

Los receptores de la vacuna canina reconocen una región inmunodominante de la glicoproteína del virus de rabia

N. Johnson, K. L. Mansfield and A. R. Fooks

Grupo de Investigación y Diagnóstico de Rabia, Agencia de Laboratorios Veterinarios, Weybridge. Addlestone, Surrey, KT15 3NB, UK

Para investigar la respuesta inmune de la vacunación antirrábica en el receptor principal (el perro doméstico), cuatro fragmentos truncados de la glicoproteína del virus de la rabia se expresaron como proteínas de fusión de glutatión de S-transferasa. Los sueros inmunes de conejos y perros vacunados se utilizaron entonces para sondear la reactividad con estas proteínas expresadas. En dos conejos y cuatro perros analizados, la respuesta de anticuerpos dominantes a sitios antigénicos no conformacionales parecía estar dirigida a una región de la glicoproteína entre los aminoácidos 222 y 332. El fragmento N-terminal de la glicoproteína también fue significativamente antigénico. Otros estudios para evaluar si la respuesta de los anticuerpos al dominio interno podría neutralizar la cepa del Estándar del Virus de Exposición de la rabia (CVS), utilizando el agotamiento de los anticuerpos, sugirieron que esta fracción contribuyó a la capacidad de los sueros post-vacunación para neutralizar y, por lo tanto, proteger contra la infección.

Introducción

La infección por el virus de la rabia clásica (RV) causa encefalitis mortal para la que no hay tratamiento una vez que se desarrollan los síntomas (Hemachuda & Phuapradit, 1997). Sin embargo, la protección contra la exposición con RV se puede obtener efectivamente mediante la vacunación o la transferencia de inmunoglobulinas antirrábicas. De hecho, estudios en ratones transgénicos sugieren que sólo una deficiencia en la capacidad de desarrollar una respuesta de anticuerpos permite que la enfermedad se desarrolle con cepas no virulentas de RV (Hooper *et al.*, 1998). La vacunación con el virus totalmente inactivado induce una fuerte respuesta humoral a una serie de antígenos, la respuesta más significativa es la contra la glicoproteína viral. Esta proteína se expresa como un polipéptido de aminoácidos 524 con los primeros 19 residuos formando un péptido de señal, que se corta a medida que la proteína entra en el retículo endoplasmático (Anilionis *et al.*, 1981). Las regiones restantes de la proteína se pueden subdividir en un ectodominio residual de 439 residuos (expuesto en la superficie), un dominio transmembrana de 22 residuos y un endodominio de 44 residuos. Se desconoce la estructura tridimensional de esta proteína, pero contiene entre 12 y 16 residuos de cisteína conservadas (Coll, 1995), en común con otras glicoproteínas de rabdovirus, y potencialmente forma trímeros (Gaudin *et al.*, 1992). *et al*

Autor para correspondencia: Nicholas Johnson.
Fax +44 1932 347046 correo electrónico:
n.johnson2@vla.defra.gsi.gov.uk

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) han sido fundamentales para esclarecer los sitios antigénicos en la glicoproteína RV y estos pueden clasificarse en sitios de conformación y sitios lineales no conformacionales. Dos sitios importantes dominan el primero. El primero, llamado sitio antigénico II, se forma a partir de dos sitios entre los residuos 34 y 42 y los residuos 198 y 200 (Prehaud *et al.*, 1988). Por el contrario, una sola región entre los residuos 330 y 338 forma el segundo sitio, el sitio antigénico III, con una arginina en la posición 333 siendo crítica para la neutralización del virus (Seif *et al.*, 1985). Este residuo también es crítico para la neuroinvasión, posiblemente a través de su papel en la unión a un receptor celular (Dietzschold *et al.*, 1983 ; Coulon *et al.*, 1989 ; Badrane *et al.*, 2001). También hay evidencia de que estos sitios antigénicos se conservan estructuralmente entre todos los rabdovirus (Walker & Kongsuwan, 1999) y el inmunodominio de estos sitios se enfatiza con la observación de que el 97 % de los mAbs reconocieron cualquiera de los sitios (Coulon *et al.*, 1993). El mapeo de los epítopos de los mAbs neutralizantes también ha identificado sitios no conformales (Bunschoten *et al.*, 1989 ; Dietzschold *et al.*, 1990) y una serie de residuos críticos (Van der Heijden *et al.*, 1993 ; Ni *et al.*, 1995 ; Luo *et al.*, 1997). Los enfoques alternativos para mapear sitios antigénicos han utilizado fragmentos de bromuro de cianógeno (CNBr) de la glicoproteína purificada (Dietzschold *et al.*, 1982) y péptidos cortos de glicoproteína expresados en levadura (Lafay *et al.*, 1996). El primer estudio concluyó que, en el conejo, las regiones principales reconocidas eran sitios internos entre los residuos 103 y 330, mientras que el segundo mapeo un panel de mAbs a una región corta entre los residuos 223 y 276. Este contraste sugiere que diferentes especies pueden responder a diferentes sitios en la glicoproteína RV.



