

中图分类号: R392
UDC: 614
学科专业代码: 105300

学校代码: 10660
学 号: 2021120040830
密 级: 公开

貴州醫科大學

2024 届硕士学位论文

(专业学位)



发热伴血小板减少综合征病毒环境稳定性及 遗传多样性研究

Research on the environmental stability and genetic
diversity of severe fever with thrombocytopenia
syndrome virus

研 究 生: 杨晓艺

指导教师: 谢 春 教 授

李建东 研究员

年 级: 2021 级

专 业: 公共卫生

提交日期: 二〇二四年五月

中图分类号: R392
UDC: 614
学科专业代码: 105300

学校代码: 10660
学号: 2021120040830
密级: 公开

贵州医科大学

2024届硕士学位论文

(专业学位)

发热伴血小板减少综合征病毒环境稳定性及
遗传多样性研究

Research on the environmental stability and genetic
diversity of severe fever with thrombocytopenia
syndrome virus

论文作者: 杨晓艺

指导教师: 谢春教授

李建东 研究员

申请学位: 公共卫生硕士

培养单位: 公共卫生与健康学院

学科专业: 公共卫生

研究方向: 疾病预防与控制

研究起止日期: 2022年3月至2024年5月

答辩委员会主席: 黎东霞

论文答辩日期: 2024年5月28日

目 录

前言.....	1
第一部分 发热伴血小板减少综合征病毒环境稳定性研究.....	5
1 材料.....	5
2 方法.....	7
3 结果.....	11
4 讨论.....	15
5 结论.....	17
第二部分 发热伴血小板减少综合征病毒遗传多样性研究.....	18
1 材料.....	18
2 方法.....	22
3 结果.....	36
4 讨论.....	53
5 结论.....	56
参考文献.....	57
综述 发热伴血小板减少综合征研究进展.....	67
参考文献.....	74

发热伴血小板减少综合征病毒环境稳定性及遗传多样性研究

专业：公共卫生 学号：2021120040830 研究生：杨晓艺

导师：谢春 李建东

摘要

目的：

发热伴血小板减少综合征（severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS）是一种新发急性病毒性人畜共患传染病，早期以发热、血小板减少、白细胞减少和胃肠道异常为主要表现，可引发感染者发生全身器官衰竭甚至死亡，目前尚无有效疫苗或特异性治疗药物。本研究分析了SFTS病毒（SFTS virus, SFTSV）的遗传多样性及地理分布特征，探索病毒在体外活性的消减规律和在蜱虫体内的带毒传播情况，进一步拓展对SFTSV经接触传播以及蜱虫叮咬传播的认知，为深入了解蜱及蜱传病毒情况以及制定有效预防病毒传播的防控措施提供科学依据和参考。

方法：

（1）发热伴血小板减少综合征病毒环境稳定性研究：以SFTSV代表株HB29为对象，利用组织细胞培养板、冻存管、硬币、无纺布、塑料制品和办公用纸等材料，通过实时荧光定量PCR和空斑试验探索病毒在环境中不同介质表面的稳定性及其影响因素。

（2）发热伴血小板减少综合征病毒遗传多样性研究：①ViPR数据库下载2010~2023年全球SFTS病毒的L片段基因序列，经整理后，构成序列数据集并进行序列比对、系统发育树构建，根据发育树进化枝距离划分为不同的基因型并进行核苷酸序列的相似性比较，分析各基因型地理分布特征；②动物体表检蜱法及布旗法采集安徽省六安市地区的寄生蜱和游离蜱，形态鉴定后根据其种类及状态重新分管研磨，采用高通量测序和实时荧光定量PCR法进行蜱虫样本核酸检测，绘制系统发育树并对不同序列之间核苷酸序列的同源性进行分析，阐述蜱虫媒介携带病毒的多样性；③NCBI网站下载肩突硬蜱唾液腺蛋白（Isac）目的基因组序

列, 通过双酶切及同源重组方法构建PET30a-Isac质粒并经原核表达制备该蛋白, 使用SDS-PAGE和Western blot方法对表达产物及蛋白进行鉴定, 初步建立蜱虫唾液腺蛋白特异性抗体的检测方法。

结果:

(1) 发热伴血小板减少综合征病毒的环境稳定性: SFTSV扩增测得滴度为 4.5×10^6 PFU/mL, 在室温(约25 °C)自然通风干燥条件下, 于硬币、塑料等介质表面的SFTSV感染性滴度24 h内显著下降分别约 $10^{4.46}$ 倍和 $10^{4.60}$ 倍, 于无纺布和纸张表面的SFTSV感染性滴度6 h内就下降分别约 $10^{3.82}$ 倍和 $10^{4.12}$ 倍。置于密闭湿润环境中的SFTSV感染性可维持长时间的稳定, 24 h病毒感染性滴度下降不明显, 1周内下降约 $10^{1.49}$ 倍, 在3周时仍可通过细胞培养分离到感染性病毒颗粒, 4周后失去了感染性; 而SFTSV处于4 °C时, 感染性保持相对稳定, 4周后, 病毒感染性滴度下降仅约 $10^{2.09}$ 倍, 仍可通过细胞分离培养扩增病毒。当病毒处于干燥状态时, 喷洒75%酒精作用1 h可灭活病毒, 非干燥状态下75%酒精则不能高效灭活病毒。

(2) 发热伴血小板减少综合征病毒的遗传多样性: ①SFTS病毒L片段分为6个进化枝, 根据遗传距离, 可命名为基因型A-F, 各基因型内的核苷酸相似性分别为A: 98.5%~99.7%、B: 96.9%~99.8%、C: 98.4%~99.9%、D: 96.1%~99.7%、E: 97.7%~99.8%、F: 95.9%~99.7%。A、B、E、F基因型占SFTSV分离株的97%以上, 报告最多的基因型A已出现在中国河南、湖北、江苏、辽宁、安徽、山东、河北、新疆等8个SFTSV流行省份以及韩国; E基因型在我国分布最广, 14个报告SFTS病例的省份中就有10个省报道了E基因型。B基因型也主要在我国流行, 以河南、湖北、山东、辽宁报告病例居多。F基因型在日本(93.14%)、韩国(88.57%)及我国浙江省(65.95%)具有明显的流行优势, 此外, 泰国也发现了一株。目前, D和C基因型也少量公布了毒株序列, D基因型出现8株, C基因型仅见于中国湖北、山东、江苏和河南。②本研究共采集蜱虫171只, 寄生蜱162只, 游离蜱9只, 长角血蜱为优势蜱种占64.33%。SFTSV感染阳性率为2.9%, 其中长角血蜱最低感染率为3.64%。经高通量测序获得三个片段分别为6522 bp、2014 bp和10306 bp的未知病毒序列, 与GenBank数据库中的序列进行同源性比较并与ViPR数据库发表的其他蜱传病毒序列进行系统发育树分析, 验证其中两个病毒为白蛉病毒科,

一个病毒为弹状病毒科。③成功构建PET30a-Isac质粒并选择IPTG诱导剂诱导目的蛋白表达。SDS-PAGE结果显示,目的蛋白在原核表达系统中得到了高效表达,并具有较高的纯度。将表达的蛋白进行纯化后进一步采用Western blot检测方法证实了目标蛋白的表达。

结论:

(1) 在对SFTS病毒环境稳定性研究中发现,外界环境中的温度、物体表面材料性质、通风干燥程度及消毒情况与SFTSV的生存能力相关,研究有助于增进对SFTSV接触传播风险的理解。

(2) SFTS病毒具有遗传多样性的特点,其L片段可分为A-F六个基因型且在广泛的地理区域内共同传播,具有在人畜间跨种传播及跨越海洋传播的能力,应加强对SFTS的监测;对蜱虫样本检测发现,长角血蜱为本次采集样本的优势蜱种,与SFTSV的传播密切相关,检出5份SFTSV核酸阳性样本及发现三株其他科蜱传病毒,提示居民应做好个人防护,避免因蜱叮咬而引起病毒感染;成功构建表达了PET30a-Isac蛋白,为建立蜱唾液腺蛋白特异性抗体检测方法奠定基础,为解读蜱传疾病的传播共性进行了初步的探索。

关键词:

发热伴血小板减少综合征病毒;基因型地理分布;稳定性;蜱虫;多样性

Research on the environmental stability and genetic diversity of Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus

ABSTRACT

Major: MPH Student ID:2021120040830 Candidate: Xiaoyi Yang

Supervisor: Chun Xie Jiandong Li

Objective:

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is a newly emerging acute viral zoonotic infectious disease. In the early stages, it is characterized by fever, thrombocytopenia, leukopenia, and gastrointestinal abnormalities. It can cause systemic organ failure and even death in infected individuals. Currently, there is no effective vaccine or specific treatment for SFTS. This study analyzed the genetic diversity and geographical distribution characteristics of the SFTS virus (SFTSV), explored the attenuation pattern of virus activity in vitro, and the transmission of the virus in ticks. It further expands our understanding of the contact and tick-borne transmission of SFTSV, providing scientific evidence and reference for a deeper understanding of ticks and tick-borne viruses and the development of effective prevention and control measures against virus transmission.

Methods:

(1) Research on the environmental stability of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: Using the representative strain HB29 of SFTSV as the object, various materials such as tissue cell culture plates, cryovials, coins, non-woven fabrics, plastic products, and office paper were used to explore the stability of the virus on different media surfaces in the environment and its influencing factors through real-time fluorescence quantitative PCR and plaque assay.

(2) Study on the genetic diversity of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: ①Download the L segment gene sequences of SFTS virus worldwide from 2010 to 2023 from the ViPR database, organize them into a sequence

dataset, perform sequence alignment and phylogenetic tree construction, divide them into different genotypes based on the evolutionary branch distance of the phylogenetic tree, and compare the nucleotide sequence similarity of each genotype to analyze the geographical distribution characteristics of each genotype; ②The animal surface tick collection method and flagging method were used to collect parasitic and free-living ticks in the Lu'an area of Anhui Province. After morphological identification, they were re-divided and ground according to their species and status. High-throughput sequencing and real-time fluorescence quantitative PCR were used to detect tick samples' nucleic acids. A phylogenetic tree was drawn, and the homology of nucleotide sequences between different sequences was analyzed to elucidate the diversity of tick-borne virus transmission; ③Download the target genome sequence of the Isac protein from the salivary gland of the hard tick on the NCBI website, construct the PET30a-Isac plasmid using double enzyme digestion and homologous recombination methods, and prepare the protein by prokaryotic expression. The expression product and protein were identified using SDS-PAGE and Western blot methods, and a detection method for specific antibodies against tick salivary gland proteins was established.

Results:

(1) Environmental stability of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: The titer of SFTSV was measured to be 4.5×10^6 PFU/mL, under natural ventilation and drying conditions at room temperature (about 25 °C), the infectious titer of SFTSV on the surfaces of coins, plastics, and other media decreased significantly by about $10^{4.46}$ and $10^{4.60}$ times, respectively, within 24 hours, while the infectious titer on non-woven fabrics and paper surfaces decreased by about $10^{3.82}$ and $10^{4.12}$ times within 6 hours. The infectious SFTSV can maintain long-term stability in a closed humid environment, with no significant decrease in viral titer within 24 hours, a decrease of about $10^{1.49}$ times within one week, and still being able to be isolated and cultured in infectious virus particles after three weeks, but losing infectivity after four weeks. When SFTSV is at 4 °C, its infectivity remains relatively stable, with a decrease of only about $10^{2.09}$ times in viral titer after four weeks, and the

virus can be amplified by cell isolation and culture. The state of SFTSV on the surface of objects affects the effectiveness of alcohol disinfection. When the virus is in a dry state, spraying 75% alcohol for 1 h can inactivate the virus, while 75% alcohol can not effectively inactivate the virus in a non-dry state.

(2) Genetic diversity of severe fever with thrombocytopenia syndrome

virus: ①The SFTS virus L segment is divided into six evolutionary branches, which can be named genotypes A-F based on genetic distance. The nucleotide similarities within each genotype are as follows: A: 98.5%~99.7%, B: 96.9%~99.8%, C: 98.4%~99.9%, D: 96.1%~99.7%, E: 97.7%~99.8%, and F: 95.9%~99.7%. Genotypes A, B, E, and F account for over 97% of SFTSV isolates, with genotype A being the most reported in eight SFTSV endemic provinces in China, including Henan, Hubei, Jiangsu, Liaoning, Anhui, Shandong, Hebei, and Xinjiang, as well as in South Korea. Genotype E has the widest distribution in China, with 10 out of 14 provinces reporting SFTS cases reporting this genotype. Genotype B is also prevalent in China, with most cases reported in Henan, Hubei, Shandong, and Liaoning. Genotype F has a clear advantage in Japan (93.14%), South Korea (88.57%), and Zhejiang Province in China (65.95%), and one strain has also been found in Thailand. Currently, the sequences of a small number of strains of genotypes D and C have been published, with eight strains of genotype D appearing and genotype C only being found in Hubei, Shandong, Jiangsu, and Henan provinces in China. ②A total of 171 ticks were collected in this study, including 162 parasitic ticks and 9 free ticks. *Haemaphysalis longicornis* was the dominant tick species, accounting for 64.33%. The positive rate of SFTSV infection was 2.9%, and the lowest infection rate of *Haemaphysalis longicornis* was 3.64%. Three unknown virus sequences with fragments of 6522bp, 2014bp and 10306bp were obtained by high-throughput sequencing. Homology comparisons were made with the sequences in GenBank database and phylogenetic tree analysis was performed with the sequences of other tick-borne viruses published in ViPR database. Two of the viruses were confirmed to be Phenuiviridae. One virus is Rhabdoviridae. ③Successfully constructed PET30a-Isac plasmid and induced the expression of the target protein using IPTG inducer. SDS-PAGE results showed that

the target protein was efficiently expressed in the prokaryotic expression system and had high purity. After purifying the expressed protein, Western blot detection method was used to confirm the expression of the target protein, and a preliminary specific antibody detection method was established.

Conclusions:

(1) In the study on the environmental stability of SFTSV, the temperature, surface material properties of objects, ventilation and drying degree, and disinfection status in the external environment are related to the survival ability of SFTSV. This research helps to enhance understanding of the risk of SFTSV contact transmission.

(2) SFTS virus has the characteristics of genetic diversity, and its L segment can be divided into six genotypes (A-F) and is widely spread in various geographical regions, with the ability to cross-species transmission between humans and animals and even cross oceans, so monitoring of SFTS should be strengthened. Tests on tick samples found that, the *Haemaphysalis longicornis* is the dominant tick species in the collected samples and is closely related to the transmission of SFTSV. The detection of 5 positive samples of SFTSV nucleic acid and three strains of other tick-borne viruses suggest that residents should take personal protection to avoid virus infection caused by tick bites. The PET30a-Isac protein was successfully constructed and expressed in prokaryotes. It provided the basis for establishing the detection method of tick salivary gland protein specific antibody and provided a preliminary exploration for understanding the commonality of tick-borne diseases.

Key Words:

Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; genotype geographic distribution; stability; tick; diversity

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
BRBV	Bourbon virus	波旁病毒
CCHFV	Crimean-Congo hemorrhagic fever virus	克里米亚-刚果出血热病毒
CTFV	Colorado tick fever virus	科罗拉多蜱热病毒
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EYAV	Eyach virus	埃亚契病毒
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HRTV	Heartland banyangvirus	心脏地带病毒
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光
Isac	Ixodes scapularis anticomplement protein	蜱唾液抗补体蛋白
KDa	Kilo Dalton	千道尔顿
kana	Kanamycin	卡那霉素
MIR	Minimum Infection Rate	最低感染率
ML	Maximum Likelihood	最大似然法
MOI	Multiplicity of infection	病毒感染复数
NJ	Neighbor-joining	邻位相接法
NP	Nucleocapsid protein	核衣壳蛋白
NS	nonstructural protein	非结构蛋白
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction	实时荧光多聚核苷酸链式 反应
SFTSV	severe fever with thrombocytopenia syndrome virus	发热伴血小板减少综合征 病毒
THOV	Thogoto virus	索戈托病毒
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

发热伴血小板减少综合征病毒环境稳定性及遗传多样性研究

前言

发热伴血小板减少综合征病毒（SFTSV）为分节段的单股负链 RNA 病毒，属于白蛉纤细病毒科（Phenuiviridae）班达病毒属（Bandavirus genus），分类名为大别班达病毒（Dabie Bandavirus）^[1]，该病毒是一种球状单股负链 RNA 病毒，直径为 80~100 nm，具有脂质包膜和分节段的特征，其基因组由 L、M 和 S 三个单链 RNA 片段组成^[2]：L 片段编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶（RdRp），调控 RNA 的复制和 mRNA 的合成；M 片段编码糖蛋白前体（Gn 和 Gc），参与 SFTSV 的早期感染和病毒颗粒形成；S 片段使用双义转录方式编码 S 片段编码核蛋白（NP）和非结构蛋白（NS），以形成核糖核蛋白复合物并且能够在感染和转染的细胞中形成病毒样颗粒结构，这些基因片段在 SFTSV 的感染、复制和病毒颗粒形成中扮演着一个关键的角色^[3,4]。该病毒于 2010 年在中国首次发现，人类感染该病毒会引起发热伴血小板减少综合征疾病，其临床症状可从早期轻度的发热伴血小板减少和白细胞显著下降发展到重度腹泻、脑炎或多器官衰竭直至死亡，病死率可高达 30%，并因流行病学和环境因素而存在差异^[5-7]，目前中国已有 27 个省 154 个地级市 533 个县（区）报告了 SFTS 确诊病例，年均发病率为 0.125/10 万，年均病死率为 5.11%，且日本和韩国报道也比较高^[8-11]。SFTSV 感染病例数量急剧增加，影响其传播扩散的风险因素多种多样，有研究证实，从事农业活动的人群是 SFTSV 高感染人群，春末至夏季（5 月至 7 月）是蜱虫种群达到高峰时期，也是感染风险最高的时期^[12, 13]；此外，温度、地形、土地利用等环境条件也是 SFTSV 感染的风险因素^[14, 15]，韩国一项研究提到，森林砍伐破坏环境会改变病媒生态系统^[16]，增加人与野生动物的接触，从而加大疾病传播的风险^[17]。

SFTS 发病率在区域之间存在差异。在中国大陆之外，日本（2012）^[18]、韩国（2013）^[19]、越南（2017）^[20]、台湾（2019）^[21]、缅甸（2019）^[22]和泰国（2020）^[23]均报告了本地传播病例，发病人数和累及地区呈不断扩大趋势^[24, 25]。考虑到其在公共卫生中的临床和流行病学意义，世界卫生组织（WHO）将该病毒列为

最具威胁性的病原体之一。目前对 SFTSV 的分子进化和遗传特性的研究还很有限，SFTSV 基因型别的确定也尚未达到共识。许多研究通过收集 SFTSV 分离株的基因组信息，构建系统发育树，检测关键突变，分析了 SFTSV 在中国、日本和韩国这三个受影响最严重的国家的遗传多样性、分子进化和传播，将其分为三个谱系^[26]，或五个^[27-29]、六个^[30, 31]基因型。关于 SFTSV 的演化历史和合并分析，由于不同研究所用的模型差异很大，导致结论也有很大差异，值得注意的是，这些研究中没有或很少包括来自日本和韩国的 SFTSV 毒株。此外，在 GenBank 数据库中，SFTSV 的全长基因组序列数据相对较少，且菌株在地理位置和时间分布上存在严重的不均匀性。河南省毒株序列相对丰富，而湖北、山东、辽宁、安徽等其他流行省份毒株序列较少。然而，考虑到有限的基因组信息，许多研究可能显示出系统发育推断中的抽样偏倚，而且随着时间的推移及病毒会传播到其他分支病毒流行地区的可能性，SFTSV 的两个分支会分别进化演变^[32]。

SFTSV 自然储存宿主尚不明确^[33, 34]，其可能通过“蜱-家养动物”、“蜱-野生动物”和“蜱-人”进行途径传播（图 1），但还需要更多的证据来说明 SFTS 病毒是否可以在家畜之间直接传播^[35]。

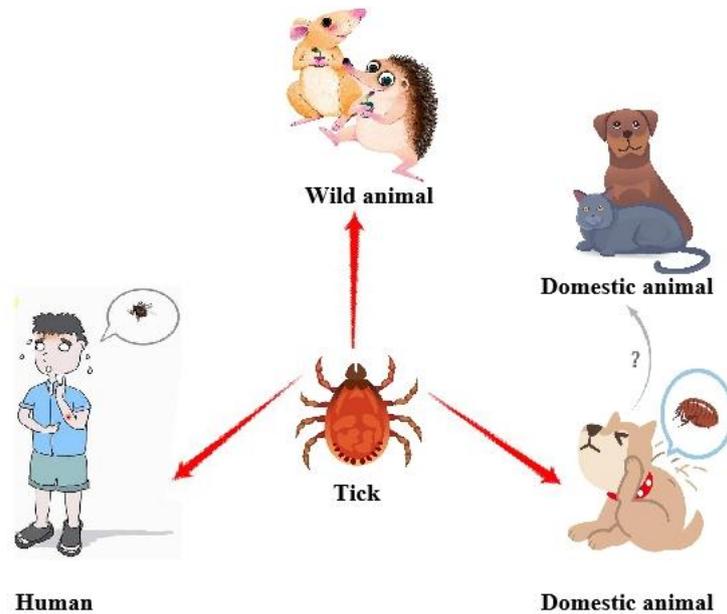


图 1 发热伴血小板减少综合征病毒感染的疑似传播途径示意图

Fig. 1 Suspected transmission pathway diagram of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV)

通过接触有症状及无症状患者或动物的血液、血性分泌物和排泄物而导致的

人与人之间传播是 SFTSV 广泛流行的原因之一^[36-38]。人与人之间传播的风险对于卫生保健工作者和患者家属来说很高^[39]。大多数 SFTS 的聚集性爆发与医院感染，家庭聚集性和葬礼仪式有关^[40-43]，在无有效防护下参与 SFTS 患者救护以及死亡患者殡葬引发的人间传播的聚集性疫情屡有发生，给群众健康带来巨大的威胁^[44, 45]，这突出表明，在治疗和处理尸体（如清洁和穿衣）期间，都需要采取标准预防措施，以防止直接接触和血液传播。根据这些 SFTSV 病例的提示，需要加强疾病控制措施，以防止病毒的聚集性传播，如感染的病人应隔离在负压通风的单间内，限制与病人接触的医护人员和来访者的数量；应避免直接接触患者的体液，正确穿戴防水防护服、面罩和口罩以防止通过液体飞溅和气溶胶传播；加强健康教育，向医务人员宣传 SFTS 预防和控制措施的知识，并提高社区成员的疾病预防意识，同时，及时的临床诊断对预防疾病传播至关重要。然而，散发病例、非特异性症状以及与其他感染性疾病的鉴别诊断使 SFTS 的诊断困难^[12]。虽然，及时的诊断和支持性临床护理可能是有帮助的，但由于没有针对 SFTS 病毒的特异性疫苗，因此预先识别和应对风险因素显得至关重要，我们应加强对 SFTSV 接触传播的认识，从源头去避免危险的发生。

蜱虫叮咬作为 SFTSV 主要的传播途径，对人类健康的危害也不容小觑^[46]。蜱虫是一种吸血节肢动物经常寄生在人类和动物的表面^[47, 48]，作为病原体（包括细菌，病毒和原生动物）的载体或中间体发挥重要作用^[49-51]。蜱属于蜱螨科（Acariidae），其由硬蜱科（Ixodidae）、软蜱科（Argasidae）和纳氏蜱科（Nuttallielidae）组成。迄今为止，全世界已鉴定出 18 属 800 余种，而我国已鉴定出 10 属 119 种，其中硬蜱 100 种，种类最多，危害最大，其次软蜱 10 余种^[52]。蜱发育过程为变态发育，分为卵、幼虫、若虫和成虫四个阶段，除卵期外的所有阶段都需要吸血，并且需要更换 2~3 个宿主，每次吸血后离开^[53]。蜱的主要危害是叮咬和吸食宿主的血液，对它们造成直接伤害，如皮肤过敏反应、阻碍幼畜发育等^[54]。同时，细菌、立克次体、病毒、原虫等多种重要病原体通过唾液、基底神经节体液、中肠返流、排泄物等间接传播，导致蜱传疾病^[55]，目前已发现蜱传病毒 6 科 80 余种^[56]。蜱虫的分布与自然环境密切相关，一项生态研究报告称，环境变化，特别是气候和景观的变化，可能促进了蜱的空间扩张和 SFTSV 的广泛传播^[57]，我们发现疾病的发病时间与蜱的活动时间一致，蜱虫活动和密度较高

的季节，病例数也较高，每年5月起病例数增加，5月至8月达到高峰^[58]。长角血蜱是携带蜱传病原体种类最多的蜱种，其在全球分布广泛（图2），对公共卫生造成了巨大的潜在影响。因此，为了更好地研究蜱传病毒，预防蜱传病毒的发生，加强蜱传病毒防控及对蜱传病毒的传播机制、特性、宿主、毒力、致病性等深入研究显得尤其重要。

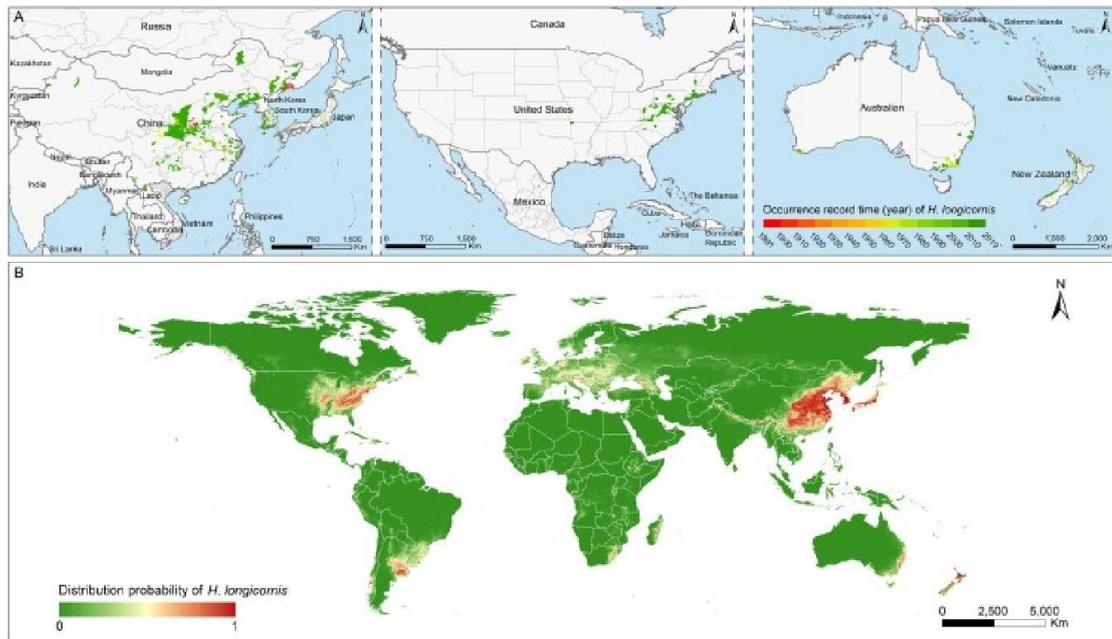


图2 长角血蜱全球记录位置和模型预测的分布概率^[24]

Fig. 2 Global record locations and model-predicted distribution probabilities of the *Haemaphysalis longicornis*^[24]

