

内蒙古自治区采集的蚊虫标本新发现 乙脑病毒和盖塔病毒

程睿^{1,2} 南晓伟³ 范娜^{1,2} 付士红² 司晓艳³ 张琳⁴ 何英² 雷雯雯² 李樊²
王环宇² 鲁晓晴¹ 梁国栋²

¹青岛大学公共卫生学院 266071; ²中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒性
脑炎室 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206; ³内蒙古自治区综合疾病预防
控制中心病媒生物防制科, 呼和浩特 010031; ⁴巴彦淖尔市疾病预防控制中心 015000
通信作者: 鲁晓晴, Email: Luxq532@126.com; 梁国栋, Email: gdliang@hotmail.com

【摘要】 目的 了解内蒙古自治区的吸血昆虫及其携带虫媒病毒的种类及分布, 为虫媒病毒病的预防提供基础数据。**方法** 在自然界使用灯诱法采集蚊虫标本, 形态学分类后分装编号, 液氮保存。组织培养法进行病毒分离。使用多种生物学信息软件(BioEdit、MEGA等)对病毒核苷酸序列进行分子生物学特征分析。**结果** 2014、2017—2018年在内蒙古自治区5个县(旗)的采集点共采集到2属3种蚊虫24 240只, 蠓虫17 110只。其中在淡色库蚊标本中检测到乙脑病毒基因阳性, 并且获得4株可以稳定传代的病毒分离物, 经分子生物学鉴定分别为盖塔病毒、浓核病毒。盖塔病毒(NMDK1813-1)E2基因遗传进化分析结果显示, 与甘肃分离株(GS10-2)在同一进化分支, 且有6个共同的氨基酸变异位点。**结论** 本研究发现的乙脑病毒和盖塔病毒均是在内蒙古蚊虫标本中新近发现的病毒, 这为内蒙古地区的虫媒病毒及其传播疾病的预防及控制提供了基础数据, 对内蒙古的虫媒病毒及其病毒病的预防及控制提出了新的挑战。

【关键词】 乙脑病毒; 盖塔病毒; 虫媒病毒

基金项目: 生物安全关键技术研发重点专项(2016YFC1201904)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20190425-00284

Emerging of Japanese encephalitis virus and Getah virus from specimen of mosquitoes in Inner Mongolia Autonomous Region

Cheng Rui^{1,2}, Nan Xiaowei³, Fan Na^{1,2}, Fu Shihong², Si Xiaoyan³, Zhang Lin⁴, He Ying², Lei Wenwen², Li Fan², Wang Huanyu², Lu Xiaoqing¹, Liang Guodong²

¹School of Public Health, Qingdao University, Qingdao 266071, China; ²Department of Viral Encephalitis, 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; ³Department of Vector Biological Prevention and Control, Inner Mongolia Autonomous Region Comprehensive Center for Disease Control and Prevention, Hohhot 010031, China; ⁴Bayannaoer Center for Disease Control and Prevention, Bayannaoer 015000, China

Corresponding authors: Lu Xiaoqing, Email: Luxq532@126.com; Liang Guodong, Email: gdliang@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the types and distribution of blood-sucking insects and arboviruses in Inner Mongolia autonomous region, and provide basic data for the prevention of arbovirus transmitted disease. **Methods** Blood-sucking insects were collected by lamp trapping method in nature. Mosquito samples were classified according to morphologic characteristics and then stored at liquid nitrogen. Viruses were isolated in cell culture and characterized, using molecular biological methods. **Results** A total of 24 240 mosquitoes and 17 110 aphids were collected from 2 sites of 5 counties (Flags) in Inner Mongolia in 2014 and during 2017–2018. Among them, Japanese encephalitis virus gene was detected in *Culex pipiens pallens*, and 4 virus strains isolates which could be stably passaged. The isolates were identified as Getah virus and densovirus by molecular biology identification. Phylogenetic analysis on the E2 gene of the Getah virus (NMDK1813-1) showed that it belonged to the same evolutionary branch of the Gansu isolates (GS10-2) and having six common amino acid variation sites. **Conclusions** The emergence of Japanese encephalitis virus

and Getah virus from specimen of mosquitoes in Inner Mongolia indicated the new challenges on the prevention and control of arbovirus and related diseases. The results of this study provided basic data for the prevention and control strategies of arbovirus transmitted diseases in Inner Mongolia.

【Key words】 Japanese encephalitis; Getah virus; Arbovirus

Fund program: The Special National Project on Research and Development of Key Biosafety Technologies (2016YFC1201904)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20190425-00284

虫媒病毒是指由吸血的节肢动物所携带,通过叮咬传播给脊椎动物的病毒,病毒可在后者体内扩增。虫媒病毒在吸血昆虫和宿主体内的传播和扩增也是虫媒病毒在自然界存在的原因^[1-2]。全世界已经发现 500 余种由吸血昆虫携带和传播的病毒,其传播媒介包括蚊虫、蜱虫和蠓虫等吸血昆虫^[3]。虫媒病毒不仅数量多而且分布广,已经发现 100 余种虫媒病毒可以感染人、畜动物并引发严重疾病^[4],如发热、皮疹、关节痛、出血热和脑炎等。全球范围内,蚊虫传播的乙型脑炎(乙脑)病毒每年造成 70.9 万人伤残寿命年的经济负担,每年有 14 300~27 200 例幸存的乙脑患者出现长期的神经心理后遗症^[5-6]。西尼罗病毒、乙脑病毒、寨卡病毒、盖塔病毒等均由蚊虫传播^[7-10]。

内蒙古自治区(内蒙古)为传统的牧业区和农业区^[11],更适宜蚊虫孳生并带来虫媒病毒传播的问题。为了解内蒙古牧业区和农业区自然界吸血昆虫及其携带的虫媒病毒的差异,本研究开展现场与实验室研究,在采集到的淡色库蚊标本中检测到乙脑病毒和盖塔病毒,这是首次在蒙古高原地区的蚊虫标本中检测到乙脑病毒及盖塔病毒,为后续在动物和人群中开展虫媒病毒感染状况的研究奠定了基础。

对象与方法

1. 标本采集:现场为内蒙古土默特右旗明沙淖地区、乌兰察布市四子王旗、包头市土默特右旗和萨拉齐、巴彦淖尔市磴口县和五原县 5 个县(旗),2014、2017、2018 年 7—8 月在人舍和动物饲养圈等蚊虫环境采集蚊虫和蠓虫标本。使用紫外诱蚊灯(武汉市吉星环保科技有限责任公司)于 18:00 到次日 07:00 在采集地点捕蚊。对采集的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 50~100 只 1 管)编号登记,立即放入液氮中保存并转移至实验室备用。

