale di Epstein-Barr virus (EBV) su campioni di sangue intero.

Le analisi sono state eseguite secondo i protocolli operativi del laboratorio e le istruzioni fornite dai produttori dei sistemi utilizzati. Nei paragrafi seguenti vengono descritti i materiali impiegati e le metodiche adottate, con particolare riferimento alla preparazione del campione, al flusso di lavoro analitico e alle caratteristiche operative delle piattaforme di diagnostica molecolare utilizzate.

#### 3.1 Metodica di routine: piattaforme ELITech InGenius® / BeGenius®

Le piattaforme ELITech InGenius® e BeGenius® sono sistemi automatizzati di diagnostica molecolare utilizzati come metodica di routine presso il settore di biologia molecolare del Laboratorio di Microbiologia dell'ospedale di Alessandria. Gli strumenti sono basati su tecnologia di PCR quantitativa real-time e consentono l'esecuzione integrata, all'interno di un'unica piattaforma, delle fasi di estrazione e purificazione degli acidi nucleici, amplificazione e rilevazione del target, con successiva elaborazione e interpretazione automatica dei risultati.

I sistemi ELITech sono configurati come sistemi chiusi, nei quali reagenti, materiali di consumo e protocolli analitici sono definiti dal produttore e non modificabili dall'operatore. Questa configurazione garantisce un'elevata standardizzazione del processo analitico, riducendo la variabilità operatore-dipendente e assicurando una maggiore riproducibilità dei risultati, aspetto particolarmente rilevante nella diagnostica molecolare di routine.

Il flusso di lavoro è organizzato in modalità batch, ovvero le analisi vengono eseguite in sedute analitiche programmate, durante le quali i campioni caricati vengono processati in modo sequenziale fino al completamento dell'intero ciclo analitico.



Figura 4: BeGenius® ([https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030\\_10.pdf](https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030_10.pdf))

### 3.1.1 Raccolta dei campioni e gestione della fase preanalitica

Nel presente progetto, l'analisi è stata condotta su campioni di sangue intero, raccolti in provette a tappo viola contenenti EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) come anticoagulante. L'impiego dell'EDTA rappresenta una scelta consolidata nella diagnostica molecolare, in quanto questa molecola agisce come agente chelante degli ioni bivalenti, in particolare del calcio, il quale riveste un ruolo essenziale nell'attivazione della cascata coagulativa. La sottrazione del calcio biologicamente attivo impedisce la formazione del coagulo di fibrina, mantenendo il campione allo stato fluido e preservando al contempo l'integrità delle componenti cellulari e del materiale genetico.

I campioni analizzati provengono dai diversi reparti dell'Ospedale di Alessandria, nonché da ambulatori esterni e da strutture ospedaliere del territorio circostante. Una volta giunti presso il Laboratorio di Microbiologia, i campioni vengono sottoposti alla fase di accettazione (check-in), durante la quale avviene la registrazione nel sistema informatico gestionale del laboratorio. Questo passaggio consente l'identificazione univoca del campione e garantisce la completa tracciabilità lungo l'intero percorso diagnostico.

Attraverso il sistema informativo di laboratorio, i campioni vengono successivamente indirizzati alle piattaforme analitiche dedicate, consentendo il monitoraggio di tutte le fasi della seduta analitica. La fase di check-in rappresenta un momento cruciale del processo preanalitico, in quanto solo i campioni correttamente registrati e validati possono essere inclusi nel flusso di lavoro diagnostico e sottoposti alle successive fasi di analisi.

Una volta accettati (check-in) e giunti presso il Laboratorio di Microbiologia, i campioni vengono avviati alla fase preanalitica e al successivo trattamento in funzione della piattaforma analitica utilizzata. Per i sistemi ELITech BeGenius® e InGenius® sono previste modalità operative differenti per quanto riguarda la gestione iniziale del campione biologico.

Nel sistema BeGenius®, il campione viene gestito mediante caricamento diretto della provetta primaria di sangue intero nell'apposito rack dedicato. In questo caso, lo strumento provvede automaticamente al prelievo del volume necessario direttamente dalla provetta primaria, senza la necessità di ulteriori manipolazioni da parte dell'operatore.

Nel sistema InGenius®, per praticità operativa, il campione viene invece sottoposto a una fase preliminare di aliquotazione. Dopo omogeneizzazione manuale della provetta primaria, effettuata mediante inversioni successive (3–4 volte) al fine di garantire una distribuzione uniforme della componente cellulare, vengono prelevati 200 µL di sangue intero, che vengono trasferiti in una provetta secondaria destinata al caricamento sullo strumento.

### 3.1.2 Preparazione dello strumento e della seduta analitica

L'organizzazione della seduta analitica sulle piattaforme ELITech InGenius® e BeGenius® dipende dal numero di campioni biologici da analizzare e dal numero di test richiesti per ciascun campione. Prima dell'avvio della seduta, è pertanto necessario pianificare la configurazione dello strumento in funzione delle richieste diagnostiche previste.

Le due piattaforme presentano differenti capacità operative: il sistema BeGenius® consente l'esecuzione di un massimo di 24 test per seduta, mentre il sistema InGenius® permette l'esecuzione di un massimo di 12 test per run. Di conseguenza, il numero di campioni processabili varia in funzione del tipo di analisi richiesta, distinguendo tra test singoli e test multipli sullo stesso campione biologico.

Nel caso di test singolo, per ciascun campione viene prevista una sola reazione di amplificazione; il numero di cuvette di amplificazione da caricare corrisponde pertanto al numero di campioni analizzati. In questa configurazione, il sistema consente di processare fino a 24 campioni sul BeGenius® e fino a 12 campioni sull'InGenius®.

Nel caso di test multipli richiesti sul medesimo campione biologico, l'estrazione degli acidi nucleici viene eseguita una sola volta, mentre il numero di reazioni di amplificazione aumenta in relazione al numero di analisi previste. In questa situazione, viene utilizzata un'unica cassetta di estrazione e una sola cuvetta di eluato per campione, mentre vengono caricate più cuvette di amplificazione, una per ciascun test programmato.

Una volta definita l'organizzazione della seduta analitica e completata la preparazione del campione biologico, l'esecuzione dell'analisi sulle piattaforme ELITech InGenius® e BeGenius® richiede il caricamento di specifici consumabili monouso, ciascuno dei quali svolge una funzione ben definita all'interno del flusso di lavoro. L'organizzazione e l'interazione di tali componenti consentono allo strumento di gestire in modo automatizzato tutte le fasi dell'analisi, dall'estrazione degli acidi nucleici fino all'amplificazione e alla rilevazione del target.

Nel seguito vengono descritti i principali consumabili utilizzati durante la seduta analitica, evidenziandone la composizione, la funzione e il ruolo svolto all'interno del percorso analitico del campione.

- **Cuvetta di amplificazione**

La cuvetta di amplificazione PCR rappresenta il compartimento in cui avviene la reazione di PCR quantitativa real-time. Al momento del caricamento sullo strumento, la cuvetta si presenta sigillata da una pellicola protettiva di colore nero, che viene

rimossa dall'operatore prima dell'inserimento, ed è costituita da due inserzioni (pozzetti) destinate a ricevere i componenti della reazione.

In questa fase, la cuvetta non contiene ancora reagenti o campione. Durante la seduta analitica, il sistema provvede automaticamente a dispensare all'interno delle inserzioni l'eluato contenente il DNA purificato e la master mix di amplificazione. Una volta assemblata la miscela di reazione, la cuvetta viene sottoposta ai cicli termici programmati, durante i quali avviene l'amplificazione del DNA target e la rilevazione del segnale fluorescente in tempo reale.



*Figura 5: cuvetta di amplificazione*

[https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030\\_10.pdf](https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030_10.pdf)

- **Cassetta di estrazione**

Le cassette di estrazione sono unità monouso preconfezionate costituite da più compartimenti separati, ciascuno contenente reagenti specifici per una fase del processo di estrazione. In particolare, all'interno delle cassette sono presenti:

- soluzioni di lisi, che consentono la rottura delle membrane cellulari e virali;
- particelle magnetiche, alle quali il DNA si lega selettivamente;
- uno o più buffer di lavaggio, utilizzati per rimuovere impurità, proteine e residui cellulari;

- una soluzione di eluizione, che permette il rilascio finale degli acidi nucleici purificati.

Dopo il prelievo del campione, il sistema trasferisce automaticamente il materiale biologico nella cassetta di estrazione. Il DNA liberato durante la lisi si lega alle particelle magnetiche e viene successivamente trasportato, attraverso i vari compartimenti, mediante cicli di lavaggio e purificazione, fino alla fase finale di eluizione.

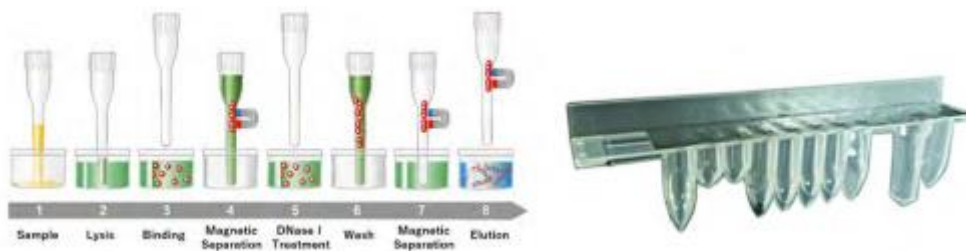


Figura 6: cuvette di estrazione ([https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030\\_10.pdf](https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030_10.pdf))

- **Cuvetta dell'eluato**

La cuvetta dell'eluato è un contenitore di raccolta, generalmente costituito da un piccolo tubicino, destinato a contenere l'eluato finale prodotto al termine della fase di estrazione. In essa viene convogliato il DNA purificato, che rimane disponibile per le successive reazioni di amplificazione. Nel caso di test multipli sullo stesso campione, l'eluato raccolto può essere utilizzato per più reazioni di PCR.

- **Master mix**

La master mix fornisce tutti i componenti chimici necessari allo svolgimento della reazione di PCR quantitativa real-time. Essa comprende la DNA polimerasi termostabile, i nucleotidi, il buffer di reazione, i cofattori enzimatici e i primer e sonde specifici per il target di interesse. Durante la seduta analitica, la master mix viene prelevata automaticamente dal sistema e dispensata all'interno delle cuvette di amplificazione, dove viene combinata con l'eluato contenente il DNA

purificato. La presenza della master mix consente l'avvio e il corretto svolgimento della reazione di amplificazione.



Figura 7: master mix ([https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030\\_10.pdf](https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030_10.pdf))

- **Puntali monouso con filtro**

I puntali monouso con filtro sono utilizzati per tutte le operazioni di gestione automatizzata dei liquidi. Il sistema impiega puntali differenti per le varie fasi del processo, tra cui il trasferimento del campione, dei reagenti di estrazione, dell'eluato e della master mix. L'utilizzo di puntali monouso con filtro consente di prevenire contaminazioni crociate e garantisce l'accuratezza dei volumi dispensati durante l'intera seduta analitica.

### 3.1.3 Flusso di lavoro

Una volta completata la fase di caricamento dello strumento e avviata la seduta analitica, il flusso di lavoro viene gestito in modo completamente automatizzato dalla piattaforma. A partire da questo momento, il campione biologico segue un percorso analitico standardizzato che comprende le fasi di estrazione degli acidi nucleici, purificazione, amplificazione e rilevazione del target.

In una prima fase, lo strumento preleva automaticamente il volume di campione previsto dal protocollo e lo trasferisce nella cartuccia di estrazione. Qui il campione viene sottoposto a lisi cellulare, mediante l'azione di specifici reagenti che

determinano la rottura delle membrane cellulari e virali, consentendo la liberazione del materiale genetico.

Il DNA rilasciato entra quindi in contatto con le particelle magnetiche, alle quali si lega selettivamente in condizioni chimico-fisiche controllate. Attraverso l'applicazione di un campo magnetico, le particelle magnetiche vengono separate dal resto della soluzione, permettendo l'eliminazione del surnatante contenente impurità. Il DNA legato alle biglie viene successivamente sottoposto a una serie di passaggi di lavaggio, finalizzati alla rimozione di proteine, residui cellulari e potenziali inibitori della reazione di PCR.

Al termine delle fasi di lavaggio, gli acidi nucleici purificati vengono eluiti dalle particelle magnetiche mediante una soluzione di eluizione e raccolti nella cuvetta dell'eluato. L'eluato così ottenuto rappresenta il materiale di partenza per la successiva fase di amplificazione.

Nella fase successiva, lo strumento trasferisce automaticamente una aliquota dell'eluato nelle cuvette di amplificazione PCR, dove viene combinata con la master mix contenente tutti i reagenti necessari alla reazione di PCR quantitativa real-time. La miscela di reazione viene quindi sottoposta a cicli termici programmati, durante i quali avviene l'amplificazione del DNA target. L'accumulo del prodotto amplificato viene monitorato in tempo reale attraverso la rilevazione di un segnale fluorescente, proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione.

Al termine dell'amplificazione, i dati vengono elaborati automaticamente dal software dello strumento, che fornisce il risultato finale secondo i parametri del metodo utilizzato. L'intero processo, dalla gestione del campione alla produzione del risultato, avviene in modo tracciabile e standardizzato, garantendo affidabilità e riproducibilità del dato analitico.

Il metodo si basa sull'impiego del kit EBV ELITE MGB®, associato a un flusso di lavoro modulare che prevede una fase di estrazione degli acidi nucleici seguita dall'amplificazione e dalla rilevazione mediante PCR real-time.

A differenza di sistemi completamente integrati, la metodica ELITech separa le fasi di estrazione e amplificazione, richiedendo un maggiore controllo operativo, ma consente

comunque una quantificazione affidabile e standardizzata della carica virale. Il risultato finale viene espresso in Unità Internazionali per millilitro (IU/mL) grazie all'utilizzo del Primo Standard Internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per EBV (NIBSC 09/260), permettendo il confronto con altre piattaforme diagnostiche.

Ogni sessione analitica deve essere validata mediante l'inclusione di un controllo negativo, per escludere contaminazioni, e di un controllo positivo, per verificare il corretto funzionamento della reazione di amplificazione. Inoltre, durante la fase di estrazione viene impiegato un controllo interno, indispensabile per monitorare l'efficienza dell'intero processo analitico e identificare eventuali inibizioni.

La validità della sessione è subordinata anche al rispetto dei criteri di accettazione della curva standard, in particolare al valore del coefficiente di correlazione ( $R^2$ ), che deve risultare  $\geq 0,990$ . Il mancato rispetto di tale criterio comporta l'invalidazione della sessione e la necessità di ripetere l'analisi.

#### 3.1.4 Prestazioni analitiche: limite minimo e massimo

Le prestazioni analitiche del test EBV ELITE MGB® su sangue intero sono state valutate considerando i principali parametri di sensibilità e linearità.

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio, definito come la concentrazione rilevata con una probabilità del 95% secondo analisi di regressione Probit, è risultato pari a circa 100 IU/mL per i campioni di sangue intero. Questo valore rappresenta la soglia minima al di sopra della quale il DNA di EBV può essere rilevato in modo affidabile. Concentrazioni inferiori a tale limite possono non essere rilevate e, pertanto, un risultato negativo non esclude la presenza del virus a livelli molto bassi.

Per quanto riguarda il limite massimo, il test ha dimostrato una risposta lineare su un ampio intervallo di misurazione, che per il sangue intero si estende fino a circa  $1,0 \times 10^6$  IU/mL. All'interno di questo intervallo, il segnale ottenuto risulta proporzionale alla quantità di DNA virale presente nel campione, consentendo una quantificazione accurata e riproducibile della carica virale. Valori superiori a tale soglia possono eccedere l'intervallo quantitativo del metodo e richiedere un'eventuale diluizione del campione.

In sintesi, la metodica ELITech consente:

- una rilevazione minima affidabile a partire da ~100 IU/mL;
- una quantificazione lineare fino a  $\sim 10^6$  IU/mL, definendo il limite superiore del range analitico.

### 3.1.5 Sensibilità, specificità e interferenze

Le prestazioni diagnostiche del test su sangue intero mostrano valori elevati di sensibilità e specificità, entrambe superiori al 97–98%, confermando l'affidabilità del metodo nell'identificazione dei campioni positivi e negativi per EBV.

La valutazione delle sostanze interferenti ha evidenziato che la maggior parte dei composti endogeni ed esogeni comunemente presenti nei campioni clinici non interferisce con la rilevazione del target virale. È stata tuttavia confermata l'eparina come potente inibitore della PCR, motivo per cui l'utilizzo di campioni raccolti in eparina è controindicato. Anche contaminazioni da solventi residui o elevate quantità di DNA genomico umano possono compromettere l'amplificazione e generare risultati non validi.

## 3.2 Sistema Panther Fusion – Hologic

La diagnostica molecolare routinaria è stata eseguita mediante piattaforme ELITech, in particolare i sistemi InGenius e BeGenius. Nel presente studio è stata introdotta la piattaforma Panther Fusion al fine di valutarne le prestazioni analitiche in confronto alla metodica di routine e di esaminarne l'applicabilità come sistema alternativo e complementare nella pratica diagnostica.

Una delle principali differenze rispetto ai sistemi ELITech riguarda l'organizzazione del workflow analitico.

Le piattaforme ELITech operano prevalentemente secondo una logica a batch, con sedute analitiche predefinite e un numero di campioni processati simultaneamente. Il Panther Fusion, invece, è concepito come sistema a flusso di lavoro continuo (random access), che consente il caricamento dei campioni anche durante il funzionamento dello strumento e il loro trattamento in modo indipendente. Questa caratteristica

conferisce al sistema una maggiore flessibilità operativa e un migliore adattamento a contesti diagnostici ad alto volume o con necessità di risposta rapida.

