

Vitassay qPCR

BK & JC

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los virus BK y JC en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of BK Virus and JC Virus in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR BK & JC, permite la detección y diferenciación del Virus BK y/o del Virus JC mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por los virus BK y/o JC.

Referencias

Vitassay qPCR BK & JC 4x8 -well strip, low profile	7041047
Vitassay qPCR BK & JC 4x8-well strip, high profile	7042047

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S047/ 7042S047	BK & JC strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C047	BK & JC Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Los poliomavirus son virus ubicuos, pequeños, DNA, sin envoltura, específicos de especies que pertenecen a la familia *Papovaviridae*. Los dos poliomavirus humanos más conocidos, el virus BK (BKV) y el virus JC (JCV), se describieron por primera vez en la década de 1970.

Infectan a individuos inmunocompetentes sin síntomas específicos. Son capaces de establecer infecciones subclínicas y persistentes y pueden reactivarse tras un período de latencia en caso de inmunosupresión.

La infección primaria con el virus BK y JC generalmente ocurre en la infancia, con un 50% de los niños con seroconversión para el virus BK a los 3-4 años de edad, y para el virus JC a los 10-15 años de edad. La infección primaria suele ser asintomática o cursar con síntomas leves afectando principalmente las vías respiratorias superiores. En la edad adulta, el 80% de las personas han sido infectadas por el virus BK, el virus JC o ambos.

La reactivación de JCV en pacientes inmunocomprometidos puede causar una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), llamada leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), mientras que la reactivación de BKV puede causar cistitis hemorrágica y nefropatía asociada a poliomavirus (PVAN) en pacientes con trasplante renal.

El virus BK puede aislarse tanto en la orina de pacientes sintomáticos como asintomáticos y en plasma. La detección del virus JC se lleva a cabo utilizando muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y plasma.

El método de detección por PCR ha demostrado ser una herramienta de diagnóstico sensible y específica para la detección de los virus BK y JC.

Principio del test

Vitassay qPCR BK & JC se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región diana conservada de los genes *VP1* para Virus BK y *T* para Virus JC. Tras la extracción de DNA, la presencia de los virus BK y/o JC se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR BK & JC, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal Cy5 (Virus BK) y FAM (Virus JC) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA.

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del BK & JC Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade wáter, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en

alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los taponeros suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales Cy5 (Virus BK), FAM (Virus JC) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de Virus BK (Cy5) y Virus JC (FAM).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de Cy5 y FAM.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

Virus JC (FAM)	Virus BK (Cy5)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	JC Virus y BK Virus Positivos
-	-	+	-	+	JC Virus y BK Virus Negativos
+	-	+/-	-	+	JC Virus Positivo y BK Virus Negativo
-	+	+/-	-	+	BK Virus Positivo y JC Virus Negativo
-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los parásitos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Un total de 112 muestras clínicas (orina y plasma) procedentes de diferentes paneles de programas de QCMD fueron analizadas mediante Vitassay qPCR BK & JC.

Vitassay qPCR BK & JC detectó Virus BK en 41 muestras positivas y Virus JC en 38 muestras positivas. Los resultados obtenidos se compararon con los informes finales de dichos programas.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los Virus BK y JC utilizando Vitassay qPCR BK & JC.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes parásitos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de los Virus BK y JC fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.

No se observaron reacciones cruzadas de los Virus BK y JC entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
<i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	HSV-2 MS
<i>Listeria innocua</i> Serotipo 6a/strain CCUG 15531	<i>Candida albicans</i>	HHV6 cepa Z29
<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/strain CCUG 15528	<i>Aspergillus fumigatus</i> pte	HHV6 Tipo A
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotipo 1/2b	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tipo A1	HHV6 Tipo B
<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/Strain CIP 59.53	<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	Varicella-Zoster Virus Ellen
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> Tipo II
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	Hepatitis A
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	<i>Treponema pallidum</i>	Parvovirus
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Epstein-Barr virus	Adenovirus 40
<i>Enterobacter cloacae</i> Serotype Cloaca A	Citomegalovirus cepa AD-169	Adenovirus 41
<i>Enterobacter aerogenes</i> Serotype Cloaca B	HSV-1 cepa MacIntyre	

Reactividad analítica

Vitassay qPCR BK & JC para el Virus BK ha sido evaluado frente a Virus BK Tipo Ib-2 y Virus BK Tipo IV, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR BK & JC para el Virus JC ha sido evaluado frente a Virus JC Tipo 1A y Virus JC Tipo 2B, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR BK & JC, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por los Virus BK y JC. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras de sangre, LCR y orina. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes parásitos, ya sea por muestras que contienen altas

concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR BK & JC allows the detection and differentiation of BK and JC Virus by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of BK and/or JC Virus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR BK & JC 4x8 -well strip, low profile 7041047

Vitassay qPCR BK & JC 4x8-well strip, high profile 7042047

Materials/reagents provided

Code	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S047/ 7042S047	BK & JC strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C047	BK & JC Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yelow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Polyomaviruses are ubiquitous, small, non-enveloped DNA, species-specific viruses which belong to the family *Papovaviridae*. The two most commonly known human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV), were firstly described in the 1970s.

