

## · 实验室研究 ·

# 海南省2017—2018年虫媒病毒的分离与鉴定

范娜<sup>1,2</sup> 孙定炜<sup>3</sup> 程睿<sup>1,2</sup> 付士红<sup>2</sup> 曾林海<sup>3</sup> 吴群<sup>3</sup> 李善干<sup>3</sup> 何英<sup>2</sup> 雷雯雯<sup>2</sup>  
李樊<sup>2</sup> 王环宇<sup>2</sup> 鲁晓晴<sup>1</sup> 梁国栋<sup>2</sup>

<sup>1</sup>青岛大学医学院公共卫生学院职业卫生与环境卫生教研室 266071; <sup>2</sup>中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒性脑炎室,北京 102206; <sup>3</sup>海南省疾病预防控制中心寄生虫病防治科,海口 570203

范娜和孙定炜对本文有同等贡献

通信作者:鲁晓晴, Email:Luxq532@126.com; 梁国栋, Email:gqliang@hotmail.com

**【摘要】目的** 了解海南省虫媒病毒种类及分布变化。**方法** 于2017—2018年在海南省野外采集吸血昆虫标本,所有吸血昆虫标本实验室处理后用BHK-21细胞和C6/36细胞进行病毒分离,同时使用RT-PCR平行检测吸血昆虫标本中虫媒病毒基因。**结果** 共采集到4属(库蚊、阿蚊、伊蚊、按蚊)15 062只蚊虫和11 360只蠓虫。采集的蚊虫中三带喙库蚊居多,占蚊虫采集总数92.88%(13 990/15 062)。经组织培养细胞共获得4株病毒分离物,其中3株乙型脑炎(乙脑)病毒、1株盖塔病毒,在5批三带喙库蚊标本中检测到乙脑病毒基因阳性。遗传进化分析结果显示这3株乙脑病毒和5批PCR筛选阳性的标本均属于基因I型乙脑病毒。当地乙脑病毒的最低感染率为0.57‰(8/13 990)。在5批蠓虫标本中检测阿卡班病毒基因阳性,当地阿卡班病毒的最低感染率为0.44‰(5/11 360)。基于病毒S基因和M基因序列的系统进化分析显示这5株阿卡班病毒处于单独进化分支形成独特的地理分布特征。**结论** 继1980年代以来,从海南省的蚊虫标本中再次分离到乙脑病毒和盖塔病毒、蠓虫标本中检测到阿卡班病毒。应加强乙脑病毒、盖塔病毒和阿卡班病毒对人畜动物感染状况及疾病负担的监测,以减少对当地公共卫生健康的危害。

**【关键词】** 虫媒病毒;乙型脑炎病毒;盖塔病毒;阿卡班病毒

**基金项目:**生物安全关键技术研发重点专项(2016YFC1201904)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.018

## Isolation and identification of Arbovirus in Hainan province, 2017–2018

Fan Na<sup>1,2</sup>, Sun Dingwei<sup>3</sup>, Cheng Rui<sup>1,2</sup>, Fu Shihong<sup>2</sup>, Zeng Linhai<sup>3</sup>, Wu Qun<sup>3</sup>, Li Shan'gan<sup>3</sup>, He Ying<sup>2</sup>, Lei Wenwen<sup>2</sup>, Li Fan<sup>2</sup>, Wang Huanyu<sup>2</sup>, Lu Xiaoqing<sup>1</sup>, Liang Guodong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Occupational Health and Environmental Health, School of Public Health, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China; <sup>2</sup>Department of Viral Encephalitis, Institute of Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; <sup>3</sup>Department of Parasitic Diseases, Hainan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Haikou 570203, China