Dal punto di vista tecnologico, la piattaforma Panther comprende due configurazioni basate su differenti tecnologie di amplificazione. Il Panther nella configurazione standard utilizza la tecnologia TMA (Transcription-Mediated Amplification), una metodica di amplificazione isoterma dell'RNA ad elevata sensibilità, impiegata principalmente per test di screening o monitoraggio. Il Panther Fusion integra invece un modulo dedicato alla PCR real-time, basata su cicli termici e rilevazione fluorescente in tempo reale, risultando maggiormente indicata per la quantificazione accurata del DNA virale.

Nel presente lavoro, le analisi sono state eseguite utilizzando il modulo Panther Fusion in modalità Open Access (NON-IVD), impiegando una metodica di PCR real-time. L'utilizzo della modalità NON-IVD consente l'esecuzione di test sviluppati o adattati dal laboratorio, mantenendo l'automazione delle fasi analitiche offerte dal sistema.

Il test EBV Quant Assay Panther Fusion™ è un saggio di amplificazione degli acidi nucleici completamente automatizzato per la quantificazione del DNA di Epstein-Barr virus (EBV) in campioni di sangue intero. Il test utilizza come target il gene EBNA-1, altamente conservato all'interno del genoma virale, caratteristica che consente di ottenere una quantificazione accurata e riproducibile del DNA di EBV.

Il metodo è standardizzato rispetto al Primo Standard Internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per EBV (NIBSC 09/260), permettendo l'espressione dei risultati in Unità Internazionali per millilitro (IU/mL) e  $\log_{10}$  IU/mL.

Un elemento centrale del sistema Panther Fusion è rappresentato dalle cartucce specifiche del test EBV Quant Assay, che costituiscono il nucleo operativo dell'intero processo analitico. Le cartucce contengono i reagenti necessari per tutte le fasi del test, dalla preparazione del campione fino alla rilevazione del segnale. In particolare, esse includono i reagenti per la lisi chimica del campione, per la cattura degli acidi nucleici mediante particelle magnetiche, per i lavaggi, per l'eluizione del DNA e per la successiva amplificazione mediante PCR real-time. L'utilizzo delle cartucce consente

di eliminare la preparazione manuale dei singoli reagenti, riducendo l'intervento dell'operatore e la variabilità analitica.

Durante il trattamento del campione, un controllo interno (IC-B) viene aggiunto automaticamente a ciascun campione tramite il reagente di cattura, consentendo il monitoraggio dell'intero processo analitico e l'identificazione di eventuali interferenze dovute a inibitori o a malfunzionamenti del reagente. Il DNA rilasciato viene catturato mediante ibridizzazione su particelle magnetiche, che vengono successivamente separate dalla matrice del campione tramite un campo magnetico e sottoposte a una serie di fasi di lavaggio. L'acido nucleico purificato viene quindi eluito con un tampone a bassa forza ionica.

Il DNA eluito viene trasferito automaticamente nella sezione dedicata all'amplificazione mediante PCR real-time, durante la quale il target EBNA-1 viene amplificato attraverso cicli termici programmati. La rilevazione del segnale avviene mediante una sonda fluorescente target-specifica, con acquisizione in tempo reale da parte del sistema ottico dello strumento. Il software del Panther Fusion elabora i valori di soglia di ciclo (Ct), inversamente proporzionali alla concentrazione di EBV presente nel campione, e determina la carica virale confrontandoli con una curva di calibrazione interna. Nel caso dei campioni di sangue intero, viene applicato automaticamente un fattore di conversione, al fine di tenere conto della diluizione introdotta durante la fase di preparazione del campione.

Nel complesso, l'elevato grado di automazione, l'utilizzo di cartucce dedicate e la gestione a flusso continuo rendono il Panther Fusion System una piattaforma particolarmente idonea per studi di validazione metodologica e per il confronto con la diagnostica molecolare routinaria, garantendo standardizzazione del processo analitico, riduzione della variabilità operatore-dipendente ed elevata riproducibilità dei risultati.

### 3.2.1 Manipolazione dei campioni biologici di sangue intero

La manipolazione dei campioni biologici di sangue intero è stata eseguita attenendosi alle indicazioni previste per la raccolta, il trattamento e la conservazione dei campioni.

Prima dell'analisi è stata verificata la corretta conservazione dei campioni non trattati all'interno delle provette primarie.

Al fine di garantire un'adeguata omogeneizzazione, ciascuna provetta di sangue intero è stata miscelata mediante almeno tre inversioni delicate oppure mediante agitazione su agitatore oscillante, fino a ottenere una sospensione uniforme. Questa fase risulta fondamentale per assicurare una distribuzione omogenea delle componenti cellulari e del materiale virale all'interno del campione.

Prima del caricamento sul sistema Panther Fusion, i campioni biologici sono stati preparati trasferendo un'aliquota di 500  $\mu$ L di sangue intero dalla provetta primaria a una provetta dedicata preriempita con diluente per sangue intero. L'utilizzo del diluente ha lo scopo di rendere la matrice del sangue intero idonea al trattamento automatizzato da parte dello strumento, riducendone la viscosità e facilitando una corretta aspirazione del volume da analizzare. Inoltre, il diluente favorisce una migliore omogeneizzazione del campione, contribuendo a una distribuzione uniforme del materiale biologico e del DNA virale. Il diluente non determina una lisi completa delle cellule o delle particelle virali, ma prepara il campione alle successive fasi automatizzate di lisi chimica, estrazione e purificazione degli acidi nucleici eseguite dal sistema.

Dopo il trasferimento, le provette sono state richiuse e miscelate mediante vortex per almeno 5 secondi, al fine di garantire una corretta omogeneizzazione del campione diluito.

Successivamente, le provette contenenti i campioni preparati sono state caricate nelle apposite rastrelliere del Panther Fusion System. Durante questa fase, il tappo di ciascuna provetta è stato allentato delicatamente senza essere inizialmente rimosso, prestando particolare attenzione a evitare la formazione di aerosol e il rischio di contaminazione. Una volta completato il caricamento delle provette nella rastrelliera, i tappi sono stati rimossi e smaltiti evitando il passaggio sopra altre rastrelliere o provette aperte.

Eventuali bolle d'aria o schiuma presenti nelle provette sono state rimosse utilizzando una pipetta di trasferimento monouso, poiché la loro presenza potrebbe interferire con

il corretto rilevamento del livello di liquido da parte dello strumento. Completata questa fase, la rastrelliera dei campioni è stata inserita nello scomparto dedicato del sistema. Nel caso di esecuzione contemporanea di altri test o di analisi su differenti tipologie di campioni, è stato fissato l'apposito fermo campioni prima del caricamento della rastrelliera.

Per l'analisi dei campioni di sangue intero è stato applicato il fattore di conversione del sangue intero agli ordini di analisi tramite il software del Panther Fusion System. Tale fattore è stato applicato all'intera rastrelliera o, quando necessario, a singoli ordini di analisi, al fine di consentire una corretta elaborazione e interpretazione dei risultati ottenuti a partire da questa specifica matrice biologica.

L'intera procedura di preparazione e caricamento dei campioni è stata eseguita seguendo le istruzioni operative riportate nel Manuale per l'operatore del Panther/Panther Fusion System, garantendo condizioni di sicurezza, tracciabilità e riproducibilità del processo analitico.

### 3.2.2 Calibratori, controlli e controllo di qualità

Nel corso dell'analisi mediante Panther Fusion System è stato adottato un sistema strutturato di calibrazione e controllo di qualità, necessario a garantire l'affidabilità e la validità dei risultati ottenuti con il test EBV Quant Assay.

La calibrazione del metodo è stata effettuata utilizzando cinque calibratori specifici per EBV (qEBV), mentre il controllo della correttezza del processo analitico è stato assicurato mediante l'impiego di un controllo positivo a bassa concentrazione (LPC), un controllo positivo ad alta concentrazione (HPC) e un controllo negativo per trapianto (NC III). I calibratori e i controlli sono stati caricati nel sistema insieme ai campioni biologici, senza vincoli specifici di posizione all'interno delle rastrelliere dei campioni.

L'elaborazione dei campioni biologici è stata avviata solo dopo che il sistema aveva completato il trattamento dei calibratori e dei controlli e dopo che i relativi risultati erano stati riconosciuti come validi dal software dello strumento. Ciascuna provetta di

calibratore e di controllo è stata utilizzata una sola volta, in accordo con le indicazioni del produttore.

La calibrazione del test è stata eseguita a ogni introduzione di un nuovo lotto di cartucce del test nel Panther Fusion System. I cinque calibratori positivi sono stati analizzati in triplicato per la costruzione della curva di calibrazione, necessaria alla quantificazione del DNA di EBV. Una volta stabilita, la calibrazione è rimasta valida per un periodo massimo di 60 giorni, salvo esiti non conformi. Il software del sistema ha monitorato automaticamente la validità della curva di calibrazione e ha segnalato la necessità di una nuova calibrazione qualora i criteri di accettabilità non fossero soddisfatti. In tali casi, i risultati dei campioni associati sono stati invalidati e l'analisi è stata ripetuta previa nuova calibrazione.

Parallelamente alla calibrazione, è stato eseguito un controllo di qualità periodico mediante l'analisi dei controlli positivo e negativo. I controlli sono stati ripetuti ogni volta che veniva caricato un nuovo lotto di cartucce oppure alla scadenza dell'intervallo di validità della serie di controlli precedente, stabilito dal sistema fino a un massimo di 30 giorni. Il Panther Fusion System ha impedito l'avvio di nuove analisi in assenza di controlli validi, garantendo così un monitoraggio continuo delle prestazioni analitiche.

Durante il trattamento, il sistema ha verificato automaticamente l'accettabilità dei controlli del test. Solo nel caso in cui tutti i controlli soddisfacessero i criteri di validità previsti, i risultati dei campioni sono stati considerati affidabili. Al termine dell'intervallo di validità, i controlli sono stati automaticamente contrassegnati come scaduti ed è stata richiesta l'esecuzione di una nuova serie di controlli prima dell'analisi di ulteriori campioni. Qualora uno o più controlli non risultassero conformi, i campioni associati sono stati invalidati e sottoposti a nuova analisi.

### 3.2.3 Interpretazione dei risultati del test EBV Quant Assay

Il test EBV Quant Assay eseguito sul Panther Fusion System consente di misurare la quantità di DNA del virus di Epstein-Barr (EBV) presente nel sangue intero. Il sistema fornisce automaticamente un valore numerico confrontando il segnale ottenuto dal

campione con una curva di calibrazione, costruita utilizzando campioni a concentrazione nota.

I risultati vengono espressi in Unità Internazionali per millilitro (IU/mL), che rappresentano la quantità di DNA virale presente in un millilitro di campione, e in  $\log_{10}$  IU/mL, una modalità di rappresentazione che permette di gestire più facilmente numeri molto grandi o molto piccoli. L'uso della scala logaritmica è particolarmente utile perché consente di descrivere in modo semplice variazioni anche rilevanti della carica virale: un aumento o una diminuzione di 1  $\log_{10}$  IU/mL corrisponde infatti a una variazione di dieci volte della quantità di virus presente nel campione.

In base alle caratteristiche analitiche del test, i risultati ottenuti sui campioni di sangue intero vengono suddivisi in categorie ben definite. Quando il risultato è non rilevato, significa che nel campione analizzato non è stata riscontrata la presenza di DNA di EBV. Se il risultato è rilevato ma inferiore al limite inferiore di quantificazione (LLoQ), il virus è presente ma in quantità troppo bassa per essere misurata con sufficiente precisione; in questi casi il test conferma la presenza del virus, ma non fornisce un valore quantitativo affidabile.

Quando la concentrazione di DNA di EBV rientra nell'intervallo compreso tra il limite inferiore di quantificazione (LLoQ) e il limite superiore di quantificazione (ULoQ), il risultato è considerato quantitativo. Questo intervallo rappresenta la fascia in cui il test è in grado di misurare la carica virale in modo accurato e riproducibile ed è quella di maggiore utilità per il monitoraggio clinico. Valori superiori al limite superiore di quantificazione indicano invece una carica virale molto elevata, al di fuori dell'intervallo di misura del test; in questi casi può essere necessario analizzare il campione dopo diluizione.

Il test presenta inoltre un limite di rilevamento (LoD), definito come la più bassa concentrazione di DNA virale che può essere individuata con elevata probabilità.

Per il test EBV Quant Assay Panther Fusion, il LoD nel sangue intero è pari a circa 200 IU/mL, mentre il limite inferiore di quantificazione (LLoQ) è pari a 350 IU/mL (2,54  $\log_{10}$  IU/mL). Il limite superiore di quantificazione (ULoQ) è invece pari a 9,78  $\log_{10}$  IU/mL. All'interno di questo intervallo il test mostra un comportamento lineare,

ovvero la quantità di DNA misurata aumenta in modo proporzionale alla reale concentrazione di virus presente nel campione, come evidenziato dall'elevata correlazione mostrata in figura .

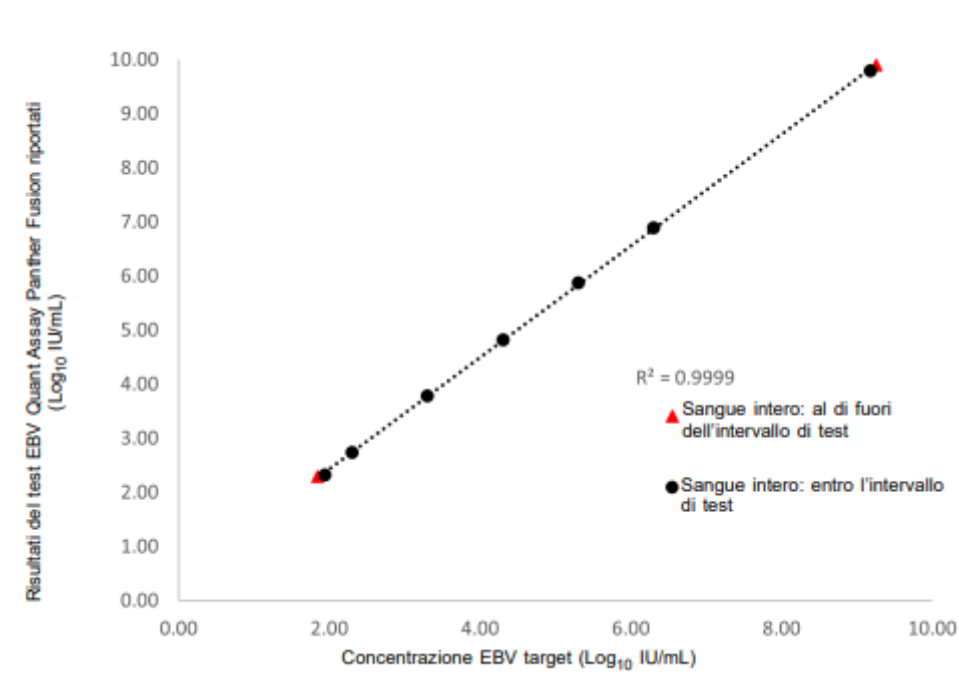


Figura 8 : Relazione tra la quantità di EBV presente nel campione e il valore misurato dal test EBV Quant Assay Panther Fusion nel sangue intero, che mostra una correlazione lineare elevata nell'intervallo di quantificazione ([https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030\\_10.pdf](https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030_10.pdf))

È importante sottolineare che un risultato negativo non esclude completamente un'infezione da EBV, in particolare in presenza di cariche virali molto basse. Allo stesso modo, un risultato positivo indica la presenza di DNA virale, che può persistere anche in assenza di virus vitale. Per questo motivo, i risultati del test devono essere sempre interpretati nel contesto clinico del paziente e in associazione ad altri dati diagnostici.

### 3.4 Confronto analitico tra Panther Fusion ed Elitech

Dal confronto tra le due metodiche emerge una differenza rilevante nelle soglie analitiche nella fascia di basse cariche virali.

La metodica ELITech presenta un limite di rilevazione inferiore, pari a circa 100 IU/mL, risultando potenzialmente più sensibile nell'identificazione di campioni a bassa carica virale. Il test EBV Quant Assay Panther Fusion, pur consentendo la rilevazione del target, definisce un limite inferiore di quantificazione pari a 350 IU/mL, adottando un approccio più conservativo nella quantificazione delle basse concentrazioni.

Questa differenza può determinare una maggiore identificazione di positività a bassa carica con la metodica ELITech rispetto al Panther Fusion e deve essere tenuta in considerazione nell'interpretazione comparativa dei risultati, in particolare nei contesti di monitoraggio virologico.

## 4. RISULTATI

Il presente studio è stato condotto durante il periodo di tirocinio svolto presso l’Azienda Ospedaliero-Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, all’interno dell’Unità Operativa di Microbiologia e Virologia, struttura di riferimento per la diagnostica molecolare e il monitoraggio delle infezioni virali in ambito clinico.

Nel periodo compreso tra luglio 2025 e febbraio 2026, al laboratorio sono pervenuti 272 campioni di sangue intero destinati alla determinazione della carica virale mediante metodica molecolare. I campioni facevano riferimento complessivamente a 169 pazienti distinti; in una quota non trascurabile dei casi si è osservata la presenza di campionamenti ripetuti per lo stesso soggetto, verosimilmente riconducibili a protocolli di follow-up clinico e/o a monitoraggio terapeutico. Le caratteristiche demografiche della popolazione in studio sono riportate in Tabella 1.

