
CERTEST RHDV + RHDVb

ONE STEP *Rabbit Hemorrhagic
Disease Virus*
COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



ENGLISH**INTENDED USE**

CerTest RHDV + RHDVb one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of the "classic" and the "new variant" virions of *rabbit hemorrhagic disease virus* (RHD) in rabbit tissues samples (preferably liver) or liquid exudate from the rabbit abdominal cavity.

CerTest RHDV + RHDVb combo card test offers a simple and highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of rabbit hemorrhagic disease.

INTRODUCTION

Rabbit hemorrhagic disease (RHD) is an acute, highly contagious and fatal disease of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), caused by a calicivirus (genus *Lagovirus*).

Infection can occur by nasal, conjunctival or orally. RHD transmission is facilitated by the high stability of the virus in the environment. The incubation period ranges from 1 to 3 days, and the death usually occurs 12–36 hours after the onset of fever. Clinical signs have been described mainly in the acute infection (nervous and respiratory signs, apathy and anorexia). Specific and clear lesions appear both macroscopic and microscopic. There is a primary hepatic necrosis and a massive disseminated intravascular coagulopathy in all organs and tissues. The most severe lesions are found in the liver, trachea and lungs. In almost every organs petechiae are demonstrated, which are accompanied by poor blood coagulation. In rabbits under 4-5 weeks of age, infection with the "classic" RHDV is subclinical.

Recently a "new variant" virus (RHDVb) which affects young rabbits and farmed adult animals previously immunized with vaccines against "classic" RHDV has been detected.

TEST PRINCIPLE

CerTest RHDV + RHDVb is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of the "classic" and the "new variant" virions of *rabbit hemorrhagic disease virus* in rabbit tissues samples.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against virus like particles (VLP's) and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-RHDV) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against virus like particles (VLP's) and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-RHDVb) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

If the sample is RHDV positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugates complex (anti-RHDV monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, and if the sample is RHDVb positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugated complex (anti-RHDVb monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in strip B which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-RHDV antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-RHDVb antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no RHDV presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the detection limit value, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-RHDV and the anti-RHDVb antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in both strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on both membranes will capture control green-conjugate complex and both control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provided in the kit are approved for use in the CerTest RHDV + RHDVb combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Tissue samples (preferably liver) or abdominal liquid exudate should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) prior to testing. For longer storage, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing.

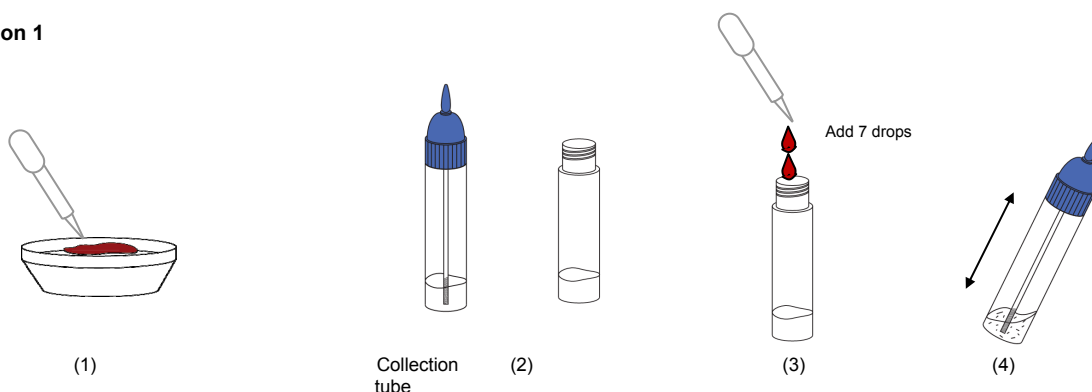
Tissue specimen preparation (see illustration 1):

1. Take approximately 0.1g of liver tissue, mix with 1ml PBS (or tap water) and homogenize with the aid of a disposable pipette. Leave the homogenate to stand to allow the particulate material to settle and use the supernatant (approx. 10% tissue homogenate) in further steps (1).
2. Take out the cap of the collection tube (2)
3. Add 7 drops of the tissue homogenate supernatant using a dispensable pipette, in the collection tube (3).
4. Close the tube with the diluent and sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (4).

Abdominal liquid exudate specimen preparation (see illustration 1):

1. Take out the cap of the collection tube (2)
2. Abdominal liquid exudate samples can be used directly without previous treatment. Add 7 drops of the abdominal liquid exudate using a dispensable pipette, in the collection tube (3).
3. Close the tube with the diluent and sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (4).

