

INgene q PPA (Sondas Detección)

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

Kit qPCR para la detección del Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) en muestras biológicas. / qPCR kit for the detection of African Swine Fever (ASFV) in Biological samples.

PCR Real-time. 100 Reacciones

Producto fabricado en INGENASA.
 Empresa certificada bajo Normas
 ISO 9001 y 14001.



Índice de Contenidos (ESPAÑOL)

1.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.	COMPOSICIÓN DEL KIT.....	2
3.	CONSERVACIÓN DEL KIT.....	2
4.	MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.....	3
5.	NORMAS BÁSICAS PARA EVITAR CONTAMINACIONES.....	3
6.	RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.....	3
7.	EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	4
8.	AMPLIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	4
9.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	5
10.	LOCALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	7
11.	CONTROL DE CALIDAD.....	7
12.	ASISTENCIA TÉCNICA.....	7

Table of Contents (ENGLISH)

1.	INTRODUCTION.....	8
2.	KIT COMPOSITION.....	8
3.	GUIDELINES FOR THE CORRECT CONSERVATION OF THE KIT COMPONENTS.....	8
4.	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	9
5.	PRECAUTIONS TO AVOID CONTAMINATION.....	9
6.	SAMPLES COLLECTION AND TRANSPORT.....	9
7.	DNA EXTRACTION.....	10
8.	AMPLIFICATION OF THE GENETIC MATERIAL.....	10
9.	ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS.....	11
10.	TROUBLESHOOTING.....	13
11.	QUALITY CONTROL.....	13
12.	TECHNICAL ASSISTANCE.....	13

1. INTRODUCCIÓN:

INgene q PPA Sondas es un ensayo diseñado para poner de manifiesto la presencia de ADN del virus de la peste porcina africana (VPPA) en muestras biológicas de un modo sencillo y con unos niveles de sensibilidad y especificidad extremadamente altos.

El kit posee los reactivos y enzimas necesarios en dos mezclas que una vez unidas en un único envase (Máster mix) se encuentran en concentraciones idóneas para detectar (opcionalmente cuantificar) VPPA, de forma que sólo sea necesaria la adición del ADN de la muestra problema. El ensayo utiliza una sonda UPL® marcada con FAM para la detección de VPPA. Por otro lado, cada Máster Mix, proporciona un control interno positivo (CIP) con cebadores y sonda Taqman marcada con VIC, permitiendo detectar falsos negativos debidos a una inhibición de la PCR. Además, la mezcla contiene un fluorocromo pasivo de referencia, ROX, que permite realizar una normalización pasiva de la señal evitando posibles errores debidos a diferencias de pipeteo, y que en el caso de utilizar modelos ABI PRISM de PCR a tiempo real de Applied Biosystems, es necesario para eliminar interferencias entre los datos recogidos de varios canales de emisión.

El kit incluye un control positivo VPPA. Bajo pedido se puede suministrar un control positivo Standard. A partir de este control, puede ser generada la curva estándar que relaciona el nº de copias del patógeno con el valor del ciclo umbral (Ct, cycle threshold).

El kit ha sido probado en todos los equipos de Applied Biosystem (StepOne, HT7300, HT7500) y LC 480 de Roche. Es posible su uso en otros equipos que permitan la medida de dos fluoróforos, aunque los valores de Ct pueden variar en función del equipo utilizado.

2. COMPOSICIÓN DEL KIT

COMPONENTES (100 reacciones)	Nº VIALES	VOLUMEN/VIAL
Mezcla A: Oligonucleótidos y sonda específicos para VPPA + C.I.	2	600 µl
Mezcla B: Mezcla de enzimas	2	600 µl
Control Positivo A1	1	60 µl

3. CONSERVACIÓN DEL KIT:

Una vez recibido el kit sus componentes se deben mantener a -20°C y son estables durante 1 año desde la fecha de fabricación (mirar fecha de caducidad en el envase).

4. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS:

- Guantes desechables libres de polvo (sin talco),
- Microcentrífuga,
- Agitador de tubos,
- Termociclador de tiempo real,
- Micropipetas (0,5-1000 µl),
- Puntas de pipeta estériles con filtro,
- Agua estéril libre de DNAsas / RNAsas.

5. NORMAS BÁSICAS PARA EVITAR CONTAMINACIONES:

En general deben mantenerse las siguientes precauciones:

- Ausencia de DNAsas/RNAsas en el material fungible a utilizar.
- Uso de agua destilada autoclavada (25 min., 120°C) libre de DNasa/RNAsas.
- Uso de puntas estériles con filtro.
- Buena homogeneización de los componentes del kit una vez descongelados.
- Mantener en todo momento las mezclas en hielo.
- Repetidos ciclos de congelación y descongelación podrían reducir la sensibilidad de los reactivos y con ello la sensibilidad del método, por lo que es conveniente dispensar los reactivos en alícuotas de un solo uso, manteniéndolas a -20°C y protegidas de la luz hasta su utilización.

Para evitar contaminaciones que generen falsos positivos, es importante:

- Separar físicamente el control positivo de PCR del resto de reactivos del kit.
- La manipulación de las muestras a testar se debe realizar en un espacio físico diferente de donde se realizan los análisis de productos amplificados.
- El control positivo de PCR debe ser añadido en un espacio físico diferente de donde se añade la mezcla y de donde se manipulan las muestras a testar.

6. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

INgene q PPA Sondas está indicado para la detección y (opcionalmente cuantificación) de ADN del VPPA a partir de diferentes muestras biológicas.

El ensayo ha sido optimizado para su utilización con muestras de sangre, suero, bazo, hígado, por ser estas las muestras de mayor interés desde el punto de vista clínico.

El transporte al laboratorio se realizará en frío dentro de las primeras 24 horas. Si bien, es posible el almacenamiento de las muestras a -20°C hasta su extracción.

7. EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

Una vez aislado el ADN, se recomienda chequear la calidad y cantidad del ADN aislado realizando una medida de absorbancia. Se utilizará cualquier procedimiento disponible en el laboratorio con el que se obtenga una buena calidad de material genético a partir de las muestras. INGENASA puede suministrar un protocolo y buffer de extracción bajo pedido.

Ingenasa ha realizado este ensayo con los métodos de extracción basados en:

- Método de Chomczynski and Sacchi de extracción fenólica.
- Métodos automáticos con uso de bolas magnéticas (Mag Max TM96 total NA isolation, Ref AM1840).
- Métodos de purificación por columna: The QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). High pure PCR template Preparation kit (ROCHE)

Existen varias casas comerciales con productos para extracción que dan una calidad óptima de ácido nucleico, siguiendo las indicaciones del fabricante, entre ellas: Life-technologies, ROCHE, Quiagen, Marchery Nalgene, otras.

PRECAUCIÓN: si la amplificación no es inmediata, conservar el DNA a -20°C.

8. AMPLIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

MATERIALES NECESARIOS

- Hielo picado.
- ADN extraído de las muestras.
- Mezcla A – MANTENER EN HIELO PICADO SIEMPRE QUE ESTÉ FUERA DEL REFRIGERADOR.
- Mezcla B - MANTENER EN HIELO PICADO SIEMPRE QUE ESTÉ FUERA DEL REFRIGERADOR.
- Control positivo de amplificación A1 (VPPA.)
- Agua libre de DNAsas y RNAsas.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar y marcar convenientemente, tantos tubos para la amplificación como muestras vayan a procesarse, añadir un tubo adicional para el control positivo de amplificación, y otro para el control negativo.
2. Sacar las mezclas A y B del congelador. Mantener en hielo picado hasta su total descongelación. Agitarlas ligeramente para su correcta homogenización y preparar la mezcla de amplificación en volumen necesario para el número de muestras que vayan a procesarse. Tener en cuenta en los controles que se van a introducir en el ensayo, que serán al menos un control positivo y un control negativo.

