

INgezim[®] RHDV1/2 DIF CROM

Prod Ref: 17.RHD.K42

Ensayo inmunocromatográfico dúplex para la detección y diferenciación específica del virus de la enfermedad hemorrágica de conejo (RHDV) en homogeneizados y exudados de hígado de conejo.

Duplex lateral flow assay for specific detection and differentiation of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in rabbit liver homogenates and exudates.

Última revisión / Last revision: 15-07-2022

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo <i>Reagent</i>	PRESENTACIÓN <i>PRESENTATION</i>	
	12 Test	30 Test
Dispositivos de diagnóstico envasados individualmente en bolsas de aluminio <i>Diagnostic devices individually wrapped in aluminium bags</i>	12	30
Gotero con tampón de cromatografía (4 mL) <i>Running buffer in a dropper bottle (4 mL)</i>	1	2
Tampón de extracción de la muestra <i>Sample extraction buffer</i>	1	2
Tubo de 1.5 mL <i>1.5 mL tube</i>	15	35
Pipetas amarillas (0.5 mL) <i>Yellow pipettes (0.5 mL)</i>	15	35
Pipetas transparentes (20 µL) <i>Transparent pipettes (20 µL)</i>	15	35

I. FUNDAMENTO Y BASE TÉCNICA

El test Ingezim® RHDV1/2 DIF CROM es un ensayo inmunocromatográfico dúplex basado en el uso de microesferas de látex coloreadas unidas a las proteínas de interés: partículas de látex rojo se encuentran unidas covalentemente a un anticuerpo que reconoce las dos variantes de RHDV y partículas azules unidas a una proteína control que actúa como indicador del correcto desarrollo de la inmunocromatografía.

La membrana contiene dos líneas test (T) y una línea control (C): T1, en la que se encuentra un anticuerpo que reconoce las dos variantes de RHDV; T2, en la que se encuentra inmovilizado un anticuerpo específico de RHDV tipo 2; y una línea control, en la que se encuentra un anticuerpo específico de la proteína control. Si el virus está presente en la muestra, este reaccionará con las partículas de látex rojo recubiertas por el anticuerpo común a ambas variantes y, a continuación, el complejo formado migrará a través de la membrana y se unirá a la línea T1 si es RHDV tipo 1 o a ambas líneas test (T1 y T2) si es RHDV tipo 2. En algún caso, cuando la carga viral de RHDV2 es baja, puede aparecer únicamente la línea inferior (T2). De este modo, según el número y posición de líneas test rojas que aparezcan, se podrá determinar la variante presente en la muestra. Si la muestra no contiene virus RHD, no aparecerá color en ninguna línea T.

II. CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos deben conservarse entre +4°C y +25°C, en su envase original, hasta su uso.

III. OTROS COMPONENTES NECESARIOS PARA EL PROCEDIMIENTO A NO INCLUIDOS

- Balanza
- Centrífuga
- Placas Petri para procesamiento de la muestra
- Vórtex
- Tijeras quirúrgicas y / o jeringas de 5 mL

IV. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni componentes de distintos lotes.
6. No comer, beber ni fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras.

V. MUESTRAS

El test ha sido diseñado para su empleo con muestras de hígado de conejo o exudados de hígado. Pueden ser muestras frescas o congeladas a -20°C o -80°C. En el caso de emplear un hígado congelado, es importante que se descongele totalmente antes de su extracción.

VI. PROCEDIMIENTO

- **Dejar que las muestras y los componentes del test alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.**
 - Si se emplea una muestra de hígado, la extracción del mismo podrá realizarse en laboratorio (punto A de esta sección), o sin emplear componentes adicionales, en campo (punto B).
 - Si se emplea un exudado de hígado, no se requiere extracción previa, dirigirse directamente al punto C de esta sección.
- A. HOMOGENEIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA EN LABORATORIO**
- Pesar una cantidad de hígado (e.g. 1 g), depositarlo en una placa Petri y cortarlo y triturarlo con una tijera/émbolo de una jeringa cuanto sea posible.
 - Añadir el mismo volumen (p/v) (e.g. 1 mL) de tampón de extracción de muestra y continuar el mismo proceso de trituración hasta formar un homogeneizado.
 - Empleando una pipeta, tomar 0.5 mL de homogeneizado y depositarlos en el tubo suministrado, en el que previamente se han

INgezim® RHDV1/2 DIF CROM 17.RHD.K42

depositado 0,5 mL tampón de extracción de muestra.

- Agitar vigorosamente durante 30 segundos empleando un vórtex y centrifugar 5 min a 4500 rpm.
- Tomar el sobrenadante y guardar a 4 °C si no se va a emplear inmediatamente o a -20°C para un período de tiempo más prolongado (más de 24 h).

B. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA EN CAMPO, SIN EMPLEAR OTROS COMPONENTES

- Tomar un pequeño trozo de hígado y depositarlo en el tubo suministrado (no debe sobrepasar la marca de 0,5mL). Si se dispone de tijeras, trocear la muestra.
- Añadir el mismo volumen de tampón de extracción empleando la pipeta amarilla.
- Agitar vigorosamente a mano durante 30 segundos y dejar decantar durante 5 minutos.

- Tomar el sobrenadante y guardar a 4 °C si no se va a emplear inmediatamente o a -20°C para un período de tiempo más prolongado (más de 24 h).

C. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

- Extraer de la bolsa el dispositivo de diagnóstico y colocarlo sobre una superficie plana.
- Añadir, empleando una pipeta transparente, 20 µL de sobrenadante extraído o exudado de hígado a la ventana de adición de muestra del dispositivo.
Importante: si en algún caso no hubiese sobrenadante suficiente como para coger 20 µL, añadir una o dos gotas más de tampón de extracción sobre el mismo, para poder tomar, a continuación, esos 20 µL.
- Añadir 3-4 gotas de tampón de cromatografía (esperar entre gota y gota la absorción total del líquido).
- Interpretar los resultados 10 minutos tras la adición del tampón de cromatografía.

ES MUY IMPORTANTE RESPETAR LOS VOLÚMENES Y TIEMPOS INDICADOS PARA QUE EL TEST FUNCIONE CORRECTAMENTE.

Si alguna muestra no migra correctamente, deberá ser centrifugada de nuevo. En caso de estar siguiendo el protocolo del punto B, se recomienda dejar la muestra reposando 1 hora para facilitar que las fases se separen.



1. Preparación de la muestra:

- a) Hígado
 - Homogeneización y extracción en laboratorio (A)
 - Extracción en campo (B)

b) Exudado de hígado

2. Añadir 20 µL del extraído /exudado sobre el dispositivo.

3. Añadir 3 gotas de tampón de cromatografía y leer el resultado a los 10 min.

VII. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La lectura de resultados debe hacerse del siguiente modo, a los 10 minutos después de depositar la muestra:

Resultado **POSITIVO A RHDV1**: (presencia de RHDV1 en la muestra).

Aparece una línea AZUL en la posición "C" (control del test) y una línea ROJA en la posición "T1" (test), la línea situada en el medio.

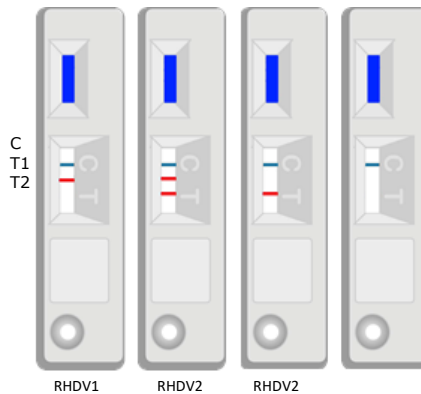
Resultado **POSITIVO A RHDV2**: (presencia de RHDV2 en la muestra).

Aparece una línea AZUL en la posición "C" (control del test) y 1) dos líneas ROJAS en las posiciones "T1" y "T2" (test) cuando la carga viral es alta; 2) una línea ROJA en la posición "T2" (test) cuando la carga viral es baja.

Resultado **NEGATIVO**: (ausencia de RHDV 1 o 2 en la muestra). Aparece únicamente una línea AZUL en la posición "C" (Control).

Resultado **NO VÁLIDO**: El test no es válido si no aparece la línea AZUL en la posición "C" Control, independientemente de si aparece o no en la línea "T" (test) cualquier señal.

Los resultados no válidos pueden ser causados por el deterioro de los reactivos o por una manipulación incorrecta. En este caso, deberá repetirse el test usando una nueva tira.



Es recomendable no dar ninguna muestra definitivamente por negativa hasta no haber transcurrido el tiempo indicado desde la realización del análisis.

I. TECHNICAL BASIS

The INgezim® RHDV1/2 DIF CROM test is a duplex lateral flow assay based on the use of coloured latex microspheres bound to the proteins of interest: red particles are covalently bound to an antibody that recognizes both RHDV variants and blue particles are coated with a control protein that indicates that the assay develops correctly.

The membrane contains two test lines (T) and one control line (C): T1, in which an antibody that recognizes both RHDV variants is immobilised; T2, that contains a RHDV2-specific antibody; and a control line (C), containing a control protein-specific antibody. If the virus is present in the sample, it will react with the red latex particles coated with the antibody for both variants and, subsequently, the complex will migrate across the membrane and bind to the protein contained in line T1 if RHDV type 1 or to both lines (T1 and T2) if it is RHDV type 2. In some cases, when the viral load of RHDV2 is low, only the bottom line (T2) can appear. In that way, according to the number and position of the red test lines that show up, the variant present in the sample can be determined. If the sample has no RHDV, no colour will appear in either T line.

II. STORAGE

All the reagents must be kept between +4°C and +25 °C.

