



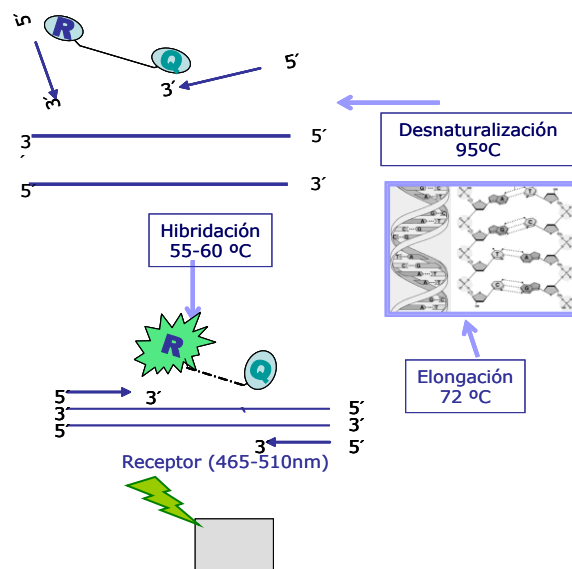
Ingene q PPA Sondas Detección es un ensayo de detección molecular de **peste porcina africana (PPA)** en muestras biológicas de un modo sencillo y con unos niveles de sensibilidad y especificidad extremadamente altos.

El kit posee los reactivos y enzimas necesarios en **dos mezclas** que una vez unidas en un único envase se encuentran en concentraciones idóneas, y está diseñado con el objeto de que únicamente sea necesaria la adición del ácido nucleico de la muestra problema, para detectar el agente patógeno. Se utiliza una sonda UPL® marcada con FAM. El kit incluye otra sonda marcada en VIC como control interno de la reacción, permitiendo detectar falsos negativos debidos a una inhibición de la PCR. Cada master mix contiene, además, un fluorocromo pasivo de referencia, ROX, que permite una normalización de la señal, evitando posibles errores debidos a diferencias de pipeteo.

El kit incluye un control positivo para detección. Bajo pedido se puede suministrar un control positivo Standard, de número de copias conocido. 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).

BASE TÉCNICA DEL KIT

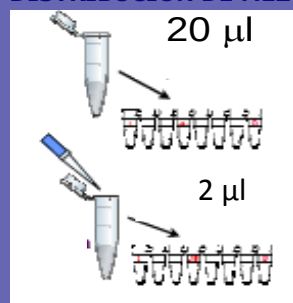
1. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la utilización de enzimas termoestables que en presencia de una secuencia de ácido nucleico cebadora ("primers"), son capaces de copiar un ácido nucleico que sirve como molde, basándose en la complementariedad de bases del ADN.
2. La mezcla A1 contiene primers específicos de una secuencia del ácido nucleico del patógeno y una sonda interna marcada con FAM (Reporter) y apantallada por un quencher (NFQ).
3. La mezcla B contiene las enzimas necesarias para la amplificación específica del fragmento de ácido nucleico interno a los primers.
4. Si existe amplificación porque el ácido nucleico del patógeno está presente en la muestra, la sonda es degradada y el fluoróforo se separa del quencher, emitiendo fluorescencia.
5. Si no se da amplificación porque la muestra no contiene ácido nucleico del patógeno, la sonda no es degradada y no se produce emisión de fluorescencia.



PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS

Mezcla A1 10 µl
Mezcla B 10 µl
Volumen de mezcla final/muestra=20 µl

DISTRIBUCIÓN DE MEZCLAS

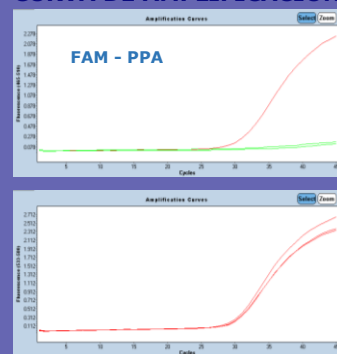


PROGRAMA DE TERMOCICLACIÓN

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos	Reacción
95	10 min	1	PCR
95	10 sg	45	
60*	30 sg		

Fluorescencia	Positivos	Negativos	Inhibidos
FAM-PPA 465-510 nm	+	-	-
VIC-CI 533-580 nm	+/-	+	-

CURVA DE AMPLIFICACIÓN



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia típica en **FAM** con un valor del ciclo umbral Ct **<40**. Las muestras negativas presentarán amplificación con lectura en **VIC** (en caso contrario, deberán repetirse diluyéndole molde de partida).

Serán muestras dudosas aquellas con Ct's que se encuentren entre **40-45**. Para estos casos recomendamos:

- Repetir el análisis.
- Secuenciar el producto amplificado.