本研究为探索 SFTSV 在不同环境下的稳定性特点及了解其遗传多样性特征，通过模拟 SFTSV 在体外的生存状态，探索该病毒在不同环境下活性的消减规律，评估生物安全实验室微环境中 SFTSV 的生存能力；纳入 2010~2023 年全球的 SFTSV 序列数据集，用系统发育学方法对 SFTS 病毒 L 片段的基因型及地理分布流行现况进行详细的解读和分析；对蜱虫唾液腺蛋白分子进行纯化、克隆和表达，并检测一批蜱虫样本，分析蜱传病毒多样性特征，进一步拓展对 SFTSV 经接触传播以及蜱虫叮咬传播的认知，为深入了解蜱及蜱传病毒情况以及制定有效预防病毒传播的防控措施提供科学依据和参考。

第一部分 发热伴血小板减少综合征病毒环境稳定性研究

为了探索 SFTSV 在不同环境条件下的稳定性,科学阻断 SFTSV 人间接接触传播途径,本部分研究通过模拟 SFTSV 在体外的生存状态,探索病毒在体外活性的消减规律,评估生物安全实验室微环境中 SFTSV 的生存能力,为进一步完善 SFTSV 的防控措施提供科学依据。

1 材料

1.1 病毒与细胞

SFTSV 参考株 HB29 由中国疾病预防控制中心病毒病所出血热实验室自急性期患者血标本中分离保存;Vero 细胞购自美国 ATCC 细胞培养中心。

1.2 模拟环境介质制备

为模拟自然环境中常见的介质,取边长为 1.5 cm 的正方形无纺布片、纸片、塑料片以及人民币 1 角的硬币,用去离子水清洗晾干,置于盒内高压蒸汽灭菌、干燥备用。

1.3 主要试剂和耗材

1.3.1 所用试剂

(1) DMEM (1×) 培养液、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、青霉素-链霉素-谷氨酰胺双抗 (Pen Strep Glutamine 100×, PS)、胰蛋白酶 (Trypsin-EDTA 1×)、HEPES 缓冲液 (1 M)、7.5% 碳酸氢钠 (Sodium Bicarbonate, 7.5%)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PH7.4) 是 Gibco 公司产品;

(2) DMEM (2×) 培养液是 MACGENE 公司产品;

(3) 二甲基亚砷 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)、中性红溶液 (NEUTRAL RED SOLUTION)、1% BSA (Bovine Serum Albumin Solution)、FITC 标记羊抗人 IgG 抗体 (Anti-Human IgG-FITC, antibody produced in goat) 是 Sigma 公司的产品;

(4) 空斑琼脂糖 (UltraPure™ LMP Agarose) 是 Invitrogen 公司的产品;

(5) DAPI 染色液 (1×) 是 Coolaber 公司的产品;

(6) 丙酮是毕得医药生产的国产试剂。

1.3.2 试剂盒

- (1) 病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit 为 QIAGEN 公司产品；
- (2) 核酸提取或纯化试剂为中山大学达安基因股份有限公司产品；
- (3) SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System 为 Invitrogen 公司产品；

1.3.3 溶液配制

- (1) Vero 细胞培养所用液体：生长液（DMEM 1× +10%胎牛血清+1% Pen Strep Glutamine 100×）、维持液（DMEM 1× +2%胎牛血清+1% Pen Strep Glutamine 100×）；
- (2) 空斑试验所用试剂：
 - 1) 2%低熔点琼脂：纯净水+2% UltraPure LMP Agarose；
 - 2) 第一层琼脂覆盖液：50%的 2×DMEM（含 1%的 PS） +10%胎牛血清+2%的 HEPES 缓冲液+40%的 2%低熔点琼脂；
 - 3) 第二层琼脂糖覆盖液：在第一层琼脂糖覆盖液的成分中加入 3%的中性红溶液。

1.3.4 实验仪器

- (1) 生物安全柜（型号：二级 1359 型）、二氧化碳细胞培养箱（型号：311 型）、-80 °C低温冰箱（型号：700 SERIES）、移液器、涡旋振荡器（型号：LP Vortex Mixer）、台式离心机（型号：PICO 17）是 Thermo（USA）公司产品；
- (2) 全自动核酸提取仪（型号：DA3200）是中山大学达安基因股份有限公司产品；
- (3) 实时荧光定量 PCR 仪 CFX96™ Real-Time System（型号：785BR04302）是 BIO-RAD 公司产品；
- (4) 高速冷冻离心机（型号：L-R）是 HERAEUS 公司产品；
- (5) 倒置显微镜（型号：ECLIPSE TS100）是 Nikon 公司产品；
- (6) 数控超级恒温槽水浴锅（型号：SC-15）是宁波新芝生物科技股份有限公司；
- (7) 倒置荧光显微镜（型号：RVL2-K）是 ECHO 品牌产品；
- (8) 混匀仪（型号：Mix Mate PCR 96）是 eppendorf 公司产品；
- (9) 超纯水系统一体机（型号：PF2XXXXM1）是威立雅公司产品。

1.3.5 耗材

离心管（200 μ L、1.5 mL、5 mL）、尖底离心管（15 mL、50 mL）、Tip 头（10 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L 等）、冻存管（2 mL）、细胞培养板（6 孔、12 孔、24 孔、96 孔等）、抗原片、移液吸管（10 mL）、细胞培养瓶（25 cm^2 、75 cm^2 等）、75%医用酒精、一次性反穿衣、防护服、乳胶手套、医用口罩、消毒液等均为科室常备实验耗材。

2 方法

2.1 细胞与病毒培养

2.1.1 细胞培养

- （1）从液氮罐中取出用冻存管冻存的 Vero 细胞，迅速投入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中，快速晃动冻存管，使细胞悬液快速融化；
- （2）细胞悬液溶解后，尽快移出水浴锅，用酒精喷洒冻存管周围，吸水纸擦净后置于安全柜中；
- （3）小心开启冻存管盖子，将冻存管中细胞悬液全部吸出，移至加入 5 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液的 15 mL 尖底离心管中，将尖底离心管放入台式离心机中，800 rpm 离心 5 min；
- （4）离心后吸去上清，向 15 mL 尖底离心管中加入 5 mL 含 10% FBS 的培养液重悬细胞，并将细胞悬液全部转移至无菌 T25 细胞培养瓶中，轻轻摇匀后放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养孵箱中培养；
- （5）Vero 细胞培养使用含有 10%胎牛血清和 1%青链霉素的 DMEM 培养液按照哺乳动物细胞常规培养方法进行，观察细胞状态，每 2~3 天换一次生长液，待细胞生长致密即可传代培养。

2.1.2 病毒培养

- （1）在病毒感染前，准备传至 T25 细胞培养瓶的 Vero 细胞，待细胞长满单层后，将含 10% FBS 的 DMEM 生长液更换为含 2% FBS 的 DMEM 维持液；
- （2）用 DMEM 细胞维持液（含 2% FBS）稀释 SFTS 病毒，以 0.01 MOI 的感染剂量将 SFTSV 接种于 Vero 细胞，37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 2 h；
- （3）加入 3 mL DMEM 维持液（含 2% FBS），置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养；

(4) 每 3 d 更换细胞维持液 (含 2% FBS), 第 7 d 收集培养上清并测定培养上清中病毒滴度。

2.2 间接免疫荧光 (IFA) 实验

(1) 将上述 T25 细胞培养瓶里感染 7 天 SFTSV 的 Vero 细胞用胰酶消化下来, 8000 rpm 离心 1 min;

(2) 离心的细胞用 PBS 缓冲液重悬, 清洗细胞, 去除残留的胰酶, 再次 8000 rpm 离心 1 min;

(3) 再次加入 PBS 缓冲液重悬细胞, 将重悬的细胞悬液滴加至抗原片上, 同时以未被 SFTSV 感染的 Vero 细胞作为阴性对照, 并做好标记;

(4) 加入细胞悬液的抗原片紫外照射干燥 1 h;

(5) 将干燥的抗原片加入 4 °C 预冷的丙酮固定 1 h, 晾干并保存于 -80 °C 备用;

(6) 抗体孵育: 将 SFTSV 病人血清用 1% BSA 溶液 1:100 稀释滴加至上述干燥的抗原片, 放湿盒内 37 °C 孵箱孵育 30 min;

(7) 孵育好血清抗体的抗原片用 PBS 缓冲液轻微震荡清洗三遍, 用 ddH₂O 再洗两遍, 放吸水纸上干燥;

(8) 待抗原片干燥后, 用 PBS 溶液 1:500 稀释 DAPI 染液, 再用稀释好的 DAPI 染液 1:100 稀释 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体并避光加入抗原片, 放湿盒内 37 °C 孵箱孵育 30 min;

(9) 孵育好二抗的抗原片用 PBS 缓冲液轻微震荡清洗三遍, 用 ddH₂O 再洗两遍, 放吸水纸上干燥;

(10) 待孵育好二抗的抗原片干燥后即可在荧光显微镜下观看荧光。

2.3 空斑滴定试验

(1) 细胞铺板: 按正常细胞培养操作规范将 Vero 细胞均匀的接种于 6 孔细胞培养板中, 培养 3~5 日, 期间随时观察细胞状态;

(2) 病毒稀释: 在 24 孔板上将待测病毒悬液用维持液作 10 倍系列稀释, 稀释成 10⁻¹~10⁻⁹ 稀释度;

(3) 病毒吸附: 小心去除 6 孔细胞培养板内培养液, 并用 DMEM 维持液清洗细胞后在每孔中预留约 500 μL 的维持液, 随后从高稀释度到低稀释度每孔依次接种 200 μL 各稀释度的病毒液, 同时设置对照组, 摇匀放入湿盒, 37 °C、5% CO₂ 孵箱中吸附 1 小时;

(4) 铺第一层琼脂糖覆盖液：弃掉吸附液，每孔加 3 mL 第一层琼脂糖覆盖液，室温凝固 3 h，6 孔板倒置放 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 7 天；

(5) 铺第二层琼脂糖覆盖液：7 天后每孔加 3 mL 第二层（含 3% 中性红）琼脂糖覆盖液，室温凝固 3 h，6 孔板倒置放 37 °C，5% CO₂ 孵箱培养 2 至 5 天，从第二天开始观察空斑；

(6) 空斑计数：观察空斑，用记号笔标记空斑并计数。以空斑形成单位（plaque forming units, PFU/ml）表示病毒的感染滴度，按下列公式计算病毒的空斑形成单位：空斑形成单位（PFU/mL）=[每孔平均空斑数×病毒稀释度（倒数）]/每孔病毒接种量（mL）。

2.4 实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR)

2.4.1 使用试剂盒提取待测病毒 RNA (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN)：

(1) AVE 缓冲液中加入 310 μg carrier RNA，使其充分溶解为终浓度 1 μg/μL 的溶液；

(2) 将 5.6 μL 含 carrier RNA 的 AVE 缓冲液和 560 μL AVL 裂解液混于 1.5 mL 离心管中；

(3) 取 140 μL 待测样本加入上述混合液中，室温作用 10 min；

(4) 取 560 μL 70% 无水乙醇加入上述混合液中，轻柔混匀 15 s，瞬时离心；

(5) 将上述混合液体转移至 QIAamp 柱子中，8000 rpm 离心 1 min；

(6) 加入 500 μL AW1 Buffer 洗柱，8000 rpm 离心 1 min，弃滤液；

(7) 加入 500 μL AW2 Buffer 洗柱，13000 rpm 离心 3 min，弃滤液；

(8) 空柱 13000 rpm 离心 1 min；

(9) 将 QIAamp 柱重新放到一个新的离心管中，加入 50 μL AVE 缓冲液，室温静置 1 min，8000 rpm 离心 1 min，收集洗脱液，-80 °C 冰箱保存。

2.4.2 使用一步法荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒 (SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System Kit, Applied Biosystems, USA) 检测待测病毒核酸：

以上述提取的 SFTS 病毒 RNA 作为 Real-time PCR 检测的模板，使用由上海生物工程公司合成的 SFSTV 特异性引物和探针，引物序列为 SFTSV-F：5'-GGTCCCTGAAGGAGTTGTAAA-3'；SFTSV-R：5'-TGCCTTCACCAAGACTAT

CAATGT-3’；探针序列为 SFTSV-P：TEX-TTCTGTCTTGCTGGCTCCGCGC-BH Q-2。配制 qRT-PCR 检测反应体系（表 1），反应条件为 50 °C、30 min；90 °C、10 min；95 °C、15 s；60 °C、45 s，循环 40 次。将 Cut-off 值设置为 Ct=35，记录病毒样本的 Ct 值，阳性结果判断以 Ct 值<35 且扩增曲线为 S 型曲线作为标准。

表 1 SFTSV 实时荧光定量 RT-PCR 检测反应体系（25 μL）

Tab. 1 SFTSV real-time RT-PCR reaction system (25 μL)

反应物	体积 (μL)
SFTSV Forward primer	0.50
SFTSV Reverse primer	0.50
SFTSV Probe	0.25
Enzyme	1.00
2×Buffer	12.50
RNase-Free water	5.25
Template	5.00
Total	25.00

2.5 研究分组

2.5.1 不同介质表面稳定性研究

将灭菌的无纺布片、纸片、塑料片以及 1 角的硬币放置 6 孔板中，滴加 SFTS 病毒悬液 50 μL ($10^{6.65}$ PFU/mL) 至各介质表面，置于室温生物安全柜中备用。在加入病毒悬液 0、1、2、4、6、8、10、12、16、20、24、48、72 h 后收集病毒样本。收集病毒样本时，向放置无纺布片、纸片、塑料片以及 1 角硬币的 6 孔板中加入 0.5 mL 含 2%胎牛血清的 DMEM 维持液，用枪头充分吹打清洗待测样品表面并将清洗液收集，测定清洗液中 SFTS 病毒的感染活力。

2.5.2 模拟自然通风干燥影响的研究

模拟的自然通风干燥组在 6 孔板内滴加 SFTS 病毒悬液 50 μL ($10^{6.65}$ PFU/mL)，不盖盖子，置于室温生物安全柜中；非通风干燥组在 6 孔板内加入 SFTS 病毒悬液 50 μL ($10^{6.65}$ PFU/mL) 后，盖好盖子封闭后置于生物安全柜中。在加入病毒悬液 0、1、2、4、6、8、10、12、16、20、24、48、72 h 后，向 6 孔板中加入

0.5 mL 含 2%胎牛血清的 DMEM 维持液充分清洗并收集病毒样本测定其感染性。

2.5.3 温度影响的研究

将 SFTS 病毒悬液 ($10^{6.65}$ PFU/mL) 50 mL/管分装至 2 mL 冻存管中, 分别放置于 4 °C 冰箱、室温 (约 25 °C) 生物安全柜中, 并分别于 1、2、3、4 周取样测 SFTS 病毒对 Vero 细胞的感染活力。

2.5.4 酒精作用方式影响研究

准备 6 孔板, 在孔内滴加 SFTS 病毒悬液 50 μ L ($10^{6.65}$ PFU/mL) 并涂抹开, A 组在病毒液肉眼可见干燥后喷洒 2 次 75%酒精 (形成雾面即可), B 组立即喷洒 2 次 75%酒精, 等待酒精作用干燥 1 h 后, 分别在每孔加入 3 mL 消化下来的 Vero 细胞液进行病毒分离培养, 检测病毒感染性。

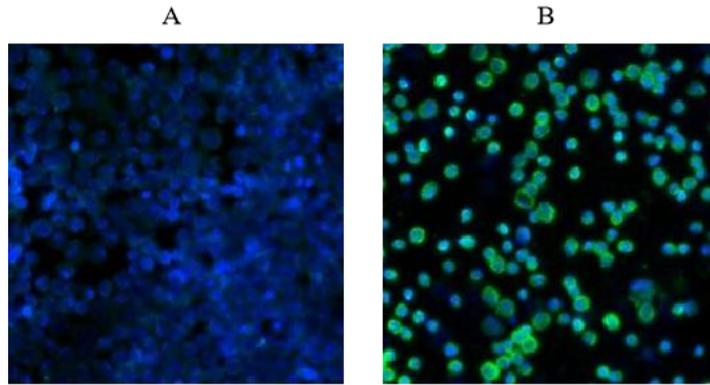
2.6 统计分析

每个实验组均设置对照, 每个样本和处理条件设置 3 组平行。对于病毒滴度及拷贝数的变化情况, 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, GraphPad Prism 8.0 软件绘制各组病毒拷贝数以及滴度变化的折线图。

3 结果

3.1 SFTSV 扩增感染情况鉴定及滴度测定

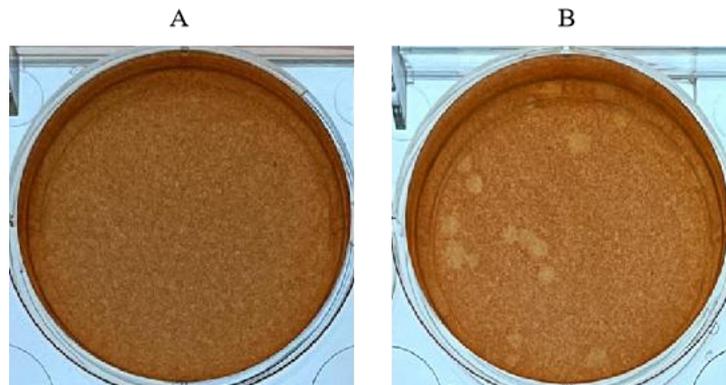
SFTSV 毒株感染 Vero 细胞并在细胞中扩增, 于第 7 天收集培养细胞制作抗原片, 孵育 SFTSV 病人血清抗体及 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体, 荧光显微镜 DAPI 通道结果显示, 经 SFTSV 感染 7 天的 Vero 细胞可见明显的特异性绿色荧光, 而正常 Vero 阴性对照细胞中未出现特异性荧光 (图 1); 于第 7 天收集培养上清, 用空斑滴定的方法将收集的 SFTS 病毒培养上清作 10 倍系列稀释, 在 10^{-5} 梯度出现清晰蚀斑 (图 2), 计算空斑数得 SFTSV 滴度为 4.5×10^6 PFU/mL。



注：A. 阴性对照细胞；B. SFTSV 感染的 Vero 细胞

图 1 间接免疫荧光法检测 SFTSV 在 Vero 细胞中的感染情况

Fig. 1 The infection of SFTSV in Vero cells was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA)



注：A. 阴性对照细胞；B. SFTSV 感染的 Vero 细胞

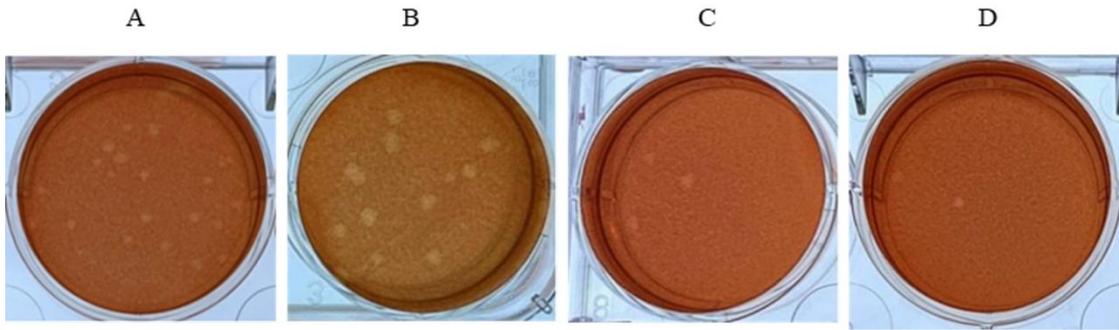
图 2 SFTSV 病毒稀释 10^5 倍后蚀斑试验成斑情况

Fig. 2 Plaque result after 10^5 fold dilution of SFTSV

3.2 不同介质表面上的稳定性

SFTS 病毒悬液加到硬币和塑料片的表面不易干燥，约 1 h 可达到肉眼可见干燥，滴加到无纺布片和纸片液滴快速扩散，约 8 min 可达到干燥。结果显示，硬币组、塑料组、纸片组和无纺布组收集的样本病毒滴度均随收集时间的延长逐渐降低。空斑试验检测结果显示，在硬币、塑料这类不吸水材料表面的病毒液滴，在 24 h 后仍具有感染性，可见少量空斑形成（图 3），但病毒感染性滴度 24 h 内显著下降分别约 $10^{4.46}$ 倍和 $10^{4.6}$ 倍。在纸片、无纺布这种吸水性材料表面，病毒感染性快速下降，病毒滴度在 6 h 内就下降分别约 $10^{3.82}$ 倍和 $10^{4.12}$ 倍，在 12 h

和 10 h 后样本在空斑试验中未见感染性蚀斑（图 4）。将不同介质表面的 SFTSV 样本收获后，利用 Vero 细胞按照常规方法进行分离培养，并传代培养，分别在每代培养的第 0 和 5 天取培养液进行 qRT-PCR 检测，结果显示，在硬币、塑料、无纺布以及纸片表面病毒液滴，室温条件下干燥静置 6 h 后可经细胞培养分离到感染性病毒，干燥静置 24 h 后，传代培养均未能分离到有感染性病毒。



注：不同介质表面病毒液稀释 5 倍后蚀斑试验成斑情况，A. 硬币；B. 塑料；C. 纸片；D. 无纺布

图 3 病毒滴加于硬币、塑料 24 h，纸片 10 h，无纺布 8 h 后的细胞空斑

Fig. 3 Cell plaques of virus added to Coin and Plastic for 24 h, Paper for 10 h, and Nonwoven cloth for 8 h

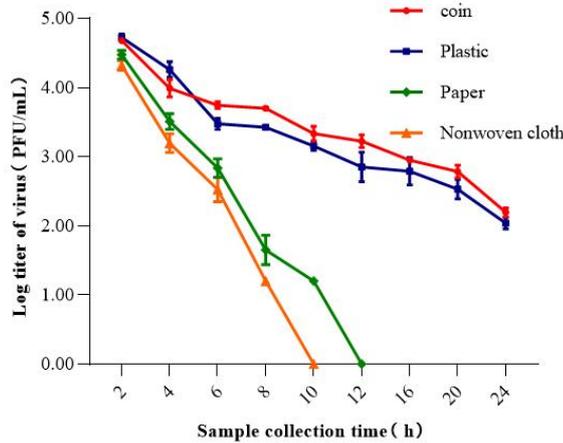


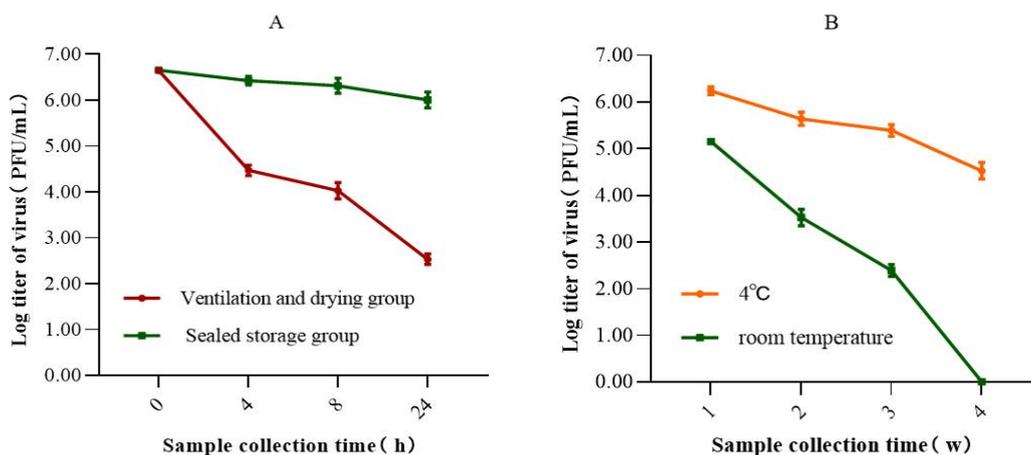
图 4 空斑试验检测不同介质表面 SFTSV 稳定性

Fig. 4 Stability of SFTSV on various surfaces determined using plaque assay

3.3 模拟自然通风干燥对 SFTSV 稳定性影响

在生物安全柜内敞口放置的 6 孔组织培养板内的 SFTS 病毒的稳定性受自然通风干燥程度影响明显，24 h 感染性滴度下降约 $10^{4.10}$ 倍，在 48 h 时丧失感染性，

经 Vero 细胞传代培养不能获得感染性病毒。如果将同样的 SFTSV 病毒封闭保存，使之处于湿润状态，病毒则保持相对的稳定性，24 h 病毒感染性滴度下降不明显，1 周内下降约 $10^{1.49}$ 倍，3 周后仍可通过细胞培养分离到感染性病毒，直到 4 周时，病毒失去感染性，空斑试验与细胞传代培养无法检出病毒的存在（图 5）。



注：A. 模拟通风干燥处理；B. 不同温度处理

图 5 空斑试验检测通风干燥及温度处理条件下 SFTSV 稳定性

Fig. 5 Stability of SFTSV under Ventilation, drying and temperature treatment conditions using plaque assay

3.4 温度的影响

温度是 SFTSV 生存的一个关键影响因素，在 4 °C 放置 4 周，对收集的样本进行 10 倍系列稀释，于 Vero 细胞中培养 7 天，显示病毒仍具有较强的感染性，感染性滴度下降仅约 $10^{2.09}$ 倍，而在室温（约 25 °C）存放 4 周后，未出现空斑，提示病毒感染性丧失（图 5 B）。对不同温度下 SFTS 病毒进行分离培养，在 4 °C 环境下放置 4 周经传代培养，病毒能够有效复制，5 天后核酸检测达到较高水平；而在室温环境下放置 4 周后，接种 Vero 细胞，病毒不能进行有效复制，传代培养 5 天后未检测到病毒复制情况，提示温度是 SFTSV 环境存活的重要影响因素，4 °C 条件下，可长时间保持感染性。

3.5 酒精消毒剂作用方式的影响

在 75%酒精作用对 SFTSV 灭活效果的研究结果中显示，A 组病毒干燥后，

酒精喷洒作用 1 h 后，接种细胞进行分离培养，传代培养 5 天后病毒未发现病毒复制。B 组病毒未干燥直接喷洒酒精作用 1 h 后，接种细胞进行分离培养，传代培养 5 天后，可检测到病毒有效复制，病毒基因组核酸拷贝数达到较高水平（图 6）。实验结果显示，75%酒精可对物体表面 SFTSV 进行有效的灭活，但如果被处置的物体表面病毒处于液体状态时，可显著影响病毒灭活效果。

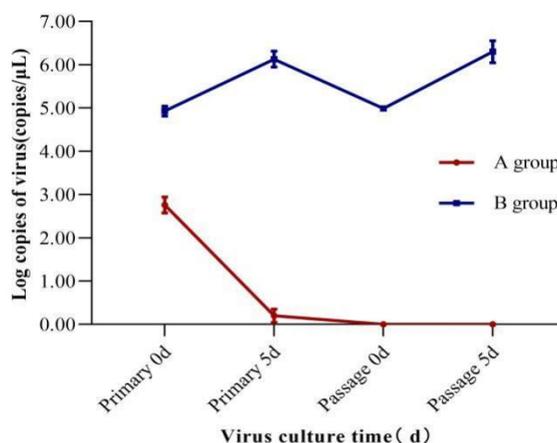


图 6 细胞培养和 qRT-PCR 检测评估酒精不同作用方式下 SFTSV 稳定性

Fig. 6 Stability of SFTSV under ethanol treatment tested with cell culture and qRT-PCR

4 讨论

自 2010 年发现 SFTSV 以来，年报告发病人数呈不断上升趋势，累及地区也不断扩大，已成为群众生命健康安全的严重威胁^[59]。特别注意的是，SFTSV 可通过患者血液、血性分泌物和排泄物及其污染物等引发人-人之间经接触传播的聚集性疫情，并且在医护人员、患者家属和死亡患者殡葬人员中发生的聚集性感染事件屡有发生^[60, 61]。因此，阐明 SFTSV 在环境中的稳定性，科学做好消毒和防护，对于防止人-人之间传播具有重要意义。前期研究已经揭示 SFTSV 对温度敏感，60 °C、30 min 可灭活病毒，对脂质溶剂或非离子去污剂敏感，强酸、碱、戊二醛、紫外线和含氯消毒剂等可灭活病毒^[62]。本研究以 SFTSV 代表株 HB29 为对象，利用组织细胞培养板、冻存管、硬币、无纺布、塑料制品和办公用纸等材料，探索病毒在环境中不同介质表面的稳定性及其影响因素，分析了温度、物体表面材料性质、通风干燥程度等因素对 SFTSV 稳定性的影响。