Fan Na and Sun Dingwei contributed equally to the article

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

**【Abstract】Objective** To understand the types and distribution of Arboviruses in Hainan province. **Methods** Blood-sucking insects were collected in Hainan province from 2017 to 2018. After laboratory treatment, BHK-21 cells and C6/36 cells were inoculated with grinding supernatant of all blood-sucking insects to isolate all of involving virus. Arbovirus genes in blood-sucking insects were detected in parallel by RT-PCR method. **Results** A total of 15 062 mosquitoes were classified into four genera (*Culex*, *Armigeres*, *Aedes*, *Anopheles*) and 11 360 midges were collected. *Culex tritaeniorhynchus* was in the majority and accounted for 92.88% (13 990/15 062) of all the mosquitoes collected. Four strains of virus isolates were notified by tissue culture method. Three strains of viruses belonged to Japanese encephalitis virus (JEV), with the other one as Getah virus (GETV). Five pools of JEV gene amplification were positive, from *Culex tritaeniorhynchus*. Results from the phylogenetic analysis showed that they belonged to genotype JEV-I. The minimum infection rate

of JEV was 0.57% (8/13 990). A total of 5 pools of Akabane virus (AKV) gene amplification were positive. The minimum infection rate of AKV was 0.44% (5/11 360). Based on the S gene and M gene sequences of the virus, data from the phylogenetic analysis showed that the five AKV strains carried by midges in Hainan province were in a separate evolutionary branch and formed unique geographical distribution. **Conclusions** JEV and GETV had been isolated again from the mosquito specimens in this survey, since the 1980s. AKV was detected from the midge specimens in Hainan province. These results showed the needs of strengthening the programs on detection and monitor of JEV, GETV and AKV that were related to animal and human diseases in order to reduce the risks of related diseases in this area.

**【Key words】** Arbovirus; Japanese encephalitis virus; Getah virus; Akabane virus

**Fund program:** Key Projects of Research and Development for Biosafety Key Technology (2016YFC1201904)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.018

海南省地理环境独特,利于虫媒病毒的存在与传播。有研究显示,1980—1993年海南省存在多种虫媒病毒<sup>[1]</sup>,包括乙型脑炎(乙脑)病毒<sup>[2]</sup>、登革病毒<sup>[3]</sup>、盖塔病毒<sup>[4]</sup>、基孔肯雅病毒<sup>[5]</sup>、罗斯河病毒<sup>[6]</sup>、马雅罗病毒<sup>[7]</sup>和呼肠孤病毒科病毒<sup>[8]</sup>等。不仅如此,1980年代在海南省发生过多次乙脑和登革热的流行,并引起相关疾病的流行<sup>[9-10]</sup>。本研究于2017—2018年在海南省曾经做过相关研究的地区进行虫媒病毒分离鉴定,为海南省的虫媒病毒防控工作提供参考依据。

## 材料与方法

1. 标本采集:2017和2018年的8月在海南省6个县市(儋州市、澄迈县、文昌市、东方市、昌江县和乐东县),使用紫外诱蚊灯诱捕和采集吸血昆虫标本。采集标本置于-40℃冰箱冷冻30 min,再将标本置于冰板上进行形态学分类,剔除雄蚊,雌蚊经分类鉴定后分装于冻存管放液氮罐保存,并送至实验室备检<sup>[11]</sup>。

2. 病毒分离鉴定:取出冻存管,将吸血昆虫标本迅速倒入无菌玻璃研磨器中,每管加入1.5 ml无血清Eagle's液(含1%双抗、1%谷氨酰胺)进行研磨,至呈匀浆状态后倒入提前标记好的EP管中,经4℃,13 200 r/min离心30 min后将上清液分别接种BHK-21细胞和C6/36细胞,每隔12 h观察细胞病变,达到75%时收获病毒,并继续传代,连续出现细胞病变则作为病毒分离物进行后续鉴定。无病变者在相同细胞系盲传3代,仍无病变者丢弃<sup>[11]</sup>。

3. 核酸提取和cDNA的制备:用QIAamp Viral RNA Extract试剂盒(德国QIAGEN公司),按照试剂盒说明书提取病毒RNA;随后使用Ready-to-Go™ You-Prime First-Strand Beads Kit试剂盒(英国GE Healthcare公司)将其反转录为cDNA<sup>[11]</sup>。