*Tabella 1: caratteristiche demografiche della popolazione in studio*

<b>Sesso del paziente</b>	<b>Numero di pazienti (n)</b>	<b>Età media (anni)</b>	<b>Età mediana (anni)</b>
M	101	59	61
F	68	55	61
<b>Totale</b>	<b>169</b>	—	—

L’analisi della distribuzione per sesso mostra una prevalenza di pazienti di sesso maschile: 101 soggetti (59% del totale) erano infatti maschi, mentre 68 (41%) erano femmine. Tale configurazione evidenzia una moderata predominanza maschile nella popolazione sottoposta a determinazione della carica virale nel periodo considerato. Questa differenza potrebbe essere correlata sia alla diversa frequenza di alcune condizioni cliniche tra i due sessi, sia alle caratteristiche epidemiologiche e assistenziali della popolazione afferente alla struttura ospedaliera.

Per quanto concerne l'età, nei pazienti di sesso maschile l'età media risultava pari a 59 anni, mentre nelle pazienti di sesso femminile era leggermente inferiore (55 anni). Pur trattandosi di uno scostamento contenuto, il dato suggerisce una tendenza a una maggiore rappresentazione di soggetti maschi in fasce di età lievemente più avanzate. Tuttavia, la mediana sovrapponibile nei due gruppi (61 anni) indica che il valore centrale della distribuzione anagrafica è sostanzialmente analogo tra maschi e femmine.

La coincidenza delle mediane e il fatto che, nel gruppo femminile, la mediana risulti superiore alla media suggeriscono una possibile asimmetria della distribuzione delle età, verosimilmente influenzata dalla presenza di alcuni soggetti più giovani che riducono il valore medio. Nel complesso, la popolazione in studio può essere descritta come prevalentemente adulta-anziana, con un'età centrale collocabile intorno alla sesta decade di vita, in linea con l'epidemiologia di numerose patologie croniche e condizioni cliniche per le quali è indicato il monitoraggio della carica virale.

Al fine di delineare in modo approfondito la composizione della casistica e contestualizzare l'attività diagnostica svolta nel periodo di studio, è stata analizzata la distribuzione dei campioni e dei pazienti in base al reparto o al setting clinico di provenienza (Tabella 2).

*Tabella 2. Distribuzione dei campioni e dei pazienti in base al reparto di provenienza*

<b>Reparto di provenienza</b>	<b>Numero di campioni (n)</b>	<b>Numero di pazienti (n)</b>
Cardiologia	4	2
Ematologia	81	39
Pronto soccorso	2	2
Ospedale infantile	3	3
Malattie dell'apparato respiratorio	1	1

<b>Reparto di provenienza</b>	<b>Numero di campioni (n)</b>	<b>Numero di pazienti (n)</b>
Malattie infettive	5	5
Nefrologia	52	33
Oncologia	6	6
Pazienti esterni	114	74
Pazienti pediatrici esterni	4	4
<b>Totale</b>	<b>272</b>	<b>169</b>

Questa analisi risulta particolarmente rilevante non solo per caratterizzare la popolazione afferente al laboratorio, ma anche per interpretare le dinamiche assistenziali che determinano la richiesta della determinazione della carica virale, distinguendo tra esigenze diagnostiche puntuali e attività di follow-up.

Tra luglio 2025 e febbraio 2026 sono stati analizzati complessivamente 272 campioni di sangue intero, riferibili a 169 pazienti distinti. Il rapporto complessivo campioni/pazienti, pari a 1,61, indica che una quota dei soggetti è stata sottoposta a determinazioni ripetute nel tempo, compatibilmente con protocolli di monitoraggio seriato, accanto a richieste effettuate in singola occasione per finalità prevalentemente diagnostiche.

La distribuzione dei campioni per reparto evidenzia una netta concentrazione delle richieste in specifici ambiti clinici: la quota più consistente è rappresentata dai pazienti esterni, dai quali provengono 114 campioni (circa 42% del totale), riferibili a 74 pazienti. Questo dato indica che l'attività ambulatoriale costituisce il principale bacino di afferenza per la determinazione della carica virale nel periodo considerato; inoltre, il rapporto campioni/pazienti nei soggetti esterni ( $\approx 1,5$ ) indica la presenza di determinazioni ripetute solo in una parte dei casi, nel complesso, risulta compatibile con un utilizzo dell'esame prevalentemente orientato alla sorveglianza clinica

ambulatoriale, con richieste distribuite nel tempo in relazione a specifiche necessità di controllo.

Un contributo altrettanto rilevante è rappresentato dall'Ematologia, da cui provengono 81 campioni, pari a circa il 30% del totale, riferibili a 39 pazienti. In questo contesto, il rapporto campioni/paziente risulta superiore a due determinazioni per soggetto (circa 2,1), configurandosi come il valore più elevato tra i principali setting analizzati.

Tale andamento è indicativo di un monitoraggio più ravvicinato e continuativo, coerente con la gestione di pazienti spesso caratterizzati da condizioni di immunocompromissione e/o sottoposti a trattamenti che rendono necessario un controllo virologico attento nel tempo. Anche la Nefrologia contribuisce in maniera consistente, con 52 campioni, pari a circa il 19% del totale, attribuibili a 33 pazienti; il rapporto campioni/paziente, pari a circa 1,6, suggerisce la presenza di controlli ripetuti, sebbene meno intensivi rispetto al contesto ematologico, risultando compatibile con richieste inserite in percorsi specialistici che comprendono sia valutazioni iniziali sia determinazioni successive nel follow-up.

I restanti reparti presentano una numerosità più contenuta, ma contribuiscono a delineare l'eterogeneità della popolazione in studio. In Oncologia e in Malattie infettive si osserva una corrispondenza numerica tra campioni e pazienti, indicando richieste prevalentemente singole nel periodo considerato.

Un andamento analogo si osserva per l'Ospedale infantile, il Pronto soccorso, l'ambito delle Malattie dell'apparato respiratorio e i pazienti pediatrici esterni, nei quali a ciascun campione corrisponde un paziente distinto; ciò suggerisce un utilizzo della determinazione virologica prevalentemente orientato a una valutazione diagnostica puntuale, più che a un monitoraggio longitudinale. Fa eccezione la Cardiologia, che pur presentando numeri contenuti mostra quattro campioni riferiti a due pazienti, evidenziando la presenza di almeno un caso di determinazione ripetuta.

Nel complesso, oltre il 90% dei campioni proviene dai tre principali contesti: pazienti esterni, Ematologia e Nefrologia. Questa concentrazione indica che la casistica è principalmente riferita a setting specialistici, nei quali la determinazione della carica virale è inserita nel percorso clinico. Di conseguenza, i campioni analizzati non

rappresentano una popolazione casuale, ma sono il risultato di richieste motivate da specifiche indicazioni assistenziali.

Dal punto di vista dell'analisi, è importante considerare che nei reparti in cui il rapporto campioni/paziente supera l'unità sono presenti determinazioni ripetute sullo stesso soggetto, riconducibili a follow-up nel tempo. Inoltre, i diversi contesti clinici possono presentare profili di rischio differenti e, quindi, una diversa probabilità di positività e una diversa distribuzione dei livelli di carica virale osservati. Nel complesso, la casistica rispecchia l'attività routinaria del laboratorio e fornisce un quadro realistico, purché tali aspetti vengano tenuti in considerazione nell'interpretazione delle successive analisi comparative tra metodiche.

#### 4.1 Distribuzione dei risultati e analisi della concordanza tra le metodiche

Per valutare la concordanza qualitativa tra le due piattaforme analitiche utilizzate nello studio, i 272 campioni esaminati sono stati classificati in tre categorie interpretative: negativo (NEG), positivo non quantificabile (PNQ) e positivo quantificabile (PQ), confrontati mediante una matrice di contingenza che mette in relazione i risultati ottenuti con ELITECH e quelli ottenuti con Hologic Panther Fusion, come riportato nella Tabella 3.

*Tab 3: confronto dei risultati qualitativi tra le piattaforme ELITECH e HOLOGIC (NEG, PNQ, PQ)*

Elitech / Hologic	NEG	PNQ	PQ	TOT	%
NEG	46	7	0	53	86,79%
PNQ	6	13	1	20	65,00%
PQ	5	17	177	199	88,94%
TOT	57	37	178	272	

Dall'osservazione della distribuzione complessiva emerge, per entrambe le metodiche, una chiara prevalenza dei campioni positivi quantificabili, che rappresentano la quota maggiore dei risultati analizzati. In particolare, con ELITECH 199 campioni su 272 (73,2%) sono risultati PQ, mentre 53 (19,5%) sono stati classificati come NEG e 20 (7,4%) come PNQ. Anche con Hologic Panther Fusion la categoria più rappresentata è quella dei PQ, pari a 178 campioni (65,4%), seguita da 37 campioni PNQ (13,6%) e 57 campioni NEG (21,0%).

Nel complesso, la distribuzione dei risultati appare quindi sostanzialmente simile tra le due piattaforme, pur evidenziando una diversa ripartizione dei campioni con risultati borderline. Rispetto a ELITECH, infatti, Hologic tende a classificare un numero maggiore di campioni come positivi non quantificabili, mentre ELITECH li include più frequentemente tra i positivi quantificabili. Questo aspetto suggerisce che le principali differenze tra le due metodiche emergano soprattutto nei campioni con carica virale più bassa, in prossimità dei limiti analitici.

Il confronto diretto tra le due piattaforme mostra comunque una buona concordanza qualitativa complessiva. Dei 272 campioni analizzati, 236 ricevono la stessa classificazione con entrambe le metodiche, corrispondenti a un accordo globale dell'86,8%. In particolare, risultano concordanti 46 campioni negativi, 13 positivi non quantificabili e 177 positivi quantificabili, indicando una sostanziale sovrapposibilità dei due sistemi nella maggior parte dei casi.

L'accordo risulta particolarmente elevato nei campioni positivi quantificabili e in quelli negativi. Tra i 199 campioni classificati come PQ da ELITECH, 177 (88,9%) risultano PQ anche con Hologic; analogamente, tra i 53 campioni classificati come NEG da ELITECH, 46 (86,8%) vengono confermati come negativi anche dalla piattaforma Hologic. Una maggiore variabilità si osserva invece nei campioni positivi non quantificabili: dei 20 campioni PNQ secondo ELITECH, 13 (65,0%) mantengono la stessa classificazione con Hologic, mentre i restanti vengono riclassificati come negativi o positivi quantificabili.

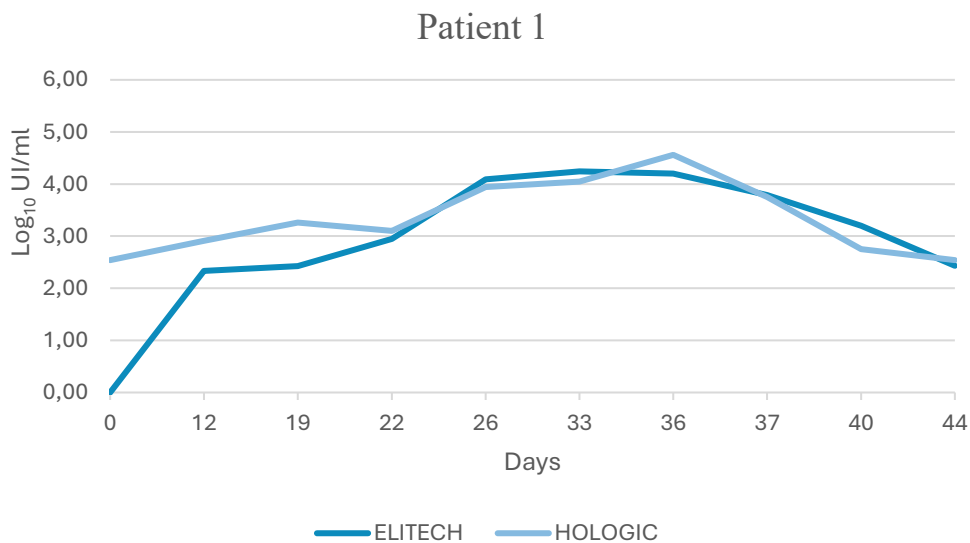
La tabella evidenzia quindi una buona concordanza qualitativa tra ELITECH e Hologic Panther Fusion, con differenze che si concentrano prevalentemente nei campioni a

bassa carica virale, mentre l'accordo risulta più elevato nei campioni con classificazione qualitativa più definita.

## 4.2 Valutazione dinamica della cinetica della viremia nei pazienti sottoposti a monitoraggio

Per valutare non solo la concordanza qualitativa tra le metodiche, ma anche la loro coerenza nel monitoraggio della viremia nel tempo, è stata eseguita un'analisi longitudinale sui pazienti sottoposti ad almeno quattro determinazioni successive. Questo approccio permette di descrivere l'andamento dinamico della carica virale, verificando se i due sistemi restituiscano tendenze comparabili e se siano in grado di intercettare in modo congruente incrementi progressivi, eventuali picchi replicativi e successive fasi di riduzione. I pazienti inclusi in tale analisi provengono da contesti assistenziali differenti, comprendendo reparti specialistici (Ematologia e Nefrologia) e richieste da strutture esterne. L'indicazione della provenienza clinica consente di inquadrare i profili virologici in modo più aderente al contesto di richiesta, distinguendo situazioni di follow-up strutturato da controlli più sporadici e supportando la lettura dell'andamento complessivo nel tempo.

### 4.2.1 Monitoraggio viremia paziente 1



*Figura 9: cinetica virale paziente 1*

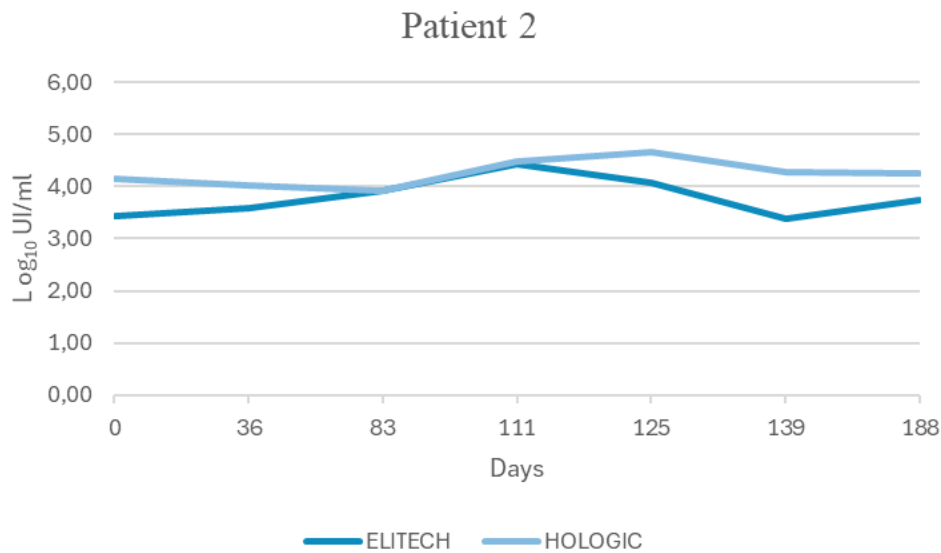
Il Paziente 1, proveniente dal reparto di Ematologia, è stato sottoposto a monitoraggio ravvicinato nel periodo compreso tra il giorno 0 e il giorno 44, consentendo di descrivere in modo puntuale l'evoluzione della viremia nelle fasi di incremento, picco e successiva riduzione.

Il grafico mostra l'andamento temporale della carica virale EBV espressa in log<sub>10</sub> UI/mL, con confronto tra ELITECH e HOLOGIC. Nel complesso si osserva una cinetica trifasica: incremento progressivo nelle prime settimane, raggiungimento di un apice intermedio e successiva diminuzione.

Alla prima determinazione (giorno 0) è presente la discrepanza quantitativa più marcata: ELITECH non evidenzia viremia quantificabile, mentre HOLOGIC rileva già un valore intorno a 2,5 log<sub>10</sub> UI/mL. Tale differenza, collocata in prossimità dei limiti inferiori di misurazione, è compatibile con una diversa sensibilità analitica e/o con differenti criteri di gestione del limite di quantificazione, e tende ad attenuarsi nelle determinazioni successive.

Tra il giorno 12 e il giorno 22 si registra un incremento costante, con progressiva riduzione del divario fino alla convergenza delle stime intorno a 3 log<sub>10</sub> UI/mL. Nella fase di piena espansione replicativa (giorni 26–33), con valori superiori a 4 log<sub>10</sub> UI/mL, le misurazioni risultano sostanzialmente sovrapponibili, indicando una buona coerenza nella fascia medio-alta. Il picco viene raggiunto intorno al giorno 36: HOLOGIC riporta un massimo lievemente superiore, ma la tempistica dell'apice è concordante tra le due metodiche, elemento rilevante in ottica clinica. Successivamente si osserva una riduzione progressiva della carica virale fino al giorno 40, con un temporaneo scostamento quantitativo a favore di ELITECH, senza tuttavia modificare la direzione del trend. All'ultima determinazione (giorno 44) i valori tornano ad allinearsi su circa 2,5 log<sub>10</sub> UI/mL.

#### 4.2.2 Monitoraggio viremia paziente 2



*Figura 10: cinetica virale paziente 2*

Il Paziente 2, proveniente da struttura esterna, è stato sottoposto a monitoraggio seriato, consentendo di valutare la coerenza tra le piattaforme nell'ambito di un follow-up prolungato, non necessariamente inserito in percorsi ematologici intra-ospedalieri. L'andamento longitudinale mostra una cinetica complessivamente ben delineata: positività iniziale, incremento progressivo fino al raggiungimento dell'apice replicativo e successiva riduzione, con scostamenti quantitativi tra le due metodiche che variano nelle diverse fasi del follow-up.

