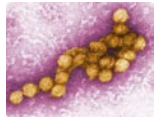
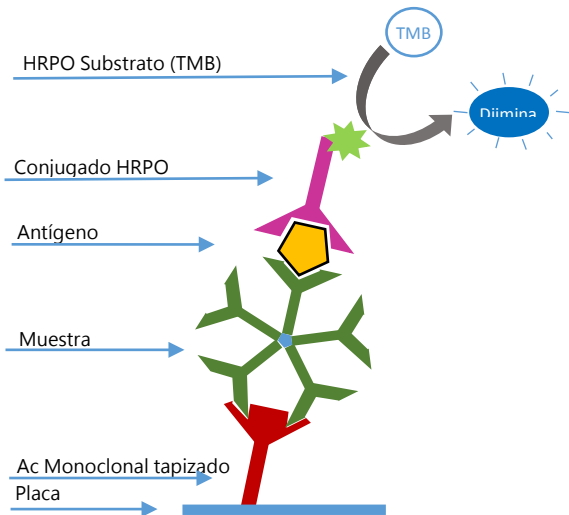


INgezim West Nile IgM

R.14.WNV.K2



INgezim WEST NILE IgM es un ensayo enzimático de captura que utiliza un anticuerpo monoclonal específico de IgM equina y un anticuerpo monoclonal específico del dominio III de la proteína E del virus del Nilo Occidental (WNV).



BASE TÉCNICA DEL KIT

1. Placas tapizadas con anticuerpo monoclonal específico de IgM equina. Las muestras de suero se añaden en los pocillos y se incuban.
2. Si la muestra contiene anticuerpos IgM específicos de WNV, éstos serán capturados por el anticuerpo monoclonal anti-IgM tapizado.
3. Al añadir antígeno de WNV, la proteína E de WNV será capturada por las IgM específicas de la muestra. Se utiliza a su vez, antígeno negativo para determinación de reacciones inespecíficas.
4. El anticuerpo monoclonal conjugado con Peroxidasa, específico de la proteína E de WNV, que se añade posteriormente, se unirá al antígeno en el caso de que haya sido capturado por las IgM de la muestra (animales infectados). Esta unión se revela mediante reacción colorimétrica tras la adición del sustrato.

APLICACIÓN

Detección de anticuerpos IgM específicos de la proteína E del virus del Nilo Occidental.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El ensayo establece un cut off. Las muestras se considerarán **Positivas** cuando su Índice de Positividad sea superior al cut off positivo; **Negativas** cuando su IP sea inferior al cut off negativo. Las IP con valores entre los cut offs positivo y negativo se consideran dudosas.

VALIDACIÓN

VALIDACIÓN CON SUEROS DE REFERENCIA

Se utilizaron dos sueros de referencia procedentes de APHIS (USDA):

- Suero de caballo infectado con la cepa N.Y.99, positivo por seroneutralización.
- Suero de caballo infectado con la cepa N.Y.99, IgM positivo.

Ambos sueros fueron detectados como positivos.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Se analizaron diferentes extracciones realizadas a caballos vacunados. La toma de muestras se realizó a días 0, 14, 21, 28, 42, 56, 70 y 85 p.v. El ensayo fue capaz de detectar IgM específicas a partir del día 14 p.v.

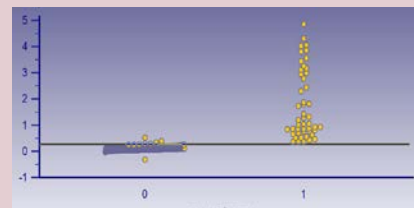
RING TRIAL (Proficiency test ANSES 2013)

Según se indica en el Informe Final, INGEZIM WNV IgM presenta mayor sensibilidad que IDEXX, IDvet o los ELISAs de captura "in house" utilizados, al analizar:

- un suero obtenido a día 35 p.i. de un pony infectado con Linaje 1 de WNV y diluido 1/6. INgezim fue el único ensayo que detectó este suero como positivo.
- Un suero de pony infectado con Linaje 2 de WNV y diluido a 1/24 y 1/48. INgezim detectó el suero como positivo, IDEXX, dudoso e IDvet y los ensayos "in house" de captura, negativos.

ESPECIFICIDAD y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICAS

- **Estudio 1:** 14 sueros de caballos infectados de forma natural por WNV, 1 suero de referencia positivo por SN, 1 suero de referencia positivo a IgM específicas de WNV, 3 sueros de caballos vacunados positivos por otros ensayos comerciales, 404 sueros de caballos procedentes de zonas libres de WNV, 28 sueros de campo de animales infectados procedentes de los 3 brotes aparecidos en España (2010-2012) positivos por otro ensayo comercial. **La sensibilidad y especificidad del ensayo fueron mayores de 99,5%**



- **Estudio 2:** 17 sueros de caballo procedentes de un brote de Linaje 2 en Italia en 2013 y previamente catalogados como positivos. INgezim WNV IgM reconoce 16 como positivos.

COMPOSICION DEL KIT

- Placas de microtitulación de 96 pocillos.
- Viales con antígeno positivo listo para usar
- Viales con antígeno negativo listo para usar
- Viales con Control Positivo listo para usar
- Viales con Control Negativo listo para usar
- Viales con Conjugado de Peroxidasa
- Frasco con Solución de Lavado
- Frasco con Diluyente.
- Frasco con Substrato (TMB) listo para usar.
- Frasco con Solución de Frenado.



