

## Procedimiento de la OIE para el registro de los kits de diagnóstico

### Hoja de resumen

**Nombre del kit de diagnóstico:** VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit  
**Fabricante:** Thermo Fischer Scientific\_ LSI S.A.S.

**Enfermedad:** Peste porcina africana (PPA)

**Agente patógeno:** Gen P72 del virus de la PPA

**Tipo de ensayo:** Detección por PCR en tiempo real TaqMan®

**Finalidad del ensayo:** El kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit es apto para los fines de detección del virus de la peste porcina africana a partir de la sangre, suero y tejidos de cerdos domésticos y salvajes (jabalís incluidos).

**Especies y especímenes:** sangre, suero y tejidos de cerdos domésticos y salvajes (jabalís incluidos)

#### 1. Información sobre el kit

La información general sobre el kit puede consultarse en el sitio web de Thermo Fischer: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**Tel:** +33 (0)4.72.54.82.82

**Fax:** +33 (0)4.72.54.82.83

#### 2. Resumen de los estudios de validación

##### Características analíticas

*Repetibilidad:* La repetibilidad del PCR es evaluada en tres sesiones por el mismo técnico con el mismo material. Los ensayos se realizan con ADN de un plásmido cuantificado del virus pPPA, diluido en una solución tampón TE 1 X para obtener 3 niveles de concentraciones (alta/media/baja). Cada muestra se analiza en triplicado. La repetibilidad del kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection presenta coeficientes de variación (CV) que fluctúan entre el 0.89 % y el 3.01 %.

*Especificidad analítica:* 100 %

La especificidad analítica del kit se evaluó comparando los sistemas PCR usados en el kit (cebadores y sondas) con las secuencias del virus de la PPA presentes en las bases de datos públicas del National Center for Biotechnology Information.

La inclusividad del método PCR se evaluó en un panel de ADN extraído de 58 muestras positivas para el virus de la PPA (órganos, suero) del Centro de Investigación en Sanidad Animal - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA).

La exclusividad del método PCR se evaluó en patógenos habitualmente hallados en los mismos nichos ecológicos, o que presentan características filogenéticas similares o producen los mismos signos clínicos en las especies diana. El kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection es específico para el virus de la peste porcina africana y no detecta otros patógenos en los ensayos.

*Sensibilidad analítica:* 100 %.

El límite de detección por PCR (LDPCR) es la concentración mínima de ácido nucleico diana que generará un resultado positivo con una confianza del 95 % (norma NF U47-600). Para determinar el LDPCR experimentalmente, debemos evaluar, en términos de validación intrapruebas (réplica) e interpruebas (sesiones independientes), un rango de ácidos nucleicos objetivo que oscile en torno al valor LDPCR esperado. El LDPCR se determinó en un plásmido cuantificado del virus pPPA para estimar el número de copias de ácidos nucleicos. Se prepararon tres rangos de diluciones individuales realizando seis diluciones seriadas con un factor de dilución 2. Se esperaba que el LDPCR estuviese comprendido dentro de este rango de diluciones.

El límite de detección del Kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection es de 16 copias de ácido nucleico por PCR.

Sobre la base de los resultados obtenidos durante el análisis de las muestras experimentales provenientes de animales positivos, el CISA-INIA concluye que el kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection posee una sensibilidad y repetibilidad analíticas adecuadas para brindar un diagnóstico fiable de PPA basado en la detección del genoma del virus de la PPA.

### Características diagnósticas

**Determinación del umbral:** Determinar el umbral consiste en asignar un valor umbral de ciclo (Ct) a cada muestra, el cual depende del diseño de PCR y del termociclador usado para la amplificación. El valor umbral es determinado a partir del Control positivo externo, en la mitad de la fase exponencial, según la norma NF U 47-600:

Tipo de reacción	Virus diana del PPA (colorante FAM™)	IPC diana (colorante VIC™)	Interpretación
Control positivo	$C_t = C_{tQC} \text{ ASFV} \pm 3 C_t$	$C_t < 45$ o $C_t > 45$	PCR validado
Control de extracción	$C_t > 45$	$C_t = C_{tQC} \text{ IPC} \pm 3 C_t$	Extracción de ADN validado
No - control con plantilla	$C_t > 45$	$C_t > 45$	Reactivos para PCR validados

