

四川省东南部地区蚊、蠓及相关虫媒病毒调查研究

宋颂 付士红 周兴余 张佳珂 李伟 刘丽珺 李劲松 汪健 林子 李晓龙
何英 雷雯雯 王环宇 王斌 鲁晓晴 梁国栋

266071 青岛大学(宋颂、王斌、鲁晓晴); 102206 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所/传染病预防控制国家重点实验室(宋颂、付士红、李晓龙、何英、雷雯雯、王环宇、梁国栋); 610041 成都, 四川省疾病预防控制中心(周兴余、张佳珂、李伟、刘丽珺); 646000 泸州市疾病预防控制中心(李劲松); 646299 泸州市合江县疾病预防控制中心(汪健); 644199 宜宾市南溪区疾病预防控制中心(林子)

宋颂、付士红与周兴余同为第一作者

通信作者: 鲁晓晴, Email: luxq532@126.com; 梁国栋, Email: gdliang@hotmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.10.017

【摘要】 **目的** 了解四川省的蚊、蠓以及相关虫媒病毒种类及分布。**方法** 在自然界使用灯诱法采集吸血昆虫标本, 形态学分类后分装, 液氮保存备用。蚊虫、蠓虫研磨上清液接种 BHK-21 细胞和 C6/36 细胞进行病毒分离和病毒基因检测。使用 BioEdit 7.0.5.3、MEGA 6.0 等软件对病毒序列进行分子生物学特征分析。**结果** 2016—2017 年在四川省东南部 3 个县 的 7 个自然村共采集到 3 属 4 种蚊虫 17 019 只, 蠓虫 12 700 只。三带喙库蚊占蚊虫采集总数的 79.4% (13 519/17 019), 其次为骚扰阿蚊(11.1%, 1 897/17 019), 致倦库蚊占采集蚊虫标本总数的 5.5% (930/17 019); 中华按蚊最少(4.0%, 673/17 019)。蚊虫标本接种组织细胞后, 在合江县采集的三带喙库蚊标本获得 3 株可以稳定传代的病毒分离株, 经分子生物学实验鉴定为基因 I 型流行性乙型脑炎(乙脑)病毒, 在合江县采集的 7 批蚊虫中检测到乙脑病毒基因阳性。蠓虫标本接种细胞后未获得病毒分离物, 在合江县采集的 4 批蠓虫标本经分子生物学检测, 显示阿卡斑病毒基因阳性。**结论** 三带喙库蚊是四川省东南部 3 县的优势蚊种, 四川省东南部存在经蚊虫传播的乙脑病毒及以蠓虫为媒介的阿卡斑病毒。

【关键词】 流行性乙型脑炎病毒; 阿卡斑病毒; 蚊; 蠓

基金项目: 国家重点研发计划生物安全关键技术研发重点专项(2016YFC1201904); 国家自然科学基金(81290342)

Mosquitoes, midges and related arboviruses in southeast Sichuan province Song Song, Fu Shihong, Zhou Xingyu, Zhang Jiako, Li Wei, Liu Lijun, Li Jinsong, Wang Jian, Lin Yu, Li Xiaolong, He Ying, Lei Wenwen, Wang Huanyu, Wang Bin, Lu Xiaoqing, Liang Guodong
Qingdao University, Qingdao 266071, China (Song S, Wang B, Lu XQ); State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Song S, Fu SH, Li XL, He Y, Lei WW, Wang HY, Liang GD); Sichuan Province Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China (Zhou XY, Zhang JK, Li W, Liu LJ); Luzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Luzhou 646000, China (Li JS); Hejiang County Center for Disease Control and Prevention, Hejiang 646299, China (Wang J); Nanxi District Center for Disease Control and Prevention, Yibin 644199, China (Lin Y)

Song Song, Fu Shihong and Zhou Xingyu are the first authors who contributed equally to the article.

