



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA.

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA.

EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA DEL VIRUS RÁBICO EN  
*Lactococcus lactis*.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA APLICADA.

PRESENTA:  
BIOL. G. GABRIELA BÁRCENA VICUÑA.

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ÁNGEL E. ABSALÓN CONSTANTINO.  
DR. PABLO HERNÁNDEZ-JAÚREGUI Y ÁLVAREZ.

MARZO 2011.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de Tepetitla siendo las 11:00 horas del día 11 del mes de Marzo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA Tlaxcala para examinar la tesis de titulada:

Expresión de la glicoproteína del virus rábico en *Lactococcus lactis*.

Presentada por el alumno:

**BARCENA**

Apellido paterno

**VICUÑA**

Apellido materno

**GUADALUPE GABRIELA**

Nombre(s)

Con registro:

A	0	6	0	4	5	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

**Directores de tesis**

Dr. Ángel Eduardo Absalón Constantino

Dr. Pablo Hernández Jáuregui y Álvarez

Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa

Dr. Víctor Eric López y López

M. en C. Francisco Romero Pastrana

**EL PRESIDENTE DEL COLEGIO**

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala



Centro de Investigación  
en Biotecnología  
Aplicada



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Tepetila de Lardizábal Tlaxcala el día 10 de Marzo del año 2011, la que suscribe Guadalupe Gabriela Bárcena Vicuña alumna del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro A060457, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Ángel Eduardo Absalón Constantino y cede los derechos del trabajo intitulado “Expresión de la glicoproteína del virus rábico en *Lactococcus lactis*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [baviga@yahoo.com.mx](mailto:baviga@yahoo.com.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Biol. Guadalupe Gabriela Bárcena Vicuña

INDICE.	PAG.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
4. HIPOTESÍS	5
5. MARCO TEÓRICO	6
5.1 Historia	6
5.2 Clasificación	8
5.3 Propiedades	8
5.4 Epidemiología	10
5.5 La proteína G	11
5.6 La proteína N	13
5.7 La proteína NS	14
5.8 La proteína M	14
5.9 La proteína L	15
5.10 Ciclo viral	15
5.11 Fisiopatogenia	16
5.12 La enfermedad en el hombre	17
5.13 Reservorios	18
5.14 Rabia urbana	22
5.15 Rabia silvestre	23
5.16 Vacunas	24
5.17 Bases moleculares de la susceptibilidad	25
5.18 Acción de los anticuerpos neutralizantes	25
5.19 <i>Lactococcus lactis</i>	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS	29
6.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	29
6.2 Construcción y amplificación de plásmidos	29
6.3 <i>E. coli</i> competentes y su transformación con el plásmido pGEMT-Gp-G	30

6.4 Extracción de ADN plasmídico pGEMT-Gp-G y amplificación por PCR	30
6.5 Construcción del plásmido pORI23-Gp-G y su expresión en <i>L. lactis</i>	31
6.6 Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido pORI23-Gp-G	32
6.7 Expresión de la Gp-G en <i>L. lactis</i> competentes	34
6.8 Extracción de ADN plasmídico (pORI23-Gp-G) de <i>L. lactis</i>	34
6.9 Extracción de proteínas de pared celular de <i>L. lactis</i> transformado con Gp-G	35
6.10 Detección por ELISA de la Gp-G en la pared de <i>L. lactis</i> transformado	36
6.11 Inmunofluorescencia indirecta de <i>L. lactis</i> transformada con GP-G	36
7. RESULTADOS	38
7.1 Amplificación del gen de la glicoproteína GP-G	38
7.2 Confirmación del inserto por el plásmido pGEMT-Gp-G	39
7.3 Clonación en el vector de expresión	42
7.4 Expresión de la Gp-G de <i>L. lactis</i> competentes	43
7.5 Inmunofluorescencia indirecta de <i>L. lactis</i> transformado con la glicoproteína Gp-G del virus rábico	45
7.6 Detección por ELISA de Gp-G de <i>L. lactis</i> transformado	47
8 DISCUSIÓN	50
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

## Resumen

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda, progresiva, incurable y mortal; que invade y lesiona el sistema nervioso de los mamíferos, incluyendo al hombre. El agente causal es un virus ARN de hebra simple, polaridad negativa y con tamaño entre 11 y 15 kb pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*. Esta enfermedad tiene amplia distribución mundial y es transmitida mediante la mordedura de un animal enfermo a uno susceptible. La glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico es la principal proteína de virulencia de respuesta inmune humoral. Los anticuerpos anti glicoproteína G *in vitro* protegen contra la infección experimental. La Gp-G del virus rábico forma parte de vacunas recombinantes donde se utilizan vectores virales. La bacteria Gram-positiva, *Lactococcus lactis* es considerada no patogénica en el hombre. Los genes involucrados en el proceso metabólico de transporte y fijación de proteínas en la pared celular han sido identificados. Uno de ellos, controlado por la enzima sortasa, ha sido utilizado para fijar y transportar proteínas recombinantes en la pared celular de esta bacteria. *L. lactis* ha sido utilizada para producir tanto antígenos en su citoplasma, como en la pared. Diversos grupos de investigación trabajan en el desarrollo y la producción de proteínas heterólogas en esta bacteria. La construcción del plásmido que codifica para la glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico se realizó utilizando el plásmido pKB3-JE-13-Gp-G y los iniciadores GPA1 For y GPA 1 Rev. La amplificación se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El fragmento amplificado ADNc resultante fue de 1500 pb y en su secuencia presentó un sitio de acción para las enzimas de restricción Sac I y Xma I; el fragmento fue insertado en el plásmido pGEMT-VECTOR y transformado en *E. Coli* Top 10. Para la expresión de Gp-G en *Lactococcus lactis*, se utilizó el plásmido pOri23. Para obtener tanto el plásmido pOri23 como el fragmento de ADN que codifica la fracción antigénica de la Gp-G libre se realizaron reacciones de restricción con las enzimas antes mencionadas. El tamaño fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa. Los resultados obtenidos por PCR confirmaron que las colonias contenían el inserto del tamaño e idéntico al producto de PCR originalmente obtenido con PKB3-JE-13-Gp-G. Con base a los resultados obtenidos se pudo validar que el vector de expresión pOri23-CL expresó la Gp-G en *Lactococcus lactis* en donde se logró ver una banda por PCR de 1500 pb (Gp-G), así mismo por doble digestión se observaron las bandas de 6.6 Kb de pOri23 y de 1500 pb (Gp-G), los mismos resultados positivos aportó la secuenciación.

En este trabajo se obtuvieron *Lactococcus lactis* silvestres y 2 clonas C3-1 y C2-1, mediante la clonación de la glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico en *Lactococcus lactis*. Se realizaron experimentos por inmunofluorescencia indirecta de *Lactococcus lactis* silvestre y la clona 3-1 y 2-1, se evaluó la expresión de la glicoproteína G (Gp-G) en *Lactococcus lactis* y se observó por microscopía confocal con un anticuerpo monoclonal comercial, así como con un anticuerpo policlonal (antirabia). Se observó que tanto con el anticuerpo policlonal como con el monoclonal, el reconocimiento fue igual en la clona 3-1; sin embargo cabe resaltar que el reconocimiento en la clona 2-1 con ambos anticuerpos fue menor que el de la clona 3-1.

En cuanto a la cuantificación por el método de ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal, se realizaron diferentes concentraciones de antígeno de 10 hasta 30 µg/mL tanto de *Lactococcus lactis* silvestre como de la clona 3-1. Se observó que a 30 µg/mL fue la concentración en donde se encontró el mayor reconocimiento de la clona 3-1, comparada con *Lactococcus lactis* silvestre y la clona 2-1

De manera general podemos concluir que la glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico en la clona 3-1 tuvo una mayor expresión, tanto en los experimentos de inmunofluorescencia indirecta como en el ensayo de ELISA, comparada con la expresión de la clona 2-1 y *Lactococcus lactis* silvestre.

Cabe señalar que el resultado anterior se refuerza al cuantificar la expresión de la Gp-G en la clona 3-1 del sobrenadante de *Lactococcus lactis*, en donde se confirma que la Gp-G se encuentra expresada en dicha fracción

El producto obtenido en el presente trabajo podrá ser evaluado en su capacidad de protección ante el desafío experimental con virus rábico en modelo animal como en ratón.

## Summary

Rabies is an acute, progressive, incurable and deadly infectious disease with worldwide distribution. It enters and cripples the host nervous system in humans and other mammals. It is caused by a single negative-strand RNA virus of 11-15 kb size, from the *Rhabdoviridae* family, *Lyssavirus* genus. The route of infection is usually by a bite from an infected animal. The principal rabies virulence protein involved in the humoral immune response is Glycoprotein G (Gp-G). Antibodies against Gp-G block experimental infections *in vitro*, and Gp-G protein is incorporated in viral vectors to create recombinant rabies vaccines.

Gram-positive *Lactococcus lactis* is non-pathogenic and generally considered safe (GRAS) for human consumption. Its protein expression, transport and wall-anchoring genetic mechanisms have been characterized. One of them, mediated by the enzyme sortase, has been exploited for the cell-wall anchoring of recombinant proteins expressed in *L. lactis*, and recombinant antigens have been expressed both in the cytoplasm and the cell wall of the bacteria.

Several research groups are working in research and development for heterologous protein expression in *L. lactis*. A 1500 bp Gp-G DNA sequence was amplified from plasmid pKB3-JE-13-Gp-G with primers GPA1 For and GPA 1 Rev by PCR (polymerase chain reaction). Both GPA1 For and GPA 1 Rev had *SacI* and *XmaI* restriction sites added in their 5' ends. The 1500 bp amplified Gp-G fragment was then inserted in plasmid vector pGEMT and cloned into *E. coli* Top 10. Gp-G was then inserted into *L. lactis* expression plasmid pOri23. Both pGEMT-Gp-G plasmid and pOri23-CL<sup>-</sup> plasmid were digested with *XmaI* and *SacI*, and the 1500 bp Gp-G fragment from pGEMT was observed in an agarose gel, extracted and ligated into pOri23-CL<sup>-</sup>, which then was used to transform *E. coli* Top 10 competent cells. Cloning success was verified by PCR and restriction digestion, producing a 6.6 kb band from digested pOri23-CL<sup>-</sup> and 1.5 kb band from Gp-G. Sequencing of the resulting plasmid pOri23-Gp-G also confirmed cloning success.

In this work wild type and two recombinant *L. lactis* C3-1 and C2-1 expressing Gp-G were used. Indirect immunofluorescence experiments were performed with confocal microscopy to evaluate Gp-G expression using commercial monoclonal anti-Gp-G antibodies and polyclonal anti-Gp-G antibodies.

Both C3-1 and C2-1 were recognized with both monoclonal and polyclonal antibodies, although signal strength was lower in C2-1 compared with C3-1.

ELISA experiments performed with the monoclonal antibody in *L. lactis* C3-1, C2-1 and wild type in 10-30 µg/mL antigen concentration resulted in a strongest signal for C3-1 at 30 µg/mL.

In conclusion, we showed that Rabies Gp-G protein is expressed in *L. lactis*, with higher levels of expression in C3-1 compared with C2-1 and with *L. lactis* wild type observed by indirect immunofluorescence and ELISA assays. This results is also confirmed after quantification of Gp-G expression in C3-1 supernatant.

The product obtained from this work can be used as a candidate vaccine in an animal model of rabies infection, to evaluate the level of protection that can be provided by immunization in an infectious challenge.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda, progresiva, incurable y mortal; que invade y lesiona el sistema nervioso de los mamíferos, incluyendo al hombre. El agente causal es un virus ARN de hebra simple, polaridad negativa y con tamaño entre 11 y 15 kb (1). Pertenece a la familia *Rhabdovirus*, género *Lyssavirus*. Esta enfermedad tiene amplia distribución mundial y es transmitida mediante la mordedura de un animal enfermo a uno susceptible, por la excreción del virus en la saliva de los animales afectados. Los reservorios del virus incluyen carnívoros y quirópteros. El transmisor más importante para el hombre es el perro y el gato (rabia urbana).

En América, los animales domésticos son afectados en el siguiente orden de frecuencia: bovinos, perros, gatos, equinos, borregos y cabras; mientras que en Europa el orden es el siguiente: gatos, bovinos, perros, borregos, cabras y caballos. En México el orden aproximado es: perros, bovinos, gatos, equinos, cerdos, borregos, murciélagos, cabras, ardillas, zorrillos y ratas.

El virus de la rabia posee cuatro proteínas estructurales y una ARN polimerasa. La nucleocápside está formada por el ácido nucleico asociado a tres proteínas: N o nucleoproteína, P o fosfoproteína y L o ARN polimerasa ARN dependiente. La glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico es la principal proteína de virulencia de respuesta inmune humoral (2), participa en la invasión, transporte y diseminación viral en el tejido infectado (4).

Los anticuerpos anti glicoproteína G *in vitro* protegen contra la infección experimental (3). En la actualidad, la Gp-G del virus rábico forma parte de vacunas recombinantes donde se utilizan vectores virales como el virus de la viruela del canario (Purevax® Merial, Inc.) y virus vaccinia (Raboral® Merial, Inc.). En el desarrollo de vacunas de ADN anti-rábicas evaluadas o experimentadas en ratones (5), caninos (6, 7), felinos (8) y primates no humanos (9). La utilidad de esta proteína viral ha comenzado a ser abordada por distintos grupos de investigación, en el diagnóstico rápido de la enfermedad (10) y caracterización de la respuesta inmune vacunal (11) con el objeto de evitar tratamientos innecesarios tras

una potencial exposición, así como también para la determinación de anticuerpos neutralizantes anti-Gp-G.

El papel de la Gp-G, la única expuesta en la envoltura externa del virus es un excelente antígeno como candidato para el desarrollo de inmunobiológicos que permitan prevenir y diagnosticar la enfermedad.

El presente proyecto tuvo como objetivo expresar la glicoproteína Gp-G del virus rábico en la pared celular de *Lactococcus lactis*, y evaluar la capacidad de éste vector para replicar la Gp-G e inducir respuesta inmune humoral

## **2.- JUSTIFICACIÓN.**

La rabia es una enfermedad viral zoonótica (transmitida al ser humano por los animales). El virus de la rabia infecta a animales domésticos y salvajes, y se propaga a las personas a través de un contacto con la saliva contaminada. La rabia tiene una amplia distribución mundial y causa más de 55 000 muertes al año. Una vez que aparecen los síntomas, la enfermedad es mortal.

En México existe el Programa Nacional de Prevención y Control de la Rabia, cuyos objetivos principales son abatir y controlar los casos de rabia animal y, en consecuencia, los que ocurren en la población humana: Éste programa establece como estrategia para el control de acciones de vacunación antirrábica masiva a los perros, principal reservorio y transmisor de la rabia en México. Por otra parte, existen esquemas de vacunación profiláctica y preexposición para médicos veterinarios, cuidadores de animales y otras personas que están en riesgo de exponerse a la infección y esquemas post-exposición para inmunizar después de que ha ocurrido la exposición al virus. Estos programas generan grandes pérdidas económicas, tanto en México como en otros países en vías de desarrollo.

El virus de la rabia posee cuatro proteínas estructurales y una ARN polimerasa. La nucleocápside está formada por el ácido nucleico asociado a tres proteínas: N o nucleoproteína, P o fosfoproteína y L o ARN polimerasa ARN dependiente. La glicoproteína del virus rábico (Gp-G) es la única proteína viral expuesta, encontrándose insertada en la envoltura lipídica. Esta molécula de 65-67 KDa corresponde a una proteína trans-membrana N-glicosilada que se dispone en forma de trímeros en la superficie viral. Ha sido identificada como el mayor determinante de patogenicidad, participando en el flujo axonal del virión durante la infección, apoptosis y evasión de la respuesta inmune. Es también el principal antígeno inductor de la respuesta inmune protectora, siendo utilizado en vacunas recombinantes comerciales. Su estructura, antigenicidad e implicaciones en la patogenia han sido bien estudiadas, identificándose los principales sitios antigénicos responsables de la patogenicidad, unión a receptores celulares y formación de epítopes.

Con base en lo anterior, consideramos viable la posibilidad del desarrollo a bajo costo, de una vacuna recombinante a partir de *Lactococcus lactis* transformada con la glicoproteína Gp-G del virus de la rabia.

### 3.- OBJETIVOS.

#### OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en la pared celular de *Lactococcus lactis*.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Construir el vector pGEMT-Gp-G utilizando un fragmento del gen que codifica para la glicoproteína G del virus de la rabia.
2. Expresar la glicoproteína G del virus de la rabia en la pared celular de *Lactococcus lactis* a partir del vector pOri23-Gp-G
3. Cuantificar la expresión genética de la glicoproteína G (Gp-G) del virus de la rabia en *Lactococcus lactis* mediante la técnica ELISA.
4. Evaluar la presencia de la glicoproteína G (Gp-G) del virus de la rabia en la pared de *Lactococcus lactis* por inmunofluorescencia.

#### **4.- HIPÓTESIS.**

La expresión de la glicoproteína G transmembranal del virus de la rabia en *Lactococcus lactis*, dará lugar a la generación de un candidato viable para la producción de una vacuna recombinante, que podría inmunizar de manera eficiente contra la rabia.

## 5.- MARCO TEORICO.

### 5.1 HISTORIA.

La rabia tiene una larga e interesante historia; existen referencias desde la antigüedad que citan aspectos de su transmisibilidad y gravedad (12). La rabia es una enfermedad infecciosa reconocida desde los tiempos antes de Cristo. A pesar de la prominencia histórica de la viruela, de la influenza y más recientemente del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, la preocupación biomédica respecto a la rabia, continúa, por las manifestaciones alarmantes de un progreso fatal inevitable en hombres, perros y otros animales, por lo que su notoriedad continúa siendo incomparable (12). Los griegos llamaron a la rabia *Lyssa* o *Lytta* que significa “loco” y la enfermedad en el hombre fue descrita como “hidrofobia”. La palabra latina “rabia” viene de una vieja palabra: *rhabas* la cual significa “hacer violencia”. Demócrito realizó la primera descripción de la rabia canina, 500 años A. C. En forma similar Celso, en el siglo I, A. C, describió aspectos clínicos de la infección humana y dijo que la saliva contenía el agente infeccioso.

Una transición gradual de la era medieval de creencias religiosas y supersticiones en el periodo renacentista se observa en el tratado de 1546, titulado “la herida incurable” por Fcastoro. Este físico italiano afirmaba que la esencia del ser humano era susceptible a la rabia y describió un caso clínico: “esta incubación (siguiendo una mordida por un animal rabioso) es cautelosa, lenta y gradual, la infección tiene manifestaciones muy raras antes del día 20, en muchos casos después del 30 y en muchos casos no pasa de 4 o 6 meses”. Hay casos en los cuales se manifiesta un año después de la mordedura, el paciente no puede levantarse ni posicionarse hacia abajo, como un loco se avienta de acá para allá, se desgarrar la carne con sus manos y siente una sed intolerable. Este es el síntoma más angustioso, es por eso que huye del agua y todos los líquidos y finalmente quedan exhaustos y respiran con dificultad (13). Esta descripción de la rabia humana es precisa en el periodo de incubación y se puede extender de meses a años después de una exposición inicial (14) pero un ataque por un paciente con rabia es un evento incomún (15).

La rabia en América fue reportada en México por el reverendo Marmolejo en el año 1709. Esta descripción sugiere ser una de las primeras sobre la transmisión de rabia por murciélagos hematófagos.

Un escritor llamado Charles Town de Sudamérica, dijo el 10 de noviembre de 1750; “desde principio de año una clase de locura había aparecido en los perros, primero en la ciudad y después en el país; el no reportó de personas mordidas, pero dijo que la enfermedad se dispersaba rápidamente entre los perros y si los perros no eran sacrificados, morían en 2 o 3 días. La mordida de un animal con rabia fue considerada el nacimiento de la infección por muchos, pero sólo, Zinke en 1804, usó la saliva de perro para demostración de la transmisión. Después de 1879, Galtier experimentó la transmisión de rabia a conejos y de conejos a conejos (16).

