

DOI:10.13350/j.cjpb.251112

• 论著 •

大别班达病毒 N 蛋白的表达与抗体 ELISA 检测方法的建立^{*}

杨骊斓¹, 王欣², 王静静¹, 王琳¹, 李兆佳¹, 吴玉龙¹, 李波清^{1**}, 乔媛媛^{1**}

(1. 滨州医学院, 山东烟台 264003; 2. 烟台市奇山医院)

【摘要】 目的 大别班达病毒(SFTSV)是一种蜱传播的病原体,其引起的发热伴血小板减少综合征(SFTS)临床表现与多种发热性疾病存在显著相似性,因此需要优化出相较于传统诊断更敏感、更快速的诊断方法。核蛋白(NP)是SFTSV的结构蛋白,具有高度保守的氨基酸序列,能作为分子检测的标志物。 **方法** 从胶东地区分离 SFTS 急性期患者血清内 SFTSV 的 S 段基因序列,利用 PCR 技术扩增 SFTSV 的 N 基因,将 N 基因与真核表达载体 pHL-His 连接,构建重组表达质粒 pHL-N,转化 *E. coli* DH5 α ,优化 N 蛋白表达条件,真核表达纯化 N 蛋白,以纯化的 N 蛋白为包被抗原,建立检测 SFTSV 抗体的 ELISA 方法,并利用该方法对临床血清样本进行评价。 **结果** 实验成功表达纯化了 SFTSV N 蛋白,确定 ELISA 方法的抗原最佳包被浓度为 2 μ g/mL,血清最佳稀释度为 1 : 50;敏感性试验显示 SFTSV 阳性血清稀释比例为 1 : 3 200 时,结果仍为阳性;重复性试验显示批内变异系数、批间变异系数均小于 15%。最终建立的 ELISA 方法具有较好的敏感性和重复性,可用于检测临床 SFTS 急性期血清样本。 **结论** 本研究成功建立了快速检测临床 SFTS 急性期血清样本的病原学诊断方法。

【关键词】 发热伴血小板减少综合征病毒;N 蛋白;真核表达;ELISA

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2025)11-1444-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2025 Nov.;20(11):1444–1449.]

Expression of N protein of Dabie Bandavirus and establishment of antibody ELISA detection method

YANG Lilan¹, WANG Xin², WANG Jingjing¹, WANG Lin¹, LI Zhaojia¹, WU Yulong¹, LI Boqing¹, QIAO Yuanyuan¹ (1. Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong, China; 2. Yantai Qishan Hospital)

【Abstract】 Objective Dabie Bandavirus (SFTSV), a tick-borne pathogen, causes severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS), a disease characterized by clinical presentations that often overlap with various febrile diseases. Therefore, it is necessary to optimize a more sensitive and faster diagnostic method than traditional diagnosis. This study utilized the highly conserved nucleoprotein (NP) of SFTSV as a detection marker. **Methods** We isolated the S segment of genome of SFTSV from patients at acute stage in Jiaodong area, then PCR-amplified the N gene, inserted it into the eukaryotic expression vector pHL-His to generate recombinant plasmid pHL-N, and transformed it into *E. coli* DH5 α . The expression conditions for the N protein were optimized, followed by its purification. Using purified N protein as coating antigen, we developed an ELISA to detect SFTSV antibodies and assessed clinical serum specimens. **Results** The SFTSV N protein was successfully expressed and purified in this study. The optimal antigen coating concentration was determined to be 2 μ g/mL per well, with the optimal serum dilution at 1 : 50. The sensitivity assay demonstrated positive detection results at a serum dilution ratio of 1 : 3200, while repeatability tests showed both intra-assay and inter-assay coefficients of variation below 15%. The ELISA method established under these conditions showed high sensitivity and repeatability, and can be used to detect clinical acute serum samples from SFTS patients. **Conclusion** This study successfully established a rapid detection method for the etiological diagnosis of acute sera specimens from SFTS patients.