2. 细胞培养:金黄色地鼠肾细胞(BHK-21 细胞)、白纹伊蚊卵细胞(C6/36 细胞)为本实验室保存。BHK-21 细胞培养在 90% Eagle's、7% 胎牛血

清、1% 的青霉素和链霉素(100 U/ml)、1% 谷氨酰胺(30 g/L)、1% NaHCO₃; C6/36 细胞培养在 89% RPMI 1640、10% 胎牛血清、1% 的青霉素和链霉素(100 U/ml)。BHK-21、C6/36 细胞分别在 37 °C 和 28 °C 5%CO₂ 培养箱中培养^[12]。

3. 病毒分离:蚊虫 50~100 只/批,标本使用玻璃研磨器进行研磨。研磨后离心(13 000 r/min, 4 °C, 30 min),取研磨上清液 100 μl 分别接种到生长至 80% 的单层 BHK-21 和 C6/36 细胞培养板中(24 孔板, Corning incorporated), BHK-21 和 C6/36 细胞分别放入 37 °C, 5%CO₂ 和 28 °C 培养箱连续培养。每 12 h 在显微镜下观察细胞病变(CPE),所有标本均盲传 3 代。细胞出现 CPE 时收取^[12]。

4. 病毒 RNA 提取及 cDNA 制备:按德国 Qiagen 公司 RNA 提取试剂盒(Viral RNA mini Kit)说明书进行操作。将提取到的 RNA 立即放入 65 °C 水浴 10 min,然后冰浴 2 min,取 32 μl 的 RNA 放入第一链反应管(Viral RNA mini Kit)中室温静置 1 min,加入 1 μl 的 pd(N)6 后瞬时离心,37 °C 水浴 1 h,使用或放 -40 °C 保存^[13]。

5. 引物:鉴定病毒使用的特异性引物来自文献[13-16],结合扩增目的片段长度、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。

6. 病毒基因的 PCR 扩增:PCR 反应条件参照引物文献[13-16],取 5 μl 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳实验,将测序结果进行 Blast(NCBI)比对,鉴定病毒种类。

7. 序列分析:使用 Seqman 7.0.5.3 软件(DNAStar, Madison, WI)进行核苷酸序列拼接与质量分析;使用 BioEdit 7.0 软件进行核苷酸多序列比对;使用 MEGA6.0 软件完成基于 Neighbour-joining 方法的系统进化分析,Bootstrap 值设定为 1 000;使用 MegAlign 7.1.0 软件进行核苷酸和氨基酸序列的同源性分析^[13],使用 Gene DOC2.6 软件进行核苷酸和氨基酸差异分析^[16]。

结 果

1. 蚊虫采集情况:共采集到 2 属 3 种蚊虫(淡色

库蚊、背点伊蚊、刺扰伊蚊)24 240只,蠓虫17 110只。淡色库蚊和背点伊蚊最多,是当地的优势蚊种。见表1。

表1 内蒙古吸血昆虫采集结果

采集时间	地点	淡色库蚊	背点伊蚊	刺扰伊蚊	蠓虫
2014年	包头市	-	4 910	-	110
2017年	包头市	2 920	260	520	-
2018年	巴彦淖尔市	12 680 ^a	2 950	-	17 000
合计		15 600	8 120	520	17 110

注:^a标本中分离到1株盖塔病毒,3株浓核病毒,检测到1株乙脑病毒;-:未采集到蚊虫或蠓虫

2. 标本基因扩增及病毒分离:对3年采集的标本分223批进行研磨,其中2014年59批,2017年72批,2018年92批。223批蚊虫研磨液分别进行多种属和种特异性引物的病毒基因扩增及细胞感染实验,基因扩增结果显示有5个PCR阳性(包括NMDK1813-1在甲病毒属、盖塔病毒引物PCR获得目的条带;NMDK1811-2、NMDK1815-1、NMDK1825-2在浓核病毒种特异性引物上获得目的条带;标本NMWY1829-1在黄病毒属引物PCR获得目的条带250 bp,经序列比对为乙脑病毒)。接种BHK-21和C6/36细胞,获得4株病毒分离物(NMDK1813-1、NMDK1811-2、NMDK1815-1、NMDK1825-2)。1株病毒在BHK-21细胞表现为细胞圆缩、脱落(图1A),在C6/36细胞表现为聚团、脱落(图1B)。3株病毒接种C6/36细胞主要表现为细胞圆缩、脱落(图1C)。4株分离物均来自2018年采集的蚊虫。所有蠓虫标本和2014、2017年采集的蚊虫标本中未获得病毒分离物。见表2。对4株病毒分离物也进行了多种属和种特异性引物的病毒基因

扩增,结果与蚊虫研磨液的基因扩增结果相对应,序列测序拼接结果显示NMDK1813-1为盖塔病毒;3株病毒株NMDK1811-2、NMDK1815-1、NMDK1825-2为浓核病毒。

3. 病毒分子生物学特征:

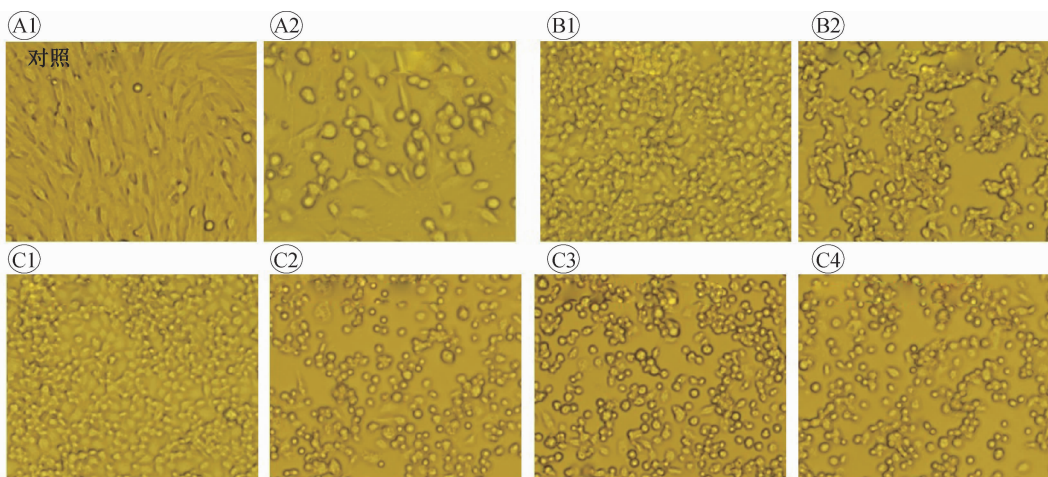
(1)乙脑病毒分子生物学分析:虽然未从NMWY1829-1标本获得乙脑病毒分离株,通过乙脑病毒16对引物对蚊虫研磨液标本进行PCR扩增^[13],获得部分基因片段,拼接获得乙脑病毒的Capsid、NS4b、NS5基因片段,经序列测定Capsid基因为381nt、127aa;NS4b基因为411nt、137aa;NS5基因为2 235nt、745aa。

