

# ESTRUCTURA ANTIGENICA Y MECANISMOS DE INFECCION DEL VIRUS DE LA RABIA

JUAN ANTONIO MONTANO HIROSE

ADRIANA E. MATA VILLEGAS

*Departamento de Microbiología e Inmunología  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad  
Universitaria, 04510, México D.F. e-mail:  
[hirose@servidor.unam.mx](mailto:hirose@servidor.unam.mx)*

I. Clasificación.....	68
II. Propiedades .....	69
III. El genoma .....	72
IV La proteína G .....	73
V La proteína N .....	77
VI. La proteína NS .....	81
VII. La proteína M .....	84
VIII. La proteína L .....	86
IX. Infección .....	86
1. Especies susceptibles .....	86
2. Vías de entrada .....	87
3. Edad .....	87
4. Organos afectados .....	88
5. Sexo .....	88
6. Adaptación al cultivo celular .....	88
7. Bases moleculares de la virulencia .....	89
8. Bases moleculares de la susceptibilidad .....	89
9. Acción de los anticuerpos neutralizantes .....	90

X. Ciclo viral .....	90
Referencias .....	91

### I. Clasificación

El virus de la rabia, debido a su envoltura con espículas, estructura helicoidal interna, ARN monocatenario no segmentado y de polaridad negativa, estructura morfológica muy particular en forma de bala de fusil y propiedades fisicoquímicas y de replicación en el citoplasma, está clasificado en la familia *Rhabdoviridae*, que incluye aproximadamente 80 virus que infectan tanto animales como vegetales (Cuadro 1).

#### CUADRO 1 CLASIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA RABIA

---

ORDEN
<i>Mononegavirales</i>
FAMILIA
<i>Rhabdoviridae</i>
GENERO
<i>Lyssavirus</i>

---

(Referencia 1)

Desde un punto de vista sistemático, los rhabdovirus pertenecen al orden *Mononegavirales*, que se distribuye en tres familias: *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* (virus Sendai, de la enfermedad de Newcastle, del sarampión, virus sincitial respiratorio y rubulavirus porcino) y *Filoviridae* (virus de Marburg). Los rhabdovirus que infectan a los animales 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 efimera bovina).

## II. Propiedades

Los Rhabdovirus son virus frágiles, inactivados por el calor, los rayos ultravioletas, la desecación, los solventes orgánicos y la tripsina, y son bastante estables entre pH 5 y 10. Los rhabdovirus se conservan varios días a 4°C y durante mucho tiempo a -70°C y liofilizados.

VSV ha sido el más estudiado y sirve de virus de referencia de los rhabdovirus. A pesar del gran parecido, la analogía antigénica entre los diferentes géneros de rhabdovirus es poca; por ejemplo, las proteínas G del virus de la rabia y de VSV solamente tienen 20% de homología en frecuencia de aminoácidos (2).

El virus de la rabia tiene una forma ojival truncada y mide 180 nm de largo por 75 nm de ancho. Posee proyecciones de superficie y presenta estrías características en microscopía electrónica (Figura 1A). El virus de la rabia tiene un coeficiente de sedimentación de 600 unidades S<sub>20</sub>w y está constituido por 5 proteínas (3) (Cuadro 2), codificadas por el ARN viral, distribuidas en 2 componentes principales: la nucleocápside (NC) y envoltura.

CUADR02 CARACTERÍSTICAS ESTEQUIOMÉTRICAS DE  
LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA RABIA

<i>Proteína</i>	<i>Peso (KD)</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Moléculas/virión</i>
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

(Referencia 4)

La NC interna es un complejo ribonucleoproteínico con simetría helicoidal, constituida por una cadena de ARN asociada a 3 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 2 proteínas de la envoltura son la G y la M. La proteína G está glicosilada y contiene aproximadamente 3% de carbohidratos y la envoltura contiene fosfolípidos que forman el 15 a 25%, según la célula hospedera, ambos de la masa del virión (1). La proteína M, descrita tradicionalmente como una proteína de la envoltura que recubre internamente la membrana lipídica, aparentemente forma parte de la NC (5).

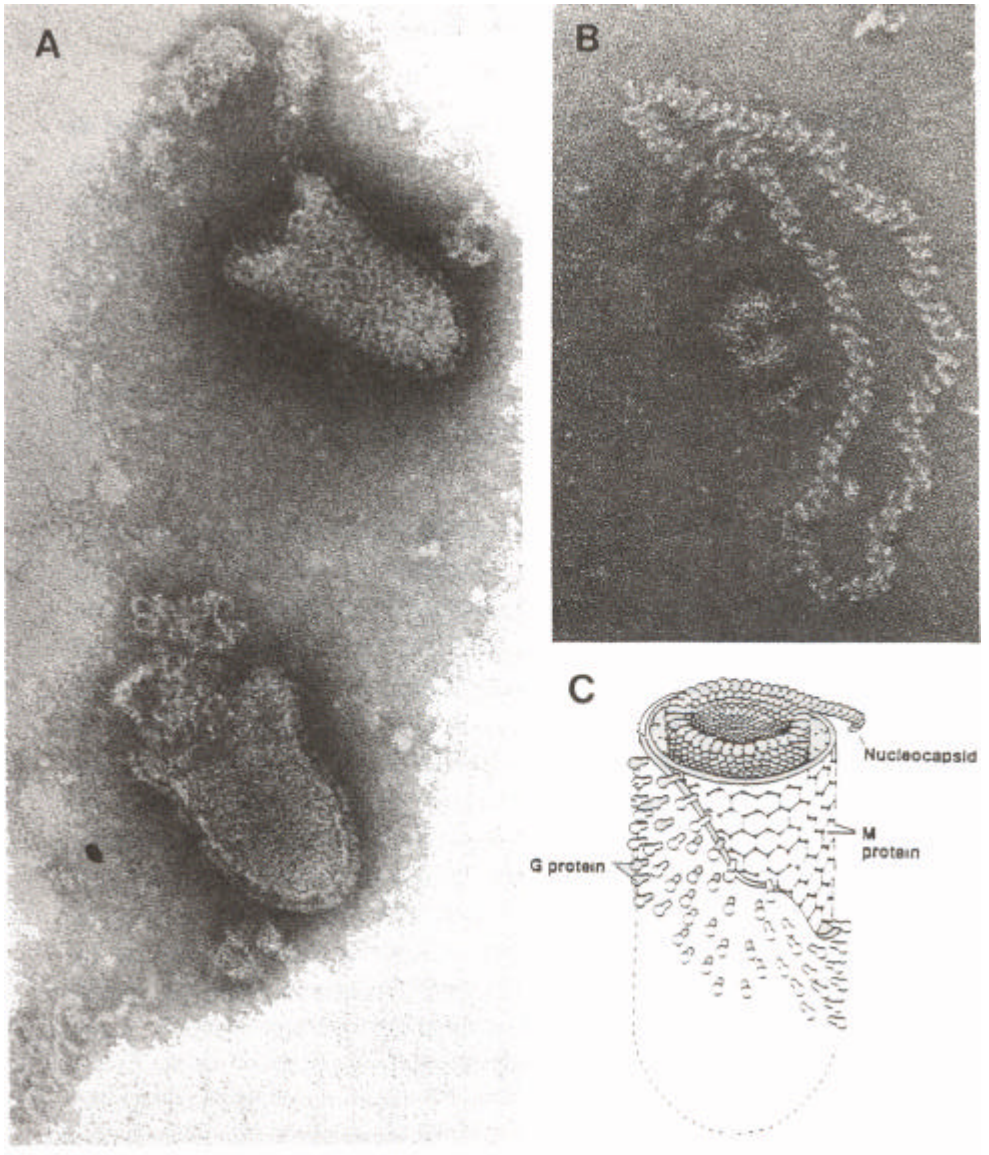


Fig. 1. Estructura del virus de la rabia. A: Viriones (220 000x). B: Virión en el momento de liberar la nucleocápside (100 000x). C: Esquema de la relación espacial de las estructuras virales (4).

