

Coltivirus 病毒属研究进展*

徐丽宏, 梁国栋**

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

Advances in Research of *Coltivirus*

XU Li-hong, LIANG Guo-dong**

(Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China)

关键词: *Coltivirus* 病毒属; 生物学特征; 基因组特征

中图分类号: Q939.4 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)04-0385-07

Coltivirus 病毒属 (*Coltivirus*, Colti) 为呼肠病毒科病毒, 以科罗拉多蜱媒热病毒 (*Colorado tick fever virus*, CTFV) 为代表株, 该病毒原为环状病毒属成员, 由于其对人有致病性, 可引起人的发热和脑炎, 病毒核心的衣壳表面结构不同于典型的环状病毒, 尤其是病毒基因组为 12 个双链 RNA 节段而不是环状病毒的 10 个节段, 核酸分子量 27×10^6 , 远比环状病毒 (18×10^6) 大, 故单列一属。目前全世界已在美洲、亚洲和欧洲等地分离到数十株 Colti 病毒 (主要病毒株的分离年代和地区见表 1)。其中 CTFV 和在德国、法国分离到的 Eyach 及其变异株 Ar577 和 Ar578 被称为欧美流行株, 亚洲分离株除印尼的 JKT6423、JKT6969、JKT7043、JKT7075 分离株外, 我国自 1980 年以来也从人、畜标本和野外采集的蚊虫及蜱标本分离到多株 Colti 病毒, 如目前研究较多的有云南分离株 Banna 病毒, 北京分离株 BJ95-75、BJ95-70、TRT2, 东北分离株 NE97-12、NE97-31 等, 这些病毒与科罗拉多蜱媒热病毒在生物学特性及致病性等均存在较大差异。本文就 Colti 病毒的生物学特征、对人、畜的致病性与流行病学等进行了总结, 特别是近年来国内外注重对 Colti 病毒的分子生物学特征研究, 获得较多进展, 由于病毒基因组已被阐明, 对许多 Colti 病毒的生物学特性可以用分子生物学加以解释, 作者将结合本人和国内的工作做一综述。

1 Colt 病毒的生物学特征

1.1 理化性质

Colti 病毒呈球形颗粒, 由致密的核心和双层衣壳组成, 毒粒直径约 60-80nm, 核衣壳直径约 50nm, 对酸 (pH3.0) 和温度 (56℃ 30min) 敏感, 对乙醚和 5-碘脱氧尿苷 (5-IDU) 抵抗, 提示为无包膜 RNA 病毒。

1.2 对细胞和实验动物的致病性

Colti 病毒对组织培养细胞和实验动物等都有不同程度的致病性。其中欧美流行株如科罗拉多蜱媒热病毒的敏感细胞株为 BHK 细胞并能形成空斑, 对 Vero 细胞和 C6/36 细胞等多种细胞也可致病变。而在亚洲采集的蚊虫标本分离的 Colti 病毒株 (简称亚洲分离株或流行株) 仅在蚊子细胞株 C6/36 上敏感, 接种 36-48h 后就出现细胞病变, 主要表现为细胞圆缩、折光增强和脱落等; Vero 细胞和 BHK 细胞感染亚洲分离株病毒后不出现病变, 但是感染上清可以引起 C6/36 细胞病变, 说明亚洲分离株病毒也可在这两种细胞繁殖但不引起病变, 用 EIA 染色也能检出亚洲分离株病毒在 Vero 和 BHK 细胞的存在。Colti 病毒亚洲分离株在 C6/36、Vero 细胞及 BHK 等细胞上均不能形成空斑。

科罗拉多蜱媒热病毒脑内接种可致 1-3 日龄小鼠死亡; 亚洲分离株如 Banna 病毒脑内或皮下接种 2-3 日龄乳鼠或 3 周龄小白鼠均不出现明显症

收稿日期: 2002-03-14, 修回日期: 2002-04-12

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (30170046)

作者简介: 徐丽宏 (1968-), 女, 河北省籍, 助研, 博士, 研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者: 梁国栋 (1951-), 男, 北京籍, 研究员, 博士生导师, 研究方向为分子病毒学及病毒基因工程。Correspondence author.

