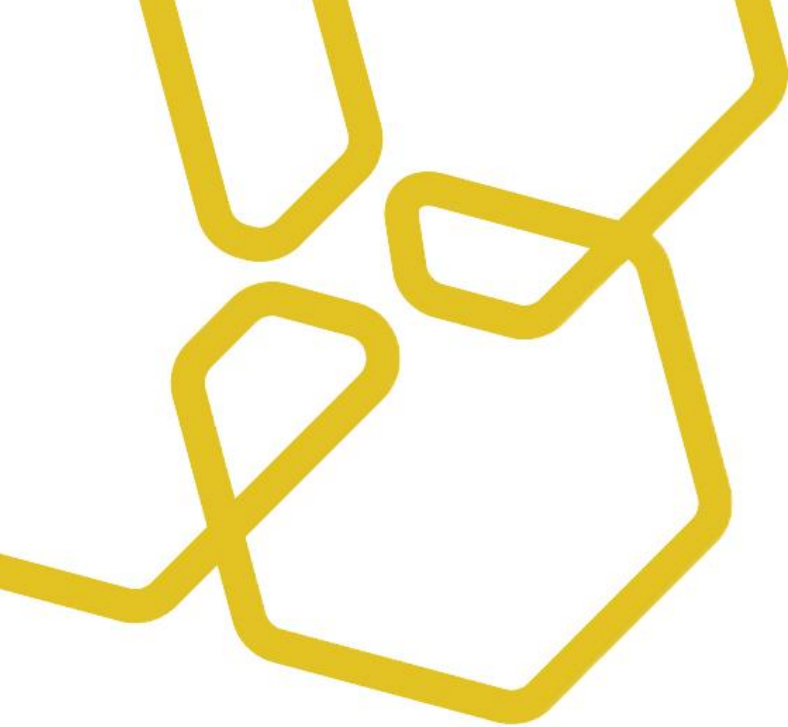




INgene® q PPA

Cat. No. R.11.PPA.K.5TX/Q

Registro en España nº 3293. Registrado en Alemania Fli-B 669.

Spanish registration nº 3293. German registration Fli-B 669.

Kit qPCR para la detección del Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) en muestras biológicas.

Real Time PCR (Tecnología TaqMan™). 100 reacciones.

qPCR kit for the detection of African Swine Fever Virus (ASFV) in biological samples.

Real Time PCR (TaqMan™ technology). 100 reactions.



Índice de Contenidos (ESPAÑOL)

1.	INTRODUCCIÓN	3
2.	USO PREVISTO	3
3.	PRINCIPIO DEL ENSAYO.....	3
4.	COMPOSICIÓN DEL KIT	3
5.	CONSERVACIÓN DEL KIT	3
6.	MATERIALES Y EQUIPOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.....	4
7.	PAUTAS DE TRABAJO Y PRECAUCIONES PARA EVITAR CONTAMINACIONES	4
8.	RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	4
9.	EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO	4
10.	AMPLIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO	5
11.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	6
12.	LOCALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	7
13.	CONTROL DE CALIDAD	8
14.	ASISTENCIA TÉCNICA Y PEDIDOS	8

Index of contents (ENGLISH)

1.	INTRODUCTION.....	8
2.	INTENDED USE	9
3.	PRINCIPLE OF THE ASSAY	9
4.	KIT COMPOSITION	9
5.	CONSERVATION OF THE KIT COMPONENTS	9
6.	MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	10
7.	WORKING GUIDELINES AND PRECAUTIONS TO AVOID CONTAMINATION	10
8.	SAMPLES COLLECTION AND TRANSPORT	10
9.	DNA EXTRACTION	10
10.	AMPLIFICATION OF THE GENETIC MATERIAL	11
11.	ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS	12
12.	TROUBLESHOOTING.....	13
13.	QUALITY CONTROL.....	14
14.	TECHNICAL ASSISTANCE AND ORDERS	14

1. INTRODUCCIÓN

INgene q PPA es un kit de PCR a tiempo real, diseñado para detectar la presencia de ADN del virus de la peste porcina africana (VPPA, en inglés ASFV) en muestras biológicas de un modo sencillo y con elevada sensibilidad y especificidad.

