

Vitassay qPCR

BK

PCR en tiempo real para la identificación y detección cuantitativa del virus BK en muestras clínicas humanas.

Real-time PCR kit for the identification and quantitative detection of BK virus in human clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR BK permite la identificación y detección cuantitativa de DNA del virus BK mediante PCR en tiempo real en muestras clínicas humanas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por BK virus en pacientes trasplantados junto con los datos clínicos del paciente, los factores de riesgo epidemiológico, y los resultados de otras pruebas de laboratorio. Este producto también puede usarse para evaluar la necesidad y monitorizar el tratamiento de la infección en estos pacientes.

Referencias

Vitassay qPCR BK 4x8-well strip, low profile	7041072
Vitassay qPCR BK 4x8-well strip, high profile	7042072

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S072/ 7042S072	BK strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7Q0721- 7Q0725	BK Quantitative standards	rojo	5 viales (1 vial por concentración)
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.
- Los BK quantitative standards resuspendidos son estables a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para dispensar hasta 96 pocillos, pero deben almacenarse a 4°C hasta un máximo de 5 meses, o para períodos de mayor duración a -20° C o menos. 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

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo
- Estándar Internacional de la OMS “1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code: 14/212)”, u otro material de referencia (opcional, en caso de utilizar un flujo de trabajo diferente y el usuario final necesite calcular su propio factor de conversión).

Resumen

Los poliomavirus BK son virus circulares de ADN de doble cadena de la familia *Polyomaviridae* y del género *Betapolyomavirus*. Los virus BK y JC son los más representativos de los poliomavirus. El poliomavirus BK puede dividirse en seis subtipos o genotipos. El genotipo I resulta ser el más frecuente en todo el mundo (80%), seguido del genotipo IV (15%). Más del 80% de los adultos son seropositivos al poliomavirus BK, y la infección suele adquirirse durante la infancia. Esto se debe a que el poliomavirus BK permanece latente en el sistema genitourinario, principalmente en las células epiteliales uroteliales y tubulares renales.

Se cree que el modo de transmisión es por contacto de persona a persona y a través de superficies, alimentos y agua contaminados. La infección primaria suele ser asintomática, y si hay algunos síntomas, son leves, como fiebre, síntomas respiratorios superiores y cistitis transitoria. La leucoencefalopatía multifocal progresiva, la meningitis y la encefalitis, la retinitis, la neumonitis, el cáncer de próstata, la enfermedad de las glándulas salivales asociada al VIH y carcinoma renal son patologías menos comunes asociadas al virus BK. En el caso de individuos inmunodeprimidos, el virus BK puede asociarse a nefropatía, estenosis ureteral, cistitis hemorrágica de aparición tardía e incluso cáncer de vejiga. El espectro renal comienza con la viruria y termina con el fallo del injerto. El poliomavirus BK también podría causar cistitis hemorrágica en pacientes con trasplante alogénico de células madre.

A pesar de las extensas investigaciones, los factores de riesgo de la nefropatía por poliomavirus BK siguen siendo controvertidos. El sexo masculino y la edad extrema, entre otros, se han sugerido como posibles factores de riesgo. La creencia generalizada es que el poliomavirus BK infecta a las personas inmunodeprimidas. En los receptores de trasplantes de médula ósea, el poliomavirus BK es prevalente, además el poliomavirus

BK afecta también a otros trasplantes de órganos sólidos no renales, como los de corazón, hígado y pulmón.

Dado que las infecciones por el virus BK se desarrollan de forma asintomática, la monitorización periódica de la carga viral mediante PCR cuantitativa es la técnica más eficaz para el seguimiento de la viruria y la viremia, así como para el diagnóstico y el tratamiento precoces de la nefropatía por BK. Además, la medición del ARNm del virus BK permite detectar la transcripción viral en curso.

Principio del test

Vitassay qPCR BK se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *vp1*. Tras la extracción de DNA, la presencia de los virus se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR BK se trata de una prueba lista 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 endógeno permite el control del proceso de extracción y la detección de una posible reacción de inhibición. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como Control Interno Endógeno (CI) (gen *RNase P* presente en el DNA humano) que se espera que esté presente en todas las células humanas nucleadas. Tras la reacción de amplificación el virus BK se detecta en el canal FAM, y el control interno endógeno en el canal HEX, VIC o JOE (dependiendo del equipo utilizado).

Además, este kit contiene 5 viales liofilizados con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico del virus BK (BK Quantitative Standards) para la cuantificación del DNA de BK en muestras clínicas. Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code: 14/212)", para asegurar la calidad de los resultados y la comparativa con los procedentes de otros laboratorios.

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- 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 o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- 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. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- No mezclar BK Quantitative standards de diferentes kits y/o lotes. Cada set de estándares cuantitativos ha sido validado para cada lote de mezcla de reacción con la que es proporcionado.
- Un pipeteo impreciso o una mala praxis que conlleve la dispensación de volúmenes inexactos puede resultar en una cuantificación errónea. Use

micropipetas calibradas y puntas apropiadas y siga el procedimiento recogido en estas instrucciones de uso.