状和死亡,但鼠脑研磨液可感染 C6/36 细胞说明病毒在鼠脑内能繁殖,该病毒可诱生 3 周龄小白鼠高滴度(大于 1 280)抗体^[1]。

1.3 Colti 病毒的血清学特征

交叉快速微量中和实验及 EIA 结果表明^[6], Colti 病毒属与呼肠病毒科其它病毒属间无血清学交叉。但 Colti 病毒属内存在血清学交叉,从德国、法国等地分离的 Eyach 病毒与美国分离的 CTFV 病毒间有补体结合实验的交叉反应,但中和实验不能发生交叉中和反应;亚洲分离株与欧美流行株间

血清学上不发生交叉^[2,11],甚至在亚洲流行株内部亦仅表现为同一地区分离的病毒株间血清学上有交叉,但不同地区分离株间不能交叉中和^[1,9~12],如我国北京地区分离的 Colti 病毒与东北地区分离株间不存在交叉中和反应,提示 Colti 病毒具有不同于呼肠病毒科其它成员的独特抗原性,为此 Colti 病毒可能存在很多血清型。此外 Colti 病毒不能凝集鹅红细胞和绵羊红细胞,这一点也与一般虫媒病毒的血凝特性不同。

表 1 *Coltivirus* 病毒属分组、各组病毒株及其分离地区和年代等

Table 1 The division of *Coltivirus*, time and district of each strain isolated

组 (Group)	亚组 (Subgroup)	病毒及分离株 (Virus and isolates)	分离株来源 (Isolation source)	国家和地区 (Region and country)	年代 (Year)	PAGE 电泳带型 (PAGE profile)
A	A1	CTFV - Florio CTFV(S6 - 14 - 03)	人和革蜱 革蜱和啮齿 动物(Human, Dermacen- tor and Rodent)	Colorado, USA Wyoming, USA	1943 1956	4 - 6 - 1 - 1
	A2	Eyach 及其血清型变异株 Ar577 和 Ar578	革蜱(Dermacentor)	德国, 法国 (Germany/ France)	1976, 1984	4 - 6 - 1 - 1
B	B1	JKT7075 ^[2] NE97 - 12 ^[9] NE97 - 31 ^[9]	蚊, 主要是按蚊和库蚊 (Mosquito, esp. Anophe- les and Culex.)	Central Java, Indonesia 中 国东北地区 (Northeast, China)	1981 1996	6 - 5 - 1
	B2	<i>Banna virus</i> ^[1] JKT6423/JKT6969/ JKT7043 ^[2] HN59/HN199/HN131/ HN295 ^[10] M14 ^[20] /BJ95 - 75/BJ95 - 70 ^[12] /TRT2 ^[11]	人、蚊 (Human, Mosquito) 蚊, 主要为按蚊和库蚊 (Mosquito, esp. Anophe- les and Culex.)	中国云南 (Yunnan, Chi- na), Central Java, Indone- sia 中国海南、北京等地区 (Hannan/Beijing, China)	1985 1980, 1981, 1982, 1990, 1995	6 - 6

2 Colti 病毒对人的致病性及其流行病学

科罗拉多蜱媒热病毒主要引起发热和脑炎,潜伏期为 3~7 d, 临床主要表现为骤起的畏寒, 头痛、背、腿部肌肉疼痛, 发热可达 38℃~40℃, 常有双峰热, 为科罗拉多蜱媒热的特征表现之一。小儿感染还可致无菌性脑膜炎或脑炎症状, 白细胞总数减少。科罗拉多蜱媒热发病年龄多见于 10 岁以下儿童和 21~30 岁的青壮年, 男性多于女性, 这可能与个体的免疫水平、工作及活动习性以及与携带病毒的吸血节肢动物接触的多寡有关。预防科罗拉多蜱媒热病毒感染主要是减少与媒介蜱的接触, 如进入疫区时要注意作好个人防护等。自然感染的人和动物可获得长期免疫力。

我国学者徐普庭等^[1]1987 年从云南省西双版纳地区 5~7 月份采集的无名热和脑炎病人的血清

和脑脊液中分离到多株病毒, 该病毒具有 Colti 病毒特性但是与标准病毒株科罗拉多蜱媒热病毒不存在血清学交叉反应, 为我国首次分离的病毒, 命名为 Banna 病毒。它也是目前 Colti 病毒属亚洲分离株中唯一一个从病人体内分离到的病毒, 并且这些病人临床上能排除伤寒、疟疾、流感等致热疾病和细菌感染, 病人的双份血清与该病毒存在 4 倍以上增长; 陈伯权等^[4]1996 年在全国范围内进行的虫媒病毒血清流行病学调查发现, 北京、河南、福建、甘肃等地临床诊断为病毒性脑炎病人的双份血清中 Colti 病毒特异性抗体有 4 倍以上升高。由此认为 Colti 病毒亚洲分离株也可引起发热和脑炎等^[1,3,4], 另外, 徐普庭等从发热伴有心率失常及病毒性心肌炎患儿血液中也曾分离到 Colti 病毒; 从临床诊断为风湿性心脏病患者血清中查出 Colti 病毒抗体 4 倍以上升高, 由此推测 Colti 病毒亚洲分离株还可能造成心肌