### III. El genoma

Cada una de las 5 proteínas que constituyen el virus rábico es codificada por un gen en el ácido nucleico. La secuencia de los 11932 nucleótidos del genoma de la cepa PV del virus de la rabia (6, 7) ha permitido estudiar los elementos reguladores de la transcripción y de la replicación. La secuencia completa de aminoácidos fue deducida de la secuencia de los genes que codifican respectivamente las 5 proteínas: N, NS, M, G y L. Por otro lado, el análisis de las secuencias parciales de diferentes Lyssavirus ha permitido su estudio comparativo y "evolutivo" (8, 9, 10, 11).

Una peculiaridad del genoma del virus de la rabia es la existencia de un gran intergen entre los cistrones G y L que comprende 423 nucleótidos (Figura 2). Esta región que no codifica e hipervariable fue denominada pseudogen 'II (6). 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 aquélla de 'II para producir un ARNm largo G-', de la proteína G. La transcripción del gen G y de 'II en un solo ARNm largo es sistemática para ciertas cepas como Flury HEP (12), o alternativa para otras como PV, donde las 2 formas de transcripción del gen G (ARNm G y ARNm G-,) coexisten (10). Se desconoce el significado biológico de estas 2 formas de transcripción de la proteína G, pero aparentemente este fenómeno tiene un papel regulador sobre la tasa de transcripción del gen distal L y en consecuencia sobre la expresión del genoma (10).

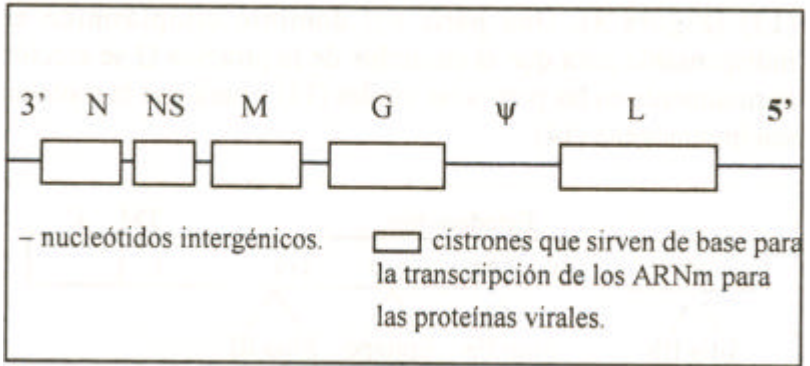


Fig. 2. Organización del genoma del virus de la rabia (4).

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.

#### IV. La proteína G

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 asociadas en trímeros (13), 10 que forma consecuentemente 600 espículas.

La secuencia de la proteína G madura comporta 504 aminoácidos para las cepas CVS, ERA y PV y 505 para Flury HEP (12). La proteína G madura es precedida por un péptido señal de 19 aminoácidos que es eliminado después de la traducción de su ARNm. La proteína G está constituida por 3 dominios: un ectodominio de 438 aminoácidos, un dominio transmembranario de 22 aminoácidos y un dominio citoplásmico de 44 aminoácidos

(13) (Figura 3). Una parte del dominio citoplásmico es indispensable para que el ensamblaje de la proteína G se efectúe normalmente en las partículas virales (13) y para que la proteína sea inmunógena (14).

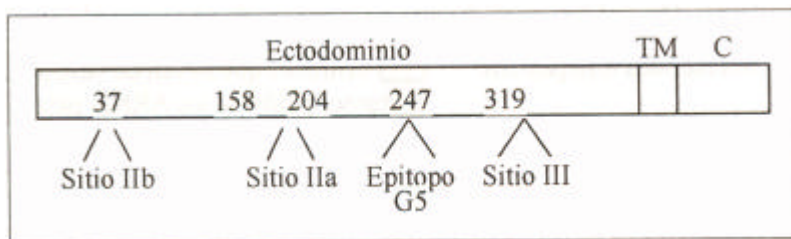


Fig. 3. Sitios de glicosilación potenciales y principales sitios antigénicos de la proteína G. TM: región transmembranaria. C: región citoplásmica.

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 (Figura 3). Las cepas ERA, CVS, Kelev, PV y Flury HEP poseen de 2 a 4 sitios potenciales de glicosilación, pero los que se encuentran en posición 37 y 319 son comunes (15, 12). Sin embargo, solamente algunos de estos sitios son utilizados. Por ejemplo, el sitio potencial 37 no está glicosilado en las cepas ERA y CVS, mientras que dos formas de proteína G coexisten en CVS-11, según que ella posea una (en posición 319) o dos cadenas glicosiladas (en posición 204 y 319) (16).

La proteína G es responsable de la adsorción específica del virus a su receptor potencial presente en la superficie de las células (17). 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 un cambio de conformación que le permite unir la envoltura viral con la membrana lisosomal. Esta fusión tiene por consecuencia inyectar la NC rábica en el citoplasma donde se desarrollan las polimerizaciones del ARN viral.



Mutantes resistentes a la neutralización pueden ser seleccionadas con el auxilio de anticuerpos monoclonales específicos. El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de la proteína G de estos mutantes ha permitido estudiar las bases moleculares de la virulencia del virus rábico. Se ha demostrado que cambios en la estructura primaria influyen sobre la patogenicidad. Así, el remplazo de la lisina 198 de las cepas CVS y ERA por glutamato disminuye la virulencia para el ratón adulto (18, 19, 20). La lisina 198 está situada en una región de la proteína G que presenta fuertes analogías con el asa tóxica de la neurotoxina del veneno de serpiente. Tanto esta neurotoxina como el virus de la rabia se unen al receptor nicotínico de la acetilcolina (21, 22). Se ha propuesto que la región de la proteína G que contiene los aminoácidos 189 a 214 se podría unir al receptor celular del virus rábico.