La peste porcina africana es una enfermedad hemorrágica altamente contagiosa y letal en cerdos domésticos y salvajes, que causa graves pérdidas productivas. El agente causal VPPA es un virus con envuelta y un genoma compuesto por ADN bicatenario que pertenece a la familia *Asfarviridae*, género *Asfivirus*.

En el pasado se detectaron brotes en África, partes de Europa, Sudamérica y el Caribe. Desde 2007, la enfermedad ha sido reportada en varios países africanos, asiáticos y europeos, tanto en cerdos domésticos como salvajes.

2. USO PREVISTO

INgene q PPA es un ensayo de PCR a tiempo real diseñado para la detección del DNA del virus de la Peste Porcina Africana en muestras biológicas de interés clínico, tales como sangre, suero, bazo, hígado.

El ensayo ha sido utilizado desde el año 2014 para la detección de VPPA en cerdos domésticos y salvajes del Este de Europa y China.

Sólo para uso veterinario.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

INgene q PPA es un kit de amplificación y detección molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Consiste en un ensayo duplex de PCR a tiempo real en formato de un solo pocillo. El kit contiene los reactivos y enzimas necesarios en dos mezclas que una vez combinadas en las proporciones indicadas, permiten detectar (opcionalmente cuantificar) el genoma de VPPA, de forma que sólo sea necesaria la adición del ADN de la muestra problema.

El ensayo utiliza cebadores específicos y una sonda tipo TaqManTM marcada con el fluoróforo FAMTM para la detección del ADN de VPPA. Además, la mezcla de reacción incluye un control interno (C.I., de origen exógeno), que se amplifica con cebadores específicos y se detecta con una sonda marcada con el fluoróforo HEXTM, 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 pasiva de la señal, en el caso de utilizar modelos de termociclador que así lo requieran. Los niveles de ROX en la mezcla están optimizados para los equipos que necesitan LOW ROX. En el caso de utilizar termocicladores que requieran niveles superiores para su óptima normalización, la cantidad de ROX podrá ser suplementada por parte del usuario.

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

El kit ha sido validado en los equipos QuantstudioTM 5 y StepOnePlusTM (Applied BiosystemsTM), LightCycler[®] 480 II de Roche. Es compatible con equipos que permitan la medida de los dos fluoróforos de interés, aunque los valores de Ct pueden variar en función del equipo utilizado.

4. COMPOSICIÓN DEL KIT

COMPONENTES (100 reacciones)	Nº VIALES	VOLUMEN/VIAL
Mezcla A: oligonucleótidos y sonda específicos para VPPA + C.I.	2	300 µl
Mezcla B: mezcla de enzimas	2	600 µl
Control Positivo A1: control de amplificación de VPPA	1	120 µl

5. CONSERVACIÓN DEL KIT

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

6. MATERIALES Y EQUIPOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Guantes desechables sin talco
- Microcentrífuga
- Agitador de tubos
- Termociclador de tiempo real
- Micropipetas (0,5-1000 µl)
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agua libre de DNasa/RNasas (calidad biología molecular)

7. PAUTAS DE TRABAJO Y PRECAUCIONES PARA EVITAR CONTAMINACIONES

En general deben mantenerse las siguientes normas básicas de trabajo:

- Uso de material fungible libre de DNasas/RNasas.
- Uso de agua libre de DNasa/RNasas (calidad biología molecular).
- Uso de puntas estériles con filtro.
- Buena homogeneización de los componentes del kit una vez descongelados.
- Mantener en todo momento los reactivos en hielo.
- Evitar ciclos sucesivos de congelación y descongelación que podrían afectar al rendimiento del kit. Si se prevé un uso intermitente 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 cruzadas o ambientales que generen falsos positivos, es importante:

- Separar físicamente el control positivo de PCR del resto de reactivos del kit.
- Nunca almacenar los componentes del kit cerca de muestras positivas o productos de amplificación.
- Utilizar áreas de trabajo separadas y materiales específicamente dedicados a cada paso del proceso, con un flujo de trabajo unidireccional para: (1) la manipulación de las muestras, (2) preparación de la reacción de qPCR, (3) amplificación mediante qPCR y (4) sólo si procede, análisis de los productos amplificados.
- Si lo anterior no fuera posible, separar al menos dos áreas de trabajo, pre-PCR (pasos 1 y 2) y post-PCR (pasos 3 y 4).
- Durante el ensamblaje de la reacción, el control positivo de PCR debe ser manipulado y añadido en último lugar, evitando que pueda entrar en contacto con el resto de los componentes del kit.

8. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

INgene q PPA 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 de mayor interés desde el punto de vista clínico.

Las muestras deben ser recogidas y manipuladas con cuidado para evitar contaminaciones y ser enviadas al laboratorio de análisis tan pronto como sea posible, siguiendo las pautas regulatorias de transporte.

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.

9. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

Para la extracción del ADN se utilizará cualquier procedimiento disponible en el laboratorio con el que se obtenga una buena calidad de material genético a partir de las muestras. En paralelo a la extracción del material genético de las muestras se recomienda añadir un control negativo de extracción, sustituyendo la muestra por agua libre de nucleasas, para poder trazar posibles contaminaciones cruzadas en cada paso del proceso.

GSD Madrid 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 (MagMAX™ Total NA Isolation Kit, Applied Biosystems™).
- 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: Applied Biosystems™, ROCHE, QIAGEN, MACHEREY-NAGEL, otras.

*En el caso de utilizar extracción fenólica, puede ser necesario reducir la cantidad de ADN molde en la reacción o diluir el resultado de la extracción para evitar posibles inhibiciones.

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

10. AMPLIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

MATERIALES NECESARIOS

- Cubeta de hielo o soportes de muestras refrigerados
- ADN extraído de las muestras
- Mezclas A y B del kit – MANTENER EN HIELO Y PROTEGIDAS DE LA LUZ mientras su uso
- Control positivo de amplificación A1 (VPPA)
- Agua libre de DNAsas y RNAsas (calidad biología molecular)
- Tubos/placas con tapas/cubiertas ópticas compatibles con el termociclador
- Tubos de reacción de 1,5 ml libres de nucleasas

PROCEDIMIENTO

1. Preparar tantos tubos/pocillos de placa de PCR para la amplificación como muestras vayan a procesarse, añadir necesariamente un tubo adicional para el control positivo de amplificación y otro para el control negativo. Identificar los tubos/placas sin rotular directamente, lo que podría interferir con la lectura óptica.
2. Descongelar las mezclas A y B sobre hielo/soporte refrigerado hasta su total descongelación. Agitarlas ligeramente para su correcta homogenización y preparar la mezcla de amplificación añadiendo en un tubo un volumen necesario para el número total de muestras que vayan a procesarse. Tener en cuenta los controles que se van a introducir en el ensayo. Mantener los componentes del kit (y la mezcla de reacción) protegidas de la luz y en hielo/soporte refrigerado.

Preparación de la mezcla de reacción:

	Volumen Mezcla A	Volumen Mezcla B	Master Mix I	Vol. Final de Master Mix (+10%)
Por muestra	5 µl	10 µl	15 µl	16,5 µl
Para 10 muestras	50 µl	100 µl	150 µl	165 µl

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.

3. Disponer los tubos/placa de PCR en hielo y añadir a cada tubo/pocillo 15 µl de la mezcla de reacción.
4. Añadir a cada uno de los tubos 5 µl de muestra de ADN extraído previamente o, en su lugar, 5 µl de los controles de la reacción indicados a continuación:

Tipo de muestra/control	Componente	Volumen
Muestra	ADN extraído de muestras biológicas	5 µl
Control de extracción	Control de agua extraído en paralelo a las muestras	5 µl
Control positivo (C+)	Control positivo de amplificación A1 (VPPA)	5 µl
Control negativo (C-)	Agua libre de nucleasas	5 µl

5. Cerrar/sellar los tubos/placas y mezclar suavemente el contenido y asegurarse de que todo el líquido se encuentra depositado en el fondo del tubo. Si no fuera así, centrifugar ligeramente.
6. Programar la reacción siguiendo las instrucciones de uso del termociclador a tiempo real, utilizando los siguientes parámetros:

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

La lectura de la fluorescencia se realiza en el paso de hibridación y elongación (señalado en la tabla*) utilizando los canales de lectura indicados a continuación:

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

11. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Analizar los datos con el software del termociclador siguiendo las instrucciones del fabricante.