【Keywords】 severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; N protein; eukaryotic expression; ELISA

^{***} 发热伴血小板减少综合征(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)是 2007 年在中国中部地区首次发现的一种新发病毒性传染病,主要流行于中国、日本、韩国等亚洲国家^[1]。该病早期临床特征类似于人嗜粒细胞无形体病,但在患者体内没有检测到相应的核酸物质,直到 2010 年通过一系列流行病学调查与实验研究,一种新的病原微生物才从感染

^{*} **【基金项目】** 山东省自然科学基金项目(No. ZR2020MH169)。

^{**} **【通信作者】** 李波清, E-mail: sdliboqing@163.com

乔媛媛, E-mail: qiaoyuanyuan_888@163.com

【作者简介】 杨骊斓(2001-),女,陕西安康人,硕士,主要从事抗病毒研究。E-mail: 18291553563@163.com
杨骊斓与王欣为共同第一作者

者血液里分离出,命名为严重发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)^[2-3]。国际病毒分类学委员会于2019年将该病毒命名为大别班达病毒,该病毒属于布尼亚病毒目班达病毒科班达病毒属。蜱是SFTSV的主要传播媒介,且该病毒也可通过受感染的动物感染,以及接触人类急性期血液有限地传染^[4]。该病的主要症状是发热、白细胞减少和血小板减少,危重患者可出现多器官衰竭和死亡,死亡主要发生在50岁以上的患者,据报道死亡率平均为10%,目前尚无特异性的疫苗和药物^[5]。

SFTSV病毒颗粒呈球形,直径约80~100 nm,外有脂质包膜,表面覆盖有棘突,是一种单链负义有包膜的RNA病毒^[6]。与典型的布尼亚病毒相似,基因组包含三个单股负链RNA片段,分别为L、M和S片段。其中S片段编码核蛋白(nucleoprotein, NP)和一种非结构蛋白(nonstructural protein, NS),M片段编码病毒囊膜成分的2种糖蛋白(glycoprotein N, Gn和glycoprotein C, Gc),L片段编码RNA依赖的RNA聚合酶^[7]。与其他基因组编码的蛋白相比,NP最为保守,是SFTSV病毒颗粒和感染细胞中含量最丰富的蛋白,在病毒的转录和复制过程中发挥重要作用^[8]。具体来说,它们包裹并保护病毒基因组RNA不被外源性核酸酶和宿主细胞先天免疫系统降解^[9]。由于NP的高免疫原性和在感染细胞中的丰度,NP经常被选作酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测抗原和抗体的理想靶标。

本研究采用真核表达系统成功表达SFTSV的N蛋白,通过Ni-NTA柱对表达产物进行纯化处理。以纯化后的N蛋白为包被抗原,构建基于重组N蛋白的ELISA检测方法,可快速、灵敏地检测临床SFTS急性期血清中的NP抗体,可安全有效地用于SFTSV病毒感染的早期快速诊断。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株、质粒、细胞 *E. coli* DH5 α 感受态细胞购于昂羽生物。SFTSV的YTSD_01、21062204和21062205毒株的S基因序列为本实验室从SFTS急性期患者血清中分离并保存,Gn蛋白为本实验室表达纯化并保存。真核表达载体PHL-His购于Addgene。293T细胞由本实验室保存。收集SFTS急性期患者血清标本已通过滨州医学院伦理委员会论证通过。

1.2 主要试剂与抗体 限制性内切酶AgeI-HF和KpnI-HF购于北京NEB有限公司, FastPfu DNA聚

合酶购于北京全式金生物技术有限公司, T4 DNA连接酶、蛋白预染marker购于美国Thermo公司, HRP标记羊抗人Fab抗体购于上海优宁维生物科技有限公司, Mouse anti His-Tag Antibody购于武汉爱博泰克生物科技有限公司, HRP标记羊抗鼠IgG购于上海爱必信生物科技有限公司, 质粒大提试剂盒购于德国QIAGEN公司。

2 方法

2.1 SFTSV的S节段系统发育分析 通过PCR扩增了SFTSV不同毒株的S片段,对YTSD_01、21062204、21062205三株SFTSV病毒的S片段进行BLAST比对以及基因序列分析,使用MAGA 12.0软件通过邻近相接法(neighbor joining method, NJ)执行系统发育树,系统发育树结构可信程度使用Bootstrap method进行测试,重复次数设置为1 000次。最后用iTOL软件进行图像编辑。