- La curva estándar debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas, y debería de generarse añadiendo cada BK Quantitative Standard por triplicado.
- En caso de utilizar el **Estándar Internacional de la OMS** “1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code: 14/212)”, debe tener en cuenta que **la estabilidad de este estándar puede verse afectada debido a determinadas prácticas**. Se recomienda reconstituirlo y hacer alícuotas de un único uso manteniendo la cadena de frío ya que los ciclos de congelación-descongelación pueden afectar la integridad del material de referencia.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR BK ha sido testado en muestras humanas de EDTA-plasma. El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medios de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Los especímenes deben transportarse a temperatura ambiente durante un máximo de 2 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 2 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse congeladas a -20°C o menos (a -80°C idealmente) para su conservación. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar la siguiente guía:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.

Extracción de DNA

Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Vitassay qPCR BK ha sido validado con muestras de EDTA-plasma utilizando el siguiente flujo de trabajo de referencia (A) que es el aplicado en la validación analítica y clínica, y el que sirve de base para la interpretación de los resultados:

MagDEA Dx SV kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.) y CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Flujo de trabajo de referencia para el cálculo del Factor de Conversión (FC)

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

El factor de conversión para el flujo de trabajo de referencia se calculó empleando el Estándar Internacional de la OMS “1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code: 14/212)”, estableciéndose en un valor de **0,420 IU/copias**.

$$\text{IU/mL} = \text{copias/mL} \times 0,420$$

Por ejemplo, una carga viral establecida a 10.000 copias/mL en una muestra se corresponde con 4.200 IU/mL.

Otros flujos de trabajo fueron validados con Vitassay qPCR BK, aunque no se consideren flujos de trabajo de referencia:

Flujo de trabajo	Extracción	Amplificación	FC (solo aplicables con muestras de EDTA-plasma)
B	MagDEA Dx SV kit - magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	NEOS-96 Real-Time PCR System (Linear)	FC = 0.50 IU/copias
C	MagDEA Dx SV kit - magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	FC = 0.54 IU/copias
D	Maxwell® RSC 16 Viral TNA/ Maxwell® RSC (Promega)	CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	FC = 0.71 IU/copias
E	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)	CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	FC = 0.925 IU/copias

Cada laboratorio debe establecer su propio factor de conversión. Si se establece otro flujo de trabajo, entonces el valor FC debe ser calculado por el usuario.

Preparación de la curva estándar

Este kit contiene 5 viales liofilizados (7Q0721-7Q0725) con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico del virus BK (BK Quantitative Standards) para la cuantificación del DNA viral de BK en muestras clínicas. BK Quantitative Standards pueden usarse para generar una curva estándar con la que determinar la cantidad de DNA viral de BK virus de una muestra en IU/mL.

Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS “1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code: 14/212)”, asegurando así la calidad de los resultados y la comparativa con los procedentes de otros laboratorios. El panel liofilizado de BK Quantitative Standards del kit está listo para su uso tras su reconstitución con PCR grade water, y los BK Quantitative Standards tienen las siguientes concentraciones*:

BK Quantitative Standard	Concentración (copias/mL)
7Q0721	10 ⁷
7Q0722	10 ⁶
7Q0723	10 ⁵
7Q0724	10 ⁴
7Q0725	10 ³

Para preparar la curva estándar del ensayo cuantitativo debe reconstituir el contenido liofilizado de cada BK Quantitative Standard (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco), cambiando la punta de la micropipeta entre viales. Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex (20 seg).

Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlos a -20°C.

Los BK Quantitative Standards contienen 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. Es recomendable que en el momento de dispensar las muestras los BK Quantitative Standards estén ya rehidratados y vortexeados.

* La información referente a la concentración de cada BK Quantitative Standard está referida en la etiqueta del tubo correspondiente. Para más detalles, solicite y consulte en el “Certificado de análisis” el número de lote y el número de copias de DNA de BK Quantitative Standard (no incluido).

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (al menos una réplica de cada BK Quantitative Standard y una réplica del control negativo en cada ejecución para cada uno de los ensayos). *La curva estándar debería generarse añadiendo cada BK Quantitative Standard por triplicado, al igual que debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas.
- 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) o de cada BK Quantitative Standard reconstituido (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones 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
Activación de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (virus BK) y HEX, JOE o VIC (Control Interno Endógeno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado.

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación y el procedimiento de extracción compruebe la emisión de señal de control interno endógeno (CI).

Utilice la curva de amplificación de los BK Quantitative Standards como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de *threshold* para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

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

BK Quantitative Standards

Los BK Quantitative Standards incluidos en cada serie deben mostrar una curva de amplificación de FAM.