将NMWY1829-1与35株不同国家、不同基因型的乙脑病毒构建Capsid、NS5系统进化树。2株进化树皆显示NMWY1829-1为基因I型乙脑病毒;Capsid基因的系统进化树显示与2008年中国台湾地区分离株TPC0806C和2012年四川分离株SCYA2012-86亲缘关系较近,NS5基因片段的系统进化分析均显示其与2008年山西分离株SXYC1523亲缘关系较近。见图2,3。

(2)盖塔病毒分子生物学分析:

①盖塔病毒E2、编码区全基因区段分子遗传进化分析:盖塔病毒NMDK1813-1 E2基因和编码区全基因核苷酸及编码氨基酸序列分别为1 266nt、422aa;11 166nt、3 720aa。

将NMDK1813-1病毒株与国内外分离到的38株盖塔病毒进行E2蛋白序列的系统进化分析,结果显示2018年内蒙古分离盖塔病毒与2006年以来甘肃从骚扰阿蚊(GS10-2)属于同一进化分支。见图4。



注:A1:BHK-21对照细胞;A2:NMDK1813-1病毒分离株接种于BHK-21细胞第3天细胞;B1:C6/36对照细胞;B2:NMDK1813-1病毒分离株接种于C6/36细胞第5天细胞;C1:C6/36对照细胞;C2:NMDK1811-2;C3和C4:NMDK1815-1、NMDK1825-2病毒分离株接种于C6/36细胞第3天细胞

图1 内蒙古4株病毒阳性分离物在BHK-21和C6/36细胞的细胞病变作用(×200)

表2 内蒙古自治区蚊虫筛查虫媒病毒阳性结果背景信息

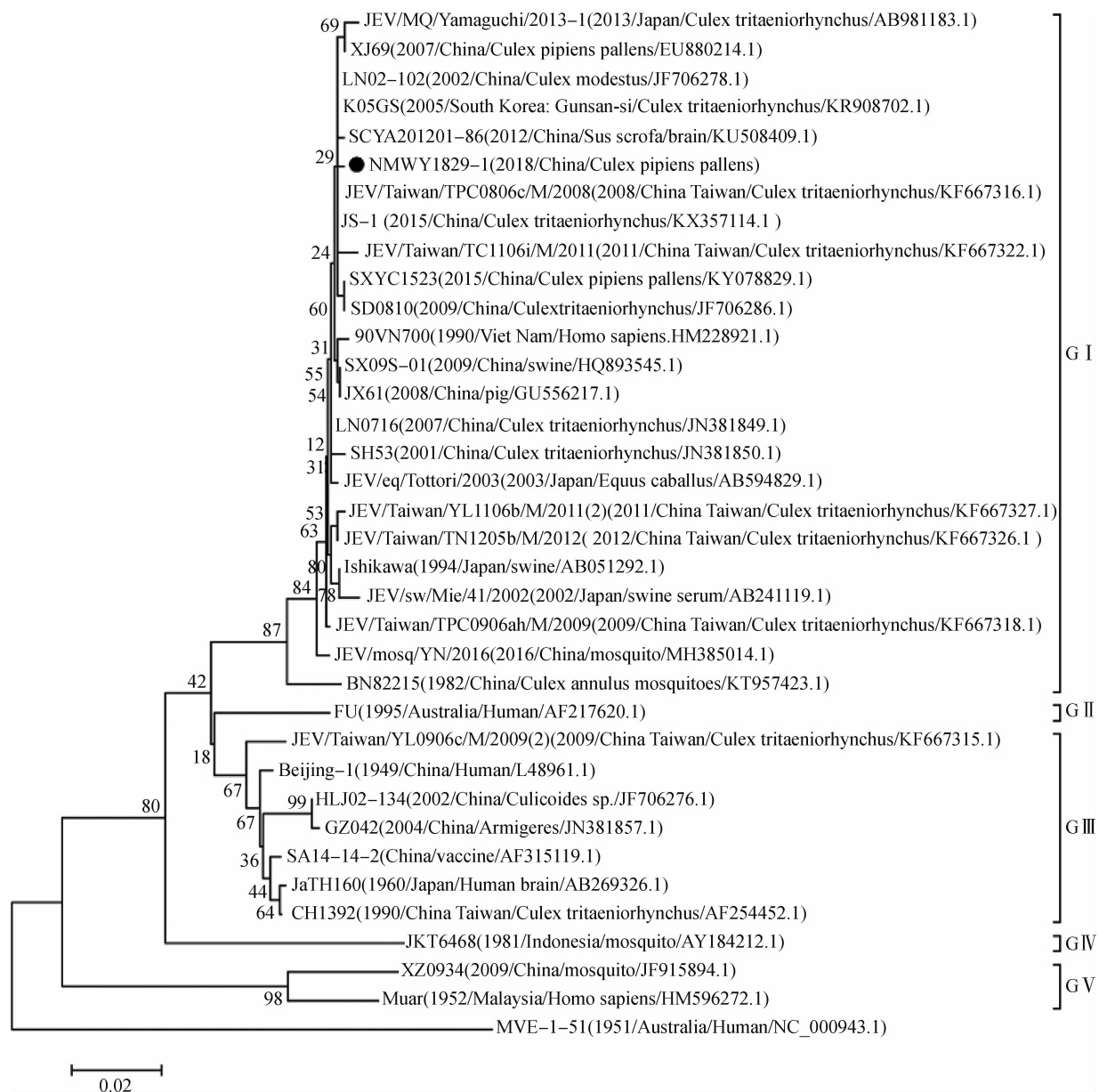
编号	采集时间	媒介	孳生地	PCR 阳性
NMDK1813-1	2018年7月31日	淡色库蚊	奶牛圈	盖塔病毒
NMDK1811-2	2018年7月31日	淡色库蚊	奶牛圈	浓核病毒
NMDK1815-1	2018年7月31日	淡色库蚊	奶牛圈	浓核病毒
NMDK1825-2	2018年7月31日	淡色库蚊	猪圈	浓核病毒
NMWY1829-1	2018年7月31日	淡色库蚊	猪圈	乙型脑炎病毒