2.2 目的基因的扩增 以SFTSV的YTSD_01的S段基因的质粒为模板进行N基因序列扩增,应用SnapGene软件设计N基因扩增引物,由擎科生物有限公司合成引物,设计的上下游引物分别为F: GGGGTACCCAGGTTTCCTGTAAGCAGC, S: GCACCGGTATGTCAGAGTGGTCCAG(下划线为酶切位点),扩增的片段大小为735 bp。PCR反应体系为:模板1 μ L,上下游引物各1 μ L, 2.5 mM dNTPs 4 μ L, FastPfu DNA聚合酶1 μ L, 5 $\times$ FastPfu Buffer 10 μ L, 无酶水32 μ L。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性2 min; 95 $^{\circ}$ C变性20 s, 58 $^{\circ}$ C退火20 s, 72 $^{\circ}$ C延伸12 s,共30个循环;72 $^{\circ}$ C终延伸5 min,最后扩增的PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定分析。

2.3 重组表达载体的构建及鉴定 将真核表达载体PHL-His和PCR扩增的SFTSV N基因产物用限制性内切酶AgeI-HF和KpnI-HF进行双酶切并回收。用T4 DNA连接酶将二者进行16 $^{\circ}$ C连接过夜,转化表达DH5 α 感受态细胞中,再涂布在含AMP的LB固体培养基上,37 $^{\circ}$ C培养18 h后,挑取单菌落扩大培养进行菌液PCR鉴定,并将验证成功的菌液送至擎科生物有限公司测序。提取测序成功的重组质粒命名为PHL-N保存。

2.4 N蛋白表达和Western blot检测 在6孔板中将测序正确的质粒转染到培养的293T细胞中,按照3 μ g:9 μ L的比例分别将重组质粒PHL-N与转染试剂稀释于125 μ L的无血清培养基中,混匀放入37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中,孵育12 h后更换新鲜培养基继续培养2~3 d后收集细胞上清,提前加1:1 000的蛋白酶抑制剂,12 000 g,4 $^{\circ}$ C,5 min离心。按照蛋白:5 $\times$ Loading Buffer=4:1混合样本,金属浴100 $^{\circ}$ C煮沸5

min, 冰上冷却, 上样进行 SDS-PAGE 电泳, 切出含待转膜蛋白的凝胶转至硝酸纤维膜(NC膜), 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 洗膜 3 次。加入一抗(Mouse anti His-Tag Antibody, 1:10 000), 4℃过夜, 洗膜 3 次。加入二抗(HRP 标记羊抗鼠 IgG, 1:10 000), 室温摇床避光孵育 1 h, 洗膜 3 次。将 NC 膜铺在全自动化学发光成像仪平板上, 表面均匀滴上 ECL 发光液, 曝光显影。

2.5 SFTSV 的 N 蛋白的纯化 将测序正确的质粒进行大量扩增, 将验证成功的重组菌株转移进 4 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃振荡过夜, 全部接种于 200 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃摇床振荡过夜, 大提质粒按照 QIAGEN 试剂盒说明进行。使用 293T 细胞表达重组质粒 PHL-N, 将其接种于 10 cm 的细胞培养皿中, 按照 12 μg:36 μL 的比例分别将重组质粒与转染试剂稀释于 500 μL 的无血清培养基中, 培养条件同上, 于 48 h、72 h 各收 100 mL 细胞上清, 经 Ni-NTA 柱纯化, 依次用 20 mL 的 PBS、20 mM 咪唑、50 mM 咪唑洗杂, 再以 250 mM 咪唑洗脱蛋白, 最后通过 10 K 超滤管将咪唑用 PBS 置换出来。经 12% SDS-PAGE 分离, 通过考马斯亮蓝染色验证后将纯化的蛋白放入 4℃分装保存。

2.6 SFTSV 的 N 抗体 ELISA 检测方法的建立 按照 ELISA 的基本操作步骤, 用 0.05 M pH9.6 的 NaHCO₃ 包被缓冲液将纯化的 SFTSV 的 N 蛋白进行倍比稀释, 包被酶标板, 按每孔 10、5、2、1、0.1 μg/mL 浓度的 N 蛋白包被反应板, 每孔加 50 μL, 4℃包被过夜; 第二天用 PBST 洗板 1 次并拍干, 每孔加 5% 脱脂乳 37℃封闭 2 h, 弃掉封闭液后 PBST 洗板 2 次拍干; SFTSV 阳性血清作 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 系列稀释, 每孔 50 μL, 37℃作用 1 h, 弃掉后 PBST 洗板 3 次拍干; 二抗(HRP 标记羊抗人 Fab 抗体)按 1:10 000 比例稀释, 37℃作用 1 h, 弃掉后 PBST 洗板 3 次拍干; 每孔加入 50 μL TMB 底物显色 25 min, 最后加入 50 μL 的 2 M H₂SO₄ 终止显色, 测定每孔的 OD₄₅₀ 值进行比较。根据 P/N 值(positive/negative ratio, P/N)确定最佳的抗原包被浓度和血清稀释度。