Las descripciones clínicas forman la base para el diagnóstico hasta el advenimiento de la microscopía de luz. Una clara descripción de interacciones virales y neuronales fue hecha por Negri en 1903, con la identificación de inclusiones citoplásmicas (cuerpos de Negri) en neuronas de animales con rabia (17). Reportes de cuerpos intraneuronales específicos para rabia estimulan el debate concerniente a ambas: su utilidad para diagnóstico y su naturaleza. El valor del diagnóstico de los cuerpos de Negri fue establecido en 1913, la composición viral tuvo que esperar al desarrollo de la microscopía electrónica.

Las investigaciones de Pasteur en rabia fueron quizá las realizaciones históricas mejor conocidas en el campo. Primero: la adaptación de virus “calle” (tipo salvaje) a animales de laboratorio. Segundo: Pasteur y sus colaboradores, desarrollaron conceptos y aproximaciones experimentales a la primera vacuna protectora contra rabia. Disecó medulas espinales de conejos infectados con rabia, llegando a ser la primera vacuna antirrábica, la cual en su tiempo era relativamente segura. El 6 de julio de 1885, un niño de 9 años llamado Joseph Meister fue mordido en múltiples sitios por un perro rabioso, recibió la primera profilaxis con la vacuna de Pasteur y Joseph sobrevivió (16). La vacuna de Pasteur con todas sus modificaciones llegó a ser aceptada en el mundo a principios del siglo XX esas vacunas fueron usadas por razones económicas, por lo que muchos países

subdesarrollados usaron vacunas antirrábicas preparadas de tejido nervioso. Sin embargo los problemas permanecen, por que se inactivan de forma inadecuada los virus que causan rabia y el tejido de cerebro animal induce reacciones alérgicas que conducen a accidentes neuromusculares.

Quizá lo más importante es que la vacuna no fue efectiva en casos de mordeduras severas, tales como las infringidas en cara y cuello por lobos con rabia. La post exposición profiláctica contra rabia a través de administración simultánea de suero antirrábico y la vacuna fueron introducidos en 1889 (18). Estas aproximaciones fueron olvidadas cerca de 1940, cuando el interés en el uso de sueros que contenían anticuerpos fue revivido. En un juicio emitido por la organización mundial de la salud en 1954 encontraron que el uso combinado de suero con la vacuna daba más protección que la vacuna sola (19). Una observación luego corroborada por los científicos chinos (20).

Hoy, la combinación de suero antirrábico y vacuna realizada en células diploides son el estándar recomendado para profilaxis en humanos (21, 14), eliminando muchos de los problemas relacionados con vacunas producidas en cerebro.. La nueva generación de vacunas antirrábicas debe tener máxima eficacia y seguridad y se debe usar en regiones donde el virus pueda propagarse.

## 5.2 CLASIFICACIÓN.

La rabia es la zoonosis de mayor gravedad que afecta al hombre, por su evolución es hacia la muerte (22). El virus de la rabia pertenece a la familia de los Rhabdovirus pertenecen al orden mononegavirales, que se distribuyen en tres familias: *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* (virus Sendai, la enfermedad de Newcastle, del sarampión, virus sincicial respiratorio y rubulavirus porcino) y *Filoviridae* (virus de Marburg). Los rhabdovirus pertenecen a tres géneros 1: Los *Vesiculovirus* (cuyo prototipo es el virus de la estomatitis vesicular-VSV), los *Lyssavirus* (cuyo modelo es el virus de la rabia) y los *Ephemerovirus* (representados por el virus de la fiebre efímera bovina).

El agente causal de la rabia pertenece al grupo de virus de RNA neurotrópicos, de la familia *Rhabdoviridae*, por que tienen una morfología en forma de bala característica de los

miembros de esta familia (23) del género *Lyssavirus* (24). Los *Lyssavirus* son virus genéticamente relacionados, adaptados para replicarse en Sistema Nervioso Central y periférico de los mamíferos (25, 26).

### 5.3 PROPIEDADES.

Los rhabdovirus son virus frágiles, son inactivados por el calor, los rayos ultravioleta, la desecación, los solventes orgánicos y la tripsina, y son estables entre pH 5 y 10. Los rhabdovirus se conservan varios días a 4 °C y durante mucho tiempo a -70 °C y liofilizados. Las partículas de este virus tienen una longitud de cerca de 200 nm y un diámetro de aproximadamente 75 nm, muestran nucleocápside helicoidal rodeada por una membrana delgada de fosfolípidos y proteínas.

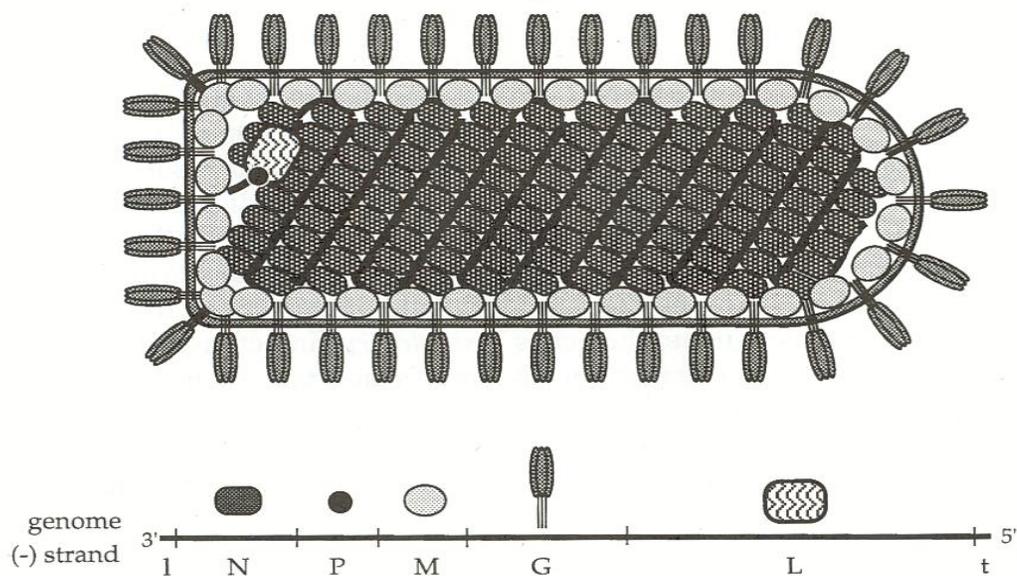
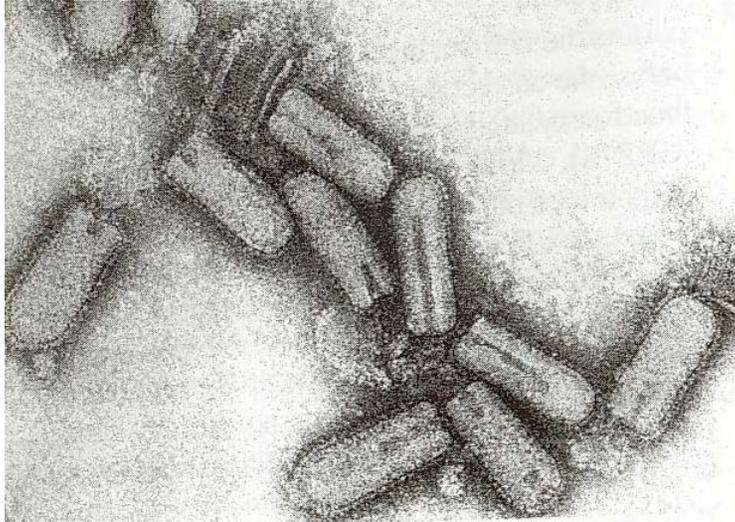


Fig. 1 G= glicoproteína, N= nucleoproteína, P= no estructural, M= membrana, L= ARN polimerasa dependiente de ARN.

Tomado del libro historia natural de la rabia.

Por microscopia electrónica se demuestra que el virus de la rabia es una estructura en forma de cilindro alargado, con un extremo plano y otro cónico, situación que le da como se

mencionó anteriormente, una forma de bala. Este virus tiene un coeficiente de sedimentación de 600 unidades Svedberg y está compuesto por 5 proteínas codificadas por el RNA viral, distribuidas en dos componentes principales: la nucleocápside (NC) y la envoltura (27).



Micrografía al microscopio electrónico de partículas del virus de la rabia, tinción negativa con ácido fosfotungsticio.  
Tomado del libro historia natural de la rabia

#### 5.4 EPIDEMIOLOGIA

La encefalitis aguda causada por un *Lyssavirus* de la rabia, es enzoótica en todas las regiones del mundo excepto en la Antártida. El virus rábico puede infectar a animales de sangre caliente bajo condiciones experimentales, pero solo los mamíferos son hospederos naturales.

Varios países tales como el Reino Unido, Japón, Escandinavia, son libres de rabia, (82, 28). Los perros son el vector mas frecuente de transmisión a los humanos. Los *Lyssavirus* Duvenhaje y Mokola son restringidos al África (29). También murciélagos y pequeños mamíferos tales como musarañas, deben ser considerados como reservorios potenciales (91).

#### PROPIEDADES BIOLÓGICAS

## CARACTERÍSTICAS ESTEQUIOMÉTRICAS DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS RÁBICO.

Proteína	Peso (KD)	Aminoácidos	Moléculas/virión
L	190	2142	17-150
G	65-80	504-505	1600-1900
N	58-62	450	1750
NS	35-40	297	900-950
M	22-25	200	1650-1700

Montaño -Hirose, JA. 1994. CITV 8a edición

La nucleoproteína interna es un complejo ribonucleoproteínico con simetría helicoidal, constituida por una cadena de RNA asociada a tres proteínas: la N asociada fuertemente, la NS y la L asociadas menos fuertemente. Las partículas están cubiertas por una envoltura que obtienen por la gemación del virus a través de la membrana plasmática de la célula hospedera. Las dos proteínas de la envoltura son la G y la M. La proteína G es glicosilada y contiene aproximadamente 3% de carbohidratos y la envoltura contiene fosfolípidos que forman el 15 al 25% según la célula hospedera, ambos de la masa del virión (30).

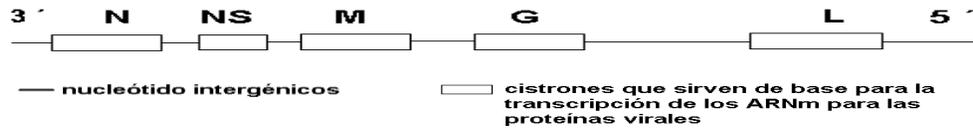
En su capa externa presenta una envoltura, la cual tiene proyecciones o espículas formadas por trímeros de la proteína G, colocadas en hileras, que le dan al cuerpo vírico el aspecto de panal de abejas (31). Cada una de las 5 proteínas que constituyen el virus rábico es codificada por un gen en el ácido nucleico.

Una peculiaridad del genoma del virus de la rabia es la existencia de un gran intergen entre los cistrones G y L que comprenden 423 nucleótidos. Esta región es hipervariable y se denomina pseudogen II (32).

Esta región posee una señal de parada de la transcripción; el complejo de transcripción puede ignorar la señal de parada del gen G y reconocer aquella de pseudogen II para producir un mRNA largo de la proteína G.

El gen que codifica la proteína N se extiende entre el codón ATG en la posición 71 y el TAA en la posición 1421. El siguiente gen comienza en la posición 1514 (ATG) y termina en la 2405 (TAA) y codifica la proteína NS. La secuencia que codifica la proteína M se extiende de la posición 2496 a la 3101.

## GENOMA DEL VIRUS RÁBICO.

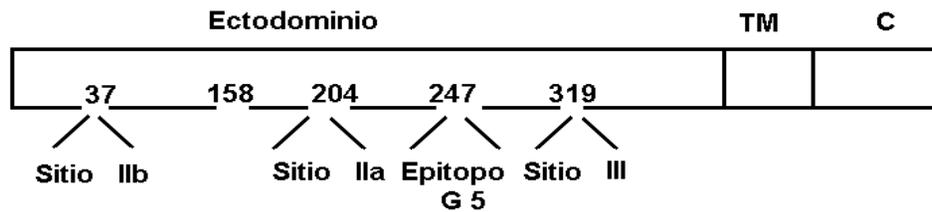


### 5.5 LA PROTEÍNA G.

#### GLICOPROTEÍNA.

La glicoproteína o proteína G forma las espículas características de la envoltura de los rhabdovirus. Representa aproximadamente un tercio de la masa proteínica viral. Se estima que cada envoltura cuenta con 1800 moléculas (33) asociadas en trímeros (34) en el retículo endoplásmico (35) y este ectodominio sobresale de la envoltura lipídica, lo que forma consecuentemente 600 espículas. La glicoproteína tiene N glicosilación, es una importante modificación post-traducciona en las proteínas y modula la actividad biológica, el índice de espacio, solubilidad, resistencia a proteasas, índice de secreción e inmunogenicidad (36). La proteína G madura es precedida por un péptido señal de 19 aminoácidos que es eliminado después de la traducción de su mRNA. La proteína G está constituida por tres dominios: un ectodominio de 438 aminoácidos, un dominio transmembranal de 22 aminoácidos y un dominio citoplásmico de 44 aminoácidos (37).

Una parte del dominio citoplásmico es indispensable para que la proteína G se ensamble en las partícula virales (38).



La proteína G es la única en estar glicosilada. Los sitios potenciales de glicosilación son de tipo N-acetilgalactosamina: asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina. La proteína G es la responsable de la absorción específica del virus a su receptor potencial presente en la superficie de las células (38), es decir es la responsable del reconocimiento del receptor de la célula hospedero (39). Esta es importante en la biología y patogénesis de la infección, esta proteína transmembranal es la única proteína viral expuesta en la superficie de las partículas virales (40), es la responsable de la respuesta inmune humoral (41, 42) y celular (43, 44) del hospedero a la infección. Después de la endocitosis de la partícula viral y su transporte a los lisosomas, la proteína G, bajo el efecto de pH ácido (5.7 a 6.1) sufre cambios conformacionales que le permite unir la envoltura viral con membranas endosomales (45). Esta fusión tiene por consecuencia inyectar la nucleoproteína rábica en el citoplasma donde se desarrollan las polimerizaciones del ARN viral.

La inmunogenicidad de la proteína G depende de su conformación tridimensional: los polipéptidos fragmentados químicamente son menos inmunógenos que la proteína entera (37). La proteína G soluble es una forma de la proteína G, segregada por las células infectadas y a la cual le faltan los 58 últimos aminoácidos de la porción COOH-terminal. A diferencia de la proteína G entera, la proteína G soluble no induce ninguna protección aún cuando es reconocida por los anticuerpos monoclonales específicos de los diferentes sitios (46). Los anticuerpos inducidos por la proteína G, en su mayoría, inhiben la infección y por lo tanto son neutralizantes (47). Este tipo de anticuerpos son los que permitieron definir los 4 serotipos de *Lyssavirus* por serología cruzada experimental en animales. Esta clasificación ha sido confirmada y refinada con anticuerpos monoclonales anti-G. La proteína G es un antígeno de superficie que genera la formación de anticuerpos que confieren inmunidad específica. La proteína G ha sido expresada en virus recombinantes de vaccinia (V-RG) (48, 49) y adenovirus humano tipo 5 (50).

Estos vectores recombinantes inducen la formación de anticuerpos neutralizantes de las especies inoculadas y confiere protección contra la infección rábica.

Los anticuerpos neutralizantes protegen al prevenir la fijación del virus a su receptor celular. También es posible que actúen por inhibición de la fusión con la membrana endosomal a pH ácido (51).

Se ha evaluado el poder protector de la proteína G en vacunas antirrábicas por la capacidad de ésta al inducir anticuerpos neutralizantes. Estas técnicas utilizan la técnica de inmunodifusión radial o pruebas inmunoenzimáticas (52, 53, 54). Los anticuerpos neutralizantes son considerados clásicamente como el factor inmunitario más importante para la protección (55). En consecuencia, inducirlos es el principal objetivo de la vacunación preventiva.

## 5.6 LA PROTEÍNA N. NUCLEOPROTEÍNA.

Esta proteína es la principal constituyente de la (nucleocapside) NC (alrededor del 90% de sus proteínas), con 1,750 moléculas. Se encuentra asociada al RNA viral y a la proteína NS. La proteína N no está glicosilada, a pesar de la existencia de sitios potenciales. La proteína N del virus de la rabia está fosforilada por la serina en posición 377 (56). La proteína N aparentemente regula el equilibrio entre la transcripción (formación del mRNA para la síntesis de las proteínas virales) y la replicación (multiplicación del RNA viral), además de proteger el RNA recién sintetizado de los ataques enzimáticos y conferirle estabilidad funcional.

Las secuencias de los 450 aminoácidos de la proteína N presenta pocas variaciones entre las diferentes cepas, a diferencia de la proteína G (57, 58). La proteína N es la más abundante en el sistema nervioso central. Existen tres sitios antigénicos que han sido identificados sobre la proteína N por medio de pruebas de competición entre anticuerpos monoclonales específicos de esta proteína (59). La NC protege contra cualquier cepa o serotipo de *Lyssavirus* de desafío.

Esta propiedad le confiere superioridad a la NC sobre la proteína G, que solamente induce protección para el serotipo al cual pertenece.

La NC no induce por ella misma la producción de anticuerpos neutralizantes. Los mecanismos implicados en el poder protector de la NC permanecen inexplicados, aunque recientemente se ha demostrado que tanto la NC como la proteína N son superantígenos (SAg) (60, 61).

## 5.7 LA PROTEÍNA NS.

### NO ESTRUCTURAL

La proteína NS, con sus 900-950 copias por virión, es un componente estructural menor (2-11%) del virión. Sin embargo, esta proteína se acumula en el citoplasma de las células infectadas. De esta propiedad, la proteína NS toma su designación inicial de no estructural. Se trata de una fosfoproteína de 297 aminoácidos (32). Inicialmente se había propuesto que esta proteína era parte de la envoltura (62); por esta razón, le fue atribuida la denominación M1, por primera proteína de membrana no glicosilada.

Posteriormente se demostró que no forma parte de la membrana sino de la NC (63, 64). Han sido descritos dos sitios antigénicos utilizando anticuerpos monoclonales (60). El perfil hidropático muestra que esta es la más hidrofílica de las 5 proteínas del virus de la rabia, con la mayor parte de los aminoácidos hidrofílicos en los dos primeros tercios a partir de la terminación amino.

Una región particularmente hidrofílica se localiza entre los aminoácidos 139 y 170 (posición nucleotídica 1928 a 2023). Otro dato interesante es que esta porción contiene 13 de los 40 sitios de fosforilación de serina y treonina. Su localización topográfica ha sido establecida por estudios inmunoquímicos de fracciones enzimáticas de la proteína NS (15). También han sido descritos epítomos T (65). Todavía se desconoce el papel que juega esta proteína en la protección.

## 5.8 LA PROTEÍNA M.

## MEMBRANA

La proteína M es la de menor tamaño de las proteínas del virus de la rabia, pero representa casi el 30% de las proteínas totales del virión. Se trata de una proteína no glicosilada, de 200 aminoácidos de longitud.

La proteína M del virus de la rabia no está fosforilada. La secuencia exhibe un segmento central rico en aminoácidos hidrofóbicos, lo que sugiere que tiene una alta probabilidad de unirse a membranas (66). Esto es relevante, ya que como la proteína M se localiza en la parte interna de la envoltura lipídica, puede interactuar con la bicapa lipídica y con el corazón de la ribonucleoproteína.

La localización de la proteína M en el citoplasma durante el ciclo viral y en el virión no han sido demostradas claramente. Solo se ha demostrado: que no está expuesta en la superficie del virión, como lo demuestra su resistencia a la hidrólisis cuando los viriones son sometidos a la acción de las enzimas proteolíticas (67) y que interactúa fuertemente con la NC (68).