IPC: Control positivo interno

### Interpretación de los resultados

Virus diana del PPA (Colorante FAM™)	IPC objetivo (colorante VIC™)	Interpretación
$C_t < 45$	$C_t < 45$ o $C_t > 45$	Virus del PPA detectado
$C_t > 45$	$C_t = C_t \text{ NEC} \pm 3 C_t$	Virus del PPA no detectado
$C_t > 45$	$C_t$ sale de este rango: $C_t \text{ NEC} \pm 3 C_t$	Resultado no válido

NEC: Control de extracción negativo

### Sensibilidad (DSn) y especificidad diagnóstica (DSp) estimadas e intervalos de confianza del 95 %

Kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection		Especímenes
Sensibilidad diagnóstica	DSn = 100 %	Se han analizado 51 muestras de tejido Se = 100 % [93.02 -100.0 %]
Especificidad diagnóstica	DSp = 100 %	Se han analizado 1563 muestras de sangre y suero Sp = 100 % [99.76-100.0 %] Se han analizado 63 muestras de tejido Sp = 100 % [94.31-100.0 %]

### Comparación de resultados

Los resultados obtenidos por el CISA-INIA en el análisis de las muestras de campo de cerdos domésticos y jabalíes europeos, obtenidas de animales infectados por el virus de la PPA de genotipo II en países de Europa del Este, se han combinado para ofrecer una estimación general de la eficiencia del kit para el diagnóstico de la PPA en condiciones de campo. De un total de 424 muestras, 400 (94 %) dieron positivo con el método UPL-PCR y 387 (91 %) con el kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection.

### Coincidencias y discrepancias

En lo referente a los estudios realizados por el CISA-INIA:

- En el análisis de 404 muestras de campo obtenidas de zonas epidémicas de Europa del Este, el valor kappa fue de 0.87, es decir, una coincidencia casi perfecta entre el método de referencia UPL y el kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection.
- En el análisis del panel de 16 muestras de referencia del EURL PPA, hubo una coincidencia perfecta entre el método de referencia UPL y el Kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection.
- En el análisis de 136 muestras experimentales de sangre, el método de referencia UPL y el kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection coincidieron perfectamente, con valores Ct inferiores a 30.
- En el análisis de las muestras de tejido, el genoma del virus de la PPA fue detectado con el método UPL-PCR y con el kit de PCR VetMAX™ en el 100 % de los casos, es decir, una coincidencia del 100 % entre ambos métodos.

### Reproducibilidad

La solidez se ha evaluado verificando la capacidad de un análisis de PCR para no ser afectado por variaciones en parámetros críticos de una reacción PCR:

- Prueba 1: T °C de hibridación +/- 1 °C
- Prueba 2: Tiempo de hibridación +/- 10 %
- Prueba 3: Volumen de mezcla de PCR +/- 10 %
- Prueba 4: Volumen de ADN +/- 10 %

El kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection ha superado con éxito la evaluación de solidez.

El análisis de un panel único de 15 muestras biológicas (11 muestras positivas y 4 negativas; caracterizadas mediante el método del CISA-INIA; un panel de 15 muestras de referencia, inactivadas y liofilizadas) realizado por el laboratorio Thermo Fischer y el CISA-INIA Valdeolmos con el kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection dio los siguientes resultados: los valores Ct obtenidos para las 15 muestras arrojaron coeficientes de variación (CV) que oscilaban entre el 2.75 % y el 7.20 %.

El kit ofreció resultados positivos coherentes, y los resultados no se vieron afectados por los factores ambientales.

### Aplicaciones

El kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection se utiliza para el diagnóstico del virus de la peste porcina africana (PPA).

Solo para uso veterinario y solo para uso *in vitro*.

### Referencias

Tignon M. *et al.* (2011). Development and inter-laboratory validation of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African Swine Fever virus. *Journal of Virological Methods*, **178** (1-2): 161-170.

Gallardo C. *et al.* (2015). Assessment of African Swine Fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in Eastern European Union countries: How to improve surveillance and control programs. *Journal of Clinical Microbiology*, **53**(8): 2555-2565.

OIE. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestre* 2019: Capítulo 3.8.1 Peste porcina africana.