En este estudio hemos investigado la respuesta de anticuerpos policlonales en los epítomos no conformacionales en receptores de conejos y perros de una vacuna antirrábica disponible comercialmente. Los fragmentos truncados de la glicoproteína RV se fusionaron con el glutatión de S-transferasa (GST) y se utilizaron para mapear la respuesta a regiones definidas. Este enfoque confirmó el inmunodominio de una región interna de la glicoproteína observada con mAbs. También identificó una segunda región cerca de la terminal N de la proteína hacia la que los perros en particular dirijan una respuesta de anticuerpos.

Métodos

■ **Inmunizaciones.** Tres conejos blancos de Nueva Zelanda fueron inoculados por vía intramuscular con 0.25 ml de Rabisin (Merial Animal Health), una vacuna comercial basada en la cepa del virus G. S.57 Wistar cultivada en células NIL (embrión de hámster). El virus se incubó con β -propiolactona y se absorbió en el hidróxido de aluminio. Los conejos fueron inoculados a los 0, 21, 42 y 57 días, y se les dio un impulso final a los 136 días. La sangrado se llevó a cabo el día 150. La confirmación de una respuesta positiva se obtuvo probando suero de cada animal con el ensayo de neutralización del virus de anticuerpos fluorescentes (FAVN). Los sueros caninos fueron seleccionados de las muestras enviadas a la Agencia de Laboratorios Veterinarios para pruebas de rutina como parte del Programa de Viajes de Mascotas del Reino Unido (Fooks *et al.*, 2002). A cada uno se le había administrado una dosis única de Rabisin (1 ml por vía intramuscular) y se había desangrado 1 mes después de la vacunación.

■ **Ensayo de neutralización del virus de anticuerpos fluorescentes (FAVN).** Este ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Cliquet *et al.* (1998). Brevemente, los sueros fueron inactivados por calor por incubación a 56°C durante 30 min y luego diluidos en serie en una placa de 96 pocillos. Cien TCID₅₀ del Estándar de Virus de Exposición de rabia (CVS-11) se agregaron y la placa fue incubada a 37°C durante 1 h. Finalmente, células del riñón de hámster bebé (BHK) de 50 μ l en células de 4 x 10⁵ células/ml se añadieron en el medio modificado de Eagle de Dulbecco con penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 μ g/ml), micostatina (25 U/ml). La placa fue incubada durante 48 h a 37°C. El sobrenadante entonces se desechó y las células adherentes se fijaron con acetona (80 % en H₂O) durante 20 min. La placa se le permitió secar al aire y luego tñó con un conjugado antirrábico-FITC (Centocor) en una dilución de 1:50. La fluorescencia se midió en cada dilución de sueros y las valoraciones se calcularon utilizando el método Spearman-Kärber. Los resultados se presentan como el número de Unidades Internacionales en comparación con un estándar positivo y negativo de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) para la inmunoglobulina de rabia.

■ **Construcción de fragmentos de glicoproteína truncada.** Los fragmentos de ADN que codifican las cuatro regiones se amplificaron utilizando PCR. El objetivo de la amplificación fue el ARN (1 g/l) extraído de células BHK infectadas con RV (cadena del virus Pasteur) (Heaton *et al.*, 1997). Brevemente, el ARN fue transcrito al revés utilizando el protocolo de Heaton *et al.* (1997) utilizando la imprimación ascendente y luego se amplificó utilizando las combinaciones de imprimaciones detalladas en la Tabla 1. El producto de cada reacción se clonó inmediatamente en plásmido pCR2.1 utilizando el sistema de clonación TA (Invitrogen) y se transformó en células competentes de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se extrajeron utilizando el kit de preparación de plásmidos Wizard (Promega) y se digirieron con endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Sal*I. Los fragmentos de glicoproteína digeridos fueron purificados y clonados en el plásmido pGEX-4T-3 (Pharmacia) y luego se transformaron en células *E. coli* competentes BL21 (Pharmacia).

■ **Expresión de fragmentos de glicoproteína fusionados con GST.** Para expresar cada proteína de fusión truncada, los transformantes que contenían cada plásmido recombinante se cultivaron durante la noche a 37°C en caldo LB que contiene 100 mg/ml de ampicilina (Sigma). Se inoculó una alícuota de 1 ml de cada transformador en 20 ml de caldo LB fresco con ampicilina y se cultivó durante 2 h a 37°C. La expresión de la proteína de fusión fue inducida por la adición de 0-1 mM IPTG (Sigma) y los cultivos fueron incubados durante otras 4 h a 28°C. Las células fueron cosechadas por sedimentación (2000 g, 5 min) y resuspendidas en búfer de sonicación (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7-2, 0-5 mM EDTA, 1 mM PMSF). Cada lote de células fue suspendido tres veces por 15 s cada una en hielo. El material insoluble y las células intactas fueron eliminadas por sedimentación (10000 g, 5 min) y el sobrenadante se retiró a un tubo separado.