Illustration 1



MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest RHDV + RHDVb combo card tests
- Instructions for use
- Disposable pipettes
- Collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

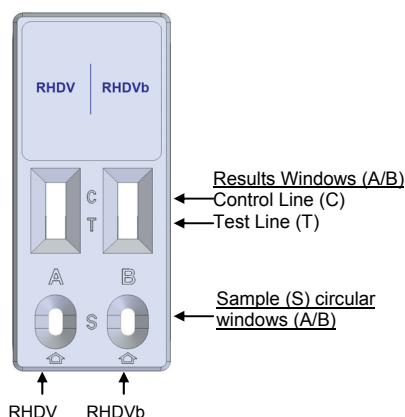
- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

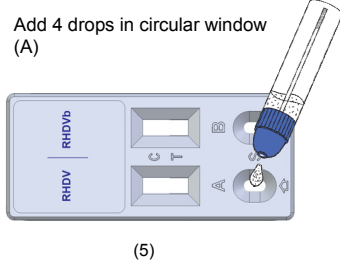
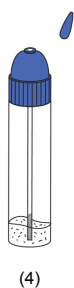
Allow tests, samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest RHDV + RHDVb combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the collection tube, cut the end of the cap (4) and dispense 4 drops in the circular window marked with the letter A (5) and 4 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

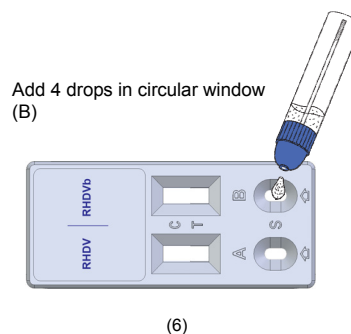
If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of extraction diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



RHDV Strip A-procedure



RHDVb Strip B-procedure



CERTEST RHDV + RHDVb

One Step test to detect Rabbit hemorrhagic disease virus in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para la detección de la Enfermedad hemorrágica del conejo en formato cassette

INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)

- A: Green→Negative RHDV
B: Green→Negative RHDVb
- A and B: Green/Red→Positive RHDVb
- A: Green/Red→Positive RHDV
B: Green →Negative RHDVb

INVALID RESULTS

- A: Green→Negative RHDV
B: Green/Red→Positive RHDVb
-

	A (RHDV)	B (RHDVb)	Interpretation of the results
1.	- GREEN	- GREEN	There are no "classic" (RHDV) and "new variant" (RHDVb) virions of <i>rabbit hemorrhagic disease virus</i> .
2.	+ GREEN-RED	+ GREEN-RED	There is presence of virions of "new variant" (RHDVb) of <i>rabbit hemorrhagic disease virus</i> . To dismiss a very unusual case of co-infection with other type of RHDV, some complementary RT-PCR assays should be made.
3.	+ GREEN-RED	- GREEN	There is "classic" (RHDV) virions of <i>rabbit hemorrhagic disease virus</i> .
4.	- GREEN	+ GREEN-RED	Invalid result: If B is positive, A has to be also positive, we recommend repeating the assay using the same sample with another test. If the same result is obtained, some complementary RT-PCR assays should be made to verify the possible type of RHDV present.
5.	Any other result	Any other result	Invalid result either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

INVALID: Total absence of any control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.



CERTEST RHDV + RHDVb

One Step test to detect Rabbit hemorrhagic disease virus in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para la detección de la Enfermedad hemorrágica del conejo en formato cassette

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of virions present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in virions can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The green lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high virus concentration to faint when the virus concentration is close to the detection limit value of the test.
4. CerTest RHDV + RHDVb should be used from tissue or exudate samples from rabbits. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper specimens must be obtained.
5. Positive results determine the presence of the "classic" and/or the "new variant" virions of isolate of *rabbit hemorrhagic disease virus* in tissue sample or exudate. A positive result should be followed up with other diagnostics to confirm the results. A confirmed infection should only be made by a specialised professional after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations.
6. A very low number of negative results have been observed with the CerTest RHDV + RHDVb test (strip A RHDV) when the responsible virus belongs to the Genogroup 6 (RHDVa), although other similar isolates (Hartmannsdorf, Triptis or Rossi) are detected efficiently with this test. In the case that suspected *rabbit haemorrhagic disease virus* clinical and laboratory findings exist and a negative result is obtained with the CerTest RHDV+RHDVb test, an ELISA + RT-PCR assay should be carried out to discard the presence of RHDVa (genogroup 6).
7. A negative result is not meaningful because of it is possible the amount of virions in the sample is lower than the detection limit value. In the case that suspected *rabbit haemorrhagic disease virus* clinical and laboratory findings exist and a negative result is obtained with the CerTest RHDV test, additional assays (ELISA + RT-PCR) should be carried out to confirm the result.