Control negativo

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

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en los pocillos de los BK Quantitative Standards para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

El control interno endógeno (CI) debería mostrar ausencia de señal en los pocillos BK Quantitative Standards y control negativo. En el caso del control negativo, es posible que aparezcan amplificaciones no específicas en valores tardíos de Ct ($C_t > 35$) debido a la

manipulación humana del proceso, ya que el gen de la *RNasa P* humana es un gen humano *housekeeping* que se espera que esté presente en todas las células humanas nucleadas.

A partir de las diluciones seriadas de los BK Quantitative Standards se puede generar la curva estándar utilizando la fórmula:

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

Donde: Ct = ciclo umbral
m = pendiente
Q = concentración
b = intersección

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

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

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

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

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

Eficiencia: 80-120%.

R ² : ≥ 0,98

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

Una vez validado el resultado de los controles, en el caso de que el flujo de trabajo utilizado haya sido el de referencia con muestras de EDTA-plasma extraídas con MagDEA Dx SV Kit/magLEAD® 12 gC instrument (Precision System Science Co.) y amplificadas con CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

Virus BK (FAM)	Control Interno Endógeno (HEX)	Interpretación	
< 102,31 IU/mL	+/- ¹	Válido	Muestra virus BK positiva no cuantificable
102,31 a 420 IU/mL	+/- ¹	Válido	Muestra virus BK positiva cuantificable mediante extrapolación ²
420 a 4,2 x 10 ⁶ IU/mL	+/- ¹	Válido	Muestra virus BK positiva cuantificable en el rango de cuantificación
> 4,2 x 10 ⁶ IU/mL	+/- ¹	Válido	Muestra virus BK positiva cuantificable mediante extrapolación ³
-	+ ⁴	Válido	Diana no detectada ⁴
-	- ⁴	Inválido	Test Fallido ⁴

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (No señal)

¹ En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. El control interno endógeno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

² Un resultado positivo para el gen diana del BK virus por debajo del rango de cuantificación permite una cuantificación de la carga viral de BK virus mediante extrapolación de la curva estándar, pero los resultados pueden no ser precisos.

³ Un resultado positivo para el gen diana de BK virus por encima del rango de cuantificación permite una cuantificación de la carga viral de BK virus mediante extrapolación de la curva estándar, pero los resultados pueden no ser precisos. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100.

⁴ En el caso de que la detección de las regiones diana del virus BK resulte negativa, el CI endógeno debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤35. El valor de Ct podría ser muy variable debido a que el Control interno endógeno es un gen humano *housekeeping* que debería estar presente en todas las células nucleadas humanas en la muestra original. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control interno endógeno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a

testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada).

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

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

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

El rendimiento clínico de Vitassay qPCR BK se evaluó utilizando restos de plasma recogidos en tubos con EDTA de pacientes con síntomas compatibles de infección por el virus BK. Tras el método de extracción y el análisis con el método de rutina, que es un ensayo comercial de PCR en tiempo real CE-IVD, se cuantificó el ADN del virus BK utilizando los estándares de cuantificación proporcionados en el kit y los resultados se dieron mediante el software correspondiente. Del total de muestras recogidas, 93 muestras pudieron ser cuantificadas, y fueron posteriormente analizadas con el kit Vitassay qPCR BK. Se calculó la correlación entre los resultados obtenidos con los métodos de referencia y el ensayo Vitassay mediante el análisis estadístico de correlación de rangos de Spearman, mostrando un fuerte coeficiente de correlación ($r_s=0,987$; $p<0,001$).

También se realizó un análisis comparativo cualitativo, utilizando 161 restos de muestras, que indicó un valor de sensibilidad de 0,99 (0,96-0,99) y un valor de especificidad de 1(0,96-1). En conclusión, Vitassay qPCR BK muestra una gran consistencia para detectar y cuantificar la presencia del virus BK en muestras clínicas.

Rango lineal

La linealidad de Vitassay qPCR BK se estableció utilizando DNA sintético y específico del virus BK, y posteriormente fue confirmada con el uso de material de referencia en muestras de plasma.

En primer lugar, se realizó la amplificación de diluciones seriadas 1:10 que contenían una concentración conocida (rango entre 10^7 a 10^1 copias/ μ l) de DNA específico del virus BK (7Q072), obteniéndose los valores Ct de todas las diluciones testadas mediante el

equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM), obteniéndose los siguientes datos:

$$E = 83.3 \% ; R^2 = 0.999 ; \text{Slope} = -3.799 \text{ y } -\text{int} = 40.966$$

En segundo lugar, el rango lineal fue confirmado utilizando muestras negativas de plasma contaminadas con una concentración conocida de material de referencia del virus BK (“1st WHO IS for BK Virus DNA (NIBSC code 14/212)”) analizadas mediante el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).