损害。

Colti 病毒的感染具有明显的季节性, 多为散发、可出现小范围流行。病毒可在哺乳动物体内增殖, 引起长期(如罗猴感染 CTFV 后, 病毒血症可达 128 d)、高滴度病毒血症, 也可在蜱、蚊子、蠓、白蛉等吸血节肢动物体内繁殖, 并由其传播扩散, 带毒者可能起到扩散宿主的作用。CTFV 病毒的传播媒介为吸血蜱, 而 Colti 病毒亚洲分离株的传播媒介以吸血蚊虫为主, 也在吸血蜱分离到病毒。另外, 徐普庭等从屠宰场的牛和猪血清分离出的 Colti 病毒与从人体标本分离的病毒存在血清学交叉, 并且病毒 RNA 带型完全相同, 表明猪、牛等家畜也可感染 Colti 病毒。

科罗拉多蜱媒热根据病人曾有吸血蜱接触史、双峰热等典型的临床症状及白细胞减少等血象变化, 可以做出临床诊断。实验室诊断包括(1)病毒分离;(2)血清学诊断^[14]如用 ELISA 法查特异性抗体和 Western blot 法检查针对于科罗拉多蜱媒热病毒 38-kD 蛋白的特异抗体, 该方法比较敏感, 甚至能检出 ELISA 检测阴性的血清标本中的抗体。另外, 根据病毒基因组第 12 片段合成了一段多肽, 在血清中检测针对该段多肽的急性期 IgM 抗体的方法也已建立起来;(3)分子生物学诊断方法^[14, 15], 如 RT-PCR 方法可从少于 10~100pfu 的标本中同时特异扩增出 3 个基因片段, 另一个系统是病毒 S2 片段的 RT-PCR 扩增方法, 该方法不但灵敏特异, 而且可以对美国和欧洲分离株进行分类。对亚洲分离株, 除根据病毒分离和血清学实验如 ELISA 法检测病毒抗体外, 针对第 7、9、12 片段的 RT-PCR 方法^[16]也已建立起来, 该方法在病毒的基因分型和小鼠模拟感染实验的诊断中获得可靠结果。最近我们也用该方法对我国各地区不同年代 Colti 病毒分离株进行了基因分型^[8], 结果显示北京地区 1995 年分离株 BJ95-75 及 2000 年从云南澜沧江地区采集的蚊标本中新分离到的 12 株 Colti 病毒用 B2 亚组引物均能扩增出特异核酸条带, 而东北分离株 NE97-12、NE97-31 则未能扩出条带, 说明我国东北地区的 Colti 病毒与云南和北京地区的病毒存在较大差异。这些病毒基因组的呼肠病毒科(PAGE)电泳带型也不相同(东北地区为 6-5-1 型, 北京和云南为 6-6 型), 病毒基因组类似于 Colti 病毒 B1 亚组, 但值得一提的是, 我们用文献中提到的 B1 亚组病毒引物扩增该病毒时, 却未能得到阳性结果, 这可能

是因为目前 B1 亚组的引物只根据一株病毒(JKT7075)的序列而设计的, 代表性较差, 我们分离的 NE97-12 和 NE97-31 很可能为国际上还未发现的 B1 亚组新成员。我们将对这两株病毒基因组做进一步研究, 结合国际上已发表的 JKT7075 病毒的序列, 重新设计 Colti 病毒 B1 亚组特异引物, 为 Colti 病毒的分子生物学诊断和鉴定打下基础。用该方法检测临床血清标本中 Colti 病毒的实验我们正在进行中。