El volumen a mezclar de cada reactivo por cada una de las muestras será:

	Volumen Mezcla A	Volumen Mezcla B	Volumen de Master Mix Final
Por muestra a procesar	10 µl	10 µl	20 µl
Para un total de 10 muestras	100 µl	100 µl	100 µl

El tubo donde vaya a realizarse la mezcla, es conveniente que se mantenga en todo momento en hielo picado. Se recomienda preparar la mezcla en exceso (calcular un 10% adicional de todos los reactivos) a fin de compensar las posibles pérdidas de volumen durante los pipeteos. Una vez preparada la mezcla homogeneizar correctamente.

- Disponer los tubos previamente etiquetados en hielo picado y añadir a cada uno 20 µl de la mezcla así preparada.
- Añadir a cada uno de los tubos 2 µl de la muestra de ADN extraído previamente. Añadir 2 µl del control positivo de amplificación A1 al tubo de control positivo y 2 µl de agua al tubo marcado como control negativo. Mezclar suavemente el contenido de cada tubo y asegurarse de que todo el líquido se encuentra depositado en el fondo del tubo. Si no fuera así, centrifugar ligeramente hasta conseguirlo.
- Siguiendo el manual de instrucciones de uso del termociclador a tiempo real, la reacción se coloca en el termociclador y se programa con arreglo a las siguientes condiciones:

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95	5 min	1
Amplificación	95	10 sg	45
	60 *	30 sg	

- La lectura de la fluorescencia se realiza en el paso de elongación (señalado en la tabla)* y los canales por los que se recogen los datos relativos a las fluorescencias se detallan en la tabla siguiente:

	Reporter	Quencher
VPPA	FAM	Ninguno
C.I.	VIC	Ninguno
Referencia pasiva	ROX	

9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los amplificadores obtenidos, deben analizarse de modo inmediato. De no ser así, deberán mantenerse a -20°C hasta el momento de su ensayo.

De cada muestra problema analizada se obtienen datos relativos a la fluorescencia proveniente del canal FAM; elegir para el análisis la selección automática del umbral.

En el caso de que esta opción no sea viable, el análisis podría desarrollarse de forma manual siguiendo las instrucciones de uso del termociclador.

El ensayo se puede considerar válido cuando el C+ tiene un valor de Ct de 32 \pm 4 y el control negativo presenta un Ct \geq 45 en el canal FAM.

Los posibles resultados se resumen en la tabla:

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.

Serán muestras dudosas aquellas con Ct's que se encuentren entre 40-45, para estos casos recomendamos:

- Repetir el análisis.
- Secuenciar el producto amplificado.

Canal VIC: Detección del Control Interno

Un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia típica con un valor del ciclo umbral Ct <45. Normalmente los valores que se registran son 30 < Ct < 45.

Tabla: Posibles resultados.

Casos	Canal FAM	Canal VIC	Resultados
A	+	+	Positivo
B	+	-	Positivo
C	-	+	Negativo
D*	-	-	Nulo/inhibido

* Repetir el análisis diluyendo el molde 1/40 para evitar inhibidores, antes de considerar la muestra negativa.

Tabla: Validación de los resultados

Caso	Muestra problema	Control negativo de extracción	Control positivo de PCR	Control negativo de PCR	Resultado muestra problema
1	+	-	+	-	+
2	-	-	+	-	-
3		+			Nulo
4		-		+	Nulo

Caso 1. Si tanto la muestra problema como el control positivo de PCR muestran un resultado positivo, y por el contrario los controles negativos de extracción y PCR muestran un resultado negativo.

Resultado positivo: La muestra contiene VPPA.

Caso 2. Si el control positivo de PCR muestra un resultado positivo y, por el contrario, la muestra problema y los controles negativos de extracción y PCR muestran un resultado negativo.

Resultado negativo: La muestra no contiene VPPA.

Caso 3. Si el control negativo de extracción muestra un resultado positivo.

Resultado invalidado o nulo desde la etapa de extracción.