■ **Electrotransferencia.** Las separaciones de proteínas se llevaron a cabo por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en búfer de transferencia (0-025 M Tris-HCl, pH 8.8, 0-192 mM de glicina, 0-1%, w/v, SDS, 25 %, v/v, metanol). Las membranas se bloquearon con un 5% de leche sin grasa en PBS (pH 7-2) con 0-1 % de Tween 20 (PBS-T). El sondeo con sueros policlonales se llevó a cabo a una dilución de 1:2000 en 1 % de leche sin grasa en PBS-T durante 1 h a 37°C. Cada membrana se lavó tres veces con PBS-T y luego se incubó con peroxidasa de rábano picante anticonejo de cerdo (Dako) o peroxidasa antiperro de conejo (Sigma) se conjuga según corresponda, ambos en una dilución de 1:2000 durante 1 h a 37°C. Las membranas se lavaron cinco veces y se desarrollaron utilizando la quimioluminiscencia mejorada (Amersham Pharmacia). El tamaño de las proteínas se estimó en comparación con los marcadores de rango amplio pre-tenidos (Bio-Rad).

Tabla 1. Secuencia y posición genómica de las imprimaciones utilizadas para construir fragmentos truncados de la glicoproteína RV



	Imprimación	Secuencia de Imprimación (5' ---3')	Sitio Genómico*	Posición sobre glicoproteína†
RvG1-2	RvG1	AGCTGGATCCAAATTCCTATTTACACG	3375–3758	1–128
	RvG2	GTCAGTCGACGGTGGTTTTTACAGTTCG		
RvG3-4	RvG3	AGCTGGATCCCGAACTGTA AAAAACCACC	3741–4055	123–227
	RvG4	GTCAGTCGACTA AACTTGAGTTTGCATGC		
RvG5-6	RvG5	AGCTGGATCCGCATGCAA AACTCAAGTTA	4035–4370	222–332
	RvG6	GTCAGTCGACGACTGACTTGTAGTGAGC		
RvG7-8	RvG7	AGCTGGATCCGCTCACTACAAGTCAGTC	4353–4703	327–443
	RvG8	GTCAGTCGACCAGTAATACATACTTCCC		

* Las posiciones de base de la región genómica amplificadas por las imprimaciones se derivan del genoma fotovoltáico (adhesión a GenBank no. M13215).

† Las posiciones de los péptidos se derivan de la glicoproteína fotovoltáica madura con el residuo 1 que representa la lisina en el sitio de escisión DE ER propuesto.

Resultados

Expresión de fragmentos truncados de glicoproteína RV

Para investigar las regiones de la glicoproteína RV contra las que los animales inmunizados generaron anticuerpos, se expresaron fragmentos truncados de la glicoproteína de cepa del Virus Pasteur (PV) como fusiones con GST. Cada fragmento tenía entre 100 y 120 aminoácidos de longitud y, cuando se expresaba como proteína de fusión, migraba con una masa molecular de entre 40 y 42 kDa (Fig. 1). Mientras que el GST por sí solo se expresó como una proteína soluble (Fig. 1, fila 2), cada una de las proteínas de fusión resultó insoluble, con la gran mayoría de la proteínas que se recuperó de la fracción de pellet después de la sonicación (Fig. 1, filas 6–9). La Figura también demuestra que las proteínas de fusión no se expresaron todas a niveles iguales y que la proteína RvG7–8 se expresaba constantemente a un nivel inferior. Para lograr la carga equitativa en experimentos posteriores con el fin de evaluar la unión diferencial de anticuerpos en sueros policlonales, las proteínas de fusión solubilizadas se diluyeron con un volumen adecuado de búfer de carga de muestras. Cantidades iguales de tinción de proteína roja Ponceau (Sigma) de las membranas de nitrocelulosa después de la transferencia después de SDS-PAGE confirmaron cantidades iguales dentro de cada muestra.

Análisis antigénico de sueros de conejo vacunados con RV

Tres conejos fueron inmunizados con la vacuna comercial antirrábica Rabisin para inducir una respuesta de anticuerpos. El análisis posterior a la vacunación de cada muestra sérica mostró una respuesta fuerte a la glicoproteína de la rabia medida por un nivel protector de anticuerpos neutralizantes superior a 0.5 unidades internacionales por ml (UI/ml) (véase la Fig. 4). La electrotransferencia también detectó una fuerte respuesta a la glicoproteína madura (Fig. 2a, fila G). El cribado de las proteínas de fusión truncadas con cada suero policlonal de conejo (Fig. 2) mostró un sesgo distintivo en la reactividad a la tercera proteína de fusión. En ambos conejos, R411 (Fig. 2b, panel superior) y R413 (Fig. 2a, b, panel inferior), la banda dominante era RvG5-6 (fila 4), que cubría un fragmento de 111 aminoácidos de la

glicoproteína de alanina-222 a la valina-332. R412 produjo una respuesta más débil a los epítomos no conformacionales, pero incluso con esta muestra, la respuesta más fuerte fue a RvG5-6. En general, hubo poco reconocimiento de GST (reconocimiento débil por R411, Fig. 2b, panel superior, fila 1), lo que indica que la respuesta fue a epítomos lineales en la glicoproteína de la rabia. El fragmento truncado RvG1-2 también fue reconocidos por R411 y R413, lo que indica que los sitios antigénicos están presentes entre los residuos 1 y 128 de la glicoproteína

