

VPEA / AHSV

Anticuerpo Monoclonal específico de VP2 de VPEA VP2 AHSV specific Monoclonal Antibody

INTRODUCCIÓN / INTRODUCTION

La Peste equina africana es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, transmitida por artrópodos que está causada por un virus RNA de doble cadena perteneciente al género Orbivirus de la familia Reoviridae (VPEA). El genoma de VPEA está formado por 10 segmentos de RNA ds que codifican para 7 proteínas estructurales (VP1-7) y 4 no estructurales (NS1-3 y 3A). Las proteínas VP2 y VP5 forman la cápsida externa y las proteínas VP3 y VP7 forman mayoritariamente la interna. VP1, VP4 y VP6 forman parte de la cápsida interna y son minoritarias. Las proteínas NS1 y NS2 están altamente conservadas entre los diferentes serotipos, siendo una característica exclusiva de NS1 la formación de estructuras microtubulares en el citoplasma celular. NS3 y NS3A (codificadas a partir del segmento 10) están consideradas las más variables después de la VP2. Se han detectado 9 serotipos diferentes mediante neutralización viral. La PEA es enzootica en el África sub-Sahariana aunque han surgido algunos brotes ocasionales en el Norte y Este de África así como en Europa (España y Portugal).

La enfermedad tiene una incidencia tanto cíclica como estacional (finales de verano y otoño). La mortalidad está relacionada con la especie equina afectada y con el serotipo del virus. Al menos se conocen dos vectores implicados: *Culicoides imicola* y *C. bolitinos*. Dentro de la familia *Equidae*, los caballos son los más afectados con una mortalidad del 50-95%; seguidos de las mulas (50%). En regiones enzooticas de África, los burros son los más resistentes experimentando únicamente una infección subclínica. En Europa y Asia, en cambio, esta especie es moderadamente susceptible y tiene una mortalidad del 10%. Las cebras son también resistentes no presentando síntomas clínicos y demostrándose viremia durante más de 40 días.

*African horse sickness (AHS) is an infectious, non-contagious arthropod-borne disease of equidae, caused by a double-stranded RNA Orbivirus belonging to the family Reoviridae. The genome of the AHS virus (AHSV) is composed of ten double-stranded RNA segments, which encode for seven structural proteins (VP1-7) and four Non Structural (NS1-3 & 3A). The VP2 and VP5 proteins form the outer capsid of the virion, and VP3 and VP7 proteins are the major inner capsid proteins. The VP1, VP4 and VP6 proteins constitute minor inner capsid proteins. NS1 and NS2 are highly conserved between the different virus serotypes being NS1 able to form tubule-like structures in the cell cytoplasm. NS3 and NS3A are codified by segment 10 and are considered the most variable between serotypes after VP2. Nine antigenically different serotypes of AHSV have been identified by virus neutralization. AHS is enzootic in sub-Saharan Africa, although occasional outbreaks have occurred in northern Africa, the Middle East, and in Europe (Spain and Portugal). The disease has both a seasonal (late summer/autumn) and a cyclical incidence. Mortality due to AHS depends on the species of equidae affected and on the serotype of the virus. At least two field vectors are involved: *Culicoides imicola* and *C. bolitinos*. Among the equidae family, horses are the most susceptible to AHS with a mortality rate of 50-95%, followed by mules with mortality rates around 50%. In enzootic regions of Africa, donkeys are very resistant to AHS and experience only subclinical infections. In European and Asian countries, however, donkeys are moderately susceptible and have a mortality rate of 10%. Zebras are also markedly resistant with no clinical signs, and may have extended viraemia (up to 40 days).*

DESCRIPCION / DESCRIPTION

El Hibridoma productor del anticuerpo monoclonal ha sido obtenido a partir de linfocitos de bazo de ratón Balb/c inmunizados con el VPEA fusionados con células del mieloma X63/Ag8653. Purificado por HPLC mediante una columna de intercambio iónico, presenta una pureza del 99%, su isotipo es IgG_{2a} y es específico de la proteína VP2 de VPEA.