首先，SFTSV 的稳定性与所存在的物品表面材料性质有关。与硬币、塑料

这类吸水性差的物品相比,无纺布、纸片这类吸水性材料表面病毒的感染活力降低更快,可能是由于易失水干燥的条件导致 SFTSV 稳定性降低,这一特性与新冠病毒等相关研究类似^[63,64],表明有脂质包膜的 SFTSV 对干燥敏感。进一步研究显示,在室温条件下,自然通风干燥可使细胞培养板表面病毒感染性快速下降,但感染性可维持 24 h,到 48 h 则完全失去感染性,通过细胞传代培养和空斑实验等方法不能检出感染性病毒颗粒。在密闭环境中保持湿润或液体状态,虽然病毒的感染性也逐步下降,但可保持较长时间,在 3 周内可通过细胞传代培养和空斑实验等方法检出感染性病毒颗粒,到第 4 周,病毒感染性基本丧失,显示了通风干燥是影响 SFTSV 的稳定性的重要因素。温度影响的研究结果显示,与室温条件下 SFTSV 感染性较快下降相比,SFTSV 在 4 °C 条件下可在较长时间内保持相对稳定的状态,保存 4 周后,病毒感染性下降约在 $10^{2.09}$ 倍,与前期研究 4 °C 条件下放置 7 天后 SFTSV 感染性仅下降约 10 倍相近^[62],说明温度是影响 SFTSV 在环境中存活的重要影响因素,在环境消毒处置以及现场标本采集、运输、保存应充分考虑这些影响因素^[65]。

酒精是日常生活中最常用的消毒剂之一,在本研究中,使用 75%酒精喷洒已经干燥的被病毒污染的物体表面时,酒精喷洒 1 h 后,采集物体表面样本通过细胞传代培养和空斑试验均不能检出感染性病毒颗粒,提示病毒已被灭活。如果使用 75%酒精喷洒尚未干燥被病毒污染的物体表面,作用 1 h 后采集物体表面样本,可通过细胞传代培养的方式分离到感染性病毒颗粒,显示物体表面病毒未完全被灭活,仍具有感染性。因此,在使用酒精消毒剂对物体表面进行消毒时,应首先擦拭表面液体,然后再喷洒酒精消毒剂或与其他消毒剂联合使用,才能起到有效灭活 SFTSV 的作用。妥善选择并正确使用消毒剂,才能保障消毒效果,做好过程控制是关键的措施^[66]。对环境中的病毒的稳定性及其影响因素进行科学评估,对于科学使用消毒剂,阻断病毒其在易感人群间传播,减少院内感染和实验室操作人员感染风险具有重要意义^[67]。

本实验局限性在于,所用病毒株为实验室分离株 SFTSV-HB29,病毒存在于含 2%胎牛血清的 DMEM 细胞培养液中,病毒液中的细胞残片通过离心方式去除,成分单纯简单,所使用的介质材料均经过实验室处理,达到无菌洁净的程度,而现实环境中患者血液或血性分泌物和排泄物等污染物中可能包含细胞、组织等

成分，且实际外界环境中存在的介质复杂多样，可能导致感染性 SFTSV 存活时间相对延长。同时，我们也注意到实验过程中，滴加病毒的无纺布和纸片在放置较长时间后容易变干、皱缩，及其自身的吸附作用等因素不利于病毒的洗脱进行空斑滴定和经细胞传代培养，也可能对评估无纺布、纸片表面病毒感染性快速消减的速率造成偏差，但并不影响对病毒有效传播的评估。因此，本研究对 SFTSV 在环境中稳定性及主要影响因素进行的比较全面的分析，显示了环境材料性质、自然通风干燥程度、温度对 SFTSV 感染性的影响，有助于增进对 SFTSV 接触传播风险的理解，所获得的相关数据可为院内感染防控、患者护理和居家消毒策略和措施的制定等提供科学依据。

5 结 论

在对 SFTS 病毒环境稳定性研究中发现，外界环境中的温度、物体表面材料性质、通风干燥程度及消毒情况与 SFTSV 的生存能力相关，研究有助于增进对 SFTSV 接触传播风险的理解。

第二部分 发热伴血小板减少综合征病毒遗传多样性研究

本研究为了更好地了解 SFTSV 的遗传多样性特征及更新 SFTS 病毒基因型的地理分布信息，纳入了 2010~2023 年全球的 SFTSV 序列数据集，用系统发育学方法对 SFTS 病毒 L 基因片段的遗传多样特征及基因型的分布现状进行了详细的解读和分析。同时，对蜱虫唾液腺蛋白分子进行了纯化、克隆和表达，并检测一批采集于安徽省六安市的蜱虫样本，分析蜱传病毒多样性特征，为解读蜱传疾病的传播共性进行了初步的探索。

1 材料

1.1 目的基因、载体和宿主菌

(1) 构建于 Ptriex 载体上的目的基因：从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GeneBank 数据库中下载 *Ixodes scapularis* anticomplement protein (Isac) 基因组序列交由生工生物工程（上海）股份有限公司优化合成并构建到 Ptriex 载体上，质粒命名为 Ptriex-Isac，由本科室保存；

(2) 载体：含目的载体的 PET30a-WENV NP 质粒，由本科室保存；

(3) 宿主菌：Trans 5 α 、BL21 (DE3) 化学感受态细胞购自北京全式金生物公司；

1.2 蜱虫样本

2023 年于 SFTS 病例高发区安徽省六安市地区采集蜱虫样本共 171 只。包括采集来源于家养动物宿主体表的寄生蜱虫 162 只，其中来自于动物牛体表的有 108 只、动物羊体表的有 50 只、动物狗体表的有 4 只；采集来源于草地的游离蜱虫 9 只。

1.3 主要试剂和耗材

1.3.1 蜱虫唾液腺蛋白制备所用试剂

(1) 限制性内切酶 XhoI、NdeI 是 New England Biolabs (USA) 公司产品；

(2) 无酶水 (Nuclease-Free Water) 是美国 Ambion 公司产品；

(3) 核酸染料 (GelStain, 10000 \times)、氨苄霉素 (Ampicillin)、卡纳霉素 (Kanamycin)、Trans 2K[®] Plus II DNA Marker、Trans DNA Marker II、Blue Plus[®] IV Protein Marker

- (10KDa-180KDa) 是全式金产品;
- (4) 琼脂糖 (Agarose-Molecular Biology Grade) 是 invitrogen 公司产品;
- (5) QDL2000 Quantitative DNA Marker、10× Loading Buffer、PCR 产物回收试剂盒 (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up)、PCR 反应体系试剂盒 (PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase) 是 TaKaRa 公司产品;
- (6) 异丙醇、无水乙醇、丙三醇、甲醇、β-巯基乙醇 (β-Mercaptoethanol) 是毕得医药生产的国产试剂;
- (7) 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PH7.4) 是 Gibco 公司产品;
- (8) Sample Buffer、SDS-PAGE 胶 (Mini-PROTEAN® TGX™ Gels)、PVDF 膜 (Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting) 是 BIO-RAD 公司产品;
- (9) QuickBlue 快速染胶液是北京博奥龙免疫技术有限公司产品;
- (10) 蛋白酶抑制剂是 Roche 品牌产品;
- (11) 脱脂奶粉 (Difco™ Skim Milk) 是美国 BD 品牌产品;
- (12) 小鼠抗 His-tag 单抗 (His-tag Mouse Monoclonal Antibody) 是北京碧云天公司产品;
- (13) Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)、显色液 (DAB Substrate Kit) 是 Abcam 公司产品;
- (14) 同源重组试剂 (ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit) 是 Vazyme 公司产品;
- (15) 质粒小提试剂盒 (QIAprep Spin Miniprep Kit)、质粒大提试剂盒 (QIAGEN® Plasmid Maxi Kit) 是 QIAGEN 公司产品;
- (16) Ni⁺亲和柱 (His Trap™ HP) 是 Cytiva 品牌产品;
- (17) 透析盒 (Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette) 是 Thermo 公司产品;
- (18) 转膜试剂 (eBlot™ Protein Transfer Pads, Basic 20-pak) 是 GenScript 公司产品;
- (19) LB AGAR、酵母提取物 (YEAST EXTRACT)、胰蛋白胨 (TRYPTONE)、为 OXOID 公司产品;
- (20) NaCl 购自北京化学试剂二厂;
- (21) 尿素 (Urea) 是 Sigma 公司产品;

(22) 咪唑 (Imidazole) 购自北京欣经科生物技术有限公司;

(23) IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、L-精氨酸 (L-Arginine)、还原型谷胱甘肽 (L-Glutathione, Reduced)、1.5M Tris-HCl 缓冲液 (PH=8.8) 是 Solarbio 公司产品;

(24) 氧化型谷胱甘肽 (L-Glutathione, oxidized) 购自源叶生物公司;

(25) PEG8000、曲拉通 (Triton X-100) 是 NEWBIO INDUSTRY 公司产品。

1.3.2 蝗虫样本检测所用试剂

(1) 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PH7.4) 是 Gibco 公司产品;

(2) 组织 RNA 提取试剂盒 (RNeasy[®] Plus Mini Kit) 是公司产品;

(3) 一步法荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒 (SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System Kit) 为 Invitrogen 公司产品;

(4) 引物和探针是由工生物工程上海股份有限公司合成。

1.3.3 溶液配制

(1) 2×YT 培养基: 称取 5 g 的 NaCl、10 g 的酵母提取物、16 g 的胰蛋白胍至量筒, 再加入 ddH₂O 定容至 1 L, 高压灭菌冷却后置于 4 °C 保存;

(2) LB 液体培养基: 称取 5 g 的 NaCl、5 g 的酵母提取物、10 g 的胰蛋白胍至量筒, 再加入 ddH₂O 定容至 1 L, 高压灭菌冷却后置于 4 °C 保存;

(3) 带抗性的 LB 固体培养基: 称取 40 g 的 LB AGAR 溶于 1 L 的 ddH₂O 中, 高压灭菌冷却至 37 °C 后加入终浓度为 50 μ g/mL 的 Kanamycin, 将其混匀并倒入无菌培养皿里, 室温冷却后密封于 4 °C 保存;

(4) 细菌裂解液: 由 0.5% 的曲拉通、0.5 M 的 NaCl、50 mM 的 Tris-HCl、无 EDTA 的蛋白酶抑制剂以及 ddH₂O 定容至 1 L 配制而成, 溶液 PH 为 7.5;

(5) 蛋白变性液: 由 20 mM 的 Tris-HCl、500 mM 的 NaCl、8 M 的尿素、20 mM 的咪唑、无 EDTA 的蛋白酶抑制剂以及 ddH₂O 定容至 1 L 配制而成, 溶液 PH 为 7.5;

(6) 透析复性液: 由 20 mM 的 Tris-HCl、500 mM 的 NaCl、0.5 M 的 L-精氨酸、0.4 mM 的 GSSG、4 mM 的 GSH、0.1% 的 PEG8000、6 M 的尿素以及 ddH₂O 定容至 1 L 配制而成, 溶液 PH 为 8.0;

(7) 稀释复性液: 由 20 mM 的 Tris-HCl、500 mM 的 NaCl、0.5 M 的 L-精氨酸、

0.4 mM 的 GSSG、4 mM 的 GSH、0.1% 的 PEG8000 以及 ddH₂O 定容至 1 L 配制而成，溶液 PH 为 8.0；

(8) 金属离子亲和层析 Binding Buffer: 由 20 mM 的 Tris-HCl、500 mM 的 NaCl、8 M 的尿素、20 mM 的咪唑以及 ddH₂O 定容至 1 L 配制而成，溶液 PH 为 7.5；

(9) 金属离子亲和层析 Elution Buffer: 由 20 mM 的 Tris-HCl、500 mM 的 NaCl、8 M 的尿素、500 mM 的咪唑以及 ddH₂O 定容至 1 L 配制而成，溶液 PH 为 7.5；

(10) 50%甘油菌种保存液: 由 50%丙三醇和 50%的 ddH₂O 混合配制而成；

(11) 核酸电泳琼脂糖凝胶: 称取 1.20 g 的琼脂糖并加入 100 mL 的 1×TAE, 在微波炉中加热融化 3 min, 降温后加入核酸染料混匀, 倒入制胶模具中凝固；

(12) PBST: 由 0.27 g 的 KH₂PO₄, 1.42 g 的 Na₂HPO₄, 8.00 g 的 NaCl, 0.20 g 的 KCl, 0.05% 的 Tween-20 以及 ddH₂O 定容至 1 L 配制而成，溶液 pH 为 7.4；

(13) 50×TAE 电泳缓冲液: 由 Tris-乙酸 40 mmol/L、EDTA (PH 8.0) 1 mmol/L 配制而成，工作浓度为 1×。

(14) IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)在纯净水中溶解, 其溶解性为 50 mg/mL。

1.3.4 实验仪器

(1) 96 孔基因扩增仪 (型号: AGT9601) 是杭州安杰思医学科技有限公司产品；

(2) 双极核酸凝胶电泳仪 (型号: DYY-6C 型) 购自北京市六一仪器厂；

(3) 成像仪 (型号: ChemiDoc™ XRS+)、电泳仪 (型号: PowerPac Universal) 是 BIO-RAD 公司产品；

(4) 超微量分光光度计 (NanoPhotometer®)、OD 值分光光度计 (型号: OD600) 是 IMPLLEN 公司产品；

(5) 加热制冷型金属浴 (型号: H2O3-100C) 是卡尤迪生物科技公司产品；

(6) 恒温摇床 (型号: 43R) 是 NBS 公司产品；

(7) 脱色摇床 (型号: TS-1) 是其林贝尔公司产品；

(8) 高速离心机 (型号: Pico 17) 是 Thermo 公司产品；

(9) 超声破碎仪 (型号: VCX800) 购自上海迭戈生物科技有限公司；

(10) 真空泵 (型号: AP-9901S) 购自天津奥特赛恩斯仪器有限公司；

(11) 蛋白纯化仪 (型号: AKTA pure) 是 Cytiva 公司产品；

(12) 双显恒温加热磁力搅拌器 (型号: SH-3) 购自北京金北德工贸有限公司；

- (13) 电转膜仪（型号：L03010）是 GenScript 公司产品；
- (14) 高压灭菌器（型号：SQL810C）是雅马拓品牌产品；
- (15) 细胞粉碎仪（型号：MS-100）为 TOMY Seiko 品牌产品；
- (16) 实时荧光定量 PCR 仪 CFX96TM Real-Time System（型号：785BR04302）是 BIO-RAD 公司产品。

1.3.5 耗材

离心管（200 μ L、1.5 mL、5 mL）、尖底离心管（15 mL、50 mL）、Tip 头（10 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L 等）、冻存管（2 mL）、细胞培养板（6 孔、12 孔、24 孔、96 孔等）、移液吸管（10 mL）、细胞培养瓶（25 cm^2 、75 cm^2 等）、涂菌棒、培养皿、摇菌试管、镊子、含钢珠的 1.5 mL 研磨管、0.45 μm 孔径滤器、75%医用酒精、一次性反穿衣、防护服、乳胶手套、医用口罩、消毒液等均为科室常备实验耗材。

2 方法

2.1 发热伴血小板减少综合征病毒基因型及地理分布特征分析

2.1.1 序列数据集构建

SFTS 病毒 L 片段基因组序列从病毒病原体资源数据库（ViPR，<https://www.viprbrc.org/>）下载，下载年份为 2010~2023 年，共下载 1348 株，根据其基因组序列的 GenBank 登录号获取相关的采集日期、国家和宿主种属等流行病学信息。经删除重复和不完整的 L 片段基因序列后，获得共计 1317 株 SFTS 病毒株的 L 片段基因序列全长，构成本次分析的序列数据集。

2.1.2 系统发育树分析

使用 MAFFT 在线比对软件（<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>）以默认参数对 SFTS 病毒 L 片段的数据集进行多重序列比对，同时添加 Bhanja 病毒的参考序列（GenBank 号：NC_027140）作为外群。使用 2.1.7 版本的 jModelTest（github.com/ddarriba/jmodeltest2）程序预测最佳的核苷酸拟合模型，然后使用该模型，利用 MEGA 11.0 软件的最大似然法（Maximum Likelihood, ML）和邻位相接法（Neighbor-joining, NJ）构建 L 片段的系统发育树，树的可信度检验采用 bootstrap 法进行评估，重复 1000 次，在最终系统发育树中去除 Bhanja 病毒的

分支，并通过 FigTree（版本 1.4.2）进行结果可视化。根据各毒株在系统发育树拓扑图中的距离，将 SFTSV 的 L 片段序列分别划分为不同的基因型。利用 MEGA 11.0 软件计算不同基因型之间的组内和组间遗传距离差异，DNASTAR 软件包中的 MegAlign 程序进行核苷酸序列的相似性比较，分析不同基因型之间的进化特点及地理分布。

2.2 2023 年安徽省六安市蜱虫样本检测分析

2.2.1 样本采集及处理

2023 年于 SFTS 病例高发区安徽省六安市地区进行寄生蜱虫和游离蜱虫样本采集。寄生蜱主要用专用镊子于动物体表进行采集；草地游离蜱主要通过布旗法进行采集。将采集的蜱虫样本先根据其来源进行分管，室温放置 5~7 天后，于 -80 °C 保存。参照《中国重要医学昆虫分类学与鉴别》（陆宝麟等，2003）和《口岸实用医学媒介生物彩色鉴定图谱》（陈小帆等，1971）对蜱虫的假头基、须肢、盾板、缘垛、气门板、足等具有形态学鉴定意义的部位进行观察对比并进行蜱虫分类。蜱虫样本进行形态鉴定后，再根据其种类及状态重新分装至研磨管中进行后续实验。

2.2.2 蜱虫样本研磨

蜱虫样本用无菌镊子放入 DMEM 培养液（含 3% PS）中振荡清洗 3 遍，随后装入提前高压好的带有钢珠的 1.5 mL 研磨管里，加入 600 μ L 的 DMEM 维持液；将研磨管放入研磨仪中，卡扣卡紧；4000 rpm、30 s 研磨，停歇 1~2 min 后，继续研磨，研磨约 3 次，直至蜱虫研磨成匀浆样；将研磨好的样本 4 °C，1000 rpm，离心 10 min 后于 -80 °C 保存，用于后续实验。

2.2.3 实时荧光定量 RT-PCR（qRT-PCR）

2.2.3.1 使用 QIAGEN(RNeasy® Plus Mini Kit)试剂盒提取待测研磨样本病毒 RNA:

- （1）取 560 μ L 加入 1% β -巯基乙醇的 RLT 裂解液于 1.5 mL EP 管中；
- （2）再加入 140 μ L 上述研磨样本的上清（其余研磨液放 -80 °C 冰箱保存）混匀，在生物安全柜内室温作用 10 分钟；
- （3）在上述混匀液中加入 700 μ L 70%乙醇，轻柔混匀；
- （4）分两次将上一步混匀准备的液体转移至 QIAamp 柱子中，台式离心机上 10000 rpm 离心 30 s；

- (5) 加入 700 μL 的 RW1 溶液清洗柱子，10000 rpm 离心 30 s，换新的收集管；
 - (6) 加入 500 μL 的 RPE 溶液清洗柱子，10000 rpm 离心 30 s，弃废液；
 - (7) 加入 500 μL 的 RPE 溶液再次清洗柱子，10000 rpm 离心 2 min；
 - (8) 换新的收集管，10000 rpm 空柱离心 1 min；
 - (9) 将 QIAamp 滤柱重新放到一个新的 1.5 mL 离心管中，加入 40 μL 的不含 RNase 的水，静置 1 min，10000 rpm 离心 1 min，收集洗脱液，-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。
- 2.2.3.2 使用一步法荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒（SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System Kit, Applied Biosystems, USA）检测待测样本病毒核酸：

以上述提取的待测样本为 Real-time PCR 检测的模板，使用由上海生物工程公司合成的 SFSTV 特异性引物和探针序列（表 1）。根据试剂盒配制 qRT-PCR 检测反应体系（表 2），反应条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min；90 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s；60 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s，循环 40 次。将 Cut-off 值设置为 Ct=35，记录样本的 Ct 值，阳性结果判断以荧光信号通路的 Ct 值<35 且扩增曲线为 S 型曲线作为标准。将检测为阳性的样本送公司测序。

表 1 SFSTV 特异性引物和探针序列

Tab. 1 Specific primers and probe sequences of SFSTV

引物名称	引物序列
SFSTV S-F (1104-1125)	5' -GGGTCCTGAAGGAGTTGTA-3'
SFSTV S-R (1155-1178)	5' -TGCCTTCACCAAGACTATCAATGT-3'
SFSTV M-F (1369-1393)	5' -AAGAAGTGGCTGTTTCATCATTATTG-3'
SFSTV M-R (1424-1445)	5' -GCCTTAAGGACATTGGTGAGTA-3'
SFSTV L-F (3138-3162)	5' -AGTCTAGGTCATCTGATCCGTTTAG-3'
SFSTV L-R (3209-3230)	5' -TGTAAGTTCGCCCTTTGTCCAT-3'
SFSTV S-Probe (1127-1148)	TexasRed-TTCTGTCTTGCTGGCTCCGCGC-BHQ-2
SFSTV M-Probe (1394-1420)	FAM-TCATCCTCCTTGATATGCAGGCCTCA-BHQ-2
SFSTV L-Probe (3168-3197)	HEX-CAATGACAGACGCCTTCCATGGTAATAGGG-BHQ1

表 2 SFTSV 实时荧光定量 RT-PCR 检测反应体系 (25 μL)Tab. 2 SFTSV real-time RT-PCR reaction system (25 μL)

反应物	体积 (μL)
3 \times SFTSV Forward primer	1.50
3 \times SFTSV Reverse primer	1.50
3 \times SFTSV Probe	0.75
Enzyme	1.00
2 \times Buffer	12.50
RNase-Free water	2.75
Template	5.00
Total	25.00

2.2.4 序列同源性比对及遗传进化分析

将荧光定量 PCR 检测为阳性的样本送交测序公司（上海生工生物工程有限公司）进行宏基因组高通量测序，使用 MEGA 11.0 软件对测序片段核苷酸序列及 NCBI 网站上下下载的其他序列进行多序列比对分析，使用 MEGA 11.0 软件中的邻位相接法 (NJ)，选择 p-distance 模型，设置重复次数 (Bootstrap Replications) 参数为 1000，绘制系统发育进化树并对不同序列之间核苷酸序列的相似性进行分析。

2.3 重组 PET30a-Isac 蛋白原核表达制备

2.3.1 双酶切制备开环载体质粒

将本科室保存的 PET30a-WENV NP 质粒使用 XhoI 和 NdeI 酶进行双酶切获取 PET30a 开环载体质粒，于 200 μL 的 EP 管中配制 XhoI 和 NdeI 双酶切 PET30a-WENV NP 的反应体系（表 3），放入 PCR 仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h。待酶切结束后，进行 DNA 凝胶电泳验证质粒酶切结果，将酶切获取的 PET30a 开环质粒酶切产物通过使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up 试剂盒进行回收。

表 3 XhoI 和 NdeI 双酶切 PET30a-WENV NP 的反应体系 (50 μ L)

Tab. 3 Reaction system for double digestion of PET30a-WENV NP by XhoI and NdeI (50 μ L)

体系	体积 (μ L)
PET30a-WENV NP	4
XhoI	1
NdeI	1
rCut smart Buffer	5
ddH ₂ O	To 50

2.3.1.1 DNA 凝胶电泳鉴定

(1) 配制 1.2%琼脂糖凝胶：称取 1.2g 琼脂糖加入至 100 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中，微波炉加热融化 3 min，加入 10 μ l 10000×Gel stain 核酸染料混匀，倒入凝胶制备模具静置数分钟，直至其凝固；

(2) 将凝胶放入电泳仪中，倒入 1×TAE 缓冲液，使其没过凝胶；

(3) 加样：在凝胶泳道分别加入 5 μ L DNA Marker、5 μ L 与 10×loading buffer 混匀的 PCR 产物；

(4) 设置 120 V，30 min 电泳参数进行 DNA 凝胶电泳；

(5) 待跑胶结束后用凝胶成像仪查看结果。

2.3.1.2 开环质粒酶切产物回收

使用 MN Takara 公司的 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up 试剂盒对酶切产物进行回收。

(1) 调整 DNA 结合条件，以 1:2 的比例将酶切产物和 NT1 溶液加入 1.5 mL 离心管中混匀；

(2) 结合 DNA，将上述混合液转移至带滤膜的柱子中 11000×g，30 s 离心；

(3) 清洗滤膜，在柱子中加入 700 μ L 的 NT3 溶液 11000×g，30 s 离心清洗，同样操作进行 2 次。

(4) 空柱离心，倒掉滤液，空柱子 11000×g，1 min 离心；

(5) 洗脱 DNA，将滤膜柱放入到一个新的 EP 管中并加入 50 μ L 的 NE 洗脱液，室温静置 1 min 后 11000×g，1 min 离心，收集洗脱液；

(6) 在 NanoPHotometer 仪器上取 1 μ L 洗脱后的 DNA，测定其核酸浓度。

2.3.2 Isac 目的片段制备

2.3.2.1 同源重组引物的设计

- (1) pET30a-F:taagaaggagatatacatatgGAAGACGGTCTAGAGCAAGAT
- (2) pET30a-R:gtggtggtggtggtggtgctcgagGGGAATTGCCTCAAATTGAGACTC

2.3.2.2 目的片段扩增

使用 Takara 公司的 PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase, 以 PTriex-Isac 质粒为模板进行 Isac 目的片段扩增进行 PCR 扩增, 于 200 μ L 的 EP 管中配制扩增反应体系如表 4, 反应条件如表 5。待 PCR 扩增结束后, 进行 DNA 凝胶电泳验证 Isac 目的片段扩增结果, 将获取的 Isac 目的片段扩增产物通过使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up 试剂盒进行回收。

表 4 PET30a-Isac 插入目的片段 PCR 扩增反应体系 (50 μ L)

Tab. 4 Reaction system for PCR of PET30a-Isac Insert target clip (50 μ L)

体系	体积 (μ L)
dNTP Mixture	4.0
5 \times PrimeSTAR GXL Buffer	10.0
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1.0
PET30a-F	1.0
PET30a-R	1.0
Template	0.5
ddH ₂ O	To 50.0

表 5 PET30a-Isac 插入目的片段 PCR 扩增反应条件

Tab. 5 Reaction condition for PCR of PET30a-Isac Insert target clip

循环次数	温度	时间
30	98 $^{\circ}$ C	10 min
	98 $^{\circ}$ C	10 s
	55 $^{\circ}$ C	15 s
	68 $^{\circ}$ C	1 min 30 s
	68 $^{\circ}$ C	10 min

2.3.2.3 目的片段扩增 DNA 凝胶电泳鉴定（操作同 2.3.1.1）。

2.3.2.4 目的片段扩增产物回收（操作同 2.3.1.2）。

2.3.3 同源重组制备 PET30a-Isac 目的质粒

2.3.3.1 Isac 目的基因与 PET30a 开环载体同源重组反应

将回收的 PET30a 开环载体及扩增后回收的 Isac 目的片段使用 Vazyme 公司的 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 试剂盒进行同源重组反应，反应体系见表 6，设置 50 °C，15 min 的反应条件，获得重组的 PET30a-Isac 质粒。