将 NMDK1813-1 病毒株与国内外分离到的 29 株盖塔病毒进行编码区蛋白序列的系统进化分析,结果显示病毒株 NMDK1813-1 与 2015 年中国河南省从猪体内分离的 HNJZ-S2、2012 年日本从三带喙库蚊分离的 12IH26 以及 2014—2016 年从驴体内分离的 14-I-605-C1、15-I-752、16-I-676、16-I-599

株亲缘关系较近。见图 5。

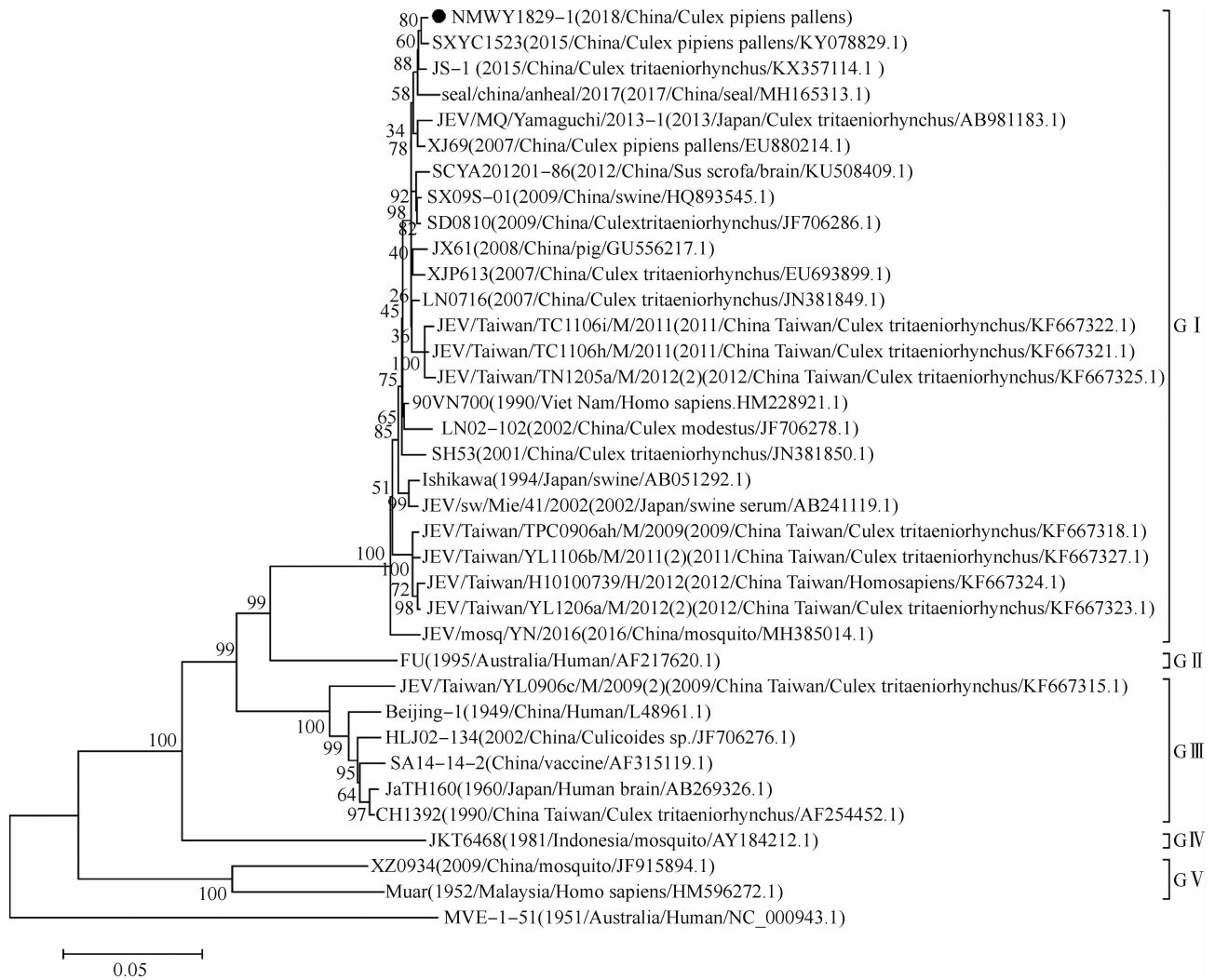
②盖塔病毒 E2 基因区段核苷酸及氨基酸序列的同源性比较:盖塔病毒 E2 基因核苷酸与氨基酸序列同源性分析显示:NMDK1813-1 病毒株与马来西亚原始分离株 MM2021 的核苷酸(氨基酸)序列的同源性 94.4%(97.9%);NMDK1813-1 病毒株与中国甘肃省分离盖塔病毒 GS10-2 株的核苷酸(氨基酸)序列同源性最高,为 99.1%(100%);与蒙古国分离株 (LEIV1774IMPR)的核苷酸(氨基酸)序列的同源性为 98.6%(99.8%)。

③盖塔病毒的 E2 基因区段氨基酸差异位点分析:本研究分析了 1955—2018 年世界各地从不同宿



注:●为内蒙古新分离到的乙脑病毒株;样本编号为采集时间/地点/分离媒介/GenBank 号

图2 乙脑病毒新分离株 Caspid 基因的系统进化分析



注：●为内蒙古新分离到的乙脑病毒株；样本编号为采集时间/地点/分离媒介/GenBank 号

图3 乙脑病毒新分离株NS5基因的系统进化分析

主分离的盖塔病毒 E2 基因氨基酸位点。研究发现，与 1955 年马来西亚原型病毒株 (MM2021) 相比，NMDK1813-1 存在 6 个氨基酸差异位点，分别位于 E27、E90、E102、E122、E213、E314；其他盖塔病毒分离株与原始株相比，除了均有以上 6 个共同氨基酸差异位点外，还在 E323 位点 (甘肃分离株 GS10-2 除外) 有共同差异。见表 3。