Otro aminoácido que ciertamente juega un papel importante en la virulencia es la arginina 333. Su sustitución por glutamina, isoleucina o glicina le hace perder la neurovirulencia para el ratón adulto al virus que porta esta mutación (18, 23, 24). La cepa Flury HEP, que a diferencia de otras cepas fijas no es neurovirulenta para el ratón adulto, también posee una glutamina en posición 333 (12,25). Es poco probable que la hipótesis señalada anteriormente, que relaciona la ausencia de patogenicidad a la incapacidad de infectar las células, pueda ser verificada por esta segunda categoría de mutantes. Estos últimos efectivamente son infecciosos *in vitro* para los fibroblastos (25), y se vuelven patógenos *in vivo* para el ratón cuando son inoculados no por vía intramuscular sino por vía estereotáxica en el *striatum* (cuerpo estriado) o en el cerebelo (26). Además, cuando los animales son inmunodeprimidos e infectados con un virus mutado en posición 333, éste es capaz de invadir estructuras nerviosas que normalmente no son infectadas por esta cepa viral. Las cepas de virus rábico apatógenas (Flury HEP) se vuelven letales para los ratones

inmunodeprimidos y para los ratones atímicos, deficientes en linfocitos T (27). Parece entonces posible que la mutación en posición 333 y la pérdida de virulencia que resulta, estén relacionadas con la capacidad de estos virus a disparar una importante respuesta inmunitaria del hospedero o alternatively, y a diferencia de los virus patógenos, a no inmunosuprimir sus hospederos.

La estructura antigénica de la proteína G ha sido definida con auxilio de anticuerpos monoclonales específicos. Así, tres sitios antigénicos han sido descritos para las cepas CVS y ERA: sitios I, II (a/b) y III (28). El sitio II (a/b) es inmunodominante en el ratón BALB/c haplotipo H-2<sup>d</sup> y comprende la lisina 198. La arginina 333 está incluida en el sitio III (18).

Tres sitios adicionales han sido descritos para la cepa ERA: IV, V (29) Y VI (30). Los epitopos descritos por los anticuerpos monoclonales son generalmente de tipo conformacional. Solamente el epitopo correspondiente al sitio VI (epitopo G5) parece ser de tipo lineal ya que el anticuerpo reconoce la proteína desnaturalizada (30, 31). Otros dos sitios han sido señalados como el sitio menor "a" y el epitopo "G 1" (32).

La inmunogenicidad de la proteína G depende de su conformación tridimensional. Polipéptidos obtenidos por fragmentación química son claramente menos inmunógenos que la proteína entera (14). La proteína G soluble es una forma de la proteína G, secretada 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 aun cuando continua a ser reconocida por los anticuerpos monoclonales específicos de los diferentes sitios (33).

Los anticuerpos inducidos por la proteína G, en su mayoría, inhiben la infección y por 10 tanto son neutralizantes (34, 35, 36). 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 ha sido expresada en virus recombinantes vaccinia (V -RG) (37,38) Y adenovirus humano tipo 5 (39). Estos vectores recombinantes inducen la formación de anticuerpos neutralizantes en las especies inoculadas y confiere protección contra la infección rábica. Los anticuerpos neutralizantes aparentemente 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 (19).

Por su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes, el contenido en proteína G de las vacunas contra la rabia ha sido evaluado para intentar predecir su poder protector. Estas pruebas utilizan la técnica de inmunodifusión radial o las pruebas inmunoenzimáticas (40, 41,42).

Los anticuerpos neutralizantes son considerados clásicamente como el factor inmunitario más importante para la protección (43). En consecuencia, inducirlos es el principal objetivo de la vacunación preventiva. También se utilizan en seroterapia como complemento de la vacunación antirrábica posexposición.

#### V. La proteína N

La proteína N deriva su nombre de *nucleoprotein* y es el principal constituyente de la NC (alrededor de 90% de sus proteínas) con 1750 moléculas. Se encuentra asociada al ARN viral y a la proteína NS. La proteína N no está glicosilada, a pesar de la existencia de sitios potenciales. Contrariamente a VSV, la proteína N del virus de la rabia está fosforilada (44) por la serina en posición 377 (45). La proteína N aparentemente regula el equilibrio entre la

transcripción (formación de los ARNm para la síntesis de las proteínas virales) y la replicación (multiplicación del ARN viral), además de proteger al ARN recién sintetizado de los ataques enzimáticos y conferirle estabilidad funcional.

La secuencia de los 450 aminoácidos de la proteína N presenta pocas variaciones entre las diferentes cepas, a diferencia de la proteína G (15,46). Como también la proteína N es la más abundante en el sistema nervioso central y los cultivos celulares, nada más natural que esta proteína sea el antígeno que se detecta en el diagnóstico de laboratorio por la técnica de inmunofluorescencia (vale la pena hacer notar que existe disponible en el comercio un conjugado antirrábico antinucleocápside, que es dirigido más específicamente contra esta proteína). Sin embargo, desde el punto de vista de la antigenicidad, existen diferencias que han permitido confirmar la clasificación de los 4 serotipos con esta proteína (47, 48). Ciertos anticuerpos monoclonales pueden ser utilizados como marcadores que permiten identificar con precisión los serotipos y, al interior del serotipo 1, de reconocer ciertas cepas vacunales como Flury HEP.

Tres sitios antigénicos han sido identificados sobre la proteína N por medio de pruebas de competición entre anticuerpos monoclonales específicos de esta proteína (49). La localización topográfica de dos de estos sitios ha sido establecida por análisis inmunológico de fragmentos enzimáticos de la proteína N (50) (Figura 4).

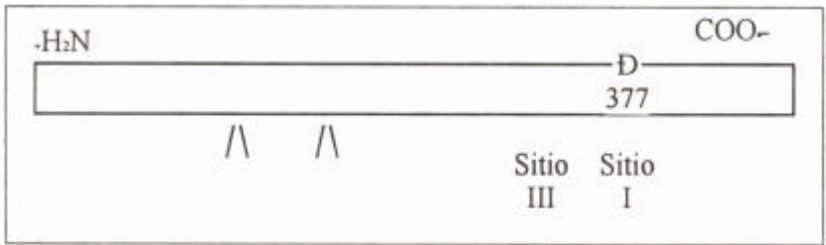


Fig. 4. Localización del sitio de fosforilación (D) en la posición 377 de y de 2 de los sitios antigénicos de la proteína N (4).

A diferencia de la proteína G, la proteína N posee varios epítomos T (51, 52), y aun B, que son comunes a varios serotipos. Esto parece ser consecuencia de que la proteína N es relativamente conservada (49,53).

Sólo recientemente, la proteína N y la NC han sido consideradas como elementos que pueden jugar un papel en el poder protector de las vacunas contra la rabia. Esto resulta aparentemente, desde el inicio de los estudios, de un vicio experimental. Las pruebas utilizadas para medir el poder protector de las vacunas contra la rabia utilizan la vía intracerebral como vía de inoculación del virus de desafío (54, 55). La infección por esta vía fue seleccionada porque es la única que permite obtener una mortalidad muy reproducible. Esta vía de inoculación sólo permite, en realidad, evaluar la capacidad de una vacunas de inducir anticuerpos neutralizantes (56). Como los anticuerpos inducidos por la NC no son neutralizantes, era imposible poner en evidencia el poder protector de la proteína N o de la NC, utilizando esta vía.