Corresponding authors: Lu Xiaoqing, Email: luxq532@126.com; Liang Guodong, Email: gdliang@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the distribution patterns of mosquitoes, midges and related arboviruses in Sichuan province. **Methods** Blood-sucking insects were collected from houses and pens, using the ultraviolet lights. Mosquito samples were classified according to morphologic

characteristics and then stored at liquid nitrogen. All samples were incubated with BHK-21 and C6/36 cells for virus isolation and then detected for their viral genes. Sequences of the virus were identified and analyzed by molecular biological software, such as BioEdit 7.0.5.3, MEGA 6.0. **Results** In total, 17 019 mosquitoes from 3 genera and 4 species and 12 700 midges were collected from the southeast regions of Sichuan province in 2016 and 2017. Among them, 79.4% (13 519/17 019) belonged to *Culex tritaeniorhynchus* with 11.1% (1 897/17 019) as *Armigeres subalbatus*, 5.5% (930/17 019) were *Anopheles sinensis* and 4.0% (673/17 019) were *Anopheles sinensis* 3 virus strains that isolated from *Culex tritaeniorhynchus* were identified as type I Japanese encephalitis virus. Seven pools of mosquitoes isolated from Hejiang county were identified Japanese encephalitis virus gene positive through PCR amplification. With 4 pool midges were detected positive for Akabane virus through PCR gene amplification while midges samples didn't have virus isolates. **Conclusions** *Culex tritaeniorhynchus* appeared the predominant species in the southeast regions of Sichuan. Japanese encephalitis virus transmitted by mosquitoes and Akabane virus by midges were prevalent in southeast Sichuan province.

【Key words】 Japanese encephalitis virus; Akabane virus; Mosquito; Midge

Fund programs: National Special Project on Research and Development of Key Biosafety Technologies (2016YFC1201904); National Natural Science Foundation of China (81290342)

虫媒病毒是一类可以在蚊、蜚、蠓等吸血昆虫体内繁殖并通过叮咬将病毒传播给人类及动物的病毒^[1]。虫媒病毒感染引起的症状主要表现为发热、皮疹、病毒性脑炎等,严重时可引起死亡^[2]。1992 年在国际虫媒病毒中心注册的虫媒病毒有 535 种,其中有 128 种可能与人畜疾病有关。四川省蚊虫种类较多。已经在四川省的蚊虫标本分离到盖塔病毒^[3]、流行性乙型脑炎(乙脑)病毒^[4-5]和布尼亚病毒目(Bunyavirales)的病毒等^[6]。四川省是我国乙脑的高发地区,近年来发病率在 2/10 万~10/10 万之间^[7]。泸州、宜宾市位于四川省东南部,是四川省乙脑高流行区,自 1950 年代以来每年均有乙脑病例发生^[8-9]。为此本研究 2016、2017 年连续 2 年在四川省泸州、宜宾市的 3 个县 7 个自然村开展虫媒病毒调查,以了解蚊、蠓以及其携带的虫媒病毒。

材料与方法

1. 标本采集:2016、2017 年 7 月在四川省泸州市合江县大桥镇大桥村、大桥镇堰坎村、合江镇三块石村、合江镇柿子田村、榕山镇荆树村、古蔺县永乐镇龙井村、宜宾市南溪区留宾乡熊湾村共 2 市 3 县 7 个村庄采集蚊虫和蠓虫标本。采集地点为集中养殖的猪圈、村民散养猪圈、牛圈、鸡舍、鸭舍和兔舍。使用紫外诱蚊灯(武汉市吉星环保科技有限公司)于 20:00 至次日 07:00 左右在采集地点捕蚊。对采集的蚊虫和蠓虫标本在冰浴条件下进行形态学分类,按照采集环境和种类等信息(蚊虫 50 只/管,蠓虫 500 只/管)编号登记后立即放入液氮中保存备用。

2. 病毒分离和鉴定:

(1)细胞培养:BHK-21 细胞(金黄色地鼠肾细胞)、C6/36 细胞(白纹伊蚊细胞)为中国 CDC 病毒病

预防控制所保存。BHK-21、C6/36 细胞分别在 37 ℃、5% CO₂和 28 ℃、5% CO₂培养箱中培养^[10]。

(2)病毒培养:蚊虫及蠓虫使用 Tissuelyser 振荡器(德国 Qiagen 公司)振荡后经 4 ℃、20 000×g 离心 20 min。取研磨上清液 100 μl 分别接种 BHK-21 细胞和 C6/36 细胞,分别放入 37 ℃、5% CO₂和 28 ℃、5% CO₂培养箱连续培养。每 12 h 在显微镜下观察细胞病变效应(CPE),所有标本均盲传三代,出现 CPE 时收取后进一步进行鉴定^[11]。