EXPECTED VALUES

Rabbit Hemorrhagic Disease is characterized by high morbidity and high mortality (70-90%), and spreads very rapidly through direct and indirect transmission.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical sensitivity and specificity (RHDV + RHDVb)

An evaluation, with positive and negative samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest RHDV + RHDVb, CerTest) with positive and negative rabbit liver specimens; these samples were evaluated compared with an ELISA assay (INGEZIM RHDV DAS (Ingenasa)). The results were as follows:

		ELISA + RT-PCR (RHDV)		
		+	-	Total
IC test: CerTest RHDV + RHDVb (RHDV)	+	69	0	69
	-	2 (*)	10	12
	Total	71	10	81

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest RHDV + RHDVb vs ELISA + RT-PCR (RHDV)	>97%	>99%	>99%	>83%



CERTEST RHDV + RHDVb

*One Step test to detect Rabbit hemorrhagic disease virus in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para la detección de la Enfermedad hemorrágica del conejo en formato cassette*

(*) The two positive samples which, being positive in the ELISA assay + RT-PCR (RHDV), were negative in the immunochromatographic test CerTest RHDV (**Strip A**) belong to the genogroup 6 and are an antigenic subtype known as RHDVa.

		ELISA + RT-PCR (RHDVb)		
		+	-	Total
IC test: CerTest RHDV + RHDVb (RHDVb)	+	62	0	62
	-	0	19	19
	Total	62	19	81

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest RHDV + RHDVb vs ELISA + RT-PCR (RHDVb)	>99%	>99%	>99%	>99%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect RHDV (RHDV classical and RHDVb new variant) of rabbit hemorrhagic disease virus using CerTest RHDV + RHDVb.

ESPAÑOL**USO PREVISTO**

CerTest RHDV + RHDVb combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de la “clásica” y la “nueva variante” del *virus de la enfermedad hemorrágica del conejo* (EHC) a partir de muestras de tejido (hígado) o de exudado de la cavidad abdominal del conejo.

CerTest RHDV + RHDVb combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por la enfermedad hemorrágica de conejos.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es una enfermedad aguda, fatal y muy contagiosa del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), causada por un calicivirus (género *Lagovirus*).

La infección puede producirse por vía nasal, conjuntival u oral. La transmisión de la EHC está facilitada por la alta estabilidad del virus en el ambiente. El periodo de incubación varía entre 1 y 3 días, y la muerte normalmente sobreviene 12–36 horas después de la aparición de la fiebre. Los signos clínicos se han descrito sobre todo en la infección aguda (signos nerviosos y respiratorios, apatía y anorexia). Aparecen lesiones específicas y claras, tanto macroscópicas como microscópicas. Hay una necrosis hepática primaria y una coagulopatía intravascular diseminada y masiva en todos los órganos y tejidos. Las lesiones más graves se encuentran en el hígado, la tráquea y los pulmones. En casi todos los órganos se evidencian petequias, que van acompañadas de una escasa coagulación sanguínea. En conejos de menos de 4-5 semanas de edad, la infección por el RHDV “clásico” es subclínica.

Recientemente se ha detectado una “nueva variante” (RHDVb) del virus que afecta a conejos jóvenes y a animales adultos en granjas de conejos previamente inmunizados con vacunas frente al RHDV “clásico”.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest RHDV + RHDVb es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección cualitativa de la “clásica” y la “nueva variante” de viriones del *virus de la enfermedad hemorrágica del conejo* en muestras de tejido de conejo.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a partículas parecidas a viriones (VLP's) en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a RHDV) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a partículas parecidas a viriones (VLP's) en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a RHDVb) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es RHDV positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-RHDV-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es RHDVb positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-RHDVb-microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-RHDV presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-RHDVb presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de RHDV o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se producirá reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-RHDV y anti-RHDVb presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en ambas tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en ambas membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest RHDV + RHDVb combo card test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras de tejido (hígado preferiblemente) y exudado de la cavidad abdominal de conejo deben ser recogidas en un envase limpio y seco (sin conservantes o medios de transporte). Las muestras pueden conservarse refrigeradas (2-8°C). Para una conservación más larga deberían congelarse a -20°C. En este caso, la muestra debe ser totalmente descongelada alcanzando la temperatura ambiente antes de usarse.