Caso 4. Si el control negativo de extracción muestra un resultado negativo, sin embargo, el control negativo de PCR muestra un resultado positivo.

Resultado invalidado o nulo desde la etapa de amplificación.

10. LOCALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. Detección de señal de fluorescencia en el canal FAM en el control negativo de extracción.

Posible causa	Solución
Contaminación ocurrida durante el proceso de extracción	<ul style="list-style-type: none"> Repetir el proceso de extracción del ADN y el desarrollo de la PCR usando nuevos reactivos. Asegurarse de que el espacio de trabajo, equipos y los diferentes instrumentos necesarios para la elaboración de la PCR están descontaminados, libres de ácidos nucleicos.

2. Detección de señal de fluorescencia en el canal FAM (patógeno) en los controles negativos de PCR.

Posible causa	Solución
Contaminación ocurrida durante la preparación de la PCR.	<ul style="list-style-type: none"> Repetir la reacción de PCR con nuevos reactivos y si es posible varias réplicas de cada muestra. Si se utilizan tubos, cerrar cada uno de ellos directamente después de la adición de la muestra. Como norma estricta el control positivo se debe añadir el último y en un espacio físico distinto de dónde se añaden las muestras problema. Asegurarse de que el espacio de trabajo, equipos y los diferentes instrumentos necesarios para la elaboración de la PCR están descontaminados, libres de ácidos nucleicos.

3. Ausencia de señal de fluorescencia en el canal FAM en los controles positivos de PCR.

Posible causa	Solución
Selección incorrecta del canal del fluorocromo.	<ul style="list-style-type: none"> Selección del canal FAM para todas las muestras y controles a analizar

11. CONTROL DE CALIDAD:

Cada lote de producción ha sido contrastado con arreglo a nuestra certificación ISO de Sistema de Gestión de Calidad.

12. ASISTENCIA TÉCNICA:

Para disponer de más información o realizar cualquier consulta relativa al producto, contactar con:

INGENASA
 C/ Hnos. García Noblejas, 41 – 28037 MADRID
 Tel (+34) 91 368 0501
 e-mail: biologiamolecular@ingenasa.com

1. INTRODUCTION

INgene q PPA Probes is a real-time PCR kit suited for the detection of DNA of African Swine Fever Virus (ASFV) in biological samples in a simple way, with high levels of sensitivity and specificity.

The kit contains all necessary reagents and enzymes in two mixes. When mixed together, they are at the required concentrations designed to detect (and optionally quantify) ASFV, simply by adding the DNA of the problem sample. This kit makes use of a UPL® probe labelled with FAM. On the other hand, each Master Mix provides a positive internal control (PIC) with primers and a Taqman probe marked with VIC, allowing detection of false negatives due to an inhibition of the PCR. In addition, the master mix contains a passive reference fluorochrome, ROX, allowing the normalisation of the signal avoiding possible quantification errors deriving from pipetting differences. When using Applied Biosystems' ABI PRISM PCR models in real time, this ROX is necessary to prevent interferences between the data collected from various emission channels.

The kit includes an ASFV positive control for detection. The kit doesn't include a standard positive control with a known number of ASFV copies (ask our commercial department for standard control). This control allows generating a standard curve which links the number of pathogen copies with the cycle threshold (Ct) value.

The kit has been tested for every system from Applied Biosystems (StepOne, HT7300, HT7500) and LC480 from Roche. It is possible to work with other thermocyclers from other commercial houses, if they have at least two fluorescence channels, but Ct values may experiment changes.

2. KIT COMPOSITION:

COMPONENTS	Nº VIALS	VOLUMEN/VIAL
Mixture A (ASFV specific primers)	2	600 µl
Mixture B (enzyme mixture)	2	600µl
Positive Control A1 – ASFV Amplification control	1	60 µl

3. GUIDELINES FOR THE CORRECT CONSERVATION OF THE KIT COMPONENTS

On receiving the kit, keep it at -20°C until use. The components of the kit are stable for 1 year from the manufacturing date (see expiry date on packaging).

4. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Dust-free disposable gloves (without talcum powder).
- Microcentrifuge.
- Tube shaker.
- Real-time thermocycler.
- Micropipettes (0.5-1000 µl).
- Sterile pipette tips (with filter).
- Sterile DNAses / RNAses free water.

5. PRECAUTIONS TO AVOID CONTAMINATION

The following points should be read with care:

- Disposable items must be DNase and RNase-free.
- Use DNase and RNase-free distilled, autoclaved water (25 min., 120°C).
- Use sterile filtered tips.
- Ensure good homogenisation of the kit components once defrosted.
- Maintain the A and B mixes stored in ice at all times. Exposing them to temperatures above 4°C reduces the efficacy of the PCR.
- Repeated cycles of freezing and defrosting may reduce the sensitivity of the reagents. Protect them from exposure to light until use.

To avoid contaminations giving rise to false positives it is important to:

- Physically separate the positive PCR control from the remaining reagents of the kit.
- To carry out any handling of samples to be tested in a different location/room from the one where the amplified products are being analyzed.
- Add the positive PCR control in a different location/room from the one where the mix is added and where the samples to be tested are being handled.

6. SAMPLES COLLECTION AND TRANSPORT

The assay could be performed using any biological sample considered of interest by the clinician. Our technique has been standardised and contrasted with a considerable number of blood, sera, spleen and liver.

The following are some recommendations and/or limitations relating to the method of obtaining and sending the samples to the laboratory:

- The samples must be cooled from the moment they are obtained until they are processed. Processing needs to occur within 24 hours after obtaining the samples. In case a longer time is envisaged, we recommend freezing the samples.

7. DNA EXTRACTION

Any extraction procedure should be used which yields good-quality of the extracted material.

In case you have no optimized extraction procedures, INGENASA could provide extraction protocol and buffer under request.

Ingenasa have tested the following methods for the DNA extraction:

- Method of Chomczynski and Sacchi (Phenol extraction).
- Automatic magnetic methods (Mag Max TM96 total NA isolation Ref AM1840).
- Colum purification methods: QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), High pure PCR template Preparation kit (ROCHE).

There are several commercial houses that provide high quality extraction kits that could be used following the manufacturer instructions, like: Life-technologies, ROCHE, Quiagen, Marchery Nalgene, others.

CAUTION: If amplification is not going to be done immediately, preserve the DNA at -20 ° C .

8. AMPLIFICATION OF THE GENETIC MATERIAL

REQUIRED MATERIALS

- Crushed ice.
- DNA extracted from the samples.
- Mixture A – **KEEP IN CRUSHED ICE AT ALL TIMES.**
- Mixture B - **KEEP IN CRUSHED ICE AT ALL TIMES.**
- Positive amplification control A1 (ASFV).
- DNAase-RNAase-free water.

PROCEDURE

1. Prepare and identify as many tubes for the amplification as samples to be processed, adding an additional tube for the positive amplification control, and another one for the negative control.
2. Take mixtures A and B out from the cooler keeping them in crushed ice. Make sure that they are correctly homogenised before taking out the required volume for the assay.
3. Prepare an appropriate amount of amplification mixture for the number of samples to be processed. The volume of each reagent to be mixed for each of the samples is:

	Mixture A	Mixture B	Final Master Mix Volume
Per sample	10 µl	10 µl	20 µl
For 10 samples	100 µl	100 µl	200 µl

The tube used for mixing should be kept in crushed ice at all times. Likewise, it is recommendable to prepare an excess amount of mixture (calculate an extra 10% for all reagents) in order to compensate for possible losses of volume during pipetting.

4. Once mixture is prepared, homogenise correctly. Place the tubes previously labelled in crushed ice and add 20 µl of the mixture prepared in this way to each tube.

Add 2 µl of previously extracted DNA samples to each tube, 2 µl of positive control A1 (amplification control for ASFV), to the corresponding tube and 2 µl of water to the tube labelled as negative control. Carefully mix the contents of each tube and ensure that all the liquid has been deposited at the bottom of the tube. If not, tubes may be centrifuged lightly until this occurs.

