



## Procedimiento de la OMSA para el registro de kits de diagnóstico Resumen de los estudios de validación

**Nombre del kit de diagnóstico:** kit Genelix™ de detección del VPPA por PCR en tiempo real

**Fabricante:** Sanigen Co., Ltd.

**Número de procedimiento/aprobación:** 052131

**Fecha de registro:** mayo de 2024

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

**Agente patógeno:** virus de la PPA (VPPA)

**Tipo de prueba:** PCR en tiempo real

### Finalidad de la prueba

El kit Genelix™ de detección del VPPA por PCR en tiempo real es un producto que detecta cualitativamente el VPPA y que confirma el diagnóstico de infección por el VPPA mediante un sistema de detección por PCR en tiempo real en sangre total, suero y tejidos porcinos en los que se sospecha de infección por el VPPA.

### Especies y muestras

La especie diana es el cerdo doméstico y la prueba puede hacerse en sangre total, suero y tejidos porcinos. Para realizar pruebas se puede utilizar sangre entera almacenada con anticoagulantes. Se recomienda que las muestras se utilicen de inmediato tras su obtención. No obstante, si no es posible usarlas de inmediato, se pueden conservar unos días a 4 °C en una nevera, o bien pueden conservarse ultracongeladas a menos de -70 °C si se va a tardar más de 7 días en analizarlas. Las muestras deben dividirse en las cantidades que requieran las pruebas y conservarse a -20±5 °C en un congelador para evitar una descongelación reiterada. Si el procesado o el transporte implican una espera de más de 24 horas, deben conservarse a -20±5 °C. Debe evitarse la congelación y descongelación reiterada de las muestras.

#### 1. Información sobre el kit

Consulte el prospecto del kit en el apartado sobre registros de la página web de la OMSA o bien contacte con el fabricante, Sanigen Co., Ltd., en:

Tel.: +82-1833-8010

Fax: +82-2-573-3134

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

### Especificidad analítica

**Conclusión:** Las pruebas de interferencia realizadas con las muestras positivas y negativas con cinco tipos de sustancias interferentes indicaron que no hay interferencia con los

resultados. Se evaluó la prueba de reactividad cruzada para distinguir entre los analitos diana y no diana. Se confirmó la exclusividad con agentes patógenos relacionados con enfermedades porcinas o reactivos infecciosos (41 materiales, incluidas 16 bacterias, siete virus relacionados con enfermedades porcinas, y otros 18 virus). No se encontraron reactividades cruzadas significativas. Se sintetizaron nueve genotipos del gen p72 del VPPA, el analito diana del kit, y se comprobó su inclusividad. Todos los tipos del gen dieron positivo.

### Sensibilidad analítica

**Conclusión:** Se realizó la prueba del límite de detección (LD) del kit Genelix™ de detección del VPPA por PCR en tiempo real para medir su sensibilidad analítica. Las concentraciones positivas bajas significativas se repitieron 24 veces, y los datos se volvieron a analizar mediante un análisis probit con un intervalo de confianza del 95 %; como resultado, la estimación máxima de 16,9 (1,7 x 10<sup>1</sup>) copias/μℓ se consideró el LD.

### Repetibilidad

**Conclusión:** La repetibilidad fue comprobada por una única persona, con un lote, durante 20 días, ejecutando la prueba dos veces al día, con duplicación de cada ejecución, y a tres concentraciones distintas. Como resultado de los experimentos realizados con dilución del ADN plasmídico del VPPA a los tres niveles de concentración de la muestra, se detectó el 100 % de las muestras, y el control negativo no presentó amplificación en ninguna muestras. El valor del coeficiente de variación (CV) fue inferior al 5 % en todos los casos

### Características diagnósticas:

Determinación del ciclo umbral y estimaciones de la sensibilidad (DSe) y la especificidad (DSp) diagnósticas:

#### **Conclusión:**

El ciclo umbral o umbral de ciclos (Ct, por las siglas en inglés de *cycle threshold*) del kit Genelix™ de detección del VPPA por PCR en tiempo real es de 38,1 Ct. En el caso del LD, determinado mediante un análisis probit, el ciclo umbral se define como el valor Ct medio de la siguiente dilución más concentrada que se haya hallado hasta el LD establecido mediante un análisis probit. En la evaluación de determinación del ciclo umbral, el valor Ct medio fue de 38,1 a 2,8 x 10<sup>1</sup> copias/μℓ, que es la concentración más cercana por encima del valor determinado mediante una prueba probit.