Por el contrario, utilizando la vía intramuscular, se ha establecido que la NC juega un papel importante en la protección. En efecto, se ha demostrado que la NC y la proteína N purificadas confieren protección contra un desafío intramuscular con virus de la rabia (57, 58,59,60,61,62,63,64).

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 por el momento, pero probablemente las propiedades superantigénicas de la NC y de la proteína N tengan algo que ver.

En efecto, se ha demostrado recientemente que la NC y la proteína N son superantígenos (SAG) (65, 66). Los SAG son antígenos particulares al contacto de los cuales las manifestaciones inmunitarias presentan una amplitud excepcional. A diferencia de los antígenos clásicos que, asociados a una molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad inducen la activación de una cantidad restrictiva de clones de linfocitos T altamente específicos, los SAG son capaces de activar fuertemente los linfocitos de manera policlonal sin importar su especificidad. La única condición es que expresen una cierta cadena V $\beta$  del receptor T (TCR) (Figura 5). Así los SAG activan generalmente alrededor de 10 000 veces más linfocitos que los antígenos. La expansión policlonal genera una producción masiva de citocinas y es seguida, en la mayor parte de los casos, por la aparición de un estado de no respuesta. La instalación de un estado de no respuesta consecutivo a la estimulación superantigénica, se interpreta como el enrolamiento de los linfocitos que portan esta cadena V en una vía de activación incompleta.

Los SAG son producidos por diferentes microorganismos. Ciertas bacterias secretan exotoxinas, como las toxinas del estafilococo A, B o el TSST -1 que están asociadas a los signos de choque tóxico y a efectos inmunosupresores (67). Ciertos micoplasmas (*Mycoplasma arthridis*) y virus también han sido descritos como SAG (68, 69, 70). La existencia de SAG virales fue demostrada inicialmente en el ratón por los retrovirus murinos

que inducen tumores de las glándulas mamarias (MMTV *mouse mammary tumor virus*) y modifican la expresión de ciertas familias de linfocitos (70). Con el descubrimiento del superantígeno del virus de la rabia, el campo de estudio de los SAg virales se vio ampliado al sistema inmune humano.

La NC y la proteína N, en efecto, se fijan a las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad y no necesitan de procesamiento antigénico; en el caso de la rabia, esta unión se lleva a cabo sin intervención del CD4 (Figura 5). La NC y la proteína N estimulan específicamente a familias VB particulares tanto *in vitro* en el hombre (VB) como *in vivo* en el ratón (VB2, VB6, VB7). La NC provoca la depleción de los linfocitos de estas familias en los ratones lactantes cuando son inyectados durante su periodo neonatal (65, 66). El descubrimiento de estas nuevas propiedades explica el interés hacia la NC mostrado en el campo de la inmunogenicidad de las vacunas.

El desconocimiento de las propiedades protectoras de la NC se tradujo durante mucho tiempo por la ausencia de una prueba de detección de la NC en las vacunas. El contenido de NC libre de las vacunas contra la rabia ha sido evaluado indirectamente por la disminución de título de un suero anti-NC, después de haber sido incubado con diferentes diluciones de vacuna (71). Sin embargo, actualmente existe ya una prueba de captura de antígeno, que permite evaluar el contenido en proteína N libre en una vacuna contra la rabia (72).

## VI. La proteína NS

La proteína NS, con sus 900-950 moléculas, 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 (6).

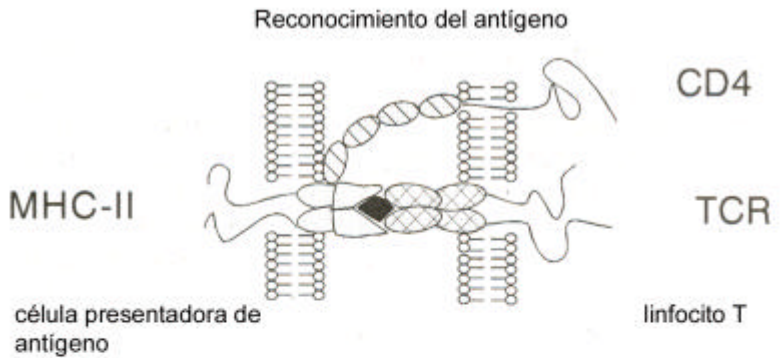
Inicialmente se había propuesto que esta proteína hacía parte de la envoltura (73); por esta razón, le fue atribuida la denominación M 1, por primera proteína de membrana no glicosilada. Posteriormente, se demostró que no forma parte de la membrana sino de la NC (74,45). La proteína MI rábica y la NS de VSV son dos denominaciones de la misma proteína y solamente la denominación NS debe ser empleada para todos los rhabdovirus (3).

Con auxilio de anti cuerpos monoclonales han sido descritos 2 sitios antigénicos (49). El perfil hidropático muestra que ésta es la mas hidrofílica de las 5 proteínas del virus de la rabia, con la mayor parte de los aminoácidos hidrofílicos en los primeros 2 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 (50). También han sido descritos epitopos T (75). Todavía se desconoce el papel que juega esta proteína en la protección.



Reconocimiento del antígeno



Reconocimiento del superantígeno de la rabia

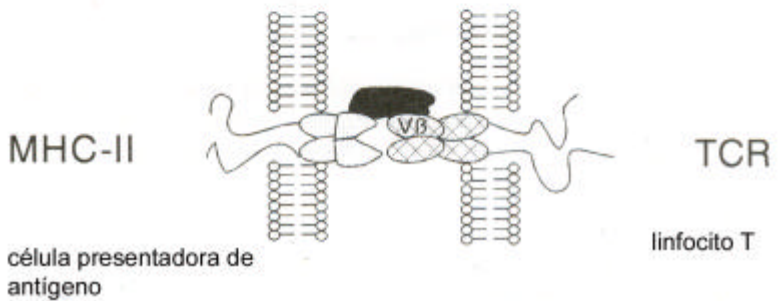


Fig. 5. Esquema de la estimulación de los linfocitos T cooperadores por interacción del TCR con un antígeno (figura superior) o con el superantígeno de la rabia (figura inferior) (4).

M.C.H.: Molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad. TCR: Receptor de los linfocitos T.

## VII. La proteína M

La proteína M es la menor de las proteínas del virus de la rabia, pero representa casi 30% de las proteínas totales del virión (1650-1700 moléculas para VSV). Se trata de una proteína muy básica, no glicosilada, de 200 aminoácidos de longitud. A diferencia de VSV, 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. 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 (46).

La localización de la proteína M en el citoplasma durante el ciclo viral y en el virión no han sido demostradas claramente. Sólo 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 enzimas proteolíticas (76,77) y que interactúa fuertemente con la NC (74,78).

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 (77,79). Sin embargo, alternativamente esta proteína podría encontrarse en el interior de la NC, como se ha demostrado en microscopía electrónica en VSV por medio de anticuerpos monoclonales anti-M y anti-N marcados con oro coloidal (5). Esta hipótesis estaría de acuerdo con los primeros esquemas del virus rábico que representan a la proteína M en el centro de la NC. En este caso, la envoltura viral no estaría constituida más que de proteína G, y la NC ganaría una cuarta proteína (Figura 6).

