

NOTAS BREVES

BRIEF NOTES

El virus de la fiebre aftosa

Aphthous fever virus

RUIZ-BRAVO A.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

La fiebre aftosa o glosopeda es una infección causada por un virus; de hecho, fue, históricamente, el primer virus animal conocido: Friedrich Löffler y Paul Frosch (discípulos de Robert Koch) lo descubrieron en 1898, cuando observaron que el agente causal de la enfermedad denominada «hoof-and-mouth disease» (enfermedad de pezuñas y boca) era capaz de atravesar filtros que retenían bacterias y resultaba imposible observarlo al microscopio (Flint et al., 2000). Actualmente, es un miembro bien conocido de la familia *Picornaviridae*, que comprende virus muy pequeños cuyo genoma consiste en una molécula de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario. Estos virus figuran entre los denominados «desnudos», porque carecen de envoltura lipídica; las partículas virales infecciosas o viriones consisten en una estructura proteica de aspecto esférico (simetría icosaédrica), que se denomina cápsida, dentro de la cual se encuentra la molécula de ARN viral. Dentro de esta familia hay varios virus importantes por las enfermedades que causan en el ser humano, como es el caso del género *Enterovirus*, que incluye al agente causal de la poliomielitis y a los virus coxsackie y echo; y del género *Rhinovirus*, al que pertenecen virus productores de resfriados (catarro común). El que nos ocupa pertenece al género *Aphthovirus*, aunque se le conoce también por las siglas FMDV, iniciales de la versión inglesa del término «virus de la glosopeda» («foot-and-mouth disease virus»). Su genoma (la molécula de ARN) fué secuenciado hace ya algún tiempo (Carroll et al., 1984): con un peso molecular de 2.93×10^6 , contiene 8450 bases y codifica una única proteína de 2332 aminoácidos, a la que se llama «poliproteína», porque realmente es precursora de

Aphthous fever or foot and mouth disease is an infection caused by a virus; in fact, it was historically, the first animal virus known: Friedrich Löffler and Paul Frosch (disciples of Robert Koch), made their discover in 1898 when they observed that the causal agent for the so called hoof-and-mouth disease was capable of passing through filters which retained bacteria and that it was impossible to see it through the microscope (Flint et al., 2000). Today, it is a well known member of the *Picornaviridae* family, which includes very small viruses and whose genome consists of a single-stranded ribonucleic acid (RNA) molecule. These viruses are among those known as naked because they lack a lipidic envelope; the infectious viral particles, or virions, consist of a proteic structure of icosahedral symmetry called capsid, inside of which we find the RNA viral molecule. In this family there are various viruses of importance due to the illnesses they inflict upon humans as it is in the case of the *Enteroviruses* genus, which includes the poliomyelitis causal agent and the coxsackie and echo viruses; and also of the *Rhinovirus* genus to which some of the common cold viruses pertain. The one that concerns us belongs to the *Aphthovirus* genus, although it is also known by the FMDV acronym, which are the initials for foot-and-mouth disease virus. Its genome (RNA molecule) was sequenced some time ago (Carroll et al., 1984): its molecular weight is 2.93×10^6 , and it contains 8,450 bases coding one protein only of 2,332 aminoacids known as a “polyprotein” since it is the forerunner of a series of minor proteins which split off by breakages and are catalyzed by subunits or parts of the same polyprotein with proteolytic activity (pro-

una serie de proteínas menores, que se escinden de ella por roturas catalizadas por subunidades o partes de la propia poliproteína con actividad proteolítica (proteasas). Las proteínas resultantes de la rotura incluyen las componentes de la cápsida (proteínas estructurales), las necesarias para la replicación del ARN viral dentro de la célula infectada y las mencionadas proteasas. Una de estas proteasas es responsable de la destrucción de una proteína de las células infectadas, conocida por las siglas eIF4G, que es necesaria para la síntesis de proteínas celulares en los polirribosomas (Flint et al., 2000); de forma que, en las células infectadas por el virus, se detiene la producción de proteínas propias y toda la maquinaria sintética de la célula se dedica a fabricar únicamente proteínas virales, lo que, junto con otras causas, determina graves anomalías observables microscópicamente (efectos citopáticos) y, finalmente, la muerte celular (Rueckert, 1996).