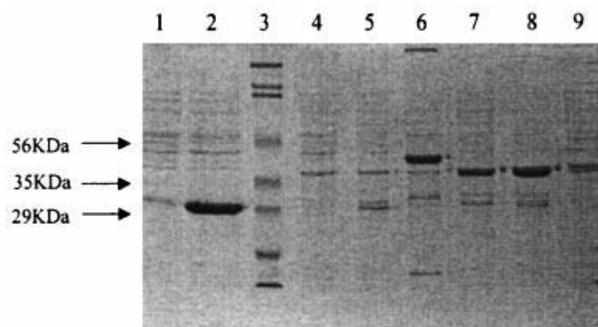


Figura 1. Análisis de fragmentos SDS-PAGE al 2% de glicoproteína truncados tras la expresión en *E. coli*. Fila 1, GST sobrenadante sin inducción IPTG; fila 2, sobrenadante GST con inducción IPTG; fila 3, marcadores de masa molecular; fila 4, GST pellet sin inducción IPTG; fila 5, GST pellet con inducción IPTG; fila 6, RvG1-2 pellet con inducción IPTG; fila 7, RvG3-4 pellet con inducción IPTG; fila 8, RvG5-6 pellet con inducción IPTG; fila 9, RvG7-8 pellet con inducción IPTG.

Análisis antigénico de sueros de perro hiperinmunes

Para confirmar las observaciones de inmunodominio de la región de la glicoproteína entre las posiciones 222 y 332, las proteínas de fusión truncadas fueron sondeadas con sueros de seis perros que también habían sido inmunizados con la vacuna Rabisin. A diferencia de las muestras de conejo cuyos valoraciones finales de FAVN eran inferiores a 100 UI/ml, estas muestras se seleccionaron intencionalmente debido a la magnitud de su respuesta, con títulos superiores a 1000 UI/ml. La Fig.

3(a) muestra que los sueros de perro D5951 produjeron una respuesta fuerte a la glicoproteína (indicada en aproximadamente 65 kDa) y a otras proteínas RV, presumiblemente la nucleoproteína (50 kDa) y la proteína de matriz (23 kDa) (Coll, 1995). Aunque hubo algunos antecedentes vinculantes a las proteínas de *E. coli*, la banda reactiva dominante parecía ser RvG5-6 (Fig. 3a, fila 4). La Figura 3(b) muestra los resultados de otros dos sueros para perros, D5993 (panel superior) y D6183 (panel inferior). Estas muestras fueron representativas de los animales analizados con una fuerte respuesta al fragmento N-terminal (RvG1-2) y a RvG5-6. D6183 respondió de manera similar al suero de conejo (R411 y R413) con una gran respuesta centrada en el fragmento RvG5-6. En la Tabla 2 se presenta un resumen de las respuestas de este panel de sueros de perros. Con la excepción de la D6183, y en menor medida D5951, todos los animales produjeron una respuesta más variada que la observada en los sueros de conejo, pero también mostrando poca respuesta a RvG7-8.

¿Se neutralizan los anticuerpos contra la región 222–332?

El enfoque adoptado para identificar los sitios de epítomos de glicoproteína RV se ha basado en la identificación de virus mutantes que escapan a la neutralización con mAbs. Con sueros policlonales, esto no es posible debido a la naturaleza heterogénea de la respuesta a más de un epítopo. Como enfoque alternativo para abordar esto, hemos aprovechado la insolubilidad de la proteína

expresada RvG5-6 y la hemos utilizado para eliminar anticuerpos de unión específicos de sueros por adsorción. A través de la centrifugación posterior, los complejos inmunes podrían ser removidos y se volverían a probar los sueros para la actividad neutralizadora. La Figura 4 muestra el resultado de esto con ejemplos de conejo (Fig. 4a, R413) y sueros de perro (Fig. 4b, D5951). La confirmación de que el agotamiento se había producido en ambos casos se obtuvo observando la reducción de la detección de esta proteína por sueros incubados con RvG5-6 insoluble durante un máximo de 60 min (Fig. 4a, b, inserciones). Para los sueros de conejo, esta reducción en la detección de RvG5-6 por electrotransferencia se asoció con una disminución en la valoración neutralizante de 3•42 a 1•97 UI/ml después de un agotamiento de 60 minutos. Los sueros de perro D5951 no mostraron una reducción en el título neutralizante después de 30 minutos de incubación con RvG5-6 insoluble, aunque la comparación con los resultados de la mancha de la tira sugirió que un nivel significativo de agotamiento no se había producido en este momento. Sin embargo, después de un agotamiento de 60 minutos, la valoración neutralizante disminuyó de 40•5 a 30•77 UI/ml en asociación con una notable caída en la detección de la proteína por el suero agotado. Estos datos sugieren que el agotamiento de los sueros con RvG5-6 insoluble resulta en una pequeña pero medible reducción en la capacidad de sueros para neutralizar RV.