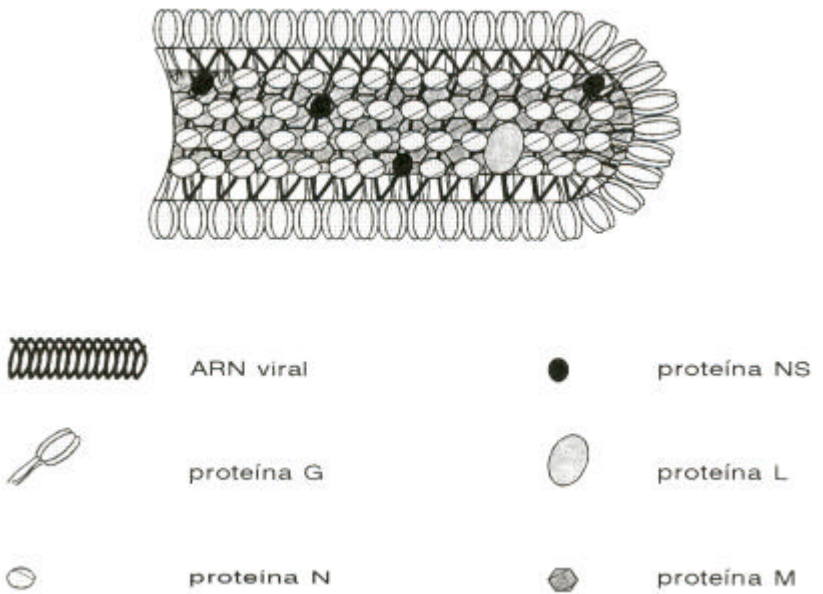


Fig. 6. Modelo del virus de la rabia que propone que la proleína M está en el interior de la nucleocápside.

Por analogía con las observaciones realizadas en VS V (80), en las que un fragmento de proteína M bloquea la transcripción viral, y por el hecho de que anti cuerpos anti -M rábica inoculados por microinyección en la célula infectada aumentan la producción viral (81), parecería que la proteína M juega un papel regulador importante en el ciclo del virus de la rabia.

### **VIII. La proteína L**

Denominada L por *large* (grande), a causa de su peso molecular (190 kD), la proteína L posee múltiples funciones enzimáticas (82). Esta proteína es la ARN-polimerasa ARN-dependiente, estrechamente asociada a la proteína NS. La proteína L es la más conservada de todas las proteínas de 105 virus ARN monocatenarios de polaridad negativa (7). Esta estabilidad aparentemente resulta de la necesidad de conservar las funciones enzimáticas vitales para el virus. Ningún anticuerpo monoclonal específico de la proteína L del virus rábico ha sido obtenido hasta hoy, lo que aparentemente refleja el carácter "universal" de los motivos antigénicos que ella posee.

### **IX. Infección**

#### *I. Especies susceptibles*

Aunque en principio todos los animales homeotermos pueden ser infectados por el virus de la rabia, la sensibilidad de las aves es muy atenuada. El virus provoca en ellas una enfermedad pasajera de evolución muy lenta después de la inoculación intracerebral y la enfermedad no existe en la naturaleza (83, 84). En los mamíferos, una vez declarada, la enfermedad siempre tiene una salida fatal, pero existen importantes variaciones de sensibilidad o de virulencia.

Ciertos animales, como el perro, el zorro, el murciélago y otros, son extremadamente sensibles a la rabia y constituyen los reservorios del virus, lo que plantea problemas epizooticos y epidemiológicos. Otros mamíferos como los roedores no representan peligro para la fauna silvestre porque normalmente no desarrollan rabia furiosa, sino al contrario, una forma paralítica. Si los roedores son los modelos de experimentación animal para la infección rábica, es porque las cepas rábicas han sido adaptadas en ellos y que puede practicárseles la vía de infección intracerebral, aunque no sea la vía de infección natural.

## *2. Vías de entrada*

La vía de entrada del virus es capital para su futuro. En el laboratorio, la inoculación intracerebral vuelve a los animales más sensibles a la rabia que la vía intramuscular, lo que explica que la infección por esta vía sea un método clásico de diagnóstico de la rabia.

## *3. Edad*

La edad tiene una influencia importante sobre la sensibilidad. De esta forma, la cepa ERA inyectada por vía intraperitoneal es letal si el ratón tiene 4 semanas de edad, pero no lo es más cuando el ratón alcanza 8 a 12 semanas; es decir, cuando adquieren la madurez de su sistema inmune. En el hombre se observa igualmente una incidencia de rabia mucho más elevada en los niños entre 5 y 6 años. Pero esto no se origina probablemente de una mayor sensibilidad, sino más bien de su curiosidad por los animales silvestres o desconocidos y de su ignorancia de los peligros que representan.

#### 4. *Órganos afectados*

Ciertos órganos y tejidos son más permisibles a la infección rábica que otros. El sistema nervioso central, las glándulas salivares y los tejidos renales son los tejidos de elección del virus rábico. Sin embargo, la sensibilidad parece depender del estado de diferenciación de las células: si el virus de la rabia es pantropo en el embrión, se vuelve neurotrópo en el pollito.

#### 5. *Sexo*

En el ratón, el sexo puede influir sobre la sensibilidad a la rabia. Los ratones hembras de las líneas BALB/c y DBA/2 son más sensibles a la rabia que los machos (85). Por el contrario, en la especie humana se observa mayor incidencia de rabia en los hombres. Sin duda, esta diferencia no se origina de una sensibilidad diferente al virus sino, como en el caso de la edad, aparentemente resulta de un comportamiento social diferente, que lleva más frecuentemente a los hombres que a las mujeres, a aproximarse a animales silvestres o desconocidos.

#### 6. *Adaptación al cultivo celular*

Para la adaptación al cultivo celular, los primeros ensayos fueron efectuados en tejidos nerviosos. Posteriormente, la utilización de cultivos fibroblásticos de riñón de hámster y de cerdo, en los cuales el virus se desarrolla muy bien, ha permitido la fabricación de vacunas. Actualmente, las líneas más corrientemente empleadas para aislar y producir virus son las células BHK -21 (riñón de hámster), NIL-2 (embrión de hámster), Yero (riñón de mono verde africano), WI-38 (diploides de fibroblastos de pulmón de embrión humano), MRC-5 (diploides de epitelio humano) y Neuro -2a (neuroblastoma de ratón).

### 7. Bases moleculares de la virulencia

La adaptación de las cepas de virus rábico a su sustrato celular favorece la virulencia. Desde el inicio de sus investigaciones, Louis Pasteur clasificó los virus de la rabia en 2 categorías: a) los virus de la calle, aislados en campo y que causan la enfermedad después de una inoculación periférica en animales de laboratorio y b) los virus fijos, manipulados en el laboratorio, que en general no causan enfermedad sino después de una inoculación intracerebral. El nombre virus de la calle se refiere a las cepas aisladas en medio urbano, mientras que el de virus fijos se refiere a la fijación de tiempo de incubación en una especie determinada.