按照确定的最佳抗原浓度包被酶标板, 在最佳血清稀释度的作用条件下依次对 5% 脱脂乳封闭时间(1 h、1.5 h、2 h)、血清孵育时间(30 min、1 h、2 h)、二抗稀释倍数(1:5 000、1:10 000、1:20 000)、二抗孵育时间(30 min、1 h、2 h)、底物显色时间(10 min、25 min、30 min)。利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 根据 P/N 值确定最佳反应条件。

2.7 敏感性与重复性试验 将 SFTSV 阳性血清进行倍比稀释(1:20、1:50、1:100、1:200、1:500、1:

:800、1:1 600、1:3 200), 根据该 ELISA 检测方法来评估本试验的敏感性。

随机抽取 6 份血清样本, 每份样本均设置 3 组平行试验, 并重复进行 2 次。随后, 利用 ELISA 进行检测分析, 通过计算变异系数以评估该检测方法在同批次实验中的重复性表现。此外, 另行随机选取 6 份血清样本, 分别在 3 个不同时间节点进行 ELISA 检测, 同样计算变异系数, 用以评估该检测方法在不同批次实验间的重复性特征。

2.8 临床样品检测 应用本研究建立的 SFTSV 的 N 蛋白 ELISA 方法, 与 SFTSV 的 Gn 蛋白 ELISA 方法比较, 检测急性期和恢复期患者血清样本共 22 份^[10], 检测样本阳性率。

结 果

1 系统发育进化树分析

为了验证 N 蛋白的跨基因型保守性, 本研究基于本实验室分离的 YTSD_01、21062204 和 21062205 的 S 节段三个基因序列构建系统发育进化树, 他们共同属于 C2 进化枝, 其中 YTSD_01 是本次纯化 N 蛋白所用的基因序列(加粗字体标注)。由(图 1)可见, 所有序列共享核心区域, 高支持度分支较多且覆盖不同基因型, 分支间遗传距离小, 证明 N 蛋白作为诊断抗原的普适性, 其跨基因型和地理区域的高保守性确保使用 N 蛋白检测方法的广泛适用性。

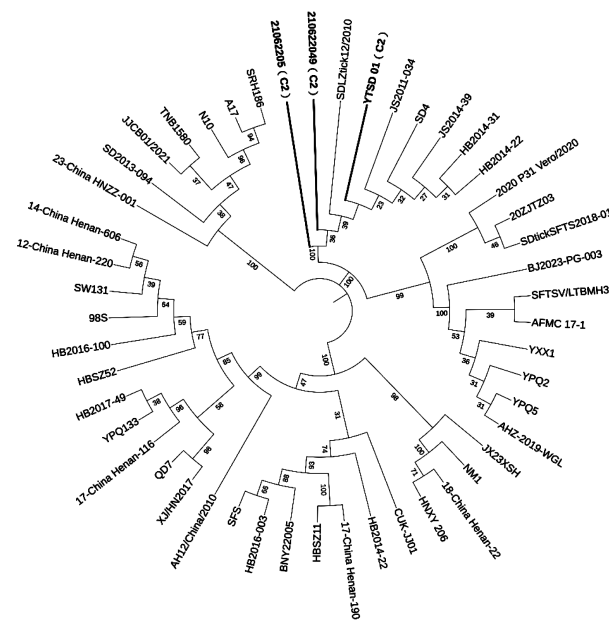


图 1 基于三个 SFTSV S 片段序列的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on three S segment sequences of SFTSV

2 重组质粒的构建

利用合成的 N 基因为模板, 进行 PCR 扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 得到约 735 bp 左右