Vitassay qPCR BK obtuvo amplificaciones en todas las diluciones testadas. El nivel de fluorescencia final se mantuvo, y no se observaron cruce de canales. El ensayo con el Estándar Internacional de la OMS (“1st WHO IS for BK Virus DNA”) mostró resultados significativos:

$$Y = 3.6868x + 46.672 ; R^2 = 0.9961$$

Sensibilidad analítica

Para la determinación del LoD del kit Vitassay qPCR BK, se realizaron diluciones seriadas del Estándar Internacional de la OMS (“1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code: 14/212)”) y se estableció una concentración LoD tentativa usando el material de referencia NATrol™ BK Virus External Run Controls (Zeptomatrix, Ref: NATBK-ERCL).

La extracción de 71 muestras negativas de plasma por nivel de concentración preparadas con el Estándar Internacional de la OMS y 106 réplicas de la muestra negativa de plasma preparada con el material de referencia de NATrol™ se realizó con MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y su amplificación se llevó a cabo en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Vitassay qPCR BK presentó un límite de detección de 243,6 copias/mL, equivalente a 102,31 IU/mL para el virus BK, utilizando el estándar internacional de la OMS y Probit Model para el análisis de los resultados, con una tasa de positividad $\geq 95\%$.

Muestras con 1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code 14/212)¹				
Concentración virus BK (copias/mL)	Concentración virus BK (IU/mL)	Nº de réplicas	Nº de réplicas positivas	Tasa de acierto (%)
1000	420	71	71	100
800	336	71	71	100
600	252	71	70	98.6
400	168	71	69	97.2
200	84	71	68	95.8
50	21	71	37	52.1

Con el uso del material de referencia de NATrol™ BK Virus External Run Controls, Vitassay qPCR BK presentó un límite de detección de 100 copias/mL, equivalente a 36,4 IU/mL para el virus BK (tasa de positividad \geq 95%). IU = International Units.

Muestras con NATrol™ BK Virus External Run Controls (Zeptomatrix, Ref: NATBK-ERCL)				
Concentración del virus BK (copias/mL)	Concentración del virus BK (IU/ml)	Nº de réplicas	Nº de réplicas positivas	Tasa de acierto (%)
100	36.4	106	106	100

Límite inferior de cuantificación

El límite inferior de cuantificación (LLoQ) es el valor de la concentración más baja a la que el virus BK se puede cuantificar y a la que el error total cumple el criterio de aceptación de ser menor del 40%. El LLoQ para el virus BK se estableció en 1000 copias/mL, equivalente a 420 IU/mL.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección del virus BK fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada

Parvovirus B19 genotipos 1, 2 y 3a	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> cepa 3D7	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Herpes simplex virus 1 (HSV-1) cepa MacIntyre	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> tipo A1 y g885652	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Herpes simplex virus 2 (HSV-2) cepa MS	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) cepa Z29 y tipos A y B	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
JC virus tipos 1A y 2B	-	Virus Hepatitis A	-	<i>Toxoplasma gondii</i> tipo II	-
<i>Candida albicans</i>	-	Citomegalovirus cepa AD-169	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo <i>Cloaca B</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serotipo 1/2b y serovar 4b	-	Varicella-Zoster Virus cepa Ellen	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo <i>Cloaca A</i>	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Epstein-Barr virus	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	Adenovirus tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-
<i>Escherichia coli</i> cepa 0.1285;O18:H7:K1	-				

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR BK para el virus BK se evaluó frente a DNA de virus BK, subtipos 1b-1 y 1b-2, y subtipo IV como referencias, mostrando resultados positivos.

Limitaciones

- 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 validado con DNA extraído de muestras de EDTA-plasma. 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.
- Se puede detectar niveles de copias molde diana por debajo del límite de cuantificación, pero los resultados pueden no ser cuantificables con precisión.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por los BK Quantitative Standards durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores

de procedimiento (incluido la extracción de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) mutaciones potenciales de las secuencias diana del genoma del virus BK identificadas por este test que pueden provocar que el DNA sea indetectable; e) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; f) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.

- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden dar lugar a valores imprecisos de DNA viral (pérdida de carga viral), que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y/o manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido la extracción de DNA); c) incorrecto mantenimiento de equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas y sistemas de extracción/amplificación; d) usar micropipetas sin calibrar y/o puntas inadecuadas; e) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del DNA viral puede no indicar la presencia de virus viables y/o infecciosos o que estos virus sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por el virus BK, y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar el virus.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con el virus BK, y se han descartado otras enfermedades relacionadas con la inmunodepresión, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar por múltiples factores como: equipo de PCR, sistema de extracción, tipo de muestra, y su tratamiento previo, entre otros.
- El factor de conversión (FC) es dependiente del tipo de muestra testada y del flujo de trabajo utilizado. Por este motivo, cada tipo de muestra-flujo de trabajo (extracción-amplificación) requiere del cálculo de su propio FC.