La estructura de la proteína G también tiene gran influencia sobre la virulencia de las cepas. Los mutantes con una sustitución de aminoácidos en las posiciones 1980333 son menos virulentos en ciertas condiciones que varían según la especie, la edad y el estado inmunitario del hospedero.

Aunque el virus rábico haya sido adaptado *in vitro* a varias líneas fibroblásticas de mamíferos, su blanco principal *in vivo* es la neurona. Sin embargo, un estudio realizado en 1965 en el conejo ha señalado la presencia de partículas infecciosas del virus rábico en células sanguíneas periféricas durante la enfermedad (87). Aparentemente porque la viremia no es un evento importante de esta enfermedad (88, 89), la infección de los linfocitos por el virus de la rabia no fue publicada más hasta 1994, cuando se describió que esta infección induce la apoptosis (4). Este mecanismo tal vez explique el estado de inmunosupresión observado en los casos de rabia.

### 8. Bases moleculares de la susceptibilidad

Experiencias *in vitro* realizadas con fibroblastos y neuroblastomas sugieren la existencia de receptores saturables y específicos para el

Virus rábico (17). Sin embargo, su identificación incontestable no ha sido obtenida todavía. Parece ser que el receptor del virus de la rabia depende de la naturaleza de la célula hospedera. De esta manera, si se ha demostrado que los gangliósidos juegan un papel en la adsorción del virus rábico a los fibroblastos (86) y que el receptor nicotínico de la acetilcolina está implicado en su fijación a las células musculares, el receptor específico del virus sobre las neuronas no ha sido identificado todavía.

### *9. Acción de los anticuerpos neutralizantes*

La conformación de la proteína G se modifica bajo efecto del pH ácido y se revelan regiones hidrófobas que permiten su unión a la membrana lisosomal (13,90). Probablemente algunos anticuerpos anti-G neutralizan el virus rábico al inhibir la etapa de fusión (19), mientras que otros anticuerpos aparentemente neutralizan el virus por una vía más clásica, que es aquella de inhibir la adsorción de la proteína G a su o sus receptores sobre la célula hospedera.

## **X. Ciclo viral**

Las células no poseen enzimas capaces de replicar el ARN viral. Por lo tanto, las partículas virales deben codificar y transportar su propia ARN-polimerasa ARN-dependiente (la proteína L) para inicialmente transcribir el genoma en varias cadenas positivas (ARN<sub>m</sub>) y posteriormente sintetizar un ARN antígenómico positivo. Las cadenas positivas de ARN<sub>m</sub> son utilizadas para sintetizar las proteínas virales en los polisomas. La cadena antígenómica es utilizada como matriz intermediaria para la replicación del ARN viral de polaridad negativa. Estas reacciones se llevan a cabo en el citoplasma.



La transcripción sigue el orden de los genes en el genoma y produce en cantidades decrecientes el ARN líder y posteriormente los 5 ARNm monocistrónicos, 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. Enseguida, se piensa que 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 plasmática o del retículo endoplásmico (91).

#### Referencias

1. Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Jarvis, A.W., Ghabrial, S.A., Summers, M.D., Martelli, G.P. and Bishop, D.H.L.: The Classification and Nomenclature of Viruses. *Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Arch. Viral: Springer Verlag, Viena, Nueva York, 1995.
2. Rose, J.K., Doolittle, R.F., Anilionis, A., Curtis, P.J. and Wunner, W.H.: Homology between the glycoproteins of vesicular stomatitis virus and rabies virus. *J. Virol.* 43: 361364, 1982.
3. Wagner, R.R., Prevec, L., Brown, F., Summers, D.F., Sokol, F. and MacLeod, R.: Classification of rhabdovirus proteins: a proposal. *J. Virol.* 10 (6): 1228-1230, 1972.
4. Montaña-Hirose, J.A: Efficacité du traitement antirabique: Extension aux Lyssavirus de la chauve-souris européenne (EBL) et rôle de l'immunosuppression. *These de Doctorat de l'Université Paris 6*. Spécialité: Sciences de la Vie. Paris, 1994.

5. Barge, A., Gaudin, Y., Coulon, P. and Ruigrok, R.W.H.: Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil. 1. *Viol.* 67 (1 2): 7246-7253, 1993.
6. Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G. and Rougeon, F.: Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3914-3918, 1986b.
7. Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G. and 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* 165 (2): 565-576, 1988.
8. Smith, J.S., Orciari, L.A., Yager, P., Seidel, H.D. and Warner, C.K.: Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. 1. *Infect. Dis.* 166: 296-307, 1992.
9. Sacramento, D., Bourhy, H. and Tordo, N.: PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Molecular and Cellular Probes* 5. 229-240, 1991.
10. Sacramento, D., Badrane, H., Bourhy, H. and Tordo, N.: Molecular epidemiology of rabies in France: Comparison with vaccinal strains. 1. *Gen Virol.* 73: 1149-1158, 1992.
11. Bourhy, H., Kissi, B. and Tordo, N.: Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* 194: 70-81, 1993.
12. Morimoto, K., Ohkubo, A. and Kawai, A.: Structure and transcription of the glycoprotein gene of attenuated HEP-Flury strain of rabies virus. *Virology* 173: 465-477, 1989.
13. Whitt, M.A., Buonocore, L., Préhaud, C. and Rose, J.K.: Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology* 185: 681-688, 1991.

14. Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Macfarlan, R.I. and Varrichio, A.: Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: ordering and immunological characterization of the large CnBr cleavage fragments. *I. Virol.* 44: 595-602, 1982.
15. Wunner, W.H., Larson, J.K., Dietzschold, B. and Smith, C.L.: The molecular biology of rabies virus. *Rev. Infect. Dis.* 10: S771-S784, 1988.
16. Wunner, W.H., Dietzschold, B., Smith, c.L., Lafon, M. and Golub, E.: Antigenic variants of CYS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology* 140: 1-12, 1985.
17. Wunner, W.H., Reagan, K.J. and Koprowski, H.: Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *I. Virol.* 50: 691-697, 1984.
18. Dietzschold, B., Wunner, W.H., Wiktor, T.J., Lopes, A.D., Lafon, M., Smith, c.L. and Koprowski, H.: Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 70-74, 1983b.
19. Dietzschold, B., Tollis, M., Lafon, M., Wunner, W.H. and Koprowski, H.: Mechanisms of rabies virus neutralization by glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Virology* 161: 29-36, 1987a.
20. Montaña-Hirose, J.A., Lafage, M., Weber, P., Badrane, H., Tordo, N. and Lafon, M.: Protective activity of a murine monoclonal antibody against European Bat Lyssavirus infection in mice. *Vaccine* 11 (12): 1259-1266, 1993
21. Lentz, T.L., Wilson, P.T., Hawrot, E. and Speicher, D.W.: Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. *Science* 226: 847-848, 1984.
22. Lentz, T.L., Hawrot, E. and Wilson, P.T.: Synthetic peptides corresponding to sequences of snake venom