的目的条带,与预期结果大小一致(图 2A)。将 SFTSV N 基因克隆至 PHL-His 载体中,经限制性内切酶 AgeI-HF 和 KpnI-HF 双酶切鉴定,酶切产物包含 5 000 bp 左右的载体片段和 700 bp 左右的目的基因片段(图 2B)。T4 DNA 连接酶连接完成载体构建,继续转化入感受态细胞培养,选单菌落摇菌进行菌液 PCR 鉴定(图 2C),测序结果与预期相符,确为目的重组质粒。

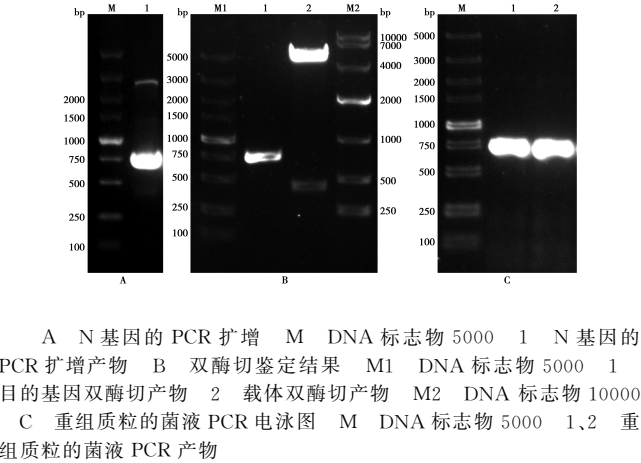


图 2 重组质粒 PHL-N 的构建与鉴定

Fig. 2 Construction and Identification of Recombinant Plasmid PHL-N

3 重组蛋白的制备

重组质粒表达目的蛋白,SDS-PAGE 结果显示,此蛋白在 293T 细胞上清中表达量高,在 27 kDa 处有明显条带,说明 N 蛋白表达成功(图 3A)。镍柱亲和层析获得高纯度目的蛋白,纯化结果显示单一条带,说明纯化效果好(图 3B)。

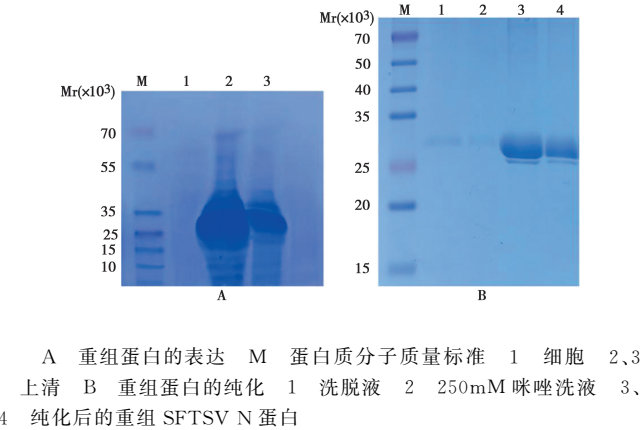


图 3 重组蛋白的表达与纯化

Fig. 3 Expression and Purification of Recombinant Proteins

4 ELISA 检测方法反应条件优化

优化 SFTSV 的 N 抗体 ELISA 检测方法,其中 P/N 值 ≥ 2.1 为阳性,图中阳性对照抗体为具有中和能力的 L9 多克隆抗体。结果显示,本方法的最佳反应条件为:抗原包被浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 4A);5%脱脂乳 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;待检测血清稀释度为 1 : 50(图 4B),

37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;以 HRP 标记的羊抗人 Fab 抗体作为酶标二抗,稀释度为 1 : 10 000,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,TMB 避光显色 25 min。