4. 病毒基因扩增(PCR):使用属特异性引物(黄

病毒属、甲病毒属、布尼亚病毒属引物)和种特异性扩增引物(乙脑病毒、版纳病毒、辽宁病毒、西藏环状病毒、辛德毕斯病毒、OYA病毒、盖塔病毒<sup>[12-14]</sup>)做PCR鉴定。乙脑病毒和盖塔病毒的全基因组序列扩增引物参照文献[15-16],阿卡班病毒S、M基因序列使用Primer premier 5软件设计引物进行扩增。PCR扩增条件为94℃预变性5 min,退火条件为94℃30 s、49℃~55℃之间30 s、72℃60 s共35个循环,最后72℃延伸10 min即可。PCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳检测,实验结果阳性者测序。

5. 序列分析:使用Seqman 7.0软件(DNAStar, Madison, WI)进行核苷酸序列拼接与质量分析。使用BioEdit 7.0软件进行多序列比对;使用Mega 6.0软件完成基于Neighbour-joining(NJ)方法的系统进化分析,Bootstrap值设定为1 000;使用MegAlign 7.0和GeneDOC 2.7.0软件进行核苷酸和氨基酸序列的差异比对和同源性分析<sup>[14]</sup>。

## 结 果

1. 吸血昆虫标本采集:共采集到4属7种的15 062只蚊虫和11 360只蠓虫。蚊虫包括三带喙库蚊13 990只,占蚊虫采集总数的92.88%(13 990/15 062),骚扰阿蚊780只,杂蚊255只(表1)。

2. 病毒分离:共获得4株病毒分离物,均分离自三带喙库蚊(表2)。HNDZ1723-2、HNDZ1751-2、HNDZ1833毒株病毒分离物在BHK-21细胞可以连续传代,出现稳定细胞病变,培养至48 h细胞开始出现圆缩、脱落,72 h细胞大量圆缩、脱落,病变程度可以达到++。HNDZ1712-1株接种至BHK-21细胞上,连续观察32 h,病变程度可以达到++,可观察到细胞圆缩脱落,偶见细胞融合现象,底部几乎无正常细胞(图1)。

3. 病毒基因检测:对所有蚊虫研磨上清液进行PCR筛选,结果除乙脑病毒、盖塔病毒、OYA病毒

表1 2017—2018年海南省吸血昆虫标本的采集

采集时间(年)	采集地点	三带喙库蚊	骚扰阿蚊	中华按蚊	杂蚊	蠓	合计
2017	儋州市	3 048	298	3	20	4 450	7 819
	澄迈县	5 914	124	0	0	1 100	7 138
	文昌市	2 682	122	0	25	760	3 589
2018	昌江县	281	21	0	26	1 400	1 728
	东方市	642	9	0	131	0	782
	乐东县	645	10	23	48	350	1 076
	儋州市	778	196	11	5	3 300	4 290
合计		13 990(92.88)	780(5.18)	37(0.25)	255(1.69)	11 360	26 422

注:括号外数据为只数,括号内数据为构成比(%)