Human polyomavirus viruses, infect immunocompetent individuals without specific signs or symptoms. They are able to establish subclinical and persistent infections and may reactivate from latency in case of immunosuppression.

Primary infection with both BK and JC virus typically occurs in childhood, with 50% of children having seroconversion for BK virus by 3-4 years of age, and for JC virus by 10-15 years of age. Primary infection is usually asymptomatic or associated with mild upper respiratory symptoms. By adulthood, 80% of people have been infected by either BK virus, JC virus, or both. [1]

JCV reactivation in immunocompromised patients may cause a demyelinating disease of the central nervous system (CNS), named progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), whereas BKV reactivation may cause hemorrhagic cystitis and polyomavirus associated nephropathy (PVAN) in renal transplant patients.

BK virus can be isolated in the urine of both symptomatic and asymptomatic patients and plasma. The detection of JC virus is carried out using cerebrospinal fluid (CSF) samples and plasma.

PCR Detection method has demonstrated to be a sensitive and specific diagnosis tool for the detection of BK Virus and JC Virus.

Principle of the test

Vitassay qPCR BK & JC test is based on the real-time amplification of a conserved region of the *VP1* gene for BK Virus and *T* gene for JC Virus. After DNA isolation, the presence of BK Virus and JC Virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR BK & JC test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the BK Virus DNA target sequence is detected through the Cy5 channel and JC Virus DNA in FAM channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex II).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized BK & JC Positive Control (red tube) with the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the Cy5 (BK Virus), FAM (JC Virus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

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

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for Cy5 (BK Virus) and FAM (JC Virus), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in Cy5 and FAM which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

JC Virus (FAM)	BK Virus (Cy5)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	JC Virus and BK Virus Positives
-	-	+	-	+	JC Virus and BK Virus Negative
+	-	+/-	-	+	JC Virus Positive and BK Virus Negative
-	+	+/-	-	+	BK Virus Positive and JC Virus Negative
-	-	-	-	+	Invalid
+	+	+	+	-	Invalid

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A total of 112 clinical samples (urine and plasma) from different panels of QCMD programs were analyzed using Vitassay qPCR BK & JC.

Vitassay qPCR BK & JC detected BK virus in 41 positive samples and JC virus in 38 positive samples. The results indicated were compared with the final reports of these programs.

The results show a high sensitivity and specificity to detect BK and JC Viruses using Vitassay qPCR BK & JC.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of BK and JC Viruses templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for BK and JC Viruses was tested within the panel of different microorganisms.

No cross-reactivity of BK and JC Viruses was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
<i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	HSV-2 MS
<i>Listeria innocua</i> Serotype 6a/strain CCUG 15531	<i>Candida albicans</i>	HHV6 strain Z29
<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/strain CCUG 15528	<i>Aspergillus fumigatus</i> pte	HHV6 Type A
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 1/2b	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1	HHV6 Type B
<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/Strain CIP 59.53	<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	Varicella-Zoster Virus Ellen
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> Type II
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	Hepatitis A
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	<i>Treponema pallidum</i>	Parvovirus
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Epstein-Barr virus	Adenovirus 40
<i>Enterobacter cloacae</i> Serotype Cloaca A	Citomegalovirus strain AD-169	Adenovirus 41
<i>Enterobacter aerogenes</i> Serotype Cloaca B	HSV-1 strain MacIntyre	

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR BK & JC for BK Virus was evaluated against BK Virus Type Ib-2 and BK Virus Type IV, showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR BK & JC for JC Virus was evaluated against JC Virus Type 1A and JC Virus Type 2B, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR BK & JC has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of BK and JC Viruses infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with human urine, CSF and plasma samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different parasites, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

High profile Block Thermocyclers
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. Michelle Pinto, Simon Dobson. BK and JC virus: A review. *Journal of Infection* (2014) 68, 52-58.
2. Malihe Fathi Haghghi, Noorossadat Seyyedi, Ali Farhadi, Farahnaz Zare, Leila Kasraian, Gholam Reza Refiei Dehbidi, Reza Ranjbaran, Abbas Behzad-Behbahani. Polyomaviruses BK and JC DNA infection in peripheral blood cells from blood donors. *BRAZ J INFECT DIS* 2019;23(1):22-26.
3. Deirdre Sawinski and Simin Goral. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant* (2015) 30: 209–217.

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number