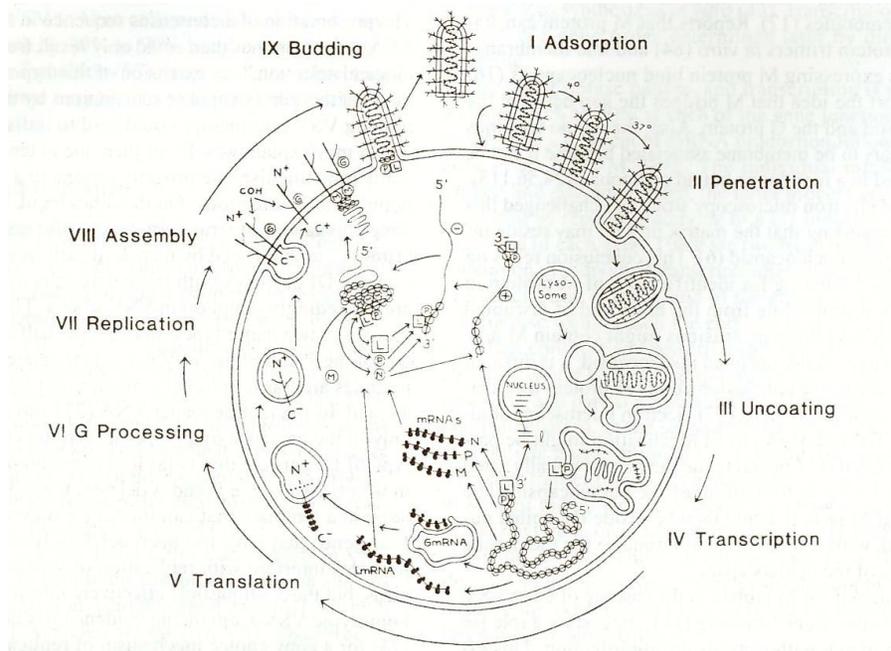
En el modelo estructural más aceptado, la proteína M rábica forma parte de la membrana viral y sirve de unión entre la NC y la envoltura viral (67, 69).

### 5.9 LA PROTEÍNA L (*large*).

#### ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN.

Denominada L (*large*) por sus siglas en inglés, dado su alto peso molecular (190 KDa), la proteína L posee múltiples funciones enzimáticas (70). Esta proteína es la ARN polimerasa dependiente de ARN, estrechamente asociada a la proteína NS. La proteína L es la más conservada de todas las proteínas de los virus ARN monocatenarios de polaridad negativa. Probable efecto evolutivo resultado de la necesidad de conservar las funciones enzimáticas vitales de los virus (71).

## 5.10 CICLO VIRAL.



Las células procariotas no poseen enzimas capaces de replicar el ARN viral. Por lo tanto, las partículas virales deben codificar y transportar su propia RNA polimerasa dependiente de RNA (la proteína L) para inicialmente transcribir el genoma en varias cadenas positivas (mARN) y posteriormente sintetizar un ARN antígeno positivo.

Las cadenas positivas de mARN son utilizadas para sintetizar las proteínas virales en los polisomas. La cadena antígeno es utilizada como matriz intermedia para la replicación del ARN viral de polaridad negativa. Esas reacciones se llevan a cabo en el citoplasma celular del huésped. La transcripción sigue el orden de los genes en el genoma y produce en cantidades decrecientes el ARN líder y posteriormente los 5 mARN virales monocistronicos, encasquetados y poliadenilados, correspondientes a las proteínas N, NS, M, G y L. Las proteínas N, NS y L, recién formadas se asocian con el ARN viral y forman la NC. La función de la proteína N aparentemente es proteger el ARN genómico de la degradación enzimática por parte del hospedero.

La NC estabilizada por la proteína M se adhiere a fragmentos de la membrana citoplásmica que contienen moléculas de proteína G.

La asociación conduce aparentemente a la gemación de una partícula viral a partir de la membrana o del retículo endoplásmico (72).

### 5.11 FISIOPATOGENIA.

La transmisión viral ocurre por la mordedura de animales portadores donde el virus es depositado en la periferia de la herida. Ciertos órganos y tejidos más propensos a la infección rábica que otros. El sistema nervioso central, las glándulas salivales y los tejidos renales son los de elección para la multiplicación del virus rábico. La infección rábica al sistema nervioso central, es un ejemplo de baja infectividad con alta patogenicidad y virulencia (73).

Si el tratamiento de las personas mordidas por perros con rabia no es proporcionado durante los primeros 5 días del evento, se estima que solo del 15 al 20% se infectarán (74, 75). Las regiones con mayor inervación como los dedos y la cara, son potencialmente más susceptibles al progreso de la infección hacia el sistema nervioso central. El virus se multiplica en los tejidos locales e inicia su viaje vía los nervios periféricos hacia el sistema nervioso central en dirección centrípeta.

Infecta los ganglios espinales posteriores (donde es factible que se repliquen nuevamente) e invaden la médula espinal, por la cual ascienden hacia el cerebro, donde los virus se replican en los tejidos de la sustancia gris (neuronas), distribuyéndose y localizándose principalmente en el hipocampo, mesencéfalo, tálamo y médula (74). Después de la replicación viral en el sistema nervioso central, continúa la propagación centrífuga que abre un portal mayor.

Por vía centrífuga y a través de nervios y terminaciones nerviosas, llegan a la mayoría de los órganos y tejidos periféricos como son la piel, el músculo y las glándulas salivales (76). La lesión en el cerebro es la destrucción de las neuronas; los cambios histopatológicos consisten en degeneración y necrosis neuronal (22, 77).

La rabia es una enfermedad infecciosa que invade y lesiona el sistema nervioso de los mamíferos, incluyendo al hombre. La intervención oportuna con la aplicación de medidas de higiene en la mordedura, la aplicación de gama globulina en la periferia de la misma y la vacunación, logran controlar la evolución de la enfermedad (78). El tratamiento sintomático en casos donde la enfermedad ya alcanzó el SNC ha logrado la sobre vivencia de escasos pacientes (79, 80).

Aún con la aplicación de las medidas de vacunación sistémica a los animales con potencialidad de transmisión de la enfermedad, la rabia es la causa del deceso de 60,000 humanos alrededor del mundo (81). La rabia es un problema de salud pública de los países en vías de desarrollo donde el virus es endémico y los perros representan el mayor reservorio en las zonas con población humana que carecen del control de los caninos (82). Existen diversas especies animales como reservorios del virus de la rabia de difícil control en otras localidades (83).

Avances recientes en la investigación de este virus mencionan que es posible la manipulación genética del genoma del virus rábico, lo que se traduce en el entendimiento de diferentes factores virales en la patogénesis de la rabia (84). La condición patogénica en rabia que lleva inevitablemente a la muerte, es por encéfalo mielitis irreversible (85, 86).

## 5.12 LA ENFERMEDAD EN EL HOMBRE.

El período de incubación de la enfermedad es de 2 a 8 semanas, sin embargo puede variar desde 10 días hasta 8 meses o más. De 500 casos estudiados, entre 4 y 10% tuvieron períodos de incubación que se extendieron por seis meses o más. La menor o mayor duración de la incubación puede depender de la dosis de virus inoculado en la mordedura, la ubicación de la misma y la gravedad de la laceración.

El período de incubación es más largo cuando la herida está más alejada del sistema nervioso central.

La enfermedad inicia con sensación de angustia, cefalalgia, discreta elevación de la temperatura corporal, malestar y alteraciones sensoriales imprecisas. El paciente suele

sentir dolor e irritación en la región de la herida. En la fase de excitación, hay hiperestesia y extrema sensibilidad a la luz y al sonido, dilatación de las pupilas y aumento de la salivación.

A medida que la enfermedad progresa, hay espasmos en los músculos de la deglución por lo que al beber los líquidos son rechazados violentamente con contracciones musculares. Esta disfunción de la deglución se observa en la mayoría de los enfermos, muchos de los cuales experimentan contracciones espasmódicas laringofaríngeas a la simple vista de un líquido y se abstiene de deglutir su propia saliva (hidrofobia). También pueden observarse espasmos de los músculos respiratorios y convulsiones generalizadas. La fase de excitación puede ser predominante hasta la muerte o sustituida por una fase de parálisis generalizada. En algunos casos, la fase de excitación es muy corta, y en casi todo el curso predomina la sintomatología paralítica. La enfermedad dura de 2 a 6 días, aunque a veces este lapso es mayor y de modo casi invariable termina con la muerte (87).

### 5.13 RESERVORIOS.

Los reservorios del virus de la rabia, incluyen a quirópteros hematófagos (murciélago) (88) y carnívoros como zorros, chacales, coyotes, mapaches, zorrillos, mangostas y musarañas (89). Siendo el perro, el zorro y el murciélago más sensibles a contraer la enfermedad, lo que plantea problemas epizooticos y epidemiológicos. Otros mamíferos como los roedores no representan peligro para la fauna silvestre porque no desarrollan rabia furiosa. No obstante que los animales homeotermos pueden ser potencialmente infectados por el virus de la rabia, la sensibilidad de las aves es muy atenuada. Posterior a la inoculación intracerebral del virus de la rabia en aves se induce enfermedad pasajera de lenta evolución. La enfermedad en las aves no existe en la naturaleza (90, 91).

En México, la transmisión se mantiene porque la rabia es enzoótica en los diferentes reservorios de los ciclos urbano y silvestre: el primero incluye al perro, quien adquiere la infección por individuos de su misma especie, tomando en cuenta la libertad que tiene para deambular en la vía pública (92).

La rabia transmitida por animales silvestres, se diferencia en terrestre, cuyos reservorios son el coyote, zorro. De gran importancia epidemiológica, la forma aérea transmitida al hombre y a otros animales por quirópteros hematófagos (93). Los quirópteros hematófagos

*Desmodus rotundus*, son el reservorio primario de rabia en los continentes donde estas especies están presentes (94, 95).

Los quirópteros con rabia, se encontraron en América antes de la colonización europea, como el principal reservorio del virus rábico en las áreas tropicales y subtropicales de México y América del Sur (96). El ganado que recibe la mordedura de quirópteros hematófagos son los huéspedes que adquiere la rabia en su variedad paralítica.

Los principales países afectados son: Brasil, Argentina, México y Venezuela con 70 millones de cabezas de ganado en riesgo y que requieren de vacunación periódica anual contra el virus rábico. Se estima que hay pérdidas anuales por arriba de 100,000 cabezas, equivalente a 50,000.000.00 de dólares por año (97).

La rata, el ratón, el conejo y el hámster, no representan especies con capacidad de transmisión, debido a la condición paralítica que ocasiona la enfermedad.

El hombre no participa activamente en la transmisión del virus y perpetuación de la rabia, ya que solo es un huésped accidental que porta el virus en forma temporal por infección o enfermedad, casi siempre por periodos reducidos (93).

La rabia en los animales se distingue de dos formas: la rabia furiosa y la paralítica o muda, según la sintomatología nerviosa predominante.

**PERROS.-** El periodo de incubación dura entre 10 días a 2 meses. En la fase prodrómica, los perros manifiestan un cambio de conducta.

Se esconden en rincones oscuros o muestran agitación inusitada y dan vueltas. Existe alta excitabilidad y el animal se sobresalta al menor estímulo. Después de 1 a 3 días, los signos de excitación y agitación se acentúan en forma notoria.

Se nota irritación en la región de la mordedura, estimulación de las vías genitourinarias y ligero aumento en la temperatura corporal con anorexia. El perro con rabia, se vuelve peligrosamente agresivo con tendencia a morder objetos, animales incluso a su propio dueño. Muchas veces, se muerde a si mismo, infligiéndose graves heridas. La salivación es abundante, ya que el animal no deglute la saliva debido a la parálisis de los músculos de deglución, y hay alteración del ladrido por la parálisis parcial de las cuerdas vocales, con un aullido ronco y prolongado. Los perros rabiosos tienen propensión a abandonar sus casas y recorrer grandes distancias, a la vez que atacan con furia a sus congéneres u otros animales. En la fase terminal de la enfermedad, con frecuencia se puede observar convulsiones

generalizadas, luego, incoordinación muscular y parálisis de los músculos del tronco y de las extremidades.

La forma muda se caracteriza por el predominio de síntomas paralíticos, en tanto que la fase de excitación es muy corta o a veces ausente. La parálisis comienza por los músculos de la cabeza y cuello. El animal tiene dificultades en la deglución y a menudo por sospecha de que el perro se haya atragantado con un hueso, el dueño trata de socorrerlo, exponiéndose de esa manera a la infección.

Luego, sobreviene parálisis de las extremidades, parálisis general y la muerte.

El curso de la enfermedad dura entre 1 a 11 días.

**GATOS.-** En los felinos domésticos como los gatos, la sintomatología es similar a la de los perros con la presentación de encefalitis y signos nerviosos de tipo furioso. En 2 a 4 días de haberse presentado los síntomas de excitación, sobreviene la parálisis del tercio posterior.

**BOVINOS.-** El virus de la rabia transmitida a los bovinos por quirópteros hematófagos, el periodo de incubación es largo, con fluctuaciones entre 25 días y más de 150.

Los síntomas predominantes son de tipo paralítico; por ello, se denomina a la enfermedad como rabia bovina pareciente o paralítica. Los animales afectados se alejan del grupo con movimientos anormales de las extremidades posteriores, lagrimeo y catarro nasal. Algunos presentan las pupilas dilatadas y el pelo erizado, otros somnolencia y depresión. Los accesos de furia son raros, pero se advierten temblores musculares, inquietud, priapismo e hipersensibilidad en el lugar de la mordedura del vampiro, de modo que los animales se rascan hasta provocarse ulceraciones. Al avanzar la enfermedad se observa incoordinación muscular y contracciones tónico clónicas de grupos musculares del cuello tronco y extremidades. Los animales tienen dificultad en la deglución y dejan de rumiar. La emaciación es notable, el morro se cubre de una baba amarillenta y espumosa y el estreñimiento es pronunciado. Los signos paralíticos suelen presentarse entre el segundo y tercer días después de iniciados los síntomas.

La duración de la enfermedad abarca de 2 a 5 días, pero en ocasiones se extiende de 8 a 10 días.

Sobre la base de la sintomatología no se puede diferenciar la rabia bovina originada por mordedura de vampiro de la causada por perros, en especial si la ocurrencia es esporádica. Los datos epizootiológicos, tales como la presencia de murciélagos hematófagos, el

hallazgo de mordedura que ocasionan estos quirópteros, la ocurrencia de múltiples casos, la preponderancia de manifestaciones paralíticas y sobre todo la ausencia de rabia canina en la región, inducen en la sospecha de rabia transmitida por vampiros. Mediante la técnica de anticuerpos monoclonales se puede identificar diferencias antigénicas, que permiten diferenciar entre el virus rábico transmitido por los vampiros del de los perros.

**OTROS ANIMALES DOMESTICOS.-** La sintomatología de la rabia en équidos, ovinos y caprinos no es muy diferente de la de los bovinos. Después de un período de excitación con duración e intensidad variables, se presentan fenómenos paralíticos que dificultan la deglución y luego provocan incoordinación de las extremidades. Se produce alteración del gusto y muchos animales ingieren objetos indigeribles. En todos los casos hay alteración de la conducta. En porcinos la enfermedad se inicia con fenómenos de excitación muy violenta y la sintomatología es en general, similar a la de los perros. La rabia en ovinos, caprinos y porcinos no es frecuente.

**ANIMALES SILVESTRES.-** La rabia ocurre naturalmente en muchas especies de cánidos y de otros mamíferos. Sobre la base de datos experimentales y algunos epidemiológicos, se considera a zorros, coyotes, chacales y lobos como los más susceptibles.

Las mofetas, mapaches, murciélagos y mangostas presentan un grado menor de susceptibilidad. Las zarigüeyas son pocos susceptibles. En ensayos experimentales se ha demostrado que para infectar mofetas se necesita una dosis por lo menos 100 veces mayor de virus que para zorros. El periodo de incubación es variable y raramente menor de 10 días o mayor de 6 meses.

#### SUCEPTIBILIDAD ENTRE ESPECIES

	MENORES	INTERMEDIAS	ALTAS
	HOMBRE	MOFETA	ZORRO
AVES	PERRO	MAPACHE	COYOTE
	OVEJA	GATO	CHACAL
	CABRA	MURCIELAGO	LOBO
	CABALLO	LINCE	RATA DE CAMPO
	PRIMATES	COBAYO	

		CONEJOS	
		BOVINOS	
		OTROS ROEDORES	

## RESERVORIOS DEL VIRUS RABICO



### 5.14 RABIA URBANA.

El perro es el principal vector de la rabia en los humanos. La infección se transmite de un perro a otro y del perro al hombre y a otros animales domésticos, por mordeduras. A pesar del desenlace mortal de la enfermedad, la rabia en las ciudades y poblados se mantiene por una importante proporción de perros susceptibles. La gran densidad de perros y su alta tasa de reproducción anual son factores importantes en las epizootías de rabia canina en América Latina y en diversas regiones. Otros factores importantes en el mantenimiento del virus es el largo período de incubación de la enfermedad en algunos perros.

En varias ocasiones se ha demostrado que el virus aparece en la saliva algunos días (2 ó 3 y a veces 13 días) antes del comienzo de la enfermedad y la eliminación del agente por esta vía puede continuar hasta la muerte del animal. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que no todos los perros rabiosos eliminan el virus por la saliva y, en consecuencia, algunas mordeduras no son infectantes. Se estima que cerca de un 60 a 75% de los perros rabiosos

eliminan virus por la saliva y su cantidad varía desde apenas vestigios hasta títulos muy altos.

Como es obvio, el riesgo de la transmisión del virus al hombre por mordedura o abrasión es mayor cuando la dosis es más alta. Asimismo el riesgo de contraer la infección aumenta cuando la mordedura se produce en la cara, cuello o manos y disminuye cuando es en el tronco o extremidades inferiores. Muchas heridas menores, por mordedura o rasguño, no contienen suficiente cantidad de virus como para provocar la enfermedad, sobre todo si se ha inferido la lesión a través de la ropa. Antes del establecimiento de los esquemas de profilaxis post-exposición, se estimaba que solo el 20% de las personas enfermaba por mordidas de perros rabiosos. En la actualidad se estima que en América Latina y el Caribe más de 370.000 personas son mordidas cada año y más de 260.000 se someten a tratamiento. La mayor parte de las mordeduras ocurren en los meses de calor.

En las zonas urbanas, los gatos siguen a los perros en el número de casos comprobados de rabia. Los gatos son huéspedes accidentales del virus y quizá no desempeñen un papel importante en el ciclo natural de la enfermedad, pero pueden servir como considerable fuente de infección humana y, por tanto, se justificaría la necesidad de aumentar su vacunación. Los gatos pueden adquirir la rabia de perros infectados o de animales silvestres con los cuales entran en contacto (87).

#### 5.15 RABIA SILVESTRE.

La rabia silvestre se mantiene en la naturaleza en forma similar a la urbana. Dentro de un determinado ecosistema, una o dos especies de mamíferos, en especial carnívoros y quirópteros, se encargan de perpetuar la rabia. En diferentes partes del mundo varias especies silvestres mantienen el ciclo del virus rábico en sus diferentes ecosistemas.

En los Estados Unidos, diferentes especies animales mantienen epizootías más o menos independientes en varias áreas. En el Este, desde Nueva Inglaterra hasta los estados del Atlántico sur, los zorros (*Vulpes fulva* y *Urocyon cinereoargenteus*) son los principales

huéspedes y vectores de la rabia, las mofetas (*Mephitis mephitis*) en los estados centro-occidentales, y los mapaches (*Procyon lotor*) en Florida y Georgia.

Ninguna de estas especies constituye un verdadero reservorio, ya que todos los animales de los que se aísla el virus de la saliva mueren a los pocos días de enfermarse. Tampoco se sabe que existan portadores sanos del virus entre otras especies de animales silvestres.

Las epizootías y enzootías entre estos animales dependen sobre todo de la dinámica de la población. Cuando la densidad de la población es alta, la rabia adquiere proporciones epizoóticas y muere un gran número de animales. Así, se estima que hasta un 60% de una población de zorros pueden morir durante una epizootía. Cuando la densidad es baja, la rabia puede presentarse en forma enzoótica o, con el tiempo, desaparecer del todo. Cuando hay una nueva generación susceptible, ocurren nuevos brotes epizoóticos. La tasa de renovación anual de las poblaciones de zorros es muy alta (hasta un 70% de la población total), y si no se controla su densidad, los brotes pueden repetirse. Sin embargo, se desconoce cuál es la densidad poblacional que debe alcanzar una especie animal para la creación de condiciones epizoóticas. El período variable de incubación, que en algunos animales pueden ser muy largos, favorece el mantenimiento de la propagación continua del virus. Se han encontrado anticuerpos contra el virus rábico en varias especies silvestres, tales como zorros, mapaches, mangostas y murciélagos insectívoros; este hecho indicaría que la infección rábica no siempre conduce a la enfermedad y muerte. En animales poco susceptibles, tales como mapaches, la tasa de reaccionantes puede ser alta en el período posepizoótico.