- neurotoxins and rabies virus glycoprotein bind to the nicotinic acetylcholine receptor. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 2: 298-307 1987.
23. Préhaud, C, Coulon, P., Lafay, F, Thiers, C and Flamand, A.: Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: Structure and role in viral virulence. *J. Virol.* 62: 1-7, 1988.
  24. Seif, I., Coulon, P., Rollin, P.E. and Flamand, A.: Rabies virulence. Effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 53: 926-934, 1985.
  25. Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Trojanowski, J.Q., Macfarlan, R.I., Wunner, W.H., Torres-Anjel, M.J. and Koprowski, H.: Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* 56. (1), 12-18, 1985.
  26. Yang C and Jackson, AC: Basis of neurovirulence of avirulent rabies virus variant AvO1 with stereotaxic brain inoculation in mice. *J. Gen. Virol.* 73: 895-900, 1992.
  27. Kaplan, M.M., Wiktor, T.J. and Koprowski, H.: Pathogenesis of rabies in immunodeficient mice. *J. Immunol.* 114: 1761-1765, 1975.
  28. Lafon, M., Wiktor, T.J. and Macfarlan, R.I.: Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 64: 843-851, 1983a.
  29. Lafon, M., Ideler, J. and Wunner, W.: Investigation of the antigenic structure of rabies virus glycoprotein by monoclonal antibodies. *Developments in Biological Standardization* 57: 219-225, 1983b.
  30. Bunschoten, H., Gore, M., Claassen, I.J.Th.M., Uyth Haag, G.C.M., Dietzschold, B., Wunner, W.H. and Osterhaus, A.D.M.E.: Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein *J. Gen. Virol.* 70: 291-298, 1989.

31. Van der Heijden, R.W.J., Langedijk, J.P.M., Groen, J., UytdeHaag F.G.C.M., Meloen, R.H. and Osterhaus, A.D.M.E.: Structural and functional studies on a unique linear neutralizing antigenic site (G5) of the rabies virus glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 74: 1539-1545, 1993.
32. Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C, Gaudin, Y., Flamand, A. and Lafay, F.: Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 65 (8): 4198-4203, 1991.
33. Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Wunner, W.H. and Varrichio, A.: Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology* 124: 330-337, 1983a.
34. Dietzschold, B., Tollis, M., Lafon, M., Wunner, W. and Koprowski, H.: Mechanisms of rabies virus neutralization by glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Virology* 161: 29-36, 1987.
35. Wiktor, T.J., György, E., Schlumberger, H.D., Sokol, F. and Koprowski, H.: Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.* 110 (I): 269-276, 1973.
36. Cox, J.H., Dietzschold, B. and Schneider, L.: Rabies virus glycoprotein II. Biological and serological characterization. *Injection and Immunity* 16: 754-759, 1977.
37. Kieny, M.P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T.J., Koprowski, H. and Lecocq, J.P.: Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 312: 163-166, 1984.
38. Wiktor, T.J., Macfarlan, R.I., Reagan, K.J., Dietzschold, B., Curtis, P.J., Wunner, W.H., Kieny, M.P., Lathe, R., Lecocq, J.P., Mackett, M., Moss, B. and Koprowski, H. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81. 7194-7198, 1984.
39. Prevec, L., Campbell, J.B., Christie, B.S., Belbeck, L. and Graham, F.L.: A recombinant human adenovirus vaccine

- against rabies. *The Journal of Infectious Diseases* 161 (1): 27-30, 1990.
40. Ferguson, M. and Schild, G.C.: A single radial-immunodiffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: application for potency tests of vaccines against rabies. *J. Gen. Virol.* 59: 197-201, 1982.
  - 41 Lafon, M., Perrin, P., Versmisse, P. and Sureau, P.: Use of a monoclonal antibody for quantitation of rabies vaccine glycoprotein by immunoassay. *J. Biol. Stand.* 13: 295-301, 1984.
  42. Montaña-Hirose, J.A. A direct ELISA to evaluate the glycoprotein content of suckling mouse brain rabies vaccines. *Arq. Biol. Tecnol.* 29 (3) 413-421, 1986.
  43. Turner, G.S.: Immune response after rabies vaccination: basic aspects. *Ann. Inst. Pasteur/Viral.* 136 E.: 453-460, 1985.
  44. Sokol, F. and Koprowski, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 933-936, 1975.
  - 45 Dietzschold, B., Cox, J.H. and Schneider, L.G.: Rabies virus strains: a comparison study by polypeptide analysis of vaccine strains with different pathogenic patterns. *Virology* 98: 63-75, 1979.
  46. Tordo, N., Poch, O., Ermine, A. and Keith, G.: Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSv. *Nucleic Acids Res.* 14: 267] - 2683, 1986a.
  47. Schneider, L.G.: Antigenic variants of rabies virus. *Camp. Immun. Microbial. infect. Dis.* 5: 10 I-I 07, 1982.
  48. Montaña-Hirose, J.A., Bourhy, H. and Lafon, M.: A reduced panel of anti-nucleocapsid monoclonal antibodies for bat rabies virus identification in Europe. *Res. Virol.* 141: 571581, 1990.

49. Lafon, M. and Wiktor, T.J.: Antigenic sites of the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. *J. Gen. Virol.* 66:2125-2133,1985.
50. Dietzschold, B., Rupprecht, CE., Tollis, M., Lafon, M., Mattei, J., Wiktor, T.J. and Koprowski, 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.* 10(supplement 4): S785-S798, 1988.
51. Ertl, H.C.J., Dietzschold, B., Gore, M., Otvos, L.J.R., Larson, J.K., Wunner, W.H. and Koprowski, H.:  
Induction of rabies virus-specific T -helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *J. Virol.* 63: 2885-2892,1989.
52. Ertl, H.C.J., Dietzschold, B., and Otvos, J.R.L.: T-helper cell epitope of rabies virus nucleoprotein defined by tri- and tetrapeptides. *Eur J. Immunol.* 21,1-10,1991.
53. Celis, E., Ou, D., Dietzschold, B. and Koprowski, H.  
Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. *J. Virol.* 62: 3128-3134, 1988.
54. Seligmann, Jr., E.B.: L'epreuve d'activite NIH. In: La Rage, Techniques de Laboratoire, 3<sup>ème</sup> edition. (Kaplan, M.M and Koprowski, H, eds.). Organisation Mondiale de la Sante, Geneve. pp. 287-294,1974.
55. Habel, K.: Test de Habel. In: La Rage, Techniques de Laboratoire, 3<sup>ème</sup> edition. (Kaplan, M.M and Koprowski, H, eds.). Organisation Mondiale de la Sante, Genève. pp. 284-285, 1974.
56. Wunderli, P.S., Shaddock, J.H., Schmid, D.S., Miller, T.J. and Baer, G.M.: The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccine. *Vaccine* 9. 638-642, 1991.