(3)病毒 RNA 提取及 cDNA 制备:使用德国 Qiagen 公司提供的 RNA 提取试剂盒,根据说明书进行病毒 RNA 提取;使用第一链反应管,加入 1 μl 的 pd(N)6 完成 cDNA 的制备^[12]。鉴定病毒使用的属特异性引物(黄病毒属、甲病毒属、布尼亚病毒属)和种特异性引物(乙脑病毒、环状病毒、辛德毕斯病毒、盖塔病毒、浓核病毒)来自文献^[10],扩增名称、产物大小等及阿卡斑病毒 S、M 片段引物^[13]见表 1。综合考虑扩增目的片段长度、引物退火温度等信息,以引物的最适反应条件进行病毒基因的扩增。

(4)病毒基因的 PCR 扩增:PCR 反应条件参照文献^[11];取 5 μl 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,将测序结果进行 Blast 比对,确定病毒种类。

(5)序列分析:使用 BioEdit 7.0.5.3 软件进行核苷酸序列拼接与质量分析、核苷酸多序列比对以及序列的同源性分析;使用 MEGA 6.0 软件完成基于 Neighbour-joining 方法的系统进化分析,Bootstrap 值设定为 1 000^[11]。

结 果

1. 一般情况:2016、2017 年连续 2 年在四川省共采集到 3 属 4 种 17 019 只蚊虫,包括三带喙库

表1 四川省东南部地区蚊、蠓及相关虫媒病毒鉴定用引物

引物名称	扩增区段	序列信息(5' ~ 3')	扩增大小 (bp)
黄病毒属			
FU1	NS5	TAC CAC ATG ATG GGA AAG AGA GAG AA	310
cFD2		GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC	
甲病毒属			
M2W(+)	NSP1	YAG AGC DTT TTC GCA YST RGC HW	434
cM3W		ACA TRA ANK GNG TNG TRT CRA ANC CDA YCC	
M2W2(+)		TGY CCN VTG MDN WSY VCN GAR GAY CC	
布尼亚病毒属			
BUP	S	ATG ACT GAG TTG GAG TTT GAT GTC GC	251
BDW		TGT TCC TGT TGC CAG GAA AAT	
辛德毕斯病毒			
SINV-F	NSP4	GAT GAA ATC NGG VAT GTT	552
SINV-R		TTA GGA CCA CCG TAG AGA	
环状病毒			
6-4-2F	4s	CGA CAG ACC AAA AGA TAT	848
6-4-2R		TCA ACA CGT AAT CCA ATA	
盖塔病毒			
NS3F	NS3	CTT TCA GAG AGG ACA GAG CGT	810
NS3R		CTC TTC TGC CGT TAT CAA AGT TAG	
乙脑病毒			
JEV-251F	C/PrM	CGT TCT TCA AGT TTA CAG CAT TAG C	674
JEV-925R		CCY RTG TTY CTG CCA AGC ATC CAM CC	
JEV-743R		CGY TTG GAA TGY CTR GTC CG	492
JE-955F	E	TGY TGG TCG CTC CGG CTT A	1 581
JE-2536R		AAG ATG CCA CTT CCA CZA YCT C	
浓核病毒			
DNV-F	NS1	AAC CGT TGG TGA CCT CTA CCC AC	1 105
DNV-R		GAT TTT CCC ATT GCT GTG CCG TTG	
阿卡拉斑病毒			
AKV-1F	S	TAA CTA CGC ATT GCA ATG GC	790
AKV-1R		TAA GCT TAG ATC TGG ATA CC	
AKV-2F	M	GCA ATG CCT CCT CGT AAT A	770
AKV-2R		TTG TTG GAC ATG GGC TAA A	
AKV-3F	M	GCT TTA TGG CTT ATT GTT GCT A	963
AKV-3R		TGT TCT CCA CTG TAT GCT GTC T	
AKV-4F	M	AGA CAG CAT ACA GTG GAG AAC A	867
AKV-4R		ACA ATA CTC ATC AAC CAA ATC A	
AKV-5F	M	AGG TCT ATT CGA CTC CTC AAA	886
AKV-5R		ACA CTG TGG ACT TCA AAC TGC	
AKV-6F	M	TTT TGT GTT TCA GAG CCT AC	1 025
AKV-6R		CCT CCC GTT ATG TCT ATT TT	

本分为108批处理(蚊虫80批次, 蠓虫28批次)。标本研磨和离心液分别接种BHK-21细胞和C6/36细胞, 最终在2016年泸州市合江县榕山镇荆树村采集的3批蚊虫中获得3株病毒分离物(SCHJ1623、SCHJ1636、SCHJ1657)。3株病毒分离物在BHK-21表现为细胞聚集、圆缩、脱落。病毒株接种C6/36细胞主要表现为细胞脱落。3株分离物均来自2016年采集的3批三带喙库蚊中。所有蠓虫标本和2017年采集的蚊虫标本中未获得病毒分离物。病毒分离结果见表3。