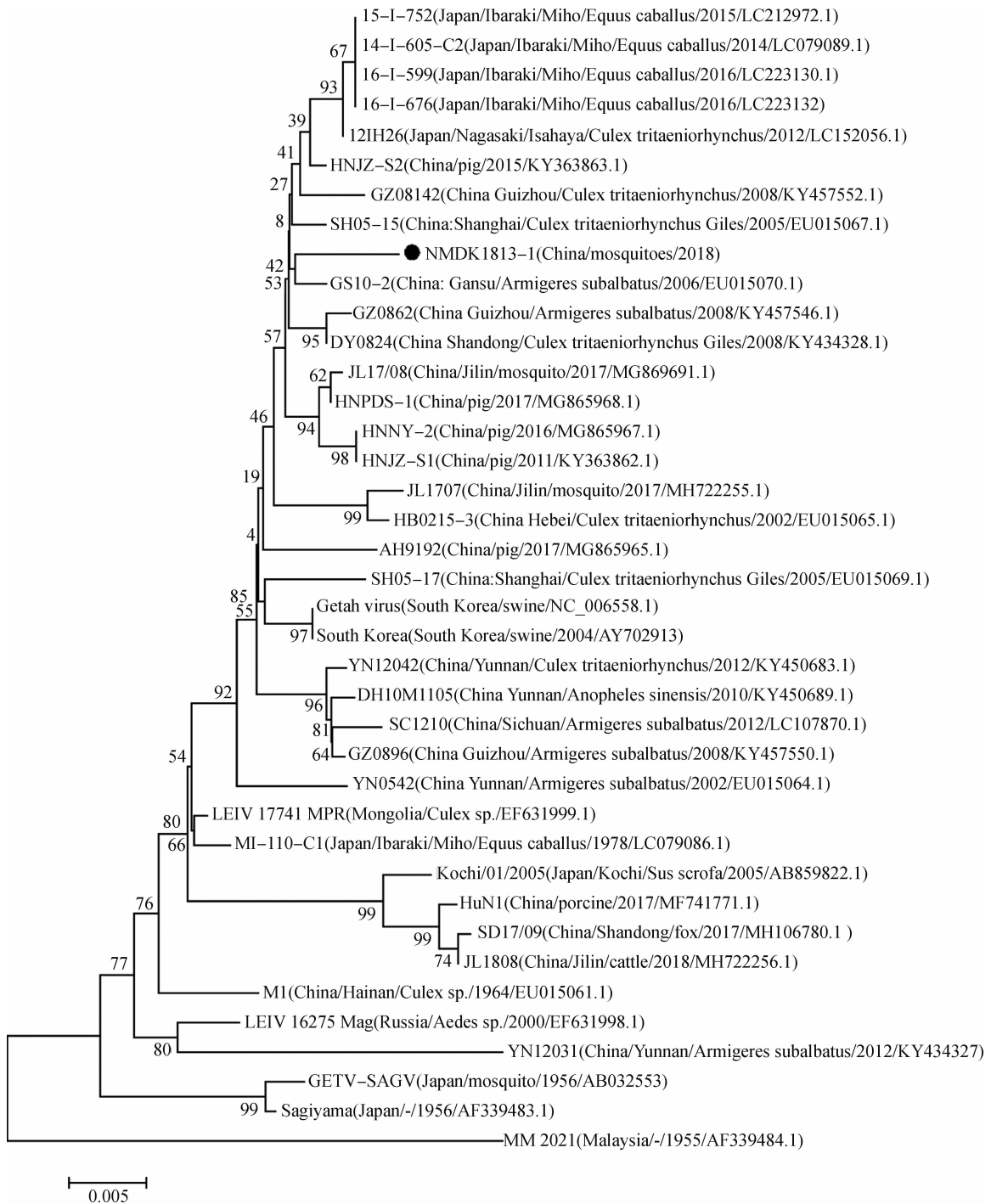
④浓核病毒 NS1 基因片段的分子遗传进化分析：编号 NMDK1811-2、NMDK1815-1、NMDK1825-2 检测到浓核病毒 NS1 基因扩增阳性，经序列测定均为浓核病毒。将 NMDK1811-2、NMDK1815-1、NMDK1825-2 与 17 株不同年代、不同分离国家、宿主、基因型 [包括浓核病毒属 (Densovirus)、短劲浓核病毒属 (Brevidensovirus)、环星黑烟浓核病毒属 (Pefudensovirus) 和重复病毒属 (Iteravirus) 病毒在内] 的病毒 NS1 核苷酸序列的分子遗传进化分析结

果显示，3 株病毒株为短浓核病毒属病毒成员。见图 6。

讨 论

本研究采集到的蚊虫包括库蚊和伊蚊，经鉴定蚊虫以背点伊蚊和淡色库蚊为主，蚊虫采集情况和田兆丰^[17]、Cao 等^[18]的调查结果基本吻合，以往对内蒙古三带喙库蚊的生态习性调查表明^[19-20]，三带喙库蚊在内蒙古主要分布在呼和浩特市、包头市和巴彦淖尔市磴口县等地，且三带喙库蚊的消长高峰在 8 月中下旬。本研究未采集到三带喙库蚊，这可能与采集时间有关，采集蚊虫标本的时间多集中在 7 月下旬和 8 月上旬，不是三带喙库蚊出现的高峰时期，而且三带喙库蚊一般孳生在稻田、秧田^[19]，本次调查选址多为农场、牧场，不适宜三带喙库蚊的孳生。

