

INGENE q PPA

R.11.PPA.K.5TX/Q

Ensayo de qPCR para la detección del virus de la Peste Porcina Africana en muestras biológicas. *Tecnología TaqMan™ PCR.*

CARACTERÍSTICAS DEL KIT

APLICACIÓN

INGENE q PPA es un ensayo de PCR a tiempo real diseñado para la detección del **DNA** del virus de la Peste Porcina Africana (**VPPA**) en muestras biológicas de interés clínico de **cerdos domésticos y jabalíes**. El ensayo ha sido optimizado y probado para **sangre, suero, bazo e hígado**.

Para uso en diagnóstico veterinario.

BASE TÉCNICA

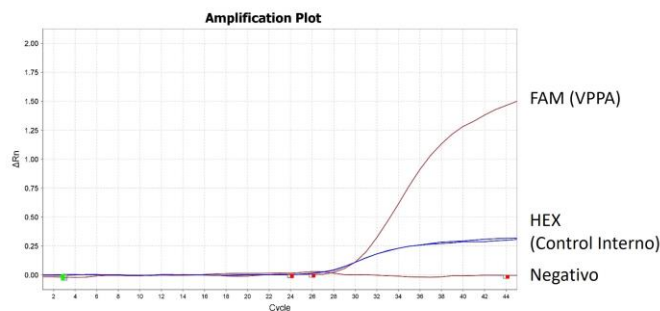
1. **INGENE q PPA** es un kit de amplificación y detección del material genético de **VPPA** basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sondas fluorescentes de hidrólisis (tipo *TaqMan™*). Consiste en un ensayo **duplex** de PCR a tiempo real en formato de un solo pocillo.
2. El ensayo utiliza cebadores específicos y una sonda tipo TaqMan marcada con el fluoróforo FAM para la detección del DNA de VPPA. Además, la mezcla de reacción incluye un control interno (C.I.), que se amplifica con cebadores específicos y se detecta con una sonda marcada con HEX, lo que permite identificar falsos negativos debidos a una inhibición de la PCR. La mezcla también contiene un fluoróforo pasivo de referencia (ROX) que permite realizar una normalización de la señal, en el caso de utilizar modelos de termociclador que así lo requieran.
3. El kit ha sido validado en los equipos **Quantstudio™ 5, StepOnePlus™ (Applied Biosystems™), LightCycler® 480 II (Roche)**. Es compatible con equipos que permitan la medida de los fluoróforos de interés, aunque los valores de Ct pueden variar en función del equipo utilizado.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

De cada muestra analizada se obtienen datos relativos a la fluorescencia proveniente del canal FAM y HEX:

- Canal FAM: Detección del patógeno. Un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia típica con un valor del ciclo umbral Ct <45.
- Canal HEX: Detección del Control Interno. Un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia con un valor del ciclo umbral Ct <45. Normalmente los valores que se registran son 30 < Ct < 45.
- En ambos canales. Un resultado negativo en la amplificación implica la ausencia de detección (no detectado, ND) o la obtención de un Ct ≥45.

Criterio de validación del kit: el ensayo se puede considerar válido cuando el C+ tiene un valor de Ct de 32 ± 4 y el control negativo presenta un Ct >45 en el canal FAM.



VALIDACIÓN DEL ENSAYO

DATOS DE VALIDACIÓN

El kit INGene q PPA en su versión inicial se validó interna y externamente por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para VPPA (Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA-INIA) con un total de 270 muestras. Sobre este ensayo se introdujeron modificaciones conservativas y de mejora. A continuación, se comprobó en paralelo el rendimiento de la versión anterior y modificada utilizando un panel adicional de 35 muestras obtenidas del Laboratorio Europeo de Referencia. Se obtuvo una correlación del 100% entre el método modificado y el anterior. Se calculó especificidad con 161 muestras de campo (65 negativas y 96 positivas), Peste Porcina Clásica y muestras de tejido. Se estimó la sensibilidad con 21 aislados de referencia pertenecientes a 21 de los 22 genotipos de p72 descritos, 79 muestras de sangre experimentales recogidas a diferentes días post-infección y 9 homogenados de garrapata (*Ornithodoros Moubata*) obtenidos de facóqueros de África del este (Kenia y Uganda). Se obtuvieron los siguientes valores: sensibilidad diagnóstica >98%; sensibilidad analítica: capacidad de detección de PPA (10 copias del gen); especificidad diagnóstica >96.8%. El ensayo fue muy reproducible con valores superiores al 95%, en comparativas: intra-ensayo; inter-ensayo; inter-día; inter-persona e inter-lote.