3. 病毒序列分析:

(1) 乙脑病毒: 对四川省采集的所有蚊虫和蠓虫标本进行多种属和种的特异性引物的病毒基因扩增, 结果显示编号SCHJ1623、SCHJ1636、SCHJ1639、SCHJ1647、SCHJ1657、SCHJ1660、SCYB1604、SCHJ1721、SCHJ1725、SCHJ1741(SCHJ1623、SCHJ1636、SCHJ1657为病毒阳性分离物)在乙脑病毒巢式PCR获得目的条带, 序列测定经Blast比对为基因I型乙脑病毒(表3)。使用乙脑病毒的E基因引物进行序列扩增, SCHJ1623、SCHJ1636、SCHJ1647、SCHJ1657、SCHJ1660获得目的条带, 与GenBank中35株分离于不同国家或地区、不同基因型的乙脑病毒构建系统进化分析。结果显示5株乙脑病毒均为基因I型。

蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)、骚扰阿蚊(*Armigeres subalbatus*)及中华按蚊(*Anopheles sinensis*), 蠓虫12 700只(均为吸血库蠓)。从蚊虫的构成来看, 三带喙库蚊最多(79.4%, 13 519/17 019), 是当地的优势蚊种。其次为骚扰阿蚊, 占11.1%(1 897/17 019); 标本采集信息见表2。

2. 病毒分离: 2016年采集的蚊虫和蠓虫标本分167批处理(蚊虫151批次, 蠓虫16批次), 2017年标

SCHJ1623、SCHJ1647与2008年中国台湾地区分离株TPC0806C亲缘关系最近, SCHJ1636、SCHJ1657、SCHJ1660在一个分支, 与2006年河南省分离株HN06-26亲缘关系最近(图1)。

病毒E基因核苷酸与氨基酸序列分析显示, 4株乙脑病毒核苷酸序列同源率为97.3%~99.8%。其中SCHJ1623与病毒株TPC0806C核苷酸序列高度同源, 核苷酸(氨基酸)序列同源率为99.3%(99.4%)。SCHJ1636与河南省分离株HN04-11同源性最高,

表 2 四川省东南部地区蚊、蠓标本的采集

采集年份	采集地点	蚊种				蚊虫合计	蠓虫	总计
		三带喙库蚊	致倦库蚊	骚扰阿蚊	中华按蚊			
2016	合江县	6 167	600	312	183	7 262	7 300	14 562
	南溪区	2 540	330	99	76	3 045	1 000	4 045
2017	合江县	4 436	0	912	204	5 552	4 400	9 952
	古蔺县	376	0	574	210	1 160	0	1 160
合计		13 519(79.4)	930(5.5)	1 897(11.1)	673(4.0)	17 019	12 700	29 719

注:括号外数据为只数,括号内数据为构成比(%)

表 3 四川省东南部地区蚊、蠓及相关虫媒病毒阳性分离物

编号	采集年份	采集地点	宿主	阳性分离物	分子生物学鉴定(PCR 阳性)
SCHJ1623	2016	泸州市合江县榕山镇荆树村	三带喙库蚊	+	乙脑病毒
SCHJ1636	2016	泸州市合江县榕山镇荆树村	三带喙库蚊	+	乙脑病毒
SCHJ1657	2016	泸州市合江县大桥镇堰坎村	三带喙库蚊	+	乙脑病毒
SCHJ1639	2016	泸州市合江县榕山镇荆树村	三带喙库蚊	-	乙脑病毒
SCHJ1647	2016	泸州市合江县榕山镇荆树村	三带喙库蚊	-	乙脑病毒
SCHJ1660	2016	泸州市合江县大桥镇堰坎村	三带喙库蚊	-	乙脑病毒
SCYB1604	2016	宜宾市南溪区留宾乡熊湾村	三带喙库蚊	-	乙脑病毒
SCHJ1721	2017	泸州市合江县合江镇三块头村	三带喙库蚊	-	乙脑病毒
SCHJ1725	2017	泸州市合江县合江镇三块头村	三带喙库蚊	-	乙脑病毒
SCHJ1741	2017	泸州市合江县合江镇柿子田村	三带喙库蚊	-	乙脑病毒
SCHJ1664	2016	泸州市合江县大桥镇堰坎村	蠓虫	-	阿卡斑病毒
SCHJ1717-1	2017	泸州市合江县合江镇柿子田村	蠓虫	-	阿卡斑病毒
SCHJ1717-2	2017	泸州市合江县合江镇柿子田村	蠓虫	-	阿卡斑病毒
SCHJ1757	2017	泸州市合江县大桥镇堰坎村	蠓虫	-	阿卡斑病毒