2007—2008 年内蒙古在蚊虫中分离到版纳病



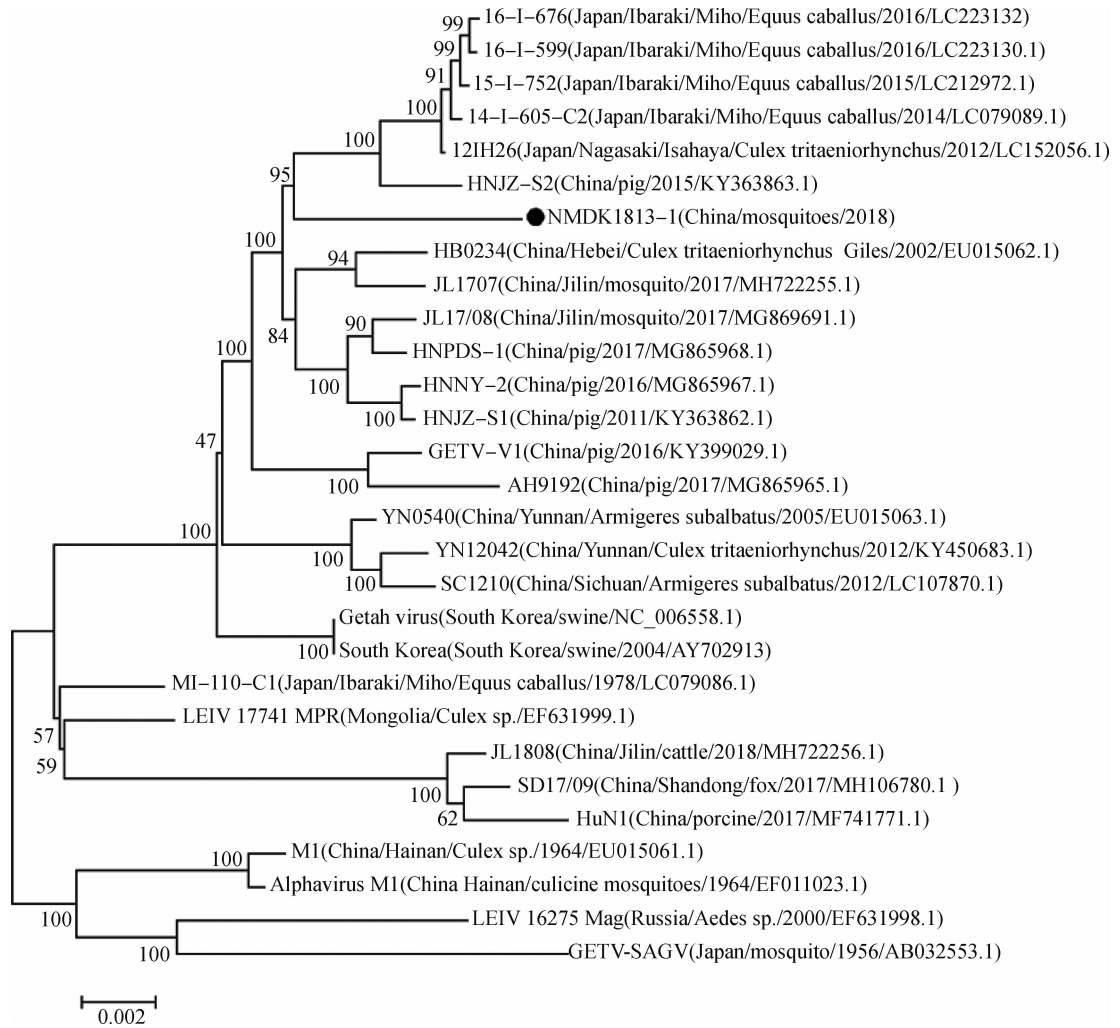
注: ●为内蒙古新分离到的盖塔病毒株; 样本编号为采集地点/时间/分离媒介/GenBank号

图4 盖塔病毒新分离株E2基因的系统进化分析

毒、浓核病毒以及 Tahyna 病毒^[18]。蒙古国曾在马血清中检测到乙脑抗体阳性^[21], 2013—2014年在和中国巴彦淖尔毗邻的蒙古国南戈壁省的蜱虫中检测到克里米亚-刚果热病毒(CCHFV)核酸阳性, 且ELISA检测到人血清CCHFV抗体阳性^[22], 在羊、骆驼等动物体内也都检测到CCHFV抗体阳性^[23-24]; 在采集的蜱虫中分离到蜱传脑炎病毒^[25], 可见内蒙古及其周边地区的虫媒病毒情况严峻; 本研究在内蒙古

采集的蚊虫中分离到1株盖塔病毒、3株浓核病毒、并检测到乙脑病毒基因阳性, 之前未见内蒙古有分离到盖塔病毒的报道, 这30年以来也未见在内蒙古蚊虫标本中检测到乙脑病毒序列的报道。分离到的3株浓核病毒与2008年在内蒙古分离到的浓核病毒同属于短浓核病毒属病毒成员, 均是在巴彦淖尔市分离得到^[18]。

乙脑在我国除新疆维吾尔自治区、西藏自治区、



注：●为内蒙古新分离到的盖塔病毒株；样本编号为采集地点/时间/分离媒介/GenBank 号

图5 盖塔病毒新分离株基因的编码区进化分析

表3 马来西亚原型病毒株MM2021和其他盖塔病毒毒株间 E2 基因氨基酸的比较

毒株	氨基酸差异位点						
	S27F	T90V	A102V	I122T	R213S	A314V	E323D
MM2021	S	T	A	I	R	A	E
其他盖塔病毒	F	V	V	T	S	V	D
GS10-2	F	V	V	T	S	V	E
NMDK1813-1	F	V	V	T	S	V	E

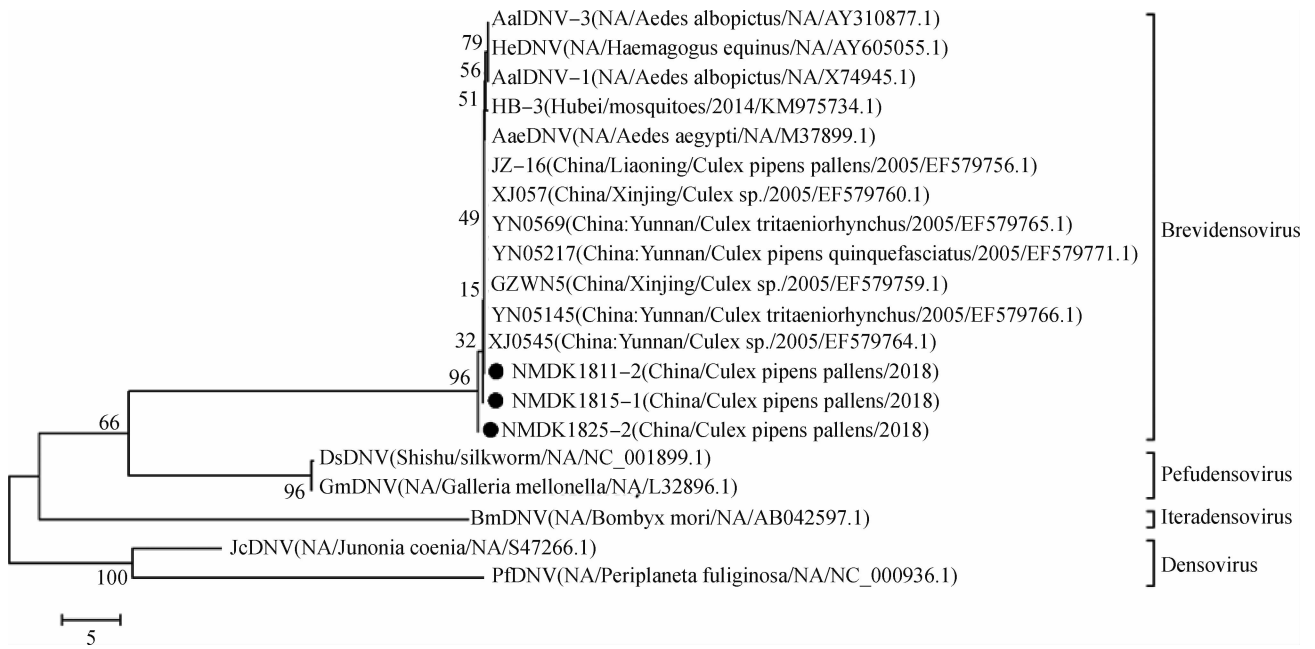
注：S:丝氨酸；F:苯丙氨酸；T:苏氨酸；V:缬氨酸；A:丙氨酸；I:异亮氨酸；R:精氨酸；E:谷氨酸；D:天冬氨酸