De cada muestra analizada se obtienen datos relativos a la fluorescencia proveniente del canal FAM y HEX/JOE/VIC.

Elegir en primer lugar para el análisis la selección automática del umbral. Alternativamente, en el caso de que el umbral establecido de forma automática sea incorrecto, analizar manualmente, seleccionando un umbral por encima del background y en la fase exponencial de amplificación y una línea base anterior a la detección significativa de la fluorescencia.

Interpretación de los datos de fluorescencia:

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 típica 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 $Ct \geq 45$

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 $Ct \geq 45$ en el canal FAM.

Control	Canal FAM Detección del patógeno	Canal HEX/JOE/VIC Detección del Control Interno	Resultado
Control negativo (C-)	No detectado (ND), $Ct \geq 45$	No relevante	PCR Válida
	$Ct < 45$	No relevante	PCR Inválida (ver sección 12.1)
Control positivo (C+)	$Ct 32 \pm 4$	No relevante	PCR Válida
	$Ct < 28$ o $Ct > 36$	No relevante	PCR Inválida (ver sección 12.2)
Control de extracción	No detectado (ND), $Ct \geq 45$	No relevante	Extracción Válida
	$Ct < 45$	No relevante	Extracción Inválida (ver sección 12.3)

Si los criterios de validación de los controles de reacción se cumplen, la interpretación de los resultados de las muestras son los siguientes:

Tabla: Interpretación de los resultados de las muestras.

Caso	Muestra	Canales de detección		Resultado	Interpretación
		FAM	HEX		
1	Muestra problema	Positivo (Ct < 45)	Positivo (Ct < 45) o Negativo (Ct ≥ 45)	Positivo	La muestra contiene ADN de VPPA
2	Muestra problema	Positivo (Ct ≥ 40 y Ct < 45)	Positivo (Ct < 45) o Negativo (Ct ≥ 45)	Dudoso	Los niveles de ADN de VPPA detectados son muy bajos y se aconseja reconfirmar el resultado
3	Muestra problema	Negativo (Ct ≥ 45)	Positivo (Ct < 45)	Negativo	La muestra no contiene ADN de VPPA
4	Muestra problema	Negativo (Ct ≥ 45)	Negativo (Ct ≥ 45)	Inválido	Posible inhibición (ver sección 12.4)

12. LOCALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

12.1. 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	- 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 manipular y añadir en último lugar, evitando que pueda entrar en contacto con el resto de las muestras y 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.

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

Posible causa	Solución
Selección incorrecta del canal del fluorocromo	Selección del canal FAM para todas las muestras y controles a analizar.
Análisis incorrecto de la reacción (automático o manual)	Verificar la correcta posición del umbral, línea base y correcta selección de la fluorescencia pasiva (ROX) en caso necesario según el termociclador.

12.3. 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	• 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.

12.4. Ausencia de señal de fluorescencia en ambos canales FAM y HEX en el caso de muestras negativas.

Posible causa	Solución
Inhibición de la reacción	• Diluir 1/40 las muestras de ADN extraído y repetir la reacción. • Si en la repetición con la muestra diluida persiste la inhibición, repetir la extracción de ADN a partir de la muestra biológica.

13. CONTROL DE CALIDAD

Cada lote de producción ha sido contrastado con arreglo a nuestra certificación ISO9001 y 14001 de Sistema de Gestión de Calidad.

14. ASISTENCIA TÉCNICA Y PEDIDOS

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

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID, S.A

e-mail: biologiamolecular.Spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

Para la realización de pedidos contacte con:

e-mail: cs.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID, S.A.

Calle de los Hermanos García Noblejas, 39-8º

28037, Madrid, España.