3 Colti 病毒的基因组特征

Colti 病毒基因组为双链分节段 RNA, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)为 12 条带。1997 年 Attoui 等^[5]首次用单引物扩增法成功地克隆并测定了 CTFV 病毒的 M6、S1、S2 片段核苷酸序列, 并在短短两年时间里几乎完成了所有 Colti 病毒代表株的全基因组或部分基因片段的序列测定。并在此基础上, 将单引物扩增法所用的引物和条件进行了优化, 建立了用该方法测定双链 RNA 病毒全序列的基本操作策略^[17]。目前 CTFV、JKT6423(印度尼西亚)、JKT7075(印度尼西亚)等各组代表株^[7, 13]的基因组已完成全序列测定, 其它毒株的大部分基因组序列也已基本完成, 如 Banna 病毒、JKT6969、JKT7043 等的第 1, 2, 6, 7-12 片段, Eyach 病毒的第 12 片段的序列等^[6], 最近我们也测定了本实验室分离的毒株 BJ95-75 第 12 片段的部分核苷酸序列^[8], 与 Banna 病毒对应区序列同源性高达 99.76%(848/850), 提示我国北京与云南地区分离的 Colti 病毒存在相同的基因组序列。现已知 CTFV 病毒基因组全长为 29 174bp^[7], 是目前所知整个呼肠病毒科基因组最长的, 基因组中 G+C 含量约为 50%, JKT7075 和 JKT6423 基因组全长分别为 20 985bp 和 20 682bp^[13], G+C 含量约为 36%。各代表株的基因组特征见表 2。

由表 2 可看出, 同一病毒株所有片段正链 RNA 的 5'端和 3'端具有相似保守序列, 如 CTFV 病毒为 SACAUUUUGY 和 WUGCAGUS, 且每个片段 5'和 3'末端端 2 个核苷酸反向互补, 除第 10 片段 5'端为 CA, 3'端为 UG 外, 其它所有片段 5'端和 3'端分别为 GA 和 UC。JKT7075 病毒株的 5'端和 3'末端保守序列分别为 GUAGAAWWWW 和 WVWMY-GAC; JKT6423 分别为 GUAUWWAWWWU 和 RMCYGAC, JKT7075 和 JKT6423 具有相似的末端

保守序列,最末端 3 个核苷酸(5'端:GUA 和 3'端:GAC)甚至完全相同,且所有片段 5'端和 3'端最末端两个核苷酸为反向互补,这些核苷酸通过同源配

对,使 RNA 转录产物形成特殊的环形结构,其功能可能是作为分拣信号,以确保新生的病毒衣壳中每个片段只有一个拷贝。

表 2 *Collivirus* 病毒各组代表株的基因组特征

Table 2 Genomic character of representative strains of each group

病毒代表株及基因片段 Representative virus iso- lates and segment	基因长度(bp) Length(bp)	编码氨基 酸长度 Protein(aa)	5'非编码区(5'NCR) 5' Noncoding region		3'非编码区(3'NCR) 3' Noncoding region		
			长度 Length(bp)	末端序列 Terminal sequence	末端序列 Terminal sequence	长度 Length(bp)	
JKT6423	1	3747	1214	23	5'GUAUuaAaaaU...	...aaCuGAC 3'	79
	2	3048	954	93	5'GUAUaaAuuuU...	...acCcGAC 3'	90
	3	2400	720	23	5'GUAUuaAuuuU...	...aaCuGAC 3'	214
	4	2038	570	26	5'GUAUuuAaaaU...	...acCcGAC 3'	281
	5	1716	508	31	5'GUAUuaAaaaU...	...aaCuGAC 3'	158
	6	1671	425	111	5'GUAUuuAaaaU...	...gaCuGAC 3'	285
	7	1136	300	30	5'GUAUuaAuuuU...	...aaCuGAC 3'	152
	8	1119	302	32	5'GUAUuuAaaaU...	...gaCcGAC 3'	178
	9	1101	283	23	5'GUAUuuAaaaU...	...gaCcGAC 3'	226
	10	977	249	28	5'GUAUuuAaaaU...	...gaCuGAC 3'	199
	11	807	180	75	5'GUAUuaAaaaU...	...aaCuGAC 3'	249
	12	862	207	43	5'GUAUuaAaaaU...	...aaCuGAC 3'	195
一致序列	-	-	-	5'GUAUWWAWWWU...	...RMCYGAC3'	-	
JKT7075	1	3774	1223	26	5'GUAGAAaaaU...	...aaacuGAC3'	76
	2	3035	908	44	5'GUAGAAuuuu...	...aaacuGAC3'	84
	3	2415	739	44	5'GUAGAAaaaU...	...aaaaGAC3'	151
	4	2121	631	25	5'GUAGAAuuuu...	...aaacuGAC3'	200
	5	1947	573	101	5'GUAGAAaaaU...	...aaaGAC3'	124
	6	1670	506	25	5'GUAGAAuuuu...	...aauccGAC3'	124
	7	1259	347	32	5'GUAGAAaaaU...	...agaacGAC3'	183
	8	1114	302	86	5'GUAGAAuaaa...	...aaaacGAC3'	119
	9	1054	303	23	5'GUAGAAaaaU...	...aaaccGAC3'	119
	10	946	260	17	5'GUAGAAaaaU...	...uaaccGAC3'	146
	11	894	203	23	5'GUAGAAuuuu...	...acacuGAC3'	79
	12	756	190	102	5'GUAGAAaaaU...	...aaaacGAC3'	81
一致序列	-	-	-	5'GUAGAAWWWW...	...WVWMYGAC3'	-	
CTFV	1	4350	1435	13	5'gACAUUUUGc...	...uUGCAGUc3'	29
	2	3909	1209	45	5'gACAUUUUGu...	...uUGCAGUc3'	234
	3	3586	1182	11	5'gACAUUUUGu...	...uUGCAGUc3'	26
	4	3157	1027	21	5'gACAUUUUGu...	...aUGCAGUc3'	52
	5	2432	751	77	5'gACAUUUUGu...	...aUGCAGUc3'	99
	6	2141	697	14	5'gACAUUUUGu...	...uUGCAGUc3'	33
	7	2133	684	23	5'gACAUUUUGu...	...uUGCAGUc3'	55
	8	2029	660	19	5'gACAUUUUGu...	...uUGCAGUc3'	27
	9	1884	337(602) *	40	5'gACAUUUUGu...	...uUGCAGUc3'	830(35) *
	10	1880	605	11	5'gACAUUUUGa...	...uUGCAGUc3'	51
	11	998	249	39	5'cACAUUUUGu...	...aUGCAGUg3'	209
	12	675	185	19	5'gACAUUUUGu...	...uUGCAGUc3'	98
一致序列	-	-	-	5'SACAUUUUGY...	...WUGCAGUS3'	-	