Con posterioridad al registro actual del kit, éste se volvió a validar externamente por el laboratorio de referencia europeo, utilizando como referencia el ensayo de la OIE (UPL-PCR). En esta validación más reciente se obtuvieron parámetros de rendimiento mejorados.

- A partir del análisis de 126 muestras de campo POSITIVAS (56 cerdos domésticos y 70 jabalíes) obtenidas en zonas endémicas de Europa, la sensibilidad diagnóstica del kit de PCR en tiempo real INGene q PPA fue del 98,41% [94,5% - 98,7% CI 95%].
- A partir del análisis de 94 muestras de sangre, la especificidad diagnóstica del kit de PCR en tiempo real INGene q PPA fue de 98,9% [94,2% - 99,8% CI95%].
- El valor (κ) de 0,97% [CI95%] indica PERFECTA CONCORDANCIA entre el método de referencia UPL y el kit de PCR en tiempo real INGene q PPA.
- El ensayo INGene q PPA mostró mejor sensibilidad que el ensayo UPL en pools de muestras. Es adecuado para grupos de hasta 20 muestras, pero para infecciones subclínicas o crónicas (CT>30) se recomiendan pools de 3-5 muestras.
- El valor de variabilidad fue inferior al 3% y es apropiado en pruebas de rutina.

COMPOSICIÓN DEL KIT

- Mezcla A: oligonucleótidos y sonda específicos para VPPA + CI
- Mezcla B: mezcla de enzimas
- Control Positivo de amplificación VPPA

CADUCIDAD: 12 MESES

Conservar a ≤-18°C

*Este ensayo está diseñado conforme a las recomendaciones de la OIE (Animal Health Code, 28ª Edición).
Registro en España nº 3293.*



GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID, S.A.

C/Hermanos García Noblejas 39, 8º

28037 MADRID (SPAIN)

Tel: (+34)91 3680501

<http://www.goldstandarddiagnostics.com/>

INgene q PPA

R.11.PPA.K.5TX/Q

qPCR kit for the detection of African Swine Fever virus in biological samples. *TaqMan™ PCR technology.*

KIT FEATURES

APPLICATION

INgene q PPA is a real-time PCR kit suited for the detection of African Swine Fever virus (ASFV) DNA in biological samples from **domestic pigs and wild boars** of clinical interest. Our assay has been optimized and specifically tested for **blood, serum, spleen and liver**.

For veterinary diagnostic use.

TECHNICAL BASE

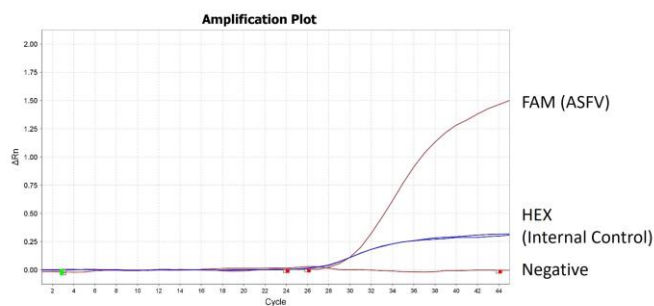
- INgene q PPA** is an assay for amplification and detection of the **ASFV** genetic material based on the polymerase chain reaction (PCR) and hydrolysis fluorescent probes (*TaqMan™* type). The assay consists on a **duplex** real-time PCR in a one-well format.
- This kit contains specific primers and a *TaqMan* probe labelled with FAM fluorochrome for the specific detection of ASFV. In addition, the reaction mix includes an internal control (I.C.) that is amplified with specific primers and detected with a *TaqMan* probe labelled with HEX, allowing identification of false negatives due to PCR inhibition. Furthermore, the master mix contains a passive reference fluorochrome (ROX) to allow signal normalisation in the real-time PCR platforms where this is required.
- The kit has been validated in the following PCR platforms: **Quantstudio™ 5, StepOnePlus™ (Applied Biosystems™), LightCycler® 480 II (Roche)**. It is compatible with other thermocyclers, if they have the appropriate fluorescence channels, but Ct values may vary among them.