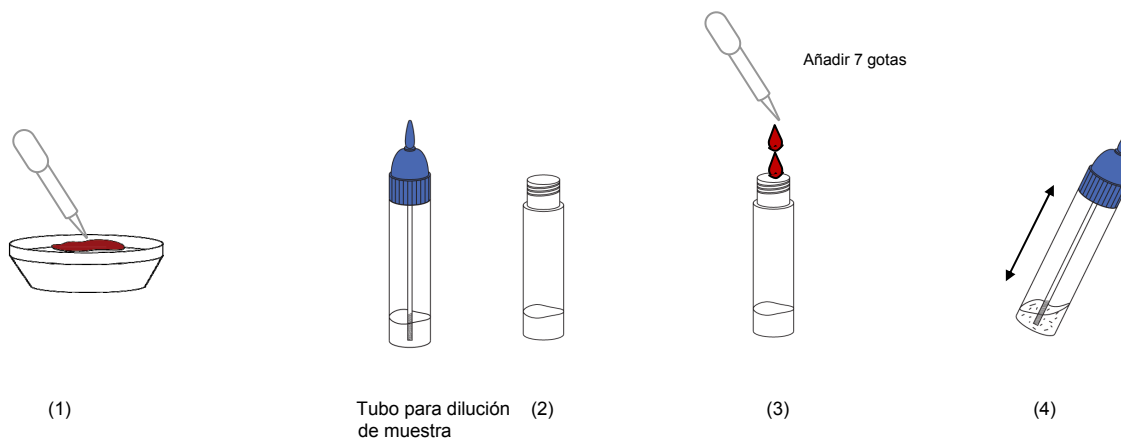
Preparación de la muestra (ver dibujo 1):

1. Tomar un trozo pequeño de hígado (aprox. 0,1g), mezclar con 1ml de PBS (o agua del grifo) y homogeneizar con ayuda de la punta de la pipeta. Dejar decantar el homogenizado para que sedimente el material particulado, o centrifugar la mezcla para acelerar el proceso. Utilizar el sobrenadante (homogenizado al 10% del tejido) (1).
2. Abrir el tubo para dilución de muestra (2).
3. Añadir 7 gotas de sobrenadante homogenizado con ayuda de la pipeta en el tubo para dilución de muestra (3).
4. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (4).

Preparación de la muestra líquida del exudado abdominal (ver dibujo 1):

1. Abrir el tubo para dilución de muestra (2)
2. Las muestras de exudado abdominal pueden usarse directamente sin tratamiento previo. Añadir 7 gotas del exudado líquido abdominal con ayuda de la pipeta en el tubo para dilución de muestra. (3)
3. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (4).

Dibujo 1



MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest RHDV + RHDVb combo card tests
- Instrucciones de uso
- Pipetas desechables
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

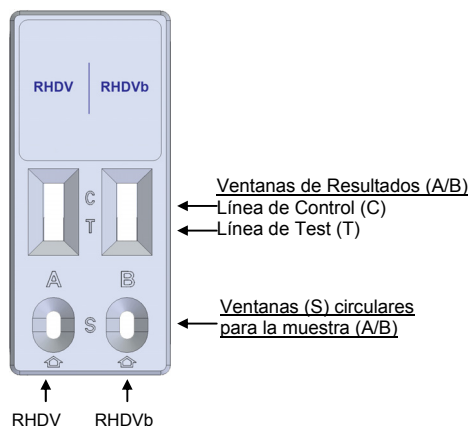
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

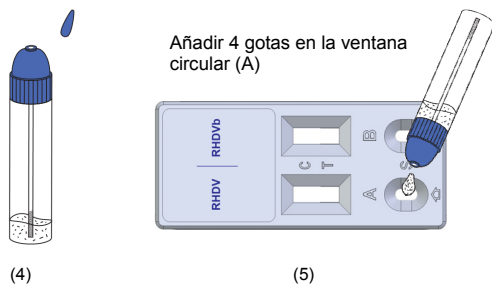
Previamente los tests, las muestras y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest RHDV + RHDVb de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (4) y añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), y con el mismo tubo, añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra B (6), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