Alla prima determinazione (giorno 0) entrambe le metodiche documentano una viremia chiaramente quantificabile; tuttavia, HOLOGIC fornisce una stima più elevata rispetto a ELITECH, con uno scarto di circa 0,7–0,8 log<sub>10</sub> UI/mL. La classificazione qualitativa risulta concordante, ma la differenza numerica suggerisce una diversa stima dell'entità della replicazione già in fase iniziale.

Nel prosieguo del monitoraggio si osserva un progressivo avvicinamento delle due curve. Intorno al giorno 83 i valori risultano pressoché coincidenti, collocandosi in

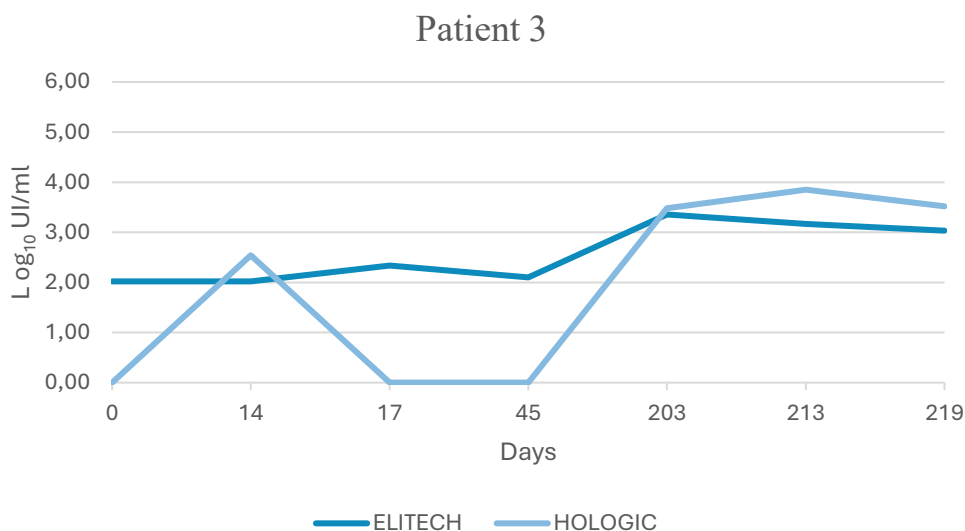
prossimità dei 4 log<sub>10</sub> UI/mL. Questa fase rappresenta un momento di sostanziale allineamento quantitativo, in particolare nella fascia di viremia medio-alta.

Tra il giorno 111 e il giorno 125 si registra il picco replicativo. La tempistica dell'apice è condivisa da entrambe le metodiche, anche se HOLOGIC tende a riportare valori leggermente superiori. Pur in presenza di tale scostamento, la dinamica complessiva rimane coerente e consente di identificare con chiarezza la fase di massima espansione virale.

Successivamente si osserva una riduzione della carica virale. In questa fase le differenze quantitative diventano più evidenti: ELITECH mostra un decremento più marcato, mentre HOLOGIC mantiene livelli relativamente più elevati. La divergenza risulta particolarmente accentuata intorno al giorno 139, pur senza modificare la direzione del trend, che rimane orientato verso la diminuzione della viremia.

All'ultima determinazione disponibile (giorno 188) i valori appaiono stabilizzati. ELITECH mostra una lieve risalita rispetto al controllo precedente, mentre HOLOGIC mantiene un andamento più stabile. Permane una distanza numerica tra le stime, ma l'evoluzione complessiva della curva resta sovrapponibile in termini di interpretazione dinamica.

### 4.2.3 Monitoraggio viremia paziente 3



*Figura 11: cinetica virale paziente 3*

Il Paziente 3, afferente al reparto di Ematologia, è stato seguito con controlli distribuiti in modo irregolare nel tempo, condizione che consente di mettere in evidenza eventuali differenze tra metodiche, in particolare in prossimità dei limiti inferiori di rilevabilità. L'andamento complessivo si articola in due momenti principali: una prima fase contraddistinta da elevata variabilità e scarsa sovrapponibilità tra ELITECH e HOLOGIC, seguita, a distanza, da una nuova fase di incremento della replicazione virale, durante la quale le stime tendono progressivamente ad allinearsi.

Alla prima determinazione (giorno 0) emerge una discrepanza evidente. ELITECH rileva una positività quantificabile intorno a  $2,0 \log_{10} \text{UI/mL}$ , indicativa di una viremia di entità moderata, mentre HOLOGIC non documenta presenza di virus rilevabile. Questa differenza iniziale, osservata in corrispondenza di valori bassi, suggerisce una diversa sensibilità analitica o una differente gestione dei limiti inferiori di quantificazione.

Al giorno 14 il quadro si modifica: HOLOGIC registra un incremento fino a circa  $2,5 \log_{10} \text{UI/mL}$ , mentre ELITECH rimane sostanzialmente stabile rispetto al tempo zero. Si verifica quindi un'inversione del rapporto tra le due metodiche, con HOLOGIC che in questa fase fornisce una stima superiore.

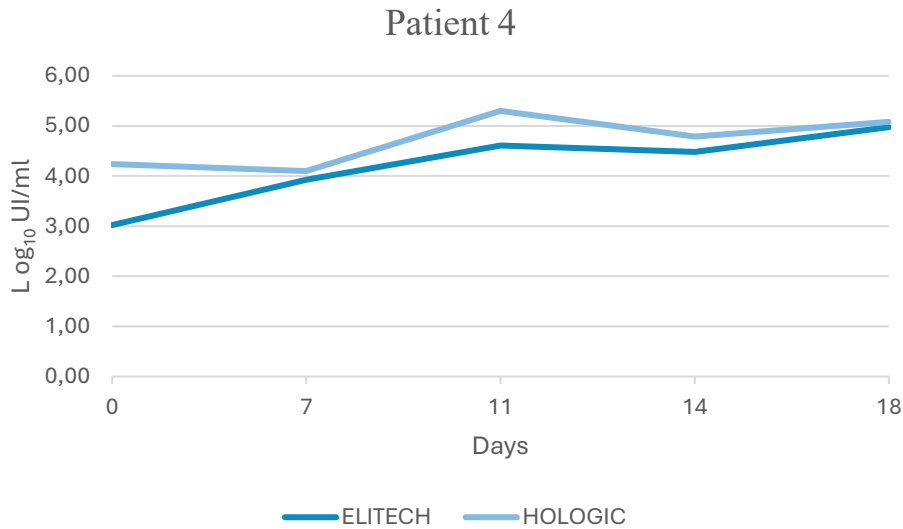
Tra il giorno 17 e il giorno 45 si osserva la fase di massima divergenza. HOLOGIC torna a riportare valori non rilevabili, mentre ELITECH mantiene una positività persistente, compresa tra 2,1 e 2,3 log<sub>10</sub> UI/mL. In questo intervallo si configura una discordanza qualitativa significativa (positivo quantificabile vs negativo), circoscritta alla fascia di bassa carica virale. Tale comportamento potrebbe riflettere variabilità analitica in prossimità dei limiti inferiori del test o differenze strutturali nella sensibilità delle piattaforme.

La dinamica cambia radicalmente a partire dal giorno 203. In questa fase si osserva un incremento marcato della carica virale, con valori superiori a 3 log<sub>10</sub> UI/mL documentati da entrambe le metodiche. Le curve risultano ampiamente sovrapponibili, indicando piena concordanza nell'identificazione di una fase di replicazione più intensa.

Nei controlli successivi (giorni 213 e 219) i livelli rimangono elevati, con una lieve tendenza alla riduzione, più evidente secondo ELITECH. HOLOGIC continua a riportare valori leggermente superiori, ma lo scostamento risulta contenuto e non comporta alcuna differenza nella classificazione qualitativa.

Nel complesso, il profilo longitudinale del paziente evidenzia che le divergenze tra le metodiche si concentrano principalmente nella fase iniziale, in presenza di viremia bassa e prossima ai limiti di rilevabilità. Al contrario, quando la replicazione virale diventa più intensa, le stime risultano sostanzialmente sovrapponibili, con piena concordanza nella descrizione dell'andamento temporale.

#### 4.2.4 Monitoraggio viremia paziente 4



*Figura 12: cinetica virale paziente 4*

Il Paziente 4, proveniente dal reparto di Ematologia, mostra una cinetica rapida e biologicamente attiva in un arco temporale relativamente breve, scenario particolarmente utile per valutare la concordanza tra le metodiche nell'identificazione tempestiva del picco replicativo. Il profilo longitudinale evidenzia una dinamica caratterizzata da una crescita iniziale marcata, un picco replicativo precoce, una breve fase di attenuazione e una successiva nuova espansione della replicazione virale. L'intera evoluzione temporale appare coerentemente intercettata da entrambe le metodiche, pur con differenze quantitative non trascurabili in specifici momenti del follow-up.

Alla valutazione basale (giorno 0) la viremia risulta già chiaramente quantificabile con entrambe le piattaforme. ELITECH riporta un valore intorno a 3,0 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC fornisce una stima significativamente superiore, pari a circa 4,2 log<sub>10</sub> UI/mL. Lo scarto, superiore a un logaritmo, suggerisce una diversa valutazione dell'intensità replicativa in fase precoce, pur in assenza di discordanza qualitativa.

A distanza di una settimana (giorno 7) si osserva un incremento sostanziale della carica virale. ELITECH raggiunge valori prossimi ai 4 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC si

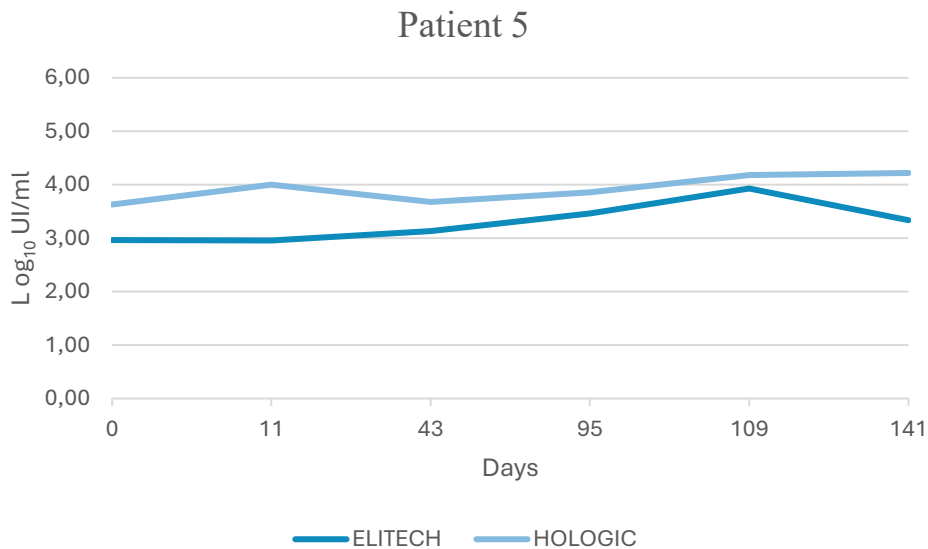
colloca poco al di sopra di tale soglia. In questa fase la distanza numerica tra le due curve si riduce sensibilmente, indicando una progressiva convergenza nella stima quantitativa.

Il massimo replicativo viene raggiunto intorno al giorno 11. HOLOGIC supera i 5  $\log_{10}$  UI/mL, mentre ELITECH si attesta intorno a 4,5  $\log_{10}$  UI/mL. Sebbene persista una differenza quantitativa, la tempistica dell'apice coincide con precisione, delineando una piena concordanza nell'identificazione del momento di massima espansione virale.

Al controllo successivo (giorno 14) si registra una lieve riduzione dei valori. La flessione risulta più evidente secondo ELITECH, mentre HOLOGIC mostra una diminuzione più contenuta, mantenendosi comunque su livelli elevati. Questa fase potrebbe riflettere una modulazione transitoria della replicazione o una risposta immunologica iniziale.

All'ultima determinazione disponibile (giorno 18) si osserva una nuova tendenza all'incremento. Entrambe le metodiche riportano valori prossimi ai 5  $\log_{10}$  UI/mL e, in questa fase, le curve risultano quasi sovrapponibili. La sostanziale coincidenza dei livelli nella fascia alta di quantificazione suggerisce un'elevata affidabilità comparativa quando la carica virale si colloca in un intervallo ben al di sopra dei limiti inferiori del test.

#### 4.2.5 Monitoraggio viremia paziente 5



*Figura 13: cinetica virale paziente 5*

Il Paziente 5, proveniente da struttura esterna, è stato monitorato longitudinalmente con determinazioni distribuite su un intervallo temporale ampio,

Alla valutazione iniziale (giorno 0) la viremia risulta già chiaramente quantificabile: ELITECH si colloca intorno a 3,0 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC fornisce una stima superiore, pari a circa 3,6 log<sub>10</sub> UI/mL. Lo scarto, pari a circa 0,6 logaritmi, non incide sulla classificazione qualitativa ma indica una diversa valutazione dell'intensità replicativa.

Al giorno 11 si osserva una prima espansione della carica virale. ELITECH mostra un incremento contenuto, mentre HOLOGIC si avvicina ai 4 log<sub>10</sub> UI/mL. La distanza tra le due misurazioni rimane simile a quella registrata all'esordio, delineando un andamento sostanzialmente parallelo con una differenza numerica relativamente costante.

Alla determinazione del giorno 43 si registra una lieve oscillazione: HOLOGIC mostra una modesta flessione, mentre ELITECH appare sostanzialmente stabile. Questo

passaggio non altera la traiettoria complessiva, che continua a orientarsi verso una crescita graduale nel medio termine.

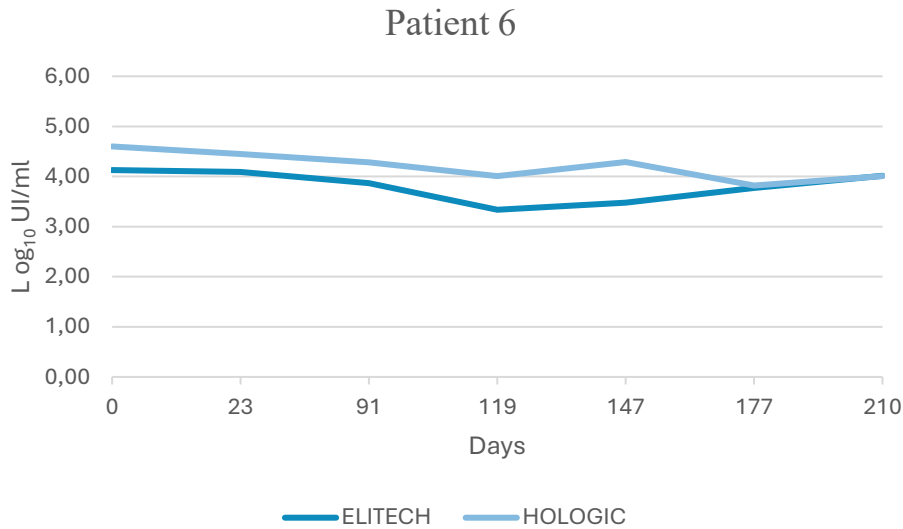
Intorno al giorno 95 si evidenzia una nuova fase di incremento. ELITECH raggiunge valori compresi tra 3,4 e 3,5 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC si mantiene poco al di sotto dei 4 log<sub>10</sub> UI/mL. La progressione è condivisa da entrambe le metodiche e precede il picco replicativo.

L'apice si colloca attorno al giorno 109 ELITECH si avvicina ai 3,9 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC supera la soglia dei 4 log<sub>10</sub> UI/mL. Anche in questa fase la differenza rimane proporzionalmente simile alle determinazioni precedenti, suggerendo la presenza di un offset quantitativo relativamente costante piuttosto che di una divergenza dinamica tra le metodiche.

All'ultima valutazione disponibile (giorno 141) si osserva una riduzione dei livelli secondo ELITECH, che scende intorno a 3,3 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC permane su valori più elevati, superiori a 4 log<sub>10</sub> UI/mL. La divergenza numerica appare più evidente in questa fase di declino, ma la direzione della variazione rimane coerente tra le due piattaforme.

Nel complesso, la cinetica del paziente 5 descrive una crescita progressiva con un picco intermedio seguito da una fase di attenuazione, riconosciuta in modo concordante da entrambe le metodiche. Lo scostamento quantitativo, presente fin dall'inizio e sostanzialmente stabile nel tempo, non interferisce con l'interpretazione evolutiva del quadro.

#### 4.2.6 Monitoraggio viremia paziente 6



*Figura 14: cinetica virale paziente 6*

Il Paziente 6, proveniente da struttura esterna, presenta una dinamica a “U” riduzione seguita da ripresa, configurazione utile per confrontare la capacità delle due piattaforme di intercettare non solo i picchi replicativi ma anche i punti di minimo e le inversioni di tendenza.

Alla valutazione basale (giorno 0) la viremia è già consistente. ELITECH si colloca intorno a 4,1 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC riporta una stima leggermente superiore, pari a circa 4,5 log<sub>10</sub> UI/mL. Lo scarto, contenuto ( $\approx 0,4$  logaritmi), non modifica l’interpretazione qualitativa e suggerisce una differenza quantitativa moderata ma stabile.

Nei controlli successivi (giorni 23 e 91) si osserva una progressiva attenuazione della carica virale. La riduzione è graduale e continua secondo entrambe le metodiche: ELITECH scende al di sotto dei 4 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC segue una traiettoria analoga mantenendosi su livelli sistematicamente più elevati. La coerenza nella direzione del cambiamento conferma la concordanza nella rilevazione della fase di declino.

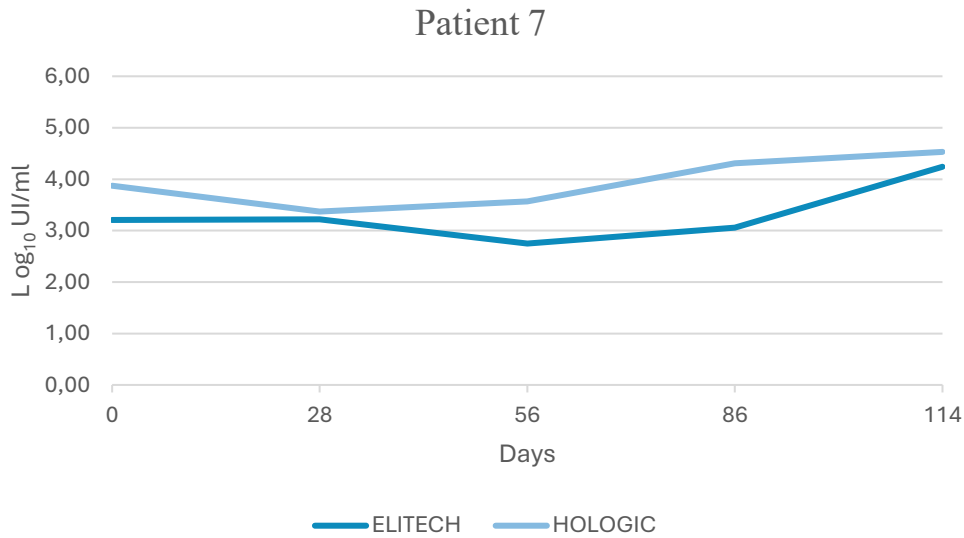
Il punto di minimo si colloca intorno al giorno 119. In questa fase ELITECH raggiunge circa 3,3 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC si attesta intorno a 4,0 log<sub>10</sub> UI/mL. Pur

risultando più evidente rispetto ai controlli precedenti, la differenza numerica non altera la lettura complessiva del trend, che rimane chiaramente orientato verso una riduzione della replicazione.

Successivamente, tra il giorno 147 e il giorno 177, la traiettoria si inverte e si osserva una nuova crescita dei livelli virali. I valori aumentano progressivamente fino ad avvicinarsi a quelli iniziali, delineando una ripresa replicativa ben definita. Anche in questa fase la variazione è intercettata in modo coerente da entrambe le piattaforme.

All'ultima determinazione disponibile (giorno 210) i livelli si stabilizzano attorno ai 4 log<sub>10</sub> UI/mL, con stime molto simili tra le metodiche. La convergenza finale suggerisce una fase di equilibrio replicativo, caratterizzata da un'elevata sovrapposibilità quantitativa tra le due piattaforme.

#### 4.2.7 Monitoraggio viremia paziente 7



*Tabella Figura 15: cinetica virale paziente 7*

Il Paziente 7, proveniente dal reparto di Nefrologia, mostra un andamento bifasico (riduzione iniziale seguita da incremento. Alla valutazione basale (giorno 0) la viremia risulta chiaramente quantificabile. ELITECH registra un valore intorno a 3,2 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC si attesta su circa 3,8 log<sub>10</sub> UI/mL. Lo scostamento iniziale, pari a circa 0,6 logaritmi, indica una differenza quantitativa moderata ma stabile, senza implicazioni sulla classificazione qualitativa di positività.

Al controllo del giorno 28 si osserva una prima flessione dei valori. ELITECH mostra una riduzione minima rispetto al tempo zero, mantenendosi su livelli prossimi a quelli iniziali, mentre HOLOGIC evidenzia un decremento più evidente. La direzione della variazione risulta concordante, anche se l'entità del cambiamento differisce tra le due piattaforme.

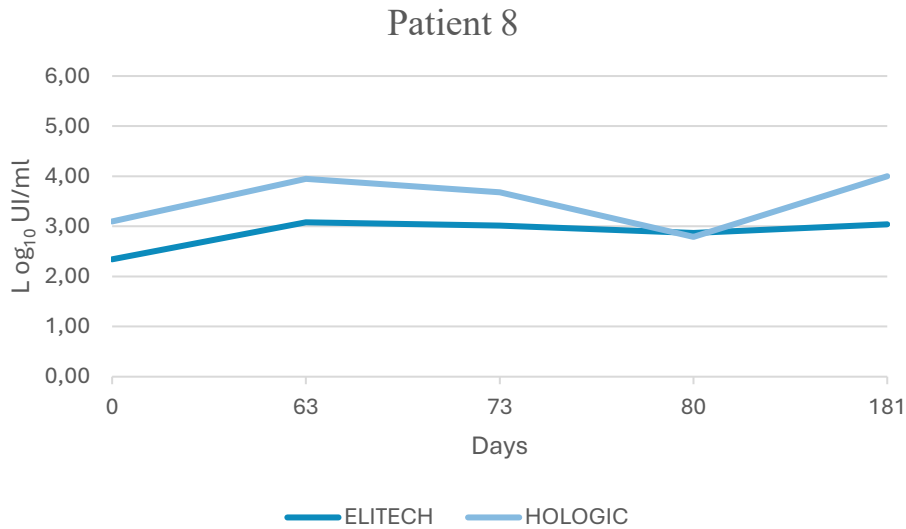
Il punto di minima carica virale si colloca intorno al giorno 56. In questa fase ELITECH raggiunge circa 2,7 log<sub>10</sub> UI/mL, segnando il valore più basso dell'intero follow-up, mentre HOLOGIC si mantiene intorno a 3,5 log<sub>10</sub> UI/mL. La distanza numerica tra le due stime appare più pronunciata rispetto ai controlli precedenti; tuttavia, entrambe documentano chiaramente una fase di attenuazione della replicazione, suggerendo una riduzione biologica reale della viremia.

A partire da questo momento si osserva un'inversione del trend. Tra il giorno 56 e il giorno 86 la carica virale riprende a crescere. ELITECH mostra un incremento graduale fino a circa  $3,0 \log_{10}$  UI/mL, mentre HOLOGIC evidenzia una crescita più marcata, superando i  $4 \log_{10}$  UI/mL. L'espansione replicativa viene quindi intercettata in modo concordante, pur in presenza di una differenza quantitativa che tende a persistere.

All'ultima determinazione disponibile (giorno 114) l'incremento prosegue. ELITECH supera i  $4 \log_{10}$  UI/mL, mentre HOLOGIC si attesta intorno a  $4,5 \log_{10}$  UI/mL. In questa fase finale la divergenza numerica rimane sostanzialmente costante, ma la traiettoria evolutiva delle due curve risulta chiaramente sovrapponibile in termini di direzione e tempistica.

Nel complesso, la cinetica del paziente 7 descrive una sequenza ben definita: una fase iniziale di progressiva riduzione fino a un minimo intermedio, seguita da una ripresa replicativa sostenuta. Le differenze quantitative, presenti fin dalla prima determinazione e relativamente stabili nel tempo, non modificano l'interpretazione dinamica del quadro.

#### 4.2.8 Monitoraggio viremia paziente 8



*Figura 16 : cinetica virale paziente 8*

Il Paziente 8, proveniente da una struttura esterna, presenta un decorso trifasico su un arco temporale prolungato, articolato in tre momenti distinti: una prima fase di espansione della replicazione, una successiva attenuazione fino a un minimo intermedio e una ripresa tardiva della carica virale. L'intero decorso si sviluppa su un intervallo temporale ampio ed è riconosciuto in modo coerente da entrambe le piattaforme analitiche, sebbene con ampiezze di quantificazione differenti nelle diverse fasi del follow-up.

Alla determinazione iniziale (giorno 0) la viremia è già documentabile. ELITECH si colloca intorno a 2,3 log<sub>10</sub> UI/mL, valore indicativo di una replicazione di entità contenuta, mentre HOLOGIC riporta circa 3,1 log<sub>10</sub> UI/mL. Lo scarto iniziale, prossimo a 0,8 logaritmi, evidenzia una diversa stima dell'intensità replicativa in presenza di livelli relativamente bassi, pur in assenza di discrepanze qualitative.

Dopo un intervallo temporale prolungato, al giorno 63 si registra un aumento significativo della carica virale. ELITECH raggiunge valori prossimi a 3,0 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC si avvicina a 3,9 log<sub>10</sub> UI/mL. In questa fase la divergenza

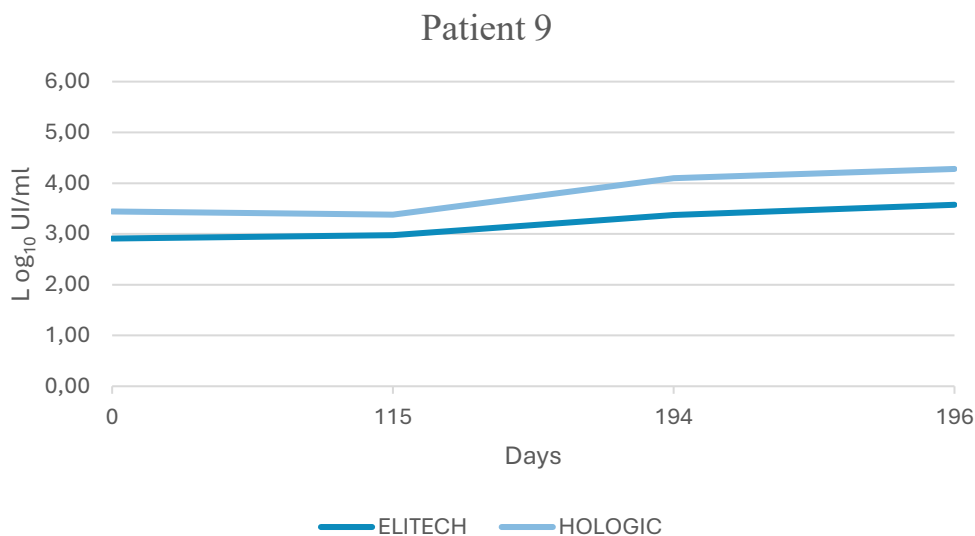
numerica si amplia rispetto al tempo zero, suggerendo una differente ampiezza nella quantificazione durante l'espansione della replicazione.

Dieci giorni più tardi (giorno 73) si osserva una flessione dei valori. ELITECH mostra una variazione minima, mantenendosi stabile intorno ai 3,0 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC evidenzia una riduzione più marcata rispetto al controllo precedente, pur rimanendo su livelli superiori. Questo passaggio intermedio suggerisce una temporanea modulazione dell'attività replicativa.

Il punto di minima carica virale si colloca intorno al giorno 80. In questa fase entrambe le metodiche riportano valori compresi tra 2,8 e 2,9 log<sub>10</sub> UI/mL, configurando il momento di massima sovrapposibilità quantitativa dell'intero follow-up. La convergenza osservata indica un allineamento sostanziale nella stima della viremia a livelli intermedi, in contrasto con le divergenze evidenziate nelle fasi di maggiore variazione.

La dinamica cambia nuovamente nella fase tardiva. Alla determinazione del giorno 181 si evidenzia una nuova crescita della carica virale: ELITECH si colloca attorno a 3,0 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC supera la soglia dei 4,0 log<sub>10</sub> UI/mL. L'ampiezza dello scarto torna quindi ad aumentare, suggerendo una diversa sensibilità nella quantificazione durante la ripresa replicativa.

#### 4.2.9 Monitoraggio viremia paziente 9



*Figura 17: cinetica virale paziente 9*

Il Paziente 9, proveniente da struttura esterna, evidenzia una crescita progressiva della DNAemia lungo l'intero periodo di osservazione, scenario che consente di valutare la stabilità del differenziale quantitativo tra piattaforme in presenza di un trend chiaramente ascendente. La traiettoria si configura come una crescita continua e graduale della replicazione virale, che diventa più marcata nelle determinazioni più tardive. In questo contesto, le due metodiche forniscono una rappresentazione coerente dell'evoluzione temporale, mantenendo uno scostamento quantitativo relativamente costante.

Alla valutazione iniziale (giorno 0) la viremia risulta già chiaramente quantificabile. ELITECH riporta un valore intorno a 2,9 log<sub>10</sub> UI/mL, indicativo di una replicazione attiva ma di entità moderata, mentre HOLOGIC si attesta su circa 3,4 log<sub>10</sub> UI/mL. La differenza, pari a circa 0,5 logaritmi, suggerisce una diversa ampiezza nella stima quantitativa, pur in assenza di discrepanze nella classificazione qualitativa.

Alla determinazione successiva (giorno 115) i valori risultano sostanzialmente stabili rispetto al basale. ELITECH mostra una variazione minima, mantenendosi prossima ai livelli iniziali, mentre HOLOGIC evidenzia una lieve flessione, rimanendo

comunque su valori superiori. Questa fase può essere interpretata come un periodo di relativa stabilità della replicazione, senza variazioni clinicamente rilevanti.

Il cambiamento più significativo si osserva a partire dal giorno 194, quando entrambe le metodiche documentano un incremento netto della carica virale. ELITECH aumenta fino a circa 3,3 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC supera i 4,0 log<sub>10</sub> UI/mL. L'entità della crescita appare evidente e concordante nella direzione, suggerendo una ripresa sostenuta dell'attività replicativa.

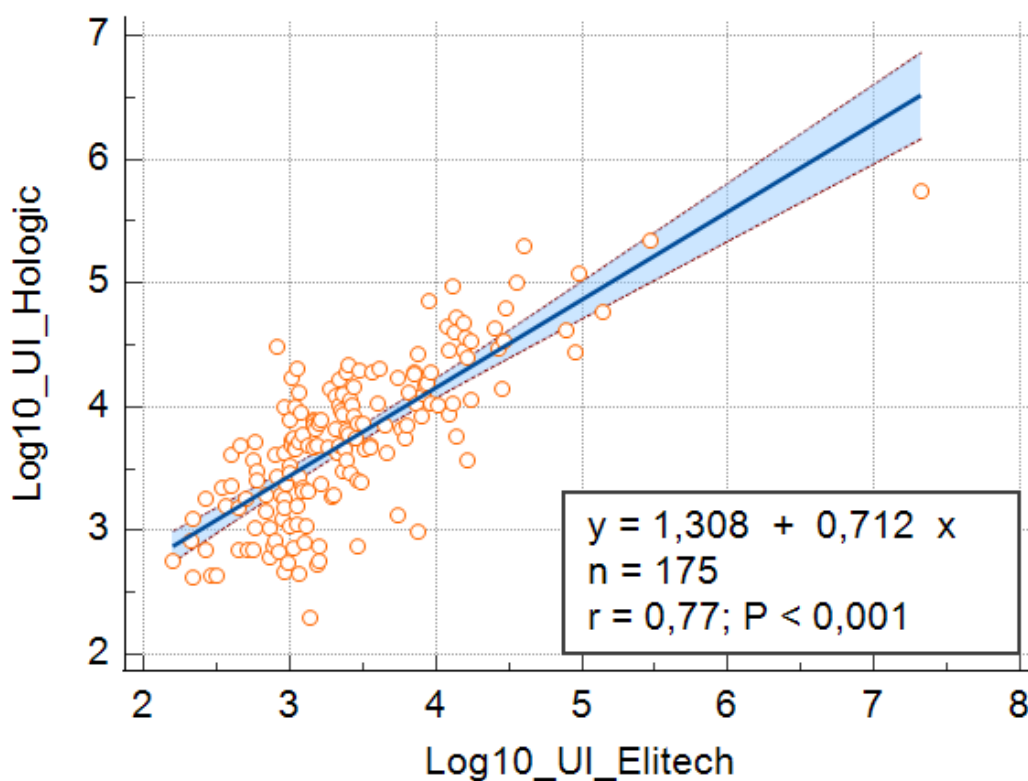
All'ultima determinazione disponibile (giorno 196) l'incremento prosegue ulteriormente. ELITECH raggiunge circa 3,5 log<sub>10</sub> UI/mL, mentre HOLOGIC si colloca tra 4,2 e 4,3 log<sub>10</sub> UI/mL. L'assenza di segnali di stabilizzazione o riduzione conferma la continuità del trend ascendente. Anche in questa fase il differenziale quantitativo tra le due piattaforme rimane proporzionalmente simile a quello osservato nelle determinazioni precedenti, suggerendo la presenza di un offset sistematico piuttosto che di una divergenza dinamica.

### 4.3 Valutazione della relazione quantitativa globale tra le metodiche ELITECH e HOLOGIC

Dopo aver analizzato l'andamento della carica virale nei pazienti sottoposti a monitoraggio seriato, con particolare attenzione ai soggetti che presentavano almeno quattro determinazioni consecutive, si è ritenuto opportuno estendere la valutazione all'intero insieme dei campioni per i quali entrambe le metodiche hanno fornito un valore quantitativo espresso in log<sub>10</sub> UI/mL.

L'analisi dei singoli casi clinici consente infatti di osservare la coerenza del monitoraggio intra-paziente nel tempo, ma non permette di descrivere in modo complessivo il grado di relazione tra le due piattaforme sull'intera popolazione studiata.

Per questo motivo è stata effettuata un'analisi di regressione lineare con calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson, al fine di valutare la forza e la natura della relazione tra i valori ottenuti con ELITECH e quelli ottenuti con HOLOGIC.



*Figura 18: Diagramma di dispersione con regressione lineare semplice (metodo dei minimi quadrati) e calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson.*

Il primo grafico rappresenta un diagramma di dispersione in cui ogni punto corrisponde a un singolo campione analizzato con entrambe le metodiche. Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori di carica virale espressi in log<sub>10</sub> UI/mL ottenuti con ELITECH, mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i corrispondenti valori ottenuti con HOLOGIC. La trasformazione logaritmica (log<sub>10</sub>) è stata adottata per normalizzare la distribuzione dei valori di carica virale, che in unità assolute (UI/mL) si estendono su più ordini di grandezza e risultano tipicamente asimmetrici; l'espressione in scala logaritmica consente di comprimere l'intervallo dei dati e di rendere più agevole il confronto tra campioni, oltre a migliorare l'applicabilità delle analisi statistiche. Inoltre, in log<sub>10</sub> le variazioni della carica virale assumono un significato proporzionale facilmente interpretabile: un incremento di 1 log<sub>10</sub> corrisponde a un aumento di dieci volte.

L'osservazione visiva del grafico evidenzia un andamento crescente: all'aumentare dei valori misurati con ELITECH aumentano anche quelli misurati con HOLOGIC. Tale relazione è descritta dalla retta di regressione lineare, espressa dall'equazione :

$$y = 1,308 + 0,712x$$

Dove y rappresenta il valore stimato con HOLOGIC e x il valore misurato con ELITECH. Il coefficiente angolare (0,712) indica che, mediamente, a un incremento di 1 log<sub>10</sub> UI/mL misurato con ELITECH corrisponde un incremento di circa 0,7 log<sub>10</sub> UI/mL con HOLOGIC; pertanto i due metodi variano nella stessa direzione, ma non in modo perfettamente proporzionale lungo tutto l'intervallo di misura.

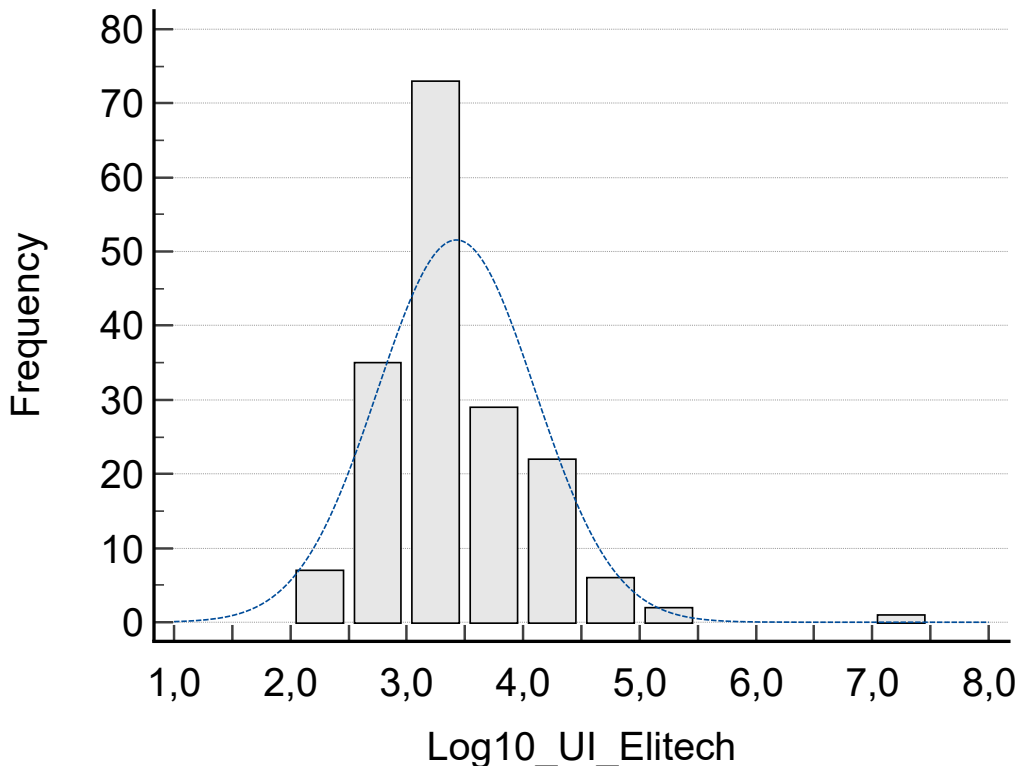
L'intercetta (1,308) rappresenta il valore di HOLOGIC previsto dalla retta quando ELITECH è pari a 0 in scala logaritmica. Pur non avendo un significato clinico diretto, questo parametro indica che la relazione stimata risulta globalmente spostata verso valori più elevati per HOLOGIC, contribuendo a descrivere uno scostamento medio tra le metodiche, più evidente nell'area dei valori bassi.

La forza dell'associazione lineare è espressa dal coefficiente di correlazione di Pearson ( $r = 0,77$ ), che può assumere valori compresi tra -1 e +1. Un valore positivo indica che le due variabili aumentano nella stessa direzione, mentre un valore negativo indicherebbe un andamento opposto; valori prossimi a  $\pm 1$  corrispondono a una relazione lineare molto stretta, mentre valori vicini a 0 indicano assenza di relazione lineare. Nel presente studio,  $r = 0,77$  indica una correlazione positiva moderatamente forte: in generale, ai campioni con valori più elevati misurati da ELITECH corrispondono valori più elevati anche con HOLOGIC, e viceversa, pur in presenza di una dispersione non trascurabile attorno alla retta.

Il coefficiente di determinazione ( $r^2 \approx 0,59$ ) quantifica la quota di variabilità dei valori HOLOGIC spiegata dalla variabilità dei valori ELITECH nel modello lineare; in questo caso, circa il 59% della variabilità osservata in HOLOGIC risulta associata ai valori misurati con ELITECH, mentre la parte restante è attribuibile a fattori non catturati dal modello, quali variabilità analitica, differenze metodologiche tra piattaforme e variabilità biologica del campione.

Il valore di  $p < 0,001$  conferma che l'associazione osservata è statisticamente significativa e difficilmente attribuibile al caso.

#### 4.4 Distribuzione dei valori di carica virale EBV espressi in $\log_{10}$ UI/mL (metodica ELITECH).



*Figura 19: Distribuzione dei valori  $\log_{10}$  UI/mL ottenuti con ELITECH*

Per caratterizzare la distribuzione della DNAemia EBV nella popolazione analizzata, sono stati considerati i valori di carica virale espressi in  $\log_{10}$  UI/mL ottenuti mediante la metodica ELITECH, adottata nel presente studio come metodo di riferimento in quanto routinariamente impiegata nella pratica diagnostica del laboratorio. La distribuzione dei dati è stata rappresentata mediante un istogramma di frequenza, nel quale l'asse delle ascisse riporta gli intervalli di carica virale e l'asse delle ordinate il numero di campioni appartenenti a ciascun intervallo.

Dall'osservazione del grafico emerge una prevalente concentrazione dei campioni in un range intermedio di viremia, indicativamente compreso tra 2 e 4  $\log_{10}$  UI/mL,

mentre i valori più elevati risultano meno frequenti. Tale andamento suggerisce che, nella casistica esaminata, la maggior parte delle determinazioni quantitative si collochi in una fascia centrale di carica virale, con progressiva riduzione della numerosità campionaria agli estremi della distribuzione.

La curva sovrapposta all'istogramma, corrispondente a un adattamento teorico di tipo normale, mostra una sostanziale coerenza con l'andamento osservato, indicando che i dati, dopo trasformazione logaritmica, presentano una distribuzione complessivamente regolare attorno a un valore centrale. Ne consegue che i valori intermedi di viremia sono i più rappresentati, mentre quelli particolarmente bassi o particolarmente elevati risultano relativamente meno frequenti.

È opportuno sottolineare che tale analisi ha carattere puramente descrittivo e non intende esprimere alcuna misura di concordanza tra ELITECH e HOLOGIC. Il suo scopo è piuttosto quello di definire il profilo distributivo della carica virale EBV nella popolazione in studio secondo la metodica di riferimento, fornendo così il contesto interpretativo per le successive analisi comparative tra piattaforme.

#### 4.5 Analisi di concordanza tra le metodiche ELITECH e HOLOGIC mediante diagramma di Bland–Altman

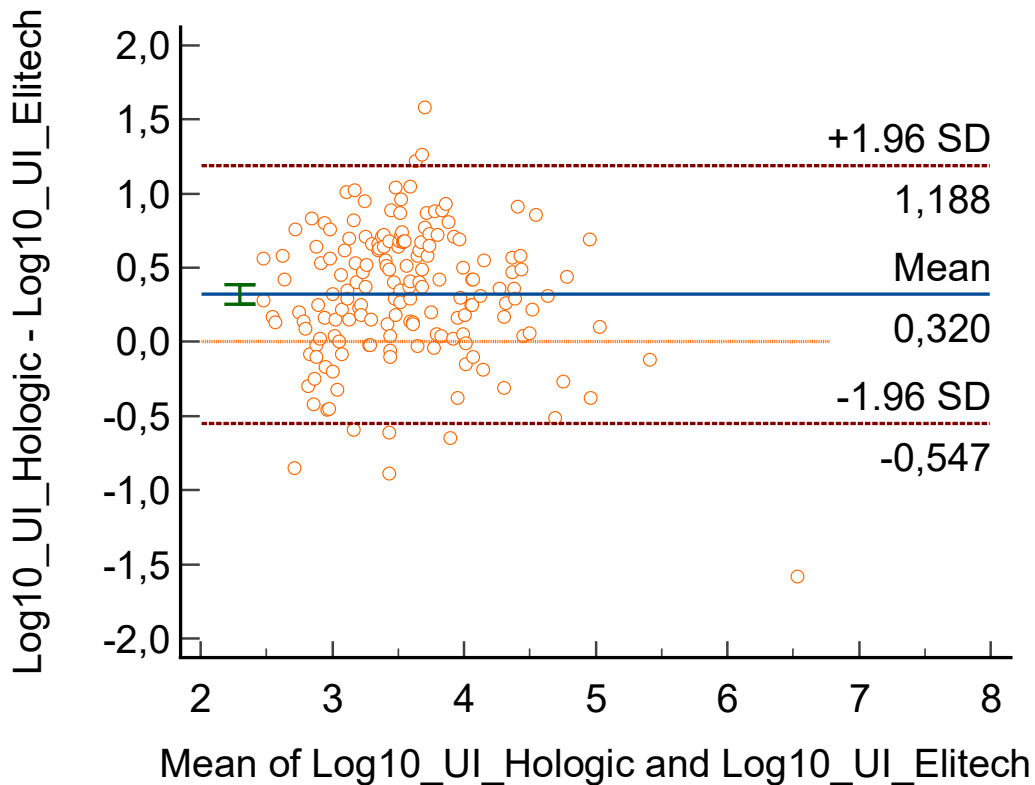


Figura 20: diagramma di Bland–Altman

Per valutare in modo diretto il grado di concordanza tra le metodiche ELITECH e HOLOGIC nella quantificazione della carica virale EBV espressa in log<sub>10</sub> UI/mL, è stata condotta un'analisi di Bland–Altman.

A differenza dell'analisi di regressione lineare, che misura la forza della relazione tra due variabili e indica se queste si muovono nella stessa direzione, il metodo di Bland–Altman consente di analizzare in modo specifico l'accordo tra due strumenti di misura, valutando l'entità delle differenze osservate per ciascun campione lungo l'intero intervallo dei valori analizzati. Tale approccio è considerato il metodo di riferimento negli studi di confronto tra metodiche quantitative.

Nel grafico, sull'asse delle ascisse è riportata la media dei valori logaritmici ottenuti con le due metodiche per ciascun campione, calcolata come (ELITECH +

HOLOGIC)/2. L'utilizzo della media consente di rappresentare il livello "medio" di carica virale per ciascun campione, evitando di privilegiare una delle due metodiche come riferimento assoluto.

Sull'asse delle ordinate è invece riportata la differenza tra le due misurazioni (HOLOGIC – ELITECH). Ogni punto del grafico rappresenta quindi un singolo campione e indica, contemporaneamente, il livello medio di viremia e l'entità dello scostamento tra le due piattaforme.

La linea orizzontale centrale (in blu) rappresenta il bias medio, ossia la media aritmetica di tutte le differenze osservate. Il bias esprime la differenza sistematica tra i due metodi: un valore pari a zero indicherebbe assenza di scostamento medio, mentre un valore positivo o negativo indicherebbe rispettivamente una tendenza di HOLOGIC a fornire valori superiori o inferiori rispetto a ELITECH. Nel grafico osservato, il bias appare contenuto e prossimo allo zero, suggerendo l'assenza di una marcata sovra- o sottostima sistematica tra le metodiche.

Le linee tratteggiate superiori e inferiori rappresentano i limiti di concordanza, calcolati come:

$$\text{bias} \pm 1,96 \times \text{deviazione standard delle differenze.}$$

Dal punto di vista statistico, tali limiti identificano l'intervallo entro il quale ci si attende che ricada circa il 95% delle differenze tra le due metodiche, assumendo una distribuzione approssimativamente normale delle differenze. L'ampiezza dell'intervallo tra i limiti superiori e inferiori fornisce un'indicazione della variabilità inter-metodica: quanto più i limiti sono ampi, tanto maggiore è la dispersione delle differenze.

Nel grafico in esame, la maggior parte dei punti si colloca all'interno dei limiti di concordanza, indicando che le differenze osservate risultano generalmente contenute entro un intervallo prevedibile. Questo suggerisce un buon livello di accordo globale tra le due metodiche. Tuttavia, si osservano alcuni punti isolati al di fuori dei limiti, indicativi di campioni nei quali la discrepanza tra i metodi è risultata più marcata rispetto alla variabilità attesa. Tali osservazioni possono essere attribuite a variabilità

analitica, differenze metodologiche intrinseche o caratteristiche specifiche del campione, e meritano un'interpretazione prudente nel contesto clinico.

Un ulteriore aspetto rilevante nell'interpretazione del diagramma di Bland–Altman è la valutazione dell'eventuale presenza di un bias proporzionale, ossia una variazione sistematica delle differenze al variare del livello medio di carica virale. Se le differenze aumentassero progressivamente con l'aumentare della media, ciò suggerirebbe una discordanza crescente ai livelli più elevati di viremia. Nel grafico analizzato non si evidenzia una chiara tendenza crescente o decrescente delle differenze lungo l'asse delle medie, suggerendo che la variabilità tra le metodiche rimanga relativamente costante nei diversi intervalli di carica virale.

Nel complesso, l'analisi di Bland–Altman evidenzia un bias medio contenuto e una distribuzione delle differenze prevalentemente compresa entro i limiti di concordanza, configurando un buon livello di accordo quantitativo tra ELITECH e HOLOGIC.

Pur non essendo perfettamente sovrapponibili, le due piattaforme mostrano una variabilità inter-metodica compatibile con l'impiego nel monitoraggio della carica virale EBV, tenendo conto che variazioni di modesta entità dovrebbero essere interpretate considerando la possibile componente metodologica oltre a quella biologica.

## 5.DISCUSSIONE

### 5.1 Concordanza tra ELITECH e HOLOGIC

Il presente studio ha valutato la comparabilità tra le piattaforme ELITECH e HOLOGIC per la quantificazione dell'EBV-DNA su sangue intero, con l'obiettivo di analizzare non soltanto la concordanza statistica tra i due sistemi, ma anche la possibile rilevanza clinica e metodologica delle differenze osservate.

Nel complesso, i risultati ottenuti indicano una buona comparabilità globale tra le due metodiche. L'analisi quantitativa ha infatti evidenziato una correlazione positiva tra i valori misurati dalle due piattaforme, indicando che i campioni caratterizzati da cariche virali più elevate con una metodica tendevano a presentare valori analogamente elevati anche con l'altra. Questo dato suggerisce che entrambi i sistemi siano in grado di descrivere in modo coerente l'andamento generale della viremia da Epstein-Barr virus.

Tuttavia, la sola correlazione non è sufficiente a dimostrare la piena equivalenza tra due metodiche quantitative. Per questo motivo, l'analisi dell'accordo mediante diagramma di Bland-Altman risulta particolarmente importante nell'interpretazione dei risultati.

Nel presente studio, tale analisi ha evidenziato la presenza di discrepanze quantitative che, in alcuni casi, possono raggiungere circa 1 log<sub>10</sub> UI/mL. In termini pratici, una differenza di tale entità corrisponde a una variazione di circa dieci volte nella quantità di DNA virale misurata sul medesimo campione. Sebbene non tutte le differenze di questa ampiezza si traducano automaticamente in un diverso comportamento clinico, il dato evidenzia che le due piattaforme, pur ben correlate, non sono perfettamente sovrapponibili sul piano quantitativo.

Per interpretare correttamente questo aspetto è necessario distinguere tra variabilità analitica fisiologica e scostamento potenzialmente rilevante dal punto di vista clinico. In ambito virologico, una variazione entro  $\pm 0,5$  log<sub>10</sub> è generalmente considerata compatibile con la normale variabilità tecnica del test, mentre differenze superiori possono assumere maggiore significato, soprattutto se persistenti o osservate nel monitoraggio seriale dello stesso paziente. In questo senso, il riscontro di discrepanze

fino a circa  $1 \log_{10}$  nel nostro studio suggerisce che una parte delle differenze osservate non sia spiegabile esclusivamente dalla variabilità tecnica ordinaria, ma possa riflettere differenze strutturali tra le due piattaforme analitiche. Ne deriva che ELITECH e HOLOGIC, pur mostrando una buona concordanza generale, non debbano essere considerate automaticamente intercambiabili nel monitoraggio longitudinale individuale, soprattutto quando le decisioni cliniche dipendono da variazioni quantitative contenute o da valori prossimi alle soglie decisionali inferiori. È tuttavia fondamentale distinguere tra significatività analitica e impatto clinico reale. Una differenza inter-metodica di  $1 \log_{10}$ , pur rappresentando una variazione quantitativa importante, non implica necessariamente una modifica della gestione clinica nei pazienti con viremia chiaramente elevata, ad esempio superiore a circa  $3-4 \log_{10}$  UI/mL. In tali situazioni, infatti, l'indicazione al monitoraggio stretto o all'eventuale avvio di strategie di gestione anticipata tende a rimanere invariata.