注: + 代表病毒阳性分离物; - 代表未分离到病毒株

核苷酸(氨基酸)序列同源性的 98.3%(99.8%)。

(2) 阿卡斑病毒:2016、2017 年在合江县采集的蠓虫标本中检测到 4 批(编号 SCHJ1664、SCHJ1717-1、SCHJ1717-2、SCHJ1757)阿卡斑病毒基因扩增阳性。经核苷酸序列显示均为阿卡斑病毒。对 4 批阿卡斑病毒检测阳性标本进行阿卡斑病毒的 S、M 片段的基因序列扩增, SCHJ1664、SCHJ1717-1、SCHJ1717-2 获得 S 片段编码区基因的序列, SCHJ1717-1 获得 M 片段编码区基因的序列。将 SCHJ1664、SCHJ1717-1、SCHJ1717-2 病毒株与国内外分离到的 25 株阿卡斑病毒进行 S 片段序列的系统进化分析,结果显示病毒株 SCHJ1664 株与广西分离株 GXLCH70N 处于同一进化分支。病毒株 SCHJ1717-1、SCHJ1717-2 与云南省分离株 DHL10M110 亲缘关系最近(图 2)。将阿卡斑病毒株 SCHJ1717-1 与国内外分离到的 21 株阿卡斑病毒以及布尼亚维拉病毒(Bunyamwera virus)为外群进行 M 片段序列的系统进化分析,结果显示病毒株 SCHJ1717-1 与广西壮族自治区分离病毒株 GXLCH04 亲缘关系较近(图 3)。

比较 3 株阿卡斑病毒的 S 片段基因的核苷酸(氨基酸)序列同源性,分析显示 3 株病毒株 SCHJ1664、SCHJ1717-1、SCHJ1717-2 之间的核苷酸(氨基酸)序列同源性在 96.5%~99.4%(97.8%~99.6%)之间, SCHJ1664 病毒株与 GenBank 下载的 14 株阿卡斑病毒(来自于肯尼亚、澳大利亚、韩国、日本、中国)进行核苷酸(氨基酸)序列的同源性分析比较,同源性在 83.0%~99.4%(90.3%~99.6%)之间。病毒株 SCHJ1664 与 2016 年广西壮族自治区竹鼠分离病毒株 GXLCH70N 同源性最高,核苷酸(氨基酸)序列同源性为 99.4%(99.6%)。

将测序得到的阿卡斑病毒 SCHJ1717-1 的 M 片段的编码区序列与 GenBank 中的提供的 14 株阿卡斑病毒序列(分离自肯尼亚、澳大利亚、韩国、日本、中国)进行核苷酸(氨基酸)同源性比对,同源性在 70.2%~96.9%(74.3%~98.0%)之间。病毒株 SCHJ1717-1 与中国分离株(GXLCH04、GXLCH70N、DHL10M110、NM/BS/1、CY-77)的核苷酸(氨基酸)序列的同源性在 89.1%~96.8%(95.4%~97.9%)之间。

