



Procédure de l'OMSA pour l'enregistrement des kits de diagnostic
Résumé des études de validation

Nom du kit de diagnostic : Genelix™ ASFV Real-time PCR Detection Kit

Fabricant : Sanigen Co., Ltd

Numéro de la demande/approbation : 052131

Date d'enregistrement : mai 2024

Maladie : Peste porcine africaine (PPA)

Agent pathogène : Virus de la PPA

Type d'épreuve : PCR en temps réel

Objectifs du test :

Le kit de détection « Genelix™ ASFV Real-time PCR » permet la détection qualitative du virus de la PPA, ainsi que la confirmation du diagnostic, au moyen d'une PCR en temps réel réalisée sur des échantillons de sang total, de sérum ou de tissus prélevés de porcins suspectés d'être infectés par le virus.

Espèces et spécimens

L'espèce cible est le porc domestique. Le kit repose sur l'analyse d'échantillons de sang total, de sérum ou de tissus. Le sang total peut être utilisé dès lors qu'il est conservé avec des anticoagulants. Il est recommandé de tester les spécimens dès que possible après la collecte. En cas d'impossibilité d'une utilisation immédiate, les spécimens peuvent être conservés pendant quelques jours à 4 °C dans un réfrigérateur, ou plus de sept jours dans un surgélateur à moins de -70 °C. Les échantillons doivent être divisés en quantités requises pour les tests et conservés à -20 ± 5 °C dans un congélateur pour éviter une décongélation répétée. Si la durée de la préparation ou du transport excède 24 heures, il conviendra de maintenir la température à -20 °C ± 5 °C. Évitez les congélations et décongélation répétées.

1. Information sur le kit

Veillez consulter la notice du kit disponible sur la page web du Registre de l'OMSA ou contactez le fabricant à l'adresse suivante : Sanigen Co., Ltd

Tél. : +82-1833-8010

Fax : +82-2-573-3134

2. Résumé des études de validation

Spécificité analytique

Conclusion : La recherche d'éventuelles réactions d'interférence associées à cinq types de substances interférentes différentes a été effectuée en utilisant des échantillons positifs et négatifs ; aucune interférence sur les résultats n'a été mise en évidence. La réactivité croisée

a été évaluée pour déterminer la capacité du test à distinguer les analytes cibles des analytes non cibles. Le caractère exclusif du test a été confirmé en testant divers agents pathogènes responsables de maladies affectant les porcins ainsi que d'autres réactifs infectieux (41 souches, dont 16 bactéries, 7 virus de maladies porcines et 18 autres virus). Il n'a pas été constaté de réactivité croisée significative. Neuf génotypes du gène p72 du virus de la PPA (qui constitue l'analyte du kit), ont été synthétisés et soumis à une étude d'inclusivité. Tous les génotypes ont été détectés sous forme de résultats positifs.

Sensibilité analytique

Conclusion : La limite de détection du test a été évaluée afin de mesurer la sensibilité analytique du kit de détection Genelix™ ASFV Real-time PCR. Les concentrations donnant un résultat positif faible mais significatif ont été répétées 24 fois ; les données ont ensuite été soumises à une nouvelle analyse reposant sur la méthode probit avec un niveau de confiance de 95 % ; il en ressort une estimation maximale de la limite de détection équivalant à 16,9 ($1,7 \times 10^1$) copies/ μ l.

Répétabilité

Conclusion : L'étude de répétabilité a été menée par un opérateur, sur un lot, pendant 20 jours, en procédant à deux cycles par jour, chaque cycle étant conduit deux fois à trois concentrations différentes. Lors des expériences réalisées en diluant l'ADN plasmidique du virus de la PPA aux trois niveaux de concentration des échantillons, 100 % des échantillons ont été détectés ; aucune amplification n'a été observée dans les échantillons de contrôle négatifs. La valeur du coefficient de variation était inférieure à 5 % dans tous les cas.