Al contrario, discrepanze di questa entità possono assumere maggiore rilevanza nei campioni con bassa carica virale, prossimi ai limiti inferiori di quantificazione, dove una diversa attribuzione qualitativa del risultato potrebbe teoricamente anticipare o ritardare l'intervento clinico. Questo dato rafforza il principio secondo cui il significato clinico della EBV-DNAemia non debba essere interpretato in modo rigido sulla base del solo valore assoluto, ma debba sempre essere contestualizzato nel profilo clinico e nel rischio individuale del paziente, in assenza di soglie universalmente applicabili a tutti i contesti e a tutte le metodiche. (E. Y. Chen et al., 2025) (Agarwal et al., 2026)

Un elemento particolarmente rilevante per comprendere i risultati ottenuti riguarda la matrice biologica utilizzata. Nel presente studio, la quantificazione dell'EBV-DNA è stata effettuata su sangue intero, matrice che comprende sia la frazione plasmatica sia la componente cellulare. Tale scelta assume una particolare importanza nel caso dell'Epstein-Barr virus, che presenta un marcato tropismo per i linfociti B e tende a persistere prevalentemente in forma cellulo-associata. Di conseguenza, una quota significativa del DNA virale circolante può essere associata alle cellule infette presenti nel sangue periferico e non esclusivamente alla frazione plasmatica. Questo implica che la DNAemia da EBV non rappresenti un parametro biologico

completamente indipendente dal compartimento analizzato, ma sia influenzata dalla matrice utilizzata per il test.

Questa interpretazione risulta coerente con quanto riportato da Fukuda et al. (2024), i quali hanno dimostrato che la rilevazione dell'EBV-DNA può differire in modo significativo tra sangue intero e plasma, con una maggiore sensibilità generalmente osservata nel sangue intero. Gli autori hanno inoltre evidenziato che, pur in presenza di trend longitudinali sovrapponibili, la concordanza tra le due matrici non è completa. Anche altri studi hanno concluso che il sangue intero mostra una sensibilità superiore rispetto al plasma per la rilevazione dell'EBV-DNA e che, per un corretto monitoraggio, la matrice biologica dovrebbe essere mantenuta costante nel follow-up dello stesso paziente. (Agarwal et al., 2026; Rzepka et al., 2023a)

Dal punto di vista clinico, la EBV-DNAemia rappresenta uno strumento di sorveglianza di particolare rilievo nei pazienti sottoposti a trapianto o in condizioni di immunosoppressione, in quanto consente di identificare precocemente situazioni a rischio di sviluppo di malattie linfoproliferative post-trapianto (PTLD). Tuttavia, la letteratura più recente sottolinea come l'incidenza, la tempistica di comparsa e l'entità della DNAemia possano mostrare una notevole variabilità interindividuale, influenzata da molteplici fattori clinici. Tra questi, assumono particolare rilievo il mismatch sierologico tra donatore e ricevente, soprattutto nelle combinazioni a maggiore rischio, e il grado di immunosoppressione.

Burton et al. (2025), studiando riceventi adulti e pediatrici di trapianto d'organo solido EBV D+/R-, hanno mostrato che la comparsa della DNAemia non segue un andamento uniforme, ma varia in funzione dell'organo trapiantato e delle caratteristiche del donatore e del ricevente, con una finestra temporale particolarmente rilevante nei primi mesi post-trapianto. Analogamente, revisioni recenti confermano che il rischio di PTLD è maggiore nei pazienti sieronegativi che ricevono un organo da donatore sieropositivo e che l'intensità dell'immunosoppressione rappresenta uno dei principali determinanti del rischio. (Burton et al., 2025; E. Y. Chen et al., 2025; Potluri et al., 2025)

In linea con tali osservazioni, Agarwal et al. (2026) sottolineano che le decisioni cliniche non dovrebbero basarsi esclusivamente su soglie numeriche rigide, ma

dovrebbero essere integrate con il quadro clinico complessivo e con la stratificazione individuale del rischio. Questa considerazione risulta pienamente coerente con i risultati del nostro studio, nei quali le differenze quantitative osservate tra le due piattaforme non compromettono generalmente la capacità delle metodiche di descrivere il comportamento biologico complessivo della viremia, ma suggeriscono cautela nell'interpretazione di singole determinazioni isolate, soprattutto nei campioni borderline o nei contesti clinici ad alta sensibilità decisionale. (Agarwal et al., 2026; E. Y. Chen et al., 2025)

Oltre agli aspetti biologici e clinici, anche fattori strettamente analitici possono contribuire alle differenze osservate tra piattaforme diagnostiche. Sebbene entrambe le metodiche si basino su sistemi di amplificazione nucleica quantitativa, il risultato finale può essere influenzato da numerose variabili tecniche e preanalitiche, tra cui il target genomico amplificato, le procedure di estrazione dell'acido nucleico, le condizioni di conservazione e manipolazione del campione, nonché i sistemi di calibrazione utilizzati per esprimere i risultati in UI/mL. In quest'ottica, le discrepanze osservate nel presente studio non devono essere interpretate come un'anomalia inattesa, ma piuttosto come un fenomeno compatibile con la nota eterogeneità metodologica che ancora caratterizza il monitoraggio quantitativo dell'EBV-DNA. Le raccomandazioni internazionali e le review più recenti sottolineano infatti che i campioni di sangue intero, plasma o siero possono tutti essere utilizzati, ma che la mancanza di standardizzazione completa rende difficile trasferire in modo diretto soglie e valori quantitativi tra laboratori, matrici e piattaforme differenti. (E. Y. Chen et al., 2025)

Dai dati analizzati emerge infatti che, in diversi pazienti, le due metodiche mostrano differenze nei valori quantitativi pur mantenendo un andamento temporale della viremia sostanzialmente sovrapponibile. In alcuni casi, la piattaforma HOLOGIC tende a riportare valori leggermente superiori rispetto alla metodica ELITECH, con scostamenti generalmente compresi tra circa 0,4 e 0,8 log<sub>10</sub> UI/mL. Questo suggerisce la presenza di un offset quantitativo tra le due piattaforme, verosimilmente legato a differenze nei sistemi di calibrazione o nell'efficienza delle diverse fasi analitiche. Tale osservazione è particolarmente importante, poiché indica

che metodiche diverse possono descrivere in modo coerente il trend biologico della DNAemia pur non restituendo valori numerici perfettamente sovrapponibili.

Parallelamente, l'analisi della concordanza qualitativa dei risultati, classificati nelle categorie negativo (NEG), positivo non quantificabile (PNQ) e positivo quantificabile (PQ), ha fornito ulteriori elementi interpretativi. La tabella di concordanza evidenzia che la maggior parte dei campioni risulta classificata in modo concordante tra le due piattaforme. In particolare, 46 campioni sono risultati negativi con entrambe le metodiche, 13 campioni sono stati classificati come positivi non quantificabili da entrambi i sistemi analitici, mentre 177 campioni sono stati identificati come positivi quantificabili da entrambe le piattaforme.

Complessivamente, 236 campioni su 272 (86,8%) hanno mostrato una concordanza qualitativa esatta, indicando un'elevata concordanza qualitativa complessiva tra ELITECH e HOLOGIC.

Le discrepanze osservate riguardano prevalentemente i campioni caratterizzati da bassa carica virale, cioè prossimi ai limiti inferiori di quantificazione dei sistemi analitici. In particolare, sono stati osservati campioni classificati come negativi da una metodica e positivi non quantificabili dall'altra, suggerendo la presenza di segnali di amplificazione molto deboli rilevati soltanto da uno dei due sistemi. Analogamente, una parte dei campioni classificati come positivi quantificabili da ELITECH risulta positiva non quantificabile con HOLOGIC. Nel complesso, tali differenze si concentrano soprattutto nei campioni borderline, nei quali anche modeste variazioni analitiche possono determinare una diversa attribuzione qualitativa del risultato. Questo aspetto rappresenta uno dei punti più significativi emersi dal confronto tra le due metodiche, poiché evidenzia che la principale area di discordanza non riguarda i campioni con viremia francamente elevata, bensì quelli collocati in prossimità delle soglie inferiori di rilevabilità e quantificazione.

Queste discrepanze possono essere in parte spiegate dai differenti limiti inferiori di quantificazione delle due metodiche. Nel sistema HOLOGIC, i campioni con carica virale inferiore a circa 350 UI/mL vengono classificati come positivi non quantificabili, mentre nella piattaforma ELITECH la soglia di quantificazione risulta più bassa, con valori inferiori a circa 104 UI/mL classificati come PNQ. Di

conseguenza, esiste un intervallo di valori compreso tra 104 e 350 UI/mL nel quale ELITECH può fornire un valore quantitativo mentre HOLOGIC può classificare lo stesso campione come positivo non quantificabile. Questo aspetto spiega plausibilmente una parte rilevante delle discrepanze qualitative osservate a bassa carica virale e conferma che, in questa fascia di concentrazione, il comportamento dei test è fortemente influenzato dalle rispettive caratteristiche analitiche.

Nel complesso, i risultati del presente studio indicano che le differenze tra le metodiche risultano più evidenti nei campioni caratterizzati da bassa viremia, prossimi ai limiti inferiori di rilevabilità e quantificazione, mentre nei campioni con carica virale più elevata la concordanza tra le piattaforme risulta molto alta. Questo dato rafforza l'interpretazione secondo cui le due metodiche siano entrambe affidabili nella rilevazione e nel monitoraggio delle viremie più significative, mentre richiedano maggiore cautela interpretativa nei contesti borderline, nei quali anche modeste differenze tecniche possono produrre un diverso inquadramento del campione.

L'analisi delle cinetiche longitudinali dei pazienti sottoposti a monitoraggio seriato evidenzia infine che, nonostante la presenza di differenze quantitative tra le piattaforme, le due metodiche risultano generalmente concordanti nella descrizione dell'andamento biologico della DNAemia nel tempo.

In conclusione, il presente studio mostra che le piattaforme ELITECH e HOLOGIC presentano una buona comparabilità complessiva per la quantificazione dell'EBV-DNA su sangue intero, sia dal punto di vista quantitativo sia dal punto di vista qualitativo. Tuttavia, le discrepanze osservate, in particolare nei campioni a bassa carica virale e nei confronti longitudinali intra-paziente, indicano che le due metodiche non dovrebbero essere considerate pienamente intercambiabili senza cautela. I risultati ottenuti, letti alla luce della letteratura recente, supportano l'idea che la EBV-DNAemia debba essere interpretata integrando il dato numerico con il contesto clinico, il profilo di rischio del paziente, la matrice biologica analizzata e soprattutto il trend seriale nel tempo. (E. Y. Chen et al., 2025; Fukuda et al., 2024)

## 5.2 Cinetica virale nei pazienti ematologici

L'analisi dei pazienti ematologici provenienti dal reparto di Ematologia (Pazienti 1, 3 e 4) evidenzia come la riattivazione di Epstein–Barr virus (EBV) nel contesto del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-HSCT) sia strettamente correlata allo stato immunologico dinamico del paziente e alla modulazione della terapia immunosoppressiva.

Nei tre casi analizzati emerge un comune denominatore fisiopatologico, rappresentato da una condizione di immunodepressione significativa, determinata dal condizionamento mieloablativo, dalla lenta ricostituzione dell'immunità T-mediata e dalla necessità di trattamenti immunosoppressivi per il controllo della graft-versus-host disease (GVHD). Quest'ultima costituisce una delle principali complicanze immunologiche del trapianto allogenico ed è caratterizzata da una risposta immunitaria mediata dalle cellule del donatore nei confronti dei tessuti del ricevente, richiedendo frequentemente l'impiego di terapie immunosoppressive ad alte dosi.

In questo contesto, la letteratura recente conferma che la riattivazione di EBV dopo allo-HSCT si osserva con maggiore frequenza nei pazienti con GVHD severa e in quelli sottoposti a immunosoppressione intensa o prolungata. (Ratiu et al., 2024) (Law et al., 2024)

Nel Paziente 1, affetto da mielofibrosi primaria e sottoposto ad allo-HSCT, la riattivazione virale si colloca temporalmente in concomitanza con una GVHD intestinale severa trattata con steroidi ad alte dosi. Tale quadro risulta pienamente coerente con quanto riportato in letteratura, dove la GVHD di grado III–IV rappresenta uno dei principali fattori di rischio per l'aumento della DNAemia da EBV e per l'evoluzione verso post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). L'andamento della carica virale del paziente 1 è caratterizzato da un incremento progressivo fino a valori superiori a  $4 \log_{10}$  UI/mL, seguito da una riduzione dopo terapia pre-emptive con rituximab, riflette una cinetica già descritta negli studi più recenti: la deplezione dei linfociti B mediata da anticorpi anti-CD20 determina infatti, nei pazienti ad alto rischio, una riduzione generalmente rapida della replicazione virale. (Law et al., 2024) (de Souza et al., 2026)

Nel Paziente 3, affetto da leucemia mieloide acuta ad alto rischio e sottoposto a trapianto aploidentico, la riattivazione si inserisce in un contesto di marcata instabilità immunologica, caratterizzato da terapie di seconda linea, complicanze infettive severe e continua modulazione dell'immunosoppressione. In questo caso, l'osservazione delle due metodiche evidenzia discrepanze nelle fasi a bassa carica virale, mentre nei range superiori a  $3 \log_{10}$  UI/mL le curve risultano sostanzialmente parallele. Questo dato suggerisce che le differenze tra piattaforme tendano ad assumere maggiore rilievo interpretativo ai bassi livelli di DNAemia, mentre nei livelli più elevati di replicazione virale le due metodiche descrivono in modo sostanzialmente concordante il trend biologico dell'infezione. Tale comportamento appare coerente con quanto riportato in letteratura, secondo cui la variabilità intermetodica tende a emergere soprattutto ai bassi livelli di DNAemia, dove differenze di sensibilità analitica, target genomico e strategie di amplificazione possono determinare discordanze qualitative o quantitative più marcate.

Il Paziente 4, affetto da leucemia mieloide acuta con inversione del cromosoma 3 e sottoposto a primo trapianto aploidentico, rappresenta invece un modello particolarmente complesso di immunosoppressione prolungata e ciclicamente modulata. Il decorso clinico è infatti caratterizzato da GVHD cutanea trattata con steroidi e rituximab, successiva recidiva di malattia, terapia ipometilante associata a venetoclax, infusioni di linfociti del donatore (DLI) e programmazione di un secondo trapianto. In questo contesto, la dinamica della carica virale riflette verosimilmente l'alternanza tra fasi di intensa immunosoppressione e tentativi di riattivazione dell'effetto graft-versus-leukemia, configurando un equilibrio immunologico estremamente instabile. La letteratura evidenzia come il trapianto aploidentico, l'impiego di globulina anti-timociti (ATG) e l'utilizzo di terapie cellulari o linfocitarie siano associati a un aumento del rischio di riattivazione dell'EBV, proprio in relazione al profondo impatto di tali procedure sulla ricostituzione immunitaria post-trapianto. (Rzepka et al., 2023)

Complessivamente, i dati osservati nei tre pazienti risultano coerenti con le evidenze più recenti della letteratura. In particolare, la riattivazione di EBV si verifica più frequentemente nei primi mesi successivi al trapianto di cellule staminali emopoietiche, pur potendo manifestarsi anche più tardivamente in presenza di

immunosoppressione persistente o nuovamente intensificata (de Souza et al., 2026). Inoltre, la presenza di GVHD severa rappresenta uno dei principali fattori di rischio per la riattivazione virale, soprattutto quando associata a trattamenti immunosoppressivi intensivi o prolungati. (Law et al., 2024; Ratiu et al., 2024b)

In tale contesto, il monitoraggio seriale mediante PCR quantitativa costituisce uno strumento fondamentale per l'identificazione precoce della riattivazione virale e per l'adozione tempestiva di strategie terapeutiche pre-emptive. L'eventuale impiego di rituximab nei casi selezionati si inserisce proprio in questa logica di intervento anticipato, finalizzata a ridurre il rischio di progressione verso PTLD nei pazienti maggiormente vulnerabili. (Preiksaitis et al., 2024a)

### 5.3 Cinetica virale nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido

Dopo l'analisi dei pazienti ematologici sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-HSCT), l'estensione dello studio ai pazienti provenienti da reparti non ematologici ha consentito di esplorare un diverso modello di vulnerabilità immunologica, rappresentato dall'immunosoppressione cronica farmacologicamente indotta nei trapiantati d'organo solido (SOT). Nei pazienti HSCT, infatti, la riattivazione di EBV si inserisce generalmente in un contesto di immunodepressione intensa ma temporalmente più definita, strettamente correlata al condizionamento mieloablativo, alla ricostituzione dell'immunità T-mediata e all'eventuale comparsa di complicanze quali la graft-versus-host disease. Nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido, al contrario, l'alterazione immunitaria si configura come una condizione cronica, modulata nel tempo in funzione del rischio di rigetto, della terapia immunosoppressiva in atto e delle condizioni cliniche intercorrenti.

In questo contesto, le più recenti linee guida sottolineano come il termine più appropriato sia EBV DNAemia, poiché il DNA virale rilevato nel sangue può derivare non solo da virioni circolanti, ma anche da cellule infette. Le stesse raccomandazioni evidenziano inoltre che non esiste una soglia universale di carica virale applicabile indistintamente a tutti i contesti clinici e a tutte le metodiche analitiche; di conseguenza, il dato deve essere interpretato soprattutto sull'andamento della viremia e del quadro clinico individuale, più che sulla base di un singolo valore assoluto.