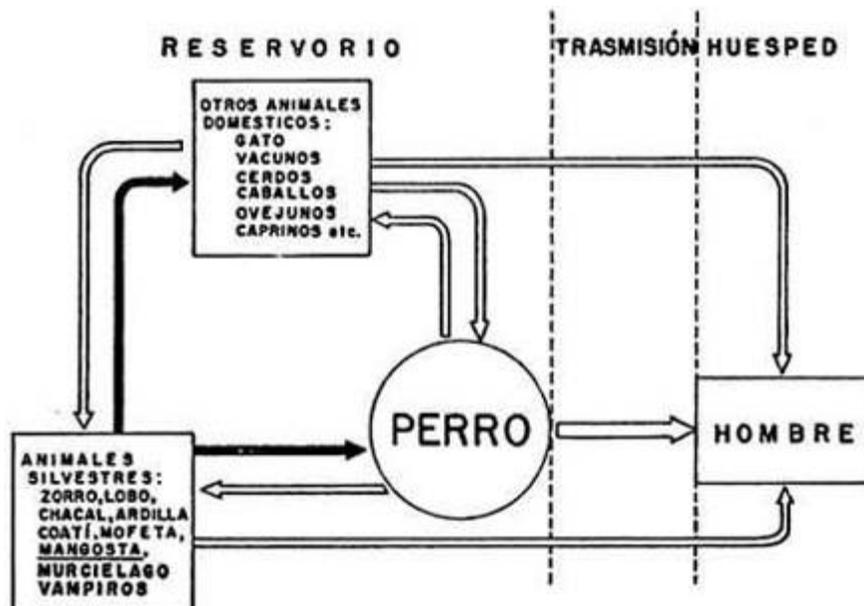
En las glándulas salivales de mangostas rabiosas se han encontrado títulos bajos del virus, y este hecho sugiere que dosis subletales de virus podrían ser transmitidas por mordedura. Incluso en especies altamente susceptibles, como los zorros, se encuentran algunos ejemplares con un título muy bajo de virus en las glándulas salivales.

La epizootiología de la rabia de los quirópteros sigue las mismas pautas que las de otros mamíferos. No se ha comprobado de modo fehaciente que haya portadores entre los murciélagos, como se había creído con anterioridad; los murciélagos mueren cuando se

enferman de rabia y nunca se ha aislado virus de las glándulas salivales sin que también lo hubiera en el cerebro.

La rabia selvática es un peligro permanente para el hombre y los animales domésticos. Cuando los animales silvestres están rabiosos, se acercan a los pobladores y pueden agredir al hombre y a sus animales. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que la proporción de carnívoros silvestres que eliminan el virus por la saliva es mas alta que la de perros. En áreas donde se ha erradicado la rabia canina, esta puede ser reintroducida por los carnívoros silvestres si la población de perros no se inmuniza de forma adecuada. La transmisión de la rabia, tanto silvestre como urbana, se produce sobre todo por mordedura de un animal que elimina el virus por la saliva a otro animal susceptible, incluido el hombre (89).

### TRANSMISIÓN DE LA RABIA.



### 5.16 VACUNAS

El pase del virus rábico en la medula espinal de conejos realizado por Pasteur dio como resultado el que el virus de la rabia atenuara su virulencia dando lugar al virus fijo utilizado como biológico por este investigador (98, 99). Los anticuerpos neutralizantes contra el

virus de la rabia son inducidos por la aplicación de las vacunas antirrábicas y juegan un papel importante en la defensa inmune contra la rabia.

Los anticuerpos neutralizantes del virus están dirigidos en forma predominante contra la glicoproteína del virus (100, 101, 102).

Las vacunas para el virus de la rabia producidas en cultivo celular, como la vacuna realizada en células diploides humanas es efectiva y empleada como protección mediante inmunización en los casos de exposición al virus de la rabia en el hombre es inactivada (103). El control por inmunización a los animales se realiza reproduciendo el virus en sistemas de cultivo celular (104). Una de las cepas de virus atenuados más comunes utilizado para la producción de vacunas es la cepa ERA.

La cepa ERA obtiene esa denominación de las iniciales de los tres investigadores que la descubrieron; Evelyn Gainor, Rokitnicky y Abelseth, del laboratorio Canadiense Connaught en Toronto. El virus se multiplica comúnmente en cultivo primario de riñón de cerdo. (105, 106, 107).

Se han hecho estudios de crecimiento y estabilidad *in vitro* del virus de la rabia, diseñado para la vacunación de animales de vida salvaje (108).

#### 5.17 BASES MOLECULARES DE LA SUSCEPTIBILIDAD.

Los estudios *in vitro* realizados con fibroblastos y células derivadas de neuroblastomas, sugieren la existencia de receptores saturables y específicos para el virus rábico (38). Sin embargo, su identificación no ha sido obtenida. Parece ser que el receptor del virus de la rabia depende de la naturaleza de la célula hospedera.

De esta manera, sí se ha demostrado que los gangliósidos juegan un papel en la adsorción del virus rábico en fibroblastos (109) y que el receptor nicotínico está implicado en su fijación a las células musculares.

#### 5.18 ACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

La conformación de la proteína G se modifica bajo el efecto del pH ácido y se revelan regiones hidrófobas que permiten su unión a la membrana lisosomal (33, 110). Probablemente algunos anticuerpos anti-G neutralizan el virus rábico al inhibir la etapa de fusión (46), mientras que otros anticuerpos aparentemente neutralizan el virus por la vía clásica, que es la de inhibir la adsorción de la proteína G a su o sus receptores sobre la célula hospedera.

### 5.19 *Lactococcus lactis*.

La bacteria Gram-positiva, *Lactococcus lactis* es usada en diversos procesos en la industria alimenticia y tiene la particularidad de que no sobrevive en el tracto digestivo de animales y humanos (111). Las pruebas en el laboratorio demostraron que *L. lactis* no produce ninguna proteasa extracelular. Hasta 1995 se conocían siete especies y subespecies (112).

Estas bacterias son comunes en el ambiente y generalmente son consideradas no patogénicas en humanos. Sin embargo algunos reportes han descrito su participación en infecciones en humanos (113, 114, 115). La biología ha sido extensamente estudiada y su genoma ha sido secuenciado (112). Los genes involucrados en el proceso metabólico de transporte y fijación de proteínas en la pared celular han sido identificados. Uno de ellos, controlado por la enzima sortasa, ha sido explotado para transportar y fijar proteínas recombinantes en la pared celular de la bacteria.

Existen estudios que han evaluado el efecto de *L. lactis* como sistema presentador de antígenos en el sistema inmune, los antígenos son segregados o expresados intracelularmente en el citoplasma del hospedero. Otra característica de *L. lactis* es que puede expresar además de antígenos, moléculas biológicamente activas, como citocinas, las cuales al ser expresadas en la membrana de la bacteria, pueden modular la respuesta inmune y funcionar como adyuvantes para generar una mejor respuesta inmune: *L. lactis* recombinante que expresa TTFC (toxina de tétanos) en su citoplasma, e interleucina 2 (IL-2) o IL-6 en su membrana (116). En cuanto a estudios de administración intranasal de *L.*

*lactis* recombinantes que expresan E7 e IL-12 se observó que hubo una respuesta inmune suficiente para proteger a ratones en contra de la administración letal de células tumorales TC-1 que expresan E7 (117).

Esta protección se logró tanto en inmunización preventiva, i.e. antes de la dosis letal, como en inmunización terapéutica, i.e. después de 7 días de la dosis letal, lo que indica una respuesta tanto humoral como celular (119). *L. lactis* puede ser utilizada para producir tanto antígenos en su citoplasma, como citocinas segregadas, lo cual ha sido recientemente explotado para generar una mejor respuesta inmune al antígeno E7 del virus de papiloma humano tipo 16, el cual en sí no genera una respuesta inmune celular fuerte, pero con la co-expresión de interleucina 12 (IL-12) se mejoró significativamente la respuesta inmune (118). A pesar de su incapacidad de colonizar, *L. lactis* es capaz de llevar antígenos heterólogos al sistema inmune mucosal y sistémico a través de la ruta mucosal (118). La inmunización mucosal con una vacuna de *L. lactis* con *env* de HIV expresado en su superficie pudo reducir y evitar la infección por HIV en un modelo animal (119).

Diversos grupos de investigación trabajan en desarrollar su uso potencial para nuevas aplicaciones, tales como la producción de proteínas heterólogas (120).

*L. lactis* es excelente para la expresión y estudio de proteínas integrales de membrana tanto de procariotes como de eucariotes (121). Las proteínas de membrana expresadas son directamente exportadas a la membrana, la bacteria tiene actividad proteolítica débil por la proteasa HtrA que puede ser eliminada genéticamente (122). La bacteria tiene una sola membrana, la cual es fácilmente solubilizada por diferentes detergentes (121). Adicionalmente, el tener una sola membrana le permite ser un buen hospedero para expresar proteínas para secreción extracelular y/o anclaje a la membrana, en donde también ayuda su baja actividad de proteinasas extracelulares, como por ejemplo, la proteinasa anclada a membrana PrtP (200 kDa) (123).



*Lactococcus lactis.*

*L. lactis* también se ha utilizado como un vector de expresión para diferentes organismos. Varios investigadores usan las especies de *Lactococcus* como vectores (129). El uso de *Lactococcus lactis* como un vector de vacunación ha emergido como uno de los más avanzados prototipos de una posible nueva clase de vacunas bacterianas derivadas de bacterias Gram-positivas no invasivas y no patogénicas (118).

*Lactococcus lactis* ha sido manipulado extensamente para la producción de diversas proteínas (124, 125, 126, 127), incluyendo algunos antígenos de origen bacterial y viral (124, 125, 128).

El desarrollo de genes de expresión eficientes y sistemas de secreción de proteínas convenientes para el uso en bacterias ácido lácticas inofensivas pueden permitir que esos microorganismos sean usados para la producción y secreción de un número de proteínas heterólogas (129). *L. lactis* puede ser considerado un buen candidato para la secreción de proteínas heterólogas por dos razones: 1) relativamente pocas proteínas son conocidas para ser secretadas por *L. lactis* solo una, UsP45 es secretada en cantidades detectables por azul de Coomassie y 2) las proteínas segregadas son más propensas a degradación extracelular (130, 131, 132).

Para investigar la efectividad de *L. lactis* recombinante como vector de antígenos en vacunas recombinantes, se utilizó una cepa de *L. lactis* recombinante que expresa el fragmento C de la toxina del tétanos TTFC, la cual fue administrada en ratones de varias formas: oral, intranasal e intraperitoneal con o sin adyuvante completo de Freund (FCA) (133), con buenos resultados.

La inmunización oral en diversos regímenes de *L. lactis* que expresa el gen ureasa subunidad B (UreB) de *Helicobacter pylori* en su citoplasma, no logró generar una

respuesta inmune protectora contra *H. pylori*, por lo que el efecto adyuvante de *L. lactis* por si mismo en este caso no fue suficiente para generar una respuesta inmune contra un inmunógeno débil (124). Otro ejemplo de *L. lactis* recombinante es la producción de un candidato vacunal contra *Brucella abortus* (134). Estudios en los mecanismos fundamentales en la biología, fisiología y genética de las bacterias ácido lácticas demuestran que se pueden usar en nuevas aplicaciones (134, 135, 136).

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **6.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento.**

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: 1) *Escherichia coli* Top 10, obtenida del Kit TA cloning (Invitrogen); y 2) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, donada por el Laboratorio de Ingeniería en Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla. Los plásmidos fueron: 1) pKB3-JE-13, que contenía un fragmento de ADN que codifica la fracción antigénica de la glicoproteína del virus rábico; 2) pGEMT-VECTOR (Promega) es un sistema para la clonación de productos de PCR, este vector agrega timidina en los extremos finales. Esos T-3' sobresalen al sitio de inserción e incrementan la eficiencia de ligación del producto de PCR dentro del plásmido para prevenir la recircularización del vector; 3) pOri23, basado en pIL253, que le confiere la capacidad de expresarse en *Lactococcus lactis*, contiene el gene ermAM que codifica la resistencia a Eritromicina, el locus OriColE1, que permite su replicación en *E. coli*; los locus repD y repE, que controlan su replicación en *L. lactis* y el promotor P23 que promueve una expresión alta y constitutiva del gene clonado (137). Para el crecimiento de *E. coli*, se utilizó medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L), a 37 °C en agitación constante (200 rpm) o sobre medio LB suplementado con agar al 1.5%. Se usó ampicilina a una concentración de 10 µg/mL. Para *L. lactis* se utilizó medio GM17 (adicionado con glucosa al 0.5%) o medio GM17-Gly (adicionado con glicina al 1%), a 30 °C en agitación constante (200 rpm) o sobre medio GM17 (adicionado con glucosa al 0.5%) suplementado con agar al 1.5%. Se usó eritromicina a una concentración final de 5 µg /mL.

### **6.2 Construcción y amplificación de plásmidos.**

La construcción del plásmido que codifica para la glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico se realizó utilizando el plásmido pKB3-JE-13-Gp-G y los iniciadores GPA1 For y GPA 1 Rev. La amplificación se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

El fragmento de ADN que codifica la fracción antigénica de la Gp-G, insertado en el plásmido pKB3-JE-13, fue amplificado utilizando los iniciadores GPA1 For (5' ATG AAT CCC GGG ATG GTT CCT CAG GCT 3') y GAP1 Rev (5' CAG TCT GAG CTC ACC CCC ACT CTT GTG TGA 3').

La reacción se preparó como sigue: 5.0 µL de Taq mix 2x, 0.50 µL de GPA1 For (2.5 pmol), 0.50 µL de GPA1 Rev (2.5 pmol), 0.25 µL de ADN (pKB3-JE-13-Gp-G, 50 ng/mL) 3.75 µL de agua libre de nucleasas. Al mismo tiempo se realizó un control negativo (sin ADN). La PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos como sigue: desnaturalización a 95 °C por 5 min, alineamiento a 94°C por 15 seg, hibridación a 50 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado ADNc resultante fue de 1500 pb y en su secuencia presenta un sitio de acción para la enzima de restricción Sac I y Xma I. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. El producto de PCR correspondiente a GP-G fue purificado e insertado dentro de la región de unión (Linker) del plásmido pGEMT-VECTOR (Promega). La reacción de ligación se llevó a cabo con el kit de ligación rápida (Fermentas) como sigue: 10.0 µL de amortiguador (5X rapid ligation buffer) 1X, 2.0 µL de producto de PCR, 1 µL de plásmido pGEMT-VECTOR, 1 µL de T4 ADN ligasa y 6 µL de agua, incubada a 4 °C durante toda la noche.

### **6.3 *E. coli* competentes y su transformación con el plásmido pGEMT-Gp-G.**

Para obtener bacterias competentes se tomaron (1 mL) de un precultivo de 24 horas de la cepa *E. coli* Top 10, se sembró en 15 mL de medio LB, y se creció a 37 °C en agitación constante (200 rpm) hasta una D.O. 0.6 – 0.7. El cultivo se colocó en hielo por 1 min y se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 4000 rpm. El sobrenadante se descartó y la pastilla (bacterias) se lavó con 1 ml de TFB1 estéril (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM acetato de potasio, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, pH 5.8), se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y la pastilla se resuspendió en 1.5 mL de TFB2 estéril (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 Mm CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, pH 6.8 con KOH). Finalmente se hicieron alícuotas de 100 µL de cultivo de bacterias competentes y se almacenaron a -80 °C.

Para llevar a cabo la transformación de bacterias competentes, a una alícuota con (100  $\mu$ L) se les incorporó el plásmido pGEMT-GP-G a una concentración de 10-15 ng/mL, se incubó en hielo por 30 min, después a 42 °C por 1 min a baño María, se le añadió a la mezcla 1 mL de LB y se volvió a cultivar a 37 °C en agitación constante (200 rpm) por 1 hora. Finalmente se realizó una siembra de cultivo (200  $\mu$ L) en placas de LB-agar, usando una asa de vidrio, las placas se cultivaron a 37 °C toda la noche.

#### **6.4 Extracción del ADN plasmídico pGEMT-Gp-G y amplificación por PCR.**

Se seleccionaron 10 colonias transformadas por el procedimiento anteriormente descrito.

Cada colonia se sembró en 1 ml de medio LB adicionado con 1  $\mu$ L de ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante 12 h. A 500  $\mu$ L del crecimiento bacteriano se le adicionaron 500  $\mu$ L de glicerol estéril (como agente preservante, para minimizar los cambios genéticos) y se almacenaron a -20°C. El resto de material, se utilizó para la extracción del ADN plasmídico utilizando el kit Ultra Clean 6 Minute Mini Plasmid Prep (MO BIO Laboratories, Inc). Brevemente, el cultivo bacteriano se centrifugó 5 min a 14,000 rpm y la pastilla se resuspendió en 50  $\mu$ L de la solución I, 100  $\mu$ L de la solución II, 325  $\mu$ L de la solución III, se mezclaron por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se colocó directamente en una membrana de afinidad, se agregaron 300  $\mu$ L de la solución IV y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min, la membrana se colocó en un tubo limpio y se agregó 50  $\mu$ L de agua libre de nucleadas para eluir el ADN. Los productos purificados fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Este ADN plasmídico se utilizó como plantilla para la PCR. El fragmento de ADN que codifica para la fracción antigénica de la Gp-G, ya insertado en el plásmido pGEMT-VECTOR, fue amplificado utilizando los iniciadores GPA1 For y GPA1 Rev. Las condiciones de la reacción: fueron: 5.0  $\mu$ L de Taq mix 2x, 0.5  $\mu$ L de GPA1 For (2.5 pmol/mL), 0.5  $\mu$ L de GPA1 Rev (2.5 pmol/mL), 0.25  $\mu$ L de ADN (pGEMT-Gp-G 15 ng/mL), 3.75  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Al mismo tiempo, se realizaron los controles: para el control positivo se utilizó una alícuota de plásmido pKB3-JE-13-Gp-G y para el control negativo no se puso ADN. La PCR se llevó a cabo por 30 ciclos bajo las siguientes

condiciones: desnaturalización a 95 °C por 5 min, alineamiento a 94 °C por 15 seg, hibridación a 50 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por 10 min.

El fragmento amplificado ADNc resultante fue de 1500 pb y en su secuencia presenta un sitio de acción para la enzima de restricción Sac I y Xma I. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se identificaron las clonas congeladas que fueron positivas para el fragmento esperado 1500 pb y se les realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico como anteriormente se describió (MO BIO Laboratories, Inc) y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

### **6.5 Construcción del plásmido pOri23-Gp-G y su expresión en *Lactococcus lactis*.**

Para la expresión de Gp-G en *Lactococcus lactis*, se utilizó el plásmido pOri23, amablemente donado por Que 2000, dicho plásmido venía acoplado con un fragmento del antígeno Cloning Factor de *Staphylococcus aureus* (pOri23-CI), por lo cual se realizó una reacción de digestión enzimática para liberarlo, y así poder insertar la Gp-G del virus rábico.

Para obtener tanto el plásmido pOri23 como el fragmento de ADN que codifica la fracción antigénica de la Gp-G libre se realizaron reacciones de restricción. Para lo cual, una alícuota del cultivo de *E. coli* transformada con pGEMT-Gp-G se inoculó en 15 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL), y por otra parte, una alícuota de *E. coli* transformada con pOri23-CI se inoculó en 15 ml de medio LB adicionado con eritromicina (100 µg/mL). Ambos cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h, en agitación constante (200 rpm). Se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico mediante el método descrito anteriormente (MO BIO Laboratories, Inc).