表2 海南省PCR筛选阳性批次的详细背景信息

序号	毒株名	采集时间	采集地区	采集环境	蚊种	研磨只数	得到病毒分离株	PCR阳性结果
1	HNDZ1712-1	2017年8月18日	儋州市	羊圈	三带喙库蚊	150	是	盖塔病毒
2	HNDZ1723-2	2017年8月19日	儋州市	猪圈	三带喙库蚊	110	是	乙脑病毒
3	HNDZ1751-2	2017年8月19日	儋州市	猪圈	三带喙库蚊	100	是	乙脑病毒
4	HNDZ1833	2018年8月16日	儋州市	猪圈	三带喙库蚊	74	是	乙脑病毒
5	HNDZ1709	2017年8月18日	儋州市	猪圈	三带喙库蚊	152	否	乙脑病毒
6	HNDZ1712-2	2017年8月18日	儋州市	羊圈	三带喙库蚊	150	否	乙脑病毒
7	HNDZ1724	2017年8月19日	儋州市	猪圈	三带喙库蚊	120	否	乙脑病毒
8	HNDZ1731	2017年8月18日	儋州市	猪圈	三带喙库蚊	100	否	乙脑病毒
9	HNDZ1733-1	2017年8月18日	儋州市	猪圈	三带喙库蚊	110	否	乙脑病毒
10	HNDZ1717-1	2017年8月19日	儋州市	猪圈	蠓	250	否	阿卡斑病毒
11	HNDZ1717-2	2017年8月19日	儋州市	猪圈	蠓	250	否	阿卡斑病毒
12	HNDZ1718-1	2017年8月19日	儋州市	猪圈	蠓	250	否	阿卡斑病毒
13	HNCM1741-2	2017年8月20日	澄迈县	猪圈	蠓	250	否	阿卡斑病毒
14	HNDZ1831-1	2018年8月16日	儋州市	猪圈	蠓	600	否	阿卡斑病毒

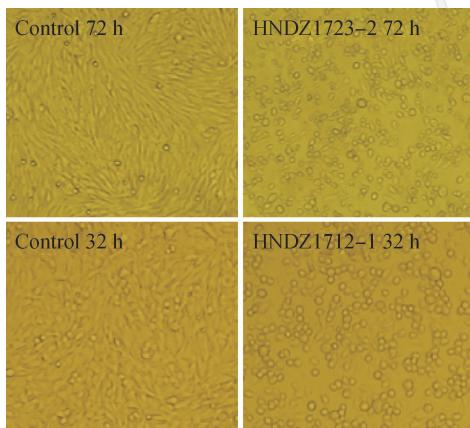


图1 病毒阳性分离物在BHK-21细胞上的细胞病变作用

引物外其他均未出现阳性结果,在9批三带喙库蚊标本检测到8批乙脑病毒基因阳性、1批盖塔病毒基因阳性,在5批蠓虫标本检测到阿卡班病毒基因阳性。

4. 病毒在吸血昆虫中的最低感染率:所采三带喙库蚊标本共13 990只,研磨130批,对研磨上清液进行PCR筛选共出现8批乙脑病毒阳性结果,最低感染率为0.57%(8/13 990),所采蠓虫标本共11 360只,研磨37批,研磨上清液共出现5批阿卡班病毒基因检测阳性,最低感染率为0.44%(5/11 360)。