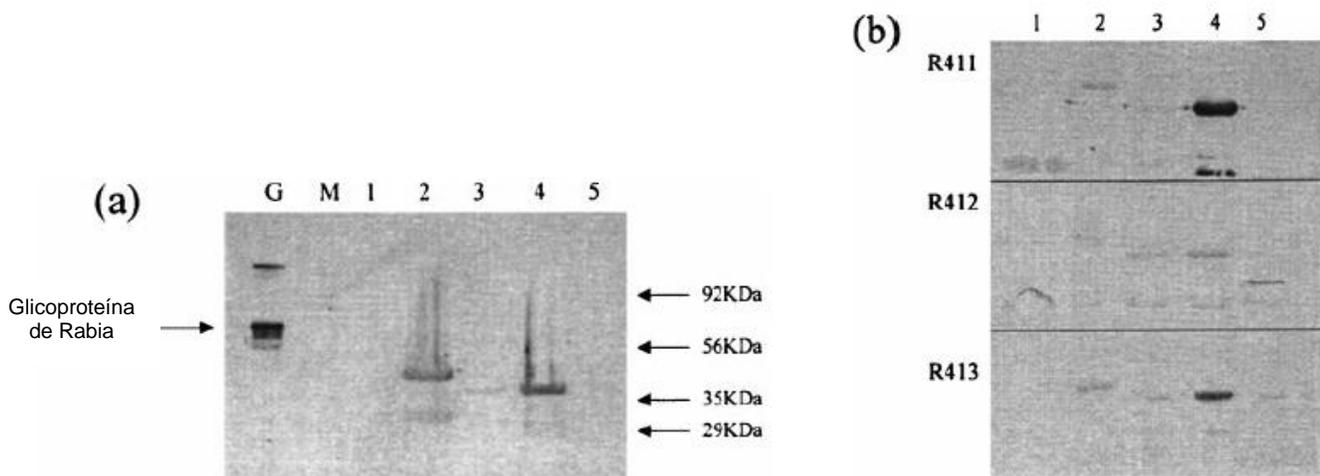


Figura 2 (a). Detección de manchas occidentales de fragmentos truncados de glicoproteína RV fusionados con GST con sueros de conejo R413. Fila G, lisado de células BHK infectadas con CVS; fila M, marcadores de masa molecular; fila 1, GST; fila 2, RvG1-2; fila 3, RvG3-4; fila 4, RvG5-6; fila 5, RvG7-8. Se indican las posiciones de los marcadores de masa molecular. (b) Detección de manchas occidentales de fragmentos de glicoproteína RV con suero de conejo R411 (panel superior), R412 (medio) y R413 (inferior). El contenido del fila es el mismo que en (a).



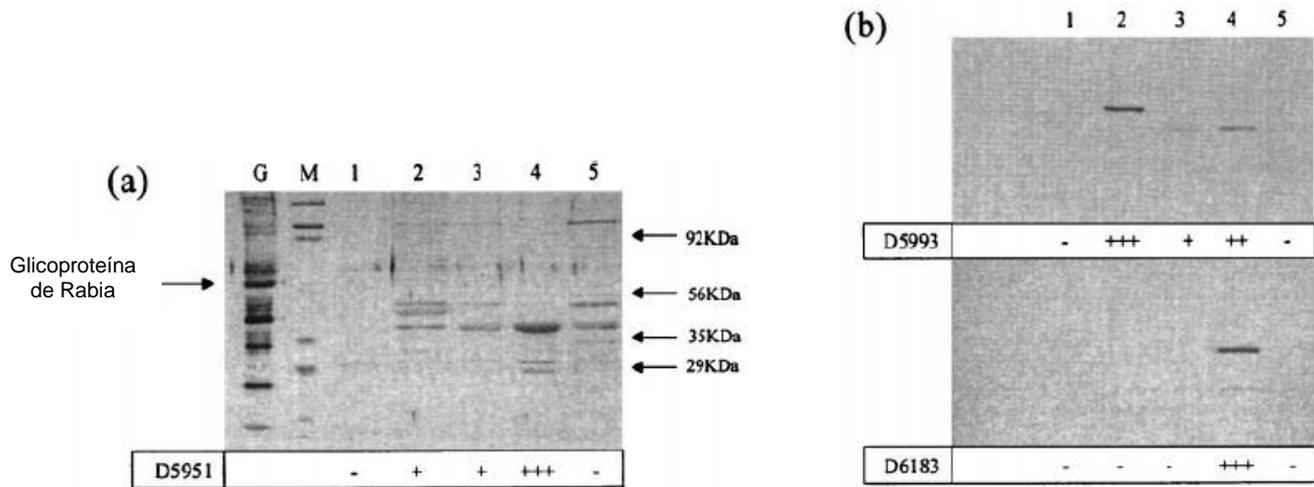


Figura 3 (a). Detección de manchas occidentales de fragmentos truncados de glicoproteína RV fusionados con GST con sueros de perro D5951. Fila G, lisado de células BHK infectadas con CVS; fila M, marcadores de masa molecular; fila 1, GST; fila 2, RvG1-2; fila 3, RvG3-4; fila 4, RvG5-6; fila 5, RvG7-8. Se indican las posiciones de los marcadores de masa molecular. (b) Detección de manchas occidentales de fragmentos de glicoproteína RV con sueros de perro D5993 (panel superior) y D6183 (panel inferior). El contenido del fila es el mismo que en (a).