表 6 PET30a-Isac 插入片段与线性载体同源重组反应体系（10 μL）

Tab. 6 Reaction system for Homologous recombination of PET30a-Isac Insert target clip and linearized vector（10 μL）

体系	体积
目的片段	0.03 pM
开环载体	0.06 pM
2×ClonExpress Mix	5 μL
ddH ₂ O	To 10 μL

2.3.3.2 重组质粒 Trans5α感受态细胞转化

- （1）从-80 °C取出感受态细胞大肠杆菌细胞 Trans 5α（克隆菌）置于冰上融化；
- （2）将上述重组 PET30a-Isac 质粒加入至 Trans 5α感受态细胞中，冰浴 30 min；
- （3）42 °C热激 45 s，冰浴 2 min；
- （4）加入 1 mL 不含抗性的 2×YT 培养基，置于摇床 37 °C、220 rpm、1 h，使细菌复苏；
- （5）4000 rpm 离心 5 min，保留 50 μL 菌液重悬细菌；
- （6）重悬后将菌液加入到含 Kanamycin 的 LB 固体培养基平板上，使用涂菌棒划“Z”字型，使其均匀涂布（同时设置对照组）；
- （7）涂布好的平板置于 37 °C的孵箱中孵育，待菌液干燥后倒置培养 12~16 h。

2.3.3.3 菌落 PCR 验证重组质粒构建成功与否

设计与目的片段相结合的上游引物 Isac-F:TGGAAACTCAGACTTTGAAGAGGA 和与载体序列相结合的下游引物 Isac-R:tccggatatagttcctccttcag 这样一对交叉引物，用 Takara 公司的 PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase，以长出来的单

克隆菌落为模板进行 PCR 扩增, 于 200 μL 的 EP 管中配制扩增反应体系如表 7, 反应条件如表 8。PCR 扩增结束后, 进行 DNA 凝胶电泳验证交叉片段扩增结果。

表 7 重组质粒交叉片段 PCR 扩增反应体系 (25 μL)

Tab. 7 Reaction system for cross-fragment PCR of recombinant plasmids (25 μL)

体系	体积 (μL)
dNTP Mixture	2.0
5 \times PrimeSTAR GXL Buffer	5.0
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	0.5
Isac-F	1.0
Isac-R	1.0
Template	单克隆菌体
ddH ₂ O	To 25.0

表 8 重组质粒交叉片段 PCR 扩增反应条件

Tab. 8 Reaction condition for cross-fragment PCR of recombinant plasmids

循环次数	温度	时间
30	98 $^{\circ}\text{C}$	10 min
	98 $^{\circ}\text{C}$	10 s
	55 $^{\circ}\text{C}$	15 s
	68 $^{\circ}\text{C}$	1 min 30 s
	68 $^{\circ}\text{C}$	10 min

2.3.3.4 交叉片段扩增 DNA 凝胶电泳鉴定 (操作同 2.3.1.1)。

2.3.3.5 重组质粒少量提取制备

使用 QIAGEN 公司的 QIAperp Spin Miniprep Kit 从在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中孵育 12~16 小时的菌液中提取重组质粒:

(1) 取 1~5 mL 菌液于离心机中 10000 rpm/min 离心 3 min, 弃掉上清, 将沉淀收集;

(2) 重悬细菌, 将沉淀的细菌通过涡旋或上下移液使细菌完全重悬于 250 μL Buffer P1 (已添加 RNase A) 中, 并转移至微量离心管中;

- (3) 裂解细菌，加入 250 μL Buffer P2 至上一步液体中，上下颠倒试管 4~6 次，轻柔充分混匀，裂解反应进行时间不得超过 5 min；
- (4) 中和，加入 350 μL Buffer N3 至上一步液体中，上下颠倒试管 4~6 次，充分混匀中和溶液，将形成白色絮状物；
- (5) 将上一步液体放至台式离心机中 13000 rpm/min 离心 10 min，沉淀白色絮状物；
- (6) 用 0.5 mL Buffer PB 洗涤 QIAprep 2.0 Spin Column，10000 rpm/min 离心 30~60 s，弃去流过液；
- (7) 将第 5 步离心的上清液加入到洗涤过的 QIAprep 2.0 Spin Column 中，10000 rpm/min 离心 30~60 s，丢弃掉滤液；
- (8) 加入 0.75 mL Buffer PE 洗涤 QIAprep 2.0 Spin Column，10000 rpm/min 离心 30~60 s，丢弃掉滤液；
- (9) 10000 rpm/min 将空的 QIAprep 2.0 Spin Column 离心 1 min，去除残留的洗涤缓冲液；
- (10) 将 QIAprep 2.0 Spin Column 置于干净的 1.5 mL 离心管中，待柱子中残余液体蒸发干后，加入 30 μL 的 Buffer EB 于柱子中心，室温静置 1 min，10000 rpm/min 离心 1 min，洗脱质粒 DNA；
- (11) 使用 NanoPhotometer 仪器测定质粒 DNA 浓度并放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.3.3.6 双酶切及测序验证重组质粒

将上述提取的重组质粒使用 XhoI 和 NdeI 酶进行双酶切验证，于 200 μL 的 EP 管中配制 XhoI 和 NdeI 双酶切反应体系见表 9，放入 PCR 仪中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h。待酶切反应结束后，进行 DNA 凝胶电泳验证重组质粒酶切结果，同时将小提质粒送天一辉远公司测序验证。

表 9 XhoI 和 NdeI 双酶切重组质粒的反应体系 (50 μL)

Tab. 9 Reaction system for double digestion of recombinant plasmids by XhoI and NdeI (50 μL)

体系	体积 (μL)
Template	4
XhoI	1
NdeI	1
rCut smart Buffer	5
ddH ₂ O	To 50

2.3.3.7 PET30a-Isac 质粒大量提取制备

用 QIAGEN 公司的 QIAGEN® Plasmid Maxi Kit 从菌液中提取 PET30a-Isac 质粒:

(1) 将含有 PET30a-Isac 质粒的 Trans 5 α 感受态细菌接种于 1 L 含有 Kanamycin 的 2 \times YT 培养基中, 置于摇床 220 rpm、37 $^{\circ}\text{C}$, 过夜培养;

(2) 过夜培养的菌液用 50 mL 尖底收集, 6000 rpm/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 直到细菌全部离心至管底;

(3) QIAGEN® Plasmid Maxi Kit 提取前准备:

1) 将 RNaseA 溶液和 LyseBlue (1:1000) 加入 P1 缓冲液中混合, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

2) 预先 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 P3 缓冲液, 检查 P2 缓冲液是否有 SDS 沉淀;

3) 准备异丙醇, 配制 70%无水乙醇。

(4) 重悬, P1 缓冲液 10 mL, 重悬离心的菌体;

(5) 裂解, P2 缓冲液 10 mL, 上下倒管 4~6 次, 混匀, 室温静置 5 min;

(6) 加入预冷的 P3 缓冲液 10 mL, 上下倒管 4~6 次沉淀, 静置 5 min, 10000 rpm/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min;

(7) 将离心上清加入 QIAfilter cartridge 滤筒中过滤到一个 50 mL 尖底离心管中 (勿振荡管壁);

(8) 将 2.5 mL Buffer ER 加入过滤后的液体中混匀, 冰上静置 30 min;

(9) 用 QBT 缓冲液 10 mL 平衡 QIAGEN-tip 500, 重力流空;

(10) 将步骤 8 得到的液体加入到平衡后的 QIAGEN-tip 500 柱中（分管的液体加到同一柱中），重力流空；

(11) 用 QC 缓冲液 30 mL 清洗 QIAGEN-tip 500 柱两遍；

(12) 用 15 mL QN 缓冲液将 DNA 洗脱到新的 50 mL 尖底离心管；

(13) 洗脱后的 DNA 中加入 10.5 mL 室温保存的异丙醇混匀并沉淀 DNA, 10000 rpm/min、4 °C 离心 30 min, 小心倒掉上清, 留下底部 DNA 沉淀；

(14) 加入 5 mL 用无内毒素水稀释至 70% 的乙醇重悬 DNA 沉淀, 10000 rpm/min、4 °C 离心 10 min, 小心倒掉上清, 留下底部 DNA 沉淀；

(15) 风干 DNA 沉淀 5~10 min, 去除残留的乙醇, 用 200 μ L TE 缓冲液重新溶解 DNA；

(16) 使用 NanoPhotometer 对质粒浓度进行测定并置于 -20 °C 冰箱保存。

2.3.4 蛋白诱导表达

2.3.4.1 PET30a-Isac 质粒 BL21 感受态细胞转化及菌液保存

(1) 从 -80 °C 取出感受态大肠杆菌细胞 BL21（表达菌）置于冰上融化；

(2) 将 1 μ L PET30a-Isac 质粒加入至 BL21 感受态中, 冰浴 30 min；

(3) 再将感受态细胞放到金属浴中, 42 °C 热激 45 s 后重新冰浴 2 min；

(4) 加 1 mL 不含抗性的 2 \times YT 培养基到感受态细胞中, 置于摇床 37 °C、220 rpm 振荡培养 1 h, 使细菌复苏；

(5) 离心保留 50 μ L 菌液重悬细菌, 重悬后将含 PET30a-Isac 质粒的菌液加入到含 Kanamycin 的 LB 固体培养基平板上, 使用涂菌棒划“Z”字型, 使其均匀涂布（同时设置对照组）；

(6) 涂布好的平板于 37 °C 的孵箱中孵育, 待菌液干燥后倒置平板培养 12~16 h；

(7) 待培养 12~16 h 后, 挑取单克隆菌落接种于 10 mL 含 Kanamycin 的 2 \times YT 培养基中, 置于摇床 37 °C、220 rpm 振荡培养；

(8) 待菌液 OD 值到达 0.6~0.8 时, 将菌液分装至冻存管中与 50% 甘油 1:1 混匀, 置于 -80 °C 保存备用。

2.3.4.2 PET30a-Isac 重组蛋白小量诱导表达及鉴定

(1) 将含 PET30a-Isac 质粒的 BL21 表达菌液按 1:100 比列转接到 10 mL 含 Kanamycin 的 2 \times YT 培养基中, 同时设置不含质粒的 BL21 表达菌作为阴性对照

组，置于摇床 37 °C、220 rpm 振荡培养；

(2) 待菌液浑浊后使用 OD 值分光光度计测其 OD 值，OD 值为 0.6~0.8 时，向菌液中加入 1 mol/L IPTG，使其终浓度达到 1 mmol/L，继续于摇床诱导表达 4 h；

(3) 待诱导表达 4 h 后，取 1 mL 菌液到离心管中，13000×g 离心 1 min（若菌体量不够，可适量增加菌液离心）；

(4) 离心的菌体用 1 mL PBS 重悬再离心，同操作进行 1~2 次，洗去培养基；

(5) 于沉淀的菌体中加入 50 μL 的 PBS 重悬，1:1 混合 Smapple Buffer，98 °C 加热 10 min 后，13000×g 离心 10 min；

(6) 取 5 μL Protein Marker 及 10 μL 步骤 5 中的上清加入到商业化 SDS-PAGE 胶的孔中，低电压 90 V；

(7) 待 Protein Marker 条带跑开分散后将电压调至 120 V，直至 Protein Marker 条带跑至凝胶底部；

(8) 暂停电泳，将蛋白凝胶浸没于考马斯亮蓝染色液中，置于摇床染色 30~40 min，观察表达情况。

2.3.4.3 PET30a-Isac 重组蛋白大量诱导

(1) 将含 PET30a-Isac 质粒的 BL21 表达菌液按 1:100 比例接种到 50 mL 含 Kanamycin 的 2×YT 培养基中，摇床 37 °C、220 rpm 过夜振荡培养后转接至 1 L 含 Kanamycin 的 2×YT 培养基中，置于摇床 37 °C、220 rpm 振荡培养；

(2) 待菌液浑浊后用 OD 值分光光度计测其 OD 值，OD 值为 0.6~0.8 时，向菌液中加入 1 mol/L IPTG，使其终浓度达到 1 mmol/L，继续置于摇床 37 °C、220 rpm 振荡培养 12~16 h。

2.3.4.4 破碎菌体、洗涤及溶解包涵体

(1) 将上述振荡培养的菌液收集至离心管中，8000 rpm、4 °C 离心 20 min，获取沉淀下来的菌体；

(2) 加入适量的 PBS 溶液重悬菌体，8000 rpm、4 °C 离心 20 min，重复操作，去除残留培养基；

(3) 收集菌体并称量湿重，以 20 mL/g 的量加入细菌裂解液并充分重悬菌体，-80 °C 与室温环境反复冷冻与融化 3 次；

(4) 超声破碎机破碎冻融细胞使其裂解，400 W，设置温度为 4 °C，每超声 5 s

暂停 5 s, 持续破碎 15 min 直至细胞裂解完全, 在 4 °C 下, 8000 rpm 离心 20 min, 丢弃上清, 收取沉淀;

(5) 向收取的沉淀中加入 100 mL 的含 8 M 尿素的蛋白变性液重悬沉淀, 在室温条件下轻柔的搅拌 1 h 左右, 放于 4 °C 下静置过夜, 充分溶解包涵体;

(6) 将充分溶解的包涵体溶液经 4 °C, 8000 rpm 离心 1 h 后用 0.45 μm 孔径滤器进行过滤并收集放 4 °C 短暂保存。

2.3.4.5 金属离子亲和层析纯化 PET30a-Isac 重组蛋白

(1) AKTA prime 仪开机清洗: 选择 Manual run 模式, ddH₂O 中放入 A、B 管, B 管进液 50%, 流速 10 mL/min, waste 模式, 清洗机器, 排空管道气泡;

(2) Ni⁺亲和柱连接: 将 HisTrap Chelating HP (5mL) 镍柱 (Ni⁺亲和柱) 与 AKTA prime 仪连接, 镍柱下端接 AKTA prime 仪, 上端接进液管;

(3) Ni⁺亲和柱平衡: load 模式, 相继用 10 倍柱体积的 ddH₂O 和亲和层析 Binding Buffer, 设置流速 2 ml/min 洗平 cond 基线;

(4) 上样: 将 A 进液管放到 2.3.4.4 中过滤的包涵体溶液中, 设置流速 2 mL/min, 收集穿过 Ni⁺亲和柱的液体, 反复上样 3 次;

(5) Ni⁺亲和柱平衡: 上样结束后, 用 10 倍柱体积的亲和层析 Binding Buffer, 设置流速 2 mL/min, 平衡 Ni⁺亲和柱, 直到 UV 基线洗平;

(6) 洗脱: Load 模式, 2 mL/min, 用含 5%、10%、20%、30%、40%、60%、100% 咪唑浓度的金属离子亲和层析 Elution Buffer 对 Ni⁺亲和柱进行梯度洗脱, 并收集洗脱峰的洗脱液进行 SDS-PAGE 鉴定;

(7) Ni⁺亲和柱回收及仪器清洗: 依次用 10 倍柱体积的金属离子亲和层析 Binding Buffer 和 ddH₂O, 设置流速 2 mL/min 清洗柱子和仪器, 再用 20% 乙醇, 设置流速 1 mL/min 贯穿柱子和仪器;

(8) 将 Ni⁺亲和柱从仪器上取下, 放到 20% 乙醇中, 4 °C 环境中保存。

2.3.4.6 PET30a-Isac 重组蛋白透析复性

(1) 透析盒预处理: 将透析膜放入 ddH₂O 中复性 1 min;

(2) 将上述鉴定无误的蛋白纯化样品经 0.45 μm 的滤器过滤后加入 Roche 蛋白酶抑制剂, 并用注射器转移至透析盒中, 排空透析盒中的空气后将其放入透析复性液中, 4 °C 进行透析复性, 同时使用磁力搅拌器协助透析;

(3) 透析复性液以尿素浓度 (6.0 M、4.0 M、2.0 M、1.5 M、1.0 M、0.5 M) 递减进行梯度透析复性, 每间隔 12 h 更换降低一个浓度的透析液, 使尿素浓度逐步降低至 0.5 M 左右;

(4) 待透析复性液尿素浓度降低至 0.5 M 左右后更换为 1×PBS 溶液进行蛋白透析复性, 透析 36 h 左右, 每 2 h 更换一次;

(5) 透析复性完成后收集保存于 1×PBS 溶液中的蛋白, 使用 NanoPhotometer 对该蛋白浓度进行测定并分装保存于 -80 °C。

2.3.4.7 免疫印迹 (Western blot) 鉴定 PET30a-Isac 重组蛋白

(1) 取适量原核表达的 PET30a-Isac 重组蛋白作 20 ng/μL 的稀释处理, 1:1 加入 Simple Buffer (含 5% β-ME) 混匀, 98 °C 金属浴加热 10 min 进行热变性;

(2) 取 5 μL Protein Marker 及 10 μL 上述样品加入到商业化 SDS-PAGE 胶的孔中, 低电压 90 V;

(3) 待 Protein Marker 条带跑开分散后将电压调至 120 V, 直至 Protein Marker 条带跑至凝胶底部, 暂停电泳;

(4) 准备 PVDF 膜, 将其裁剪成胶块大小, 放置于甲醇中浸泡, 使其复性;

(5) 打开转膜仪, 放置转膜材料: 白色滤纸→PVDF 膜→SDS-PAGE 胶→转膜液→黄色滤纸依次加入, 确保无气泡后关闭转膜仪, 设置转膜时间为 8 min;

(6) 将转膜成功的 PVDF 膜取出并放入 PBS 配制的 5% 脱脂奶中, 置于脱色摇床上室温环境封闭 1 h;

(7) 封闭 1 h 后, 将膜浸没于用 5% 脱脂奶 (PBS 配制) 1:1000 配制的小鼠抗 His 标签的单抗液中, 摇床孵育 1 h;

(8) 在摇床上用 PBST 清洗 PVDF 膜 3 遍, 1 遍 15 min 左右;

(9) 将膜浸没于用 5% 脱脂奶 (PBS 配制) 1:1000 配制的 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体液中, 摇床孵育 1 h;

(10) 在摇床上用 PBST 清洗 PVDF 膜 3 遍, 1 遍 15 min 左右;

(11) 加 abcam 品牌的 DAB Substrate Kit 中的显色液进行显色, 待出现条带后立即用蒸馏水漂洗 PVDF 膜停止反应, 观察并保存实验结果。

2.4 统计分析

使用 Excel 表格对下载序列及样本信息进行整理, SPSS 软件进行统计分析,

图形绘制使用 Origin、GraphPad Prism 8.0 软件；根据 SFTSV 基因型构成比分析地理分布特征；蜱虫 SFTSV 感染率计算用最低感染率（Minimum Infection Rate, MIR），公式为：MIR=阳性批次/总蜱数×100%。使用 χ^2 检验对率进行比较分析，P <0.05 为显著水平。

3 结果

3.1 发热伴血小板减少综合征病毒基因型及地理分布特征分析

3.1.1 L 片段全长基因序列遗传进化分析

jModelTest 程序预测最佳的核苷酸拟合模型为（GTR + I + G），利用该模型及 MEGA 11.0 软件对获取的序列数据集进行最大似然和邻位相接法分析，构建 L 片段的系统发育树。根据系统发育树拓扑结构（图 1，由于页面限制，仅选择代表株作为结果呈现，表 10）及不同进化枝的遗传距离（表 11），观察到 SFTS 病毒 L 片段可分为 6 个进化枝，枝内的遗传距离为 0.009~0.032，不同枝间的遗传距离为 0.035~0.042，分别命名为基因型 A-F，且 A-F 每个基因型内的核苷酸相似性分别为 A 基因型 98.5%~99.7%、B 基因型 96.9%~99.8%、C 基因型 98.4%~99.9%、D 基因型 96.1%~99.7%、E 基因型 97.7%~99.8%、F 基因型 95.9%~99.7%（图 2）。在 1317 株 L 基因组片段完整的 SFTSV 毒株中，A、B、C、D、E、F 基因型分别有 658 株、218 株、20 株、8 株、227 株和 186 株。

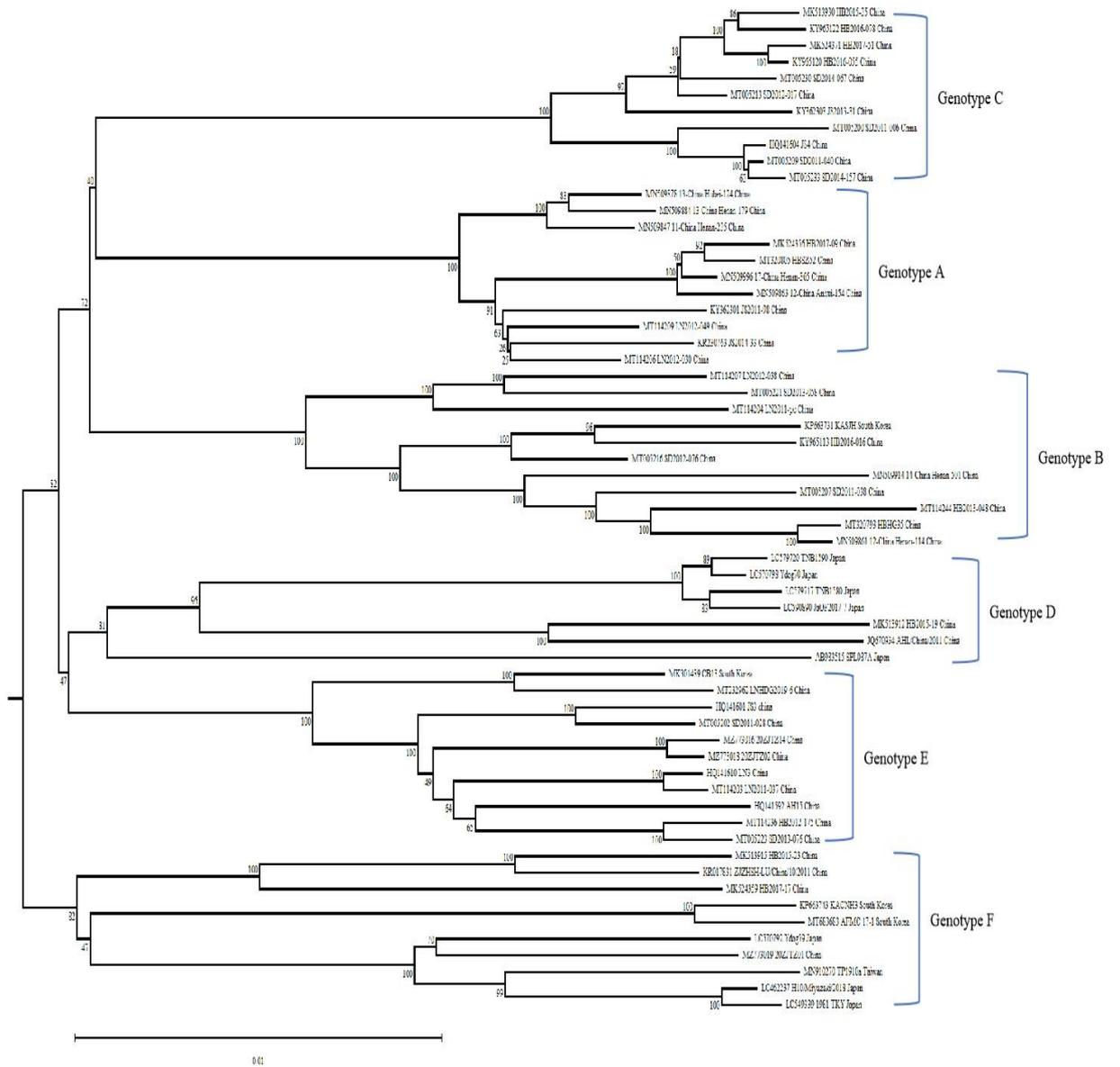


图 1 SFTS 病毒部分 L 片段核苷酸序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed from the nucleotide sequence of the partial L segment of SFTS virus

表 10 SFTS 病毒 L 片段部分毒株信息

Tab. 10 Information on SFTS virus L segment partial strains

Country	Location	Year	Host	Strain	Accession	Genotype
China	Hubei	2017	Human	HB2017-09	MK524356	A
China	Liaoning	2012	Human	LN2012-049	MT114209	A
China	Liaoning	2012	Human	LN2012-030	MT114206	A
China	Unknow	2012	Human	12-China_Anhui-154	MN509863	A

(续表 10)

Country	Location	Year	Host	Strain	Accession	Genotype
China	Unknow	2013	Human	13-China_Hubei-124	MN509878	A
China	Unknow	2013	Human	13-China_Henan-179	MN509884	A
China	Unknow	2017	Human	17-China_Henan-365	MN509996	A
China	Hubei	2017	Human	HBSZ52	MT320805	A
China	Unknow	2014	Human	JS2014-33	KR230763	A
China	Unknow	2011	Human	JS2011-98	KY362301	A
China	Unknow	2011	Human	11-China_Henan-235	MN509847	A
China	Shandong	2011	Human	SD2011-038	MT005207	B
China	Shandong	2013	Human	SD2013-058	MT005221	B
China	Hubei	2013	Human	HB2013-048	MT114244	B
China	Liaoning	2011	Human	LN2011-pc	MT114204	B
South Korea	Unknow	2014	Human	KASJH	KP663731	B
China	Unknow	2012	Human	12-China_Henan-114	MN509861	B
China	Hubei	2017	Human	HBHG35	MT320793	B
China	Shandong	2012	Human	SD2012-076	MT005216	B
China	Hubei	2016	Human	HB2016-016	KY965113	B
China	Unknow	2014	Human	14-China_Henan-501	MN509914	B
China	Liaoning	2012	Human	LN2012-038	MT114207	B
China	Shandong	2011	Human	SD2011-040	MT005209	C
China	Shandong	2012	Human	SD2012-017	MT005213	C
China	Shandong	2014	Human	SD2014-067	MT005230	C
China	Shandong	2014	Human	SD2014-157	MT005233	C
China	Hubei	2015	Lab host	HB2015-35	MK513930	C
China	Hubei	2017	Human	HB2017-51	MK524371	C
China	Hubei	2016	Human	HB2016-078	KY965122	C
China	Unknow	2013	Human	JS2013-31	KY362303	C
China	Shandong	2011	Human	SD2011-006	MT005200	C
China	Hubei	2016	Human	HB2016-055	KY965120	C
China	JiangSu	2010	Human	JS4	HQ141604	C
China	Unknow	2011	Human	AHL/China/2011	JQ670934	D
Japan	Unknow	2017	Human	SPL087A	AB983515	D
China	Hubei	2012	Lab host	HB2015-19	MK513912	D
Japan	Unknow	2012	Raccoon	TNB1590	LC579720	D
Japan	Unknow	2012	Dog	Ydog70	LC570798	D
Japan	Unknow	2013	Raccoon	TNB1580	LC579717	D
Japan	Osaka	2013	Human	JaOF2017-7	LC590890	D
China	Zhejiang	2017	Human	20ZJTZ14	MZ773016	E
China	JiangSu	2017	Human	JS3	HQ141601	E
China	AnHui	2014	Human	AH15	HQ141592	E
China	Liaoning	2011	Human	N3	HQ141610	E
China	Hubei	2011	Human	HB2012-175	MT114236	E