La fiebre aftosa es, desde el punto de vista económico, la infección más importante que afecta al ganado en todo el mundo. El virus infecta a bóvidos, cabras, cerdos y ovejas, aunque el total de especies animales susceptibles llega a 70 (la lista incluye bóvidos como búfalos, cebúes y yacks; antílopes y gacelas, e incluso elefantes). La infección del ser humano es rara, pero no puede excluirse. Hay varias vías de contagio: los aerosoles formados por las secreciones respiratorias pueden transmitir al virus, incluso a gran distancia, sobre todo en climas húmedos; además, puede transmitirse por vía oral y por contacto, a través de las células epiteliales. La aspiración del virus determina la infección de la mucosa del tracto respiratorio, a partir de la cual se disemina por todo el organismo. El periodo de incubación viene influido por los factores típicos, como la cepa del virus y la dosis de viriones transmitidos, pero, por término medio, dura entre 2 y 14 días. La sintomatología clásica suele iniciarse con pérdida de apetito y una drástica disminución de la producción de leche en vacas, cabras y ovejas. Prosigue con aumento de la salivación y formación de vesículas en la orofaringe (lengua, paladar), que pueden extenderse a los labios y el hocico de los animales infectados, así como en las áreas interdigitales de las pezuñas, donde causan dolor, por lo que los animales son reacios a levantarse y andar; las células epiteliales que forman las vesículas se necrotizan, apareciendo

teases). The proteins resulting from this breakage includes the capsid components (structural proteins), those necessary for RNA virus replication inside the infected cell and the aforementioned proteases. One of these proteases is the one responsible for the destruction of a protein in the infected cells known by the initials F4G which is necessary for the synthesis of cellular proteins in the polyribosomes (Flint et al., 2000); so that in the cells infected by the virus, its own proteins production is stopped and all of the synthetic machinery of the cell is aimed towards the manufacture of the viral proteins only, which among other effects determines severe anomalies microscopically observable (cytopathic effects), and finally it results in cell death (Rueckert, 1996).

From the economical point of view aphthosa fever is the most important worldwide livestock infection. Cattle, goats, pigs and sheep are infected by the virus, although the totality of animals susceptible to be infected reaches 70 in number (the list includes such bovines as buffalo, zebu, yak, antelopes, gazelle and even elephants). Infection in humans is rare but it cannot be excluded. The contagion routes are various; aerosol formed by breathing excretions can transmit the virus, even to great distances, specially in humid climates, furthermore, it can be transmitted through the epithelial cells by direct contact and orally. The intake by aspiration of the virus determines the infection in the respiratory tract mucosa, from where it spreads to the whole body. The incubation period is influenced by such typical factors as virus strain and virions dose transmitted, but on the whole, it lasts between 2 and 14 days. Traditional symptoms usually starts with appetite loss and a drastic milk production reduction in cows, goats and sheeps. It continues with a salivation increase and the formation of vesicles in the oropharynx (tongue, palate), which can spread to the lips and the snout of the infected animals as well as the interdigital areas of the hoofs on where it inflicts pain, thus making the animals reluctant to get up and walk; the epithelial cells forming the vesicle become necrotic and give way to erosions which occasionally are overinfected with bacteria. In severe cases, problems in the respiratory tract as well as in the myocardium have fatal consequences: Mortality rate in young animals is very high (it can reach 50% of the infected steers). An aspect of great impor-

erosiones que ocasionalmente pueden sobreinfectarse con bacterias. En los casos graves, la afectación de las vías respiratorias y del miocardio tiene consecuencias fatales; la mortalidad es alta en los animales jóvenes (puede alcanzar al 50% de las terneras infectadas). Un aspecto de gran importancia es que los animales infectados, tanto si desarrollan la enfermedad como si no (por estar inmunizados), son portadores potencialmente contagiosos y este estado se puede prolongar durante meses. Un trabajo reciente de Zhang y Kitching (2001), del Pirbright Laboratory (Institute for Animal Health, World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease, en Inglaterra), ha mostrado que el virus persiste en las células epiteliales del paladar y la faringe de los animales portadores.

Las desastrosas consecuencias económicas de la enfermedad ha impulsado la investigación sobre vacunas que puedan proteger al ganado. La vacuna inicial se preparaba con viriones enteros, procedentes de cultivos celulares, e inactivados con formol, que posteriormente fue desplazado por etilamina binaria, cuya cinética de inactivación es mucho más eficaz (de hecho, se han atribuido algunos brotes infecciosos al uso de la vacuna formolada). Sin embargo, las vacunaciones del ganado se dejaron de practicar, hace años, en base a varias consideraciones, más o menos discutibles: el elevado coste económico de las vacunaciones masivas, agravado por la necesidad de revacunar periódicamente (cada 6 a 9 meses) porque la inmunidad inducida es de corta duración; la fácil emergencia de cepas del virus con cambios en su estructura antigénica (consecuencia de la variabilidad genética), que puede anular, en el curso de un brote epidémico, la eficacia de una determinada vacuna; la dificultad para distinguir, mediante pruebas serológicas, entre la presencia de anticuerpos debidos a la vacunación (animales inmunizados) y los debidos a la respuesta frente al virión activo (animales infectados, en periodo de incubación); y la errónea suposición de que la ausencia de nuevos casos equivalía a la erradicación de la enfermedad. Desde hace años, se trabaja en el desarrollo de vacunas subunidad, que están constituidas por péptidos. La clave para conseguir la neutralización de virus reside en una de las proteínas de la cápsida, la que se une a los receptores de la superficie de las células susceptibles a la infección; los anticuerpos dirigidos contra la parte

tance, is that the infected animals, whether developing the illness or not (by having immunity), are potential contagious carriers, and this sort of situation can be prolonged during months. A recent work by Zhang and Kitching (2001), of Pirbright Laboratory (Institute for Animal Health, World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease, in England), has shown that the virus persists in the epithelial cells of the palate and pharynx of the carrier animals.

The disastrous economical consequences of this illness has prodded the investigation for vaccines that could provide protection for the livestock. The initial vaccine was prepared with whole virions coming from cellular cultures and who were inactivated by formol. Afterwards, formol was displaced by binary ethylamine, whose inactivation kinetic is much more efficient (in fact, some infectious outbreaks have been attributed to the use of formol inactivated vaccines). Nevertheless, livestock vaccination has been out of use for many years, and this came about since some more or less disputable considerations about the high costs of massive vaccinations were taken into account, and this was aggravated by the fact of having to perform periodical livestock vaccination (every 6 to 9 months), since induced vaccination is short lived; the easy exit of new strains of the virus with changes in its antigenic structure (a consequence of its genetic variability), which can annul during the course of an epidemic the efficiency of a determined vaccine; the difficulty to distinguish through serological tests the presence of antibodies due to vaccination (immune animals), and those antibodies given as an answer to the active virion (infected animals in incubation period); plus the erroneous supposition that the absence of new cases meant the eradication of the illness. Work has been done during many years for the development of subunit vaccines which are made up by peptides. The key to virus neutralization is in one of the capsids protein which unite to the surface receptors in the cells susceptible to infection.; the antibodies directed against the immunodominant part of this protein are capable of annulling the infectivity of the virion. But the administration of this peptide doesn't always induce a protective answer in the immunized animal. In various countries, including Spain, there are groups of investigators which have been studying these problems and trying to better the

inmuno-dominante de esta proteína son capaces de anular la infectividad del virión. Pero la administración de este péptido no siempre induce una respuesta protectora en el animal inmunizado. En diversos países, incluyendo España, hay grupos de investigadores que llevan años estudiando estos problemas y tratando de mejorar la vacuna. Los recientes trabajos del grupo dirigido por Sobrino en el CSIC han puesto de manifiesto que la inclusión, en la vacuna, de secuencias peptídicas reconocidas por los linfocitos Th, que cooperan con los linfocitos B para que estos produzcan anticuerpos, puede mejorar mucho la respuesta, incluso en animales previamente considerados como difíciles de inmunizar (Blanco et al., 2001).

Al elaborar vacunas frente a la fiebre aftosa, hay que tener presente que existen varios tipos de *Aphthovirus*, que, aunque causen la misma enfermedad, tienen entre sí diferencias antigénicas suficientes como para que la inmunidad frente a uno de ellos no proteja frente a otro. Clásicamente, se distinguen siete serotipos: A, C, O, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1. Para mayor dificultad, dentro de un mismo serotipo hay variantes (subtipos) con escasa protección cruzada; en 1994 se conocían, en total, al menos 53 subtipos (Rueckert, 1996). Esta variabilidad antigénica, ya mencionada, es típica de los virus con genoma de ARN (piénsese en los virus de la gripe y del SIDA), y supone una grave limitación para las vacunas, que deben incorporar los antígenos de las variantes más frecuentes en cada epidemia. A finales del pasado mes de Febrero, la revista *Vaccine* publicó un trabajo de Barnett et al. (2001), señalando que los antígenos de las cepas existentes en el International Vaccine Bank, del ya mencionado Institute for Animal Health, podrían permitir todavía el control del virus en los actuales focos infecciosos, a pesar de su evidente variabilidad. Se trata de las cepas Manisa y Lausanne, del serotipo O, que protegen frente a la mayoría de las variantes de este serotipo; A(22) Iraq 24/64 y A(15) Tailandia 1/60, que cubren las del serotipo A; Asia-1 India 8/79, para el serotipo Asia-1; y C(1) Oberbayern, representativo del serotipo C.

Es interesante reseñar que el virión es muy sensible al pH ácido (Rueckert, 1996) y a determinados agentes como hidróxido o carbonato sódicos, pero resiste a los compuestos de amonio cuaternario, yodóforos, hipoclorito y fenol.

vaccine. The recent works of a group lead by Sobrino in the CSIC, have shown that the immune answer can be bettered, even in animals previously considered hard to immunize (Blanco et al., 2001), by including peptidic sequences in the vaccine that are in turn recognized by the Th lymphocytes, who in cooperation with B lymphocytes, makes these last ones produce antibodies.

When preparing vaccines against aphthose fever we must keep in mind that there are various types of Aphthoviruses, which although cause the same illness, have among themselves the sufficient antigenic differences so as to make immunity against one of them non-protective against the other. Traditionally seven serotypes are distinguished: A, C, O, SAT-1, SAT-2, SAT-3 and Asia-1. To make it more difficult, inside one serotype there are variants (sub-types), with poor cross protection; in 1994 at least 53 sub-types were known (Rueckert, 1996). This aforementioned antigenic variability is typical of the viruses with a RNA genome (think in the influenza and AIDS viruses), and supposes a grave limitation for vaccines which must incorporate the antigens of the most frequent variants in each epidemic. At the end of last February, the journal *Vaccine* published a work by Barnett et al. (2001), pointing out that the antigens of the existing strains in the International Vaccine Bank in the already mentioned Institute for Animal Health, could still permit the control of the virus in the actual infectious focuses in spite of its evident variability. They are serotype O Manisa and Lausanne strains, which protect against the majority of the variants of this serotype; A(22) Iraq 24/64 and A (15) Thailand 1/60, which cover serotype A; Asia-1 India 8/79, for the Asia-1 serotype; and C(1) Oberbayern, representative of serotype C.

It is interesting to point out that the virion is very sensitive to an acid pH (Rueckert, 1996), and to determined agents, such as sodium carbonate or sodium hydroxide, but it is resistant to quaternary ammonium, iodophores, hypochlorite and phenol compounds. The appropriate measures, the disinfection and infection isolation should contribute to control the epidemic focus. Quick diagnosis and confirmation of suspicious cases is fundamental. The serological diagnosis is performed by automatic techniques such as the immunoassay in solid phase (ELISA). The virus can be isolated from the vesicles and from other

Las medidas apropiadas de desinfección y el aislamiento de los focos infecciosos deben contribuir a controlar la extensión de la epidemia. Es fundamental el rápido diagnóstico y confirmación de los casos sospechosos. El diagnóstico serológico se realiza por técnicas automatizables, como los inmunoensayos en fase sólida (ELISA). El virus puede aislarse de las vesículas y otras muestras, por cultivo sobre líneas celulares como BHK-21. En España, el Centro de Investigación de Sanidad Animal (CISA), perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología (INIA), posee la tecnología necesaria para realizar diagnósticos presuntivos en animales a partir del sexto día de infección y confirmarlos posteriormente.

La epidemia que actualmente se extiende por varios países europeos se inició, oficialmente, con el reconocimiento del primer foco en el Reino Unido, el 20 del pasado mes de febrero. Las medidas de aislamiento no han conseguido, por ahora, yugular la infección; el día 13 de marzo, las autoridades británicas declaraban un total de 196 focos. Cabe reseñar, por su importancia para nuestro país, que ese mismo día se reconoció el primer foco infeccioso en Francia (Mayenne). A título de ejemplo sobre las medidas a tomar en estos casos, cabe comentar que las autoridades francesas han establecido perímetros de protección de 3 Km y de vigilancia de 10 Km en torno a los focos detectados; las alemanas han ordenado el sacrificio de ovejas, cabras, ciervos, corzos y camélidos importados de Inglaterra. Mientras que la Unión Europea se limita a prohibir los intercambios de animales vivos y de carnes desde las zonas infectadas, otros países, como Italia o los Estados Unidos de Norteamérica amplían la restricción a la leche y productos derivados, si bien miembros del U.S. Agriculture Department han reconocido que la prohibición no debe afectar a yogures y quesos fabricados con leche pasteurizada, ya que el proceso de calentamiento destruye al virus. En España, el Ministerio de Agricultura ha publicado cuatro Ordenes sucesivas, con fechas de 28 de febrero (prohibiciones cautelares de concentraciones y movimiento de ganado), 2 de marzo (medidas en referencia al Reino Unido), 8 de marzo (recogiendo las medidas de la Comunidad Europea respecto del Reino Unido) y 13 de marzo (medidas a nivel comunitario respecto de Francia).

samples by performing a culture over cell lines like BHK21. In Spain, the "Centro de Investigación de Sanidad Animal" (CISA [Animal Health Investigation Centre]), which belongs to the "Instituto Nacional de Investigación y Tecnología" (INIA [National Institute of Investigation and Technology]), has the necessary technology to carry out the presumptive diagnosis in animals from the sixth day of infection onwards and for its confirmation afterwards.

The epidemic which is extending through the various European countries officially started last February 20 in the United Kingdom with the recognition of the first focus. The isolation measures have not been able to strangle the infection up to now; on March 13, the British authorities had declared a total of 196 focuses. It should be pointed out, due to the importance to our country, that on that same day, the first focus was recognized in France (Mayenne). As an example of the measures to be taken in these cases, it should be commented that the French authorities have established a protection perimeter of 3 Km., and a vigilance perimeter of 10 Km., around the detected focus; the Germans have ordered the sacrifice of sheep, goats, deer, roebucks and camel-dromedaries imported from England. While the European Union limits itself to prohibit the exchange of live animals and meat from the infected areas, other countries like Italy or the United States of America expand their restrictions to milk and derivatives, although members of the U.S. Agriculture Department have recognized that the prohibition should not affect yoghurts and cheese manufactured with pasteurized milk, since in the heating process the virus is destroyed. In Spain, the "Ministerio de Agricultura" (Agriculture Ministry), has published four successive Orders with the following dates: February 28 (prohibition of concentration and movement of livestock), March 2 (measures in reference to the United Kingdom), March 8 (which takes up the measures of the European Community in regards to the United Kingdom), and that one of March 13 (community measures in regards to France).

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Barnett P.V., Samuel A.R. y Statham R.J. (2001). The suitability of the 'emergency' foot-and-mouth disease antigens held by the International Vaccine Bank within a global context. *Vaccine*, 19: 2107-2117.
- Blanco E., Garcia-Briones M., Sanz-Parra A., Gomes P., De Oliveira E., Valero M.L., Andreu D., Ley V. y Sobrino F. (2001). Identification of t-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 75: 3164-3174.
- Carroll, A.R., Rowlands, D.J. y Clarke, B.E. (1984). The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation products of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acid Res.*, 12: 2461-2472.
- Flint S.J., Enquist L.W., Krug R.M., Racaniello V.R. y Skalka A.M. (2000). Principles of virology. ASM Press, Washington.
- Rueckert R.R. (1996). *Picornaviridae: the viruses and their replication*. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley, P.M. (eds.), *Fundamental virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 477-522.
- Zhang Z.D. y Kitching R.P. (2001). The localization of persistent foot and mouth disease virus in the epithelial cells of the soft palate and pharynx. *J. Comp. Pathol.*, 124: 89-94.