注:高度保守的末端序列用大写字母表示。在一致序列中,M代表A或C;R代表A或G;V代表A,C或G;W代表A或U;Y代表A,C或U;S代表G或C。

*表示如果有通读现象发生时理论上编码的蛋白质的长度和3'端非编码区长度。

Note. Highly conserved terminal sequences are shown in upper-case. In consensus sequences, M represents A or C; R represents A or G; V represents A, C or G; W represents A or U; Y represents C or U and S represents G or C.

* length of theoretical protein and 3' NCR if readthrough occurs.

无论 CTFV 病毒或 Colti 病毒亚洲分离株基因组均分为 12 个片段, 每一个基因片段各编码一个蛋白质分别称为 VP1-12 蛋白。Attoui 等通过分析病毒蛋白中氨基酸形成的功能结构域以及在有某些功能活性的蛋白中寻找相似蛋白这两种方法, 对病毒各基因片段所编码的蛋白质功能进行了推测^[7,13], 结果发现 CTFV 病毒 VP1 蛋白的功能为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RDRP); VP2 蛋白可能具有 DNA 乙酰转移酶作用; VP3 蛋白可能为病毒复制酶; VP6 蛋白为核苷结合蛋白或嘌呤核苷磷酸化酶(NTPases); CTFV 的 VP7 蛋白与核酸复制过程所需蛋白如转录因子、转录延长因子、RNA 聚合酶的 sigma 因子相似; CTFV 的 VP9 核酸序列分析发现具有一个 Opal 终止子, 其 3' 端侧有一胞嘧啶残

基, 这一特征在逆转录病毒和甲病毒中有通读现象, 结果导致可能编码两种蛋白; VP12 蛋白具有 RNA 聚合酶 II 相似功能等; VP4、5、8 和 11 蛋白质功能不清。

Colti 病毒亚洲分离株(JKT6423 和 JKT7075) 各基因片段编码的蛋白质除 VP1 外, 与 CTFV 病毒基本上没有对应关系, 功能也不尽相同, 但 JKT6423 所有蛋白在 JKT7075 基因组中都有同源基因, 但在 PAGE 电泳图谱上顺序和位置不一定完全一致, 如 JKT6423 基因组中 VP5 与 JKT7075 的 VP6 互为同源基因, JKT6423 的 VP6 和 JKT7075 的 VP5 相对应等。JKT6423 和 JKT7075 各基因片段对应关系及编码的蛋白质的功能见表 3。