6. Set the thermocycler to the following conditions:

	Temperature (°C)	Time	Cycles
Desnaturalization	95	5 min	1
Amplification	95	10 sg	45
	60 *	30 sg	

7. Reading the fluorescence takes place during the elongation step (marked in the table)*, and the channels through which the fluorescence data are collected are detailed in table :

	Reporter	Quencher
ASFV	FAM	None
I.C.	VIC	None
Passive reference	ROX	

9. ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

Analysis of results

Each problem sample analyzed yields data regarding the fluorescence originated from channel FAM. Automatic threshold analysis (threshold and baseline) is recommended.

If this option is not viable, the analysis can be carried out manually following the thermocycler instructions.

The assay will be considered as valid when the C+ have a Ct value within the range 32₊₄ and the C- Ct_{>45} in the FAM channel

Possible results are summarised in the table:

FAM channel: pathogen detection

A positive result during amplification implies a typical fluorescence curve with a Ct value <45.

Samples with Ct's comprised between 40 and 45 should be regarded as doubtful. In that case we recommend:

- Repeating the analysis.
- Sequencing the amplified product.

VIC channel: Internal Control detection

A positive result during amplification implies a typical fluorescence curve with a Ct value <45. Normally, values are comprised within a range of 30 <Ct < 45

Table: Possible results.

Cases	Channel FAM	Channel VIC	Results
A	+	+	Positive
B	+	-	Positive
C	-	+	Negative
D*	-	-	Null/inhibited

*Repeat the analysis diluting DNA 1/40 to avoid inhibitors, before considering the sample as negative.

Table: Results validation

Case	Problem sample	Negative extraction control	Positive PCR control	Negative PCR control	Result of problem sample
1	+	-	+	-	+
2	-	-	+	-	-
3		+			Nulo
4		-		+	Nulo

Case 1. Both the problem sample and the positive PCR control exhibit a positive result, whereas the negative extraction and PCR controls yield a negative result.

Positive result: the sample contains ASFV.

Case 2. The positive PCR control exhibits a positive result, whereas the problem sample and the negative extraction and PCR controls yield a negative result.

Negative result: the sample does not contain any ASFV.

Case 3. The negative extraction control yields a positive result.

Result invalidated or null. Go back to extraction step.

Case 4. The negative extraction control exhibits a negative result, whereas the negative PCR control yields a positive result.

Result invalidated or null. Go back to amplification step.

10. TROUBLESHOOTING

Detection of fluorescence signal on FAM channel in the negative extraction control.

Possible cause	Solution
Contamination during extraction process	<ul style="list-style-type: none"> Repeat the DNA extraction process and PCR using new reagents. Ensure that the workplace, equipment and all instruments used for performing the PCR are decontaminated, i.e. free from nucleic acids.

Detection of fluorescence signal on FAM channel (pathogen) in the negative PCR control.

Possible cause	Solution
Contamination during PCR preparation.	<ul style="list-style-type: none"> Repeat PCR reaction with new reagents and, if possible, various replicates of each sample. If tubes are being used, close each one immediately after adding the sample. As a strict rule, the positive control must be added last and in a separate physical location from where the problem samples are added. Ensure that the workplace, equipment and all instruments used for performing the PCR are decontaminated, i.e. free of nucleic acids.

Absence of fluorescence signal on FAM channel in the positive PCR controls.

Possible cause	Solution
Wrong fluorochrome channel selected	<ul style="list-style-type: none"> Check that you select the FAM channel for all samples and controls to be analyzed.

11. QUALITY CONTROL:

Each production batch of this kit, has been checked under our ISO-certified Quality Management System.

12. TECHNICAL ASSISTANCE:

For further information concerning the assay and its performance, please contact:

INGENASA
 C/ Hnos. García Noblejas, 41 – 28037 MADRID
 Tel (+34) 91 368 0501
 e-mail: biologiamolecular@ingenasa.com