El producto ha sido validado por el Laboratorio de Referencia Europeo para PPA :Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA)

COMPOSICIÓN DEL KIT

Mezcla A1: (primers y sonda específicos para **PPA + CI**)
Mezcla B: Mezcla de enzimas
Control Positivo A1



PRODUCTO FABRICADO POR INGENASA



IT-73840
IT-73780



9191.INGE



9175.ING2

CADUCIDAD: 12 meses
Conservado a -20°C



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

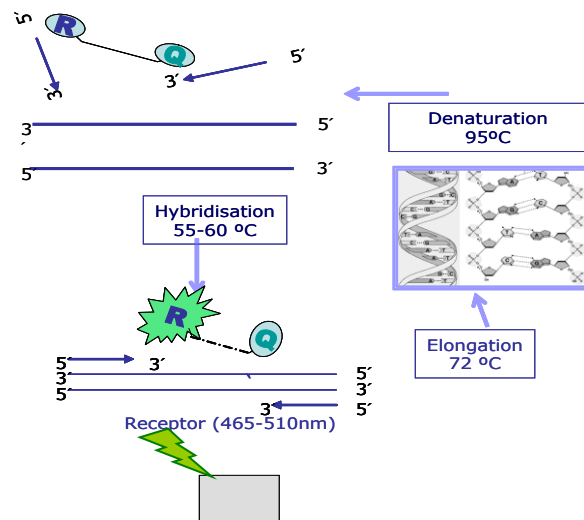
Ingene q PPA Sondas Detection is a real-time PCR kit suited for the detection of nucleic acid of **African swine fever** in biological samples in a simple way, with high levels of sensitivity and specificity.

The kit contains all necessary reagents and enzymes in **two mixes**. When mixed together, they are at the required concentrations designed to detect the pathogen, simply by adding the nucleic acid of the problem sample. This kit makes use of a UPL® probe labelled with FAM. It also includes another probe, labelled in VIC, as internal control of the reaction, 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 normalization of the signal, avoiding possible quantification errors deriving from pipetting.

The kit includes a positive control for detection. A standard positive control with a known number of copies can be supplied under request. This control allows generating a standard curve which links the number of pathogen copies with the cycle threshold (Ct) value.

TECHNICAL BASIS

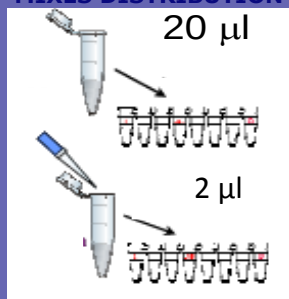
1. Polymerase chain reaction (PCR) is based on the use of heat-stable DNA polymerase, which assembles a new DNA strand, by using DNA as a template and DNA oligonucleotides (primers) to selectively amplify the target DNA of the sample. The reaction is specific because of the bases complementarities.
2. Mix A1 includes specific primers and probe complementary to the pathogen DNA.
3. Mix B contains all necessary enzymes for specific amplification of a nucleic acid fragment from the pathogen.
4. The probe is labelled with a fluorophore (FAM) in 5' and with a quencher (NFQ) in 3'.
5. During elongation, the enzyme cuts the probe and the fluorophore is separated from the quencher, emitting fluorescence between 465-510 nm. If pathogen is not present in the sample, there is no fluorescence emission.



PREPARATION OF THE PCR

Mix A1 10 µl
Mix B 10 µl
Mix final volumen/sample = 20 µl

MIXES DISTRIBUTION

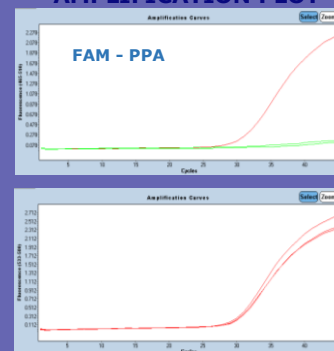


THERMOCYCLER PROGRAMME

Temperature(°C)	Time	Cycles	Reaction
95	10 min	1	PCR
95	10 s	45	
60*	30 s		

Fluorescence	Positives	Negatives	Inhibited
FAM-PPA 465-510 nm	+	-	-
VIC-CI 533-580 nm	+/-	+	-

AMPLIFICATION PLOT



INTERPRETATION OF RESULTS

A positive result during amplification implies a typical **FAM** fluorescence curve with a Ct value <40. Negative samples will amplify with fluorescence lecture in **VIC** (otherwise they should be analyzed again, diluting the starting template).

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.

PRODUCT MANUFACTURED BY INGENASA



IT-73840 IT-73780 ISO 14001:2004 9191.INGE ISO 9001:2008 9175.ING2

This product has been validated by the European Reference Laboratory for ASF :Centro de Investigación en sanidad Animal (CISA-INIA)

KIT COMPOSITION

Mix A1: (specific primers and probe for **PPA + IC**)
Mix B: Enzymes mixture
Positive control A1



Self life: 12 months
Stored at -20°C