A cada plásmido (pGEMT-Gp-G y pOri23) se les realizó una doble reacción de restricción con las enzimas Xma I y Sac I (New England Biolabs), como sigue: 20 µL de ADN (pGEMT-Gp-G o pOri23), 1.5 µL de Sac I, 1.5 µL de Xma I, 5 µL de Amortiguador 4 y 22 µL de agua estéril. Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C durante 3 h. Los productos de

la digestión Gp-G (1,500pb) y pOri23 (6,600 pb), fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Ambas bandas fueron extraídas de manera individual y purificadas mediante el DNA extraction kit (Fermentas Life Sciences).

Brevemente, a un volumen de gel (correspondiente a la banda 1,500 pb o la banda 6,600 pb) se le agregaron 3 volúmenes de solución de unión. Se incubó la mezcla a 55 °C por 5 min o hasta que el gel se deshizo completamente. Por cada 2.5 µg de ADN se agregaron 5 µL de suspensión de sílica gel. Se mezclaron y se incubaron a 55 °C por 5 min, para permitir que el ADN se uniera a la matriz de la sílica, agitando cada 2 min para que la sílica permanezca en suspensión. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min, el sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó 3 veces con 500 µL de amortiguador de lavado frío. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 10 o 15 min, para eluir el ADN, ésta última se resuspendió con 14 µL de agua y se incubó a 55 °C durante 5 min. Los productos purificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

## **6.6 Transformación de *E. coli* con el plásmido pOri23-Gp-G.**

Para obtener el plásmido pOri23-Gp-G se realizó una reacción de ligación con. Quick Ligation Kit (New England Biolabs), como sigue: 2 µL de pOri23 (50 ng/mL), 3 µL de Gp-G (50 ng/mL), 1 µL de Quick T4 DNA Ligasa, 1.5 µL de Amortiguador de ligación, 7.5 µL de agua destilada, se incubó a 22 °C, durante 10 min y posteriormente a 4 °C toda la noche. El plásmido pOri23-Gp-G fue clonado en bacterias *E. coli* competentes por medio de choque térmico.

Brevemente, en un tubo de micro centrífuga se agregaron 100 µL de *E. coli* competentes y 15 µL del plásmido pOri23-Gp-G, se mezclaron suavemente, y se mantuvieron en hielo durante 20 min, posteriormente se incubaron en baño María a 42 °C por 90 seg y se agregaron 500 µL de medio PSI (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, 4 mM de MgSO<sub>4</sub>, 10 Mm KCl), se incubó a 37 °C durante 60 a 90 min en agitación constante (200 rpm). Se sembraron 50, 100 y 200 µL de *E. coli* transformadas en

placas de cultivo de LB-agar con eritromicina (5 µg/mL) y como control negativo, 50 µL de éstas mismas bacterias en placas de LB-agar con ampicilina (100 µg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C, por 16 h. Se seleccionaron 10 colonias transformadas. Cada colonia se sembró en 5 mL de medio LB adicionado con eritromicina (5 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 h, en agitación constante (200 rpm). Posteriormente, 500 µL del crecimiento bacteriano se colocaron en 500 µL de glicerol estéril, y se almacenaron a -20 °C.

El resto de material se utilizó para la extracción del ADN plasmídico como anteriormente se mencionó (MO BIO Laboratories, Inc) y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Este ADN plasmídico se utilizó como plantilla para la PCR.

El fragmento de ADN que codifica la fracción antigénica de la Gp-G, insertado en el plásmido pOri23, fue amplificado utilizando los iniciadores GPA1 For y GAP1 Rev. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 5.0 µL de Taq mix 2x, 0.50 µL de GPA1 For (2.5 pmol/mL), 0.50 µL de GPA1 Rev (2.5 pmol/mL), 0.25 µL de ADN pOri23-Gp-G, (50 ng/mL), 3.75 µL de agua destilada. Al mismo tiempo se realizaron los controles tanto positivo como negativo (como control positivo se utilizó una alícuota de PCR de pKB3-JE-13-Gp-G y como control negativo a la PCR no se le puso ADN). La reacción se llevó a cabo durante 30 ciclos como sigue: desnaturalización a 95 °C por 5 min, alineamiento a 94 °C por 15seg, hibridación a 50 °C por 30seg y extensión a 72 °C por 10min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. A las clonas que resultaron positivas se les realizó la extracción del ADN plasmídico (pOri23-Gp-G) mediante el sistema MO BIO (Laboratories Inc.). Una vez purificado los pOri23-Gp-G, las muestras se almacenaron a -20 °C para posteriormente ser clonado en bacterias *L. lactis* competentes.

## **6.7 Expresión de Gp-G en *Lactococcus lactis* competentes.**

Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de un precultivo de 16 horas de la cepa *L. lactis*, y se inocularon en 20 mL de medio GM17 (DIBICO)-gly (SIGMA) (0.5% de glicina), se dejó crecer a 30 °C en agitación constante (200 rpm) hasta una D.O. 0.6, en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5%. Las bacterias se centrifugaron y se lavaron 3 veces con 1 ml de electroamortiguador estéril (0.5M de sacarosa, 10% glicerol), se resuspendieron en 2 mL de electroamortiguador, se hicieron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y se almacenaron a -80 °C.

Para llevar a cabo la transformación de *L. lactis*, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de bacterias competentes y se le agregaron 5.0  $\mu\text{L}$  del plásmido pOri23 -Gp-G, se incubó en hielo por 20 min.

La suspensión bacteriana se colocó en una celda y se electroporó (BTX) a 25  $\mu\text{F}$ , 2.5 KV y 200 Ohms de resistencia, inmediatamente después, las bacterias electroporadas se agregaron a 1 ml de medio de recuperación (GM17, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) precalentado, y se incubaron a 30 °C por 2 horas en agitación constante (200 rpm). Se sembraron 50, 100 y 200  $\mu\text{L}$  de *L. lactis* transformadas en placas de cultivo con medio GM17-agar con eritromicina (5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a 30 °C, por 16 h, en ambiente de CO<sub>2</sub> al 5 %. Se seleccionaron 30 colonias transformadas. Cada colonia se sembró en 1 ml de medio GM17 adicionado con eritromicina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a 30 °C, en atmosfera de CO<sub>2</sub> durante 16 h, en agitación constante (200 rpm). Posteriormente, 500  $\mu\text{L}$  del crecimiento bacteriano se colocaron en 500  $\mu\text{L}$  de glicerol estéril y se almacenaron a -20 °C. El resto de material, se utilizó para la extracción del ADN plasmídico para *L. lactis* (138), y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Este ADN plasmídico se utilizó como templado para la PCR y digestión enzimática.

### **6.8 Extracción de ADN plasmídico (pOri23- Gp-G) de *Lactococcus. lactis*.**

Para la extracción de ADN plasmídico de la cepa *L. lactis* transformada con pOri23-Gp-G, se tomaron 1.5 mL de un precultivo de 16 horas bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Las bacterias transformadas se centrifugaron, el sobrenadante se descartó y la pastilla de bacterias se lavó con 400  $\mu\text{L}$  de acetona fría.

La pastilla se resuspendió con 200  $\mu$ L de solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, 20 mg/mL de lisozima y 100 mg/mL de RNAsa, pH 8.0), se mezcló vigorosamente y se incubó a 37 °C por 15 min. Posteriormente, se agregaron 300  $\mu$ L de solución II (0.2 M de NaOH, 2% de SDS), se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 3 min y finalmente, se agregaron 70  $\mu$ L de solución III fría (1.2 M Tris-HCl (pH 7.0), 2 M de NaCl, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1), la suspensión se mezcló por inversión durante 3 minutos, adicionándose 500  $\mu$ L de fenol, y nuevamente se mezcló. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 600  $\mu$ L de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 600  $\mu$ L de isopropanol, se mantuvo en hielo por 15 minutos y se centrifugó bajo las mismas condiciones.

La pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70%, se secó por evaporación y por último se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua estéril. Con la finalidad de corroborar que el inserto de Gp-G haya sido el correcto, el ADN plasmídico anteriormente obtenido, fue amplificado nuevamente mediante PCR. A los productos de esta reacción se les realizó una doble reacción de restricción bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Los productos de la restricción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Una fracción de estos productos de reacción se mandó a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (CINVESTAV-IRAPUATO).

### **6.9 Extracción de Proteínas de Pared Celular de *Lactococcus lactis* transformada con Gp-G.**

Dos alícuotas de *Lactococcus lactis* transformada con pOri23 - Gp-G y una con pOri23 (sin Gp-G, como control) se inocularon de forma individual en 500 ml de medio GM17, se incubaron a 30 °C durante 16 h, en agitación constante (200 rpm) y con una atmósfera de

CO<sub>2</sub>. Los cultivos se centrifugaron a 5000 xg, a 4 °C, durante 10 min, el sobrenadante fue descartado y las pastillas se lavaron 2 veces con 15 ml de NaCl 0.9 M frío. Cada pastilla se resuspendió con 5 ml de amortiguador de lisis (sacarosa 1.1 M, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM en PBS), adicionado con RNAsa 100 µg/mL, DNAsa 50 µg/mL, un coctel de antiproteasas, lisozima 5 mg/mL, mutanolisina 100 µg/mL. A una muestra se le agregó Tritón X-100 (2%) y a la otra NP-40 (2%). Las muestras se incubaron a 37 °C por 30 min, en agitación constante (120 rpm). La lisis celular se llevó a cabo por el método de choque térmico-congelación-descongelación con nitrógeno líquido, para garantizar la completa ruptura de pared celular de la bacteria. Las muestras se centrifugaron a 10000 xg, a 4 °C, durante 30 min. Los sobrenadantes (con las proteínas de pared) se dializaron contra PBS a 4° C, la noche.

La concentración de proteínas se determinó por el método de (139).

#### **6.10 Detección por ELISA de Gp-G en la pared de *Lactococcus lactis* transformado.**

Se utilizó el kit de ELISA Anti-Mouse/Anti-Rabbit Bluephos System (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc).

Brevemente, se forraron placas de 96 pozos con 100 µL de Antígeno (extracto total de proteínas y proteínas de pared celular de *L. lactis* transformada con Gp-G, a diferentes concentraciones de 10 hasta 50 µg/mL) diluído en solución de recubrimiento (coating solution), se incubó a 4 °C toda la noche. La placa se vació y se eliminó todo el líquido residual, y se adicionaron a cada pozo 300 µL de solución de bloqueo (blocking solution). Se incubó 15 min, la placa se vació y se eliminó todo el líquido residual. Se adicionaron 100 µL de anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína del virus rábico de ratón (Chemicon International), dilución 1:500), se incubó a temperatura ambiente toda la noche, se vació la placa y se eliminó todo el líquido residual. Los pozos se lavaron 3 veces con 100 µL de solución de lavado (wash solution) 10 min cada vez. El lavado se realizó por 3-5 veces. La placa se vació y se eliminó todo el líquido residual. A cada pozo se le adicionaron 100µl de anticuerpo secundario (anticuerpo Anti-Mouse IgG (H+L) marcado con fosfatasa alcalina, dilución 1:100), se incubó a temperatura ambiente durante

1h, se vació la placa y se eliminó todo el líquido residual. La placa se lavó como se describió anteriormente. La reacción se reveló como sigue: (50  $\mu$ L de solución A conteniendo 50  $\mu$ L de solución B) a cada pozo se le adicionaron 100 $\mu$ L de sustrato, cuando se desarrolló un color suficiente a cada pozo se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de paro (stop solution). El extracto total de proteínas de *L. lactis* transformadas pOri23 (sin Gp-G) se usó como control negativo. Las densidades ópticas fueron leídas a 620 nm, en un lector de microplacas (Diagnostics Pasteur).

### **6.11 Inmunofluorescencia Indirecta de *Lactococcus lactis* transformada con Gp-G.**

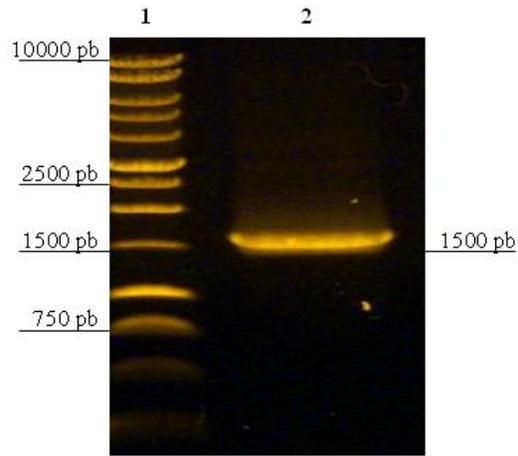
Una alícuota de 100  $\mu$ L de cultivo saturado de *L. lactis* transformada con Gp-G se inoculó en 1 ml de medio GM17 adicionado con eritromicina (5  $\mu$ g/mL) y se incubó a 30 °C, en agitación constante (200 rpm) hasta alcanzar una DO 600 de 0.4. La muestra se centrifugó a 14000 rpm/ 4 min; la pastilla celular se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en 0.5 ml de PBS.

Se adicionaron 50  $\mu$ L de anticuerpo primario diluido 1:500 (anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína del virus rábico de ratón (Chemicon International), o anticuerpo policlonal anti-rabia diluido 1:500 (donado por la Dra. Sandra Cuevas del INIFAP). Se incubaron en oscuridad toda la noche a temperatura ambiente, con agitación ligera (100 rpm). Las preparaciones se lavaron con PBS en 5 ocasiones por centrifugación y se resuspendió en 0.5 ml de PBS, se le adicionó 100  $\mu$ L de anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (anti mouse IgG, marca American Qualex). Se incubaron en oscuridad toda la noche a temperatura ambiente, en agitación ligera (100 rpm). Las preparaciones se lavaron con PBS 5 veces (por centrifugación). La pastilla celular se resuspendió en 50  $\mu$ L de PBS. Como control negativo, se usó una cepa de *L. lactis* transformada con el plásmido pOri23 (sin la Gp-G). Con una alícuota de 10  $\mu$ L de cada una de estas suspensiones se realizaron frotis, y se observaron bajo microscopio Nikon modelo E600 equipado con un sistema confocal (Nikon modelo C1).

## **7. RESULTADOS.**

### **7.1 Amplificación del gen de la glicoproteína G (Gp-G).**

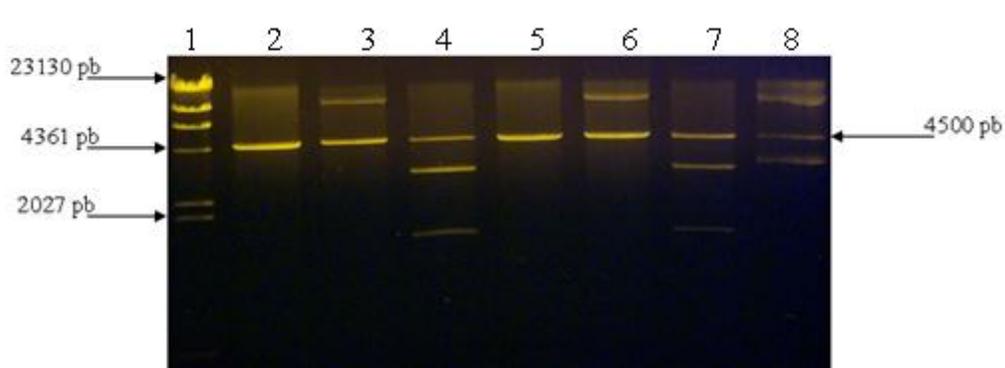
Los iniciadores GPA1-F y GPA1-R permitieron amplificar un producto de tamaño esperado (1500 pb), correspondiente al gen de la Gp-G. El tamaño fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa 0.8% y tinción con bromuro de etidio (Figura 1).



**Figura 1. Amplificación por PCR del gen de la Gp-G del virus de la rabia.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio en el que se observa el producto de PCR de 1500 pb obtenido a partir de pKB3-JE-13-Gp-G. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 KB, carril 2: Fragmento amplificado de la Gp-G del virus rábico.

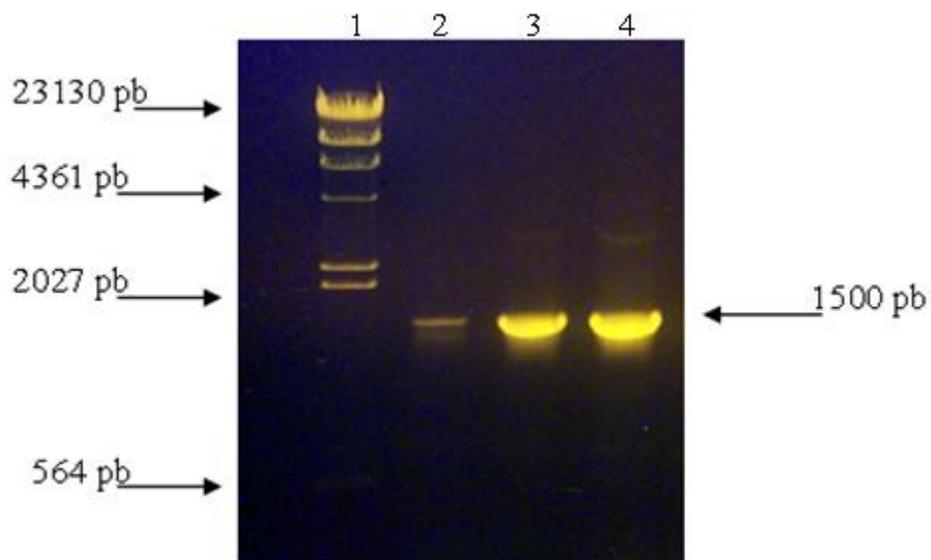
## 7.2 Confirmación del inserto en el plásmido pGEMT-Gp-G.

Para confirmar la identidad del inserto en *E. coli* Top 10 transformadas con el plásmido pGEMT-Gp-G se seleccionaron 7 colonias (escogidas al azar entre mas de 50), (Fig 2). Se realizó una PCR con los iniciadores específicos GPA1 F y GPA1 R de 2 clonas.



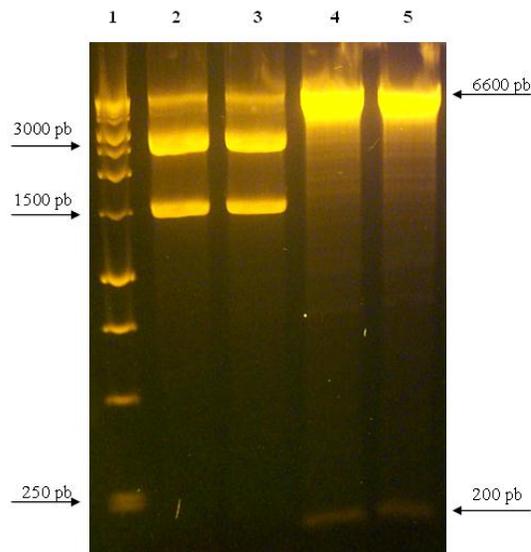
**Fig. 2. Confirmación del inserto en el plásmido pGEMT-Gp-G.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Segmento de Gp-G obtenido de 7 colonias de *E. coli* Top 10 transformadas con pGEMT-Gp-G y digeridas con la enzima Sac I. Carril 1: Marcador de peso molecular Lambda Hind III, carril 2-8: clonas transformadas con el plásmido pGEMT-Gp-G positivas (1500 pb).

Los resultados obtenidos por PCR confirmaron que las colonias contenían el inserto de tamaño correcto e idéntico al producto de PCR originalmente obtenido con pKB3-JE-13-Gp-G (Figura 3).



**Fig 3. Producto del PCR del ADN plasmídico de 2 clonas positivas.** Carril 1: Marcador de peso molecular Lambda Hind III, Carril 2: control positivo (pKB3-JE-13-Gp-G); Carril 3: clona 2-1, Carril 4: clona 3-1.

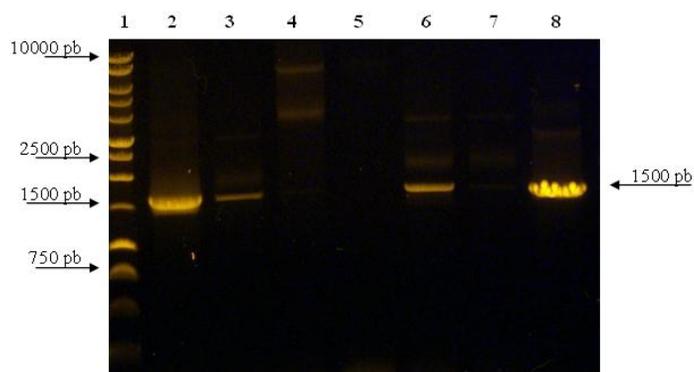
Posteriormente se realizó un análisis por restricción enzimática sobre los productos de PCR obtenidos del plásmido pGEMT-Gp-G purificado. En la figura 4 se observa que los fragmentos obtenidos de la doble digestión son del tamaño esperado. Debido a que el plásmido de expresión pOri23 venia ligado a un fragmento CI (200 pb), también se realizo una doble digestión enzimática del plásmido. Los productos de digestión de ambas reacciones fueron analizados por electroforesis.