Tel: +34 91 368 0501

Websites: www.goldstandarddiagnostics.es www.goldstandarddiagnostics.com



1. INTRODUCTION

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

African swine fever infection causes a lethal haemorrhagic disease in domestic and wild pigs, with important productive losses. African swine fever virus (ASFV) is a large, enveloped, icosahedral double-stranded DNA virus that belongs to the *Asfviridae* family, genus *Asfivirus*.

In the past, outbreaks were detected in Africa, parts of Europe, South America and the Caribbean. More recently, since 2007, the disease has been reported in several African countries, Asia and Europe, in both domestic and wild pigs.

2. INTENDED USE

INgene q PPA is a real-time PCR kit suited for the detection of DNA of African Swine Fever Virus (ASFV) DNA in biological samples of clinical interest, such as blood, serum, spleen and liver.

The kit has been used since 2014 to monitor domestic and wild pigs in Eastern Europe and China.

For veterinary use only.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

INgene q PPA is an assay for amplification and detection of the ASFV genetic material based on the polymerase chain reaction (PCR). The assay consists of a duplex real-time PCR in a one-well format. The kit contains all necessary reagents and enzymes to amplify and simultaneously detect ASFV genetic material in extracted DNA samples. The reagents are included in two mixes, that once combined in the indicated proportions, are in optimal concentrations to detect (and optionally quantify) the genetic material of ASFV, simply by adding the extracted DNA of the problem sample. 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 amount of ROX in the master mix is adjusted for the thermocyclers that are indicated to use LOW ROX (such as Applied Biosystems Quantstudio5). In the case that higher ROX levels are required it should be supplemented by the end user.

The kit includes an ASFV positive control for detection. If a standard positive control with a known number of ASFV copies is required, it can be available upon request. This control could be used to generate a standard curve in order to correlate the number of pathogen copies with the cycle threshold (Ct) value.

The kit has been validated in the following PCR platforms from Applied Biosystems™: Quantstudio™ 5; StepOnePlus™ and LightCycler® 480 II from Roche. It is compatible with other thermocyclers, if they have the appropriate fluorescence channels, but Ct values may vary among them.

4. KIT COMPOSITION

COMPONENTS (100 reactions)	Nº VIALS	VOLUME/VIAL
Mixture A: ASFV and I.C. specific primers and probes	2	300 µl
Mixture B: enzyme mix	2	600 µl
Positive Control A1: ASFV amplification control	1	120 µl

5. CONSERVATION OF THE KIT COMPONENTS

All components have to be stored at -20°C immediately after arrival and until the moment of use and protected from light. The components of the kit are stable for 1 year from the manufacturing date (see expiry date on packaging).

6. MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Powder-free disposable gloves
- Microcentrifuge
- Tube shaker
- Real-time thermocycler
- Micropipettes (0,5-1000 µl)
- Sterile pipette tips (with filter)
- DNase/RNase-free water, molecular grade

7. WORKING GUIDELINES AND PRECAUTIONS TO AVOID CONTAMINATION

The following working guidelines should be carefully observed:

- Use DNase/RNase-free disposable consumables.
- Use DNase/RNase-free water, molecular grade.
- Use sterile filtered tips.
- Ensure good homogenisation of the kit components once defrosted.
- During use, keep all the kit components on ice/cooling block.
- Avoid repeated cycles of freezing and defrosting of the kit components, as it can reduce kit performance. Protect kit reagents from light exposure until their immediate use.

Special precautions to avoid ambient or cross-contaminations that could cause false positive results:

- The positive PCR control should be stored separately from the rest of kit reagents.
- Store the kit components in dedicated areas separated from samples or amplification products.
- Use separate working areas with dedicated material and unidirectional workflow, for every step of the process: (1) Sample manipulation and extraction; (2) qPCR setup; (3) qPCR amplification and (4) just in the case needed, analysis of amplified products.
- If the above recommendation is not feasible, separate at least two separated areas, pre-PCR (steps 1 and 2) and post-PCR (steps 3 and 4).
- During the qPCR setup, the positive control should be manipulated and dispensed in the last place, avoiding the contact with the other kit components.