Intended use

Vitassay qPCR BK allows the identification and quantitative detection of DNA from BK virus by Real-Time PCR in human clinical samples. This product is intended to aid in the diagnosis of BK virus infections in transplant patients, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes. The test can be used to assess the need and monitoring the treatment of the infection in these patients.

References

Vitassay qPCR BK 4x8-well strip, low profile	7041072
Vitassay qPCR BK 4x8-well strip, high profile	7042072

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S072/ 7042S072	BK strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7Q0721- 7Q0725	BK Quantitative standards	red	5 vials (1 vial per concentration)
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended BK Quantitative Standards are stable at room temperature during the time needed to dispense 96-wells, but they should be stored at 4 °C for up to 5 months, or at -20°C or lower for longer period. 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

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- 1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code 14/212), or another reference material (optional, when using a different workflow and in case the final user needs to calculate its own conversion factor).

Summary

BK polyomavirus is a circular, double-stranded DNA virus from the *Polyomaviridae* family and *Betapolyomavirus* genus. BK and JC virus are the more representatives of polyomavirus. BK polyomavirus can be divided into six subtypes or genotypes. Genotype I is the most frequent worldwide (80%), followed by Genotype IV (15%). More than 80% of adults are seropositive for BK polyomavirus, and infection usually is acquired during childhood. This is because BK polyomavirus remains latent in genitourinary system, mostly in urothelial and renal tubular epithelial cells.

The mode of transmission is thought to be by person to person contact and via contaminated surfaces, food, and water. Primary infection is usually asymptomatic, and if there are some symptoms, they are mild such as fever, upper respiratory symptoms, and transient cystitis. A progressive multifocal leukoencephalopathy, meningitis and encephalitis, retinitis, pneumonitis, prostate cancer, HIV-associated salivary gland disease, and renal carcinoma are pathologies less common associated with BK virus. In the case of immunocompromised individuals, BK virus can be associated with nephropathy, ureteral stenosis, late-onset hemorrhagic cystitis and even bladder cancer. The renal spectrum begins with viruria and ends with graft failure. BK polyomavirus could also cause hemorrhagic cystitis in patients with allogeneic stem cell transplantation.

Regardless extensive research, the risk factors for BK polyomavirus nephropathy remain controversial. Male gender and extremes of age, among other things, have been suggested as possible risk factors. The widely held belief is that BK polyomavirus infects people who are immunocompromised. In bone marrow transplant recipients, the BK polyomavirus is prevalent, also BK polyomavirus affects other non-kidney solid organ transplants such as heart, liver, and lung.

As BK virus infections develops asymptotically, regular monitoring of the viral load through quantitative PCR is the most effective technique for monitoring viruria and viraemia, as well as early diagnosis and treatment of BK nephropathy. Furthermore, measuring BKV mRNA allows for the detection of ongoing viral transcription.

Principle of the test

Vitassay qPCR BK is based on real-time amplification of a conserved region of the *vp1* gene. After DNA extraction, the viruses presence is detected by an increase in fluorescence observed during the reaction, following hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect the accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to extend the primers, the probe is hydrolysed by its 5'-3' exonuclease activity resulting in spatial separation of the fluorophore and the quencher. The resulting increase in fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR BK is a ready-to-use test that contains in each well all the necessary reagents in a stabilised format to perform real-time PCR. In addition, an endogenous internal control allows the extraction process control and the detection of a possible inhibition reaction. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous internal control (IC) (*RNase P* gene present in human DNA) that is expected to be present in all nucleated human cells. After the amplification reaction, the BK virus is detected in the FAM channel and the Endogenous Internal control (IC) is detected on HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used).

In addition, this kit contains 5 lyophilized vials with different standardized concentrations of BK virus specific DNA (BK Quantitative Standards) for the quantification of BK virus DNA in clinical samples. These quantitative standards are calibrated against the 1st WHO International Standard for BK virus DNA (NIBSC code: 14/212), ensuring the quality of the results and the comparison with results from other laboratories.

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- 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 is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.

- 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. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Do not mix BK Quantitative Standards from different kits and/or lots. Each quantitative standard set has been validated for each lot of master mix with which it is supplied.
- Inaccurate volumes due to imprecise pipetting or malpractices may result in an erroneous quantification. Use calibrated micropipettes and proper tips and follow the test procedure of this instructions of use.
- Standard curve should be included in the same run of samples to be quantify and should be generated by running each BK Quantitative Standard in triplicate.
- In case of using **1st WHO International Standard for BK Virus DNA** (NIBSC code 14/212), note that **this standard stability can be affected by some practices**. It is recommended to reconstitute the standard and prepared aliquots for single use only by maintaining the cold chain since freeze-thawing cycles can affect the reference material integrity.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR BK has been tested on human EDTA-plasma samples. Other sample types should be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at room temperature for up to 2 hours. For long term transport (more than 2 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. The samples can be stored frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally) for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guideline:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.