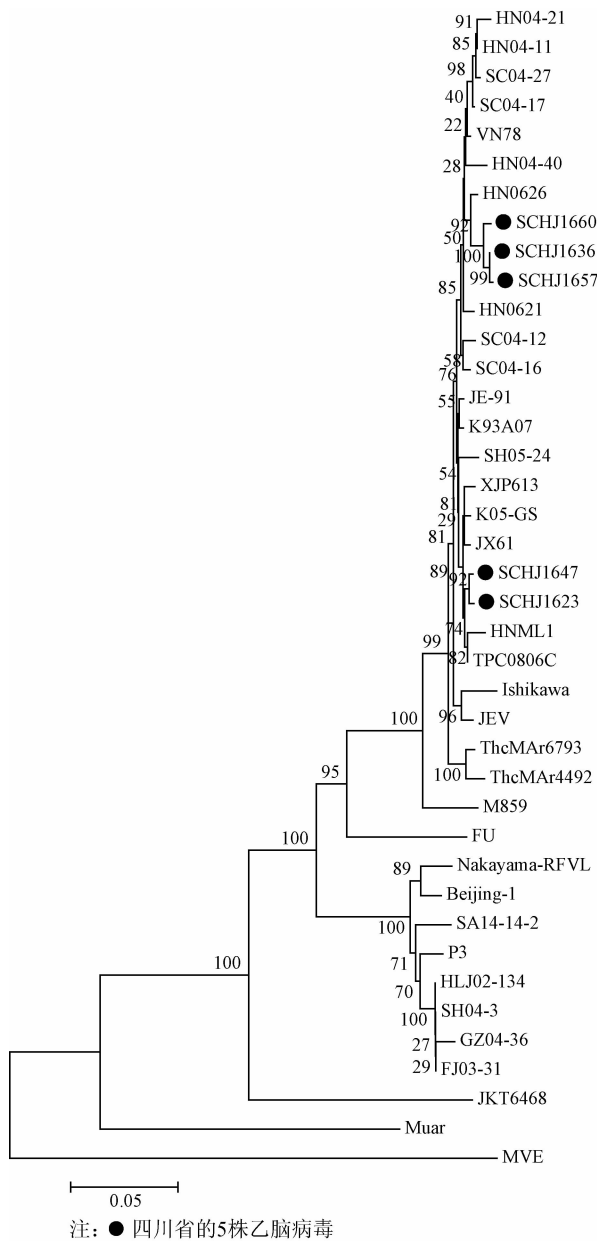


图1 四川省乙脑病毒株E基因核苷酸序列的系统进化分析

讨论

王环宇等^[14]在四川省东北部的巴中市采集的三带喙库蚊中分离3株乙脑病毒,张佳珂等^[5]在四川省东部地区广安等7个县(区)进行虫媒调查,分离出8株乙脑病毒,均来自于三带喙库蚊。本研究在四川省东南部地区采集的三带喙库蚊中分离3株乙脑病毒和7批三带喙库蚊标本中乙脑病毒基因扩增阳性,提示四川省三带喙库蚊是当地乙脑病毒的主要传播媒介。7、8月是三带喙库蚊的高峰期,同时也是乙脑疫情的高发期,因此加强当地蚊虫媒介种类和密度监测及时发现蚊虫携带病毒及其相关疾病对当地公共卫生具有重要意义。