PRODUCTO FABRICADO POR INGENASA
Nº REGISTRO 2863 RD

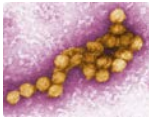


CADUCIDAD: **12 meses**
Conservado a 2°C-8°C

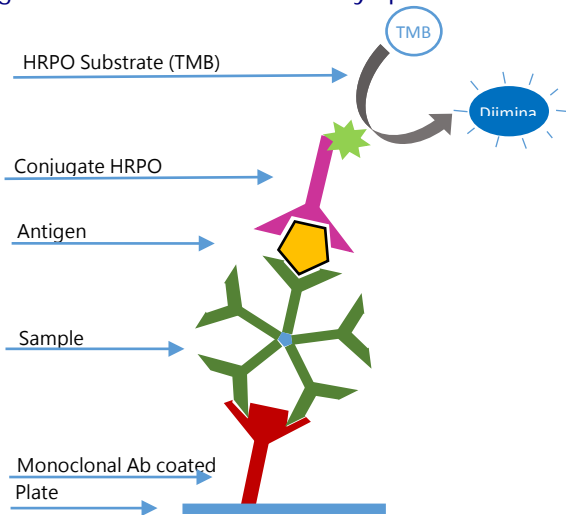
Ed.250117

INgezim WEST NILE IgM

R.14.WNV.K2



INgezim WEST NILE IgM is a capture immunoenzymatic assay which uses a monoclonal antibody specific to equine IgM and a monoclonal antibody specific to WNV E protein (Domain III).



TECHNICAL BASIS OF THE KIT

1. Plates are coated with a monoclonal antibody (MAb) specific of equine IgM. Samples are added and incubated.
2. If the sample contains specific IgMs to WNV, they will be captured by the α -equine IgM MAb which is coating the plate.
3. Once the WNV antigen is added, the E protein will be captured by the specific IgM from the sample. A negative antigen is also used to determine unspecific reactions.
4. The WNV specific MAb-HRPO added later will bind to the antigen in case it has been captured by the specific IgM of the sample (infected or vaccinated animals). This binding is detected by adding a specific substrate.

APPLICATION

Detection of specific IgM antibodies to West Nile Virus E protein

INTERPRETATION OF THE RESULTS

The assay establishes two cut offs. Samples will be considered **Positive**, if their Positivity index (IP= ODPositive Ag- ODNegative Ag) is higher than the positive cut off; **Negative**, if their IP value is lower than the negative cut off. IP in the range between the positive and negative cut offs will be considered doubtful.

VALIDATION

VALIDATION WITH REFERENCE SERA

- Two reference Sera from APHIS (USDA) were used:
- Equine serum infected with strain N.Y.99, positive by seroneutralization.
 - Equine serum infected with strain N.Y.99, IgM positive.

Both sera were detected as positive.

ANALYTICAL SENSITIVITY

Different extractions made to vaccinated horses were analyzed. Animals were bled at days 0, 14, 21, 28, 42, 56, 70 and 85 p.v. The assay was able to detect specific IgM from **day 14 p.v.**

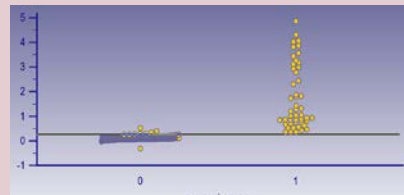
RING TRIAL (Proficiency test ANSES 2013)

The conclusions of the Final Report regarding sensitivity were: The Ingezim WN IgM kit appeared to be more sensitive than IDEXX, IDVet or in-house IgM capture ELISAs with:

- A serum sampled from the WNV lineage 1-infected pony on day 35 post-infection and diluted at 1/6. Found positive with the Ingezim WN IgM kit and negative with the 3 other tests.
- A serum sampled from the WNV lineage 2-infected pony and diluted at 1/24 and 1/48. Found positive with the Ingezim WN IgM kit, doubtful with the IDEXX IgM WNV Ab kit and negative with the IDScreen WN IgM Capture or in-house ELISAs.

DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

- **Study 1** 14 equine sera infected by WNV, 1 SN positive reference serum, 1 WNV specific IgM positive serum, 3 equine WNV vaccinated sera, positive by other commercial assays, 404 equine sera from WNV free areas and 28 field WNV infected sera from 3 outbreaks in Spain (2010-2012) and positive by another commercial ELISA. **The sensitivity and specificity of the assay were higher than 99.5%.**



- **Study 2:** 17 equine sera from a Linage 2 outbreak occurred in Italy in 2013 and previously classified as positive. INgezim WNV IgM detected 16 of them as positive.

COMPOSITION OF THE KIT

- Microtitration plates of 96 wells
- Vials with positive antigen
- Vials with negative antigen
- Vials with Positive Control
- Vials with Negative Control
- Vials with Peroxidase Conjugate
- Bottle with Washing Solution
- Bottle with diluent
- Bottle with stop solution
- Bottle with substrate (TMB) ready to use



PRODUCT MANUFACTURED BY INGENASA
REGISTRATION NUMBER 2863 RD



IT-73840 ISO 14001:2015 ISO 9001:2015
IT-73780 9191.INGE 9175.ING2

SHELF LIFE: **12 months**
Stored at 2°C-8°C

Ed.250117