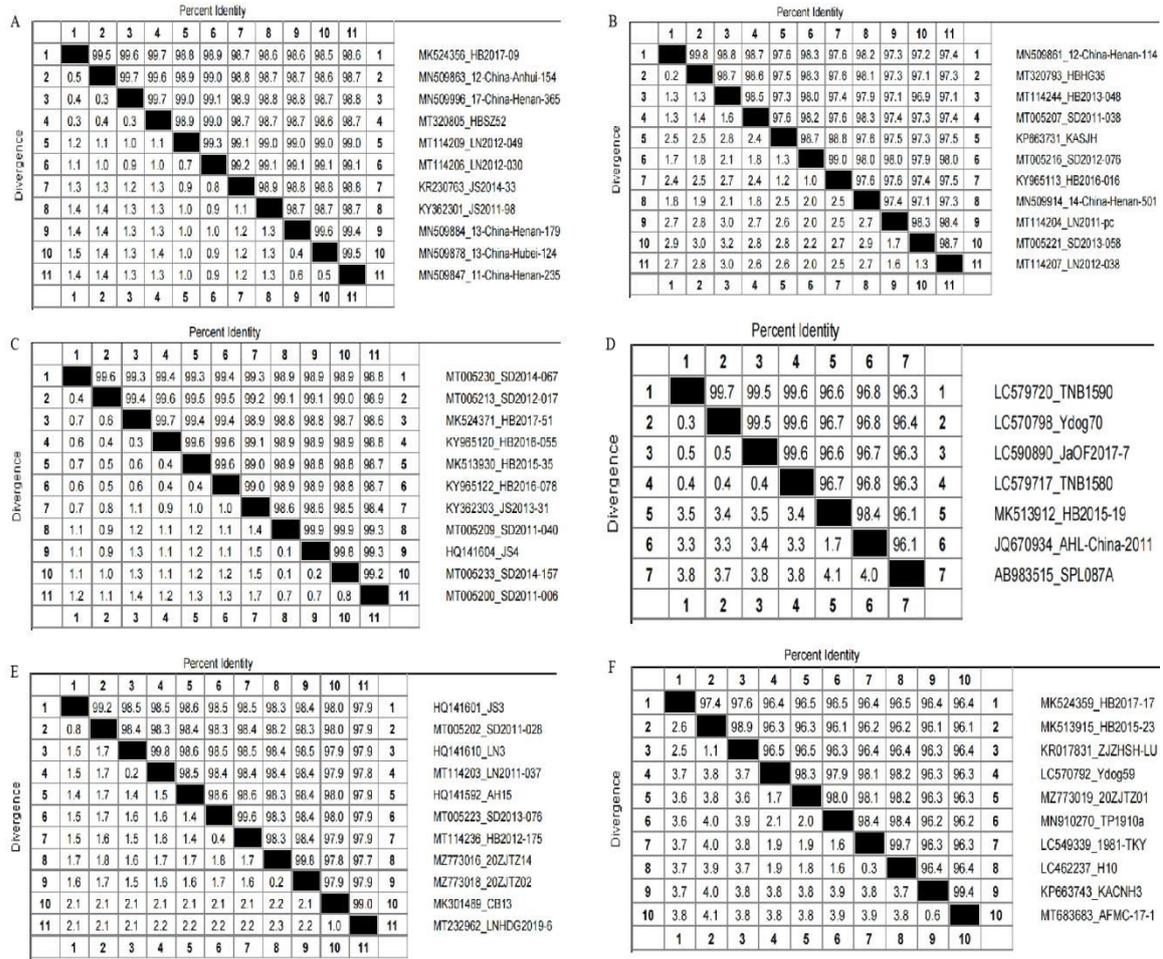
(续表 10)

Country	Location	Year	Host	Strain	Accession	Genotype
China	Shandong	2011	Human	SD2011-028	MT005202	E
China	Shandong	2013	Human	SD2013-076	MT005223	E
China	Liaoning	2013	Human	LNHDG2019-6	MT232962	E
South Korea	Unknow	2011	Human	CB13	MK301489	E
China	Liaoning	2014	Human	LN2011-037	MT114203	E
China	Zhejiang	2012	Human	20ZJTZ02	MZ773018	E
China	Hubei	2017	Human	HB2017-17	MK524359	F
South Korea	Unknow	2012	Human	KACNH3	KP663743	F
Japan	Unknow	2016	Dog	Ydog59	LC570792	F
Taiwan	Unknow	2014	Human	TP1910a	MN910270	F
Japan	Unknow	2012	Human	1981_TKY	LC549339	F
China	Hubei	2011	Lab host	HB2015-23	MK513915	F
China	Unknow	2012	Human	ZJZSH-LU/China/10/2011	KR017831	F
Japan	Miyazaki	2014	Human	H10/Miyazaki/2018	LC462237	F
South Korea	Unknow	2014	Human	AFMC_17-1	MT683683	F
China	Zhejiang	2020	Human	20ZJTZ01	MZ773019	F

表 11 SFTS 病毒 L 片段基因型组内和组间遗传距离分析

Tab. 11 Genetic distance analysis of SFTS virus L segment genotypes within and between groups

基因型	组间					组内
	F	D	B	A	C	
F						0.032
D	0.042					0.025
B	0.041	0.041				0.021
A	0.040	0.038	0.036			0.010
C	0.041	0.040	0.038	0.035		0.009
E	0.039	0.038	0.038	0.035	0.038	0.017



注：A、B、C、D、E、F 分别为 A-F 基因型

图 2 SFTS 病毒部分 L 片段基因型组内核苷酸序列相似性分析

Fig. 2 Analysis of nucleotide sequence similarity within the genotype of the partial L segment of SFTS virus

3.1.2 基因型多样性及分布特征

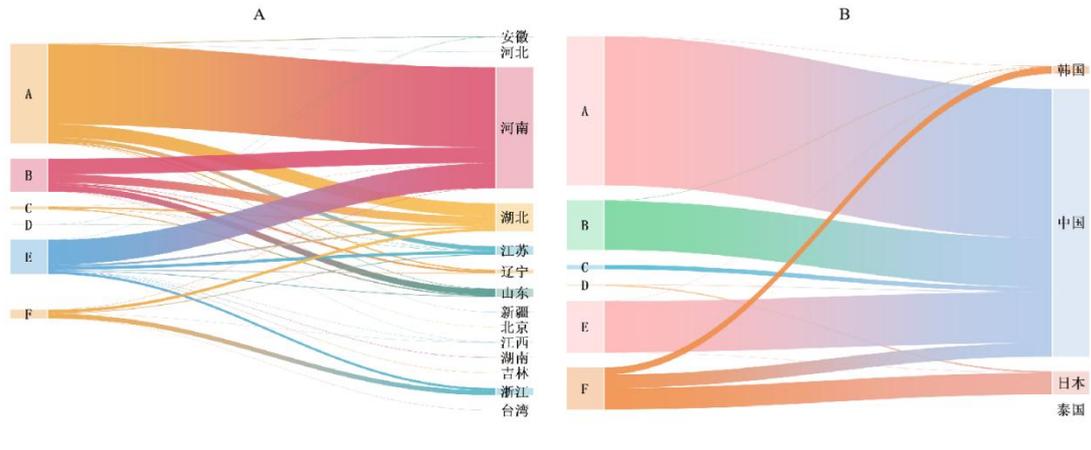
根据 L 序列数据集构建的系统发育树，描述 SFTSV 的基因型分布特征（表 12，图 3）。A、B、E、F 基因型占 SFTSV 分离株的 97%以上（L:1289/1317），主要分布在 SFTSV 严重的疫情区域。其中，基因型 A 是报告最多的基因型，其毒株已出现在中国河南、湖北、江苏、辽宁、安徽、山东、河北、新疆等 8 个 SFTSV 流行省份以及韩国，其中 79.90%的 A 基因型来自河南省毒株的，其次为湖北（13.24%）、江苏（4.26%）和辽宁（1.22%）。E 基因型在我国分布最广且相对均匀，14 个报告 SFTS 病例的省份中就有 10 个省报道了 E 基因型。B 基因型也主要在我国流行，以河南、湖北、山东、辽宁报告病例居多，来自这 4

省的毒株占 97%以上；此外，江苏、江西、北京及韩国对 B 基因型也有少数报道，而目前日本还未报道该基因型。除 B 基因型外，日本也未曾报道 A、C 基因型，而是以 F 基因型为主要流行，占 93.14%；F 基因型在我国浙江省（65.95%）和韩国（88.57%）也具有明显的流行优势，并且这三个区域贡献了绝大多数 F 基因型毒株，此外，还发现了 1 株来自泰国的 F 基因型毒株。目前，D 和 C 基因型也公布了少量的毒株序列。C 基因型仅见于中国湖北、山东、江苏和河南。D 型仅 8 株，分别来自安徽（1 株）、湖北（1 株）和日本（6 株）。

表 12 SFTS 病毒 L 片段的基因型地理分布信息

Tab. 12 Geographical distribution information of the genotype of SFTS virus L segment

Isolation Country	Geographic Location	Genotype						Total
		A	B	C	D	E	F	
China		657	216	20	2	225	59	1179
	Anhui	4	-	-	1	1	-	6
	Beijing	-	1	-	-	-	-	1
	Henan	525	104	1	-	163	2	795
	Hunan	-	-	-	-	2	-	2
	Jiangsu	28	2	2	-	20	5	57
	Jiangxi	-	1	-	-	1	1	3
	Jilin	-	-	-	-	2	-	2
	Liaoning	8	13	-	-	4	-	25
	Shandong	3	41	7	-	4	-	55
	Taiwan	-	-	-	-	-	1	1
	XinJiang	1	-	-	-	-	-	1
	Zhejiang	-	-	-	-	16	31	47
	Hebei	1	-	-	-	-	-	1
	Hubei	87	54	10	1	12	19	183
Japan		-	-	-	6	1	95	102
	Kochi	-	-	-	-	-	2	2
	Miyazaki	-	-	-	-	-	13	13
	Osaka	-	-	-	1	-	-	1
	Unknow	-	-	-	5	1	80	86
South Korea		1	2	-	-	1	31	35
	Unknow	1	2	-	-	1	28	32
	Chungju	-	-	-	-	-	1	1
	Daegu	-	-	-	-	-	1	1
	Cheongju	-	-	-	-	-	1	1
Thailand		-	-	-	-	-	1	1
	Unknow	-	-	-	-	-	1	1
Total		658	218	20	8	227	186	1317



注：A. 中国；B. 全球

图 3 中国和全球 SFTSV L 片段基因型地理分布桑基图

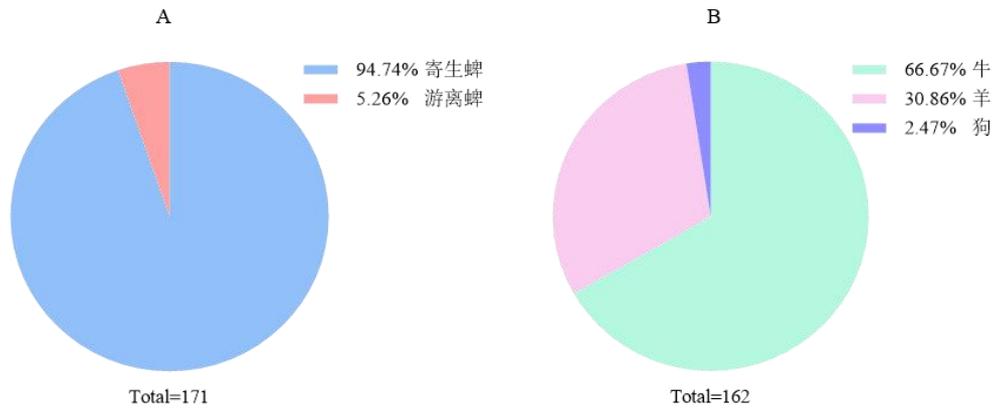
Fig. 3 Sankey diagram of SFTSV L segment genotype geographic distribution in China and the global

3.2 2023 年安徽省六安市蜱虫样本检测分析

3.2.1 蜱虫样本信息及分类鉴定

3.2.1.1 蜱虫样本捕获情况

本研究于 2023 年 5 月份在六安市霍山县太平畈乡共采集蜱虫 171 只。用动物体表法采集寄生蜱虫共 162 只，占比 94.74%，其中来自于动物牛体表的有 108 只（66.67%）、动物羊体表的有 50 只（30.86%）、动物狗体表的有 4 只（2.47%）；用布旗法采集游离蜱虫共 9 只，占比 5.26%（图 4）。



注：A：蜱虫样本类型构成情况；B：寄生蜱虫来源构成情况

图 4 蜱虫样本构成情况（%）

Fig. 4 Tick sample composition（%）

3.2.1.2 蜱虫样本分类鉴定

根据蜱虫形态学特点（表 13）对本次采集的蜱虫样本进行种类鉴定，鉴定结果显示本次蜱种包括长角血蜱、微小扇头蜱和血红扇头蜱，其中长角血蜱为优势蜱种，占比最高，占 64.33%；其次为微小扇头蜱，占 31.58%，血红扇头蜱占比最少，占 4.09%（表 14）。

表 13 部分蜱虫形态学特征

Tab. 13 Partial morphological characteristics of ticks

形态特征	长角血蜱	微小扇头蜱	血红扇头蜱
颜色	雄雌蜱均呈黄褐色	雄雌蜱均呈浅褐色	雄雌蜱均呈红褐色
假头基	雄雌蜱均呈矩形，宽短	雄雌蜱均呈六角形，宽短	雄雌蜱均呈六角形，宽短，侧角明显
基突	雄蜱大，末端尖	-	雄蜱明显，呈小尖齿状，后缘微凹向上呈半弧形；雌蜱宽短，后缘较平直
须肢	前窄后宽，雄蜱第 2 节外角突出；雌蜱第 3 节背缘有三角刺突	雄雌蜱须肢短，第 2、3 节有横脊	雄雌蜱须肢粗短，中部最宽，前端稍窄
盾板	卵形，中部最宽，雄蜱刻点中等大，分布均匀稠密；雌蜱边缘均匀弧形微波状	雄蜱盾板刻点稀少	长卵形，雄蜱前窄后宽，分布有粗细不等的刻点；雌蜱肩沟明显，延至盾板后侧缘
缘刺	雄雌蜱均缘刺明显，窄长而清晰	雄雌蜱均无缘刺	雄雌蜱均有缘刺，中刺较宽
气门板	雄雌蜱均呈卵圆形	-	雄雌蜱均呈逗点形
足	雄雌蜱均中等粗细，基节 I 内距长，末端略尖	雌蜱基节 I 内外距粗短	雄雌蜱足基节 I 内外距约等长
颈沟	雄蜱短小呈弧形；雌蜱长而明显，末端达盾板后 1/3	-	雄蜱深而短；雌蜱前端深，向后呈八字分开

表 14 不同种类蜱虫样本构成情况 (N, %)

Tab. 14 Composition of tick samples of different species (N, %)

采集方法	蜱虫种类			总数 (N)
	长角血蜱	微小扇头蜱	血红扇头蜱	
动物体表法	106 (65.43)	51 (31.48)	5 (3.09)	162
布旗法	4 (44.44)	3 (33.33)	2 (22.22)	9
合计	110 (64.33)	54 (31.58)	7 (4.09)	171

3.2.2 蜱虫样本病原学检测

通过实时荧光定量 PCR 检测方法对采集到的蜱虫样本进行 SFTS 病毒核酸检测，以荧光信号通路的 Ct 值 <35 且扩增曲线为 S 型曲线作为阳性结果判断标准，从 171 只不同种类的蜱虫样本中共检测出 5 个 SFTSV 阳性样本，其中长角血蜱 4 只，微小扇头蜱 1 只，血红扇头蜱未检出阳性，蜱虫最低感染率（MIR）分别为 3.64%、1.85%和 0（图 5）；从 162 只动物来源的蜱虫样本中进行 SFTSV 核酸检测，其中牛蜱 108 只，检测出阳性 1 份，最低感染率为 0.93%，狗蜱 4 只均检测出阳性，最低感染率为 100%，羊蜱 50 只未检出阳性。

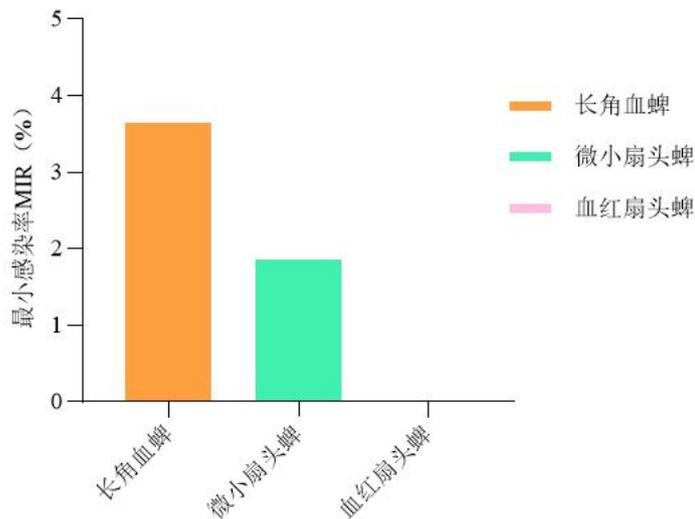


图 5 不同种类蜱虫样本最低感染率情况

Fig. 5 Minimum infection rate of tick samples of different species

3.2.3 序列比对分析

将经过荧光定量 PCR 方法检测为 SFTSV 阳性的蜱虫样本送生物测序公司进行测序。由于信号弱，未获得 SFTSV 序列片段，但获得三个未知病毒片段，片段长度分别为 6522 bp、2014 bp 和 10306 bp，根据地区、实验室编号和分离年代命名原则，将其分别命名为 AnHui/LA-D-159/2023、AnHui/LA-B-002/2023 和 AnHui/LA-B-066/2023，设计荧光探针及引物（①AnHui/LA-D-159/2023-F(2223-2244): TGAGAATCATCAAGGAGCCATT、AnHui/LA-D-159/2023-R(2358-2338): TAGGTAGCCAAGGTAGAAGAGG、AnHui/LA-D-159/2023-Probe(2246-2278): CY5-ATGCCAATCCCTGTCTCGATGGGAAAGCCAAGTGG-BHQ2；②AnHui/LA-B-002/2023-F(630-651):CATTAAAGGTGTTGATGGAGTGG；AnHui/LA-B-002/20

23-R(699-679): ATCACTGTCATTCAGCCTCAC; AnHui/LA-B-002/2023-Probe(653-687):HEX-CATGCCGAATGTGCAGGGGTGGAAGGGTGAGGCTG-BHQ1;

③AnHui/LA-B-066/2023-F(6354-6375):CCACCACCTTCCTTCAATCATA、AnHui/LA-B-066/2023-R(6463-6442):TGATGGTGCTGGTCTCTTCC、AnHui/LA-B-066/2023-Probe(6378-6412):FAM-ACCGGCTGGTACTATGGGGCTGCAATCAATTTCTG-BHQ1), 对这三个病毒进行实时荧光定量 PCR 检测(方法同 2.2.3), 以荧光信号通路的 Ct 值<35 且扩增曲线为 S 型曲线作为阳性判断标准, 从 171 只不同种类的蜱虫样本中分别对应检测出 4 个、6 个和 0 个阳性样本, 最低感染率(MIR)分别为 2.34%、3.51%、0。将获得的三个病毒基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比较, AnHui/LA-D-159/2023 病毒与 2019 年贵州省铜仁市收集的以野猪为宿主的蜱虫中分离的病毒(GeneBank 号: ON812233)核酸同源性为 98.00%; AnHui/LA-B-002/2023 病毒与 2012 年湖北省采集的蜱虫中分离的病毒(GeneBank 号: MW721915)核酸同源性为 98.00%, AnHui/LA-B-066/2023 病毒与 2019 年湖北省采集的蜱虫中分离的病毒(GeneBank 号: MW721927)核酸同源性为 99.58%, 经与病毒病原体资源数据库(ViPR)发表的其他蜱传病毒(表 15)序列一起进行系统发育树分析(图 6), 验证前两个病毒(AnHui/LA-D-159/2023、AnHui/LA-B-002/2023)为布尼亚病毒下的白蛉病毒科, 后一个病毒(AnHui/LA-B-066/2023)为弹状病毒科病毒。

表 15 本研究所用蜱传病毒的分类信息

Tab. 15 The classification information of the tick-borne virus used in this study

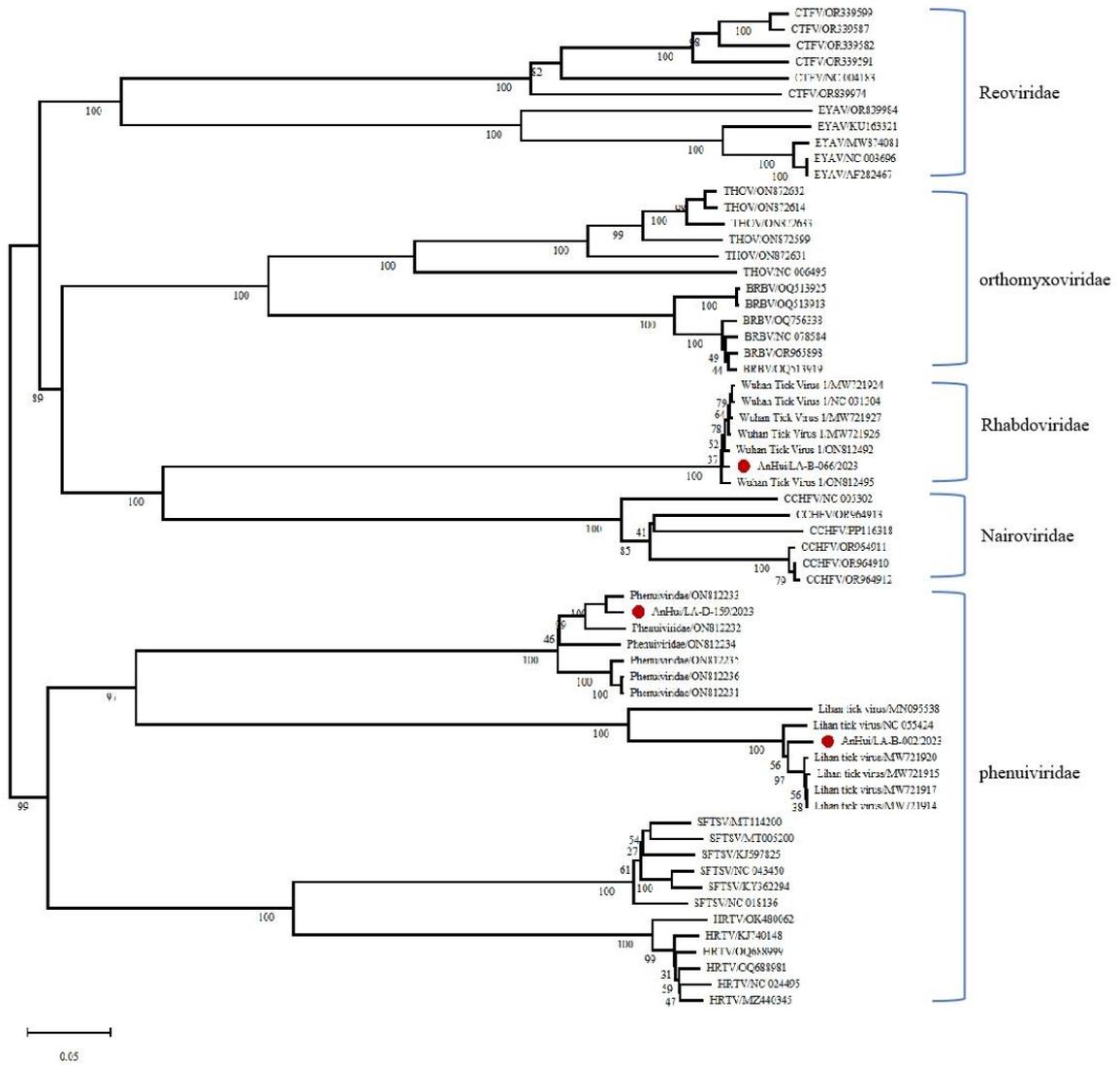
Order	Family	Species	Viral Strain	Country	Accession
Bunyavirales	Phenuiviridae	SFTSV	SD2011-006	China	MT005200
			LN2010-001	China	MT114200
			JS2011-106	China	KY362294
			HNXH	China	NC_043450
			Zhejiang/01/2011	China	KJ597825
			HB29	China	NC_018136
			HRTV	USA	KJ740148
			R124318c	USA	OQ688999

(续表 15)

Order	Family	Species	Viral Strain	Country	Accession		
Bunyavirales	Phenuiviridae	HRTV	1782	USA	MZ440345		
			Patient1	USA	NC_024495		
			M12-66	USA	OQ688981		
			R102483a	USA	OK480062		
			TIGMIC_6	China	ON872631		
			Phenuiviridae	TIGMIC_4	China	ON812233	
				sp.	TIGMIC_3	China	ON812232
				TIGMIC_5	China	ON812234	
				TIGMIC_6	China	ON812235	
				TIGMIC_7	China	ON812236	
		TIGMIC_2	China	ON812231			
	Lihan tick virus	Thailand tick phlebovirus	Thailand tick	Thailand	MN095538		
			LTV/HAHH7	China	MW721917		
			LTV/HAHH2	China	MW721915		
			LTV/HAHH5	China	MW721914		
			LTV/HAHH4	China	MW721920		
			LH-1	China	NC_055424		
			Nairoviridae	CCHFV	10200	USA	NC_005302
					GE/Ser-H/2023	Russia	PP116318
					CCHF/NIHPAK-31/2023	Pakistan	OR964910
CCHF/NIHPAK-96/2023					Pakistan	OR964911	
CCHF/NIHPAK-22/2023	Pakistan	OR964912					
CCHF/NIHPAK-30/2023	Pakistan	OR964913					
Articulavirales	Orthomyxoviridae	THOV	THOV_s2gp1	USA	NC_006495		
			TIGMIC_1	China	ON872599		

(续表 15)

Order	Family	Species	Viral Strain	Country	Accession
Articulavirales	Orthomyxoviridae	THOV	TIGMIC_2	China	ON872614
			TIGMIC_7	China	ON872632
			TIGMIC_8	China	ON872633
			TIGMIC_6	China	ON872631
		BRBV	MO-2013-2499	USA	NC_078584
			124470b	USA	OR965898
			NY21-2143	USA	OQ513919
			Monmouth	USA	OQ756338
			NY21-1814	USA	OQ513913
			NY21-2666	USA	OQ513925
Reovirales	Spinareoviridae	CTFV	Florio	USA	NC_004183
			64V37	USA	OR339582
			69V28	USA	OR339587
			R113677	USA	OR339599
			83F-15B	USA	OR339591
			SS-18	USA	OR839974
		EYAV	EYAVs1gp1	USA	NC_003696
			Fr578	France	AF282467
			NTB6	Belgium	MW874081
			Alsace	France	KU163321
			S6-14-03	USA	OR839984
			WTV1/HAHH9	China	MW721927
			WTV1/HAHH4	China	MW721926
Mononegavirales	Rhabdoviridae	Wuhan tick virus 1	TIGMIC_8	China	ON812492
			TIGMIC_11	China	ON812495
		X78-2	China	NC_031304	
		WTV1/HAHH7	China	MW721924	



注：红色标记为本研究发现的病毒

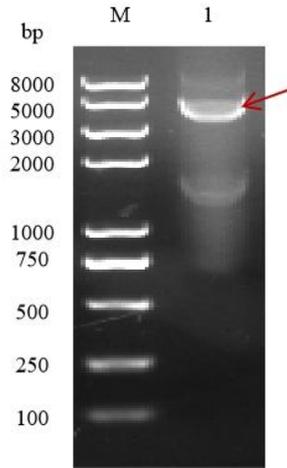
图 6 本研究所用蜱传病毒及未知病毒构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree constructed using tick-borne viruses and unknown viruses in this study

3.3 重组 PET30a-Isac 蛋白原核表达制备

3.3.1 PET30a-Isac 蛋白原核表达开环载体制备

将本科室保存的 PET30a-WENV NP 质粒经 XhoI 和 NdeI 进行双酶切。待酶切结束，进行 DNA 凝胶电泳鉴定质粒酶切结果（图 7）：泳道 1 中出现两条大小不一的条带，箭头所指条带大小介于 8000~5000 bp 之间，与预期 PET30a 开环质粒条带 5241 bp 大小一致。经酶切产物回收，获取 PET30a 开环载体质粒。