Tale impostazione risulta particolarmente importante nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido, nei quali la presenza di EBV DNAemia non rappresenta un evento raro e può essere riscontrata anche in assenza di sintomi specifici. Tuttavia, la semplice evidenza di DNAemia non coincide con una diagnosi di PTLD (Post-Transplant Lymphoproliferative Disease), ma costituisce piuttosto un indicatore di rischio che richiede integrazione con i dati clinici, radiologici e, quando necessario, istologici.

In tale prospettiva, il Paziente 2, uomo di 59 anni sottoposto a trapianto combinato rene-pancreas nel 2010, rappresenta un esempio significativo di come, nel contesto del trapianto d'organo solido, la replicazione di EBV possa svilupparsi anche in assenza di eventi clinici acuti chiaramente correlabili. Il paziente presenta infatti un quadro clinico relativamente stabile dal punto di vista cardiovascolare, ma caratterizzato da patologie croniche, comprendente diabete mellito, insufficienza renale cronica e retinopatia. Durante il follow-up, la EBV DNAemia mostra un andamento progressivamente crescente, con valori che raggiungono circa 4,2–4,3 log<sub>10</sub> UI/mL nella serie analizzata mediante piattaforma HOLOGIC, mentre la metodica di confronto ELITech evidenzia valori costantemente lievemente inferiori. Questo andamento suggerisce come, nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido, la vulnerabilità immunologica non debba essere interpretata esclusivamente come conseguenza di episodi di instabilità clinica, ma possa derivare anche da una condizione di immunosoppressione cronica e protratta nel tempo.

In questo setting, il rischio virologico e linfoproliferativo è quindi espressione di un equilibrio instabile tra controllo immunitario dell'ospite e pressione immunosoppressiva farmacologica.

Anche il Paziente 9 si inserisce in questo quadro interpretativo, ma con caratteristiche cliniche differenti. In questo caso, infatti, l'andamento della EBV DNAemia si colloca in una fase di maggiore instabilità clinica, caratterizzata da un episodio settico che ha richiesto la sospensione e la successiva rimodulazione della terapia immunosoppressiva. Tale elemento è particolarmente rilevante, poiché suggerisce che le oscillazioni della carica virale osservate durante il follow-up possano essere state influenzate non solo dalla naturale dinamica della replicazione

virale, ma anche dalle modifiche terapeutiche rese necessarie dal quadro infettivo intercorrente. Il Paziente 9 rappresenta quindi un esempio di come, nei trapiantati d'organo solido, la EBV DNAemia possa riflettere in modo dinamico le variazioni dell'equilibrio immunologico, soprattutto nelle fasi di maggiore instabilità clinica.

L'osservazione congiunta dei Pazienti 2 e 9 consente di sottolineare come, nei trapiantati d'organo solido, la EBV DNAemia non debba essere interpretata come un semplice dato laboratoristico isolato, ma come un indicatore dinamico del rapporto tra intensità dell'immunosoppressione e capacità dell'ospite di mantenere il controllo virale. La persistenza della DNAemia, anche in assenza di manifestazioni cliniche suggestive, non equivale automaticamente a una diagnosi di PTLD, ma identifica piuttosto una condizione di rischio che richiede monitoraggio seriale e attenta contestualizzazione clinica. In tale prospettiva, un elemento di particolare rilievo è rappresentato anche dal sierostatus EBV donatore/ricevente, noto fattore di rischio per lo sviluppo di PTLD nei trapiantati renali. In particolare, i soggetti con profilo D+/R- presentano un rischio significativamente aumentato rispetto ai riceventi sieropositivi, a conferma del fatto che la carica virale non possa essere interpretata esclusivamente sulla base del valore quantitativo, ma debba sempre essere letta alla luce del profilo immunologico individuale e dei fattori di rischio specifici del paziente. (Preiksaitis et al., 2024b)

Nel complesso, l'inclusione dei pazienti non ematologici contribuisce ad ampliare la robustezza dello studio, dimostrando che il confronto tra piattaforme analitiche mantiene rilevanza anche in un setting di immunosoppressione cronica quale quello dei trapianti d'organo solido. Tuttavia, proprio in questo contesto, il dato molecolare non può essere considerato separatamente dal quadro clinico, ma deve essere interpretato alla luce della storia trapiantologica, del profilo immunologico del paziente, dei fattori di rischio individuali e dell'andamento temporale della DNAemia. Ne consegue che, anche nel contesto dei trapianti d'organo solido, il monitoraggio molecolare dell'EBV rappresenta uno strumento fondamentale di sorveglianza clinica, purché i valori quantitativi vengano letti in maniera critica e contestualizzata, tenendo conto sia delle possibili differenze metodologiche tra piattaforme diagnostiche sia del significato clinico del trend intra-paziente.

## 6. CONCLUSIONI

Il monitoraggio della DNAemia da virus di Epstein–Barr (EBV) rappresenta uno strumento fondamentale nella gestione dei pazienti immunocompromessi, in particolare nei soggetti affetti da patologie ematologiche o sottoposti a trapianto, nei quali la riattivazione virale può precedere lo sviluppo di complicanze clinicamente rilevanti. In questo contesto, la disponibilità di metodiche molecolari sensibili, affidabili e comparabili tra loro è essenziale per garantire un follow-up virologico accurato.

Il presente studio ha avuto l'obiettivo di valutare il grado di concordanza tra due piattaforme diagnostiche per la quantificazione della DNAemia da EBV nel sangue intero: la metodica ELITECH, attualmente utilizzata nella routine diagnostica del laboratorio, e la piattaforma HOLOGIC, oggetto di valutazione comparativa. L'analisi dei risultati ha evidenziato una buona concordanza complessiva tra le due metodiche. L'analisi quantitativa ha mostrato una relazione generalmente coerente tra i valori ottenuti con le due piattaforme, pur in presenza di una certa variabilità intermetodica. Il confronto mediante grafico di Bland–Altman ha evidenziato che la maggior parte delle determinazioni rientra nei limiti di concordanza, indicando una sostanziale comparabilità tra i due sistemi analitici, sebbene siano presenti alcune discrepanze quantitative, soprattutto nelle fasce di carica virale più basse.

Nonostante tali differenze, l'andamento complessivo della viremia nei pazienti sottoposti a monitoraggio seriato risulta generalmente sovrapponibile tra le due metodiche. Questo aspetto assume particolare rilevanza nella pratica clinica, in quanto l'interpretazione dei risultati si basa frequentemente sull'andamento temporale della carica virale nel singolo paziente piuttosto che sul valore assoluto di una singola determinazione.

Tra i principali punti di forza dello studio si annoverano l'analisi di un numero significativo di campioni provenienti dalla routine diagnostica e la valutazione dei dati in un contesto clinico reale, che riflette le condizioni operative di un laboratorio di

microbiologia clinica. Inoltre, l'analisi dei pazienti con determinazioni seriali ha permesso di valutare l'andamento della viremia nel tempo, fornendo indicazioni utili per l'interpretazione clinica dei risultati.

Tuttavia, lo studio presenta anche alcuni limiti. In primo luogo, la natura monocentrica dell'analisi, condotta esclusivamente presso il laboratorio dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Alessandria, potrebbe limitare la generalizzazione dei risultati. Studi analoghi sono stati condotti anche in altri contesti europei, tra cui centri di laboratorio in Belgio, al fine di valutare la performance delle metodiche in popolazioni differenti e in diversi contesti epidemiologici. L'inclusione di più centri potrebbe quindi permettere una validazione più ampia dei risultati. Un ulteriore limite è rappresentato dall'assenza di un metodo di riferimento assoluto che consenta di stabilire con certezza quale delle due metodiche fornisca il valore più accurato nei casi di discordanza. Infine, le differenze tecnologiche tra le piattaforme analitiche possono contribuire alla variabilità intermetodica osservata, in particolare nei campioni con basse cariche virali.

Nel complesso, i risultati ottenuti suggeriscono che entrambe le piattaforme analizzate rappresentano strumenti validi per il monitoraggio della DNAemia da EBV nel sangue intero. Le differenze quantitative osservate sottolineano tuttavia l'importanza di interpretare i risultati nel contesto clinico del paziente e, quando possibile, di mantenere la stessa piattaforma analitica durante il follow-up, al fine di garantire una maggiore coerenza nella valutazione dell'andamento della carica virale nel tempo.

## 7. BIBIOGRAFIA

- Agarwal, R., Purohit, S., Garg, R., Kumar, G., Khanna, R., Pamecha, V., & Gupta, E. (2026). Evaluating the need for Epstein-Barr virus DNAemia monitoring in liver transplant recipients in India. *Microbiology Spectrum*, 14(2).  
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01862-25>
- Bauer, G. (2001). Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. *Clinical Laboratory*, 47(5–6), 223–230.
- Blazquez, A. C., Fellner, M. D., Lorenzetti, M. A., & Preciado, M. V. (2025). A Comparative Genomic Analysis of Epstein–Barr Virus Strains with a Focus on EBV2 Variability. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(6), 2708.  
<https://doi.org/10.3390/ijms26062708>
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in african children. *Journal of British Surgery*, 46(197), 218–223. <https://doi.org/10.1002/bjs.18004619704>
- Burton, C., Mabilangan, C., & Preiksaitis, J. (2025). Incidence and Timing of Epstein–Barr Virus Whole Blood DNAemia in Epstein–Barr Virus-Mismatched Adult and Pediatric Solid Organ Transplant Recipients. *Transplant Infectious Disease*, 27(4). <https://doi.org/10.1111/tid.70042>
- Chakravorty, S., Afzali, B., & Kazemian, M. (2022). EBV-associated diseases: Current therapeutics and emerging technologies. *Frontiers in Immunology*, 13, 1059133. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1059133>
- Chen, E. Y., Dilwali, N., Mysore, K. R., Hassan, S., Smith, S. K., & Karnsakul, W. (2025). Navigating Epstein–Barr Virus (EBV) and Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder (PTLD) in Pediatric Liver Transplantation: Current Knowledge and Strategies for Treatment and Surveillance. *Viruses*, 17(2), 254. <https://doi.org/10.3390/v17020254>

- Chen, J., & Longnecker, R. (2019). Epithelial cell infection by Epstein–Barr virus. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(6), 674–683.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz023>
- Coates, P. J., Slavin, G., & D’Ardenne, A. J. (1991). Persistence of Epstein–Barr virus in Reed–Sternberg cells throughout the course of Hodgkin’s disease. *The Journal of Pathology*, *164*(4), 291–297.  
<https://doi.org/10.1002/path.1711640404>
- Cohen, J. I. (2000). Epstein–Barr Virus Infection. *New England Journal of Medicine*, *343*(7), 481–492. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008173430707>
- Crawford, D. H. (2001). Biology and disease associations of Epstein–Barr virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *356*(1408), 461–473. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0783>
- Cui, X., & Snapper, C. M. (2021). Epstein Barr Virus: Development of Vaccines and Immune Cell Therapy for EBV-Associated Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*, 734471. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734471>
- Damania, B., Kenney, S. C., & Raab-Traub, N. (2022). Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*, *185*(20), 3652–3670.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.026>
- De Paschale, M., & Clerici, P. (2012). Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology*, *1*(1), 31–43.  
<https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.31>
- Delecluse, H. J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J., & Bornkamm, G. W. (1993). Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *Journal of Virology*, *67*(3), 1292–1299.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.67.3.1292-1299.1993>
- Dunmire, S. K., Grimm, J. M., Schmeling, D. O., Balfour, H. H., & Hogquist, K. A. (2015). The Incubation Period of Primary Epstein-Barr Virus Infection: Viral Dynamics and Immunologic Events. *PLOS Pathogens*, *11*(12), e1005286.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005286>

- Fox, C. P., Shannon-Lowe, C., & Rowe, M. (2011). Deciphering the role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of T and NK cell lymphoproliferations. *Herpesviridae*, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-2-8>
- Fukuda, Y., Torii, Y., Iwata, K.-I., Haruta, K., Yamaguchi, M., Suzuki, T., Narita, A., Muramatsu, H., Ogura, Y., Takahashi, Y., Ito, Y., & Kawada, J.-I. (2024). Comparison of Whole Blood and Plasma for Monitoring Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus. *The New Microbiologica*, 47(1), 52–59.
- Gulley, M. L., & Tang, W. (2008). Laboratory Assays for Epstein-Barr Virus-Related Disease. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 10(4), 279–292. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080023>
- Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T., & Morishima, T. (1999). Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus Load by Using a Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(1), 132–136. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.1.132-136.1999>
- Kuri, A., Jacobs, B. M., Vickaryous, N., Pakpoor, J., Middeldorp, J., Giovannoni, G., & Dobson, R. (2020). Epidemiology of Epstein-Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health*, 20(1), 912. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09049-x>
- Law, N., Logan, C., & Taplitz, R. (2024). EBV Reactivation and Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Recipients and Its Impact on HSCT Outcomes. *Viruses*, 16(8), 1294. <https://doi.org/10.3390/v16081294>
- Lunn, R. M., Jahnke, G. D., & Rabkin, C. S. (2017). Tumour virus epidemiology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732), 20160266. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0266>
- Murphy, G., Pfeiffer, R., Camargo, M. C., & Rabkin, C. S. (2009). Meta-analysis Shows That Prevalence of Epstein–Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location. *Gastroenterology*, 137(3), 824–833. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.001>

- Musawi, S., Zalah, A., Aqeel, A., Ibrahim, A. M., Maha, S., Abutawail, M., Garn, F. A., Wasili, E., Shageri, O., Shrefan, Z., Hifthi, R. Y., Khawaji, T., Muhajir, A. A., Klufah, F., Alhazmi, A. H., & Mobarki, M. (2025). Molecular epidemiology and clinical patterns of Epstein–Barr virus infection in Southwestern Saudi Arabia: a 2020–2023 retrospective study. *BMC Infectious Diseases*, *25*(1), 1066. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11407-2>
- Potluri, V. S., Zhang, S., Schaubel, D. E., Shaikhouni, S., Blumberg, E. A., Nasta, S. D., Bloom, R. D., Cruz-Peralta, M., Mehta, R. B., Lavu, N. R., Getachew, B., Tandukar, S., Reese, P. P., & Puttarajappa, C. M. (2025). The Association of Epstein–Barr Virus Donor and Recipient Serostatus With Outcomes After Kidney Transplantation. *Annals of Internal Medicine*, *178*(2), 157–166. <https://doi.org/10.7326/ANNALS-24-00165>
- Preiksaitis, J., Allen, U., Bollard, C. M., Dharnidharka, V. R., Dulek, D. E., Green, M., Martinez, O. M., Metes, D. M., Michaels, M. G., Smets, F., Chinnock, R. E., Comoli, P., Danziger-Isakov, L., Dipchand, A. I., Esquivel, C. O., Ferry, J. A., Gross, T. G., Hayashi, R. J., Höcker, B., ... Maecker-Kolhoff, B. (2024a). The IPTA Nashville Consensus Conference on Post-Transplant lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation in children: III – Consensus guidelines for Epstein-Barr virus load and other biomarker monitoring. *Pediatric Transplantation*, *28*(1). <https://doi.org/10.1111/ptr.14471>
- Ratiu, C., Dufresne, S. F., Thiant, S., & Roy, J. (2024b). Epstein–Barr Virus Monitoring after an Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant: Review of the Recent Data and Current Practices in Canada. *Current Oncology*, *31*(5), 2780–2795. <https://doi.org/10.3390/curroncol31050211>
- Rzepka, M., Depka, D., Gospodarek-Komkowska, E., & Bogiel, T. (2023). Diagnostic Value of Whole-Blood and Plasma Samples in Epstein–Barr Virus Infections. *Diagnostics*, *13*(3), 476. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13030476>

- Thompson, M. P., & Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(3), 803–821. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0670-3>
- Thorley-Lawson, D. A., & Allday, M. J. (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 913–924. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2015>
- Tonoyan, L., Vincent-Bugnas, S., Olivieri, C.-V., & Doglio, A. (2019). New Viral Facets in Oral Diseases: The EBV Paradox. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5861. <https://doi.org/10.3390/ijms20235861>
- Tzellos, S., Correia, P. B., Karstegl, C. E., Cancian, L., Cano-Flanagan, J., McClellan, M. J., West, M. J., & Farrell, P. J. (2014). A Single Amino Acid in EBNA-2 Determines Superior B Lymphoblastoid Cell Line Growth Maintenance by Epstein-Barr Virus Type 1 EBNA-2. *Journal of Virology*, 88(16), 8743–8753. <https://doi.org/10.1128/JVI.01000-14>
- White, R. E., Rämer, P. C., Naresh, K. N., Meixlsperger, S., Pinaud, L., Rooney, C., Savoldo, B., Coutinho, R., Bödör, C., Gribben, J., Ibrahim, H. A., Bower, M., Nourse, J. P., Gandhi, M. K., Middeldorp, J., Cader, F. Z., Murray, P., Münz, C., & Allday, M. J. (2012). EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1487–1502. <https://doi.org/10.1172/JCI58092>
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D., & Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(12), 3806–3810. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.12.3806>
- Yu, H., & Robertson, E. S. (2023). Epstein-Barr Virus History and Pathogenesis. *Viruses*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/v15030714>

## **8. SITOGRAFIA MANUALI:**

[https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030\\_10.pdf](https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030_10.pdf)

[https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030\\_10.pdf](https://www.elitechgroup.com/documentation/wp-content/uploads/sites/30/2022/12/SCH-mINT030_10.pdf)

[https://www.hologic.com/package-inserts/diagnostic-products/panther-fusion-ebv-quant-assay?utm\\_source](https://www.hologic.com/package-inserts/diagnostic-products/panther-fusion-ebv-quant-assay?utm_source)