

Scientific Research Advances

Lectina Crotálica AL27 Utilizada Para Incrementar La Expresión De Una Vacuna Genica Contra La Rabia

Alvarado Islas Arcelia,¹ Alonso Rogelio,² De Paz Villafán Octavio,¹ Mejía Sánchez Pedro,¹ Tenorio Gutiérrez Victor,¹ Sandoval Trujillo Horacio,³ and Aguilar Setién Alvaro⁴

1) INIFAP-CENID-Microbiología, Mexico City, Mexico 2) National Autonomous University of Mexico, Coyoacan, Mexico 3) UAM-Xochimilco, Coyoacan, Mexico 4) IMSS-CMN Siglo XXI, Mexico City, Mexico

Arcelia Alvarado Islas: arce_ai@yahoo.es

El beneficio de la inmunización con DNA es la inducción de respuesta humoral y celular. Sin embargo, la eficiencia de transfección in vivo es baja. Consecuentemente, se requiere de un agente que facilite su entrada y liberación intracelular. Las lectinas crotálicas poseen afinidad por los receptores ácido siálico celulares, por lo que es factible que favorezcan la expresión de DNA en la célula huésped. El objetivo fue evaluar una fracción de veneno crotálico (AL27) (lectina) como potenciador de la expresión de una vacuna génica contra la rabia en ratón. Se utilizó un plásmido acarreador de la glicoproteína G de un virus rábico aislado en México en dosis de 20 µg de DNA/animal, solo ó adicionado con 1.062 µg/ml de lectina AL27. Se inocularon 3 grupos (G) con 6 ratones c/u en músculo tibial como sigue: G1) DNA solo, G2) DNA + AL27 y G3) control negativo. 3 animales de cada grupo se sacrificaron al día 3 para extracción del musculo tibial. De los restantes se tomo muestras sanguíneas a los 30, 45 y 60 días post-inoculación. Se determinó la eficiencia de expresión por microscopía confocal (MC), y la respuesta inmune por seroneutralización con reducción de focos fluorescente (RFFIT). Resultados: Al MC se observó mayor expresión del plásmido en los tejidos de los ratones del G2 (+++), que en el G1 (++) . Los niveles de anticuerpos para el G1 a los 30, 45 y 60 días fueron de 0.75, 0.9 y 1.2 UI/ml (Unidades Internacionales/mililitro), y de 1.1 y 1.27 UI/mL para el G2 a los 45 y 60 día

Quantifying Antigenic Relationships amongst a Global Panel of Lyssaviruses

Daniel Horton,^{1,2} Lorraine McElhinney,¹ D.A. Marston,¹ J.L.N. Wood,² Nicola Lewis,³ Ivan Kuzmin,⁴ Charles Rupprecht,⁴ Thomas Muller,⁵ Derek J. Smith,³ and Anthony R. Fooks¹

1) Rabies and Wildlife Zoonoses, Veterinary Laboratories Agency Weybridge, United Kingdom, 2) Cambridge Infectious Diseases Consortium, Department of Veterinary Medicine, Cambridge, United Kingdom, 3) Department of Zoology, Cambridge University, Downing Street, Cambridge, United Kingdom, 4)Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA 5) Institute for Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institute, Wusterhausen, Germany

Daniel L Horton: d.horton@vla.defra.gsi.gov.uk

Understanding antigenic variation among pathogens is crucial to the prevention and control of disease. Previously, we have demonstrated the potential to improve on the low resolution and qualitative nature of lyssavirus antigenic data by applying antigenic cartography techniques to rabbit serum-virus neutralization data, producing antigenic maps. Here we used antigenic cartography techniques to quantify the antigenic relationships amongst a more global panel of lyssaviruses, including representatives from all seven genotypes and unclassified viruses from Eurasia. In addition, we assessed the effect on the maps of using different animal spp. sera and cell type in the neutralization assay. We assessed the differential ability of a range of polyclonal rabbit and mouse sera to neutralize a panel of 30 viruses using modified fluorescent antibody virus neutralization (mFAVN) tests on both baby hamster kidney (BHK), and mouse neuroblastoma (N2A) cells. The virus panel included RABV(n=13), LBV(n=2), MOKV(n=1), DUVV(n=1), EBLV1(n=4), EBLV2(n=4), ABLV(n=1), IRKV(n=1), ARAV(n=1), KHUV(n=1) and WCBV(n=1). In addition we sequenced the glycoprotein ectodomain of all isolates in the panel, where sequence data was not already available. Applying antigenic cartography to the mFAVN data produced antigenic maps showing the same antigenic relationships, irrespective of

sera or cell type used in the mFAVN test. Combining antigenic data with the glycoprotein ectodomain amino acid sequence data, we were able to show direct quantitative comparison of antigenic and genetic relationships within the lyssavirus genus.