III. NECESSARY COMPONENTS FOR PROCEDURE A NOT INCLUDED

- Weighing scale
- Centrifuge
- Petri dishes for sample processing
- Vortex
- Surgical scissors and / or 5 mL syringes

IV. PRECAUTIONS

1. Read the use instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the reagents of the kit.
5. Do not use components after expiration date and do not mix components from different batches.
6. Do not eat, drink, or smoke where specimens or kit reagents are being handle.

V. SAMPLES

The test has been designed for its use with samples of rabbit liver and liver exudates. Samples can be fresh or frozen at -20°C o -80°C. If using a frozen liver, it is important that it thaws completely before its extraction.

VI. TEST PROCEDURE

■ **Allow all kit components and samples to reach room temperature, before use.**

- If a liver sample is employed, the extraction can be carried out in a laboratory (part A of this section), or in field without any additional component (part B).
- If a liver exudate is employed, no sample extraction is required, go straight to part C of this section.

A. SAMPLE HOMOGENIZATION AND EXTRACTION IN LABORATORY

- Weigh one amount of liver (i.e. 1 g), place it in a Petri dish and cut it and squash it as much as possible using scissors and / or the syringe piston.
- Add the same volume (w/v) (i.e. 1 mL) of extraction buffer and continue squashing to form an homogenate.
- Using a pipette, take 0.5 mL of homogenate and place it in the supplied tube, in which 0.5 mL of extraction buffer have been dispensed previously.
- Vigorously stir for 30 seconds using a vortex and centrifuge 5 min at 4500 rpm.

- Take the supernatant and keep it at 4 °C if it is not going to be used immediately. For a longer period (more than 24 h), keep at -20°C.

B. SAMPLE EXTRACTION IN FIELD, WITHOUT ANY OTHER COMPONENT

- Take a small piece of liver and place it in the supplied tube (it should not surpass the 0.5 mL mark). If some scissors are available, cut the sample.
- Add the same volume of extraction buffer using a yellow pipette.
- Vigorously stir by hand for 30 seconds and leave for 5 min to allow phase separation.
- Take the supernatant and keep it at 4 °C if it is not going to be used immediately. For a longer period (more than 24 h), keep at -20°C.

C. ASSAY PROCEDURE

- Remove the diagnostic device from the bag and place it on a flat surface.
Add, using a transparent pipette, 20 µL of extracted supernatant or liver exudate onto the sample round window of the device. **Important:** If not enough supernatant is obtained for taking 20 µL, add one or two more drops of extraction buffer above it. After that, take the 20 µL needed.
- Add 3-4 drops of the supplied running buffer (wait between drops for the liquid to be absorbed).
- Read the results 10 minutes after the addition of the running buffer.

THE VOLUMES AND TIMES INDICATED MUST BE RESPECTED FOR THE TEST TO WORK CORRECTLY.

If any sample does not migrate correctly, it must be centrifuged again. If following the protocol B, it is recommended to leave the sample to rest for 1 hour, to facilitate phase separation.

1. Sample preparation:

- Liver
 - Homogenization and extraction in laboratory (A)
 - Extraction in field (B)
- Liver exudate



2. Add 20 µL of the extraction /exudate to the device.



3. Add 3 drops of running buffer and read the results after 10 min.

VII. INTERPRETATION OF RESULTS

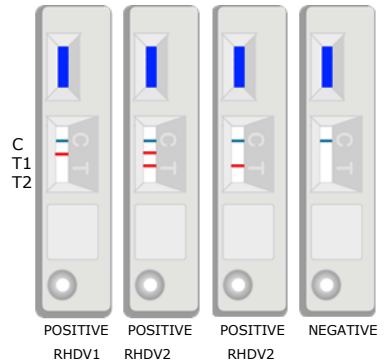
Interpretation of results should be done as follows, 10 minutes after the addition of the sample:

POSITIVE result to RHDV1: (presence of RHDV1 in the sample)
A BLUE line appears in "C" zone (control) and a RED line appears in "T1" zone (test), the line situated in the middle.

POSITIVE result to RHDV2: (presence of RHDV2 in the sample)
A BLUE line appears in "C" zone (control) and 1) two RED lines appear in "T1" and "T2" zones (test) when viral load is high; 2) one RED line appears in "T2" zone (test) when the viral load is low.

NEGATIVE result: (absence of RHDV 1 or 2 in the sample). Only one BLUE line appears in the "C" zone (control).

INVALID result: Test is not valid if a BLUE line does not appear in position "C", either a "T" line appears or not in the test zone. Not valid results may be caused by damaged reagents or by an incorrect manipulation. In this case, the test should be repeated using a new strip.



It is advisable not to classify any sample as completely negative until the indicated time has elapsed since the analysis.

Desarrollado y fabricado en España por:
Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
Av.de la Institución Libre de Enseñanza 39,
8ª planta
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es



Distributed in by:

