

DOI: 10.13376/j.cblls/2016040

文章编号: 1004-0374(2016)03-0311-14



刘湘涛, 博士, 博士生导师, 中国农业科学院兰州兽医研究所研究员, 主要从事口蹄疫流行病学研究。他是 OIE/ 中国国家口蹄疫参考实验室主任, OIE 口蹄疫专家, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室副主任; 国家兽药审评专家, 国家动物疫病防治专家委员会委员, 国家动物卫生风险评估专家委员会委员, 中国畜牧兽医学会口蹄疫学分会副理事长; 中国农业科学院首批优秀创新团队——口蹄疫流行病学创新团队首席专家。主持和参加国家“973”、“863”及省部级科研课题 15 项, 以第一作者或通讯作者发表研究论文 125 篇, 其中 SCI 论文 40 余篇, 相关研究工作发表在 *J Virol*、*JGV*、*Virus Res*、*JPR* 等刊物。主编出版专著 2 部, 参编 5 部; 获得新兽药 5 项; 主持制修订国家和农业行业标准 3 项; 申报发明专利 16 项 (获得 9 项, 公开 7 项)。参加《国家动物疫病中长期防治规划》、《口蹄疫防治计划》、《国家动物疫病免疫方案》、《国家动物疫病监测方案》、《国家无疫区建设标准》等重要文件的起草和修订工作。

口蹄疫病毒遗传进化研究进展

郑海学, 刘湘涛*

(中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, OIE/国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046)

摘要: 口蹄疫病毒以“准种”状态生存和演变, 具有群体庞大、复制突变率高、繁殖周期短等特征, 是研究物种进化的最好模型之一。利用突变、遗传漂移、重组和基因迁移等多种机制以及在环境压力的作用下, 口蹄疫病毒不断发生适应性进化, 种群衍变分化导致其宿主嗜性、毒力、抗原性等表型出现差异, 形成了具有明显区域特征的变异株系, 展现出丰富的遗传多样性。现对口蹄疫病毒进化的源动力、进化方式及其结果进行综述, 并对进化所产生的生物学效应进行介绍。

关键词: 口蹄疫病毒; 准种; 遗传变异; 进化

中图分类号: Q939.47; S851.3; S852.659.6 **文献标志码:** A

Advances on evolution of foot-and-mouth disease virus

ZHENG Hai-Xue, LIU Xiang-Tao*

(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, OIE/National Food and Mouth Disease Reference Laboratory
Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The understanding of foot-and-mouth disease virus (FMDV) evolution has been marked by the recognition of high mutation rates, large population, and short life cycles that make the virus becoming one of the best models for studying evolution. FMDV applies different kinds of mechanisms such as mutation, genetic drift, shift, recombination and selective pressure from environment to adapt to evolution. The dynamic changes of virus

收稿日期: 2015-09-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302118, U1501213, 31572542, 31402179, 31502042, 31500617); 科技支撑课题(2015BAD12B04); 甘肃省杰出青年项目(145RJDA328); 甘肃省科技重大专项项目(1302NKDA027); 948项目(2015-Z6)

*通信作者: E-mail: liuxiangtao@caas.cn; Tel: 0931-8342710

lead to various strains among regions which have significant differences in host tropism, viral virulence and their antigens. These characteristics all contribute to abundant FMDV genetic diversity. Here, we summarize the driving forces, mechanisms and results of FMDV evolution, especially its biological effects on hosts.

Key words: foot-and-mouth disease virus; quasispecies; genetic variation; evolution

口蹄疫病毒(foot-and-mouth-disease virus, FMDV)属于小RNA病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(*Aphthovirus*),可引起猪牛羊等多种偶蹄家畜和野生动物发生严重疾病。由于口蹄疫对畜牧业危害巨大,能够造成严重的经济和社会问题^[1-2],被世界动物卫生组织(OIE)列为法定报告病种,我国定为一类动物疫病。

FMDV是人类最早确认的一种动物病毒(1897年, Loeffler和Frosch),具有群体庞大、复制突变率高、繁殖周期短等特征,被认为是研究物种进化的最好模型之一^[3-4]。FMDV以“准种(quasispecies)”状态生存和演变^[5],在突变(mutation)、遗传漂移(genetic drift)、重组(recombination)和基因迁移(migration)等多种机制和环境压力作用下,不断进化,导致病毒适应性、种群大小和种群平衡、瓶颈事件等准种特性的变化,形成了具有明显区域特征的变异体(毒株),其宿主嗜性、毒力、抗原性等表型呈现差异^[6-9],充分展现了准种生物的遗传多样性(genetic heterogeneity)和生命活动内涵^[10-12]。

研究FMDV的主要目的是为了防治,同时也希冀借此探索原始生命的进化理论^[8]。进化和变异一直是病毒学研究的难点和热点, RNA病毒准种理论的阐述为该方向研究提供了新的思路。开展准种动力学研究,有助于破解FMDV进化机制,理解变异选择过程,预见适应性变异的发生,对发展控制理论具有重要指导意义^[10-11]。

1 FMDV进化的源动力——准种

FMDV的准种特性是维持其进化的源动力,表现为RNA复制时的高突变率,产生大量不确定但又密切相关,呈动态分布的突变和重组体。这些具有异质性的病毒类群在传播过程中为适应环境不断演化,形成变异株。

Bachrach^[13]早期研究了FMDV的表型差异,强调在FMDV复制过程中频繁出现重组和突变。他们发现FMDV粒子具有不同的特性,包括对热和酸的不稳定性,以及噬斑形态的差异。有些FMDV偶尔能导致病毒性心肌炎、神经病理或糖尿病等,而有些则不能^[14]。FMDV在体内可产生宿

主谱改变和毒力变化的FMDV突变株^[15]。FMDV的7个血清型(A、O、C、Asia 1、SAT1、SAT2和SAT3)鉴定以后,人们一直在探求其亚型的分类,这反映了普遍的观点,即病毒分类特征是由一个基因组的核苷酸序列及抗原特征来界定的。口蹄疫病毒、流感病毒及其他病毒具有周期性流行规律,这是由于突变积累的结果。符合“存在于自然界的相关毒株是可适应的,它们是从相对漫长的进化过程中出现的,而不是从一个共同的祖先突变而来”^[16]。病毒适应性或潜在适应性以不同形式不断显现,如新“型”、新“亚型”,都是准种群体的一部分,但对其精确分子特征描述是困难的^[17]。

不论FMDV的自然株还是一个单一的基因组的后代都具有遗传多样性(genetic heterogeneity),即便是来自同一个噬斑的病毒(约含有 $10^2\sim 10^5$ 个病毒粒子)也不完全相同。FMDV的遗传多样性不仅表现在同一次疫情不同动物个体分离的病毒^[10-12],而且在同一动物个体内分离的病毒基因组都有差异^[18],由此引导了FMDV准种群体结构的提出^[19]。对FMDV自然群体的差异性评估发现,不同次疫情的分离株约有50~100个基因差异位点,同次疫情分离株有2~20个差异位点,而单一株的克隆株差异平均为0.6~2个基因位点^[20-21]。FMDV准种证据的描述直接来自噬菌体Qb早期设计的灵感,通过实验表明,无论是致细胞病变的感染^[22],还是形成细胞持续感染^[23],单一感染性的FMDV基因组都会迅速进化为复杂的突变复合体。连续细胞培养病毒传至30代后,感染性病毒颗粒的量增加3万倍,遗传差异性估计达到每个基因有2~8个碱基替换^[22]。相对而言,来自一个克隆的大量群体传代,会导致群体内一致的核苷酸序列差异的变异,每个基因有14~57个核苷酸替换^[22]。这些早期的研究数据与最近比较整个病毒完整序列的数据是一致的,也和细胞培养中相同起源基因的克隆在长时间细胞毒传代和持续感染后比较的数据是一致的,如持续感染的细胞传代99和146代后每个基因有30和38个碱基突变^[24],致细胞毒性感染的FMDV 2个不同的克隆在大群体中传代200次后每个基因有31个突变^[25]。

FMDV RNA通过遗传重组促进准种进化^[26]。

基因重组在 FMDV 的进化过程中发挥着重要的作用, 主要发生在编码非结构蛋白的基因区段^[27-29]。非结构蛋白的改变可能会影响病毒的毒力^[30]。结构蛋白的进化中, 尤其是 VP1, 对于病毒吸附起主要作用, 有时致病毒感染力改变, 主要是通过基因漂移形成的^[6-8]。2005 年, 一个新型 A 型 FMDV 的亚型 A/IRN/2005 穿过伊朗, 向西蔓延到沙特阿拉伯、土耳其, 并在 2007 年到达约旦。2006 年, 这一亚型也在巴基斯坦发现^[30]。2012—2015 年, 该毒株进化成了 8 个亚谱系, 在该地区广泛蔓延和流行 (OIE, 2015)。这种特殊的 FMDV 亚型已被证明是高致死的, 能够造成各年龄段的牛的严重疾病 (EUFMD, 2007)。A/IRN/2005 谱系结构和非结构基因区域经历了两个不同的进化途径^[30]。结构基因区域进化的起点可能指向 A22 亚型谱系。可以设想, 由于 FMDV 准种结构和复制过程的易于错配, 在变化的环境中, 调整有利突变并导致新的 A/IRN/2005 谱系的发生。非结构基因区域的重组, 有可能改变病毒的毒力, 也可能参与了这一新谱系的形成。这一重组病毒可能是起源于 Asia 1 型和 A/IRN/2005 谱系前体共感染亚洲水牛造成的^[30]。另外一个例子是 2011 年发现的 PanAsia II 谱系毒株, 2011—2014 年迅速进化成 7 个亚谱系, 在伊朗、以色列、沙特阿拉伯、土耳其、阿富汗、阿联酋、利比亚和巴基斯坦等国家广泛流行。PanAsia II 毒株的进化似乎远离“老”泛亚 (PanAsia I) 毒株, 可能是导致 O1/Manisa 疫苗免疫效果降低的原因。这就是抗原转移 (antigenic shift) 的结果, 是由遗传重组或基因重排所导致的^[31]。当病毒发生抗原转移后, 会导致难以控制的新疫情^[32]。上述结果表明, FMDV 进化出不同的准种群体和表现出不同的生物动力学效应。

2 FMDV 的进化及其结果

对于物种而言, 进化的结果将是适应、退化甚至灭绝。对于 FMDV, 在自然传播或特定选择压力下发生适应性进化, 导致变异体 (株) 的出现, 变异产生表型差异, 主要表现在抗原性、群体大小、宿主嗜性和毒力等方面。

2.1 FMDV 的自然进化

FMDV 的自然进化是指其在自然传播过程中所发生的突变与选择, 这种突变在病毒感染动物开始复制时就已发生, 也是迈向自然多样性进程的第一步。病毒核苷酸序列深度测序和比较技术为研究病

毒突变提供了有效手段, 该方法不仅能够精确分析核苷酸和氨基酸序列差异, 而且能够明确毒株间的遗传衍化关系, 进而按病毒的流行区域划分遗传拓扑型, 建立以序列比对为基础的疫情追踪溯源方法^[33]。

研究表明, 在同一次疫情中 (C 型 FMDV), 假设流行起源是从最近的共同祖先衍生而来, 计算出它的进化率为 $4 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-2}$ (每个核苷酸·每年置换数)^[34]。另据对世界许多地区由已鉴定的某毒株传入而引起疫病爆发的 A、O、C 型病毒序列的比较分析, 估计 VP1 编码区段的进化率约为 10^{-2} (每个核苷酸·每年置换数)^[35]。这些数值比其感染细胞的进化率高约 $10^4 \sim 10^7$ 倍。需要强调的是, FMDV 进化率的变化取决于所研究病毒的基因 (或基因片段) 和被比较的各病毒分离物之间跨越的时间^[34]。在短时期内, 可观察到疫病流行的病毒进化率是恒定的, 这种恒定归因于随机采集的来自各感染动物所形成的准种突变样品^[36]。在较长时期内, 病毒进化率不一定恒定, 产生不一样的种群, 因对宿主感染性差异导致种群失衡, 其基因组序列也因突变而不一致^[37]。

RNA 病毒的最高进化率是 7.4×10^{-2} (每个核苷酸·每年置换数), 是 FMDV 克隆株在实验性感染牛时建立的持续感染期间观察到的, 难以想象这种高变异率能够长期持续。对跨越 60 年时间的 C 型 FMDV 的抗原位点的氨基酸序列进化的比较, 揭示了某些位置的氨基酸的交错变化^[38]。这证明即使抗原位点表面的残基对于氨基酸置换的耐受性是有限的, FMDV 在自然界的连续进化与其抗原多样性不成正相关。

2.2 FMDV 的抗原变异

探讨 FMDV 遗传多样性 (genetic heterogeneity) 首先是定量抗原差异, 鉴定宿主免疫反应中的病毒逃逸, 尤其是针对感染病毒抗体的中和作用逃逸株。抗原是宿主免疫系统识别和诱导抗体清除病毒感染的靶标, 对于病毒生存和宿主抗病毒感染具有重要意义。

FMDV 的 5 个主要的抗原位点已经被鉴定, 每种抗原位点上一个或几个外部衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3^[38-46]。FMDV 一个主要的抗原位点是线性抗原位点, 位于 VP1 的 G-H 环内, 与受体识别位点 RGD 模域重叠, 是口蹄疫合成疫苗的候选抗原序列。虽然口蹄疫合成疫苗已取得一定的进展, 但从准种理论的角度, 合成疫苗效力无法克服的缺点是因为 FMDV 具有病毒群体多样性、病毒抗原的多样性和

抗原变异主序列的不可预测性,而合成肽疫苗只能针对有限的病毒抗原位点。即便合成肽疫苗产生的抗体能够限制对应位点的病毒,但在群体中,位点不同的病毒可以逃避免疫并迅速成为优势群体,由此合成肽疫苗反而有可能加速FMDV的选择(定向)进化,加速病毒变异株的出现,这将增加口蹄疫防治的复杂化^[47-48]。FMDV抗原位点的快速进化在自然界中或在细胞培养中的模仿试验,也是揭示了RNA病毒进化机制的一个方面。

在自然进化中, RNA病毒的进化率是按不同时间分离的病毒的核苷酸突变数量来衡量的,其范围是每年每个核苷酸变异率为 $10^{-4} \sim 10^{-1}$,变异率因时间间隔和基因区域不同呈现差异^[49]。用克隆的FMDV感染牛,形成持续感染牛实验,其进化率高达每年替换 10^{-2} 个核苷酸,主要发生在VP1抗原位点,导致单克隆抗体(mAb)中和活性改变^[50]。在疫情暴发过程中,病毒VP1、VP2和VP3编码区的变异率也能高达每年替换 10^{-2} 个核苷酸,影响甚至改变FMDV抗原位点^[34-36]。对RNA依赖的RNA聚合酶3D进行研究,发现3D编码区的进化率要比VP1编码区的低50%。在FMDV感染循环的初期,VP1和3D编码区的遗传差异性是非常相似的,从流行病学的角度考虑,它们都来自一个共同的祖先^[36]。3D基因区域的保守性并非是由于该基因低突变性,而是由于体内循环时基因组同义核苷酸序列在此区域的集中^[36]。

RNA病毒变异和进化受制于功能性制约(functional constraints),尽管具有高突变率,但在功能性制约的作用下病原体的生物学特性得以维持。根据这种观点可以推测,高进化率不可能长时间保持,因为病毒的遗传多样性最终必将向保持病毒本质和基本特性妥协。支持这一观点的试验是FMDV C型分子流行病学分析比较显示的结果,自然流行毒株具有共有序列,在其衣壳表面的可变位点以一种交换方式长期存在,被两个氨基酸中的一个占据超过了60年^[51]。有一些变异位点在抗原位点上,随着时间的推移,抗原变异性与有限的氨基酸组合交替突变相关^[51]。在BHK-21细胞系中进行CS8c1毒株传代,在VP1蛋白的B-C环上有两种氨基酸替换^[25],在一个低适应性FMDV克隆进行传代,致适应性增加的情况下,在VP1的G-H环和3D上也观察到两种氨基酸的替换^[52],这再次表明功能性制约维持了序列空间。特别重要的是,VP1的G-H环赖氨酸残基的缺失并伴随两个侧翼位点变异而获

得^[52]。这个G-H环的结构使得3个串联赖氨酸残基不太可能维持在这样的暴露位点。而对能够形成牛持续感染和不能形成牛持续感染的毒株进行序列分析表明,形成持续感染的毒株在VP2基因上有两个固定氨基酸突变^[53],这与FMDV功能维持与基因变异有何关系仍不清楚,需进一步证实。

功能性制约可能限制,但不会消除单个FMDV株或流行病学相关的FMDV株的广泛的差异性。比较来自同一次疫情的FMDV C1分离株(属于血清型C的欧洲亚型1拓扑型)的VP1编码区显示,这些分离株可分为两类,VP1有8个不同的共有序列,它们的VP1的G-H环有4个位点的差异^[54]。为了解决这些同期的病毒相关的生物学之间差异的问题,按照欧洲药典中描述,制备了这两种病毒的全病毒灭活疫苗。尽管在VP1的一些位点上有差异,但用这两个选择的病毒制备的疫苗在补体结合试验和血清中和试验中是无法区分的。然而,疫苗免疫应答能够对同源牛病毒完全保护,而对异源猪病毒只有部分保护^[54]。

以抗原单克隆抗体的反应性来定量抗原距离,FMDV C型有两种著名的抗原多样化机制^[55]。一个是由VP1 G-H环的高变区积累氨基酸替换导致抗原距离逐渐增加,第二个是由突发的抗原变化(如多表位的缺失)组成,或是由关键位置的替代所造成^[55]。抗原变异的渐进/突变模式与流感病毒的抗原迁移/抗原漂移相似,都是基于不同的分子基础。FMDV的抗原变异与发生在4个主要抗原区域的任何氨基酸替换有关,不仅仅只是VP1的G-H环上的位点变异决定^[56-57]。

另一个抗原多样性实验,用46个FMDV田间株分离株(为c1和c3亚型)的中和表位,以24个单克隆抗体来组合研究^[58]。这与Notkins等^[59]在观察柯萨奇病毒B4的抗原多样性的结果是一致的。值得关注的是,24个不同的抗原组合可以鉴定这些FMDV株中和性。而由10个非中和单克隆抗体识别的抗原决定簇在所有分离株中是保守的。FMDV亚型之间微妙的差异表明C3亚型中和表位是由C1亚型衣壳中一个单一的氨基酸替换导致的^[60]。这个例子也表明,很小的遗传变化尽管不会改变病毒所在的遗传位置,但可能改变病毒的生物学特性。抗原多样性经常能揭示出,自然分离的RNA病毒或它们的克隆易与小剂量的单克隆抗体反应。病毒的型和亚型只是病毒准种深层和基本现象的冰山一角。这种现象是突变产生、竞争和选择的连续型动

力学和一些随机事件的综合结果, 这又将病毒准种推向更加复杂、更加多元化^[25]。

2.2.1 无免疫压力的抗原变异

病毒在没有抗体的培养细胞中传代, 将会形成优势的抗原变异。有两种解释: (1) 在病毒的生命周期中, 抗原位点还具有其他潜在功能, 而抗原位点区氨基酸的替代能更好地发挥这些功能, 在培养细胞中的病毒可能受此正向选择的青睐, 抗原变异只是这种选择的次级效应; (2) 抗原位点处在病毒衣壳表面, 与涉及蛋白质/蛋白质相互作用衣壳的内部位点相比, 可能受到较少功能性制约^[61-62]。第二个机制是适用于任何高于平均突变容忍度的病毒基因组区域, 特别是作用于任何无关位点的正向选择可能会导致“搭便车”的突变而影响抗原位点, 又称为随机变化模式。这两个模式并非相互排斥, 目前的证据表明, 在没有免疫压力选择时, 这两个模式都参与了抗原变异^[63]。在 FMDV VP1 的 G-H 环上, 抗原位点 1 与整联蛋白受体识别位点 RGD 重叠^[64], 通过 FMDV 在培养细胞中的传代, 利用改变细胞受体分子来选择突变株, 该突变株可以不需要整联蛋白识别域而具有感染性, 无需 RGD 以及周围残基的毒株表现出功能性制约的明显缓和, 而抗原变异的可能性和通过第二机制途径预测的一样。几种缺失 RGD 基序的有感染性的 FMDV 显示了其抗原行为显著变化的特点^[49,65]。在没有抗体的情况下, 进行病毒细胞传代, 形成了优势基因, 在 VP1 的 G-H 环上显示出比其他抗原位点高 20 倍的突变频率^[66]。尽管有这种突变率的差异型, 利用免疫猪血清分离的抗体中和实验, 证明了在 VP1 的 G-H 环外侧含有抗原变异效应位点^[66]。因此, 氨基酸替换的耐受度将调节 FMDV 不同的衣壳位点抗原改变的程度, 不依赖抗体选择而产生。

结构性制约 (structural constraints) 因素可能限制抗原变异的另一个证据来源于 C 型 FMDV 抗原位点三维结构。表面残基可以进入抗体, 但在抗体逃逸突变体中, 表面残基并没有被替换, 这些表面残基经常参与蛋白质/蛋白质的相互作用, 而不是公认的替代导致与抗体不作用^[46]。在单克隆抗体筛选的逃逸突变株中, 病毒蛋白中的一个侧链是氢键的组氨酸残基被精氨酸取代, 这一变化模式表明氢键是保守的^[46]。另一种是非排外机制 (nonexclusive mechanism), 一些属于环的残基能与抗体相互作用, 但对抗原/抗体复合物的稳定性没有实质性贡献。利用抗体进行选择时, 在逃逸突变体中没有发现氨

基酸残基的替换。P1 前体特异位点的序列分析表明, 病毒逃逸突变株中没有替换, P1 前体分子能维持不连续的抗原位点 (空间依赖性抗原位点), 这对抗原/抗体复合物的稳定做出了重大贡献^[67]。

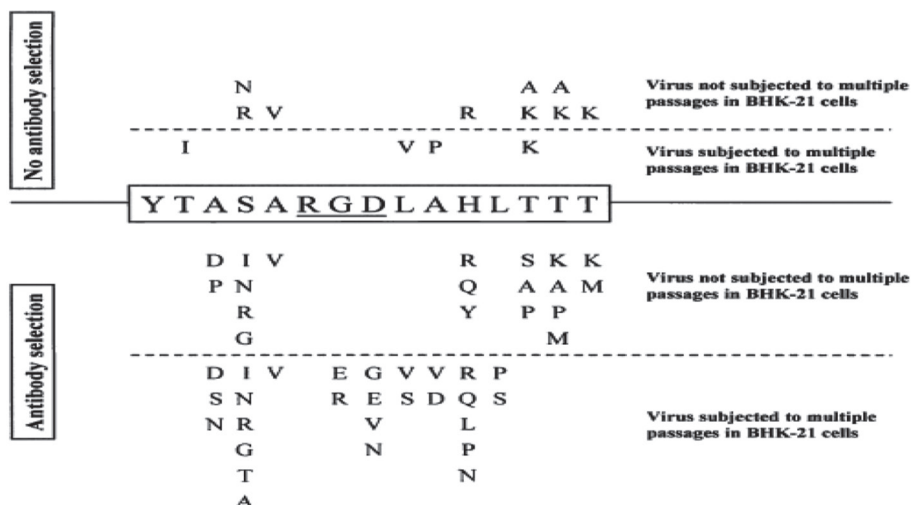
2.2.2 有免疫压力的抗原变异

在用抗体选择时, 抗体逃逸的突变毒株中, VP1 的 G-H 环的氨基酸替换出现在相同位置, 但无抗体选择时的突变的位置不同 (图 1)^[61]。这种差异表明, 替换 (或几个表位的缺失) 导致了抗原特异性的一个重要变化, 可能会作为抗体正向选择的一个优势结果出现。然而, 激烈的抗原变异是因为 RGD 序列下游相邻位置的两个氨基酸替换 (图 1), 这取决于没有抗体选择时, 大量的群体传代, 但并不取决于小量的群体传代^[68-69]。通过反向克隆分析显示, 具有活性的病毒有一个氨基酸替换, 而优势病毒包括两处替代。这个结果表明, 含有两处替换易于保持病毒适应性, 并且因为其较低频率的突变谱, 可维持连续感染性包含双突变的足够准种群。这种可能性不被结构模型支持^[69]。Pandey 等^[70]在体外利用 A 型毒株得到类似的结论, 也佐证了上述结论。因此, 尽管病毒进化可能被正向的达尔文选择或随机基因漂移所驱动, 而这两大机制可能有利于抗原修饰的不同进化结果。病毒群体大小也能影响可能成为优势的突变类型。

2.3 FMDV 的群体大小及其突变谱

感染动物中, FMDV 的群体大小直接由毒血症状态下组织和器官的易感性决定。估计每个动物含有 $10^9 \sim 10^{12}$ pfu, 而且这可能低估了 FMDV 在生理温度和适度 pH 值下的易变性, 以及体内复制的 FMDV 亚群在细胞培养中未产生感染能力的可能^[71]。病毒群体大小的影响与其他参数相关, 这也为病毒适应性赋予了相关的病毒准种动力学。如一个 10 kb 长度的病毒基因组群体 (FMDV 基因组约 8.3 kb) 有 3×10^4 个可能的单一突变, 低于许多病毒的群体大小。相比之下, 哺乳动物基因组单一突变的总数达 10^{10} , 高于哺乳动物物种的群体规模。

一个病毒复制群体的大小能影响病毒准种进化中随机漂移/正向选择的相对分布。用特定病毒系统, 如口蹄疫病毒、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒等, 病毒群体的适应性 (fitness) 变异可被定量, 这与一些普遍的病毒适应的群体效应结论一致^[72]。适应性是一个有机体对某一环境的适应能力。病毒适应性的定义是在特定的环境条件下产生后代的相对能力, 实验的程序是由 Holland 等^[73]发展起来的。



图中氨基酸序列对应于FMDV C-8c1衣壳蛋白VP1 G-H环136~159位置。其中的RGD下方划线显示。该序列包含属于抗原位点1的最少数量的残基，根据与合成肽mAb SD6的反应，和逃脱mAb突变的分析^[58]。在该序列中间是在未经或者经过在BHK细胞中多次继代的FMDV C-8c1中发现的，在无抗体存在的条件下复制病毒的全部置换氨基酸成分。在同一克隆或群体中，通常是单个置换，不常出现2处或更多处置换。在该序列下方，是在位点1的特异性多克隆或单克隆抗体存在下复制的FMDV C-8c1的全部置换成分。在同一克隆或群体中最经常的也是单个置换，少有2处或多处置换。注意到Y-136和R-141的严格保守性，和G-142、D-143的耐受性，仅在FMDV C-8c1经BHK细胞多次继代中接受突变。除在该图中认可的变异外(有或没有抗体选择，和适应BHK细胞的程度)，观察到的全部置换成分可能受病毒群体大小、被分析的克隆和群体总数的影响，如文中所述。

图1 FMDV一个抗原位点的变异模式^[61]

首次研究 FMDV 的适应性是测量了 BHK-21 传代细胞中的抗原变异株适应性增加，并发现适应性不涉及抗原修饰的复原^[55]。用多克隆抗体选择低适应性 FMDV，并能维持其内的抗原变异，同样指出这些 FMDV 在没有抗体时的进一步传代导致适应性增加。其他病毒遗传和一些表型标志，如人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 对抗病毒抑制剂的耐受性，这些生物学特征的适应性实验结果与 FMDV 是一致的^[74]。适应性增加是通过补偿性突变获得，而不是原始损伤的修复或复原，这构成了病毒隐藏于表型修饰的传播机制。这种机制最初不大可能发生在优势基因组中，因为它减少了适应性。

噬菌体 $\phi 6$ 和水泡性口炎病毒 (VSV) 的研究表明，相对大量的群体经过反复噬斑对噬斑的传代，会导致平均适应性的丧失^[75-76]。在噬斑对噬斑的传代过程中，病毒群体呈周期性的减少，因此，该病毒将承受一系列严重的群体瓶颈。与此相反，基于大群体传代的 VSV 的适应性指数上升^[77-78]。基因瓶颈大小的确立决定着适应性的增加或减少，这依赖于 VSV 群体的起始适应度 (较高的起始适应度，必须以不太明显的瓶颈维持其适应度)^[78]，这对了解 RNA 病毒的进化过程非常重要。当 VSV 达到相

对高的适应值时，即使在恒定的细胞培养环境下也发生随即发生的适应变异^[79]。当用传代群体瓶颈在大群体传代之间干预时，这个过程模仿了一些横向病毒的传播，两个大群体传代都无法克服由相关的单一瓶颈传代干预的适应性降低^[80]。VSV 的这些结果的强调了，当群体大小发生变化时，解释在应答选择性限制 (例如免疫应答和生理应答，以及一些抑制剂等) 时，病毒适应性变异的困难；在艾滋病病毒感染领域的也是类似的困难^[81]。

FMDV 群体大小对其适应性变异的效应结果与 VSV 中得出的结论是完全一致的^[52,82]。特别令人感兴趣的是，在反复噬斑 - 噬斑传代中，含有突变的 FMDV 基因组形式与大群体传代中相同病毒克隆的结果是不同的^[52,83]。绝大多数的氨基酸替代是发生在衣壳内部位点，与反复瓶颈相关，而与暴露于衣壳内部或外部表面的位点不相关，并且一些克隆在第二功能的蛋白质合成起始密码子 AUG 上游有 4 个腺苷酸残基的伸长，可以形成一个不寻常的内部 polyA 片段^[84]。这些准种动力学的观察意味着，与大群体传代过程相比，在噬斑 - 噬斑的传代中的负选择效应 (消除或保持低适应基因的低频率) 不是很强烈。对于大群体而言，存在较多的竞争和干扰：

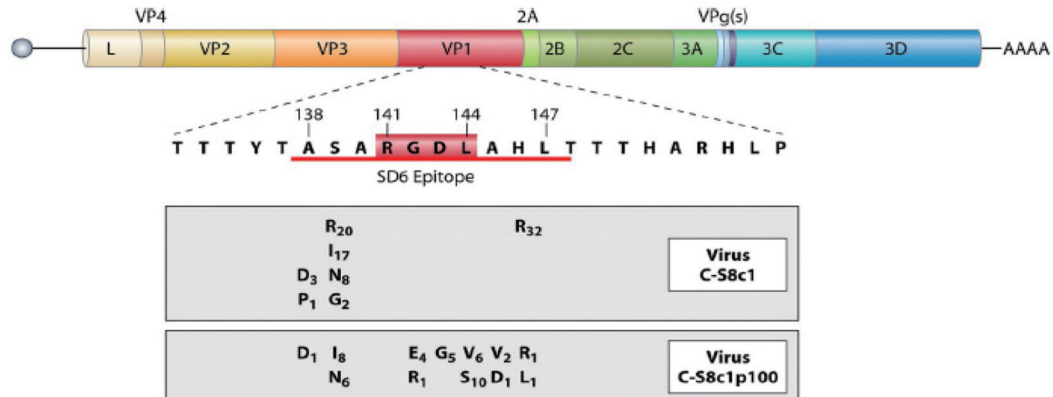


图2 用C-S8c1和C-S8c1 p100毒株获得RGD识别位点区突变模式图, 以及获得的mAb SD6逃逸突变株和C-S8c1抗原位点A突变的特征^[5]

多样的FMDV基因组和病毒颗粒在细胞内竞争、宿主结构和病毒复制所需因子的干扰、胞外竞争进入细胞和病毒颗粒稳定性等。有任何缺陷的基因组或病毒颗粒的稳定性或复制(尤其在细胞培养环境下)不适合病毒组装。事实上, FMDV低适应性克隆导致内部polyA片段的恢复和一系列分散在整个基因组上突变的获得^[52]。

在FMDV噬斑-噬斑筛选情况下, 分析同一斑中的不同病毒, 表明有关基因组核苷酸序列的基因组异质性和适应度^[83-84]。克隆的基因组核苷酸序列能延迟噬斑-噬斑传递, 揭示出FMDV和HIV-1病毒基因组和表型有不寻常的分布。HIV-1的gag基因的突变频率比env基因的高3倍^[85]。而比较大群体病毒的传代时, 发现了相反的结果。在FMDV突变体簇中, 这些基因位点通常非常保守, 可形成长期噬斑-噬斑的传递^[83]。这些不寻常的遗传多样性类型表明, 群体大小和复制动力学的修饰都可以深刻地改变病毒的进化过程和基因区域的恒定/变异过程。

2.4 FMDV宿主嗜性的变异

整联蛋白是FMDV一种主要的细胞受体分子^[86-88]。然而, FMDV在细胞培养传代中导致了受体路径的改变, 病毒可以用硫酸乙酰肝素(HS)作为替代性受体^[25,89-90]。100个FMDV克隆(C-S8c1)在BHK-21细胞中的大群体传代, 导致了培养细胞中宿主细胞嗜性扩大, 这种表型变异与衣壳表面6个氨基酸的替换相关^[25,49,91]。有些细胞系不能被亲本的克隆C-S8c1感染, 而能被传代的FMDV感染, 能够产生了接近正常病毒的复制能力。传代的FMDV获得了使用HS和第三种没有鉴定出来的进入途径的能力。当用肽阻止整联蛋白的识别时, 有

趣的是, 当HS结合作用减弱时, 这致使体外筛选的病毒突变株无法有效地利用HS, 病毒可以再次利用RGD依赖的途径进入细胞^[91]。Borca等^[92]进一步证实, VP3的第56组氨酸(H)变成精氨酸(R)的生物学特征以及对猪和牛致病性的变化表明, H56R突变获得了利用HS作为替代性受体的能力。56H毒株是热稳定的, 并能够对猪和牛产生典型的临床症状, 而56R热不稳定, 且对猪和牛没有产生临床症状。

因此, FMDV基因组中适度数量的突变, 可能允许其利用细胞受体替代进入细胞, 甚至进入同一个类型的细胞^[25,49,91]。使用替代受体后, RGD序列变得可有可无, 而一定数量的mAb逃逸突变株在RGD序列有氨基酸替换, 伴有剧烈的抗原变异^[65]。口蹄疫的这些结果加强了早期建立的人类流感病毒的进化概念, 即当表面氨基酸参与了细胞识别和抗体结合时, 将可能发生抗原性和宿主细胞嗜性的协同进化, 这也是病毒与宿主共进化的结果^[49,93]。

2.4.1 抗原位点变异与适应性增加

口蹄疫病毒主要的抗原位点和RGD重叠, 都处在G-H环内。用一个不相关的FLAG序列替代RGD周围残基, 包括RGD的8种氨基酸, 结果产生一个有活性的FMDV, 提供了替代的RGD序列试验, 使RGD可有可无^[49,93]。有活性的FMDV/FLAG嵌合毒株在BHK-21细胞的传代, 产生了一个复杂的突变谱。在这个突变谱中, 氨基酸替代发生在FMDV的其它抗原位点, 呈现出高频率性。有趣的是, 加入亲本FMDV/FLAG嵌合毒株的对应替代的毒株, 导致适应性增加, 提出了O型FMDV抗原变异的新机制, 而且也强调了突变群体谱系增

加有利于病毒群体适应性提升^[49,93]。

2.4.2 FMDV的体内适应性、毒力和宿主范围的变化

通过猪接种了一个C型FMDV的克隆(C-S8c1)导致了病毒群体异质性的恢复。用单克隆抗体从病毒感染C-S8c1的动物群体病料中,直接选择出单克隆抗体抗性突变株(monoclonal antibody resistant mutants, MARM)^[94]。分离率大约是 10^{-5} ,VP1基因具有氨基酸替换,这使得MARM的表型与来自细胞培养的CS8c1中的MARM相似^[82]。这与细胞培养中实验结果一致,体内分离出的MARM当与猪的亲本病毒共感染时,显示出选择的劣势^[94]。

感染猪的病毒的多样性也表明,在早期(感染后1 d)收集的血液样品中分离到了一个突变体,它含有VP1蛋白的氨基酸替换^[94]。这些突变体在血液样本中的比例很低,并没有成为受感染的动物的优势。然而,当用突变体接种猪时,产生了比FMDV C-S8c1更早出现的临床症状。有趣的是,该突变株的适应性与亲本C-S8c1相似,而且这两种病毒在共感染猪里发生了相当水平的病变^[95]。这些早期的突变株在动物内缺少优势,是因为突变体在群体中占有少数,即使它们表现出较高的适应性,也被平均的准种抑制。这与de la Torre等^[96]首次在体内其他情况下观察到的结果一致。

通过分析多肽免疫牛的病毒毒力实验,可以理解自然宿主中的FMDV准种动力学的时空复杂性^[97]。在单一病灶中,大约有40%的VP1的共有基因序列显示出单个的氨基酸替换,替换了VP1 G-H环的3个碱基。带有这些替代碱基的FMDV改变了抗原特性,该毒株很难用分离到的动物血清中和,这表明它们在肽接种疫苗的动物中,是通过多肽免疫反应引起的局部选择的结果^[98]。在6个动物中有3个分离出免疫逃逸突变株,并在这3个动物上发生症状,占优势群体的毒株与逃逸突变株以不同比例并存。此外,病毒VP1的G-H环的替换影响了细胞的整联蛋白和病毒的相互作用。这些细胞受体的修饰是否是使用免疫力实施的正向选择的旁位效应,它赋予了宿主牛复制的选择优势,仍有待确定。

FMDV呈现出广泛的宿主,能够感染大多数的偶蹄动物并导致临床症状,其中包括病毒血症、发烧和出现病变(水泡发生在口腔、舌头和蹄部为主)。针对不同的口蹄疫宿主(牛、猪、羊、山羊),症状的严重程度可能会有所不同,这依赖于物种和感染的病毒株。没有临床症状并不意味着缺乏FMDV复制和繁殖。例如,成年鼠在病毒血症阶段不产生

病变或发烧,但可从血液循环中分离到病毒^[95]。仍然有许多关于病毒毒力和宿主范围决定因素需要了解。现有资料表明,RGD序列三联体与整联蛋白家族分子的相互作用,对病毒的自然宿主产生临床症状是非常重要的^[99]。然而,整联蛋白在不同组织中表达的差异,影响FMDV的感染力差异,强调受体识别是细胞嗜性的决定因素之一^[93]。

近年来,非结构蛋白对FMDV毒力和宿主嗜性的影响已取得研究证据。非结构蛋白3A的缺失与牛FMDVO和C血清型减毒有关,序列缺失情况与在鸡胚胎中传代的结果类似^[100]。1997年从台湾分离到的毒株含有10个氨基酸的缺失,与发生在鸡胚胎中的缺失传代重叠,与3A不同的点突变一起,有利于变异的O型FMDV对牛的低致病性^[15]。在过去29年,3A的改变导致病毒循环中突变体在这一地区的积累^[101]。有趣的是,这种病毒对猪显示高的毒力,说明物种特异性往往与FMDV毒力相关,宿主和病毒复杂的相互作用决定了病变和临床症状的出现。在脊髓灰质炎病毒中,3A参与了病毒特异性RNA的合成^[102],但3A介导的FMDV毒力改变的生化基础和宿主调控机制仍然不得而知。

对FMDV适应豚鼠的分子基础的分析发现,这种传统的动物模型不仅可以用于研究免疫反应和疫苗的免疫效果,还为3A蛋白在FMDV的宿主范围的作用提供了证据。通过C-S8c1病毒在啮齿动物中的传代和筛选,选择的病毒获得了产生发烧和病变的能力。从病料中恢复出病毒,揭示了在适应过程中蛋白质2C、3A和VP1发生了固定的氨基酸序列替代。利用反向遗传技术构建嵌合病毒表明,3A单一的氨基酸替换(Q44-R)就足够FMDV对豚鼠产生病变^[103]。有趣的是,替换VP1基因L147-P,在适应过程中却成为优势,都改变了抗原的特性和与细胞整联蛋白相互作用的能力^[49,93]。

利用致死性突变也是抗病毒的一种策略。Agudo等^[104]通过利用基因诱变剂病毒唑(ribavirin)来进行抗FMDV研究,发现在RNA依赖的RNA聚合酶中含有3个氨基酸替换(M296I、P44S和P169S),这些突变株是对病毒唑的一种适应性突变。Zeng等^[105]也利用基因诱变剂病毒唑来加压筛选,鉴定出3D含有4个位点替换(D5N、A38V、M194I和M296V),并用反向遗传证实了含有D5N和A38V变异位点的毒株具有毒力减弱的特征,证明了准种多样性和限制准种多样性是与病毒致弱相关的,可以作为一种致弱策略。这些数据也表明,口蹄疫病毒进化和变异

获得新的适应性是其难以防控和限制的主要内因。

FMDV 出现了与其他小 RNA 病毒一些相似的细胞和宿主嗜性, 就是 FMDV 准种与不同的宿主相互作用的结果, 导致优势病毒亚群复杂的动力学, 这是由不同的选择压力驱动的。其中, 需要细胞受体在不同的靶组织中起始感染, 需要最低程度的病毒复制, 以及逃避宿主的免疫反应, 已有越来越多的定量测定来支持这些分析。在选择压下涌现的突变体, 不仅会影响结构蛋白, 也影响非结构蛋白和 FMDV 基因组的调控区域。

2.5 持续感染的形成

持续感染 (persistent infection) 是指动物感染病毒后, 机体不能及时清除而保持无症状带毒状态。在带毒期间病毒持续感染动物可能间歇性向外界排出病毒, 感染周围易感动物。口蹄疫病毒的持续感染的界定是通常将感染病毒 28 d 或更长一段时间后, 仍能分离到活 FMDV 的动物称为 FMDV 带毒动物。持续感染形成的分子基础是 FMDV 准种和宿主选择和进化的结果。

Van Bekkum 等^[106]首次证实从口蹄疫感染的康夏牛咽喉黏液中可分离到感染性 FMDV。非洲水牛可带毒 5 年, 牛最长带毒可达 3.5 年, 绵羊和山羊也能持续带毒, 绵羊达 9 个月, 山羊达 4 个月^[107]。目前仍然没有查到猪持续感染的直接证据。Zhang 等^[53]在感染 28 d 后的猪的颈和下额的淋巴组织中检测到病毒核酸, 但在咽和软腭部位没有查到核酸, 仍不确定这些淋巴组织能否造成猪的持续感染。动物畜群中带毒动物的数量取决于畜种、感染次数和畜群的免疫状态 (免疫或非免疫)。Hedger 等^[108]和 Gurhan 等^[109]调查发现, 牛感染病毒后带毒比例为 68%, 非洲水牛为 70%、绵羊为 16.8%, 一般在 12 个月后带毒比例下降为 5%~12%。英国 Pirbright 研究所实验发现, 高滴度病毒感染免疫牛和非免疫牛, 各有 77% 和 78% 发展为带毒者。弱毒疫苗的使用也可造成 FMDV 持续感染, 如接种 O 型弱毒株 OMII 疫苗可造成 52% 的牛、12% 的羊带毒, 这可能是接种 FMD 弱毒疫苗的最大隐患。

但携带病毒动物在田间对病毒的散播的作用仍有争议。唯一的直接的证据是 19 世纪末 20 世纪初, 在津巴布韦 (Zimbabwe) 爆发 FMD 期间, 从非洲水牛到家牛的传播^[110]。迄今为止, 还没有实验室的证据来说明携带病毒的牛或羊能够将病毒传播给未感染的动物体上。然而, 在食道-咽部液体存在的活病毒使得此种传播成为可能, 除此, 在田间,

宿主动物体内病毒的长期持续感染和复制会导致基因的变异和进化, 从而可能会引起一种新病毒变异株的产生^[24,50]。而且, Bao 等^[111]鉴定了从牛 OP 分离毒株对猪和牛具有感染性和致病性, 这间接证明了持续感染病毒的感染风险。

病毒携带者状况的形成和维持机制不是很清楚, 因为暴露于病毒环境中的动物经过急性感染或免疫接种后, 都会发生持续感染。这似乎是动物的免疫状态可能会控制病毒复制的水平。Alexandersen 等^[112]对于在咽部持续感染的形成, 提出了两种机制。一种是 FMDV 能够感染免疫系统的细胞, 例如巨噬细胞, 或者其他的免疫系统保护特殊部位, 从而导致了免疫应答的逃避。Baxt 和 Mason^[113]在猪的外周血液巨噬细胞里检测到了病毒的复制, 并且发现了当这些细胞被 Fc 介导受体吸附呈现为一种免疫复合物时, 病毒仅仅能感染这类细胞。Pacheco 等^[114]检测了牛上呼吸道黏膜显著降低的一些细胞因子 (IP-10、IFN- β 、IL-12 和 IL-2) 的 mRNA 水平, 与持续感染部位相关。而且, 感染会中断且不能导致新的感染性病毒的产生。Rigden 等^[115]也发现了猪牙槽的巨噬细胞也不能支持病毒的复制; 然而, 在缺少特异抗体时, 病毒结合该巨噬细胞。而且, 病毒通过巨噬细胞的内化作用进入该细胞, 病毒能维持感染性至少 12 h。第二种机制提出, 通过宿主信号, 病毒利用宿主的应答来提供有利长时间持续感染的细胞内环境。

这两种进化机制的分子基础是由 FMDV 准种和宿主选择进化决定的。FMDV 具有准种特性, 即 FMDV 的基因组 RNA 没有单一明确的核酸序列, 而是呈现类群分布。FMDV 感染新宿主时, 就只是类群中一部分变异株生长并复制, 结果又产生了新的准种。如果病毒长期感染和传播, 就形成基因高度异质性的毒株群体。这种异质性基因型病毒复制可能引起病毒的持续性感染。从这个角度理解, 持续感染是 FMDV 群体经过宿主选择后, 形成的新的表型变异的群体; 也可以理解为 FMDV 经过宿主的选择压力, 变异成新表型的群体。

2.6 应对天然免疫应答

持续性感染形成的一个最主要的机制就是能够逃逸宿主的免疫应答。持续性感染的形成是许多病毒和宿主因子的共同调控的结果, 首先是抑制或突破天然免疫屏障。口蹄疫病毒感染宿主必须突破天然免疫系统才能够使得病毒在机体内大量复制、繁殖和传播, 为达到这一目的, 口蹄疫病毒进化出能

利用多种途径抗衡,甚至破坏宿主细胞天然免疫应答的机制。

口蹄疫病毒 L 蛋白为口蹄疫病毒的一个非结构蛋白,其在口蹄疫病毒发挥免疫抑制方面有着极为重要的作用。口蹄疫病毒感染宿主后,其病毒 RNA 编码表达出一个完整的多聚蛋白,其中编码的 3 种非结构蛋白 L^{pro}、2A 和 3C 均具有蛋白酶活性,能剪切多聚前体蛋白形成成熟蛋白^[116],同时也在拮抗宿主天然免疫反应过程中发挥着重要作用。L 蛋白具有类似木瓜蛋白酶的功能,其从多聚蛋白前体上进行自我切割裂解下来。然后,它可以通过切割宿主的翻译起始因子 eIF-4G,从而切断宿主依赖性帽子 mRNA 的翻译,间接促进病毒对宿主细胞内复制原料的摄取,加快病毒的复制^[117]。L 蛋白被认为是口蹄疫病毒拮抗宿主天然免疫反应最为重要的蛋白,因为其可以直接裂解多种天然免疫通路的节点分子而发挥免疫抑制作用^[117]。L 蛋白可以通过裂解 NF- κ B 蛋白而抑制由 NF- κ B 调控的相关细胞因子和趋化因子的表达,为病毒复制提供有利的复制和增殖条件与环境。L 蛋白同样可以通过裂解 IRF3 和 IRF7 而拮抗 I 型干扰素的表达^[118],进而极大地抑制宿主抗病毒蛋白的表达,促进病毒的复制。L 蛋白还被报道具有去泛素化酶的功能,它可以抑制 RIG-I、TBK1 等 I 型干扰素通路的重要节点分子,同样抑制 I 型干扰素的产生,从而发挥免疫抑制作用^[119]。L 蛋白被报道还可抑制抗病毒蛋白 RANTES 的表达,而发挥拮抗效应^[118]。而 L 基因缺失的口蹄疫病毒对宿主干扰素诱导水平、NF- κ B 的表达水平以及相关抗病毒蛋白的表达水平的抑制能力明显下降,病毒复制水平也显著降低。由此可见,L 蛋白通过多种途径发挥免疫抑制作用,有利于促进和保障口蹄疫病毒的快速复制。

3C 蛋白是口蹄疫病毒发挥免疫抑制作用的另外一个关键蛋白。3C 蛋白在结构上几乎与丝氨酸蛋白酶原体糜蛋白酶一致^[120]。3C 蛋白的主要功能是对病毒多聚前体蛋白进行剪切加工,形成成熟蛋白,而且其在感染的宿主细胞中可以发挥剪切宿主蛋白的功能,它可以切除组蛋白 H3 的 N 末端 20 个氨基酸,促进病毒复制。L 蛋白被报道可以剪切 eIF4G 阻断宿主细胞蛋白合成,但也有报道在口蹄疫病毒感染晚期,3C 蛋白能够剪切 eIF4G 和 eIF4A 发挥拮抗作用^[121]。3C 蛋白可以裂解 NF- κ B 调节蛋白 NEMO (nuclear transcription factor kappa B essential modulator),并抑制 NEMO 介导的 I 型干扰素产生,

从而发挥免疫抑制功能,促进病毒复制^[122];3C 蛋白还可以通过拮抗 JAK-STAT 通路发挥免疫抑制作用,其具体机制为 3C 蛋白通过蛋白酶体和 caspase 非依赖途径降低 KPNA1 蛋白的表达水平,由于 KPNA1 是 STAT1 的核定位信号受体,因此, KPNA1 的下降直接阻断了 STAT1/STAT2 的入核, STAT1/STAT2 的核定位被阻断后,直接导致了大量抗病毒蛋白因子表达的抑制,不能有效限制病毒复制^[123]。

除了 L 蛋白和 3C 蛋白,口蹄疫病毒 2C 蛋白也在免疫抑制方面发挥着拮抗作用,它可以抑制天然免疫到获得性免疫的过渡,并且可以与 beclin 蛋白结合,阻止溶酶体与自噬小泡的融合,使得病毒能够存活下来进行进一步的复制繁殖^[124]。口蹄疫病毒的多种蛋白都具有抑制天然免疫系统的作用,而且其抑制机制多种多样,许多机制至今还不是很清楚,有待于进一步深入研究。但病毒进化出抑制天然免疫应答的功能,是决定病毒是否能够有效感染和致病宿主的前提,也是获得性免疫和免疫逃逸的基础。而宿主天然免疫系统是保守的,对宿主清除病毒感染具有重要作用,但病毒仍然能够逃逸天然免疫系统的监视,抑制宿主免疫的进化机制仍然有待深入研究。

3 结语

FMDV 与其他 RNA 病毒相同,具有高突变率和准种动力学属性。病毒的分子变异和表型可塑性研究^[125-126]为我们描绘了该方向的前景。新一代测序技术的出现,使确认感染细胞和动物组织中的病毒突变更加容易,为进一步揭示 FMDV 生命活动本质提供了新方法,新的发现和新的研究成果指日可待。然而,需要面对的现实问题是,目前全球仍有多个区域因流行 FMD 而蒙受巨大损失,尤其是亚洲和非洲,即使引入欧美防控模式也难奏其效。频繁发生的局部流行毒株跨区域 (Pool) 传播,加剧了 FMDV 的变异,致使抗原差异加大、毒力增强、跨种间感染增多,形成老病未除新病又至的复杂局面,传统控制理论已不敷其用,需要另辟蹊径。开展 FMDV 生物学本质及其遗传变异规律的研究,深入探索病毒感染和病毒清除机制,将为全面创新 FMD 防控理论和技术打下坚实基础。

[参 考 文 献]

- [1] Thomson GR, Vosloo W, Bastos AD. Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res*, 2003, 91: 145-61

- [2] Grubman MJ, Baxt B. Foot and mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 465-193
- [3] Holmes EC. Viral evolution in the genomic age. *PLoS Biol*, 2007, 5: e278
- [4] Koonin EV, Dolja VV. Evolution of complexity in the viral world: the dawn of a new vision. *Virus Res*, 2006, 117: 1-4
- [5] Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76: 159-216
- [6] Domingo E, Escarmis C, Lazaro E, et al. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res*, 2005, 107: 129-39
- [7] Domingo E, Pariente N, Airaksinen A, et al. Foot-and-mouth disease virus evolution: exploring pathways towards virus extinction. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 288: 149-73
- [8] Domingo E, Escarmis C, Baranowski E, et al. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 2003, 91: 47-63
- [9] Monaghan P, Gold S, Simpson J, et al. The $\alpha(v)\beta 6$ integrin receptor for foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol*, 2005, 86: 2769-80
- [10] Domingo E. RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog Drug Res*, 1989, 33: 93-133
- [11] Crandall KA, Perez-Losada M, Christensen RG, et al. Phylogenomics and molecular evolution of polyomaviruses. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 577: 46-59
- [12] King W, Van Santen V, Kieff E. Epstein-Barr virus RNA. VI. Viral RNA in restringently and abortively infected Raji cells. *J Virol*, 1981, 38: 649-60
- [13] Bachrach HL. Large-scale cultivation of animal cells in roller bottles for production of decigram amounts of pure foot-and-mouth disease virus. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1968, 29: 73-9
- [14] Mateu MG, Martinez MA, Capucci L, et al. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol*, 1990, 1: 629-37
- [15] Beard CW, Mason PW. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, 74: 987-91
- [16] Luria AR. The localization of function in the brain. *Biol Psychiatry*, 1978, 13: 633-5
- [17] Domingo E, Mas A, Yuste E, et al. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Prog Drug Res*, 2001, 57: 77-115
- [18] Rowlands DJ, Clarke BE, Carroll AR, et al. Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1983, 306: 694-7
- [19] Domingo E, Davila M, Ortin J. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene*, 1983, 1: 333-46
- [20] Domingo E, Escarmis C, Martinez MA, et al. Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, 176: 33-47
- [21] Sobrino F, Saiz M, Jimenez-Clavero MA, et al. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res*, 2001, 32: 1-30
- [22] Sobrino F, Davila M, Ortin J, et al. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, 1983, 128: 310-8
- [23] de la Torre JC, Domingo E. Minimum number of cells required for reconstitution of a foot-and-mouth disease virus-carrier cell culture. *Microbiologia*, 1988, 4: 161-6
- [24] Toja M, Escarmis C, Domingo E. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res*, 1999, 64: 161-71
- [25] Baranowski E, Sevilla N, Verdaguer N, et al. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol*, 1998, 72: 6362-72
- [26] King AM, McCahon D, Saunders K, et al. Multiple sites of recombination within the RNA genome of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 1985, 3: 373-84
- [27] Haydon DT, Bastos AD, Awadalla P. Low linkage disequilibrium indicative of recombination in foot-and-mouth disease virus gene sequence alignments. *J Gen Virol*, 2004, 85: 1095-100
- [28] Haydon D, Lea S, Fry L, et al. Characterizing sequence variation in the VP1 capsid proteins of foot and mouth disease virus (serotype O) with respect to virion structure. *J Mol Evol*, 1998, 46: 465-75
- [29] Tosh C, Hemadri D, Sanyal A. Evidence of recombination in the capsid-coding region of type A foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2455-60
- [30] Klein J, Hussain M, Ahmad M, et al. Genetic characterisation of the recent foot-and-mouth disease virus subtype A/IRN/2005. *Virol J*, 2007, 4: 122
- [31] Klein J, Hussain M, Ahmad M, et al. Epidemiology of foot-and-mouth disease in Landhi Dairy Colony, Pakistan, the world largest Buffalo colony. *Virol J*, 2008, 5: 53
- [32] Jamal SM, Ferrari G, Ahmed S, et al. Genetic diversity of foot-and-mouth disease virus serotype O in Pakistan and Afghanistan, 1997-2009. *Infect Genet Evol*, 2011, 11: 1229-38
- [33] Samuel AR, Knowles NJ, Mackay DK. Genetic analysis of type O viruses responsible for epidemics of foot-and-mouth disease in North Africa. *Epidemiol Infect*, 1999, 122: 529-38
- [34] Sobrino F, Palma EL, Beck E, et al. Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variations. *Gene*, 1986, 50: 149-59
- [35] Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 2003, 91: 65-80
- [36] Villaverde A, Martinez-Salas E, Domingo E. 3D gene of foot-and-mouth disease virus. Conservation by convergence of average sequences. *J Mol Biol*, 1988, 204: 771-6
- [37] Coffin JM. Genetic variation in avian retroviruses. *Dev Biol Stand*, 1990, 72: 123-32

- [38] Martinez MA, Verdaguer N, Mateu MG, et al. Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6798-802
- [39] Baxt B, Morgan DO, Robertson BH, et al. Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *J Virol*, 1984, 51: 298-305
- [40] McCullough KC, Crowther JR, Carpenter WC, et al. Epitopes on foot-and-mouth disease virus particles. I. Topology. *Virology*, 1987, 157: 516-25
- [41] Xie QC, McCahon D, Crowther JR, et al. Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J Gen Virol*, 1987, 68: 1637-47
- [42] Thomas AA, Woortmeijer RJ, Puijk W, et al. Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J Virol*, 1988, 62: 2782-9
- [43] Baxt B, Vakharia V, Moore DM, et al. Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1989, 63: 2143-51
- [44] Bolwell C, Brown AL, Barnett PV, et al. Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1989, 70: 45-57
- [45] Kitson JD, McCahon D, Belsham GJ. Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology*, 1990, 179: 26-34
- [46] Lea S, Hernandez J, Blakemore W, et al. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 1994, 2: 123-39
- [47] Bittle JL, Houghten RA, Alexander H, et al. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 1982, 298: 30-3
- [48] Pfaff E, Mussgay M, Bohm HO, et al. Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus. *EMBO J*, 1982, 1: 869-74
- [49] Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Lim F, et al. Foot-and-mouth disease virus lacking the VP1 G-H loop: the mutant spectrum uncovers interactions among antigenic sites for fitness gain. *Virology*, 2001, 288: 192-202
- [50] Gebauer F, de la Torre JC, Gomes I, et al. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol*, 1988, 62: 2041-9
- [51] Martinez MA, Dopazo J, Hernandez J, et al. Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J Virol*, 1992, 66: 3557-65
- [52] Escarmis C, Davila M, Domingo E. Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J Mol Biol*, 1999, 285: 495-505
- [53] Zhang Z, Bashiruddin JB. Quantitative analysis of foot-and-mouth disease virus RNA duration in tissues of experimentally infected pigs. *Vet J*, 2009, 18: 130-2
- [54] Martinez MA, Carrillo C, Plana J, et al. Genetic and immunogenic variations among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, 1988, 62: 75-84
- [55] Martinez MA, Hernandez J, Piccone ME, et al. Two mechanisms of antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 1991, 184: 695-706
- [56] Feigelstock D, Mateu MG, Piccone ME, et al. Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J Gen Virol*, 1992, 73: 3307-11
- [57] Mateu MG, Andreu D, Domingo E. Antibodies raised in a natural host and monoclonal antibodies recognize similar antigenic features of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 1995, 210: 120-7
- [58] Mateu MG, Da Silva JL, Rocha E, et al. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 1988, 167: 113-24
- [59] Prabhakar BS, Haspel MV, McClintock PR, et al. High frequency of antigenic variants among naturally occurring human Coxsackie B4 virus isolates identified by monoclonal antibodies. *Nature*, 1982, 300: 374-6
- [60] Hernandez ME, Bruguera M, Puyuelo T, et al. Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *J Hepatol*, 1992, 16: 56-8
- [61] Borrego B, Novella IS, Giralt E. Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J Virol*, 1993, 67: 6071-9
- [62] Haydon PG, Man-Son-Hing H. Low- and high-voltage-activated calcium currents: their relationship to the site of neurotransmitter release in an identified neuron of *Helisoma*. *Neuron*, 1988, 1: 919-27
- [63] Camarero JA, Andreu D, Cairo JJ, et al. Cyclic disulfide model of the major antigenic site of serotype-C foot-and-mouth disease virus. Synthetic, conformational and immunochemical studies. *FEBS Lett*, 1993, 328: 159-64
- [64] Verdaguer N, Mateu MG, Andreu D, et al. Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO J*, 1995, 14: 1690-6
- [65] Ruiz-Jarabo CM, Sevilla N, Davila M, et al. Antigenic properties and population stability of a foot-and-mouth disease virus with an altered Arg-Gly-Asp receptor-recognition motif. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1899-909
- [66] Holguin A, Hernandez J, Martinez MA, et al. Differential restrictions on antigenic variation among antigenic sites of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibody selection. *J Gen Virol*, 1997, 78: 601-9
- [67] Saiz JC, Cairo J, Medina M, et al. Unprocessed foot-and-mouth disease virus capsid precursor displays discontinuous epitopes involved in viral neutralization. *J Virol*, 1994, 68: 4557-64
- [68] Sevilla N, Domingo E. Evolution of a persistent aphthovirus in cytolytic infections: partial reversion of

- phenotypic traits accompanied by genetic diversification. *J Virol*, 1996, 70: 6617-24
- [69] Sevilla N, Verdaguier N, Domingo E. Antigenically profound amino acid substitutions occur during large population passages of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 1996, 225: 400-5
- [70] Pandey LK, Mohapatra JK, Subramaniam S, et al. Evolution of serotype A foot-and-mouth disease virus capsid under neutralizing antibody pressure *in vitro*. *Virus Res*, 2014, 181: 72-6
- [71] Sellers RF, Herniman KA, Mann JA. Transfer of foot-and-mouth disease virus in the nose of man from infected to non-infected animals. *Vet Rec*, 1971, 89: 447-9
- [72] Domingo E, Verdaguier N, Ochoa WF, et al. Biochemical and structural studies with neutralizing antibodies raised against foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 1999, 62: 169-75
- [73] Holland GD, Ito K, Kaehler DA, et al. Thymic targets for Abelson murine leukemia virus are early gamma/delta T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3700-4
- [74] Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, et al. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS*, 1999, 13: 2349-59
- [75] Chao HH, Waheed A, Pohlmann R, et al. Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J*, 1990, 9: 3507-13
- [76] Duarte E, Clarke D, Moya A, et al. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 6015-9
- [77] Novella IS, Elena SF, Moya A, et al. Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *J Virol*, 1995, 69: 2869-72
- [78] Novella IS, Clarke DK, Quer J, et al. Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *J Virol*, 1995, 69: 6805-9
- [79] Novella IS, Quer J, Domingo E, et al. Exponential fitness gains of RNA virus populations are limited by bottleneck effects. *J Virol*, 1999, 73: 1668-71
- [80] Duarte EA, Clarke DK, Moya A, et al. Many-trillionfold amplification of single RNA virus particles fails to overcome the Muller's ratchet effect. *J Virol*, 1993, 67: 3620-3
- [81] Domingo E. RNA virus evolution, population dynamics, and nutritional status. *Biol Trace Elem Res*, 1997, 56: 23-30
- [82] Martinez MA, Carrillo C, Gonzalez-Candelas F, et al. Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J Virol*, 1991, 65: 3954-7
- [83] Escarmis C, Gomez-Mariano G, Davila M, et al. Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to-plaque transfers: diversification by mutation clustering. *J Mol Biol*, 2002, 315: 647-61
- [84] Escarmis C, Davila M, Charpentier N, et al. Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol*, 1996, 264: 255-67
- [85] Yuste E, Lopez-Galindez C, Domingo E. Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck passages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 2000, 74: 9546-52
- [86] Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, et al. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha V\beta 3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol*, 1995, 69: 2664-6
- [87] Mateu MG, Valero ML, Andreu D, et al. Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J Biol Chem*, 1996, 271: 12814-9
- [88] Jackson T, Blakemore W, Newman JW, et al. Foot-and-mouth disease virus is a ligand for the high-affinity binding conformation of integrin $\alpha 5\beta 1$: influence of the leucine residue within the RGD motif on selectivity of integrin binding. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1383-91
- [89] Jackson T, Ellard FM, Ghazaleh RA, et al. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 1996, 70: 5282-7
- [90] Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, et al. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol*, 1997, 71: 5115-23
- [91] Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, et al. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol*, 2000, 74: 1641-7
- [92] Borca MV, Pacheco JM, Holinka LG, et al. Role of arginine-56 within the structural protein VP3 of foot-and-mouth disease virus (FMDV) O1 Campos in virus virulence. *Virology*, 2012, 422: 37-45
- [93] Stewart SA, Poon B, Jowett JB, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J Virol*, 1997, 71: 5579-92
- [94] Carrillo C, Plana J, Mascarella R, et al. Genetic and phenotypic variability during replication of foot-and-mouth disease virus in swine. *Virology*, 1990, 179: 890-2
- [95] Carrillo C, Borca M, Moore DM, et al. *In vivo* analysis of the stability and fitness of variants recovered from foot-and-mouth disease virus quasispecies. *J Gen Virol*, 1998, 79: 1699-706
- [96] de la Torre JC, Martinez-Salas E, Diez J, et al. Extensive cell heterogeneity during persistent infection with foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1989, 63: 59-63
- [97] Taboga O, Tami C, Carrillo E, et al. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol*, 1997, 71: 2606-14
- [98] Tami C, Taboga O, Berinstein A, et al. Evidence of the coevolution of antigenicity and host cell tropism of foot-and-mouth disease virus *in vivo*. *J Virol*, 2003, 77: 1219-26
- [99] McKenna TS, Lubroth J, Rieder E, et al. Receptor binding

- site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol*, 1995, 69: 5787-90
- [100] Wild F, Giraudon P, Spehner D, et al. Fowlpox virus recombinant encoding the measles virus fusion protein: protection of mice against fatal measles encephalitis. *Vaccine*, 1990, 8: 441-2
- [101] Haydon DT, Bastos AD, Knowles NJ, et al. Evidence for positive selection in foot-and-mouth disease virus capsid genes from field isolates. *Genetics*, 2001, 157: 7-15
- [102] Xiang J, Klinzman D, McLinden J, et al. Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol*, 1998, 72: 2738-44
- [103] Nunez JI, Baranowski E, Molina N, et al. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol*, 2001, 75: 3977-83
- [104] Agudo R, Ferrer-Orta C, Arias A, et al. A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1001072
- [105] Zeng J, Wang H, Xie X, et al. Ribavirin-resistant variants of foot-and-mouth disease virus: the effect of restricted quasispecies diversity on viral virulence. *J Virol*, 2014, 88: 4008-20
- [106] van Bekkum JG, Straver PJ, Bool PH, et al. Further information on the persistence of infective foot-and-mouth disease virus in cattle exposed to virulent virus strains. *Bull Off Int Epizoot*, 1966, 65:1949-65
- [107] Condy JB, Hedger RS, Hamblin C, et al. The duration of the foot-and-mouth disease virus carrier state in African buffalo (i) in the individual animal and (ii) in a free-living herd. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1985, 8: 259-65
- [108] Hedger RS, Condy JB, Golding SM. Infection of some species of African wild life with foot-and-mouth disease virus. *J Comp Pathol*, 1972, 82: 455-61
- [109] Gurhan SI, Ozdural N. Serial cultivation of suspended BHK 21/13 cells in serum-reduced and serum-free medium supplemented with various membrane protective agents. *Cytotechnology*, 1990, 3: 89-93
- [110] Dawe PS, Sorensen K, Ferris NP, et al. Experimental transmission of foot-and-mouth disease virus from carrier African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in Zimbabwe. *Vet Rec*, 1994, 134: 211-5
- [111] Bao HF, Li D, Sun P, et al. The infectivity and pathogenicity of a foot-and-mouth disease virus persistent infection strain from oesophageal-pharyngeal fluid of a Chinese cattle in 2010. *Virol J*, 2011, 8: 536
- [112] Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI. Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals--the carrier problem. *Microbes Infect*, 2002, 4: 1099-110
- [113] Baxt B, Mason PW. Foot-and-mouth disease virus undergoes restricted replication in macrophage cell cultures following Fc receptor-mediated adsorption. *Virology*, 1995, 207: 503-9
- [114] Pacheco JM, Smoliga GR, O'Donnell V, et al. Persistent foot-and-mouth disease virus infection in the nasopharynx of cattle; tissue-specific distribution and local cytokine expression. *PLoS One*, 2015, 10: e0125698
- [115] Rigden RC, Carrasco CP, Summerfield A, et al. Macrophage phagocytosis of foot-and-mouth disease virus may create infectious carriers. *Immunology*, 2002, 106: 537-48
- [116] Grubman MJ, Moraes MP, Segundo DS, et al. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, 53: 8-17
- [117] Kirchweger R, Ziegler E, Lamphear BJ, et al. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 γ . *J Virol*, 1994, 68: 5677-84
- [118] Wang D, Fang L, Bi J, et al. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced RANTES transcription in PK-15 cells. *Virus Genes*, 2011, 42: 388-93
- [119] Wang D, Fang L, Li P, et al. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *J Virol*, 2011, 85: 3758-66
- [120] Zunszain PA, Knox SR, Sweeney TR, et al. Insights into cleavage specificity from the crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease complexed with a peptide substrate. *J Mol Biol*, 2010, 395: 375-89
- [121] Belsham GJ, McInerney GM, Ross-Smith N. Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol*, 2000, 74: 272-80
- [122] Wang D, Fang L, Li K, et al. Foot-and-mouth disease virus 3C protease cleaves NEMO to impair innate immune signaling. *J Virol*, 2012, 86: 9311-22
- [123] Du Y, Bi J, Liu J, et al. 3C^{pro} of foot-and-mouth disease virus antagonizes the interferon signaling pathway by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J Virol*, 2014, 88: 4908-20
- [124] Gladue DP, O'Donnell V, Baker-Branstetter R, et al. Foot-and-mouth disease virus nonstructural protein 2C interacts with Beclin1, modulating virus replication. *J Virol*, 2012, 86: 12080-90
- [125] Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, 176: 1-20
- [126] Spindler KR, Holland JJ. A mutant standard virus isolated from vesicular stomatitis virus persistent infection interferes specifically with wild-type virus replication. *J Gen Virol*, 1982, 62: 363-7