表 3 *Coltivirus* 病毒 JKT6423 和 JKT7075 各基因片段编码蛋白对应关系、同源蛋白的功能及基因序列相似性

Table 3 Correspondence between proteins of JKT6423 and JKT7075, percentage identity and similarity between genes of JKT6423 and JKT7075 are reported for homologous proteins

JKT6423 Protein(Gene)		JKT7075 Protein(Gene)	氨基酸同源性(%) Identity of aa	核酸序列相似性(%) Similarity of nt sequence	可能的功能 Function
VP1(S1)	←——→	VP1(S1)	42	57	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
VP2(S2)	←——→	VP2(S2)	28	43	核苷结合活性, 细胞受体识别位点
VP3(S3)	←——→	VP3(S3)	39	54	乙酰转移酶、螺旋酶
VP4(S4)	←——→	VP4(S4)	33	47	乙酰转移酶
VP5(S5)	←- - - ->	VP6(S6)	30	43	
VP6(S6)	←- - - ->	VP5(S5)	33	50	NTP 酶, 含有一亮氨酸拉链结构
VP7(S7)	←——→	VP7(S7)	30	48	蛋白激酶
VP8(S8)	←- - - ->	VP9(S9)	25	38	
VP9(S9)	←- - - ->	VP11(S11)	26	43	
VP10(S10)	←——→	VP10(S10)	24	51	
VP11(S11)	←- - - ->	VP12(S12)	26	53	
VP12(S12)	←- - - ->	VP8(S8)	27	* *	dsRNA 结合活性

注: VPx 表示病毒蛋白, Sx 表示 dsRNA 的基因片段。* * 表示用 Gapped BLAST 程序搜索未发现明显的相似性。实体箭头表示同源蛋白的基因片段在琼脂糖凝胶上泳动顺序相同; 虚箭头指在琼脂糖凝胶上电泳顺序不一致的基因片段所编码的同源蛋白; 点状箭头表示二者具有相似功能但没有明显的序列相似性。

Note. VPx indicates the viral proteins; [Sx] indicates the dsRNA segments. * *, No significant similarity (from the gapped BLAST program).

Proteins encoded by segments that are homologous in the order of their relative electrophoretic mobility in agarose gel are indicated by dashed arrows. Proteins with similar functions (contain dsRNA - binding domains) that do not exhibit significant sequence similarity (* *) are indicated by a dotted arrow.

4 *Coltivirus* 病毒的分类

Colti 病毒的分类过程可以说直接反映了病毒学分类方法的发展历程。在 1980 年以前由于该属病毒在电子显微镜下毒粒形态与环状病毒相似, 且具有与环状病毒相似的基本理化性质, 因此人们一直将 Colti 病毒归为环状病毒属。但是 Bremer^[18]等早在 1976 年就提出采用 PAGE 电泳分离病毒 RNA

带形作为环状病毒分类的依据, 1977 年 Payne 等^[19]也提到病毒 RNA 带型在环状病毒分类学上比血清学更有意义。特别是 1980 年以来我国和印尼先后分离到多株 Colti 病毒, 其基因组虽都为双链分节段 RNA, 但病毒在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)时分离为 12 条带, 而环状病毒的 RNA 分为 10 条带型。核酸杂交实验也证实 Colti 病毒与环状病毒基因组各片段间均不存在杂交反应, 这些新分离病毒与环状病毒亦不发生血清学交叉反应, 提示 Colti 病

毒与环状病毒为完全不同的病毒。1990年在德国柏林召开的国际病毒分类委员会(International Committee for Taxonomy of virus, ICTV)第五次会议上正式将12片段双链RNA病毒从环状病毒属中分离出来,重新建立了一个新属并暂定名为Colti病毒属。