8. SAMPLES COLLECTION AND TRANSPORT

INgene q PPA is a real-time PCR kit suited for the detection of DNA of African Swine Fever Virus (ASFV) DNA in biological samples of clinical interest. Our assay has been optimized and specifically tested for blood, sera, spleen and liver samples, as those specimens are of clinical importance.

Samples should be collected and handled carefully to avoid contamination and should arrive in the testing laboratory as soon as possible, following national regulations for their transport. The samples must be cooled from the moment they are obtained and during the transport until they are processed. Processing needs to occur within 24 hours after obtaining the samples. In case a longer time is envisaged, freezing of samples is recommended.

9. DNA EXTRACTION

Any extraction procedure which yields good quality of the extracted material could be used. Parallel to the extraction of the genetic material of the samples, it is advised to perform a mock-extraction, in which the biological sample is replaced by nuclease-free water, to check possible contamination during the extraction procedure.

GSD Madrid has tested the assay with the following methods for the DNA extraction:

- Method of Chomczynski and Sacchi (Phenol extraction*).
- Automatic magnetic methods (MagMAX™ Total NA Isolation Kit, Applied Biosystems™).
- Colum-based purification methods The QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). High pure PCR template Preparation kit (ROCHE).
- Several commercial suppliers could provide high quality nucleic-acid extraction, following the manufacturer instructions, such as: Applied Biosystems™, ROCHE, QIAGEN, MACHEREY-NAGEL, others.

*In case of using phenolic extractions, it might be needed to reduce/dilute the DNA input in the qPCR reaction to avoid potential inhibition.

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

10. AMPLIFICATION OF THE GENETIC MATERIAL

REQUIRED MATERIALS

- Ice bucket or cooling block
- DNA extracted from the samples
- Mixture A and B from the kit – KEEP ON ICE AND PROTECTED FROM LIGHT meanwhile PCR setup, store at -20°C afterwards
- Positive amplification control A1 (ASFV)
- DNAase-RNAase-free water (molecular grade)
- Tubes/plates with optical caps/sealing compatible with thermocycler
- DNAase-RNAase-free tubes (1,5 ml)
-

PROCEDURE

1. Prepare as many tubes or PCR plate wells for the amplification as samples to be processed, adding additional tubes for the positive and the negative amplification controls. Identify positions avoiding direct label on the tubes/plates at it could interfere with optical reading.
2. Thaw and keep mixes A and B on ice/cooling block. Make sure that they are correctly homogenised before pipetting. Prepare a fresh amplification mix by adding in one tube the amount needed for the total number of samples to be processed, including the necessary controls. Keep the mixes A and B (and the amplification mix) always on ice/cooling block and protected from light.
3. Prepare the amplification mix on ice as follows. It is advisable to prepare an excess amount of mix (calculate an extra 10% for all reagents) in order to compensate for possible losses of volume during pipetting:

	Mixture A	Mixture B	Master Mix	Final Master mix volume (+10%)
Per sample	5 µl	10 µl	15 µl	16,5 µl
For 10 samples	50 µl	100 µl	150 µl	165 µl

4. Once mixture is prepared, homogenise it correctly. Place the PCR plate or strips on ice/cooling block and add 15 µl of the final reaction mix to each well.
5. Add 5 µl of each extracted sample to the corresponding tube or reaction well of the PCR plate, or alternatively, of each of the reaction controls indicated.

Type of sample/control	Component	Volume
Sample	Extracted DNA from biological samples	5 µl
Extraction control	Extraction of a water control, in parallel to the samples	5 µl
Positive control (C+)	Positive amplification control A1 (ASFV)	5 µl
Negative control (C-)	Nuclease-free water	5 µl

6. Close/seal the tubes/plate and mix carefully the content, make sure the liquid is at the bottom of the tubes/wells. Otherwise, spin down briefly in a centrifuge.
7. Insert the plate/tubes in the real-time instrument and follow the specific instructions to programme the reaction according to the following conditions:

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

8. Reading of fluorescence takes place during the hybridisation/elongation step (asterisk in the table*), using the indicated fluorescence channels:

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

11. ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

At the end of the run, results should be analysed with the software of the thermocycler, following the manufacturer instructions. From each sample, fluorescence data originated from channels FAM and HEX/JOE/VIC is obtained. It is recommended in first place to select the automatic analysis mode for threshold and baseline determination. Alternatively, in the case that the automatic threshold is set incorrectly, adjust it manually following the thermocycler instructions. The threshold should be placed above the background and in the initial phase of the exponential curve. The baseline start and end cycles, should be set before any significant fluorescence is detected.