DNA extraction

For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. Vitassay qPCR BK has been validated with EDTA-plasma samples using the following reference workflow (A), which is the one applied in the analytical and clinical validation, and the one that serves as the basis for the interpretation of results:

MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Reference workflow for Conversion Factor (CF) calculation

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

The conversion factor value for the reference workflow was calculated using the 1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code: 14/212) and established at **0.420 IU/copies**.

IU/mL = copies/mL x 0.420

For instance, a viral load determined at 10,000 copies/mL in a sample would correspond to 4,200 IU/mL.

Other workflows were validated using Vitassay qPCR BK, even if they are not considered reference workflows:

Workflow	Extraction	Amplification	CF (only applicable with EDTA-plasma samples)
B	MagDEA Dx SV kit - magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	NEOS-96 Real-Time PCR System (Linear)	CF = 0.50 IU/copies
C	MagDEA Dx SV kit - magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	CF = 0.54 IU/copies
D	Maxwell® RSC 16 Viral TNA/ Maxwell® RSC (Promega)	CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	CF = 0.71 IU/copies
E	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)	CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	CF = 0.925 IU/copies

Each laboratory must establish its own conversion factor. If another workflow is set, then the CF value must be calculated by the user.

Standard curve preparation

This kit contains 5 lyophilized vials (7Q0721-7Q0725) with different standardized concentrations of BK virus specific DNA (BK Quantitative Standards) for the quantification of BK virus viral DNA in clinical samples. BK Quantitative Standards can be used to generate a standard curve with which to determine the amount of BK virus viral DNA in a sample in IU/mL.*

These Quantitative Standards were calibrated against the 1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code: 14/212), thus ensuring the results quality and comparison with those from other laboratories. The lyophilized BK Quantitative Standards panel of

Vitassay qPCR BK are ready to use after reconstitution with PCR grade water, and the BK Quantitative Standards have the following concentrations:

BK Quantitative Standard	Concentration (copies/mL)
7Q0721	10^7
7Q0722	10^6
7Q0723	10^5
7Q0724	10^4
7Q0725	10^3

To prepare the standard curve to perform a quantitative assay, reconstitute each lyophilized BK Quantitative Standard (red tube) with 100 μ L of PCR grade water (white tube), changing the micropipette tip between vials. To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly (20 sec).

After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

BK Quantitative Standards 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 and samples. It is recommended that the BK Quantitative Standards be rehydrated and vortexed at the time of dispensing the samples.

* The concentration of each BK Quantitative Standard is indicated on the corresponding tube label. For more information, please request and refer to the 'Certificate of Analysis' for the lot number and DNA copy number of the BK Quantitative Standard (not included).

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that at least one replicate of each BK Quantitative Standard and one replicate of negative control must be included in each run for each assay. *The standard curve should be generated by adding each BK Quantitative Standard in triplicate and should be included on the same run as the samples to be quantified.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 μ L of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 μ L of DNA sample, negative control (yellow tube) or each reconstituted BK Quantitative Standard (red tube) and add them into the corresponding wells.
- 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
Polymerase activation	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 FAM (BK virus), and HEX, JOE, or VIC (Endogenous Internal Control). Depending on the equipment used select the proper detection channel.

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, and the extraction procedure check the endogenous internal control (IC) signal emission.

Use the BK Quantitative Standards amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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

BK Quantitative Standards

The BK Quantitative Standards included in each run should show an amplification curve in FAM channel, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence in FAM, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the BK Quantitative Standards for any channel. The assay should be repeated.

The endogenous internal control (IC) should show no signal in the BK Quantitative Standards and negative control wells. In Negative Control, it is possible that non-specific amplifications in late Ct values (Ct >35) may appear due to human manipulation of the process, since human *RNAse P* gene is a human housekeeping gene that is expected to be present in all nucleated human cells.

From the BK Quantitative Standards dilution series, a standard curve for quantitative analysis can be generated using the formula:

$Ct = m \log(Q) + b$	Where:	Ct = Threshold Cycle
		m = Slope
		Q = Concentration
		b = Intercept

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

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

The obtained quantification results are obtained in the concentration units of the calibration set.