1998年Attoui等^[6]根据Colti病毒7-12片段核苷酸序列的同源性,将Colti病毒分成为A、B两组。A组主要为美国分离的CTFV病毒和欧洲分离的Eyach病毒及其血清学变异株等,B组则主要为我国和印尼等亚洲地区的分离株。目前Colti病毒属的分类情况及各组包括的病毒详见表1。A、B两组病毒间核苷酸序列不存在任何明显同源性,而将它们所编码的氨基酸序列进行比较时,最大同源性也只有15%,这一数值与呼肠病毒科不同属间的同源性相似。B组分为B1和B2亚组,两亚组间7-12片段的核苷酸序列同源性约为49%;对B2亚组各病毒株7-12片段的序列同源性进行分析发现,第8、10-12片段序列比较保守,序列同源性可达83.3%-98.84%,而在易变异的第7和9片段,序列同源性为54.39%-99.7%。由此又将B2亚组分为2个基因型,既B2a和B2b两型,B2a型包括JKT6423和Banna病毒,B2b包括JKT6969和JKT7043。对于B2亚组其它各株病毒,因还未对其基因组进行序列测定,还无法将其明确分型。最近几年随着病毒基因组学的飞速发展,Colti病毒属内各代表毒株的基因组已全部测完,再结合血清学、PAGE电泳、临床及流行病学等方面的特征,人们越来越发现欧美流行株与亚洲流行株之间存在许多差别,主要包括:1. 亚洲株各病毒基因组长度相似,但均较CTFV病毒基因组短约36%;2. 亚洲株病毒基因组G+C含量为37%~39%,而CTFV病毒为50%,亚洲株基因组G+C含量明显偏低;3. 亚洲株各病毒间具有相似的末端保守序列,但与CTFV完全不同;4. B1与B2亚组之间编码聚合酶的氨基酸序列同源性为42%,而它们与A组(CTFV)之间的同源性只有7.9%和9.7%,而根据呼肠病毒科分属的主要依据,同一属内编码聚合酶的氨基酸序列同源性应大于等于18%;此外,Colti病毒亚洲株与欧美流行株间在流行病学、致病性以及血清学等方面也存在较大差异,如亚洲株传播媒介主要为蚊虫,而欧美流行株的传播媒介为蝉;亚洲株主要是从我国和印尼等东南亚国家分离到的,而欧美流行株则是

从美国以及德、法等欧洲国家分离的;欧美流行株对哺乳动物细胞、实验动物和人类都有不同程度的致病性,而亚洲株对BHK、Vero等细胞及小白鼠等实验动物不致病,对人的致病性还有待进一步研究确证;最后,亚洲株内部血清学上有一定程度交叉,但与欧美流行株间无交叉反应等,因此Attoui等^[13]提出将亚洲分离株从Colti属中分离出来,作为呼肠病毒科的一个新属,称Seadornavirus病毒属,其名称来自于英文“South-East Asian dodeca RNA viruses”的缩写(划线部分),其中dodeca为拉丁语,意指12基因片段,全文为“东南亚地区存在的具有12条带的RNA病毒”。并已正式向国际病毒分类委员会提出申请。其中包括Kadipira病毒(KDV)和BAV,KDV即原来的B1亚组,代表株写作KDV-In7075,BAV为原来的B2亚组,代表株为BAV-In6423。另外,由于2000年召开的第七次国际病毒分类委员会已正式接纳按病毒核酸序列的种系发生距离对病毒进行分类和鉴定的原则,这也对Colti病毒属重新分类具有巨大的促进作用。

5 问题与展望

CTFV病毒是最早分离到的Colti病毒,该病毒在自然界的生态及病毒对人的感染途径、致病性及致病机理、临床症状及愈后等都已研究得比较清楚。相比之下亚洲分离株分离年代较晚,对病毒的研究不够深入,特别是这些病毒对人的致病性还有待阐明。Colti病毒的亚洲流行株仅Banna病毒是直接分离自发热和脑炎病人的血清或脑脊液,提示病毒与人的疾病的关系;其它Colti病毒均分离自蚊虫标本,未获得病毒致病性的足够证据。如这些病毒在BHK21、Vero等哺乳动物细胞上不出现病变,接种乳鼠及3周龄小鼠均不发病,提示这些病毒可能对哺乳动物不致病,也提示这些病毒可能对人不具有致病性。因此应进一步明确其对人的致病性。到目前为止,亚洲株主要是从我国分离到的,我们有充足的病毒和血清标本,如果我们能充分利用这种优势,搞清Colti病毒亚洲株与人类疾病的关系,这无疑将会在国际上首次取得Colti病毒亚洲株研究的突破性进展,也能为Colti病毒亚洲株的进一步研究提供指导性建议。例如通过寻找合适的动物模型以及借助分子流行病学手段或利用对该病毒已取得分子水平的研究成果解释病毒的致病性。特别应与基层防疫部门和医院合作,收集病毒性脑炎的血液和脑