Interpretation of fluorescence data:

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 typical fluorescence curve with a Ct value < 45. Normally, values are comprised within a range of $30 < Ct < 45$.

In both channels: a negative result implies absence of amplification (undetected) or a $Ct \geq 45$.

Criteria for the kit validation:

The assay will be considered as valid when the C+ has a Ct value within the range 32 ± 4 and the negative control $Ct \geq 45$ in the FAM channel.

Before interpreting the samples result, check the validation criteria of the controls:

Control	FAM channel Pathogen detection	HEX/JOE/VIC channel Internal Control detection	Result
Negative control (C-)	undetected (ND), $Ct \geq 45$	Not relevant	Valid PCR
	$Ct < 45$	Not relevant	Invalid PCR (see section 12.1)
Positive control (C+)	$Ct 32 \pm 4$	Not relevant	Valid PCR
	$Ct < 28$ o $Ct > 36$	Not relevant	Invalid PCR (see section 12.2)
Extraction control	undetected (ND), $Ct \geq 45$	Not relevant	Valid extraction control
	$Ct < 45$	Not relevant	Invalid extraction (see section 12.3)

In the case that the validation criteria of the controls are met, the interpretation of the sample results should be as follows:

Table: Interpretation of sample results.

Case	Sample	Detection channels		Result	Interpretation
		FAM	HEX		
1	Problem sample	Positive (Ct < 45)	Positive (Ct < 45) or Negative (Ct ≥ 45)	Positive	Sample contains DNA of ASFV
2	Problem sample	Positive (Ct ≥ 40 y Ct < 45)	Positive (Ct < 45) or Negative (Ct ≥ 45)	Doubtful	The detected levels of ASFV genetic material are very low and it is recommended to repeat the test to verify this result
3	Problem sample	Negative (Ct ≥ 45)	Positive (Ct < 45)	Negative	Sample does NOT contain DNA of ASFV
4	Problem sample	Negative (Ct ≥ 45)	Negative (Ct ≥ 45)	Invalid	Possible inhibition (See section 12.4)

12. TROUBLESHOOTING

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

Possible cause	Solution
Contamination during PCR setup	- Repeat PCR reaction with new reagents. - If tubes are being used, close each one immediately after adding the sample. - As a strict rule, the positive control must be manipulated and added in last place and avoiding any contact with the rest of reaction components. - Ensure that the workplace, equipment and all instruments used for performing the PCR are decontaminated, i.e. free of nucleic acids.

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

Possible cause	Solution
Wrong fluorochrome channel selected	Check that FAM channel is selected for all samples and controls to be analysed.
Wrong analysis settings (automatic or manually selected)	Verify the adequate positioning of the threshold and baseline, and the corrected selection of passive fluorescence dye (ROX) in the case needed, according to the instrument requirements.

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

Possible cause	Solution
Contamination during extraction process	- 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.

12.4. Absence of fluorescence signal in both fluorescence channels FAM y CY5 in the case of negative samples.

Possible cause	Solution
PCR inhibition	- Dilute 1/40 the extracted DNA material and repeat the PCR reaction. - In the case that inhibition persists with the diluted sample, repeat the DNA extraction from the biological sample.

13. QUALITY CONTROL

Each production batch of this kit has been validated under our ISO-9001 and 14001 certified Quality Management System.

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND ORDERS

For further information concerning the assay and its performance:

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID, S.A

e-mail: biologiamolecular.Spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

For placing orders, please contact:

e-mail: cs.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID, S.A.

Calle de los Hermanos García Noblejas, 39-8º

28037, Madrid, España.

Tel: +34 91 368 0501

Websites: www.goldstandarddiagnostics.es www.goldstandarddiagnostics.com