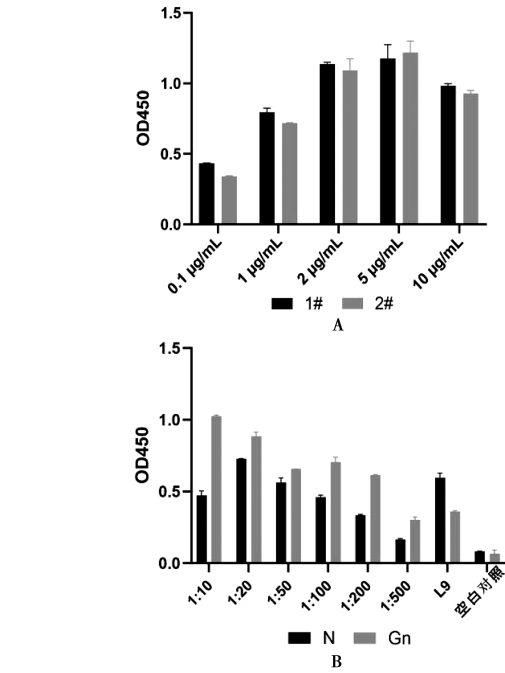


图 4 SFTSV 的 N 抗体 ELISA 检测方法优化

Fig. 4 Optimization of the N Antibody of SFTSV by ELISA Detection Method

5 敏感性试验结果

采用系列稀释法对 SFTSV 阳性血清进行检测,实验数据显示当稀释浓度达到 1 : 3 200 时,其阳性判定值(P/N)仍稳定保持在 2.1 以上,符合血清学检测阳性阈值标准,说明该方法的敏感性指标满足血清学检测的要求(图 5)。

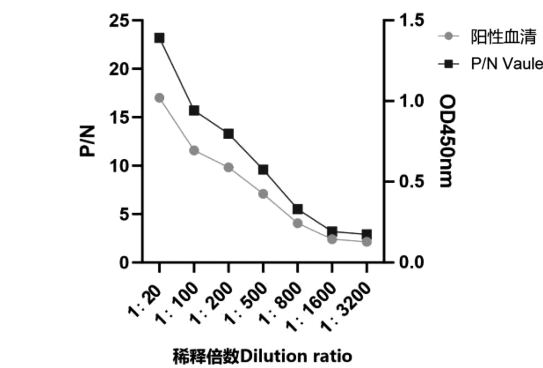


图 5 敏感性试验结果

Fig. 5 Results of sensitivity test

6 重复性试验结果

随机选择 6 份血清样品,每份做 3 个重复,共重复 2 次。利用 ELISA 进行检测,计算批内重复性试验变异系数。选择 6 份血清样品,于 3 个不同时间,利用

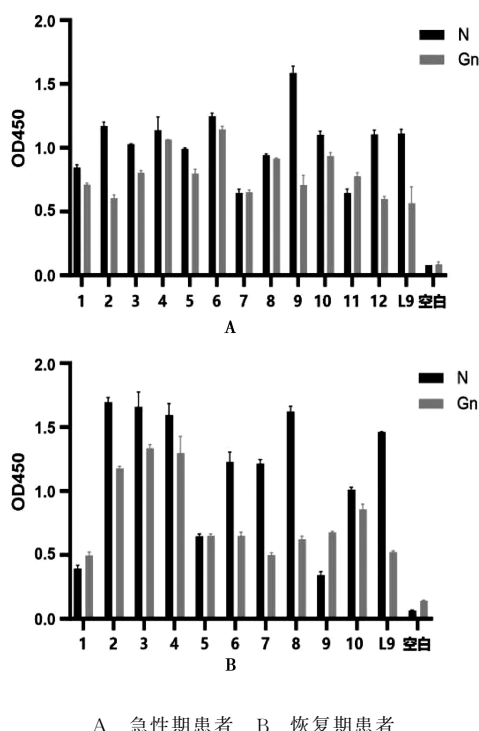
ELISA 进行检测,计算批间重复性试验变异系数。本研究建立的 ELISA 检测方法经方法学验证,其批内分析显示变异系数低于 10%,批间评估结果稳定控制在 15% 以内,符合体外诊断试剂重复性验证标准(表 1),说明该方法重复性好,试验操作稳定性好,实验条件重复性好。

表 1 重复性试验结果
Table 1 Results of repeatability test

编号	批内重复性		批间重复性	
	$\bar{x} \pm s$	CV(%)	$\bar{x} \pm s$	CV(%)
1	1.53 ± 0.04	2.42	1.27 ± 0.17	13.72
2	0.83 ± 0.01	1.71	0.74 ± 0.07	9.49
3	0.79 ± 0.05	6.31	1.56 ± 0.11	7.29
4	1.48 ± 0.04	2.89	0.56 ± 0.04	6.43
5	0.75 ± 0.03	4.32	0.44 ± 0.04	9.27
6	0.44 ± 0.04	9.39	0.76 ± 0.09	12.49