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

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

Efficiency: 80-120%.
R ² : ≥ 0,98

The concentration of the "Positive Sample" refers to the concentration of the eluted DNA after extraction, not of the original clinical sample. **To determine the concentration of the original sample, take into account the dilutions corresponding to the extraction and PCR preparation.**

Once the controls results have been validated, in case the workflow used was the reference workflow with EDTA-plasma samples extracted with MagDEA Dx SV Kit/magLEAD® 12 gC instrument (Precision System Science Co.) and amplified with CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), use the following table to analyze the samples results:

BK Virus (FAM)	Endogenous Internal Control (HEX)	Interpretation	
< 102,31 IU/mL	+/- ¹	Valid	Non-quantifiable BK Virus positive sample
102,31 a 420 IU/mL	+/- ¹	Valid	Quantifiable BK Virus positive sample by extrapolation ²
420 a 4,2 x 10 ⁶ IU/mL	+/- ¹	Valid	Quantifiable BK Virus positive sample in the quantification range
> 4,2 x 10 ⁶ IU/mL	+/- ¹	Valid	Quantifiable BK Virus positive sample by extrapolation ³
-	+ ⁴	Valid	Target not detected⁴
-	- ⁴	Invalid	Test Failed⁴

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

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

¹Sometimes, the Endogenous Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Endogenous Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

²BK virus target gene positive below the quantification range let quantification of BK virus viral load by extrapolation of the standard curve, but results could not be accurate.

³BK virus target gene positive above the quantification range let quantification of BK virus viral load by extrapolation of the standard curve, but results could not be accurate. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100.

⁴In the case of negative BK virus target genes detection, endogenous IC must show an amplification signal with Ct ≤35. The Ct value could be very variable due to the Endogenous Internal Control is a human *housekeeping* gene that should be present in all human nucleated cells in the original sample. If there is a signal' absence or Ct value > 35 of the Endogenous Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence

intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Endogenous Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a negative control and BK Quantitative Standards must be included in each assay to interpret and quantify the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

Vitassay qPCR BK kit's clinical performance was assessed using plasma leftovers collected in EDTA-containing tubes from patients with compatible symptoms of BK virus infection. After the extraction method and the analysis with the routine method, which is a commercial CE-IVD real-time PCR assay, the BK virus DNA was quantitated using the quantification standards providing in the kit and results was given by the corresponding software. Of the total collected samples, 93 samples could be quantifiable, and they were later analysed with Vitassay qPCR BK and correlation between the results obtained with the reference methods and Vitassay assay were calculated using the Spearman's rank correlation statistical analysis, showing a strong coefficient of correlation ($r_s=0.987$; $p<0.001$).

A qualitative comparative analysis, using 161 specimen remnants, was also carried out, indicating a sensitivity value of 0,99 (0,96-0,99) and a specificity value of 1(0,96-1). In conclusion, Vitassay qPCR BK shows a great consistency to detect and quantify the BK virus presence in clinical samples.

Linear range

The Vitassay qPCR BK kit's linearity was determined using specific and synthetic DNA belonging to BK virus, and further was confirmed with the use of reference material in plasma samples.

In the first place, a series of ten-fold dilutions containing a known concentration (ranging from 10^7 to 10^1 copies/ μ L) of specific BK virus DNA (7Q072) was amplified, and Ct values in all dilution tested were obtained using CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (FAM channel), and the following data were obtained:

$$E = 83.3 \% ; R^2 = 0.999 ; \text{Slope} = -3.799 \text{ and } -\text{int} = 40.966$$

In the second place, linear range was further confirmed using negative plasma samples spiked with a known concentration of BK virus reference material (1st WHO IS for BK Virus DNA (NIBSC code 14/212) using CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (FAM channel).

Vitassay qPCR BK obtained amplifications in all dilutions tested. End-point fluorescence level was maintained, and no crosstalk was observed. The assays with 1st WHO IS for BK Virus DNA showed statistical significance:

$$Y = 3.6868x + 46.672 ; R^2 = 0.9961$$

Analytical sensitivity

For the Vitassay qPCR BK LoD determination, a dilution series of the 1st WHO International Standard for BK Virus DNA (NIBSC code 14/212) and a tentative LoD concentration of NATtrol™ BK Virus External Run Controls (Zeptometrix, Ref: NATBK-ERCL) were set up.

The extraction of 71 negative plasma samples per concentration level of 1st WHO IS for BK Virus DNA reference material and 106 negative plasma samples replicates of the NATtrol™ BK Virus External Run Controls reference material was performed with the MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and their amplification was carried out in the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Vitassay qPCR BK kit showed a detection limit of 243.6 copies/mL, equivalent to 102.31 IU/mL for BK virus (positive rate ≥ 95%) using the 1st WHO IS BK Virus DNA (NIBSC code 14/212) and Probit Model to analyze the results.

Samples with 1 st WHO IS BK Virus DNA (NIBSC code 14/212)				
BK virus concentration (copies/mL)	BK virus concentration (IU/ml)	Nº of replicates	Nº of positive replicates	Hit rate (%)
1000	420	71	71	100
800	336	71	71	100
600	252	71	70	98.6
400	168	71	69	97.2
200	84	71	68	95.8
50	21	71	37	52.1

Vitassay qPCR BK showed a detection limit of 100 copies/mL, equivalent to 36.4 IU/mL for BK virus (positive rate $\geq 95\%$) using NATrol™ BK Virus External Run Controls reference material. IU = International Units.