### Interpretación del resultado

Los criterios de fijación del valor umbral y del valor basal según el equipo son los siguientes:

Equipo	Ciclo umbral	Valor basal inicial	Valor basal final
AB 7500	0,1	3	15
AB 7500 Fast	0,1	3	15
QuantStudio™ 5	0,4	3	15
Bio-rad CFX96™	100	3	15

Si los resultados de los controles positivo y negativo coinciden con los criterios de la siguiente tabla, interprete los resultados de la muestra o muestras en estudio. Si los resultados de los controles no coinciden con los de la tabla, repita el experimento.

Tipo de control	Valor Ct
Control positivo	Ct ≤ 38,1
Control negativo	No detectado

Compruebe el valor Ct de la muestra(s) empleando el software específico de cada equipo. Los datos relativos a la muestra se consideran positivos cuando Ct ≤ 38,1, y negativos cuando Ct > 38,1.

### Estimaciones de la sensibilidad (DSe) y la especificidad (DSp) diagnósticas e intervalos de confianza del 95%

- Para determinar la sensibilidad y la especificidad diagnósticas, se llevó a cabo una prueba comparativa empleando el método de referencia (validado y certificado por la OMSA), y los resultados se muestran a continuación.

Kit Genelix™ de detección del VPPA mediante PCR en tiempo real		VPPA/Sangre total y suero porcinos
Sensibilidad diagnóstica	n DSe IC	187 99,47 % 97,07 a 99,99%
Especificidad diagnóstica	n DSp IC	553 100 % 99,33 a 100,0%

Kit Genelix™ de detección del VPPA mediante PCR en tiempo real		VPPA/Tejido porcino
Sensibilidad diagnóstica	n DSe CI	22 100 % 84,56 a 100,0%
Especificidad diagnóstica	n DSp CI	450 100 % 99,18 a 100,0%

### Reproducibilidad

**Conclusión:** Los tres laboratorios de referencia de la OMSA para la PPA llevaron a cabo un estudio comparativo de la reproducibilidad. Para determinar la reproducibilidad de la prueba, se compararon los resultados obtenidos por tres laboratorios, en tres días distintos y llevando a cabo dos ejecuciones por día. Todos los resultados cualitativos coincidieron al 100% y cumplieron los criterios de aceptación, con un CV inferior al 5%. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla siguiente:

Muestra nº	Coeficientes de variación (%)			
	Sanigen	Lab A	Lab B	Lab C
SNG-01	1,09	0,46	0,90	1,36
SNG-02	0,68	2,81	0,43	1,19
SNG-03	0,40	0,40	0,40	2,42
SNG-04	0,68	0,92	2,56	1,66
SNG-05	2,20	2,86	1,86	2,28
SNG-06	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
SNG-07	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
SNG-08	0,87	2,36	1,64	0,92
SNG-09	0,21	4,98	2,07	0,45
SNG-10	0,63	1,66	1,29	0,64
SNG-11	0,60	0,57	0,62	1,29
SNG-12	0,90	1,55	0,95	0,33
SNG-13	0,19	2,12	0,47	0,69
SNG-14	0,36	0,91	0,92	1,41
SNG-15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
SNG-16	0,60	5,18	1,07	0,78
SNG-17	1,04	0,42	0,43	1,00
SNG-18	1,03	2,07	1,02	1,08
SNG-19	1,02	6,13	1,54	1,71
SNG-20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

## Bibliografía

- Chapter 1.01.06 Principles and Methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases (WOAH 2023)
- Chapter 2.02.03 Development and optimisation of nucleic acid detection assays (WOAH 2024)
- Section 3.8-SUIDAE Chapter 3.8.1-African Swine Fever (Infection with African swine fever virus) (WOAH 2019)
- African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses* 2017, 9, 103; doi: 10.3390/v9050103
- African swine fever: detection and diagnosis. A manual for veterinarians. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017
- Chapter 1.01.02 Collection, submission and storage of diagnostic specimens (WOAH 2018)
- Chapter 2.2.6 Selection and use of reference samples and panels (WOAH 2024)
- CLSI-EP17-A2 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures
- CLSI-EP07-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry
- CLSI-EP05-A3 Evaluation of Precision of Quantitative Measurement
- King, D. P., S. M. Reid, G. H. Hutchings, S. S. Grierson, P. J. Wilkinson, L. K. Dixon, A. D. S. Bastos, and T. W. Drew, 2003: Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods* 107, 53–61
- Charles G.B. Caraguel, 1 Henrik Stryhn, Nellie Gagne', Ian R. Dohoo, K. Larry Hammell, Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest* 23:2-15(2011)
- Addressing African swine fever (FAO, 2020)