**Fig. 4. Análisis por restricción enzimática.** El plásmido pGEMT-Gp-G purificado de las bacterias se amplificó por PCR y los productos obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción Xma I y Sac I. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2, 3: Productos de la digestión del plásmido pGEMT-Gp-G de las clonas 2-1 y 3-1, respectivamente; carril 4, 5: productos de la digestión del plásmido pOri23-CI. Los productos de la digestión muestran el tamaño esperado: GP-G (1500 pb) y pOri 23 (6,600 pb).

### 7.3 Clonación en el vector de expresión.

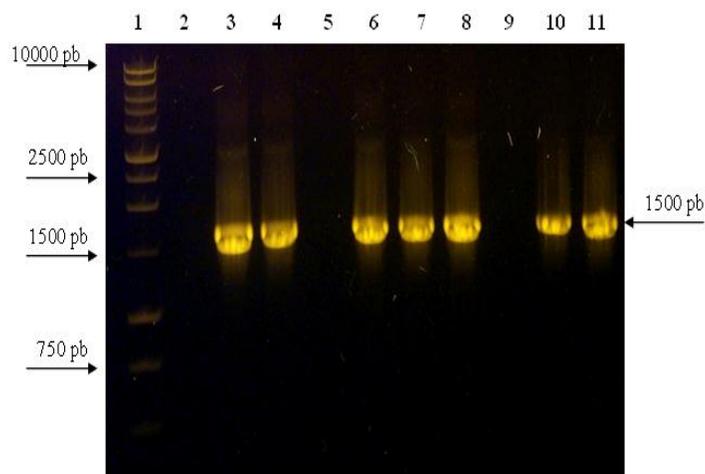
El fragmento de ADN que codifica la fracción antigénica de la Gp-G, insertado en el plásmido pOri23, fue amplificado utilizando los iniciadores GPA1 For y GAP1 Rev. La transfección en *E. coli*, del nuevo plásmido recombinante permitió seleccionar al azar 7 colonias resistentes a eritromicina y ser sometidas a PCR con los iniciadores específicos GPA 1-F y GPA 1-R confirmando la identidad del inserto subclonado. (Fig. 5). Las clonas de los carriles 3, 6 y 8 dieron positivas para el tamaño esperado de 1500 pb. La colonia que permitió la amplificación mas evidente fue seleccionada para inducir la expresión de la glicoproteína G (clona 3-1).



**Fig. 5 Clonación en el vector de expresión.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8%, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kbp, carril 2: Control positivo Gp-G (1500 pb), carriles 3-8: Clonas con el inserto subclonado.

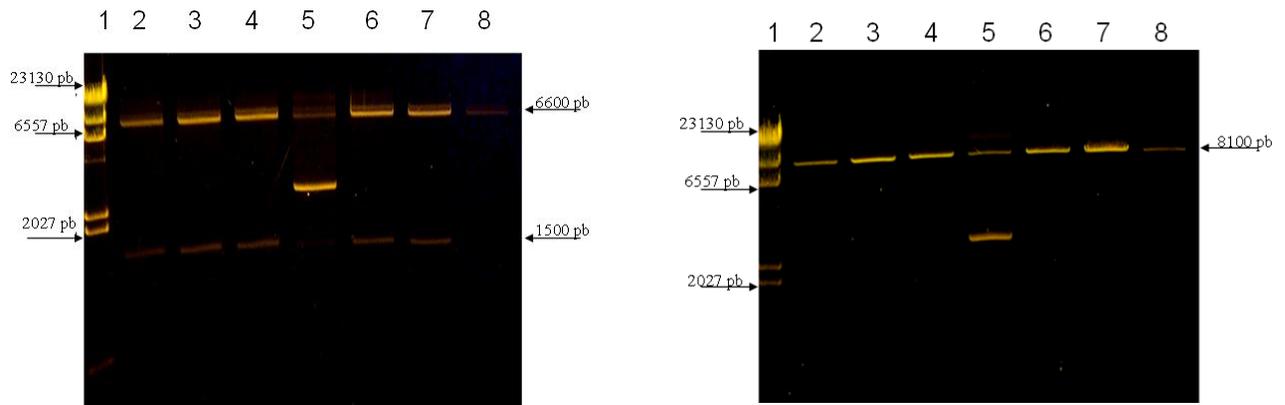
#### 7.4 Expresión de Gp-G en *L. lactis* competentes.

La transfección en *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* del nuevo plásmido recombinante permitió seleccionar al azar 10 colonias resistentes a eritromicina y sometidas a PCR con los iniciadores específicos GPA1 F y GPA1 R confirmando la identidad del inserto subclonado (Figura 6). El ADN plasmídico purificado de estas colonias fue sometido a ensayos de restricción enzimática con las enzimas Sac I y Xma I, confirmando nuevamente la identidad del inserto y la conservación de los sitios intactos de reconocimiento (Figura 6).



**Fig. 6 Expresión de Gp-G en *L. lactis* competentes.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb, carriles 2-11: productos de PCR Gp-G (1500 pb).

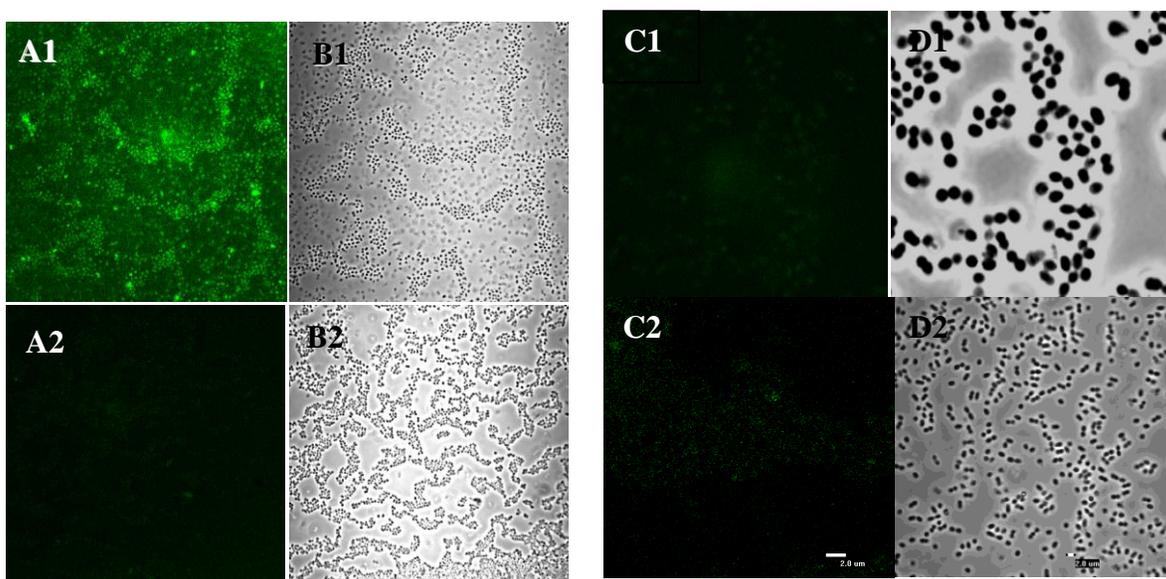
A las 7 clonas que salieron positivas se les hizo doble digestión con las enzimas Sac I y Xma I de y digestión sencilla con la enzima Sac I NEB.



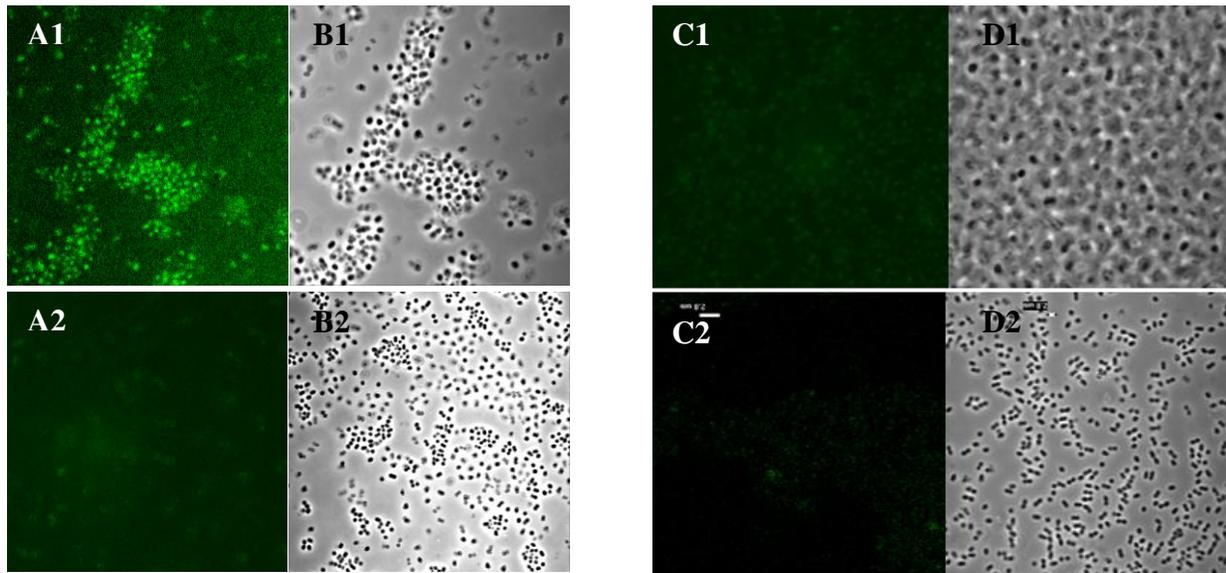
**Fig. 7 Análisis de restricción. A). Liberación del plásmido GP-G con Sac I y Xma I.** Carril 1: marcador de peso molecular Lambda Hind III, carriles 2-4,6-8 productos esperados Gp-G (1500 pb) y pOri23 (6600 pb). **B) Linearización de plásmido pOri23-Gp-G.** Carril 1: marcador de peso molecular Lambda Hind III; carriles 2-4, 6-8. Fragmento esperado de 8100 pb (Sac I).

### 7.5 Inmunofluorescencia indirecta de *Lactococcus lactis* transformada con la glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico.

Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal, observados bajo microscopía confocal demuestran la presencia de pOri23-Gp-G tanto en la clona 2-1 como en la 3-1. (Fig. 8, panel A1 y C1, respectivamente). Podemos observar un mejor reconocimiento por parte de la clona 3-1 (Fig. 8, panel A1), mientras que *L. lactis* silvestre no muestra reconocimiento (Fig. 8, panel A2 y C2, respectivamente). Las imágenes correspondientes al contraste de fases de cada ensayo, se muestran en la Fig. 8 paneles B1, B2, D1, y D2.



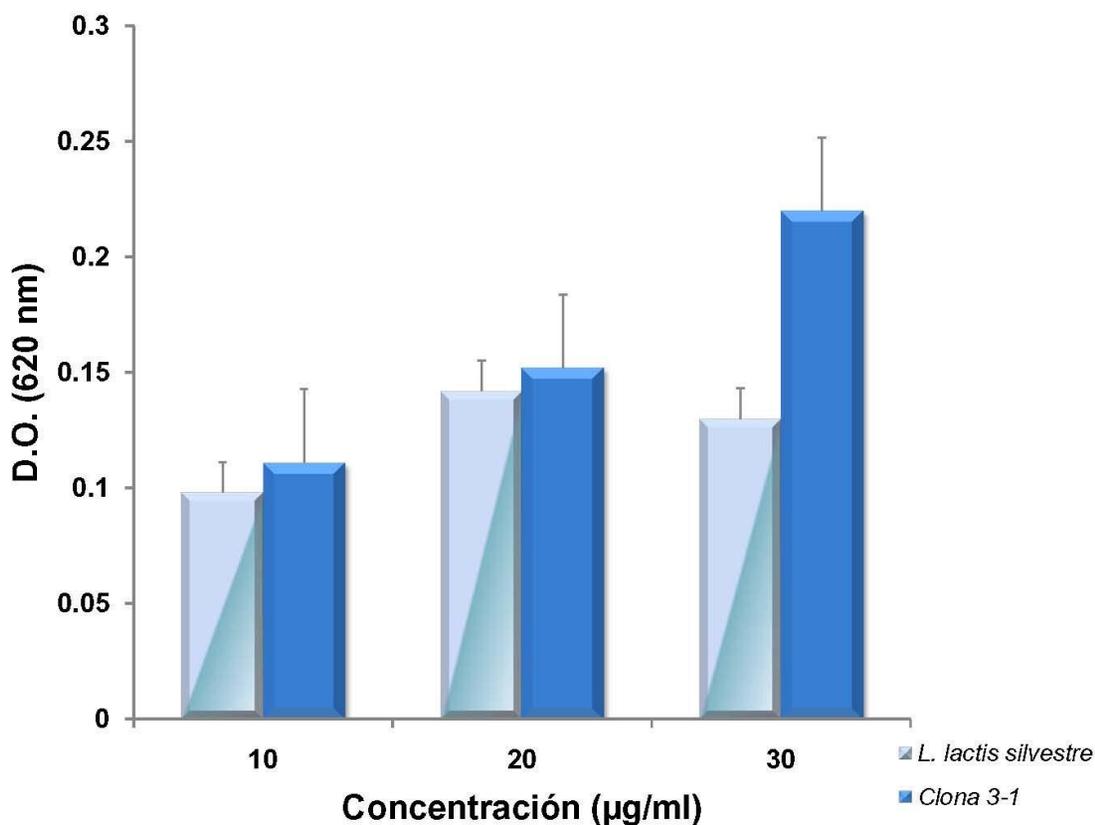
**Figura 8. Inmunofluorescencia indirecta para detectar Gp-G en *Lactococcus lactis* con un anticuerpo monoclonal.** Panel A1) Clona 3-1 transformada con pOri23-Gp-G; panel C1) clona 2-1 transformada pOri23-Gp-G, incubadas con anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína del virus rábico de ratón. Panel A2 y C2) *L. lactis* silvestre como control negativo. Panel B1, B2, D1 y D2) Correspondientes a su imagen en contraste de fases. Imagen Confocal a 100X.



**Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta para detectar Gp-G *Lactococcus lactis* con un anticuerpo policlonal.** Panel A1) Clona 3-1 transformada con pOri23-Gp-G; panel C1) clona 2-1 transformada pOri23-Gp-G, incubadas con anticuerpo policlonal antirabia. Panel A2 y C2) *L. lactis* silvestre como control negativo. Panel B1, B2, D1 y D2). Correspondientes a su imagen en contraste de fases. Imagen Confocal a 150X.

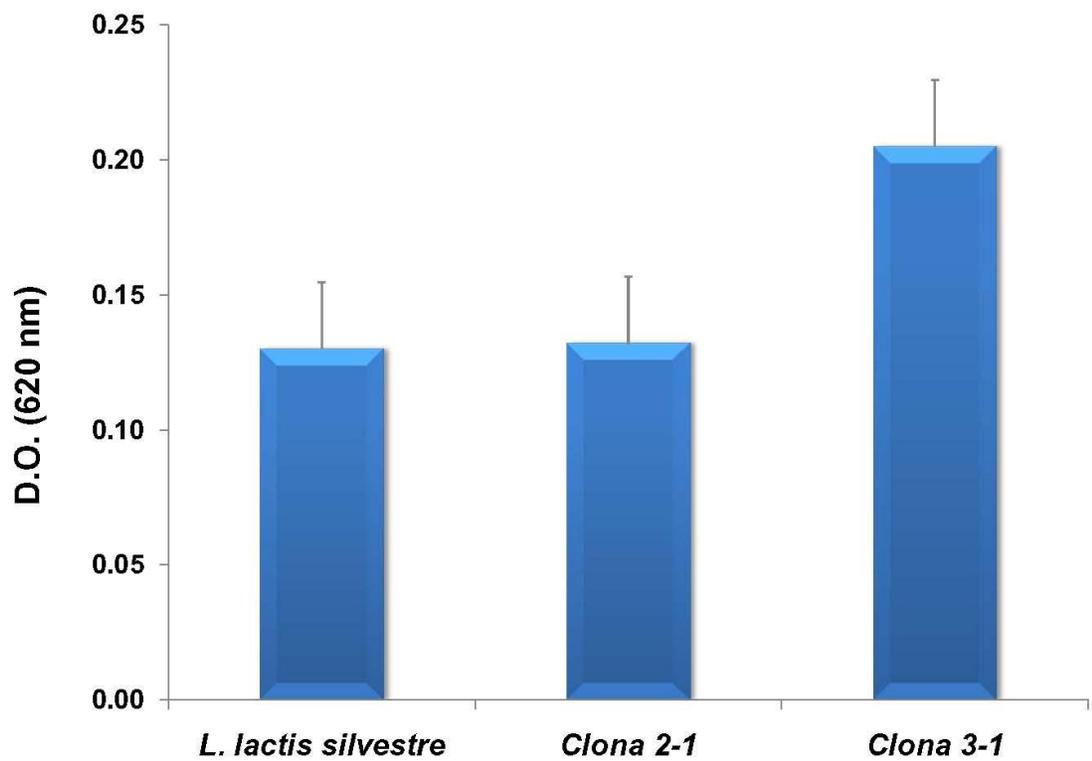
## 7.6 Detección por ELISA de Gp-G de *Lactococcus lactis* transformado.

La valoración de la expresión de la Gp-G en las clonas de *L. lactis* transformadas se realizó mediante un ensayo de ELISA utilizando extracto total (ET) de proteínas y un anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína del virus rábico. El ensayo se realizó con diferentes concentraciones del antígeno (10-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tanto de las clonas transformadas, como de bacterias silvestres. La gráfica 1 muestra que la clona 3-1 presenta un incremento en la expresión de la Gp-G dependiente de la concentración, comparada con las bacterias silvestres. La concentración óptima de proteína fue 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El mismo comportamiento se observó con la clona 2.1 (datos no mostrados).



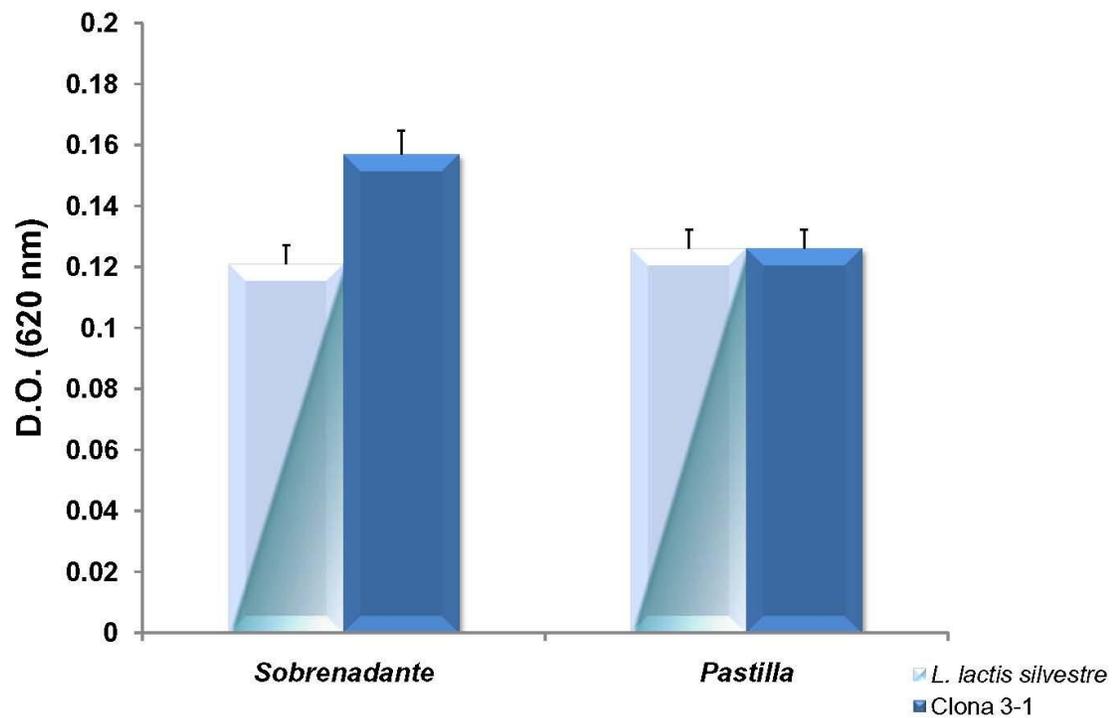
Gráfica 1. Expresión de Gp-G en Extracto Total de proteínas de la clona 3-1.