青海省外均有流行^[26]，但内蒙古自治区此前未在蚊虫中分离检测到乙脑病毒，此次在五原县淡色库蚊标本中获得了2段乙脑病毒基因序列，标本采集地为猪圈，而猪圈和人房毗邻，已有研究显示在人类居所附近有猪圈是导致成年乙脑流行的一个潜在危险因素^[26-27]。

盖塔病毒属于甲病毒属披膜病毒科的成员^[28]，于1955年首次在马来西亚捕获的库蚊标本分离到，其原型病毒株为MM2021^[29]。目前盖塔病毒已经在

澳大利亚、马来西亚、日本、中国、蒙古国和俄罗斯等约10个国家或地区被分离或发现，来源于刺扰伊蚊、三带喙库蚊、马、猪等媒介和宿主^[10,30-32]。

盖塔病毒通过蚊虫叮咬而传播，可引起马匹发热，引起猪致死性疾病和生殖障碍^[33]等，是重要动物源性病原体。在亚洲如日本、印度曾多次出现盖塔病毒感染引发的马匹疾病流行^[34-35]。2017年中国湖南省某养殖场发生盖塔病毒猪感染疫情，百余头猪及幼仔死亡^[36]，提示我国已经存在盖塔病毒在动物中的流行。NMDK1813-1与甘肃分离株(GS10-2)亲缘关系最近，在E2基因的氨基酸同源性高，差异较小，而且遗传进化分析显示，它与中国河北省、吉林省等北方地区以及蒙古国分离的盖塔病毒不在同一分支，而与2006年我国甘肃省分离的GS10-2在同一分支，提示此次分离到的盖塔病毒株可能由中国甘肃省传来。近些年来内蒙古周边国家(俄罗斯、蒙古国)、中国甘肃、吉林、河北省等均分离到盖塔病



注：●为内蒙古新分离到的浓核病毒株；样本编号为采集地点/时间/分离媒介/GenBank号

图6 浓核病毒新分离株NS1基因的系统进化分析

毒,内蒙古此前调查中未见分离到盖塔病毒,内蒙古作为我国畜牧业大省,此次分离到盖塔病毒,提示盖塔病毒在我国分布范围进一步扩大,是在北方地区又分离到的一株盖塔病毒,对内蒙古及周边地区的虫媒病毒的防治意义重大。新近研究表明^[16],除原始毒株以外的盖塔病毒分离株在E2基因上均存在7个共同的氨基酸突变位点(GS10-2除外),这些变异很可能是盖塔病毒从热带地区逐渐向北传播的分子基础。而本研究分离的盖塔病毒NMDK1813-1与原型病毒株MM2021则在E2基因上仅有6个共同的氨基酸突变位点,这与2006年在甘肃地区分离的病毒(GS10-2)的氨基酸突变位点一致,与其他盖塔病毒株E2基因上共同氨基酸突变位点相比少了E2基因氨基酸第323位,即此位点氨基酸和原始分离株一致。将来,需要更多的病毒基因数据进一步研究盖塔病毒的传播进化和致病性。

综上所述,本研究发现的乙脑病毒和盖塔病毒均是在内蒙古地区蚊虫标本中新近发现的病毒,这为内蒙古的虫媒病毒及其传播疾病的预防及控制提供了基础数据,对内蒙古的虫媒病毒及其病毒病预防及控制提出了新的挑战。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Calisher HC. Medically important arboviruses of the United States and Canada[J]. Clin Microbiol Rev, 1994, 7(1): 89-116. DOI:10.1128/CMR.7.1.89-116.1994.

[2] Bowling E, OD, MS, et al. Editorial: One health, one team [Z]. 2014.

[3] 王环宇,梁国栋. 我国虫媒病毒研究10年回顾[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 473-476. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-0580.2003.04.058.

Wang HY, Liang GD. A 10-year review of arbovirus research in China [J]. Chin J Publ Heal, 2003, 19(4): 473-476. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-0580.2003.04.058.

[4] 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.

[5] Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD, et al. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2007, 1(2): e114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000114.

[6] Campbell GL, Hills SL, Fischer M, et al. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review [J]. Bull World Health Organ, 2011, 89: 766-774. DOI: 10.2471/blt.10.085233.

[7] Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, et al. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000 [J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(4): 679-685. DOI: 10.3201/eid0704.010415.

[8] Toma T, Higa Y, Miyagi I. Distributions and breeding habitats of the Japanese encephalitis virus mosquito vector, *Culex vishnui*, and other *Culex Vishnui* Subgroup species in the Ryukyu Archipelago, Japan [J]. Med Entomol Z, 2015, 66(3): 127-133. DOI: 10.7601/mez.66.127.

[9] CDC Zika Response. Vital signs: preparing for local mosquito-borne transmission of Zika Virus-United States, 2016 [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2016, 65(13): 352. DOI: 10.15585/mmwr.mm6513e1.