Respuesta canina a la vacuna de la rabia

Tabla 2. Caracterización antigénica de sueros para perros por FAVN e electrotransferencia contra fragmentos truncados de glicoproteína RV

Muestra	FAVN (IU/ml)	Proteína de fusión de glicoproteína*				
		GST	RvG1-2	RvG3-4	RvG5-6	RvG7-8
D6183	1493.13	-	-	-	+++	-
D6159	1093.50	-	+	++	+++	-
D6020	1439.13	-	+	++	+++	+
D5993	1439.13	-	+++	+	++	-
D5951	1039.50	-	+	+	+++	+
D5904	1439.13	-	++	+	++	+

* Los resultados se presentan como reactividad relativa en comparación con la unión a la glicoproteína intacta (ver Fig. 3a, b).



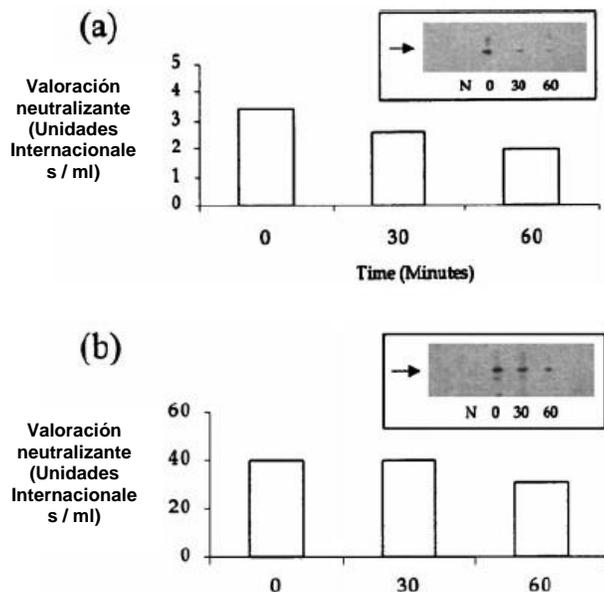


Figura 4. (a) El agotamiento de los anticuerpos reactivos al fragmento RvG5-6 conduce a una pérdida de actividad neutralizadora en los sueros de conejo (R413). La reactividad de la mancha SDS-PAGE/Occidental al 12% RvG5-6 de suero de conejo R413 contra el fragmento RvG5-6 se muestra en el recuadro. Fila N, sin antígeno; fila 0, sueros agotados durante 0 min; fila 30, sueros agotados durante 30 min; fila 60, sueros agotados durante 60 min. La flecha indica la posición de RvG5-6. (b) El agotamiento de los anticuerpos reactivos al fragmento RvG5-6 conduce a una pérdida de actividad neutralizadora en los sueros para perros (D5951). La reactividad de la mancha SDS-PAGE/Occidental al 12% de los sueros de perro agotados por RvG5-6 D5951 contra el fragmento RvG5-6 se muestra en el recuadro. El contenido del fila es el mismo que en (a). La flecha indica la posición de RvG5-6.

Discusión

La respuesta de los anticuerpos tras la inmunización a sitios antigénicos conocidos en la glicoproteína RV en las principales especies (hombre, perro y zorro) que reciben la vacunación contra la rabia no ha sido estudiada. El enfoque utilizado en este estudio sugiere que en dos especies, el conejo y el perro, la región entre alanina-222 y valina-332 (fragmento RvG5-6) de la glicoproteína fotovoltáica es inmunodominante en relación con el resto de la proteína. En un número de receptores de la vacuna canina, el término N de la proteína también contenía sitios antigénicos. La eliminación del componente de anticuerpos que se une a esta región inmunodominante redujo la capacidad de los sueros policlonales para neutralizar la RV.

Estas observaciones se comparan favorablemente con dos estudios previos que identificaron sitios antigénicos en la glicoproteína RV. Dietzschold *et al.* (1982) generó fragmentos cortados de la cepa ERA con Inmunoprecipitación CNBr. de tales fragmentos de CNR radioetiquetados con sueros de conejo hiperinmunes que identificaron dos regiones de la glicoproteína que formaron sitios antigénicos. El segundo de ellos se superpone parcialmente al fragmento RvG5-6 sobre la secuencia 293–332. Estas dos regiones, y un péptido no precipitable de los residuos N-terminal 50, fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes. El segundo estudio

de Lafay *et al.* (1996) utilizando fragmentos de péptidos de la cepa CVS expresados en levaduras identificó una región entre los residuos 223 y 276 que unía seis de los doce mAbs no dependientes de la conformación. El sitio se encuentra dentro del núcleo del péptido RvG5-6. Los mAbs restantes enlazados a sitios que flanquean esta región. Los estudios de predicción sobre esta región sugieren que hay múltiples sitios que podrían formar determinantes antigénicos, aunque esto no corresponde con el número limitado de sitios expuestos a la superficie pronosticadas (N. Johnson, observaciones inéditas). Además, tres estudios separados (van der Heijden *et al.*, 1993; Ni *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997) han caracterizado los mAbs neutralizantes que se unen a una región entre los residuos 248 y 268. Es posible que dentro de los sueros de perro policlonales, la unión total de anticuerpos neutralizantes al fragmento RvG5-6 podría deberse a la unión de anticuerpos a este sitio. Sin embargo, se requiere un análisis más detallado para evaluar el número de epítopos dentro de esta región truncada.