La gráfica 2 muestra que a una concentración de 30  $\mu\text{g/mL}$ , la clona 3-1 presenta una mayor expresión de la Gp-G comparada con la clona 2-1 y que las bacterias silvestres.



Gráfica 2. Comparación de la expresión de Gp-G entre las clonas 3-1 y 2-1.

Debido a que se obtuvo un bajo rendimiento en la expresión de la Gp-G en ET, se decidió realizar un fraccionamiento del extracto proteico de *L. lactis* transformada. La grafica 3 muestra que la Gp-G esta presente en la fracción soluble (sobrenadante) tal y como se esperaba y no en la pastilla.



Gráfica 3. Análisis del fraccionamiento proteico de *L. lactis* transformada.

## 8. DISCUSIÓN.

Recientemente se ha informado sobre la generación y caracterización fenotípica de varios antígenos recombinantes del virus de la rabia que pueden potencialmente ser usados para la protección mediante la vacunación contra esta enfermedad (140, 141, 142, 143). Entre las estrategias para el desarrollo de nuevos biológicos recombinantes, el uso de vectores, es una herramienta indispensable. El concepto de vector puede ser definido como el organismo al cual es posible introducir genes de patógenos no relacionados en su genoma. El vector transformado, es capaz de expresar proteínas heterólogas y presentarlas al sistema inmune mediante un biológico recombinante (144).

El control de la rabia en la fauna silvestre implica el hacer llegar la vacuna a reservorios animales como; zorros, coyotes, mapaches, hurones, etc. en su ambiente natural. En estas especies se ha ensayado vacunas recombinantes de aplicación oral mediante cebos. Uno de los vectores empleados es el virus recombinante transformado del virus de la viruela V-RG que expresa la glicoproteína del virus rábico. La vacuna recombinante V-RG desarrolla anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia y se demostró su seguridad en pruebas con primates no humanos (145).

Otro ejemplo de vacuna recombinante es el de la expresión de la glicoproteína del virus rábico en el virus pox de los canarios como vector de expresión (146). Y en vectores basados en rhabdovirus vivos e inactivados como una vacuna contra hepatitis C. (147).

También se han hecho estudios en donde usaron tecnología recombinante y construyeron un vector del virus rábico el cual expresa altos niveles de anticuerpos neutralizantes. El vector es una cepa modificada del virus rábico en el cual la glicoproteína del virus rábico tiene que ser reemplazada con una glicoproteína quimérica del virus de estomatitis

vesicular, este virus recombinante puede infectar una variedad de líneas celulares de mamíferos que permiten el uso de tecnología de cultivo celular para producir vacunas contra rabia (148).

Los biológicos recombinantes arriba referidos requieren de la infraestructura de cultivos celulares para la replicación del virus con gastos similares a las vacunas antirrábicas de la actualidad y adicionado el costo del mantenimiento del virus recombinante. Por otro lado, existe el desarrollo de vacunas de DNA como biológicos recombinantes que expresan la glicoproteína del virus de la rabia. Este grupo de biológicos son eficientes en la protección ante el desafío natural y experimental y emplean a otros virus no relacionados como promotores, además para que la inmunogenicidad de estos productos sea la adecuada, se requiere de la asociación de adyuvantes especiales que incrementan la respuesta inmune (149).

Otros biológicos recombinantes han empleado plantas para su expresión, como la expresión del la glicoproteína del virus rábico en tomates transgénicos (150). Una ventaja en el uso de vectores de DNA es la fácil construcción, manipulación y producción (150). Para llevar a cabo altos niveles de expresión de la glicoproteína, la transcripción de la glicoproteína del virus rábico es llevada bajo el control de promotores altamente activos y facilitadores de la expresión, como el virus de los simios SV40 (151).

Un ejemplo de la evaluación de la eficacia es el análisis de vacunas de rabia basadas en DNA y probados en ratones (151, 152, 153), perros, gatos (154) y primates no humanos (155), después de la exposición experimental al VR donde los investigadores coinciden en que las vacunas de DNA inducen altos títulos de anticuerpos neutralizantes del virus rábico. La glicoproteína del virus rábico se utilizó como antígeno (156). La glicoproteína purificada del virus rábico usada como antígeno, induce anticuerpos neutralizantes y puede ser usada como la vacuna antirrábica ideal para el humano (157). Las vacunas basadas en vectores de plásmidos y las vacunas que emplean virus recombinantes que expresan la glicoproteína del VR (virus rábico), son ejemplos del avance en materia de producción de vacunas (157).

Otro abordaje de interés por la economía que representa en su preparación, son las vacunas recombinantes expresadas en virus de plantas como el virus del mosaico del tabaco replicado en alfalfa y espinacas. Estos productos han demostrado no solo su eficiencia en ratones desafiados, sino también su inocuidad y producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en voluntarios humanos que consumieron las plantas con los virus quiméricos transformados (158). Otro experimento realizado en el virus del mosaico en la alfalfa, es que éste fue usado como una molécula acarreadora para expresar péptidos antigénicos del virus rábico y HIV. Ambos antígenos fueron inductores de anticuerpos específicos contra la glicoproteína del VR en los ratones inmunizados (159).

No obstante el progreso en mejorar el tratamiento pre y post exposición al VR, el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos y productos antivirales junto con vacunas de menor costo y eficiencia, continúan siendo un reto por alcanzar.

La bacteria Gram-positiva, *Lactococcus lactis* es usada en diversos procesos en la industria alimenticia y tiene la particularidad de que no sobrevive en el tracto digestivo de animales y humanos (111). Las pruebas en el laboratorio demostraron que *L. lactis* no produce ninguna proteasa extracelular. Hasta 1995 se conocían siete especies y subespecies (123).

Estas bacterias son comunes en el ambiente y generalmente son consideradas no patogénicas en humanos. Sin embargo algunos reportes han descrito su participación en infecciones en humanos (113, 125, 126). La biología ha sido extensamente estudiada y su genoma ha sido secuenciado (112).

Los genes involucrados en el proceso metabólico de transporte y fijación de proteínas en la pared celular han sido identificados. Uno de ellos, controlado por la enzima sortasa, ha sido explotado para transportar y fijar proteínas recombinantes en la pared celular de la bacteria. Existen estudios que han evaluado el efecto de *L. lactis* como sistema presentador de antígenos en el sistema inmune, los antígenos son segregados o expresados intracelularmente en el citoplasma del hospedero. Otra característica de *L. lactis* es que puede expresar además de antígenos, moléculas biológicamente activas, como citosinas, las cuales al ser expresadas en la membrana de la bacteria, pueden modular la respuesta inmune y funcionar como adyuvantes para generar una mejor respuesta inmune: *L. lactis*

recombinante que expresa TTFC (toxina de tétanos) en su citoplasma, e interleucina 2 (IL-2) o IL-6 en su membrana (116). En cuanto a estudios de administración intranasal de *L. lactis* recombinantes que expresan E7 e IL-12 se observó que hubo respuesta inmune suficiente para proteger a ratones en contra de la administración letal de células tumorales TC-1 que expresan E7 (117). Esta protección se logró tanto en inmunización preventiva, i.e. antes de la dosis letal, como en inmunización terapéutica, i.e. después de 7 días de la dosis letal, lo que indica una respuesta tanto humoral como celular (119).

*L. lactis* puede ser utilizada para producir tanto antígenos en su citoplasma, como citosinas segregadas, lo cual ha sido recientemente explotado para generar una mejor respuesta inmune al antígeno E7 del virus de papiloma humano tipo 16, el cual por sí mismo no genera una respuesta inmune celular fuerte, pero con la coexpresión de interleucina 12 (IL-12) se mejoró significativamente la respuesta inmune (118).

A pesar de su incapacidad de colonizar, *L. lactis* es capaz de llevar antígenos heterólogos al sistema inmune mucosal y sistémico a través de la ruta mucosal (118). La inmunización mucosal con una vacuna de *L. lactis* con *env* de HIV expresado en su superficie pudo reducir y evitar la infección por HIV en un modelo animal (119). Muchos investigadores trabajan en desarrollar su uso potencial para nuevas aplicaciones, tales como la producción de proteínas heterólogas (120). *L. lactis* es excelente para la expresión y estudio de proteínas integrales de membrana tanto de procariones como de eucariotes (121). Las proteínas de membrana expresadas son directamente exportadas a la membrana, la bacteria tiene actividad proteolítica débil por la proteasa HtrA que puede ser eliminada genéticamente (122). La bacteria tiene una sola membrana, la cual es fácilmente solubilizada por diferentes detergentes (121).

Adicionalmente, el tener una sola membrana le permite ser un buen hospedero para expresar proteínas para secreción extracelular y/o anclaje a la membrana, en donde también ayuda la baja actividad de proteinasas extracelulares, como por ejemplo, la proteinasa anclada a membrana PrtP (200 kDa) (123).

*L. lactis* también se ha utilizado como un vector de expresión para diferentes organismos. Varios investigadores usan las especies de *Lactococcus* como vectores (129). El uso de

*Lactococcus lactis* como un vector de vacunación ha emergido como uno de los más avanzados prototipos de una posible nueva clase de vacunas bacteriales derivadas de bacterias Gram-positivas no invasivas y no patogénicas (118).

*Lactococcus lactis* ha sido manipulado extensamente para la producción de diversas proteínas (124, 125, 126, 127), incluyendo algunos antígenos de origen bacterial y viral (124, 125, 128). El desarrollo de genes de expresión eficientes y sistemas de secreción de proteínas convenientes para el uso en bacterias ácido lácticas inofensivas pueden permitir que esos microorganismos sean usados para la producción y secreción de un número de proteínas heterólogas (129). *L. lactis* puede ser considerado un buen candidato para la secreción de proteínas heterólogas por dos razones: 1) relativamente pocas proteínas son conocidas para ser secretadas por *L. lactis* solo una, UsP45 es secretada en cantidades detectables por azul de Coomassie y 2) las proteína secretadas son mas propensas al tiempo de degradación extracelular (130, 131, 132). Diversos grupos de investigadores han probado la efectividad de *L. lactis* recombinante como vector de antígenos en vacunas recombinantes, por ejemplo: Robinson K, et al. 2004 (133) utilizó una cepa de *L. lactis* que expresa el fragmento C de la toxina del tétanos TTFC, la cual fue administrada en ratones de varias formas: oral, intranasal e intraperitoneal con o sin adyuvante completo de Freund (FCA) (133), obteniendo buenos resultados.

Wells J, et al. 1993 (129) expresó el gen ureasa subunidad B (UreB) de *Helicobacter pylori* en el citoplasma de *L. lactis*, no logró generar una respuesta inmune protectora contra *H. pylori*, por lo que el efecto adyuvante de *L. lactis* por si mismo en este caso no fue suficiente para generar una respuesta inmune. Ribeiro LA, et al. 2002 (134) utilizó *L. lactis* recombinante en la producción de un candidato vacunal contra *Brucella abortus*.

Estudios en los mecanismos fundamentales en la biología, fisiología y genética de las bacterias ácido lácticas demuestran que se pueden usar en nuevas aplicaciones (134, 135, 136). En el presente trabajo se obtuvieron *Lactococcus lactis* silvestres y 2 clonas C3-1 y C2-1, mediante la clonación de la glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico en *L. lactis*.

Debido a que en diversos estudios demuestran que *Lactococcus lactis* puede ser un buen candidato para expresar antígenos en vacunas recombinantes, nuestro grupo de

investigación se interesó en ver si dicha bacteria podría ser capaz de expresar a la glicoproteína G (GP-G) del virus rábico en su pared celular.

Con base a los resultados obtenidos se pudo validar que el vector de expresión pOri23-CL<sup>-</sup> expresó la Gp-G en *Lactococcus lactis* en donde se logró ver una banda por PCR de 1500 pb (Gp-G), así mismo por doble digestión se observaron las bandas de 6.6 Kb de pOri23 y de 1500 pb (Gp-G), los mismos resultados positivos aportó la secuenciación.

En este trabajo se obtuvieron *Lactococcus lactis* silvestres y 2 clonas C3-1 y C2-1, mediante la clonación de la glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico en *Lactococcus lactis*. Se realizaron experimentos por inmunofluorescencia indirecta de *Lactococcus lactis* silvestre y la clona 3-1 y 2-1, se evaluó la expresión de la glicoproteína G (Gp-G) en *Lactococcus lactis* y se observó por microscopía confocal con un anticuerpo monoclonal comercial (anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína del virus rábico de ratón, Chemicon International), así como con un anticuerpo policlonal (antirabia). Se observó que tanto con el anticuerpo policlonal como con el monoclonal, el reconocimiento fue igual en la clona 3-1; sin embargo cabe resaltar que el reconocimiento en la clona 2-1 con ambos anticuerpos fue menor que el de la clona 3-1.

En cuanto a la cuantificación por el método de ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal, se realizaron diferentes concentraciones de antígeno de 10 hasta 30 µg/mL tanto de *Lactococcus lactis* silvestre como de la clona 3-1. Se observó que a 30 µg/mL fue la concentración en donde se encontró el mayor reconocimiento de la clona 3-1, comparada con *Lactococcus lactis* silvestre y la clona 2-1

De manera general podemos concluir que la glicoproteína G (Gp-G) del virus rábico en la clona 3-1 tuvo una mayor expresión, tanto en los experimentos de inmunofluorescencia indirecta como en el ensayo de ELISA, comparada con la expresión de la clona 2-1 y *Lactococcus lactis* silvestre.

En relación a la cuantificación de la Gp-G por ELISA, utilizando el anticuerpo monoclonal (anti glicoproteína, CHEMICON INTERNATIONAL), pudimos corroborar que a 30 µg/mL la Gp-G se expresa mayoritariamente en la clona 3-1, comparada con la clona 2-1 y

como se observó en los ensayos de fluorescencia utilizando un detergente no iónico como el NP40.

La fracción del sobrenadante (que es en la que se localiza la Gp-G) fue la que tuvo una mayor expresión de dicha proteína, no sucediendo lo mismo con la pastilla celular cuyo valor fue igual a del control negativo (*Lactococcus lactis* silvestre).

Cabe señalar que el resultado anterior se refuerza al cuantificar la expresión de la Gp-G en la clona 3-1 del sobrenadante de *Lactococcus lactis*, en donde se confirma que la Gp-G se encuentra expresada en dicha fracción

El producto obtenido en el presente trabajo podrá ser evaluado en su capacidad de protección ante el desafío experimental con virus rábico en modelo animal como en ratón.

## **9. REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS.**

1. Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, Smith CL. The molecular biology of rabies virus. *Rev Infect Dis* 1988; 10: S771-S784.
2. Faber M, Pulmanusahakul R, Hodawadekar SS, Spitsin S, McGettigan JP, Schnell MJ, Dietzschold B. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J Virol* 2002, 76:3374-3381.
3. Walker P, Kongsuwan K. Deduced structural model for animal Rhabdovirus glycoproteins. *J Gen Virol* 1999, 80: 1211-1220.
4. Jackson A. Rabies pathogenesis. *J Neuro Virol* 2002; 8: 267-9.
5. Xiang ZQ, Spitalnik S, Minh Tran, Wunner WH, Jun Cheng, Ertl HCJ. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994; 1: 132-140.
6. Patial S, Chaturvedi V, Rai A, Saini M, Chandra R, Saini Y, Gupta P. Virus neutralizing antibodies response in mice and dogs with a bicistronic DNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein and canine parvovirus VP2. *Vaccine* 2007; 25: 4020-8.
7. Perrin P, Jacob Y, Aguilar A, Loza E, Jallet C, Desmezieres E, et al. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999; 18: 479-86.

8. Osorio JE, Tomilson CC, Frank RS, Haanes EJ, Roshlow K, Haynes JR, Stinchcomb DT. Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine* 1999; 17: 1109-1116.
9. Lodmell DL, Ray NB, Pornell MJ, Ewalt LC, Hanlon CA, Shaddock JH, Sanderlin DS, Rupprecht CE. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med* 1998; 4: 949-952.
10. Gupta P, Sharma S, Walunj S, Chaturvedi V, Raut A, Patial S, et al Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. *Vet Microbiol* 2005; 108: 207-14.
11. Feyssaguet M, Dacheux L, Audry L, Compoin A, Morize J, Blanchard I, et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIATM RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine* 2007; 25: 2244-51.
12. Wilkinson L. Understanding the nature of rabies: An historical perspective. In: Campbell JB, Charlton KM, eds. *Rabies*. Boston: Kluwer Academic 1988; 1: 1-23.
13. Kaplan MM, Koprowski H. Rabies. *Sci Am* 1980; 242: 120-134.
14. Smith JS, Fishbein DB, Rupprecht CE, Clark E. Unexplained rabies in 3 immigrants in U.S.A. *N Engl J Med* 1991; 324: 205-211.
15. Fekadu M, Endeshau T, Alemu W, Bogale Y, Teshanger T, Olson JG. Possible human-to-human transmission of rabies in Ethiopia. *Ethiop Med J* 1996; 34: 123-127.
16. Koprowski H. La rage et la vaccination rabique de Pasteur a nos jours. *Bull Inst Pasteur* 1985; 83: 301-308.
17. Kristensson K, Dastur DK, Manghani DK, Tsiang H, Bentivoglio M. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22: 179-187.
18. Babes V. *Traite de la Rage*. Paris: Bailliere et Fils, 1912.
19. Habel K, Koprowski H. Laboratory data supporting the clinical trial of antirabies serum in persons bitten by a rabid wolf. *Bull World Health Organ* 1955; 13: 773-779.

- 20 Lin FT, Chen SB, Wang YZ, Sun CZ, Zeng FZ, Wang GF. Use of serum and vaccine in combination for prophylaxis following exposure to rabies. *Rev Infc Dis* 1988; 10: 766-770.
21. Koprowski H. In vitro production of antirabies vaccine. *Symp Ser Immunobiol Stand* 1966; 1:357-366.
22. Dietschy JM. Encephalitis. *Neurology* 1985; 1: 19-24.
23. Wagner RR. Reproduction of rhabdoviruses. In H. Fraenkel-Conrat and RR Wagner *Comprehensive Virology* 1975; 1-93.
24. Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Infectious Diseases. Lancet* 2002; 2: 327.
25. Dietzschold B, Rupprecht CE, Tollis M, Lafon M, Mattei J, Wiktor JT, Koprowsky H. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Rev Infect Dis* 1988; 10 (suppl 4): 785-798.
26. Bingham J, Javangwe S, Sabeta CT, Wandeler AI, Nel LH. Report of isolations of unusual lysaviruses (rabies and mokola virus) identified retrospectively from Zimbabwe. *JS Afr Vet Assoc* 2001; 72: 92-94.
27. Wagner RR, Prevec L, Brown F, Summers DF, Sokol F and MacLeod R. Classification of rhabdovirus proteins: A proposal. 1. *Viral* 1972; 10: 1228-1230.
28. Whitby JE, Johnstone P, Parsons G, King AA, Hutson AM. Ten-years survey of British bats for the existens of rabies. *Vet Rec* 1996; 139: 491-493.
29. King A, Crick J. Rabies-related viruses. In: Campbell J, Charlton KM, eds. *Rabies*. Boston: Kluwer Academic 1988, 1: 177-199.
30. Murphy FA, Fauquet CM, Mayo MA, Jarvis AW, Ghabrial SA, Summers MD, Martelli GP, Bishop DHL. The classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol* 1995.
31. Bourhy H, *Lyssaviruses: Special emphasis on Rabies virus*. Instituto Pasteur 1998.
32. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Walking along the rabies genome: is the large GL intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci* 1986b; 83: 3914-3918.