- [10] Bannai H, Ochi A, Nemoto M, et al. A 2015 outbreak of Getah virus infection occurring among Japanese racehorses sequentially to an outbreak in 2014 at the same site[J]. BMC Vet Res, 2016, 12:98. DOI:10.1186/s12917-016-0741-5.
- [11] 宁夏新闻网. 内蒙古自治区概况介绍[EB/OL]. (2008-08-29) [2019-04-01]. <https://wenku.baidu.com/view/9e66dc42e45c3b3567ec8b14.html>.
Ningxia News Network. Brief introduction of Inner Mongolia Autonomous Region [EB/OL]. (2008-08-29) [2019-04-01]. <https://wenku.baidu.com/view/9e66dc42e45c3b3567ec8b14.html>.
- [12] Feng Y, Li YY, Fu SH, et al. Isolation of Kaeng Khoi virus (KKV) from *Eucampsipoda sundaica* bat flies in China[J]. Virus Res, 2017, 238:94-100. DOI:10.1016/j.virusres.2017.06.007.
- [13] Fu SH, Song S, Liu H, et al. ZIKA virus isolated from mosquitoes: a field and laboratory investigation in China, 2016 [J]. Sci China Life Sci, 2017, 60 (12) : 1364-1371. DOI: 10.1007/s11427-017-9196-8.
- [14] Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, et al. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the Alphavirus genus[J]. J Virol Methods, 2001, 95(1/2):153-161. DOI:10.1016/S0166-0934(01)00306-8.
- [15] 潘晓玲, 梁国栋. 乙脑病毒基因 I、III 型特异性全基因组引物 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(4):254-256. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2009.04.006.
Pan XL, Liang GD. The genotype-specific primers for amplifying and sequencing the genotype I & III Japanese encephalitis virus [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2009, 23(4):254-256. DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2009.04.006.
- [16] Li YY, Liu H, Fu SH, et al. From discovery to spread: The evolution and phylogeny of Getah virus [J]. Infect Genet Evol, 2017, 55:48-55. DOI:10.1016/j.meegid.2017.08.016.
- [17] 田兆丰. 内蒙古地区蚊科地理分布的调查研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2009, 15(4):306-308.
Tian ZF. Study on the culicidae geographic distribution of Inner Mongolia[J]. Chin J Hyg Insect Equip, 2009, 15(4):306-308.
- [18] Cao Y, Fu S, Tian Z, et al. Distribution of mosquitoes and mosquito-borne arboviruses in Inner Mongolia, China[J]. Vector Borne Zoonot Dis, 2011, 11 (12) : 1577-1581. DOI: 10.1089/vbz.2010.0262.
- [19] 韩志学, 田兆丰. 内蒙古地区三带喙库蚊生态习性的调查[J]. 内蒙古卫生防疫, 1985(1):22.
Han ZX, Tian ZF. Investigations on the ecological habits of *Culex pipiens pallens* in Inner Mongolia[J]. IM Health Epidemic Prevent, 1985(1):22.
- [20] 李军, 刘井泉, 李永山, 等. 科左后旗三带喙库蚊季节消长与自然带毒调查[J]. 内蒙古卫生防疫, 1986, 2(1):51-53.
Li J, Liu JQ, Li YS, et al. Investigation on the seasonal fluctuation and natural poisoning of *Culex pipiens pallens* in the Kezuohouqi Banner [J]. IM Health Epidemic Prevent, 1986, 2 (1):51-53.
- [21] Pagamjav O, Kobayashi K, Murakami H, et al. Serological survey of equine viral diseases in Mongolia [J]. Microbiol Immun, 2011, 55(4):289-292. DOI:10.1111/j.1348-0421.2011.00312.x.
- [22] Whitehouse CA. Crimean-congo hemorrhagic fever[J]. Antiviral Res, 2004, 64(3):145-160. DOI:10.1016/j.antiviral.2004.08.001.
- [23] Chumikhin S, Potshild E, Nyamadava P, et al. Serological and virological tests used for the detection of arboviruses in wild mammals and birds of Mongolia [Z]. Med Parazitol (Mosk) , 1987:10-2.
- [24] Morikawa S. Serological surveillance of Crimean-Congo haemorrhagic fever infection among sheep in Mongolia [Z]. Tokyo:National Institute of Infectious Diseases, 2013.
- [25] Muto M, Bazartsuren B, Tsevel B, et al. Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes persulcatus* in Mongolia in 2012[J]. Ticks Tick Borne Dis, 2015, 6(5):623-629. DOI:10.1016/j.ttbdis.2015.05.006.
- [26] Zheng YY, Li MH, Wang HY, et al. Japanese encephalitis and Japanese encephalitis virus in mainland China [J]. Rev Med Virol, 2012, 22(5):301-322. DOI:10.1002/rmv.1710.
- [27] Ren XJ, Fu SH, Dai PF, et al. Pigsties near dwellings as a potential risk factor for the prevalence of Japanese encephalitis virus in adult in Shanxi, China[J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6(1):100. DOI:10.1186/s40249-017-0312-4.
- [28] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus taxonomy, taxonomy releases year 2018b [EB/OL]. (2018-07-30) [2019-04-01]. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases.
- [29] Berge TO. Getah [M]//International catalog of arboviruses. 2nd ed. Washington, DC: US Department of Health, Education, and Welfare, 1975:278-279.
- [30] Shibata I, Hatano Y, Nishimura M, et al. Isolation of Getah virus from dead fetuses extracted from a naturally infected sow in Japan [J]. Vet Microbiol, 1991, 27(3/4):385-391. DOI:10.1016/0378-1135(91)90162-9.
- [31] Doherty RL, Carley JG, Mackerras MJ, et al. Studies of arthropod-borne virus infections in Queensland. III. Isolation and characterization of virus strains from wild-caught mosquitoes in North Queensland [J]. Aust J Exp Biol Med Sci, 1963, 41 (1) : 17-39. DOI:10.1038/icb.1963.2.
- [32] Li XD, Qiu FX, Yang H, et al. Isolation of Getah virus from mosquitos collected on Hainan Island, China, and results of a serosurvey[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1992, 23(4):730-734.
- [33] L'vov SD, Gromashevski' i VL, Aristova VA, et al. Isolation of Getah virus (Togaviridae, Alfavirus) strains in North-Eastern Asia [J]. Vopr Virusol, 2000, 45(5):14-18 (in Russian).
- [34] Kamada M, Ando Y, Fukunaga Y, et al. Equine getah virus infection: isolation of the virus from racehorses during an enzootic in Japan [J]. Am J Trop Med Hyg, 1980, 29(5):984-988. DOI:10.4269/ajtmh.1980.29.984.
- [35] Broen CM, Timoney PJ. Getah virus infection of Indian horses [J]. Trop Anim Health Prod, 1998, 30 (4) : 241-252. DOI: 10.1023/a:1005079229232.
- [36] Yang T, Li R, Hu Y, et al. An outbreak of Getah virus infection among pigs in China, 2017 [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65 (3):632-637. DOI:10.1111/tbed.12867.

(收稿日期:2019-04-25)

(本文编辑:斗智)