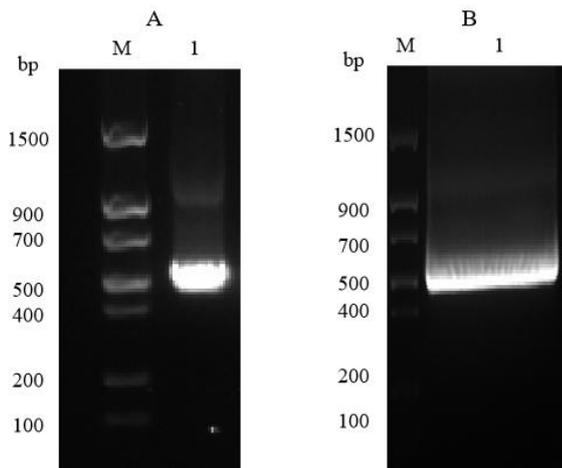
注：M：Trans 2K[®] Plus II DNA Marker；1：PET30a-WENV NP 质粒双酶切

图 7 PET30a 线性化载体制备

Fig. 7 Preparation of the PET30a linearized vector

3.3.2 PET30a-Isac 蛋白原核表达插入目的片段制备

以 PTriex-Isac 质粒为模板，结合上海生物工程公司合成的同源重组引物进行 PET30a-Isac 插入目的片段 PCR 扩增。待 PCR 扩增结束后，DNA 凝胶电泳验证 PET30a-Isac 插入目的片段扩增结果（图 8 A）：出现一条位于 700~500 bp 大小的条带，与预期带有同源重组引物的目的片段 531 bp 大小一致，经鉴定无误后，通过试剂盒进行切胶（图 8 B）产物回收，获取 PET30a-Isac 插入目的片段。



注：A：PET30a-Isac 插入目的片段扩增鉴定；B：PET30a-Isac 插入目的片段切胶图

M：Trans DNA Marker II；1：PET30a-Isac 插入目的片段

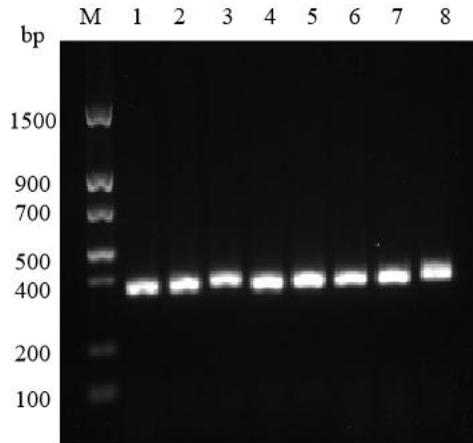
图 8 PET30a-Isac 插入目的片段制备

Fig. 8 Preparation of the PET30a-Isac Insert target clip

3.3.3 PET30a-Isac 目的质粒制备

3.3.3.1 重组质粒菌落 PCR 鉴定

同源重组后的质粒经过单克隆筛选挑取 8 个菌落为模板, 用与目的片段相结合的上游引物 Isac-F 和与载体序列相结合的下游引物 Isac-R 这一交叉引物进行 PCR 扩增, 鉴定重组质粒构建成功与否。待 PCR 扩增结束后, 进行 DNA 凝胶电泳鉴定重组质粒交叉引物扩增结果如下 (图 9): 出现一条位于 400~200 bp 大小的条带, 与预期交叉引物扩增片段 364 bp 大小一致。



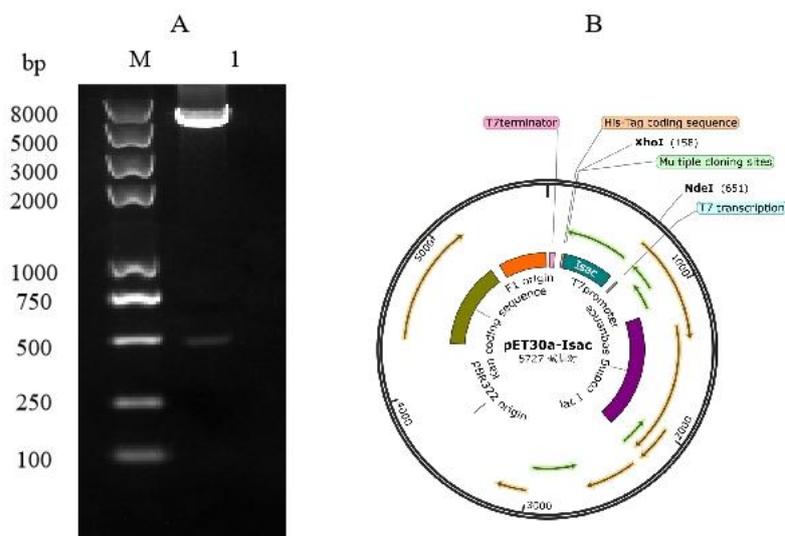
注: M: Trans DNA Marker II; 1~8: 单克隆筛选挑取的第 1~8 个菌落

图 9 重组质粒菌落 PCR 鉴定

Fig. 9 Identification of recombinant plasmid colonies by PCR

3.3.3.2 重组质粒双酶切及公司测序鉴定

将菌体 PCR 鉴定成功的单克隆菌体筛选出来于含 Kanamycin 的 2×YT 培养基中摇床孵育培养, 并进行重组质粒的小量提取。提取后的质粒通过 XhoI 和 NdeI 两个酶进行双酶切鉴定, 酶切结果如下 (图 10 A): 泳道 1 中出现两条大小不一的条带, 分别位于 8000~5000 bp 和 500~250 bp 之间, 与 PET30a-Isac 目的质粒在两个酶切位点预期呈现的两个条带 5241 bp 和 486 bp 大小一致。由天一辉远公司测序, 结果显示提取质粒序列与质粒图谱 (图 10 B) 序列一致, 鉴定证明 PET30a-Isac 重组质粒成功构建。经质粒大量提取制备, 获取浓度为 1322 ng/μL 的 PET30a-Isac 重组质粒。



注：A：PET30a-Isac 重组质粒双酶切；B：PET30a-Isac 重组质粒图谱

M：Trans DNA Marker II；1：PET30a-Isac 插入目的片段

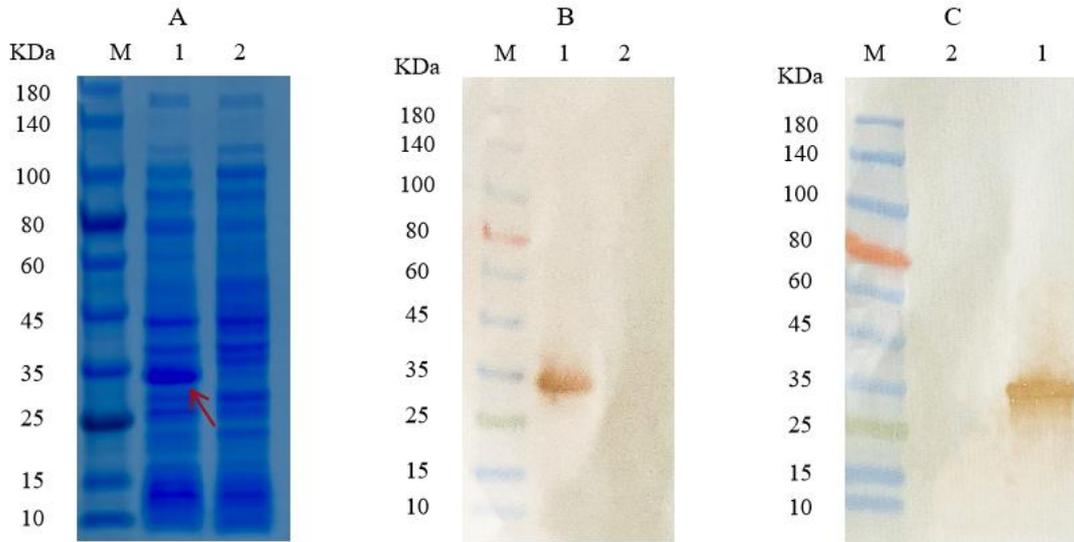
图 10 PET30a-Isac 重组质粒双酶切及测序鉴定

Fig. 10 Identification of PET30a-Isac recombinant plasmid by Double enzyme digestion analysis and sequencing analysis

3.3.4 PET30a-Isac 目的蛋白诱导表达

3.3.4.1 PET30a-Isac 目的蛋白诱导表达及鉴定

将 PET30a-Isac 重组质粒转化至感受态 BL21 大肠杆菌（表达菌）中，同时设置 PET30a 空载质粒作为对照摇菌，在加入 IPTG 诱导 4 个小时后，取菌液离心收集菌体重悬，混合 Simple Buffer 做 SDS-PAGE 凝胶电泳及 Western Blot 鉴定目的蛋白是否有表达，鉴定结果如下（图 11 A）：泳道 1 中出现了一条介于 35~25 KDa 大小的条带，与预测蛋白 17.4 KDa 二聚体形式出现的条带大小基本一致。以小鼠抗 His 标签的单抗进行 Western Blot 检测，可见（图 11 B）相同位置出现了棕色目的条带。将含 PET30a-Isac 质粒的 BL21 表达菌液转接至含 Kanamycin 的 2×YT 培养基中进行过夜大量诱导表达，收集菌液，破碎其菌体、洗涤及溶解包涵体后用其上清做 Western Blot 鉴定（图 11 C），鉴定结果同小量诱导表达一致，在介于 35~25 KDa 之间出现了一条棕色条带，故鉴定 PET30a-Isac 重组质粒能在 BL21 大肠杆菌中表达出目的蛋白。



注：A：小量诱导表达 SDS-PAGE 结果；B：小量诱导表达 Western Blot 结果；C：大量诱导表达 Western Blot 结果

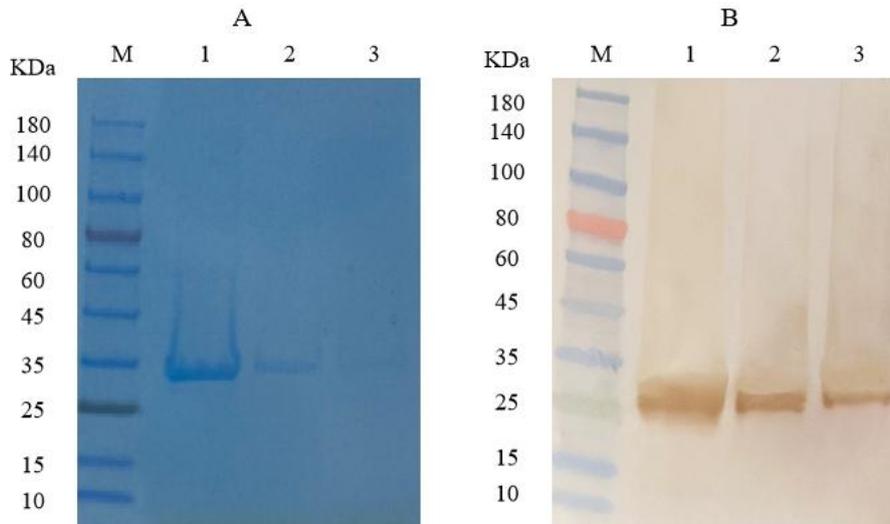
M: Blue Plus[®]IV Protein Marker; 1: PET30a-Isac 转化 BL21 细菌; 2: 空载对照

图 11 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 PET30a-Isac 目的蛋白表达

Fig. 11 SDS-PAGE and Western blot identification of PET30a-Isac protein expression

3.3.4.2 PET30a-Isac 目的蛋白纯化及鉴定

重组的 PET30a-Isac 蛋白加入 0.1 mM 的 IPTG 进行大量诱导表达, 收集菌液, 破碎其菌体、洗涤及溶解包涵体后用 HisTrap Chelating HP (5 mL) 镍柱 (Ni⁺亲和柱) 对其进行纯化, 共收集 3 个洗脱峰洗脱下来的纯化样本, 将其进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western Blot 鉴定, 鉴定结果如下: 1~3 泳道分别为第 1~3 个洗脱峰收集的样本, 从 SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示 (图 12 A), 1~3 洗脱峰收集的蛋白均出现目的蛋白条带且浓度依次降低, Western Blot 进一步鉴定 (图 12 B) 显示结果一致, 纯化后的蛋白能与小鼠抗 His 标签的单抗进行结合, 呈现出清晰的棕色条带, 且条带位置与目的蛋白预测的二聚体形式大小基本一致。将 3 个洗脱峰收集的蛋白纯化样本透析复性, 获取浓度为 1.55 mg/mL 目的蛋白。



注：A：纯化蛋白 SDS-PAGE 结果；B：纯化蛋白 Western Blot 结果

M: Blue Plus®IV Protein Marker; 1: 收集于第 1 个洗脱峰; 2: 收集于第 2 个洗脱峰;
3: 收集于第 3 个洗脱峰

图 12 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 PET30a-Isac 纯化蛋白

Fig. 12 SDS-PAGE and Western blot identification of PET30a-Isac Purified protein

4 讨论

SFTS 疾病对公共卫生的管理产生了极大的威胁，了解其致病病毒如何在环境中维持和传播对于实施有效的预防和控制措施至关重要。SFTS 病例主要来自中国中部、东部和东北部地区，虽然大部分病例集中在这些地区的高风险省份，但 SFTS 病例以散发为主其地区呈逐渐扩大的趋势，这可能与 SFTS 病毒的传播媒介蜱虫在中国的广泛分布以及 SFTS 诊断程序的改进有关^[8]。长角血蜱作为 SFTSV 主要的传播媒介，其携带的 SFTSV 可以通过附着在宿主身上或通过自身的运动来进行长距离迁移活动，如候鸟作为长距离迁移的动物之一，其在蜱传克里米亚-刚果出血热病毒及脑炎病毒的传播中起主要作用^[68-71]。有研究在多种候鸟（如金鸕、短尾鸕、蓝翡翠和仙鹤鸕等）身上发现了长角血蜱的身影，这些鸟类沿着东亚/澳大拉西亚的飞行路线在繁殖区和越冬区之间来回穿梭，包括中国，韩国和日本 SFTS 疾病高发的沿海地区^[72, 73]。

本研究纳入了 2010~2023 年全球的 SFTSV 序列数据集，并通过系统发育学方法对 SFTS 病毒 L 基因片段进行分析发现，SFTSV 的 L 基因组片段的系统发

育显示六个支持良好的进化枝，定义为六个 SFTSV 基因型 A-F，且基因型组内核苷酸相似性均大于 95%，体现了该病毒遗传相对稳定的特点。随着时间的推移，每个基因型的毒株均在不断的更新和增多，其中，基因型 A、E、B 作为主流基因型在中国大陆广泛的地理区域内共同传播，其毒株的来源多样，包括了从人、宿主动物和蜱中分离的毒株，显示出复杂的遗传多样性，这说明我国 SFTSV 的优势基因型具有在人畜（尤其是蜱类）间跨种传播的能力。然而，我国浙江省的主要流行基因却和日本、韩国的主要流行基因一致为 F 基因型，这不得不引起我们对跨海传播的关注。舟山群岛作为我国浙江省 SFTS 重要疫情区，与韩国和日本距离较近，由于海洋通道对大多数动物宿主形成了天然屏障，所以病毒不容易像在大陆上那样跨越地理屏障进行传播，而国际旅行及候鸟飞行增加了病毒渡海传播的可能性，这为 SFTSV 在日本、韩国和中国岛屿以 F 基因型流行提供了合理的解释，而近年来在岛屿地区报告了相当数量的 SFTS 病例^[74]。因此，我们认为，SFTS 以其独特的流行病学和传播方式对岛屿地区的居民造成了重大威胁；除此之外，我们还新发现了一株来自泰国的 F 基因型毒株，以及少数的 D、C 基因型，但由于分析序列有限，其传播特点还有待挖掘。

SFTSV 在中国、日本、韩国、泰国等国家报告的感染病例证明了这种病原体的区域威胁，并表明需要加强对 SFTSV 的监测，便于更好地了解其进化史，地理传播和进化的毒力。因此，公共卫生部门应在风险区对潜在的传播或输入事件保持最高警惕，并倡导对长角血蜱及 SFTSV 的感染情况进行了分析，建议在全国范围内加强对 SFTS 的重视，在深入研究的基础上更新诊断和报告程序，以更好地了解 SFTS 的流行病学特征，为 SFTS 的控制提供科学依据。

蜱是吸血节肢动物，常常寄生在家养动物、野生动物和人身上^[69, 75]并且在世界各地广泛分布传播多种病原体，如发热伴血小板减少综合征病毒、刚果-克里米亚病毒、立克次氏体细菌等^[50]，被认为是世界上仅次于蚊子的人类疾病载体，是家畜和野生动物中致病病原体的重要载体，造成了严重的公共卫生负担^[76-78]。

作为一种体外寄生虫，蜱的口腔部位可以垂直的嵌入脊椎动物宿主进食几天甚至几周，这个行为对于蜱传病毒来说，为其提供了一个重要的传播途径；虽然非自然的宿主可以对蜱产生有效的免疫反应，但当蜱以它们的自然宿主为食时，只观察到轻微的排斥反应，这可能是由于蜱类唾液中含有大量 Th2 细胞因子、

白介素 IL-8、Isac 等抗宿主免疫调节活性分子，可以起到抗炎、止血、使过敏性毒素失活及抑制宿免疫反应的作用，同时也进一步的帮助病毒实现免疫逃逸，进而感染宿主^[79-81]。因此，受到该行为的启发，本研究将从蜱唾液腺分离的抗补体蛋白序列构建于 pET30a 载体上，设计重组 PET30a-Isac 质粒，并通过原核表达的方法成功制备其蛋白，为建立一种以外来生物体蜱虫为突破口的蜱虫唾液腺蛋白特异性抗体检测方法奠定基础，为解读病毒性传染病传播共性及其阻断病毒传播进行了初步的探索。

此外，为了更大程度的认识蜱及蜱传病毒，本研究还于发热伴血小板减少综合征疾病高发区安徽省六安市采集了共 171 只寄生蜱虫和游离蜱虫标本并对其进行了形态学鉴定和病原检测，形态学鉴定主要通过观察蜱假头基、基突、须肢、眼、盾板、缘垛、气门板、足等部位进行鉴别，如长角血蜱主要鉴别要点为股沟在肛后向前绕行，雌蜱颈沟长而明显，末端伸达盾板后 1/3，假头基为矩形；微小扇头蜱假头宽大于长，多呈六角形，无缘刹；血红扇头蜱体有缘刹，中垛较宽等^[82-84]。通过分析及鉴定发现，来自于动物牛体表的寄生蜱最多，有 108 只（66.67%），来自动物羊体表的为其次，这主要与蜱的生活习性相关，大部分野外的蜱常常会寄生于像牛、羊这种放养于草地的动物上；通过对所采集的蜱虫进行形态鉴定发现，长角血蜱为安徽省六安市的优势蜱种，此外还有微小扇头蜱和血红扇头蜱；在 4 只长角血蜱，和 1 只微小扇头蜱中检测到了 SFTS 病毒阳性核酸，提示这两种蜱虫具有作为该地区病毒传播媒介的可能性；将检测病毒阳性的样本送公司进行宏基因组高通量测序，虽然未获得 SFTS 病毒序列，但获得三个片段分别为 6522 bp、2014 bp 和 10306 bp 的未知病毒序列，设计引物探针对这三个病毒进行实时荧光定量 PCR 检测，从 171 只不同种类的蜱虫样本中分别检测出 4 个、6 个和 0 个阳性样本，最低感染率（MIR）分别为 2.34%、3.51%、0，且阳性样本中长角血蜱居多。长角血蜱是携带的病原体种类最多、分布最广、影响最大的蜱种，其分布在中国东部和东北部的 1140 个县中，占全国人口的 40%以上^[85]，对人类健康及公共卫生造成极大的威胁。将获得的未知病毒基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比较并与其他蜱传病毒序列一起进行系统发育树分析验证 AnHui/LA-D-159/2023 和 AnHui/LA-B-002/2023 为布尼亚病毒下的白蛉病毒科，AnHui/LA-B-066/2023 为弹状病毒科病毒，这说明了蜱虫传播的病

毒多种多样，除了本次检出的病毒和 SFTS 病毒外，还有克里米亚-刚果出血热病毒、心脏地带病毒等^[86-89]，随着蜱传病原体的不断发现，新出现的蜱传疾病日益成为传染病的重点之一，其病原生物学特性、媒介生物、自然感染宿主、流行区等已成为亟待解决的重要科学问题。

随着中国城市化和退耕还绿色工程的推进，蜱虫和蜱传病原体的传播将变得更加复杂。因此，我们需要加强对蜱虫的实地调查，特别是那些携带对公共卫生构成威胁的病原体的蜱虫。同时，在出现人间病例或模型预测风险水平高的地区，我们需要加强居民健康教育和防护措施宣传，提高诊断和治疗能力，以完善对疾病的监测。当然，在预防蜱传疾病时，虽然很难对蜱虫进行全面的消除，但我们可以通过个人防护来降低感染的风险，如工作时穿防护服，野外活动时勿穿暴露衣物、使用驱避剂等措施，减少与蜱虫接触的机会。

5 结 论

SFTS 病毒具有遗传多样性的特点，其 L 片段可分为 A-F 六个基因型且在广泛的地理区域内共同传播，具有在人畜间跨种传播及跨越海洋传播的能力，应加强对 SFTS 的监测；对蜱虫样本检测发现，长角血蜱为本次采集样本的优势蜱种，与 SFTSV 的传播密切相关，检出 5 份 SFTSV 核酸阳性样本及发现三株其他科蜱传病毒，提示居民应做好个人防护，避免因蜱叮咬而引起病毒感染；成功构建表达了 PET30a-Isac 蛋白，为建立蜱唾液腺蛋白特异性抗体检测方法奠定基础，为解读蜱传疾病的传播共性进行了初步的探索。

参考文献

- [1] Abudurexiti A, Adkins S, Alioto D, Alkhovsky S V, Avsic-Zupanc T, Ballinger M J, Bente D A, Beer M, Bergeron E, Blair C D, Briese T, Buchmeier M J, Burt F J, Calisher C H, Chang C, Charrel R N, Choi I R, Clegg J C S, De La Torre J C, De Lamballerie X, Deng F, Di Serio F, Digiario M, Drebot M A, Duan X, Ebihara H, Elbeaino T, Ergunay K, Fulhorst C F, Garrison A R, Gao G F, Gonzalez J J, Groschup M H, Gunther S, Haenni A L, Hall R A, Hepojoki J, Hewson R, Hu Z, Hughes H R, Jonson M G, Junglen S, Klempa B, Klingstrom J, Kou C, Laenen L, Lambert A J, Langevin S A, Liu D, Lukashevich I S, Luo T, Lu C, Maes P, De Souza W M, Marklewitz M, Martelli G P, Matsuno K, Mielke-Ehret N, Minutolo M, Mirazimi A, Moming A, Muhlbach H P, Naidu R, Navarro B, Nunes M R T, Palacios G, Papa A, Pauvolid-Correa A, Paweska J T, Qiao J, Radoshitzky S R, Resende R O, Romanowski V, Sall A A, Salvato M S, Sasaya T, Shen S, Shi X, Shirako Y, Simmonds P, Sironi M, Song J W, Spengler J R, Stenglein M D, Su Z, Sun S, Tang S, Turina M, Wang B, Wang C, Wang H, Wang J, Wei T, Whitfield A E, Zerbini F M, Zhang J, Zhang L, Zhang Y, Zhang Y Z, Zhang Y, Zhou X, Zhu L, Kuhn J H. Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019[J]. Arch Virol, 2019, 164(7): 1949-1965.
- [2] Williams H M, Thorkelsson S R, Vogel D, Milewski M, Busch C, Cusack S, Grunewald K, Quemin E R J, Rosenthal M. Structural insights into viral genome replication by the severe fever with thrombocytopenia syndrome virus L protein[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(3): 1424-1442.
- [3] Ning Y-J, Feng K, Min Y-Q, Cao W-C, Wang M, Deng F, Hu Z, Wang H, Perlman S. Disruption of Type I Interferon Signaling by the Nonstructural Protein of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus via the Hijacking of STAT2 and STAT1 into Inclusion Bodies[J]. Journal of Virology, 2015, 89(8): 4227-4236.
- [4] Wu X, Qi X, Liang M, Li C, Cardona C J, Li D, Xing Z. Roles of viroplasm-like structures formed by nonstructural protein NSs in infection with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. Faseb j, 2014, 28(6): 2504-2516.
- [5] Yu X J, Liang M F, Zhang S Y, Liu Y, Li J D, Sun Y L, Zhang L, Zhang Q F, Popov V L, Li C, Qu J, Li Q, Zhang Y P, Hai R, Wu W, Wang Q, Zhan F X, Wang X J, Kan B, Wang S W, Wan K L, Jing H Q, Lu J X, Yin W W, Zhou H, Guan X H, Liu J F, Bi Z Q, Liu G H, Ren J, Wang H, Zhao S, Song J D, He J R, Wan T, Zhang J S, Fu X P, Sun L N, Dong X P, Feng Z J, Yang W Z, Hong T, Zhang Y, Walker D H, Wang Y, Li D X. Fever with thrombocytopenia associated with a novel

- bunyavirus in China[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [6] Casel M A, Park S J, Choi Y K. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: emerging novel phlebovirus and their control strategy[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2021, 53(5): 713-722.
- [7] Song H, Zou S, Huang Y, Wang Y, Wang T, Wei W, Sun Z, Hou H. The pathogenic and clinical characteristics of severe fever with thrombocytopenia syndrome patients with co-infections[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1298050.
- [8] Huang X, Li J, Li A, Wang S, Li D. Epidemiological Characteristics of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome from 2010 to 2019 in Mainland China[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(6):3092.
- [9] Yoo J R, Heo S T, Song S W, Bae S G, Lee S, Choi S, Lee C, Jeong S, Kim M, Sa W, Lee Y, Choi H, Kee S H, Lee K H. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Ticks and SFTS Incidence in Humans, South Korea[J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(9): 2292-2294.
- [10] Kobayashi Y, Kato H, Yamagishi T, Shimada T, Matsui T, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Morikawa S, Hasegawa H, Saijo M, Oishi K. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Japan, 2013–2017[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(4): 692-699.
- [11] Chen Q L, Zhu M T, Chen N, Yang D, Yin W W, Mu D, Li Y, Zhang Y P, Zainawudong Y. [Epidemiological characteristics of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011-2021][J]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2022, 43(6): 852-859.
- [12] He Z, Wang B, Li Y, Du Y, Ma H, Li X, Guo W, Xu B, Huang X. Severe fever with thrombocytopenia syndrome: a systematic review and meta-analysis of epidemiology, clinical signs, routine laboratory diagnosis, risk factors, and outcomes[J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1): 575.
- [13] Lee J, Moon K, Kim M, Lee W G, Lee H I, Park J K, Kim Y H. Seasonal distribution of *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) and detection of SFTS virus in Gyeongbuk Province, Republic of Korea, 2018[J]. *Acta Trop*, 2021, 221: 106012.
- [14] Park S W, Ryou J, Choi W Y, Han M G, Lee W J. Epidemiological and Clinical Features of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome During an Outbreak in South Korea, 2013-2015[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2016, 95(6): 1358-1361.
- [15] Kim J Y, Jung M, Kho J W, Song H, Moon K, Kim Y H, Lee D H. Characterization of

overwintering sites of *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) and tick infection rate with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from eight provinces in South Korea[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2020, 11(5): 101490.

[16] Nam H K, Min K D, Jo S, Cho S I. Association of Deforestation With Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome[J]. *J Infect Dis*, 2023, 228(12): 1730-1738.

[17] Morand S, Lajaunie C. Outbreaks of Vector-Borne and Zoonotic Diseases Are Associated With Changes in Forest Cover and Oil Palm Expansion at Global Scale[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8:661063.