Samples with NATrol™ BK Virus External Run Controls (Zeptomatrix, Ref: NATBK-ERCL)				
BK virus concentration (copies/mL)	BK virus concentration (IU/ml)	Nº of replicates	Nº of positive replicates	Hit rate (%)
100	36.4	106	106	100

Lower Limit of Quantification

The lower limit of quantification (LLoQ) is the lowest concentration value that BK virus can be quantified and at which the total error meets the acceptance criterium of being below 40%. The LLoQ for BK virus was determined to be 1000 copies/mL, equivalent to 420 IU/mL.

Analytical specificity

The analytical specificity for BK virus detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed with any of the species.

Cross-reactivity testing					
Parvovirus B19 genotypes 1, 2 and 3a	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Herpes simplex virus 1 (HSV-1) strain MacIntyre	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> type A1 and g885652	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Herpes simplex virus 2 (HSV-2) strain MS	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) strain Z29 and types A and B	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
JC virus types 1A and 2B	-	Hepatitis A Virus	-	<i>Toxoplasma gondii</i> type II	-
<i>Candida albicans</i>	-	Cytomegalovirus strain AD-169	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotype <i>Cloacae B</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serotype <i>1/2b</i> and serovar <i>4b</i>	-	<i>Varicella-Zoster Virus</i> strain Ellen	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotype <i>Cloacae A</i>	-	<i>Listeria innocua</i> serotype 6a	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Epstein-Barr virus	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-
<i>Escherichia coli</i> strain 0.1285;O18:H7:K1	-				

Analytical reactivity

Vitassay qPCR BK kit's reactivity for BK virus was tested against DNA from BK virus, subtypes 1b-1 and 1b-2, and subtype IV as templates, showing positive results.

Limitations

- All obtained results should be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from EDTA-plasma samples. The use of other samples has not been established.
- The correct test performance depends on the sample's quality; DNA should be properly extracted from clinical samples.
- Lower levels of target below the quantification limit might be detected, but results may not be accurately quantifiable.
- Low copy numbers of the target DNA template may be detected below the detection limit, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination, either by BK Quantitative Standards during reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA template or by PCR products from previous reactions.
- Detection can be affected by several factors and their combinations that can lead to false negative results, including: a) inadequate specimen sampling, shipping, storage and handling; b) procedural errors (including DNA extraction); c) DNA degradation during specimen shipping, storage and/or preparation; d) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect the detection of new or unknown BK virus genes mutations; e) pathogen load is below the detection limit for the assay; f) presence of real-time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapies, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressive drugs used to prevent infection or during treatment of infection was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- Detection can be affected by several factors and their combinations that can lead to inaccurate viral DNA values (loss of viral load), which include: a) inadequate specimen sampling, shipping, storage and handling; b) procedural errors (including DNA extraction); c) incorrect maintenance of commonly used equipment, especially micropipettes and extraction/amplification systems; d) use of uncalibrated micropipettes and/or inadequate tips; e) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.

- Detection of viral DNA may not indicate the presence of viable and/or infectious virus or that these viruses are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude BK virus infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimal specimen types and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the virus.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible BK virus infection, and other immunodepression-related illnesses have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.
- The conversion factor (CF) depends on the tested sample type and the used workflow (extraction and amplification). For this reason, each sample type-workflow requires the calculation of its own CF.










Bibliography/Bibliografía

- Blackard J.T., Davies S.M., & Laskin B.L. (2020). BK polyomavirus diversity – Why viral variation matters. *Reviews in medical virology*. 30(4):e2102.
- Furmaga, J., Kowalczyk, M., Zapolski, T., Furmaga, O., Krakowski, L., Rudzki, G., Jaroszyński, A., & Jakubczak, A. (2021). BK Polyomavirus-Biology, Genomic Variation and Diagnosis. *Viruses*, 13(8), 1502.
- Kotla, S. K., Kadambi, P. V., Hendricks, A. R., & Rojas, R. (2021). BK polyomavirus-pathogen, paradigm and puzzle. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 36(4), 587–593.

Trademarks

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

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
			Número de referencia Catalogue number

Change Control / Control de cambios		
Version Nº /	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original versión / Versión original	21/06/2022
01	<p>In “Standard Curve Preparation” the following statement is added: The concentration of each BK Quantitative Standard is indicated on the corresponding tube label. For more information, please request and refer to the 'Certificate of Analysis' for the lot number and DNA copy number of the BK Quantitative Standard (not included). Attached 1 and 2 are deleted.</p> <p>En “Preparación de la curva standard” se añade: La información referente a la concentración de cada BK Quantitative Standard está referida en la etiqueta del tubo correspondiente. Para más detalles, solicite y consulte en el “Certificado de análisis” el número de lote y el número de copias de DNA de BK Quantitative Standard (no incluido). Se suprimen el Adjunto I y el adjunto II. Corrección de errores tipográficos (ES)</p>	11/04/2024



VVA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com