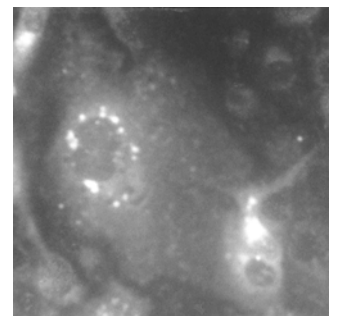
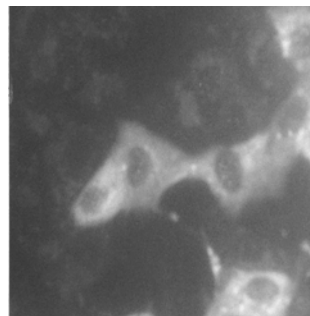
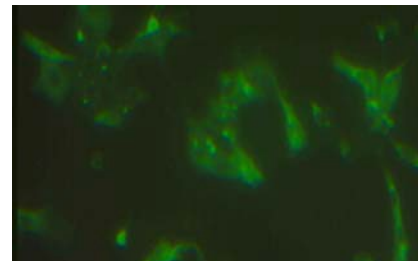
The hybridoma which produces the monoclonal antibody has been obtained by the fusion of lymphocytes from Balb/c mice's spleen with myeloma X63/Ag8653 cells. The Ig has been purified by HPLC presenting a purity of 99%, its isotype is IgG_{2a} and it is specific to AHSV' VP2 protein.

APLICACIONES / APPLICATIONS

Detección VPEA mediante la técnica de Inmunofluorescencia (IFA).

Detection of AHSV by Immunofluorescence (IFA) technique.

RESULTADOS / RESULTS



A Fase temprana / Early infection **B Fase tardía / Late stages**
Células vero infectadas con VPEA teñidas con el AcM / Vero cells infected with AHSV stained with Mab.



DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO IFA / IFA PROCEDURE

- Sembrar 40.000 células vero/poc en portas.
- Al día siguiente retirar el medio e infectar las células con VPEA a una multiplicidad de infección entre 1 y 5 ufp/cel.
- Incubar 2 h a 37°C y retirar el inóculo.
- Añadir medio de cultivo
- Incubar 24 h y retirar el medio.
- Desmontar las divisiones del porta.
- Lavar 1 vez con PBS.
- Dejar secar completamente a temperatura ambiente.
- Fijar las células 10 min en MetOH Acetona 1:1 a -20°C.
- Dejar secar completamente a T.A..
- Saturar con PBS-BSA 1%, 10 min a T.A.
- Añadir el primer anticuerpo (75 µl/ poc) e incubar 45 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. (Diluciones en PBS-BSA 0,25%. Ver condiciones de uso recomendadas para dilución. Atención, el sobrenadante se suministra listo para usar)
- Lavar 2 x 10 min en PBS-BSA 0,25% por inmersión.
- Añadir el segundo anticuerpo, marcado con fluoresceína (75 µl/poc.) diluido en PBS-BSA 0,25%.
- Incubar 45 min, en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Lavar 3 x 10 min en PBS-BSA 0,25% por inmersión.
- Montar con glicerol:PBS (9:1).
- Fijar el cubre.

- Seed 40.000 Vero cell / well in slides.
- The next day, remove the culture medium and infect the cells with AHSV at m.o.i. 1-5 pfu/cell.
- Incubate 2 h. at 37°C and remove the inoculum.
- Add culture medium
- Incubate 24 h. and remove the medium.
- Break the divisions of the slide.
- Wash once with PBS.
- Dry completely at R.T.
- Saturate with PBS:BSA 1% 10 min. at R.T.
- Add the primary antibody (75 µl/ well) and incubate 45 min. in wet chamber at R.T. (Make dilutions in PBS:BSA 0.25% (See recommended use conditions for dilution. Note that the supernatant is supplied ready to use)
- Wash twice for 10 min. in PBS:BSA 0.25% by immersion.
- Add the secondary antibody labelled with fluorescein (75 µl/well) diluted in PBS:BSA 0.25%.
- Incubate 45 in wet chamber at R.T.
- Wash three times for 10 min. in PBS:BSA 0.25% by immersion.
- Prepare the sample with glycerol:PBS (9:1)
- Fix the slide.

CARACTERÍSTICAS / CHARACTERISTICS

AcM / MAbs	Isotipo / Isotype	Especificidad / Specificity
SMAA	IgG ₁	VP2 PROTEIN

PRESENTACIÓN / FORMAT

Disponible en dos presentaciones / Two formats available:

PRESENTACIÓN / FORMAT	CANTIDAD / QUANTITY	CONCENTRACIÓN / CONCENTRATION (aproximada / approximated)	REFERENCIA / REFERENCE
Sobrenadante / Supernatant	5 ml	10-20 µg / ml	M.14.AHS.BSMAA
Purificada / Purified	1 ml	1mg / ml	M.14.AHS.ISMAA

CONSERVACIÓN / STORAGE

-20°C

REFERENCIAS / REFERENCES

Fotos realizadas en INGENASA / Photo taken by INGENASA

PRODUCTO DESARROLLADO POR INGENASA / PRODUCT DEVELOPED BY INGENASA

Inmunología y Genética Aplicada, SA
C/ Hermanos García Noblejas 39
28037. MADRID



Tel.: +34- 91 3680501
Fax: +34- 91 4087598

www.ingenasa.com

Última revisión / Last review: 250117