7 临床样品检测应用结果

利用建立的 SFTSV 的 N 蛋白 ELISA 检测方法,对山东省胶东地区采集的急性期(图 6A)和恢复期(图 6B)患者的 22 份临床血清样品进行检测,并且与 SFTSV Gn 蛋白的 ELISA 检测方法做出比较。结果显示,N 蛋白在临床急性期血清样本中表现出更高的灵敏度,且适合早期诊断,尽管 Gn 蛋白在中和抗体研究具有重要价值,但其在 ELISA 中的实际应用受限于表达难度、基因型特异性及检测灵敏度,更适合作为辅助诊断或治疗性抗体开发的靶点。



A 急性期患者 B 恢复期患者
图 6 SFTSV N 蛋白 ELISA 检测方法在急性期和恢复期患者血清水平检测中的应用

Fig. 6 Application of the SFTSV N protein ELISA detection method in the detection of serum levels during the acute and convalescent phases of patients

讨论

2007 年在河南省信阳市首次发现 SFTS,随后在中国其他省份也相继有相似的病例出现^[11]。2012 年韩国确认了国内 SFTS 的病例,2013 年日本报道了 SFTS 病例^[12-13]。SFTS 流行范围广,致死率高,流行特点多为散发,但有明显的地区集聚性,在中国,SFTS 主要在中部和东部地区流行。截至 2019 年底,中国、韩国和日本共报告 SFTS 患者超过 1.45 万例^[14]。由于 SFTS 病例数的增加和疾病流行区域的扩大,引起了极大的关注,从当前的研究来看,我国有相应的防治方案与专家共识,但尚无特异性治疗手段,主要为对症支持治疗,该病毒对人类仍然造成公共卫生威胁,因此优化相较于传统诊断更敏感、更快速的诊断方法对控制 SFTSV 的传播具有重要意义。

SFTS 患者临床表现与多种发热性疾病存在显著相似性,导致单纯依靠临床症状进行鉴别诊断的准确性不足。病毒分离培养作为确诊的金标准虽具理论优势,但其操作复杂性高、生物安全风险显著,加之检测周期超过常规诊疗窗口期,致使该方法在临床实践中的应用受到严格限制^[15-17],且携带的细胞成分可能对后续的检测产生干扰。为了提高诊断的准确性,采用核酸检测技术检测血液中的 SFTSV 基因组,如实时定量 RT-PCR^[18-19]、逆转录介导的等温扩增法(RT-LAMP)^[20-21]等。但由于 SFTSV 感染的病毒血症持续时间短,对于发病大于 1 周的患者,核酸检测技术并不适用,此时诊断需要 SFTSV 抗体的检测^[22]。

在本研究中,我们利用真核分泌型载体 PHL-His 表达 N 蛋白,利用其信号肽序列引导重组蛋白分泌至细胞外。相比原核表达系统,真核分泌表达可减少包涵体形成,提高蛋白可溶性,分泌到培养基中的蛋白更易纯化,无需破碎细胞,降低内毒素污染风险。与非分泌型真核载体相比,分泌型载体可显著提高蛋白产量。其次利用 293T 细胞的高效表达,转染效率高,分泌蛋白能力强。加上通过基于 His 标签的镍柱亲和层析将重组蛋白纯化,更有利于蛋白折叠,提高镍柱亲和层析效率,蛋白表达及纯化过程简单,且纯化的蛋白产量大、浓度高,并将其用作 ELISA 中测定 SFTS 患者血清中特异的抗体,证明了其有良好的反应原性。以重组 N 蛋白建立 SFTSV 抗体的 ELISA 检测方法,经敏感性、重复性试验证实了该检测方法有良好的应用价值。

N 蛋白是病毒颗粒中含量最丰富的蛋白,在感染过程中大量表达。具有高免疫原性,其线性表位高度暴露,易被免疫系统识别,可诱导强烈的体液免疫反应^[23-24]。N 蛋白抗体在感染早期即可检出,适合早期

诊断。尽管 Gn 蛋白抗体具有中和活性,但其滴度在感染后期才显著升高,且依赖病毒载量,不适合作为早期诊断指标。而 N 蛋白抗体水平与病毒血症呈正相关,可用于病情监测。用 N 蛋白进行包被时,使用的包被质量浓度较其他蛋白低,可降低检测成本,且待测样品上样量低,便于临床样品的采集,为了确定这些检测方法在临床上的性能,还需要进一步的研究检测来自人类和动物的大量样本。