Al igual que con ambos estudios anteriores (Dietzschold *et al.*, 1982; Lafay *et al.*, 1996) que mapearon la glicoproteína RV, el fragmento C-terminal entre los residuos 327 y 443 no parece contener ningún determinante antigénico. Una posible explicación para esto podría ser que esta región está protegida de la vigilancia inmune por los dominios N-terminal de la glicoproteína. Sin embargo, en ausencia de una estructura secundaria completa, esto sigue siendo especulativo, a pesar de ser un hallazgo constante entre los grupos de investigación.

Los estudios de agotamiento utilizando RvG5-6 insoluble causaron una reducción limitada en el título neutralizante de los sueros de conejo y perro. Material insoluble de sonificado *E. coli* por sí solo no causó ninguna reducción en la valoración (datos no mostrados) y este paso podría utilizarse para eliminar la unión no específica sin ninguna reducción en la detección de glicoproteína RV. Los componentes restantes que constituyen la valoración neutralizante dentro de un suero policlonal son anticuerpos que se unen a los epítopos lineales en la región N-terminal, que podrían ser inducidos después de la inmunización con un péptido que cubre este sitio por Dietzschold *et al.* (1983). Además, los anticuerpos que unen sitios conformacionales como los sitios antigénicos previamente descritos en II y III (Coulon *et al.*, 1993) conformarán el componente neutralizador de los sueros inmunes.

Cabe señalar que el enfoque descrito anteriormente sólo identifica las regiones antigénicas no conformacionales. La importancia relativa de cada componente es imposible de comparar dentro de los sueros policlonales, aunque la experiencia con mAbs neutralizados sugiere que los sitios de conformación son dominantes (Lafay *et al.*, 1996). Sin embargo, la ausencia de estudios en carnívoros significa que esto puede no ser el caso en animales como el perro. Los enfoques que desarrollan mAbs que no son de ratón podrían utilizarse para abordar este problema (Champion *et al.*, 2000).

La importancia de investigar la respuesta de los anticuerpos en los receptores de vacunas reside en la información que se proporciona para identificar enfoques alternativos para el diseño de vacunas. La identificación de epítopos lineales cortos permite su replicación en forma de péptidos, que luego pueden ser utilizados como vacunas (Dietzschold *et al.*, 1990). Sin embargo, la

capacidad de RV para acomodar mutaciones puntuales que permiten escapar de la neutralización e irónicamente el método utilizado para identificar muchos epitopos, sugiere que este enfoque puede ser limitado. El uso de una región más grande de la glicoproteína como antígeno, que contiene más de un epítipo neutralizante, puede superar este problema. La observación principal de este estudio sugiere que algunos epítipos reconocidos por los mAbs probablemente también son reconocidos por perros vacunados. Esto debería permitir el diseño de un gran fragmento de la glicoproteína, que es capaz de inducir una respuesta policlonal neutralizante después de la inmunización, que podría proteger contra la exposición con una gama divergente de aislados RV clásicos.

Este trabajo fue apoyado por una subvención (SEO416) del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación, Asuntos Rurales (DEFRA), Reino Unido.

Referencias

Anilionis, A., Wunner, W. H. & Curtis, P. J. (1981). Estructura del gen de la glicoproteína en el virus de la rabia. *Nature* 294, 275–278.

Badrane, H., Bahloul, C., Perrin, P. & Tordo, N. (2001). Evidencia de dos fillogrupos de lisovirus con patogenicidad e inmunogenicidad distintas. *Journal of Virology* 75, 3268–3276.

Bunschoten, H., Gore, M., Claassen, I. J. T. M., Uytdehaag, F. G. C. M., Dietzschold, B., Wunner, W. H. & Osterhaus, A. D. M. E. (1989). Caracterización de un nuevo epítipo neutralizante del virus que denota un determinante secuencial en la glicoproteína del virus de la rabia. *Journal of General Virology* 70, 291–298.

Champion, J. M., Kean, R. B., Rupprecht, C. E., Notkins, A. L., Koprowski, H., Dietzschold, B. & Hooper, D. C. (2000). El desarrollo de anticuerpos monoclonales neutralizantes de la rabia humana como sustituto de la globulina inmune humana agrupada en el tratamiento profiláctico de la exposición al virus de la rabia. *Journal of Immunological Methods* 231, 81–90.

Cliquet, F., Aubert, M. & Sagne, L. (1998). Desarrollo de una prueba de neutralización del virus de anticuerpos fluorescentes (FAVN) para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes de la rabia. *Journal of Immunological Methods* 212, 79–87.