[18] Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(6): 816-827.

[19] Kim K-H, Yi J, Kim G, Choi S J, Jun K I, Kim N-H, Choe P G, Kim N-J, Lee J-K, Oh M-D. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, South Korea, 2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19(11):1892-4.

[20] Tran X C, Yun Y, An L V, Kim S H, Thao N T P, Man P K C, Yoo J R, Heo S T, Cho N H, Lee K H. Endemic Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Vietnam[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2019, 25(5): 1029-1031.

[21] Peng S H, Yang S L, Tang S E, Wang T C, Hsu T C, Su C L, Chen M Y, Shimojima M, Yoshikawa T, Shu P Y. Human Case of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection, Taiwan, 2019[J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(7): 1612-1614.

[22] Win A M, Nguyen Y T H, Kim Y, Ha N-Y, Kang J-G, Kim H, San B, Kyaw O, Htike W W, Choi D-O, Lee K-H, Cho N-H. Genotypic Heterogeneity of *Orientia tsutsugamushi* in Scrub Typhus Patients and Thrombocytopenia Syndrome Co-infection, Myanmar[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(8): 1878-1881.

[23] Rattanakomol P, Khongwichit S, Linsuwanon P, Lee K H, Vongpunsawad S, Poovorawan Y.

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection, Thailand, 2019-2020[J]. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28(12): 2572-2574.

[24] Miao D, Dai K, Zhao G P, Li X L, Shi W Q, Zhang J S, Yang Y, Liu W, Fang L Q. Mapping the global potential transmission hotspots for severe fever with thrombocytopenia syndrome by machine learning methods[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 817-826.

[25] Lin T-L, Ou S-C, Maeda K, Shimoda H, Chan J P-W, Tu W-C, Hsu W-L, Chou C-C. The first discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Taiwan[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 148-151.

[26] He C Q, Ding N Z. Discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus strains originating from intragenic recombination[J]. *J Virol*, 2012, 86(22): 12426-12430.

[27] Liu J W, Zhao L, Luo L M, Liu M M, Sun Y, Su X, Yu X J. Molecular Evolution and Spatial Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Based on Complete Genome Sequences[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0151677.

[28] Zhang Y, Shen S, Shi J, Su Z, Li M, Zhang W, Li M, Hu Z, Peng C, Zheng X, Deng F. Isolation, characterization, and phylogenetic analysis of three new severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus strains derived from Hubei Province, China[J]. *Virol Sin*, 2017, 32(1): 89-96.

[29] Shi J, Hu S, Liu X, Yang J, Liu D, Wu L, Wang H, Hu Z, Deng F, Shen S. Migration, recombination, and reassortment are involved in the evolution of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus[J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 47: 109-117.

[30] Fu Y, Li S, Zhang Z, Man S, Li X, Zhang W, Zhang C, Cheng X. Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19563.

[31] Huang X, Liu L, Du Y, Wu W, Wang H, Su J, Tang X, Liu Q, Yang Y, Jiang Y, Chen W, Xu B. The evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the fever, thrombocytopenia and leukocytopenia syndrome virus (FTLSV) in China[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(10): 3237.

[32] Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic

Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan[J]. *J Infect Dis*, 2015, 212(6): 889-898.

[33] Boulanger N, Boyer P, Talagrand-Reboul E, Hansmann Y. Ticks and tick-borne diseases[J]. *Med Mal Infect*, 2019, 49(2): 87-97.

[34] Rochlin I, Toledo A. Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review[J]. *J Med Microbiol*, 2020, 69(6): 781-791.

[35] Zu Z, Lin H, Hu Y, Zheng X, Chen C, Zhao Y, Zhang Z, He N. Seroprevalence and transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in a coastal endemic area in Southeastern China[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2024, 15(1): 102277.

[36] Yang Z D, Hu J G, Lu Q B, Guo C T, Cui N, Peng W, Wang L Y, Qin S L, Wang H Y, Zhang P H, Zhang X A, Liu W, Cao W C. The prospective evaluation of viral loads in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *J Clin Virol*, 2016, 78: 123-128.

[37] Tang X, Wu W, Wang H, Du Y, Liu L, Kang K, Huang X, Ma H, Mu F, Zhang S, Zhao G, Cui N, Zhu B P, You A, Chen H, Liu G, Chen W, Xu B. Human-to-human transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through contact with infectious blood[J]. *J Infect Dis*, 2013, 207(5): 736-739.

[38] Kim C M, Kim D M, Bang M S, Seo J W, Yun N R, Kim D Y, Han M A, Hwang J H, Park S K. The Seroprevalence of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome: An Epidemiological Study of Korean Veterinary Hospital Workers[J]. *Viruses*, 2023, 15(3):609.

[39] Liu Y, Li Q, Hu W, Wu J, Wang Y, Mei L, Walker D H, Ren J, Wang Y, Yu X J. Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2012, 12(2): 156-160.

[40] Huang D, Shi J, Wang H, Shen S, Liu H, Tang S, Wang B, Deng F, Su Z, Jiang Y, Wang T, Liu X, Hu Z. A Cluster of Symptomatic and Asymptomatic Infections of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Caused by Person-to-Person Transmission[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2017, 97(2): 396-402.

[41] Gai Z, Liang M, Zhang Y, Zhang S, Jin C, Wang S W, Sun L, Zhou N, Zhang Q, Sun Y, Ding S J, Li C, Gu W, Zhang F, Wang Y, Bian P, Li X, Wang Z, Song X, Wang X, Xu A, Bi Z, Chen S, Li D. Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through blood contact[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(2): 249-252.

- [42] Hu J, Shi C, Li Z, Guo X, Qian Y, Tan W, Li X, Qi X, Su X, Zhou M, Wang H, Jiao Y, Bao C. A cluster of cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus infection in China, 1996: A retrospective serological study[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12(6):e0006603.
- [43] Hu J, Li Z, Cai J, Liu D, Zhang X, Jiang R, Guo X, Liu D, Zhang Y, Cui L, Shen J, Zhu F, Bao C. A Cluster of Bunyavirus-Associated Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Cases in a Coastal Plain Area in China, 2015: Identification of a Previously Unidentified Endemic Region for Severe Fever With Thrombocytopenia Bunyavirus[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2019, 6(6): 209.
- [44] Jeong E J, Song J Y, Lim C S, Lee I, Park M S, Choi M J, Jeon J H, Kang S H, Jung B K, Yoon J G, Hyun H J, Noh J Y, Cheong H J, Kim W J. Viral shedding from diverse body fluids in a patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *J Clin Virol*, 2016, 80: 33-35.
- [45] Sharma D, Kamthania M. A new emerging pandemic of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS)[J]. *Virusdisease*, 2021, 32(2): 220-227.
- [46] Hu Y Y, Zhuang L, Liu K, Sun Y, Dai K, Zhang X A, Zhang P H, Feng Z C, Li H, Liu W. Role of three tick species in the maintenance and transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14(6):e0008368.
- [47] Sharifah N, Heo C C, Ehlers J, Houssaini J, Tappe D. Ticks and tick-borne pathogens in animals and humans in the island nations of Southeast Asia: A review[J]. *Acta Trop*, 2020, 209: 105527.
- [48] Adelabu O A, Iweriebor B C, Okoh A I, Obi L C. Phylogenetic profiling for zoonotic Ehrlichia spp. from ixodid ticks in the Eastern Cape, South Africa[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(3): 1247-1256.
- [49] Capligina V, Seleznova M, Akopjana S, Freimane L, Lazovska M, Krumins R, Kivrane A, Namina A, Aleinikova D, Kimsis J, Kazarina A, Igumnova V, Bormane A, Ranka R. Large-scale countrywide screening for tick-borne pathogens in field-collected ticks in Latvia during 2017-2019[J]. *Parasit Vectors*, 2020, 13(1): 351.
- [50] Chiuya T, Masiga D K, Falzon L C, Bastos A D S, Fèvre E M, Villinger J. Tick-borne pathogens, including Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, at livestock markets and slaughterhouses in western Kenya[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68(4): 2429-2445.
- [51] Oundo J W, Kalayou S, Bosch Q T, Villinger J, Koenraadt C J M, Masiga D. Ticks (Acari:

- Ixodidae) infesting cattle in coastal Kenya harbor a diverse array of tick-borne pathogens[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2024, 15(1): 102266.
- [52] Zhang Y K, Zhang X Y, Liu J Z. Ticks (Acari: Ixodoidea) in China: Geographical distribution, host diversity, and specificity[J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2019, 102(3): 21544.
- [53] Kondo M, Matsushima Y, Nakanishi T, Iida S, Koji H, Yamanaka K. Increasing Risk of Tick-Borne Disease through Growth Stages in Ticks[J]. *Clin Pract*, 2023, 13(1): 246-250.
- [54] Takayama N, Takagaki Y. Tick anaphylaxis triggered by pulling out the tick[J]. *Acute Med Surg*, 2020, 7(1): 503.
- [55] Cutler S J, Vayssier-Taussat M, Estrada-Peña A, Potkonjak A, Mihalca A D, Zeller H. Tick-borne diseases and co-infection: Current considerations[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2021, 12(1): 101607.
- [56] Jia W, Chen S, Chi S, He Y, Ren L, Wang X. Recent Progress on Tick-Borne Animal Diseases of Veterinary and Public Health Significance in China[J]. *Viruses*, 2022, 14(2):355.
- [57] Li Z, Bao C, Hu J, Liu W, Wang X, Zhang L, Ji Z, Feng Z, Li L, Shen A, Liu X, Zhao H, Tan W, Zhou J, Qi X, Zhu Y, Tang F, Cardona C J, Xing Z. Ecology of the Tick-Borne Phlebovirus Causing Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in an Endemic Area of China[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(4):e0004574.
- [58] Hou S, Zhang N, Liu J, Li H, Liu X, Liu T. Epidemiological Characteristics and Risk Factors of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Yantai City, Shandong Province[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2023, 10(4): 141.
- [59] Li J, Li S, Yang L, Cao P, Lu J. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: a highly lethal bunyavirus[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2021, 47(1): 112-125.
- [60] Jung I Y, Choi W, Kim J, Wang E, Park S W, Lee W J, Choi J Y, Kim H Y, Uh Y, Kim Y K. Nosocomial person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(5): 631-634.
- [61] Hu L, Li J, Zhang H, Bian T, Pan J, Li J, Xu X, Gao Y, Chen G, Ye Y, Li J. Predisposing factors for person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus[J]. *J Hosp Infect*, 2022, 123: 174-178.
- [62] 张全福, 李建东, 姜晓林, 李川, 刘林, 梁米芳, 李德新. 发热伴血小板减少综合征病毒热稳定性和灭活条件初步研究[J]*中华实验和临床病毒学杂志*, 2014, 28(3): 206-208.

- [63] Chin A W H, Poon L L M. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions - Authors' reply[J]. *Lancet Microbe*, 2020, 1(4): 146.
- [64] Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris D H, Holbrook M G, Gamble A, Williamson B N, Tamin A, Harcourt J L, Thornburg N J, Gerber S I, Lloyd-Smith J O, De Wit E, Munster V J. Aerosol and surface stability of HCoV-19 (SARS-CoV-2) compared to SARS-CoV-1[J]. *medRxiv*, 2020, 13:20033217.
- [65] 韦雪敏, 李书晗, 王耀, 陈梦婷, 赵丽, 王志玉, 万敏, 温红玲. 发热伴血小板减少综合征病毒温度敏感性研究[J]*中国人兽共患病学报*, 2022, 38(01): 25-28.
- [66] 甘芳容, 张烨, 谭敏菊, 成艳辉, 薄洪, 房琼琼, 周为民, 王大燕, 董婕, 武桂珍. 理化条件对人感染 H9N2 禽流感病毒灭活效果的评价[J]*中华实验和临床病毒学杂志*, 2020, 34(1): 87-91.
- [67] 李婕, 严冬梅, 张勇, 许文波, 祝双利, 周为民, 武桂珍. 肠道病毒 A 组 71 型热力和常见 3 种化学消毒剂灭活效果的研究[J]*中华实验和临床病毒学杂志*, 2020(01): 18-19-20-21-22.
- [68] Diaz L A, Goni S E, Iserte J A, Quaglia A I, Singh A, Logue C H, Powers A M, Contigiani M S. Exploring Genomic, Geographic and Virulence Interactions among Epidemic and Non-Epidemic St. Louis Encephalitis Virus (Flavivirus) Strains[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0136316.
- [69] Chaorattanakawee S, Wofford R N, Takhampunya R, Katherine Poole-Smith B, Boldbaatar B, Lkhagvatseren S, Altantogtokh D, Musih E, Nymadawa P, Davidson S, Hertz J, Fiorenzano J, Gray G C, Von Fricken M E. Tracking tick-borne diseases in Mongolian livestock using next generation sequencing (NGS)[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2022, 13(1): 101845.
- [70] Leblebicioglu H, Eroglu C, Erciyas-Yavuz K, Hokelek M, Acici M, Yilmaz H. Role of migratory birds in spreading Crimean-Congo hemorrhagic fever, Turkey[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(8): 1331-1334.
- [71] Waldenström J, Lundkvist A, Falk K I, Garpmo U, Bergström S, Lindegren G, Sjöstedt A, Mejlon H, Fransson T, Haemig P D, Olsen B. Migrating birds and tickborne encephalitis virus[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(8): 1215-1218.
- [72] Choi C Y, Kang C W, Kim E M, Lee S, Moon K H, Oh M R, Yamauchi T, Yun Y M. Ticks collected from migratory birds, including a new record of *Haemaphysalis formosensis*, on Jeju Island, Korea[J]. *Exp Appl Acarol*, 2014, 62(4): 557-566.

- [73] Yun Y, Heo S T, Kim G, Hewson R, Kim H, Park D, Cho N H, Oh W S, Ryu S Y, Kwon K T, Medlock J M, Lee K H. Phylogenetic Analysis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in South Korea and Migratory Bird Routes Between China, South Korea, and Japan[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2015, 93(3): 468-474.
- [74] Li F, He F, Sun J, Zhai Y, Jiang J, Lin J. Spatial and temporal analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Zhejiang Province, China, 2011 - 2015[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2019, 13(1): 35-43.
- [75] Grech-Angelini S, Stachurski F, Vayssier-Taussat M, Devillers E, Casabianca F, Lancelot R, Uilenberg G, Moutailler S. Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(2): 745-757.
- [76] Jones K E, Patel N G, Levy M A, Storeygard A, Balk D, Gittleman J L, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases[J]. *Nature*, 2008, 451(7181): 990-993.
- [77] Raghavan R K, Barker S C, Cobos M E, Barker D, Teo E J M, Foley D H, Nakao R, Lawrence K, Heath A C G, Peterson A T. Potential Spatial Distribution of the Newly Introduced Long-horned Tick, *Haemaphysalis longicornis* in North America[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 498.
- [78] Beard C B, Occi J, Bonilla D L, Egizi A M, Fonseca D M, Mertins J W, Backenson B P, Bajwa W I, Barbarin A M, Bertone M A, Brown J, Connally N P, Connell N D, Eisen R J, Falco R C, James A M, Krell R K, Lahmers K, Lewis N, Little S E, Neault M, Pérez De León A A, Randall A R, Ruder M G, Saleh M N, Schappach B L, Schroeder B A, Seraphin L L, Wehtje M, Wormser G P, Yabsley M J, Halperin W. Multistate Infestation with the Exotic Disease-Vector Tick *Haemaphysalis longicornis* - United States, August 2017-September 2018[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2018, 67(47): 1310-1313.
- [79] Valenzuela J G, Charlab R, Mather T N, Ribeiro J M C. Purification, Cloning, and Expression of a Novel Salivary Anticomplement Protein from the Tick, *Ixodes scapularis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(25): 18717-18723.
- [80] Guo X, Booth C J, Paley M A, Wang X, Deponte K, Fikrig E, Narasimhan S, Montgomery R. Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(6): 2320-2329.
- [81] Hajnická V, Kocáková P, Sláviková M, Slovák M, Gasperík J, Fuchsberger N, Nuttall P A.

Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts[J]. *Parasite Immunol*, 2001, 23(9): 483-489.

[82] 庞道毛著. 中国医学蜱类及其防治[M]. 成都: 四川民族出版社, 1986.10.

[83] 陈小帆, 刘昌递主编. 口岸实用医学媒介生物彩色鉴定图谱[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2014.03.

[84] 高娃著. 蜱类生态及蜱媒病原微生物群研究[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2018.08.

[85] Zhao G P, Wang Y X, Fan Z W, Ji Y, Liu M J, Zhang W H, Li X L, Zhou S X, Li H, Liang S, Liu W, Yang Y, Fang L Q. Mapping ticks and tick-borne pathogens in China[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1075.

[86] Garrison A R, Alkhovsky Альховский Сергей Владимирович S V, Avšič-Županc T, Bente D A, Bergeron É, Burt F, Di Paola N, Ergünay K, Hewson R, Kuhn J H, Mirazimi A, Papa Avva Παπά A, Sall A A, Spengler J R, Palacios G, Consortium I R. ICTV Virus Taxonomy Profile: Nairoviridae[J]. *J Gen Virol*, 2020, 101(8): 798-799.

[87] Shchetinin A M, Lvov D K, Deriabin P G, Botikov A G, Gitelman A K, Kuhn J H, Alkhovsky S V. Genetic and Phylogenetic Characterization of Tataguine and Witwatersrand Viruses and Other Orthobunyaviruses of the Anopheles A, Capim, Guamá, Koongol, Mapputta, Tete, and Turlock Serogroups[J]. *Viruses*, 2015, 7(11): 5987-6008.

[88] Zhu C, He T, Wu T, Ai L, Hu D, Yang X, Lv R, Yang L, Lv H, Tan W. Distribution and phylogenetic analysis of Dabieshan tick virus in ticks collected from Zhoushan, China[J]. *J Vet Med Sci*, 2020, 82(8): 1226-1230.

[89] Shi J, Hu Z, Deng F, Shen S. Tick-Borne Viruses[J]. *Virol Sin*, 2018, 33(1): 21-43.

综述

发热伴血小板减少综合征研究进展

杨晓艺 综述 谢春 李建东 审校

摘要

发热伴血小板减少综合征（SFTS）是一种由发热伴血小板减少综合征病毒（SFTSV）感染引起的急性病毒性传染病，早期以发热、血小板减少、白细胞减少和胃肠道异常为主要表现，具有重症患者多，病死率高的特点，已经成为地方性流行区严重的公共卫生问题。蜱是 SFTSV 传播的重要媒介，也可经接触患者血性分泌物、排泄物及其污染物而导致人与人之间传播。宿主动物包括各种家养动物和野生动物，但存储宿主尚不明确。本文通过文献检索，从 SFTSV 地理分布、传播途径、临床表现及可能的致病机制等方面进行综述，旨在为 SFTS 的科学防治提供有益的参考和支持。

关键词

发热伴血小板减少综合征；地理分布；传播；临床特征；致病机制

发热伴血小板减少综合征（Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, SFTS）是在 21 世纪初首次发现的一种新发蜱媒传染性疾病。该病于 2010 年在中国首次被分离和鉴定，初始病死率高达 30%^[1]。引起该疾病的病毒被国际病毒分类委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV）在 2020 年最新分类为发热伴血小板减少综合征病毒（Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus, SFTSV），属于 Bunyavirales 目，Phenuiviridae 科，Bandavirus 属。此病毒是一种分节段、有脂质包膜、直径为 80~100nm 的球状单股负链 RNA 病毒，其基因组由 L、M 和 S 三个单链 RNA 片段组成^[2]，其中，L 片段主要是编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶（RdRp），其功能是调控 RNA 的复制与 mRNA 的合成；M 片段主要是编码 Gn 和 Gc 糖蛋白，它们可以参与 SFTSV 的早期感染而且在病毒装配、病毒颗粒形成、靶细胞附着以及介导 SFTSV 入侵中枢神经系统中发挥着至关重要的作用；S 片段主要是使用双义转录方式编码非结构蛋白（NSs）和核衣壳蛋白（NP），这些片段与病毒的感染、复制过程密切相关^[3]。

为了有效地预防和控制 SFTS 的传播，需要不断更新并加深关于 SFTS 的认

知，着力强化消灭传染源和切断传播途径，加大 SFTS 疫苗和新药的研发工作力度，以便更有效地保护易感人群。本文对 SFTS 传播方式及免疫逃避机制进行初步归纳梳理，以便增强对该疾病的了解。

1 地理分布和遗传多样性

自发现 SFTS 以来，中国大陆地区已有超过 27 个省份报道了该病例，主要集中于河南、山东、湖北、安徽、江苏、浙江和辽宁七个省的部分地级市和县(区)，累及地区呈现不断扩散趋势，从中部向东北、西部和南方蔓延^[4-6]。2019 年，中国台湾省首次宣布发现 SFTS 病例^[7]。在中国之外，朝鲜、韩国、日本、越南、缅甸等国家也在 2009 年至 2020 期间陆续报告了 SFTS 病例^[8-12]。SFTS 传播的机制尚不明确，新出现的 SFTS 病毒的传播通常归因于两个主要原因，一是野生动物和人类之间的接触增加，二是嗜血节肢动物载体或其脊椎动物宿主在地方性流行区以外。有研究表明，长角血蜱作为影响 SFTS 疾病传播的重要媒介，可寄生于候鸟并随之在中国、韩国和日本等流行区之间繁殖和迁移，其在亚太地区的迁徙路线与东亚-澳大利西亚飞行的鸟类迁徙路线相吻合，提示非人类宿主和媒介（如迁徙野生鸟类或输入蜱）的长距离移动可能是 SFTSV 扩大地理分布、进行国际传播的合理途径^[13, 14]。

SFTSV 基因组的分段性质促进了其频繁的重组事件及遗传多样性特征^[15, 16]。根据 Fu 等^[14] 基于基因平均距离计算方法的建议，SFTSV 毒株的系统发育分析可将其分为 A-F 六种基因型，且各基因型的流行率在不同国家不同。基因型 A、C、D、E 和 F 主要在中国广泛的地理区域内共同传播；基因型 B 主要在韩国、日本和中国舟山群岛流行，Yun 等^[17]还将其进一步细分为 B-1、B-2 和 B-3 三种不同的基因亚型。Lee^[18]等对 SFTSV 在人类、蜱和其他哺乳动物之间遗传相关性研究中提示，SFTSV 的蜱媒流出将在家畜或野生动物宿主的人类感染中发挥关键作用，强调了在分子水平上对人类和非人类宿主进行 SFTSV 监测的重要性。尽管尚无证据表明 SFTS 会在全球发生流行，但近年来有国家陆续报道新增病例，表明 SFTS 已成为国际公共卫生面临的重大挑战。

2 病媒和疾病传播

SFTS 的常见的传播方式为蜱虫叮咬，其中，能传播此疾病的蜱虫种类主要包括长角血蜱等。此外，SFTS 还可通过接触病例血液、体液、血性分泌物或排

泄物等途径传播^[19,20]。不仅如此,当前还有文献报道 SFTS 可能通过空气气溶胶传播^[21],尽管这一传播途径的风险和机制仍需要进一步研究和确认。

2.1 媒介传播

蜱虫是很多蜱媒疾病的潜在传播媒介,因其携带丰富的病原体而具有重要意义^[22]。在韩国的研究中发现,蜱虫中 SFTSV 感染率约为 11.1%^[23]。通过流行病学研究和分子检测已证实,在多种蜱虫中都能检测到 SFTSV RNA,包括长角血蜱、微小扇头蜱、亚洲璃眼蜱、日本硬蜱、龟甲形钝眼蜱等^[24-27]。研究表明,亚洲长角血蜱在中国分布广泛,与 SFTS 病例分布强相关,通过垂直经卵传播、经期传播(幼蜱、若蜱、成蜱阶段)以及叮咬传播等方式迅速传播^[28,29]。全基因测序显示,从蜱中分离的 SFTSV 序列与同一地区从 SFTS 患者中分离的序列高度同源^[30]。且蜱虫的分布范围广泛,部分区域的病毒携带率较高,如在韩国德裕山国立公园收集的蜱,其 SFTSV 总感染率可达 6.0%^[31],因此应对这些区域进行重点防控。

2.2 人传人方式传播

在一些聚集性疫情的流行病学调查中,有关 SFTS 人传人的传播案例已经报道^[32]。据文献记载,SFTS 人传人的潜伏期通常为 7~14 天。有的重症病例,发病后 18 天仍具有较高的传染性,可引起继发感染并持续传播,病毒可从首发患者传播到继发患者,再传播到潜伏感染人群^[33]。2007 年在中国东部发生的一起家庭聚集性 SFTS 疫情表明,继发患者感染是通过与指示性患者的直接接触实现的^[34]。直接接触血液/血性分泌物是 SFTS 人传人的主要危险因素,其中,在中国和韩国报告的 27 起 SFTS 人传人聚集性传播中,84.76%的继发病例接触血液/血性分泌物;89.47%的指示病例有呼吸道症状,部分病例还伴有口腔出血症状,暗示 SFTSV 可能通过近距离血飞沫传播^[19]。此外,接触非血性标本也是一种可能的传播方式。在中国山东省发生的一个聚集性 SFTSV 感染事件中,在患者咽喉,尿液和粪便标本等非血液样本中检测到 SFTSV RNA^[35];韩国的一项研究也提到呼吸道分泌物或被体液污染的长袍与 SFTSV 感染显著相关,暗示患者的非血性标本中可能存在感染性病毒颗粒^[36]。除此之外,浙江省还曾报道出 2 例仅在因本病死亡者葬礼灵堂停留,未与指示病例直接接触而感染的继发病例^[37],以及 5 名在接触首例患者的血液时都戴着手套和口罩而感染的继发病例^[38],提示

SFTSV 传播途径与安全防护效果有待进一步研究，直接接触血液/血液分泌物是 SFTS 人传人的最主要危险因素。

2.3 宿主动物传播

SFTSV 的自然宿主较多，其中家养动物，特别是牛和山羊，有很高的 SFTSV 感染率，是病毒的扩散宿主^[39]，此外，在野生动物中也可检测到抗原和抗体，包括野鹿、野猪、野生獾和果子狸等^[40-42]。这些动物可能没有临床症状，但它们的分泌物中含有 SFTSV RNA^[43]，虽然尚无证据表明 SFTS 病毒可以在动物中引起疾病，但 SFTSV 可能通过动物宿主污染环境，导致更多动物宿主感染，从而增加人类感染的风险^[44]。有研究报道，在日本，一名男兽医在救治感染 SFTSV 的猫时被感染，猫和患者的 SFTSV 全基因组序列的 100% 同一性表明可能发生了 SFTSV 从猫到患者的直接传播^[45]。密切接触或被感染 SFTSV 的病猫咬伤都存在感染 SFTSV 的风险^[46]，因此，在诊断 SFTS 时，除了考虑蜱媒叮咬传播及人与人传播的途径外，还需考虑动物直接传播到人的可能性。与疑似患有 SFTS 的动物接触时，应采取标准预防措施，包括佩戴口罩、手套和围裙，并保护粘膜，尤其是眼睛^[47]。

3 临床特征

SFTSV 感染的主要临床症状是发热和血小板减少。除这两大临床表现外，还包括恶心呕吐厌食不良、白细胞减少、淋巴细胞计数低、凝血功能障碍、出血倾向等胃肠道症状^[48]。此外，还有非典型和无症状 SFTS 感染病例的报告^[49]。在进行 SFTSV 鉴别诊断时还需注意与其他类似症状的病原体进行区分，如嗜吞噬细胞无形体等^[1]。