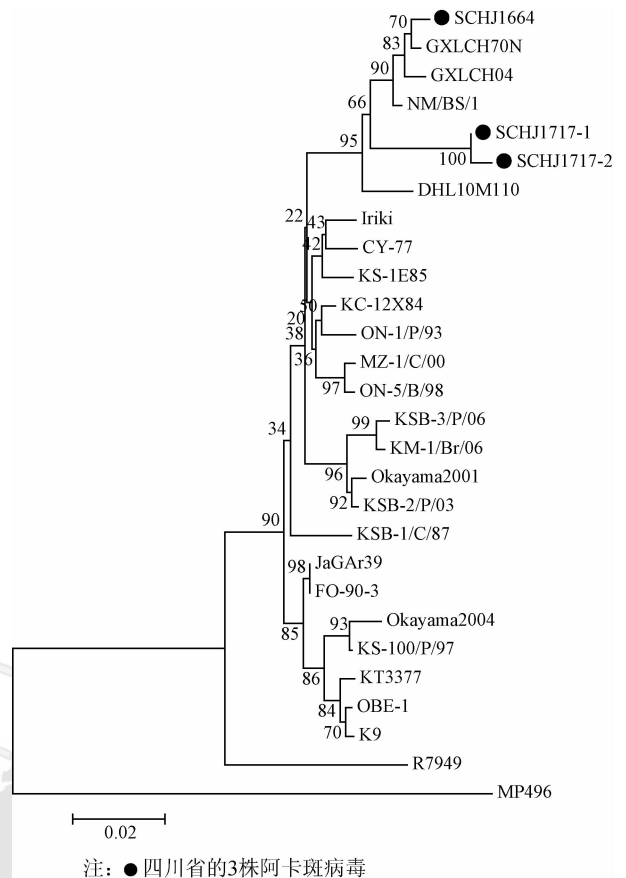


图2 四川省阿卡斑病毒株S1片段核苷酸序列的系统进化分析

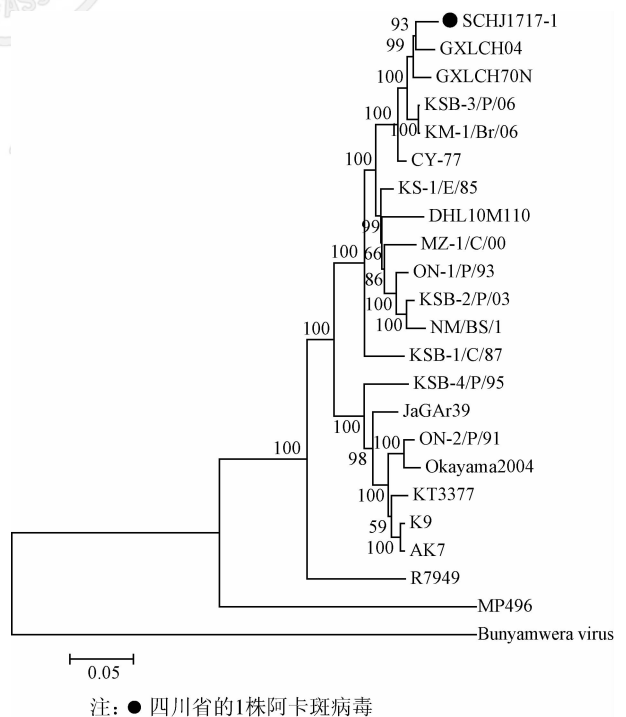


图3 四川省阿卡斑病毒株M1片段核苷酸序列的系统进化分析

阿卡斑病毒属于布尼亚病毒目布尼亚病毒属病毒。阿卡斑病毒于1959年在日本采集的金色库蚊

和三带喙库蚊中分离到^[2]。在澳大利亚、马来西亚、南非、沙特阿拉伯、肯尼亚、韩国和我国台湾地区、云南省等地采集的媒介标本和动物标本分离到阿卡斑病毒^[15-18]。1998 年李其平等^[19]在我国采集的蚊虫标本中分离到阿卡斑病毒,2010 年从云南省采集的三带喙库蚊和迷糊按蚊(*Anopheles vagas*)分离到 2 株阿卡斑病毒(病毒株 DHL10M117, DHL10M110)^[20]。本研究在四川省采集的蚊虫中鉴定到阿卡斑病毒,进一步提示阿卡斑病毒通过蚊虫媒介携带。