综上,本研究成功建立了快速检测临床 SFTS 急性期血清样本的病原学诊断方法,可用于检测临床急性期患者血清中的特异性抗体,实现 SFTS 的早期快速诊断,其检测结果与临床诊断具有显著一致性。实验结果表明,该方法采用简便的操作流程,具备良好的安全性和可重复性,适用于临床实验室常规开展。

【参考文献】

- [1] Liu Q, He B, Huang SY, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8): 763-772.
- [2] Zhang L, Liu Y, Ni D, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China [J]. *Jama*, 2008, 300(19): 2263-2270.
- [3] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [4] Chen H, Hu K, Zou J, et al. A cluster of cases of human-to-human transmission caused by severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus [J]. *Int J Infect Dis*, 2013, 17(3): e206-e208.
- [5] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China [J]. *New Eng J Med*, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [6] Lu J, Li C, Zhang FS, et al. Expression of structural and non-structural proteins of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus [J]. *Chinese J Virol*, 2011, 27(6): 515-520.
- [7] Silvas JA, Aguilar PV. The emergence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2017, 97(4): 992.
- [8] Wang G, Chang H, Jia B, et al. Nucleocapsid protein-specific IgM antibody responses in the disease progression of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *Ticks Tick-Borne Dis*, 2019, 10(3): 639-646.
- [9] Walter CT, Costa Bento DF, Guerrero Alonso A, et al. Amino acid changes within the Bunyamwera virus nucleocapsid protein differentially affect the mRNA transcription and RNA replication activities of assembled ribonucleoprotein templates [J]. *J General Virol*, 2011, 92(1): 80-84.
- [10] Umeki K, Yasuda A, Umekita K, et al. Detection of anti-SFTSV nuclear protein antibody in the acute phase sera of patients using double-antigen ELISA and immunochromatography [J]. *J Virol Method*, 2020, 285: 113942.
- [11] Bao C, Guo X, Qi X, et al. A family cluster of infections by a newly recognized bunyavirus in eastern China, 2007: further evidence of person-to-person transmission [J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(12): 1208-1214.
- [12] Choi SJ, Park SW, Bae IG, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome in South Korea, 2013-2015 [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(12): e0005264.
- [13] Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan [J]. *J Infect Dis*, 2014, 209(6): 816-827.
- [14] Chen S, Xu M, Wu X, et al. A new luciferase immunoprecipitation system assay provided serological evidence for missed diagnosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *Virol Sinica*, 2022, 37(1): 107-114.
- [15] Umeki K, Yasuda A, Umekita K, et al. Detection of anti-SFTSV nuclear protein antibody in the acute phase sera of patients using double-antigen ELISA and immunochromatography [J]. *J Virol Method*, 2020, 285: 113942.
- [16] Xu B, Liu L, Huang X, et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus [J]. *PLoS pathog*, 2011, 7(11): e1002369.
- [17] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China [J]. *New Eng J Med*, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [18] Matsuu A, Hamakubo E, Yabuki M. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals in Kagoshima Prefecture, Japan, and development of Gaussia luciferase immunoprecipitation system to detect specific IgG antibodies [J]. *Ticks Tick-Borne Dis*, 2021, 12(5): 101771.
- [19] Park E, Fujita O, Kimura M, et al. Diagnostic system for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA from suspected infected animals [J]. *PLoS One*, 2021, 16(1): e0238671.
- [20] Lee JW, Won YJ, Kang LH, et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification method for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. *J Microbiol*, 2020, 58: 711-715.
- [21] Sano S, Fukushi S, Yamada S, et al. Development of an RT-LAMP assay for the rapid detection of SFTS virus [J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 693.
- [22] 张梦瑶, 梁天来, 闫飞虎, 等. 发热伴血小板减少综合征病毒 Gn 蛋白 D III-III 的表达与抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2024, 44(8): 1704-1712.
- [23] Yu F, Le MQ, Inoue S, et al. Evaluation of inapparent nosocomial severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in Vietnam by use of highly specific recombinant truncated nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2005, 12(7): 848-854.
- [24] Yu F, Khairullah NS, Inoue S, et al. Serodiagnosis using recombinant Nipah virus nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli* [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3134-3138.

【收稿日期】 2025-04-25 【修回日期】 2025-07-17