Caractéristiques diagnostiques :

Détermination des seuils, et estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD) :

Conclusion :

Détermination des seuils : Le seuil de détection du kit Genelix™ ASFV Real-time PCR est fixé à une valeur Ct (cycle seuil) de 38,1. S'agissant de l'analyse probit, le seuil est défini comme la valeur moyenne du Ct de la dilution la plus concentrée testée suivant immédiatement la limite de détection définie par l'analyse probit. Lors de l'évaluation du seuil de détection, la valeur moyenne du Ct était de 38,1, à $2,8 \times 10^1$ copies/ μ l, soit la concentration immédiatement au-dessus de la valeur probit.

Interprétation des résultats

- Les critères de définition des seuils et le paramétrage de la ligne de base en fonction de l'équipement utilisé sont présentés ci-dessous :

Instrument	Seuil	Début de la ligne de base	Fin de la ligne de base
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 les résultats obtenus avec les contrôles positifs et négatifs sont conformes aux critères du tableau ci-dessous, il peut être procédé à l'interprétation des résultats obtenus avec les échantillons cible. Si les résultats des contrôles ne correspondent pas au tableau, l'expérience doit être reconduite.

Type de contrôle	Valeur du seuil de cycle
Contrôle positif	Ct ≤ 38,1
Contrôle négatif	Absence de détection

- Lancez le logiciel correspondant à votre instrument afin de vérifier la valeur du Ct pour le ou les échantillons testés. Les données obtenues avec un échantillon donné sont considérées comme un résultat positif lorsque la valeur du Ct ≤ 38,1 ; elles sont considérées comme un résultat négatif si la valeur du Ct > 38,1.

Estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD), et intervalles de confiance à 95 %

- Un test comparatif a été réalisé afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité diagnostiques du kit en utilisant la méthode de référence (validée et certifiée par l'OMSA). Les résultats sont présentés ci-dessous :

Kit Genelix™ ASFV Real-time PCR		VPPA /sang total et sérum porcins
Sensibilité diagnostique	N	187
	SeD	99,47 %
	IC	97,07 - 99,99 %
Spécificité diagnostique	N	553
	SpD	100 %
	IC	99,33 - 100,0 %

Kit Genelix™ ASFV Real-time PCR		VPPA/tissus porcins
Sensibilité diagnostique	N	22
	SeD	100 %
	IC	84,56 to 100,0%
Spécificité diagnostique	N	450
	SpD	100 %
	IC	99,18 - 100,0 %

Reproductibilité

Conclusion : Trois laboratoires de référence de l'OMSA pour la PPA ont participé à une étude comparative afin d'évaluer la reproductibilité du test. La comparaison a porté sur l'essai effectué par les trois laboratoires, pendant trois jours en procédant à deux cycles par jour. Les résultats qualitatifs étaient 100 % concordants et répondaient aux critères d'acceptation, le coefficient de variation étant inférieur à 5 %. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

N° échantillon	Coefficients de variation (%)			
	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	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
SNG-07	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
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	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
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	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

Références

- Chapter 1.1.6. Validation of diagnostic assays for infectious diseases of terrestrial animals. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OMSA, 2023)
- Chapter 2.2.3. Development and optimisation of nucleic acid detection assays. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OMSA, 2024)
- Section 3.8-SUIDAE, Chapter 3.8.1. African Swine Fever (Infection with African swine fever virus) (OIE [OMSA], 2019)
- Galindo I. & Alonso C. (2017). African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses*, 9(5), 103. doi:10.3390/v9050103
- Beltrán-Alcrudo D., Arias M., Gallardo C., Kramer S. & Penrith M.L. (2017). African swine fever: detection and diagnosis. A manual for veterinarians. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
- Chapter 1.01.02 Collection, submission and storage of diagnostic specimens (OMSA, 2018)
- Chapter 2.2.6. Selection and use of reference samples and panels. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OMSA, 2024)
- CLSI-EP17-A2 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures
- CLSI-EP07-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry
- CLSI-EPO5-A3 Evaluation of Precision of Quantitative Measurement
- King, D.P., Reid S.M., Hutchings G.H., Grierson S.S., Wilkinson P.J., Dixon L.K., Bastos A.D.S. & Drew T.W. (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
- Caraguel C.G., Stryhn H., Gagné N., Dohoo I.R. & Hammell K.L. (2011). 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 (1), 2-15. doi: 10.1177/104063871102300102.
- Addressing African swine fever. <http://www.fao.org/3/cb1430en/CB1430EN.pdf> (FAO, 2020)