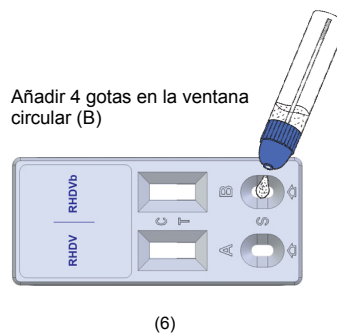
Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



Procedimiento para la tira A de RHDV



Procedimiento para la tira B de RHDVb



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

- A: Verde → Negativo RHDV
B: Verde → Negativo RHDVb
- A y B: Verde/Rojo → Positivo RHDVb
- A: Verde/Rojo → Positivo RHDV
B: Verde → Negativo RHDVb

RESULTADOS INVÁLIDOS

- A: Verde → Negativo RHDV
B: Verde/Rojo → Positivo RHDVb

-

	A (RHDV)	B (RHDVb)	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No hay presencia de viriones de la "clásica" (RHDV) y de la "nueva variante" (RHDVb) del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de viriones de la "nueva variante" (RHDVb) del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. Para descartar un muy poco probable caso de co-infección con otro tipo de RHDV deben realizarse pruebas de RT-PCR complementarias.
3.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Hay presencia de viriones del virus "clásico" (RHDV) de la enfermedad hemorrágica del conejo.
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Resultado inválido: Si B es positivo, A tiene que ser positivo también. Se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test. En caso de repetirse el mismo resultado deben realizarse pruebas de RT-PCR complementarias para verificar el posible tipo de RHDV presente.
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido en A o en B: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder

incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en las líneas de test (T) en las ventanas de resultados variará dependiendo de la concentración de viriones presentes en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de la concentración del virus pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas verdes que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

1. Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
2. Un exceso de muestra puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
3. La intensidad de la línea del test puede variar desde muy fuerte a alta concentración del virus a débil cuando la concentración del virus está cerca del valor del límite de detección del test.
4. CerTest RHDV+RHDVb debería utilizarse sólo con muestras de tejido o de exudado. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras.
5. Los resultados positivos determinan la presencia de la "clásica" y/o de la "nueva variante" del Virus de la *enfermedad hemorrágica del conejo* en muestras de tejido o exudado; sin embargo, un resultado positivo debería ser contrastado con otros procedimientos de diagnóstico para confirmar los resultados. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas.
6. Se han observado un bajo número de resultados negativos con la prueba CerTest RHDV + RHDVb (para la tira A RHDV) cuando el virus responsable pertenece al genogrupo 6 (RHDVa), aunque otros aislados muy similares (Hartmannsdorf, Triptis o Rossi) son detectados eficazmente en esta misma prueba. En el caso de que existan pruebas clínicas y hallazgos de laboratorio sospechosos del virus de la *enfermedad hemorrágica del conejo* y se obtenga un resultado negativo en la prueba CerTest RHDV + RHDVb, deben realizarse pruebas ELISA + RT-PCR complementarias para descartar la presencia de RHDVa (genogrupo 6).
7. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de viriones en la muestra sea inferior al valor del límite de detección. En el caso de que existan pruebas clínicas y hallazgos de laboratorio sospechosos del virus de la *enfermedad hemorrágica del conejo* y se obtenga un resultado negativo en la prueba CerTest RHDV + RHDVb, deben realizarse pruebas ELISA + RT-PCR complementarias para confirmar el resultado.

VALORES ESPERADOS

La *Enfermedad Hemorrágica del Conejo* se caracteriza por una alta morbilidad y una alta mortalidad (70–90%), y se propaga de manera muy rápida mediante transmisión directa e indirecta.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad y especificidad clínica (RHDV + RHDVb)

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras positivas y negativas, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest RHDV + RHDVb, CerTest) con muestras positivas y negativas de muestras de hígado de conejo; estas muestras se evaluaron usando una técnica ELISA (INGEZIM RHDV DAS (Ingenasa)). Los resultados se muestran a continuación:

CERTEST RHDV + RHDVb

One Step test to detect Rabbit hemorrhagic disease virus in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para la detección de la Enfermedad hemorrágica del conejo en formato cassette

		ELISA +RT-PCR (RHDV)		
		+	-	Total
IC test: CerTest RHDV + RHDVb (RHDV)	+	69	0	69
	-	2 (*)	10	12
	Total	71	10	81



CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