Coll, J. M. (1995). La glicoproteína G de los rabdovirus. *Archives of Virology* 140, 827–851.

Coulon, P., Derbin, C., Kucera, P., Lafay, F., Prehaud, C. & Flamand, A. (1989). Invasión de los sistemas nerviosos periféricos de ratones adultos por la cepa CVS del virus de la rabia y su derivado avirulento AvO1. *Journal of Virology* 63, 3550–3554.

Coulon, P., Lafay, F. & Flamand, A. (1993). Antigenicidad del virus de la rabia: una descripción general. *Onderstepoort Journal of Veterinary Virology* 60, 271–275.

Dietzschold, B., Wiktor, T. J., Macfarlan, R. & Varrichio, A. (1982). Estructura antigénica de la glicoproteína del virus de la rabia: ordenación e immuno-caracterización immuno- lógica de las grandes divisiones de fragmentos CNBr. *Journal of Virology* 44, 595–602.

Dietzschold, B., Wunner, W. H., Tadeusz, J. W., Lopes, D., Lafon, M., Smith, C. L. & Koprowski, H. (1983). Caracterización de un determinante antigénico de la glicoproteína de la rabia que se correlaciona con la patogenicidad del virus de la

rabia. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 80, 70–74.

Dietzschold, B., Gore, M., Marchadier, D., Niu, H. S., Bunschoten, H. M., Otvos, L. Jr, Wunner, W. H., Ertl, H. C. J., Osterhaus, A. D. M. E. & Koprowski, H. (1990). Caracterización estructural e inmunológica de un epítipo lineal neutralizador del virus de la glicoproteína del virus de la rabia y su posible uso en una vacuna sintética. *Journal of Virology* 64, 3804–3809.

Fooks, T., McElhinney, L. M., Brookes, S. M., Johnson, N., Keene, V., Parsons, G. & Soldan, A. (2002). Pruebas de anticuerpos contra la rabia y el programa de viajes para mascotas del Reino Unido. *Veterinary Record* 150, 428–430.

Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Tuffereau, C., Knossow, M. & Flamand, A. (1992). La glicoproteína del virus de la rabia es un trimer. *Virology* 184, 441–444.

Heaton, P. R., Johnstone, P., McElhinney, L. M., Cowley, R., O'Sullivan, E. & Whitby, J. E. (1997). Ensayo de PCR hemi-anidado para la detección de seis genotipos de virus relacionados con la rabia y la rabia. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2762–2766.

Hemachuda, T. & Phuapradit, P. (1997). La Rabia. *Current Opinion in Neurobiology* 10, 260–267.

Hooper, D. C., Morimoto, K., Bette, M., Weihem, E., Koprowski, H. & Dietzschold, B. (1998). Colaboración de anticuerpos e inflamación en el aclaramiento del virus de la rabia del sistema nervioso central. *Journal of Virology* 72, 3711–3719.

Lafay, F., Benmansour, A., Chebli, K. & Flamand, A. (1996). Epítipos inmunodominantes definidos por una biblioteca expresada por levaduras de fragmentos aleatorios del mapa de glicoproteína del virus de la rabia fuera de los principales sitios antigénicos. *Journal of General Virology* 77, 339–346.

Luo, T. R., Minamoto, N., Ito, H., Goto, H., Hiraga, S., Ito, N., Sugiyama, M. & Kinjo, T. (1997). Un epítipo neutralizante del virus en la glicoproteína del virus de la rabia que contiene Trp251 es un epítipo lineal. *Virus Research* 51, 35–41.

Ni, Y., Tominaga, Y., Honda, Y., Morimoto, K., Sakamoto, S. & Kawai, A. (1995). Mapeo y caracterización de un epítipo secuencial en la glicoproteína del virus de la rabia que es reconocido por un anticuerpo monoclonal neutralizante Rg719. *Microbiology and Immunology* 39, 693–702.

Prehaud, C., Coulon, P., Lafay, F., Thiers, C. & Flamand, A. (1988). Sitio antigénico II de glicoproteína del virus de la rabia: estructura y papel en la virulencia viral. *Journal of Virology* 62, 1–7.

Seif, I., Coulon, P., Rollin, P. E. & Flamand, A. (1985). Virulencia de la rabia: efecto sobre la patogenicidad y caracterización de secuencia de mutaciones del virus de la rabia que afectan al sitio antigénico III de la glicoproteína. *Journal of Virology* 53, 926–934.

Van der Heijden, R. W. J., Langedijk, J. P., Groen, J., UytdeHaag, F. G., Meloen, R. H. & Osterhaus, A. D. (1993). Estudios estructurales y funcionales en un sitio antigénico neutralizante lineal único (G5) de la glicoproteína del virus de la rabia. *Journal of General Virology* 74, 1539–1545.

Walker, P. J. & Kongsuwan, K. (1999). Modelo estructural deducido para glicoproteínas de rabdovirus animal. *Journal of General Virology* 80, 1211–1220.

Recibido el 24 de abril de 2002. Aceptado el 10 de julio de 2002.