RESULTS INTERPRETATION

From each sample, fluorescence data originated from channels FAM and HEX is obtained:

- FAM channel: pathogen detection. A positive result should show a typical amplification curve with a Ct value <45.
- HEX channel: Internal Control detection. A positive result during amplification implies a fluorescence curve with a Ct value <45. Normally, values are comprised within a range of 30 < Ct < 45.
- Both channels. A negative result implies absence of amplification (undetected) or a Ct ≥ 45.

Criteria for the kit validation: the assay will be considered as valid when the C+ have a Ct value within the range 32 ± 4 and the C-, a Ct >45 in the FAM channel.



ASSAY VALIDATION

VALIDATION DATA

The previous INgene q PPA kit was validated internally and externally by the European Reference Laboratory for ASFV (CISA-INIA) with a panel of 270 samples. Conservative modifications and improvements were introduced on this assay and both the previous and modified versions were compared in parallel with an additional set of 35 samples provided by the European Reference Laboratory. The improved kit showed 100% correlation with the previous version. Specificity was tested with 161 field samples (65 negatives, 96 positives, one sample of Classical Swine Fever and other tissue samples).

Sensitivity was calculated using 21 reference isolates belonging to 21 of the 22 p72 and 9 tick homogenates (*Ornithodoros Moubata*) obtained from warthogs of east Africa (Kenia y Uganda). The obtained values were: diagnostical sensitivity >98%, analytical sensitivity: detection of ASFV (10 gene copies), diagnostic specificity: >96.8%, repeatability: intra-assay, inter-assay, inter-day, inter-person and inter-batch variabilities were superior to 95%.

After the current registration of the kit, it was re-validated externally by the European Reference Laboratory, using the OIE assay (UPL-PCR) as a reference. Improved performance parameters were obtained in this most recent validation.

- From the analysis of 126 POSITIVE field samples (56 domestic pigs and 70 wild boars) obtained in endemic areas of Europe, the diagnostic sensitivity of the INgene q ASF real-time PCR kit was 98.41% [94.5% - 98.7% CI 95%].
- Based on the analysis of 94 blood samples, the diagnostic specificity of the INgene q PPA real-time PCR kit was 98.9% [94.2% - 99.8% CI 95%].
- The value (κ) of 0.97% [CI 95%] indicates PERFECT CONCORDANCE between the UPL reference method and the INgene q PPA real-time PCR kit.
- The INgene q PPA assay showed better sensitivity than the UPL assay in sample pools. It is suitable for groups of up to 20 samples, but for subclinical or chronic infections (CT >30) pools of 3-5 samples are recommended.
- The inter-assay and inter-assay variability value was less than 3% and is appropriate in routine tests.

KIT COMPOSITION

- Mixture A: ASFV and IC specific primers and probes
- Mixture B: enzyme mix
- Positive ASFV Amplification control

EXPIRATION: 12 MONTHS
Stored ≤-18°C

Assay design follows OIE guidelines (Animal Health Code, 28th Edition).
Spanish registration nº 3293.



GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID, S.A.

C/Hermanos García Noblejas 39, 8º
28037 MADRID (SPAIN)
Tel: (+34)91 3680501

<http://www.goldstandarddiagnostics.com/>