由于在当地采集的蚊虫吸血量较多,细胞培养分离时血液可能对接种细胞产生毒性,导致研磨液在吸附过程中脱落或者发生细胞污染,为了避免这种情况,在蚊虫研磨时将双抗比例提高,使用 0.22 μm 的滤膜除菌滤过接种细胞,但是在蚊虫中未分离到阿卡斑病毒,使用剩余蚊虫研磨液进行病毒基因片段的扩增。虽然未获得阿卡斑病毒的阳性分离物,但是对采集的蚊虫标本进行分子生物学鉴定结果表明四川省采集的蚊虫中存在阿卡斑病毒。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats[J]. *Antiviral Res*, 2010, 85(2): 328-345. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
- [2] Karabatsos N. International catalogue of arthropod-borne viruses [M]. 3rd ed. San Antonio, TX: American Society for Tropical Medicine and Hygiene, 1985.
- [3] 李伟,潘明,周兴余,等.四川省首株盖塔病毒 SC1210 的鉴定[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2017, 31(1): 2-7. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2017.01.001.
Li W, Pan M, Zhou XY, et al. First isolation and identification of Getah virus SC1210 in Sichuan[J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2017, 31(1): 2-7. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2017.01.001.
- [4] Wang HY, Takasaki T, Fu SH, et al. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88(Pt 3): 885-894. DOI: 10.1099/vir.0.82185-0.
- [5] 张佳珂,林世华,刘学成,等.四川省虫媒病毒调查研究[J]. *预防医学情报杂志*, 2010, 26(5): 325-330.
Zhang JK, Lin SH, Liu XC, et al. Survey on arbovirus in Sichuan province[J]. *J Prev Med Inf*, 2010, 26(5): 325-330.
- [6] Zhang JK, Wang JL, Wang LH, et al. Molecular characterization and seroprevalence in pigs of SC0806, a cat Que virus isolated from mosquitoes in Sichuan province, China[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2015, 15(7): 423-431. DOI: 10.1089/vbz.2014.1767.
- [7] 袁磊.四川地区乙型脑炎病毒的分子流行病学调查研究[D].雅安:四川农业大学,2012.
Yuan L. The molecular epidemiology investigation of Japanese encephalitis virus in Sichuan[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2012.
- [8] 张佳珂,陈丹林,刘学成,等.四川省 2002 年流行性乙型脑炎监测[J]. *中国计划免疫*, 2003, 9(4): 215-218. DOI: 10.3969/j.issn.1006-916X.2003.04.009.
Zhang JK, Chen DL, Liu XC, et al. The surveillance of Japanese encephalitis in Sichuan province in 2002[J]. *Chin J Vacc Immun*, 2003, 9(4): 215-218. DOI: 10.3969/j.issn.1006-916X.2003.04.009.
- [9] 郭杨,周兴余.2011-2014 年四川省流行性乙型脑炎流行特征分析[J]. *预防医学情报杂志*, 2016, 32(5): 458-461.
Guo Y, Zhou XY. Epidemiological characteristics of Japanese encephalitis in Sichuan, 2011-2014[J]. *J Prev Med Inf*, 2016, 32(5): 458-461.
- [10] Fu SH, Song S, Liu H, et al. ZIKA virus isolated from mosquitoes: a field and laboratory investigation in China, 2016 [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2017, 60(12): 1364-1371. DOI: 10.1007/s11427-017-9196-8.
- [11] Wang JL, Zhang HL, Sun XH, et al. Distribution of mosquitoes and mosquito-borne arboviruses in Yunnan province near the China-Myanmar-Laos Border[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 84(5): 738-746. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0294.
- [12] Lei WW, Guo XF, Fu SH, et al. Isolation of *Tibet orbivirus*, TIBOV, from *Culicoides* collected in Yunnan, China [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136257. DOI: 10.1371/journal.pone.0139646.
- [13] 冯云,章域震,杨卫红,等.阿卡斑病毒云南分离株全基因组序列特征研究[J]. *病毒学报*, 2016, 32(2): 161-169. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002902.
Feng Y, Zhang YZ, Yang WH, et al. Characterization and analyses of the full-length genome of a strain of the Akabane virus isolated from mosquitoes in Yunnan province, China [J]. *Chin J Virol*, 2016, 32(2): 161-169. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002902.
- [14] 王环宇,张佳珂,付士红,等.四川省分离的基因 I 型乙型脑炎病毒分子特征分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2009, 29(9): 816-821. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2009.09.012.
Wang HY, Zhang JK, Fu SH, et al. Molecular character analysis of Japanese encephalitis virus isolated from Sichuan province, China [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2009, 29(9): 816-821. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2009.09.012.
- [15] Coverdale OR, Cybinski DH, St George TD. Congenital abnormalities in calves associated with Akabane virus and Aino virus [J]. *Aust Vet J*, 1978, 54(3): 151-152. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1978.tb05538.x.
- [16] Metselaar D, Robin Y. Akabane virus isolated in Kenya [J]. *Vet Rec*, 1976, 99(5): 86. DOI: 10.1136/vr.99.5.86-a.
- [17] Strm Y, Brenner J, Braverman Y, et al. Akabane virus in Israel: a new virus lineage [J]. *Virus Res*, 2004, 104(1): 93-97. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.03.004.
- [18] Al-Afaleq AI, Elzein EMEA, Mellor PS. Prevalence of neutralizing antibodies to Akabane virus in ruminants in Saudi Arabia [J]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1998, 45(5): 257-262. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1998.tb00792.x.
- [19] 李其平,周立桥,姚龙涛,等.阿卡斑(赤羽病)病毒的分离与初步鉴定[J]. *中国动物检疫*, 2000, 17(7): 27-29.
Li QP, Zhou LQ, Yao LT, et al. Isolation and preliminary identification of Akabane virus [J]. *Chin Animal Health Inspect*, 2000, 17(7): 27-29.
- [20] 冯云,何彪,付士红,等.云南蚊虫中阿卡斑病毒的分离和鉴定[J]. *病毒学报*, 2015, 31(1): 51-57. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002626.
Feng Y, He B, Fu SH, et al. Isolation and identification of the Akabane virus from mosquitoes in Yunnan province, China [J]. *Chin J Virol*, 2015, 31(1): 51-57. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002626.

(收稿日期:2018-05-03)

(本文编辑:万玉立)