57. Dietzschold, B., Wang, H., Rupprecht, C.E., Celis, E., Tollis, M., Ertl, H., Heber-Katz, E. and Koprowski, H.: Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9165-9169, 1987b.
58. Dietzschold, B., Gore, M., Ertl, H., Celis, E., Otvos, Jr. L. and Koprowski, H.: Analysis of protective immune mechanisms induced by rabies nucleoprotein. *In: Genetics and pathogenicity of negative strand viruses* (Mahy, B. W.J. and Kolakowsky, D.; eds.). *Elsevier Science Publishing Co, Inc*, New York, pp. 295-309, 1989.
59. Bellini, W.J., Sumner, J.W., Fekadu, M. Shaddock, J.H. and Esposito, J.J.: Expression of rabies nucleoprotein (N) gene by recombinant vaccinia virus. *In: Proceedings of The 22<sup>nd</sup> Joint Viral Diseases Panel Meeting, of the Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, Tokyo, Japon, 51-52. 1988a. Citado por Celis and Rupprecht 1990.*
60. Bellini, W.J., Reid-Sanden, F.L., Sumner, J.W. and Smith, J.S.: Expression of rabies virus nucleoprotein (N) gene using a baculovirus recombinant: antigenic and immunologic properties of the N protein expressed in an insect cellline. *In: Proceedings of The 22<sup>nd</sup> Joint Viral Diseases Panel Meeting, of the Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, Tokyo, Japon, 53. 1988b. Citado por Celis and Rupprecht 1990.*
61. Fu, Z.F., Dietzschold, B., Schumacher, c.L., Wunner, W.H., Ertl, H.C.J. and Koprowski, H.: Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 20022005, 1991.
62. Lodmell, D.L., Sumner, J.W., Esposito, J.J., Bellini, W.J. and Ewalt, L.c. Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *J. Virol.* 65: (6),3400-3405, 1991.
63. Sumner, J.W., Fekadu, M., Shaddock, J.H., Esposito, J.J. and Bellini, W.: Protection of mice with vaccinia virus



recombinants that express the rabies nucleoprotein. *Virology* 183:703-710,1991.

64. Tollis, M., Dietzschold, B., Volia, C.B. and Koprowski, H.: Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. *Vaccine* 9:134-136,1991.
65. Lafon, M., Lafage, M., Martínez-Arends, A., Ramirez, R., Vuillier, F., Charron, D., Lotteau, V. and Scott-Algara, D.: Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature* 358: 507-510, 1992.
66. Lafon, M., Scott-Algara, D., Jouvin-Marche, E. and Marche P.N.: Superantigenicity of rabies virus nucleocapsid in humans and mice. *In: Superantigens: A pathogen's view of the immune system.* Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 117-138,1993.
67. Marrack, P. and Kapler, J.: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248: 705-711,1990.
68. Cole, B.C. and Atkins, C.L.: The *mycoplasma arthritis* T cell mytogen, MAM: a model superantigen. *Immunol. Today* 12:271-276.1991.
69. Huber, B.T.: MIs genes and self-superantigens. *Trends in Genetics* 8: 399-402, 1992
70. Acha-Orbea, H., Held, W., Waanders, G.A., Shakhov, A.N., Scarpellino, L., Lees, R.K. and MacDonald, H.R.: Exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus superantigens. *Immunological Rev.* 131: 5-25, 1993
71. Atanasiu, P., Perrin, P., Delagneau, J.F., Versmisse, P., Chevalier, G., Reculard, P., Le Fur, R. and Sureau, P.: Titrage immunoenzymatique de la glycoprotéine, une technique *in vitro* pour l'appréciation de l'activité des vaccins antirabiques. *J. Biol. Stand.* 10 (4): 289-296, 1982.

72. Montaña-Hirose, J.A., Lafage, M. and Lafon, M.: Measurement of rabies virus N protein in rabies vaccines. *Res. Virol.* 146: 217-224, 1995.
73. Sokol, F., Stancek, D. and Koprowski, H.: Structural proteins of rabies virus. *J. Virol.* 7, 241-249, 1971.
74. Zaides, V.M., Krotova, L.I., Selimova, L.M., Selimov, M.A., Elbert, L.B. and Zhdanov, V.M.: Reevaluation of the proteins in rabies virus particles. *J. Virol.* 29: 1226-1228, 1979.
75. Larson, J.K., Wunner, W.H., Otvos, L.J.R. and Ertl, H.C.J.: Identification of an immunodominant epitope<sup>7</sup> within the phosphoprotein of rabies virus that is recognized by both class I- and class II-restricted T cells. *J. Virol.* 65: 5673-5679, 1991.
76. McSharry, J.J. and Wagner, R.R. Carbohydrate composition of purified vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 7: 412-415, 1971.
77. Delagneau, J.F., Perrin, P. and Atanasiu, P.: Reevaluation de la structure du virus rabique: relations spatiales entre les proteines constitutives du virus. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon* 14. (3), 377-399, 1981.
78. Wilson, T. and Lenard, J. Interaction of wild-type and mutant M protein of vesicular stomatitis virus with nucleocapsid in vitro. *Biochemistry* 20: 1349-1354, 1981.
79. Pal, R. and Wagner, R.R. Rhabdovirus membrane and maturation. In: *The rhabdoviruses (R.R. Wagner, ed.)*. Plenum Publishing Corp. NY. pp 75-128, 1987.
80. Carroll, A.R. and Wagner, R.R.: Role of the membrane (M) protein in endogenous inhibition of in vitro transcription by vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 29: 134-142, 1979.

81. Lafon, M., Bourhy, H. and Sureau, P.: Immunity against the European bat rabies (Duvenhage) virus induced by rabies vaccines: an experimental study in mice. *Vaccine* 6: 362-368, 1987.
82. Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L. and Tordo, N.: Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignments of functional domains. *J. Gen. Virol.* 71: 1153-1162, 1990.
83. Marie, A.: Note sur la rage chez les oiseaux. *C.R. Soc. Biol.* 56. 573-575, 1904.
84. Remlinger, P. and Bailly, J.: La rage du pigeon. *Ann. Inst. Pasteur* 43: 1543-1559. 1929.
85. Lodmell, D.L.: Genetic control of resistance to street rabies virus in mice. *J. Exp. Med.* 157: 451-460, 1983.
86. Superti, F., Hauttecoeur, S., Morelee, M.J., Goldoni, P., Bizzini, B. and Tsiang, H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J. Gen. Virol.* 67: 47-56, 1986.
87. Baratawidjaja, R.K., Morrissey, L.P. and Labzoffsky, N.A. Demonstration of vaccinia, lymphocytic choriomeningitis and rabies viruses in the leucocytes of experimentally infected animals. *Arch. Ges. Virusforsch.* 17: 273-279, 1965.
88. Koprowski, H. and Wiktor, T.J. Monoclonal antibodies against rabies virus. In *Monoclonal antibodies. Hybridomas: a new dimension in biological analyses* (Kennell, R.H., McKearn, T.I. and Bechtol, K.B., eds.). Plenum Press, New York. pp. 335-351, 1980.
89. Fekadu, M. and Shaddock, J.H.: Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 45. 724-729, 1984.
90. Gaudin, Y., Tuffereau, C., Segretain, D., Knossow, M. and Flamand, A.: Reversible conformational changes and fusion

activity of rabies virus glycoprotein. *J. Viral.* 65 (9): 4853-4859, 1991.

91. **Kawai, A.:** Transcriptase activity associated with rabies virion. *J. Viral.* 24: 826-835, 1977.