Rabies Transmission from IC Inoculated Suckling Mice to Their Mothers

Nidia Arechiga-Ceballos,^{1,4} Leonardo Perea-Martinez,^{1,4} Bogar Castro-Barron,³ Salvador Flores-Chavez,² Francisco Blanco-Favela,¹ and Alvaro Aguilar-Setien Alvaro¹

1) Unidad de Investigacion Medica en Inmunologia, Hospital de Pediatria, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico 2) Centro de Instrumentos, CMN Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico 3) Bioterio del CMN Siglo XXI, Mexico City, Mexico 4) Escuela Nacional de Ciencias Biologicas, IPN, Mexico City, Mexico

Nidia Arechiga: nhyxbiogirl@aol.com

Isolation of rabies virus from probably infected individuals has been accomplished since long ago by inoculating homogeneates by IC route into 4 to 7 days old suckling mice. It is commonly believed that rodents could not actively transmit rabies because when the virus is present in saliva, they are already paralyzed. Twenty-one rabies isolates from different species and geographic areas of Mexico were inoculated by IC route in suckling mice (one isolate per litter) following the standard procedures of the WHO. Animals presenting rabies signs were sacrificed at the moment when these were evident, those that survived were sacrificed on day 21. Incubation period in mice was 7 - 15 days. Mothers were kept and daily observed for 60 days. Three out of the 21 mothers (14%) showed rabies signs. One was sacrificed on day 33 and the others died on days 37 and 39 p.i. of baby mice. Rabies diagnosis was performed by direct immunofluorescence in brain smears. Characterization of the virus by PCR and sequencing of the N gene demonstrated that mothers were infected with the same rabies isolate of their respective litters. Transmission of rabies virus from mice to their mothers could have occurred by means of lacerations caused while suckling with their tiny teeth. It has previously been described that some bat rabies isolates were infectious by superficial epithelial inoculation more than by intramuscular inoculation. Those isolates could infect superficial epithelial cells. All isolates that caused the death of the mothers proceeded from vampire bats. Other common fact in the baby-to-mother transmissions was the size of the litter (9 individuals). In nature, rabies virus could be preserved by the transmission from babies (more susceptible of acquiring rabies by aerosol) to mothers while suckling. In general, lactating period in bats is very long.

Determinación de DNA Residual de Células Vero para el Control de Calidad en la Preparación de Vacuna Antirrábica Humana

Mónica M. Romero,¹ Ruth Velázquez,¹ and María E. Jiménez¹

1) Instituto Nacional de Virología, BIRMEX S.A. de C.V., Mexico City, Mexico

Monica Mayté Romero RamosL mayrom11@yahoo.com

Objetivo: BIRMEX tiene como objetivo desarrollar las etapas de producción, control de calidad y control en proceso de la vacuna antirrábica humana producida en células Vero, para lo cual se requiere cumplir con los límites de DNA residual después de la purificación de la vacuna, por lo tanto es necesario contar con al menos una metodología confiable de cuantificación de dicho DNA. Metodología y Resultados: Se desarrollaron y estandarizaron dos metodologías para la cuantificación de DNA de una vacuna antirrábica purificada. El primero fue un marcaje con digoxigenina del DNA extraído de la vacuna el cual se comparó con una curva patrón con diferentes cantidades de DNA marcados también con digoxigenina y se visualizó por el método de Dot Blot revelando por quimioluminiscencia. Los resultados fueron analizados utilizando un equipo que mide la densidad de los puntos. El segundo método fue la cuantificación por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), comparando las bandas obtenidas en el gel de poliacrilamida pertenecientes al DNA extraído de la vacuna purificada con las de una curva patrón con diferentes cantidades de DNA de células Vero. En ambas metodologías se obtuvieron menos de 10 ng de DNA de células Vero por dosis de vacuna purificada.