SFTS 的潜伏期一般为 7~14 天（平均 9 天），临床病程根据病情进展可分为 3 个不同阶段：发热期、多器官功能障碍期和恢复期。发热阶段，患者最初表现为急性高热、血清病毒载量高，最高体温可达 39~40 °C，伴血小板减少、白细胞减少、淋巴结肿大；通常 5~7 天后疾病从发热期发展为多器官功能障碍期，该时期血液学症状包括出血表现、血小板计数持续下降、凝血功能持续异常、弥散性血管内凝血（DIC）；神经系统症状包括嗜睡、肌肉震颤、惊厥、抽搐和昏迷；呼吸系统症状包括呼吸急促、血氧饱和度下降；循环系统会出现休克表现，如血压降低、心率加快和全身灌注不足。在疾病的末期还会出现黄疸、无尿等肝肾功

能衰竭的表现，且往往是相继的器官功能损害，发展为重症、危重，这也是患者死亡的直接原因；轻度或自限性感染的患者直接进入恢复期^[50]。一般来说，免疫力较弱及患有慢性疾病的长者，最容易感染严重的病毒性疾病，随着年龄的增长，免疫系统以免疫衰老并增加全身炎症这两种主要方式发生变化。在免疫衰老中，由于先天性和适应性免疫系统的缺陷，免疫功能逐渐下降。

4 可能的致病机制

抵御 SFTSV 感染的第一道防线是先天免疫系统，它阻止病毒入侵和复制。研究发现，SFTSV 感染可减弱单核细胞、树突状细胞（DC 细胞）和自然杀伤细胞（NK 细胞）在免疫应答中的功能，并诱导巨噬细胞分化为 M2 表型，导致先天免疫受损^[51-54]，最终促进病毒持续存在和疾病进展。SFTSV NP 也可干扰 IFN 调节因子 3（IRF3）和 NF- κ B 信号通路抑制 IFN- β 应答，从而增强病毒复制^[55]。SFTSV 感染期间，自噬不仅可以被诱导并用作病毒复制和组装的平台，还能通过自噬相关囊泡释放子代病毒，从而增强 SFTSV 感染^[56]。SFTSV 装配依赖于由内质网-高尔基体中间体形成的吞噬囊泡，其组装的子代 SFTSV 颗粒可以在自噬相关囊泡（如自噬体和自噬溶酶体）中存活，并通过自噬囊泡的胞吐作用直接释放到细胞外^[57]。

宿主适应性免疫应答针对病毒的特异性识别和清除，主要由 T 细胞和 B 细胞参与。研究数据表明，CD4⁺ T 细胞的减少与 SFTS 的严重程度增加相关。在感染早期阶段，感染个体的 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞上的凋亡标志物（膜联蛋白 V 和 CD95）的表达水平显著高于健康人群；在急性期，CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞上的 PD-1 的显著增加可能会削弱抗病毒 T 细胞免疫力^[58]。此外，SFTSV 感染还会损害 B 细胞和 mDC 的抗原呈递功能，以及损害 T_{fh}s，导致体液免疫应答显著减弱^[59, 60]，Angela 等人^[61]使用 SFTS 患者 PBMC 的单细胞 RNA 测序分析显示，B 细胞群明显扩增，尤其是浆细胞，在 SFTSV 感染者血液中潜在的病毒库，与疾病严重程度相关。

5 治疗

对于 SFTS 患者主要应用的治疗方案有抗病毒药、类固醇、静脉注射免疫球蛋白和治疗性血浆置换等方法，而患者的康复主要取决于支持性的护理，目前还没有特异性抗病毒治疗被证明对这种疾病有效。

作为抗病毒药物的利巴韦林，于 SFTSV 发现不久后，就被中国卫生部发布的管理指南建议使用^[62]，因为其在体外和体内都能有效降低病毒载量。一项前瞻性观察研究发现^[63]，当 SFTS 病毒载量较低的患者接受利巴韦林治疗时，能有效降低病死率，但利巴韦林治疗也有可能引起贫血和高淀粉酶血症等不良事件，应密切监测患者。在体外和体内研究中，法匹拉韦表现出比利巴韦林更高的有效性，其能在体外和体内显著抑制 SFTSV 复制^[64, 65]。最近在中国进行的一项随机对照试验提供了确证性证据，证明与未经治疗的患者相比，接受法匹拉韦治疗的 SFTS 患者的 CFR 显著降低^[66]。类固醇具有抑制全身炎症和缓和随后的细胞因子风暴的能力，因此临床上已应用于治疗 SFTS 患者。有研究报道提出了糖皮质激素治疗在 SFTSV 感染中的有益作用，但接受类固醇治疗的 SFTS 患者并发症增加，仍有待于在良好的对照研究中证明^[67]。静脉注射免疫球蛋白（IVIG）能有效抑制细胞因子风暴，被认为有助于降低 SFTS 患者的病毒载量，遏制 SFTSV 的传播。Kim 等人研究中报告了伴有并发症的重度 SFTS 患者病例，其中 IVIG 和其他药物联合治疗显示出积极的治疗效果^[68]。血浆置换（TPE）能缓解细胞因子风暴并降低病毒载量，YOO 等人报告称，未接受血浆置换的患者相比，接受血浆置换治疗的患者的临床表现和实验室检查结果得到了有效的改善，表明其在临床治疗中的潜在作用^[69]。

6 总结

SFTSV 感染正在全球范围内成为备受关注的公共卫生问题，其发病率逐年上升，具有大流行的潜力和引起医院传播的能力。随着人们农业事业和户外活动的增加，接触携带 SFTS 病原体的病媒机会也随之增加。病毒溢出事件经常发生在人、动物和蜱虫流行地区之间的交界处。控制 SFTSV 的主要途径包括阻止病毒传播，保护易感人群免受蜱叮咬以及避免直接接触感染^[70]。SFTSV 感染的免疫发病机制涉及多个免疫细胞亚群、炎症介质、炎性体和信号通路的级联反应等。SFTSV 感染期间一些免疫细胞亚群和 NS 蛋白在调节免疫应答中具有一定作用，但免疫系统的逃避和促炎应答的启动可能起双重作用，免疫应答的激活可以消除 SFTSV，然而过度的免疫活化也可以导致具有临床上伴随损伤的过度炎症反应。因此，有效防治 SFTS 既需要在宏观公共卫生政策和措施角度着力完善，加强对公众尤其是高发地区居民的健康卫生教育，提高对疾病发病和预防的认知水平，

不断提高临床医师的治疗水平，有需要在基础研究领域加大投入，尤其是快检试剂、疫苗、抗病毒以及免疫调理药物等研发应为着重加强的重要领域。

参考文献

- [1] Yu X J, Liang M F, Zhang S Y, Liu Y, Li J D, Sun Y L, Zhang L, Zhang Q F, Popov V L, Li C, Qu J, Li Q, Zhang Y P, Hai R, Wu W, Wang Q, Zhan F X, Wang X J, Kan B, Wang S W, Wan K L, Jing H Q, Lu J X, Yin W W, Zhou H, Guan X H, Liu J F, Bi Z Q, Liu G H, Ren J, Wang H, Zhao Z, Song J D, He J R, Wan T, Zhang J S, Fu X P, Sun L N, Dong X P, Feng Z J, Yang W Z, Hong T, Zhang Y, Walker D H, Wang Y, Li D X. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [2] Williams H M, Thorkelsson S R, Vogel D, Milewski M, Busch C, Cusack S, Grünewald K, Quemin E R J, Rosenthal M. Structural insights into viral genome replication by the severe fever with thrombocytopenia syndrome virus L protein[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(3): 1424-1442.
- [3] Guu T S, Zheng W, Tao Y J. Bunyavirus: structure and replication[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 726: 245-266.
- [4] Miao D, Liu M J, Wang Y X, Ren X, Lu Q B, Zhao G P, Dai K, Li X L, Li H, Zhang X A, Shi W Q, Wang L P, Yang Y, Fang L Q, Liu W. Epidemiology and Ecology of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in China, 2010–2018[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(11): 3851-3858.
- [5] 陈秋兰, 朱曼桐, 陈宁, 杨栋, 殷文武, 牟笛, 李昱, 张彦平, 再那吾东·玉山. 2011-2021年全国发热伴血小板减少综合征流行特征分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2022(06): 852-859.
- [6] Zu Z, Lin H, Hu Y, Zheng X, Chen C, Zhao Y, Zhang Z, He N. Seroprevalence and transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in a coastal endemic area in Southeastern China[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2024, 15(1): 102277.
- [7] Lin T-L, Ou S-C, Maeda K, Shimoda H, Chan J P-W, Tu W-C, Hsu W-L, Chou C-C. The first discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Taiwan[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 148-151.
- [8] Denic S, Janbeih J, Nair S, Conca W, Tariq W U Z, Al-Salam S. Acute Thrombocytopenia, Leucopenia, and Multiorgan Dysfunction: The First Case of SFTS Bunyavirus outside China?[J]. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2011, 2011: 1-4.
- [9] Kim K-H, Yi J, Kim G, Choi S J, Jun K I, Kim N-H, Choe P G, Kim N-J, Lee J-K, Oh M-D. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, South Korea, 2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19(11):1892-4.
- [10] Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M,

Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(6): 816-827.

[11] Tran X C, Yun Y, An L V, Kim S H, Thao N T P, Man P K C, Yoo J R, Heo S T, Cho N H, Lee K H. Endemic Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Vietnam[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2019, 25(5): 1029-1031.

[12] Win A M, Nguyen Y T H, Kim Y, Ha N-Y, Kang J-G, Kim H, San B, Kyaw O, Htike W W, Choi D-O, Lee K-H, Cho N-H. Genotypic Heterogeneity of *Orientia tsutsugamushi* in Scrub Typhus Patients and Thrombocytopenia Syndrome Co-infection, Myanmar[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(8): 1878-1881.

[13] Yun Y, Heo S T, Kim G, Hewson R, Kim H, Park D, Cho N H, Oh W S, Ryu S Y, Kwon K T, Medlock J M, Lee K H. Phylogenetic Analysis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in South Korea and Migratory Bird Routes Between China, South Korea, and Japan[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2015, 93(3): 468-474.

[14] Fu Y, Li S, Zhang Z, Man S, Li X, Zhang W, Zhang C, Cheng X. Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19563.

[15] Shi J, Hu S, Liu X, Yang J, Liu D, Wu L, Wang H, Hu Z, Deng F, Shen S. Migration, recombination, and reassortment are involved in the evolution of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus[J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 47: 109-117.

[16] Rezelj V V, Mottram T J, Hughes J, Elliott R M, Kohl A, Brennan B. M Segment-Based Minigenomes and Virus-Like Particle Assays as an Approach To Assess the Potential of Tick-Borne Phlebovirus Genome Reassortment[J]. *J Virol*, 2019, 93(6):e02068-18.

[17] Yun S M, Park S J, Kim Y I, Park S W, Yu M A, Kwon H I, Kim E H, Yu K M, Jeong H W, Ryou J, Lee W J, Jee Y, Lee J Y, Choi Y K. Genetic and pathogenic diversity of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) in South Korea[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(2):e129531.

- [18] Lee K, Seok J H, Kim H, Park S, Lee S, Bae J Y, Jeon K, Kang J G, Yoo J R, Heo S T, Cho N H, Lee K H, Kim K, Park M S, Kim J I. Genome-informed investigation of the molecular evolution and genetic reassortment of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2023, 17(9):e0011630.
- [19] Fang X, Hu J, Peng Z, Dai Q, Liu W, Liang S, Li Z, Zhang N, Bao C. Epidemiological and clinical characteristics of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus human-to-human transmission[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, 15(4):e0009037.
- [20] Huang X, Li J, Li A, Wang S, Li D. Epidemiological Characteristics of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome from 2010 to 2019 in Mainland China[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(6):3092.
- [21] Wei X, Li S, Lu Y, Qiu L, Xu N, Guo X, Chen M, Liang H, Cheng D, Zhao L, Hao S, Kou Z, Wen H. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus aerosol infection in C57/BL6 mice[J]. *Virology*, 2023, 581: 58-62.
- [22] Boulanger N, Boyer P, Talagrand-Reboul E, Hansmann Y. Ticks and tick-borne diseases[J]. *Med Mal Infect*, 2019, 49(2): 87-97.
- [23] Yoo J R, Heo S T, Song S W, Bae S G, Lee S, Choi S, Lee C, Jeong S, Kim M, Sa W, Lee Y, Choi H, Kee S H, Lee K H. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Ticks and SFTS Incidence in Humans, South Korea[J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(9): 2292-2294.
- [24] Zhang Y Z, Zhou D J, Qin X C, Tian J H, Xiong Y, Wang J B, Chen X P, Gao D Y, He Y W, Jin D, Sun Q, Guo W P, Wang W, Yu B, Li J, Dai Y A, Li W, Peng J S, Zhang G B, Zhang S, Chen X M, Wang Y, Li M H, Lu X, Ye C, De Jong M D, Xu J. The ecology, genetic diversity, and phylogeny of Huaiyangshan virus in China[J]. *J Virol*, 2012, 86(5): 2864-2868.
- [25] Zhu L, Yin F, Moming A, Zhang J, Wang B, Gao L, Ruan J, Wu Q, Wu N, Wang H, Deng F, Lu G, Shen S. First case of laboratory-confirmed severe fever with thrombocytopenia syndrome disease revealed the risk of SFTSV infection in Xinjiang, China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 1122-1125.
- [26] Jo Y S, Kang J G, Chae J B, Cho Y K, Shin J H, Jheong W H, Chae J S. Prevalence of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Ticks Collected from National Parks in Korea[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2019, 19(4): 284-289.
- [27] Yun S M, Lee W G, Ryou J, Yang S C, Park S W, Roh J Y, Lee Y J, Park C, Han M G. Severe

fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks collected from humans, South Korea, 2013[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(8): 1358-1361.

[28] Hu Y Y, Zhuang L, Liu K, Sun Y, Dai K, Zhang X A, Zhang P H, Feng Z C, Li H, Liu W. Role of three tick species in the maintenance and transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14(6):e0008368.

[29] Zhang X, Zhao C, Cheng C, Zhang G, Yu T, Lawrence K, Li H, Sun J, Yang Z, Ye L, Chu H, Wang Y, Han X, Jia Y, Fan S, Kanuka H, Tanaka T, Jenkins C, Gedye K, Chandra S, Price D C, Liu Q, Choi Y K, Zhan X, Zhang Z, Zheng A. Rapid Spread of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus by Parthenogenetic Asian Longhorned Ticks[J]. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28(2): 363-372.

[30] Sato Y, Mekata H, Sudaryatma P E, Kirino Y, Yamamoto S, Ando S, Sugimoto T, Okabayashi T. Isolation of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus from Various Tick Species in Area with Human Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Cases[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2021, 21(5): 378-384.

[31] Kang J G, Cho Y K, Jo Y S, Han S W, Chae J B, Park J E, Jeong H, Jheong W H, Chae J S. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Ticks in the Republic of Korea[J]. *Korean J Parasitol*, 2022, 60(1): 65-71.

[32] Liu T, Zhang N, Li H, Hou S, Liu X. Analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome cluster in east China[J]. *Virology*, 2023, 20(1): 199.

[33] Huang D, Shi J, Wang H, Shen S, Liu H, Tang S, Wang B, Deng F, Su Z, Jiang Y, Wang T, Liu X, Hu Z. A Cluster of Symptomatic and Asymptomatic Infections of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Caused by Person-to-Person Transmission[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2017, 97(2): 396-402.

[34] Bao C J, Guo X L, Qi X, Hu J L, Zhou M H, Varma J K, Cui L B, Yang H T, Jiao Y J, Klena J D, Li L X, Tao W Y, Li X, Chen Y, Zhu Z, Xu K, Shen A H, Wu T, Peng H Y, Li Z F, Shan J, Shi Z Y, Wang H. 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.

[35] Zhang Y Z, He Y W, Dai Y A, Xiong Y, Zheng H, Zhou D J, Li J, Sun Q, Luo X L, Cheng Y L, Qin X C, Tian J H, Chen X P, Yu B, Jin D, Guo W P, Li W, Wang W, Peng J S, Zhang G B,

Zhang S, Chen X M, Wang Y, Li M H, Li Z, Lu S, Ye C, De Jong M D, Xu J. Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(4): 527-533.

[36] Kim W Y, Choi W, Park S W, Wang E B, Lee W J, Jee Y, Lim K S, Lee H J, Kim S M, Lee S O, Choi S H, Kim Y S, Woo J H, Kim S H. Nosocomial transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Korea[J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 60(11): 1681-1683.

[37] Gong Z, Gu S, Zhang Y, Sun J, Wu X, Ling F, Shi W, Zhang P, Li D, Mao H, Zhang L, Wen D, Zhou B, Zhang H, Huang Y, Zhang R, Jiang J, Lin J, Xia S, Chen E, Chen Z. Probable aerosol transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in southeastern China[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(12): 1115-1120.

[38] Wu Y X, Yang X, Leng Y, Li J C, Yuan L, Wang Z, Fan X J, Yuan C, Liu W, Li H. Human-to-human transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus through potential ocular exposure to infectious blood[J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 123: 80-83.

[39] Tian H, Yu P, Chowell G, Li S, Wei J, Tian H, Lv W, Han Z, Yang J, Huang S, Zhou S, Brownstein J S, Wang J, Xu B. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Humans, Domesticated Animals, Ticks, and Mosquitoes, Shaanxi Province, China[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2017, 96(6): 1346-1349.

[40] Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Ogata M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M, Shinomiya H. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in humans and animals in Ehime prefecture, Japan, an endemic region of SFTS[J]. *J Infect Chemother*, 2018, 24(10): 802-806.

[41] Rim J M, Han S W, Cho Y K, Kang J G, Choi K S, Jeong H, Son K, Kim J, Choi Y, Kim W M, Cho N H, Chae J S. Survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in wild boar in the Republic of Korea[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2021, 12(6): 101813.

[42] Okada A, Hotta A, Kimura M, Park E S, Morikawa S, Inoshima Y. A retrospective survey of the seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in wild animals in Japan[J]. *Vet Med Sci*, 2021, 7(2): 600-605.

[43] Sun J, Gong Z, Ling F, Zhang R, Tong Z, Chang Y, Chen E, Liu Q, Lin J, Chen Z, Jiang J. Factors associated with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome infection and fatal

outcome[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33175.

[44] Xing X, Guan X, Liu L, Zhan J, Jiang H, Liu L, Li G, Xiong J, Tan L, Xu J, Jiang Y, Yao X, Zhan F, Nie S. Natural Transmission Model for Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Bunyavirus in Villages of Hubei Province, China[J]. *Medicine*, 2016, 95(4):e2533.

[45] Kida K, Matsuoka Y, Shimoda T, Matsuoka H, Yamada H, Saito T, Imataki O, Kadowaki N, Noguchi K, Maeda K, Mochizuki Y, Kishimoto T. A Case of Cat-to-Human Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2019, 72(5): 356-358.

[46] Tsuru M, Suzuki T, Murakami T, Matsui K, Maeda Y, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Shimada T, Hasegawa H, Maeda K, Morikawa S, Saijo M. Pathological Characteristics of a Patient with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Infected with SFTS Virus through a Sick Cat's Bite[J]. *Viruses*, 2021, 13(2):204.

[47] Miyauchi A, Sada K-E, Yamamoto H, Iriyoshi H, Touyama Y, Hashimoto D, Nojima S, Yamanaka S, Ishijima K, Maeda K, Kawamura M. Suspected Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus from a Cat to a Veterinarian by a Single Contact: A Case Report[J]. *Viruses*, 2022, 14(2):223.

[48] Fang L, Yu S, Tian X, Fu W, Su L, Chen Z, Yan C, He J, Hong J, Lian W, Liu G, Zhang Y, Zhou J, Hu L. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus replicates in platelets and enhances platelet activation[J]. *J Thromb Haemost*, 2023, 21(5): 1336-1351.

[49] Gai Z T, Zhang Y, Liang M F, Jin C, Zhang S, Zhu C B, Li C, Li X Y, Zhang Q F, Bian P F, Zhang L H, Wang B, Zhou N, Liu J X, Song X G, Xu A, Bi Z Q, Chen S J, Li D X. Clinical progress and risk factors for death in severe fever with thrombocytopenia syndrome patients[J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(7): 1095-1102.

[50] Song H, Zou S, Huang Y, Wang Y, Wang T, Wei W, Sun Z, Hou H. The pathogenic and clinical characteristics of severe fever with thrombocytopenia syndrome patients with co-infections[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1298050.

[51] Xu S, Jiang N, Nawaz W, Liu B, Zhang F, Liu Y, Wu X, Wu Z. Infection of humanized mice with a novel phlebovirus presented pathogenic features of severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(5): 1009587.

[52] Peng C, Wang H, Zhang W, Zheng X, Tong Q, Jie S, Yang D, Zhou Y. Decreased monocyte

subsets and TLR4-mediated functions in patients with acute severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS)[J]. *Int J Infect Dis*, 2016, 43: 37-42.

[53] Li H, Li X, Lv S, Peng X, Cui N, Yang T, Yang Z, Yuan C, Yuan Y, Yao J, Yuan Z, Li J, Ye X, Zhang X, Zhu S, Peng K, Liu W. Single-cell landscape of peripheral immune responses to fatal SFTS[J]. *Cell Rep*, 2021, 37(8): 110039.

[54] Li M, Xiong Y, Li M, Zhang W, Liu J, Zhang Y, Xiong S, Zou C, Liang B, Lu M, Yang D, Peng C, Zheng X. Depletion but Activation of CD56(dim)CD16(+) NK Cells in Acute Infection with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus[J]. *Viol Sin*, 2020, 35(5): 588-598.

[55] Wu X, Qi X, Qu B, Zhang Z, Liang M, Li C, Cardona C J, Li D, Xing Z. Evasion of antiviral immunity through sequestering of TBK1/IKKepsilon/IRF3 into viral inclusion bodies[J]. *J Virol*, 2014, 88(6): 3067-3076.

[56] Yan J M, Zhang W K, Yan L N, Jiao Y J, Zhou C M, Yu X J. Bunyavirus SFTSV exploits autophagic flux for viral assembly and egress[J]. *Autophagy*, 2022, 18(7): 1599-1612.

[57] Liu S, Liu H, Kang J, Xu L, Zhang K, Li X, Hou W, Wang Z, Wang T, Dutch R E. The Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus NSs Protein Interacts with CDK1 To Induce G2 Cell Cycle Arrest and Positively Regulate Viral Replication[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(6):e01575-19.

[58] Huang M, Wang T, Huang Y, Wang Y, Wu S, Wang F, Tang G, Wei W, Liu W, Hou H. The clinical and immunological characteristics in fatal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) infection[J]. *Clin Immunol*, 2023, 248: 109262.

[59] Song P, Zheng N, Liu Y, Tian C, Wu X, Ma X, Chen D, Zou X, Wang G, Wang H, Zhang Y, Lu S, Wu C, Wu Z. Deficient humoral responses and disrupted B-cell immunity are associated with fatal SFTSV infection[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3328.

[60] Li Y H, Huang W W, He W Q, He X Y, Wang X H, Lin Y L, Zhao Z J, Zheng Y T, Pang W. Longitudinal analysis of immunocyte responses and inflammatory cytokine profiles in SFTSV-infected rhesus macaques[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1143796.

[61] Park A, Park S J, Jung K L, Kim S M, Kim E H, Kim Y I, Foo S S, Kim S, Kim S G, Yu K M, Choi Y, Kim J Y, Baek Y H, Song M S, Kim S R, Kim S Y, Jeong H W, Kim S H, Jung J U, Choi Y K. Molecular Signatures of Inflammatory Profile and B-Cell Function in Patients with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome[J]. *mBio*, 2021, 12(1):e02583-20.

- [62] 卫生部发布《发热伴血小板减少综合征防治指南(2010版)》[J]. 中国药房, 2010(42): 3990.
- [63] Li H, Lu Q B, Xing B, Zhang S F, Liu K, Du J, Li X K, Cui N, Yang Z D, Wang L Y, Hu J G, Cao W C, Liu W. Epidemiological and clinical features of laboratory-diagnosed severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011-17: a prospective observational study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(10): 1127-1137.
- [64] Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the Treatment of Infections with Lethal Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus[J]. *mSphere*, 2016, 1(1):e00061-15.
- [65] Tani H, Komeno T, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Shimojima M, Uda A, Morikawa S, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a lethal mouse model: Dose-efficacy studies upon oral administration[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10):e0206416.
- [66] Li H, Jiang X M, Cui N, Yuan C, Zhang S F, Lu Q B, Yang Z D, Xin Q L, Song Y B, Zhang X A, Liu H Z, Du J, Fan X J, Yuan L, Yuan Y M, Wang Z, Wang J, Zhang L, Zhang D N, Wang Z B, Dai K, Bai J Y, Hao Z N, Fan H, Fang L Q, Xiao G, Yang Y, Peng K, Wang H Q, Li J X, Zhang L K, Liu W. Clinical effect and antiviral mechanism of T-705 in treating severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 145.
- [67] Jung S I, Kim Y E, Yun N R, Kim C M, Kim D M, Han M A, Kim U J, Kim S E, Kim J, Ryu S Y, Kim H A, Hur J, Kim Y K, Jeong H W, Heo J Y, Jung D S, Lee H, Huh K, Kwak Y G, Lee S, Lim S, Lee S H, Park S H, Yeom J S, Kim S W, Bae I G, Lee J, Kim E S, Seo J W. Effects of steroid therapy in patients with severe fever with Thrombocytopenia syndrome: A multicenter clinical cohort study[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, 15(2):e0009128.
- [68] Kim U J, Kim D M, Ahn J H, Kang S J, Jang H C, Park K H, Jung S I. Successful treatment of rapidly progressing severe fever with thrombocytopenia syndrome with neurological complications using intravenous immunoglobulin and corticosteroid[J]. *Antivir Ther*, 2016, 21(7): 637-640.
- [69] Yoo J R, Kim S H, Kim Y R, Lee K H, Oh W S, Heo S T. Application of therapeutic plasma exchange in patients having severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *Korean J Intern*

Med, 2019, 34(4): 902-909.

[70] Kim J Y, Jeon K, Hong J J, Park S I, Cho H, Park H J, Kwak H W, Park H J, Bang Y J, Lee Y S, Bae S H, Kim S H, Hwang K A, Jung D I, Cho S H, Seo S H, Kim G, Oh H, Lee H Y, Kim K H, Lim H Y, Jeon P, Lee J Y, Chung J, Lee S M, Ko H L, Song M, Cho N H, Lee Y S, Hong S H, Nam J H. Heterologous vaccination utilizing viral vector and protein platforms confers complete protection against SFTSV[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 8189.

学位论文数据集

关键词*	密级*	中图分类号*	UDC	论文资助
发热伴血小板减少综合征病毒；基因型地理分布；稳定性；蜱虫；多样性	<input checked="" type="checkbox"/> 公开 <input type="checkbox"/> 不公开	R392		
学位授予单位名称*	学位授予单位代码*	学位类别*	学位级别*	
贵州医科大学	10660	专业学位	硕士	
论文题名*				论文语种*
发热伴血小板减少综合征病毒环境稳定性及遗传多样性研究				中文
并列题名*	Research on the environmental stability and genetic diversity of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus			
作者姓名*	杨晓艺	学号*	2021120040830	
培养单位名称*	培养单位代码*	培养单位地址	邮编	
中国疾病预防控制中心	100000			
学科专业*	研究方向*	学制*	学位授予年*	
公共卫生	疾病预防与控制	3年	2024	
论文提交日期*	2023.5.28			
导师姓名*	谢春、李建东	职称*	教授、研究员	
评阅人	答辩委员会主席*	答辩委员会成员		
	黎东霞			
电子版论文提交格式 文本 () 图像 () 视频 () 音频 () 多媒体 () 其它 ()				
推荐格式: application/msword; application/pdf				
电子版论文出版(发布)者	电子版论文出版(发布)地	权限声明		
论文总页数*	97			
共 33 项, 其中带*为必填数据, 为 22 项。				