33. Whitt MA, Bounocore L, Préhaud C and Rose JK. Membrane fusion activity, oligomerization and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology* 1991; 185: 681-688.
34. Gaudin Y, Ruigrok RW, Tufferereau C, Knossow M and Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 1992; 187: 627-632.
35. Langevin C, Jaaro H, Bressanelli S, Fuinzilber M and Tuffereau C. Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N- terminalcysteine-rich domain of the mammalian P75 neurotrophin receptor. *J. Biol Chem* 2002; 277: 37655-37662.
36. Varki A. Biological roles of oligosaccharides; all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993; 3: 97-130.
37. Dietzschold B, Wiktor TJ, Macfarlan RI and Varrichio A. Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: ordering and immunological characterization of the large CnBr cleavage fragments. *Virology* 1982; 44: 595-602.
38. Wunner WH, Reagan KJ, Koprowski H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *Virology* 1984; 50: 691-697.
39. Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B and Flammand A. Low affinity nerve-growth factor-receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J* 1998; 17: 7250-7259.
40. Coll JM. The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Arch of Virology* 1995; 140: 827-851.
41. Cox JH, Dietzschold B and Schneider LG. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect Immun* 1977; 16: 754-759.
42. Wiktor TJ, Gyorgy E, Schlumberger D, Sokol F and Koprowski H. Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol* 1973; 110: 269-276.
43. Cellis E, Karr RW, Dietzschold B, Wunner WH and Koprowski H. Genetic restriction and fine specificity of human T cell clones reactive with rabies virus. *J Immunol* 1988; 141: 2721-2728.
44. McFarland RI, Dietzschold B and Koprowski H. Stimulation of cytotoxic T, lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. *Mol Immunol* 1986; 23: 733-741.

45. Gaudin Y, Ruigrok RW, Knossow M and Flammand A. Low PH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol* 1993; 67: 1365-1372.
46. Dietzschold B, Wiktor TJ, Wuner WH, Varichio A. Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology* 1983a; 124: 330-337.
47. Dietzschold B, Tollis M, Lafon M, Wunner W, Koprowski H. Mechanisms of rabies virus neutralization by glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Virology* 1987; 161: 29-36.
48. Kieny MP, Lathe R, Drillien R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, Wiktor TJ, Koprowski H, Lecocq JP. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 1984; 312: 163-166.
49. Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, Kieny MP, Lathe R, Lecocq JP, Mackett M, Moss B, Koprowski H. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 7194-7198.
50. Precev L, Campbell JB, Christie BS, Bclbeck L, Graham FL. A recombinant human Adenovirus vaccine against rabies. *The Journal of Infectious Diseases* 1990; 161: 27-30.
51. Dietzschold B, Tollis M, Lafon M, Wunner WH, Koprowski H. Mechanisms of rabies virus neutralization by glycoprotein –specific monoclonal antibodies. *Virology* 1987a; 161: 29-36.
52. Ferguson M, Schild GC. A single radial immunodiffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: application for potency tests of vaccines against rabies. *J Gen Viral* 1982; 59: 197-201.
53. Lafon M, Perrin P, Versmisse P, Sureau P. Use of a monoclonal antibody for quantitation of rabies vaccine glycoprotein by immunoassay. *J Biol Stand* 1984; 13: 295-301.
54. Montaña-Hirose JA. Direct ELISA to evaluate the glycoprotein content of suckling mouse brain rabies vaccines. *Arq Biol Tecnol* 1986; 29: 413-421.
55. Turner GS. Immune response after rabies vaccination: basic aspects. *Ann Inst Pasteur/Viral* 1985; 136E: 453-460.
56. Sokol F, Koprowski H. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72: 933-936.

57. Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, Smith CL. The molecular biology of rabies virus. *Rev Infect Dis* 1988; 10: S771-S784.
58. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acid Res* 1986a; 14: 2671-2683.
59. Lafon M, Wiktor TJ. Antigenic sites of the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. *J Gen Virol* 1985; 66: 2125-2133.
60. Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez R, Vuillier F, Charron D, Lotteau V, Scott-Algara D. Evidence for a viral super antigen in humans. *Nature* 1992; 358: 507-510.
61. Lafon M, Scott-Algara D, Jouvin-Marche E, Marche PN. Superantigenicity of rabies virus nucleocapsid in humans and mice. In: *Super antigens: A pathogens view of the immune system*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993; 1: 117-138.
62. Sokol F, Stancek D, Koprowski H. Structural proteins of rabies virus. *J Virol* 1979; 7: 241-249.
63. Zaides VM, Krotova LI, Selimova LM, Selimov MA, Elbert LB, Zhdanov VM. Re-evaluation of the proteins in rabies virus particles. *J Virol* 1979; 29: 1226-1228.
64. Dietzschold B, Cox JH, Schneider LG. Rabies virus strains: a comparison study by polypeptide analysis of vaccine strains with different pathogenic patterns. *Virology* 1979; 98: 63-75.
65. Larson JK, Wunner WH, Otvos LJR, Erth HCJ. Identification of an immunodominant epitope 7 within the phosphoprotein of rabies virus that is recognized by both class I and class II restricted T cells. *J Virol* 1991; 65: 5673-5679.
66. McSharry JJ, Wagner RR. Carbohydrate composition of purified vesicular stomatitis virus. *J Virol* 1971; 7: 412-415.
67. Delagneau JF, Perrin P, Atanasiu P. Reevaluation de la structure du virus rabique: relations spatiales entre les proteines constitutives du virus. *Revue de Institut Pasteur de Lyon* 1981; 3: 377-399.
68. Wilson T, Lenard J. Interaction of wild-type and mutant M protein of vesicular stomatitis virus with nucleocapsid *in vitro*. *Biochemistry* 1981; 20: 1349-1354.
69. Pal R, Wagner RR. Rhabdovirus membrane and maturation. In: *The rhabdoviruses* (R. R. Wagner, ed). Plenum Publishing Corp 1987; 1: 75-128.

70. Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, Tordo N. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignments of functional domains. *J Gen Virol* 1990; 71: 1153-1162.
71. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* 1988; 2: 565-576.
72. Kawai A. Transcriptase activity associated with rabies virion. *J Virol* 1977; 24: 826-835.
73. Hunter, Swarzwisler, Clyde. *Tropical medicine*. G. B. Saunders Company 1987; 1: 47.
74. Guarnera E A, Álvarez PE, Gómez SJ, Amador VJ. Guía para el tratamiento de la rabia en el hombre. INPPAZ 1993; 2: 7-8.
75. Freeman BA. Rhabdovirus. En: *Microbiología de Burrows*. Interamericana 1989; 22: 914-918.
76. Corey L. Rabies. En: *Principles of internal medicine* 1992; 832-836.
77. Fischman HR. Diseases transmitted primarily from animal to man (zoonoses). In: *Public health and preventive medicine* 1980; 11: 406-414.
78. Center for Disease Control and Prevention. Human rabies prevention-United States, 1999: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999; 48 (RR-1): 1-21.
79. Porras C, Barboza JJ, Fuenzalida E, Adaros HL, Oviedo AM, Furst J. Recovery from rabies in man. *Ann Intern Med* 1976; 85: 44-48.
80. Pleasure S J, Fischbein N J. Correlation of clinical and neuroimaging findings in a case of rabies encephalitis. *Arch Neurol* 2000, 57: 1765-1769.
81. Martinez L. Global infectious disease surveillance. *Int. J. Infect. Dis* 2000; 4: 22210-22228.
82. Rupprecht CE, Smith JS, Fekadu M, Childs JE. The ascension of wildlife rabies a cause for public health concern or intervention? *Emerging Infect Dis* 1995; 1: 107-114.

83. Meslin FX, Fishbein DB, Matter HC. Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries. In: Lyssaviruses. Rupprecht CE, Dietzschold B, Koprowski H. (Eds). Springer 1994; 1-26.
84. Schnell MJ, Tan GS, Dietzschold B. The application of reverse genetics technology in the study of rabies virus (RV) pathogenesis and for the development of novel RV vaccines. *Neurovirol* 2005; 11: 76-81.
85. Hattwick MA, Gregg MB. La enfermedad en el hombre. En: Rabia. La prensa médica mexicana 1982; 1: 277-301.
86. Kumate J. Rabia. Manual de infectología clínica 1993; 1: 314-318.
87. <http://www.monografias.com/trabajos12/rabia/rabia.shtml>.
88. Niezgodá H, Hanlon CA, Rupprecht CE. Animal rabies. In: Jackson A, Wunner W, eds. Rabies. San Diego: Academy press (in press).
89. King AA, Meredith CD, Thomson GR. The biology of southern African *Lyssavirus* variants. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 187: 267-295.
90. Marie A. Note sur la rage chez les oiseaux. *CR Coc Biol* 1904; 56: 573-575.
91. Remlinger P, Bailly J. La rage du pigeon. *Ann Ins Pasteur* 1929; 43: 1543-1559.
92. SSA/DGMP. Instructivo para la atención del paciente expuesto a rabia. Grupo interinstitucional de medicina preventiva. S. S. A. 1992.
93. De la Fuente JR, Velázquez M O, Kuri Morales P. Manual para la vigilancia epidemiológica de la rabia. Epidemiología SSA. 1998.
94. Nadin-Davies SA, Huang W, Armstrong J, Casey GA, Bahloul C, Tordo N, Wandeler AI. Antigenic and genetic divergence of rabies viruses from bat species indigenous to Canada. *Virus Research* 2001; 74: 139-154.
95. Tordo N, Charlton K, Wandeler A. Rhabdoviruses: rabies. In: Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. Ed: Collier L, London H. Arnold Press 1998; 666-692.
96. Baer GM. Vampire bat and bovine paralytic rabies. In: the natural history of rabies. Ed: Baer GM. Academic Press 1999; 389-403.

97. Acha P N, Málaga-Alba A M. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. The natural history of vampire bats, Boca Ratón: CRC Press 1985; 2.7-214.
98. Pasteur L. Méthode pour prévenir la rage morsure. CR Acad Sci 1885; 101: 722-765.
99. Pasteur L. C.R. Acad Sci 1885; 101:765.
100. Dietzschold B, Wiktor TJ, Trojanowski JQ, McFarland RI, Wunner WH, Torre-Angel MS, Koprowski H. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and pathogenic rabies virus in vivo and in vitro. J Virol 1985; 56: 8-12.
101. Hooper DC, Morimoto K, Bette M, Weibe E, Koprowski H, Dietzschold B. Collaboration of antibody and inflammation in the clearance of rabies virus from the CNS. J Virol 1998; 72: 3709-3711.
102. Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A. Rabies virulence: effect on pathogenicity glycoprotein. J Virol 1985; 53: 926-934.
103. Lodmell DL, Ewalt LC. Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with different combinations of DNA, inactivated virus, or recombinant vaccinia virus vaccines. Vaccine 2000; 18: 2394-2398.
104. Dreesen DW. A global review of rabies vaccines for human use. Vaccine 1997; 15: 2-6.
105. Lawson KF, Hertler R, Charlton KM, Campbell JE and Rhodes AJ. Safety and immunogenicity of ERA strain of Rabies virus propagated in a BHK-21 cell line. Journal of Veterinary Research 1989; 53: 438-444.
106. Lawson KF, Black JG, Charlton KM, Johnston DH, Rhodes AJ. Safety and immunogenicity of a vaccine bait containing ERA strain of attenuate rabies virus. Journal of Veterinary Research 1987; 51: 460-464.
107. Bouillant AMP, Tabel H, Geig AS. Titration and neutralization of rabies virus (ERA strain) following its replication in a pig fallopian tube cell line. Can J Comp Med 1974; 38: 118.

108. Schnell M J, Dietzschold M, Faber M, Matiss J A, Pak KY, Dietzschold B. In vitro growth and stability of recombinant rabies virus designed for vaccination of wildlife. *Vaccine* 2004; 23: 518-524.
109. Superti F, Hauttecoeur, Morelee MJ, Goldoni P, Bizzini B, Tsiang H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J Gen Virol* 1986; 67: 47-56.
110. Gaudin Y, Tuffereau C, Segretain D, Knossow M, Flamand A. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* 1991; 9: 4853-4859.
111. Drouault SG, Corthier SD, Ehrlich Renault P. Survival, physiology and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4881-4886.
112. Facklam R, Elliott JA. Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 1995; 8: 479-495.
113. Elliott JA, Collins MD, Pigott NE, and Facklam RR. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol* 1991; 29: 2731-2734.
114. Mannion PT and Rothbur MM. Diagnosis of bacterial endocarditis caused by *Streptococcus lactis* and assisted by immunoblotting of serum antibodies. *J. Infect* 1990; 21: 317-326.
115. Wood HF, Jacobs K, McCarty M. *Streptococcus lactis* isolated from a patient with subacute bacterial endocarditis. *Am. J. Med* 1985; 18:345-347.
116. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RWF, Wells JM. Mucosal delivery of immune interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strain of *Lactococcus lactis* co expressing antigen and cytokine. *Infect and Immunity* 1998; 66: 3183-3189.
117. Bermúdez-Humarán LG, Cortés-Pérez NG, Lefevre F, Guimaraes V, Rabot S, Alcocer-González JM, Gratadoux JJ, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra RS, Corthier G, Gruss A, Langella P. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7

antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* 2005; 11: 7297-7302.

118. Wells JM, Schofield KM. Cloning and expression vectors for lactococci. *NATO ASI Ser. H* 1996b; 98: 37–63.

119. Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N, Ohba K, Kushiro Kiwaki AM, Hamajima K, Klinman D, Okuda K. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env *Blood* 2003; 102: 223–228.

120. Nouaille S, Riberio L, Miyoshi A, Ponte P, Le Loir Y, Costa Oliveira S, Langella P and Vazco Azevedo. Heterologous protein production and delivery systems for *L. lactis*. *Genetics and Molecular Research* 2003; 1: 103.

121. Kunji ER, Slotboom DJ, Poolman B. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1610: 97–108.

122. Kunji ER, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings WN. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 70: 187–221.

123. Habimana O, Le Goff C, Juillard V, Bellon-Fontaine MN, Buist G, Kulakauskas S, Briandet R. Papel positivo de la pared celular de proteinasa PrtP anclada en la adhesión de lactococci. *BMC Microbiology* 2007; 7:36.

124. Bermúdez-Humarán L, Langella GPA, Miyoshi A, Gruss RS, Tamez-Reyes R, Montes de Oca-Luna, Le Loir Y. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol* 2002; 68: 917–922.

125. Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, Corthier G. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl. Environ. Microbiol* 2001; 67: 1423–1428.

126. Geoffroy MC, Guyard C, Quatannens B, Pavan S, Lange M, Mercenier. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl. Environ. Microbiol* 2000; 66: 383–391.

127. Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, Langella P. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol 1998; 180:1895–1903.
128. Lee MH, Roussel Y, Wilks M, Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. Vaccine 2001; 19: 3927–3935.
- 129 Wells J, Wilson P, Norton P, Le Page R. A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *L. lactis*. Appl Env Microb 1993; 59: 3954.
130. Wu XC, Lee W, Tran L and Wong SL. Engineering *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. J. Bacteriol 1991; 173: 4952-4958.
131. Wu XC, Ye R, Wu XC, Ng SC and Wong SL. Enhanced secretory production of a single chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. J. Bacteriol 1998; 180: 2830-2835.
132. Lee SJ, Kim DM, Bae KM, Byun SM and Chung JH. Enhancement of secretion and extracellular stability of staphylokinase in *Bacillus subtilis* by *wprA* gene disruption. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 476-480.
133. Robinson K, Chamberlain LM, Lopez MC, Rush CM, Marcotte H, Le Page RWF, Wells JM. Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant *Lactococcus lactis* strains expressing tetanus toxin fragment C. Infect. Immun 2004; 72: 2753-2761.
134. Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, Langella P. Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 910-916.
135. Marteau P and Rumbaud JC. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immuno modulation in man. FEMS Microbiol Rev 1993; 12: 207-220.
136. Seegers JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: Progress and prospects. Trends Biotechnol 2002; 20: 508-515.

137. Que YA, Haefliger JA, Francioli P and Moreillon P. Expression of *Staphylococcus aureus* Clumping Factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Using a New Shuttle Vector. *Infect Immun* 2000; 6: 3516–3522.
138. Duan K, Dunn NW and Kim WS. Rapid plasmid DNA isolation from *Lactococcus lactis* overnight cultures. *Biotechnology Techniques* 1999; 13: 519-521.
139. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
140. Morimoto K, McGettigan JP, Foley HD, Hooper DC, Dietzschold B, Schnell MJ. Genetic engineering of live rabies vaccines. *Vaccine* 2001; 19: 3543-3551.
141. Morimoto K, Schnell M J, Pulmanusahakul R, McGettigan J P, Foley H D, Farber M, Hooper D C, Dietzschold B. High-level expression of a human rabies virus-neutralizing monoclonal antibody by a rhabdovirus-based vector. *J Immunol Methods* 2001; 1: 199-206.
142. Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, Lafon M, Smith CL, Koprowski H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein, which defines pathogenicity of fixed rabies virus strains. *Proc Nat Acad Sci USA* 1982; 80: 70-74.
143. Taylor J, Trimarchi C, Weinberg R, Languet B, Guillemin F, Desmettre P, Paoletti E. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine* 1991; 9: 0-3.
144. Stanley A. Vaccines in the 21<sup>st</sup> century. *Hibridoma and hybridomics* 2002; 21: 138-139.
145. Lodmell DL, Ray NB, Pornell MJ, Ewalt LC, Hanlon CA, Shaddock JH, Sanderlin DS, Rupprecht CE. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med* 1998; 4: 949-952.
146. Fies LF, Tartaglia J, Taylor J, Kauffman EK, Meignier B, Paoletti E, Plotkin S. Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system. *Vaccine* 1996; 14: 428-434.

147. Schnell MJ, Siler CA, McGettigan JP, Dietzschold B, Herrine SK, Dubuisson J, Pomerantz RJ. Live and killed rhabdovirus based vectors as potential hepatitis C vaccine. *Virology* 2002; 1: 24-34.
148. Wang Y, Xiang Z, Pasquina S, Ertl HCJ. Effect of passive immunization or maternally transferred immunity on the antibody response to a genetic vaccine to rabies virus. *J Virol* 1998; 72: 1790-1796.
149. Lodmell DL, Ray NB, Ulrich JT, Ewalt LC. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL). *Vaccine* 2000; 18: 1059-1066.
150. Schnell et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Nature biotechnology* 1995.
151. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J and Ertl CJ. Carrying the Rabies Virus Glycoprotein Gene Induces Protective Immunity against Rabies Virus Jun and Hildegund. *Virology* 1994; 199: 132-140.
152. Shadma A, Singh P.K., Dinesh K. Yadav, Shahnawaz Md., Mishra S, Sawant SV and Tuli R. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *Journal biotechnology* 2005; 119: 1-14.
153. Ray NB, Ewalt LC, Lodmell DL. Nanogram quantities of plasmid DNA encoding the rabies virus glycoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *Vaccine* 1997; 15: 892-895.
154. Osorio JE, Tomilson CC, Frank RS, Hanes EJ, Roshlow K, Haynes JR, Stinchcomb DT. Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine* 1999; 17: 1109-1116.
155. Lodmell DL, Ray NB, Pornell MJ, Ewalt LC, Hanlon CA, Shaddock JH, Sanderlin DS, Rupprecht CE. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med* 1998; 4: 949-952.

156. Rupprecht CE, Hanlon CA, Cummins LB, Koprowski H. Primate responses to a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Vaccine* 1992; 10: 368-374.
157. Schnell MJ, Tan GS, Dietzschold B. The application of reverse genetics technology in the study of rabies virus (RV) pathogenesis and for the development of novel RV vaccines. *Neurovirol* 2005; 11: 76-81.
158. Modelska A. et al. Immunization against rabies with plant-derived antigens. *Immunology* 1997; 95: 2481-2485.
159. Yusibov Y, et al. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Immunology* 1997; 94: 5784-5788.