脊液标本进行病毒分离,进一步明确其与疾病的关系。同时对从蚊虫及病人分离的病毒进行细致的病毒生物学(甚至包括病毒的繁殖周期及病毒在自然界的生态活动等)和分子生物学对比研究以确证 Colti 病毒对人的致病性。在此前提下,对病毒编码蛋白的功能进行确证,找出病毒特异抗原、致病成分等为 Colti 病毒的诊治以及疫苗的研制奠定基础。与此同时,也可以利用已完成的基因组研究成果,将我们最近从不同地区分离的病毒代表株,尤其是电泳带型与已知代表株明显不同的毒株的基因组进行分析,如前边提到的 NE97-12、NE97-31 等,以发现 Colti 病毒的变异株或新的基因型,并建立起相应的针对不同型别病毒的快速、特异诊断方法。

参考文献

- [1] 徐普庭,王逸民,左建民,等.从云南省无名热病人和脑炎病人分离到新环状病毒[J].病毒学报,1990,6:27-32.
- [2] Brow S E, Gorman B M, Tesh R B, *et al.* Coltiviruses isolated from mosquitoes collected in Indonesia[J]. Virol, 1993, 196: 363-367.
- [3] 陶三菊,江之云,殷国庆,等.临床诊断为乙型脑炎等病人血清的 Colti 病毒抗体检测[J].中华实验和临床病毒学杂志,1996,10:247-250.
- [4] Chen B Q, Tao S J. Arbovirus survey in China in recent ten years[J]. Chin. Med. J(Engl). 1996, 109: 13-15.
- [5] Attoui H, De Micco P, De Lamballerie X. Complete nucleotide sequence of Colorado tick fever virus segments M6, S1 and S2 [J]. J Gen. Virol, 1997, 78: 2895-2899.
- [6] Attoui H, Charrel R N, Billoir F, *et al.* Comparative sequence analysis of American, European and Asian isolates of viruses in the genus Coltivirus[J]. J Gen. Virol. 1998, 79: 2481-2489.
- [7] Attoui H, Billoir F, Biagini P, *et al.* Sequence determination and analysis of the full-length genome of Colorado tick fever virus, the type species of genus Coltivirus[J]. Biochem. Biophys Res Commun, 2000, 273:1121-1125.
- [8] 徐丽宏,陶三菊,王焕琴,等. Colti 病毒中国株基因分型及部分序列测定[J].中华实验和临床病毒学杂志,2003,待发表.
- [9] 陶三菊,蔡增林,杨冬荣,等.从东北地区蚊标本首次分离到新亚型 Colti 病毒[J].中华实验和临床病毒学杂志,1999,13: 228-230.
- [10] 游志勇,王逸民,赵治国,等.海南省两株环状病毒的分离与鉴定[J].病毒学报,1990,6:272-275.
- [11] 宋立亭,陈伯权,赵子江. Coltivirus 新成员的分离和鉴定[J].中华实验和临床病毒学杂志,1995,9:7-10.
- [12] 陶三菊,何英,陈伯权,等. Colti 病毒的分离及其生物学性状[J].中华实验和临床病毒学杂志.1997,11:363-365.
- [13] Attoui H, Billoir F, Biagini P, *et al.* Complete sequence determination and genetic analysis of Banna virus and Kadipira virus: proposal for assignment to a new genus (Seadornavirus) within the family Reoviridae[J]. J Gen. Virol. 2000, 81: 1507-1515.
- [14] Attoui H, Billoir F, Bruey J M, *et al.* Serologic and molecular diagnosis of Colorado tick fever viral infections[J]. Am J Trop Med Hyg. 1998, 59: 763-768.
- [15] Johnson A J, Karabatsos N, Lanciotti R S. Detection of Colorado tick fever virus by using reverse transcriptase PCR and application of the technique in laboratory diagnosis[J]. J clin. Microbiol. 1997, 35:1203-1208.
- [16] Billoir F, Attoui H, Simon S, *et al.* Molecular diagnosis of group B Coltivirus infections[J]. J virol. Methods. 1999, 81: 39-45.
- [17] Attoui H, Billoir F, Cantaloube J F, *et al.* Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes [J]. J virol. Methods. 2000, 89: 147-158.
- [18] Bremer C W. A gel electrophoretic study of the protein and the nucleic acid components of African horsesickness virus[J]. Onderstepoort J Vet Res, 1976, 43: 193-199.
- [19] Payne C C, Piasecha-Serafin M, Pilley B. The properties of two recent isolates of cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. Intervirology, 1977, 8: 155-163.
- [20] 梁雪嘉,王逸民,黄祯祥,等.北京新虫媒病毒的分离和初步鉴定[J].中华微生物学和免疫学杂志,1985,5:262-264.