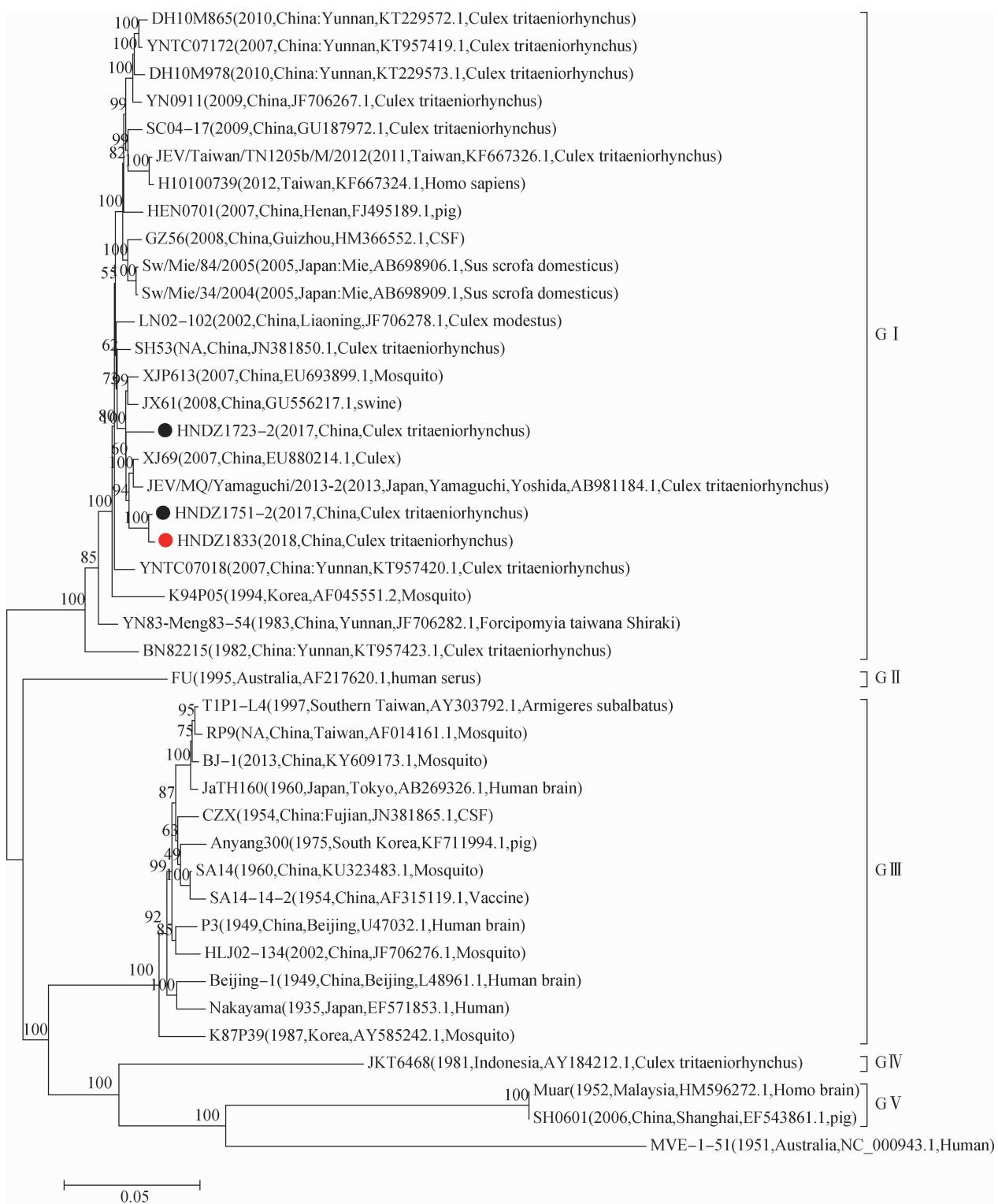
#### 5. 病毒的分子遗传进化:

##### (1) 乙脑病毒编码区基因序列的分子遗传特征:

用乙脑病毒全基因组序列扩增引物对HNDZ1723-2、HNDZ1751-2、HNDZ1833进行编码区基因扩增<sup>[15]</sup>,获得核苷酸序列长度均为10 296 bp。将3株病毒基因序列与GenBank记录的基因I~V型38株乙脑病毒编码区序列进行系统进化树分析,结果显示3株病毒株均属于基因I型乙脑病毒(图2)。

(2) 盖塔病毒全基因组序列的分子遗传特征:用盖塔病毒全基因组特异扩增引物对HNDZ1712-1株病毒进行扩增<sup>[16]</sup>。结果显示核苷酸序列长度为11 626 bp,中间无插入或缺失,但两端非编码区有缺失,3'端缺20个核苷酸,5'端缺43个核苷酸。将HNDZ1712-1株与GenBank上34株分离于不同国家、不同年代盖塔病毒进行分子遗传进化分析结果显示,HNDZ1712-1株属于盖塔病毒,与1964年在海南省蚊虫分离的盖塔病毒M1株处在不同分支(图3)。

盖塔病毒E2蛋白氨基酸位点分析:将HNDZ1712-1株与GenBank中1955—2017年全球各地不同宿主和不同媒介分离到的盖塔病毒E2基因

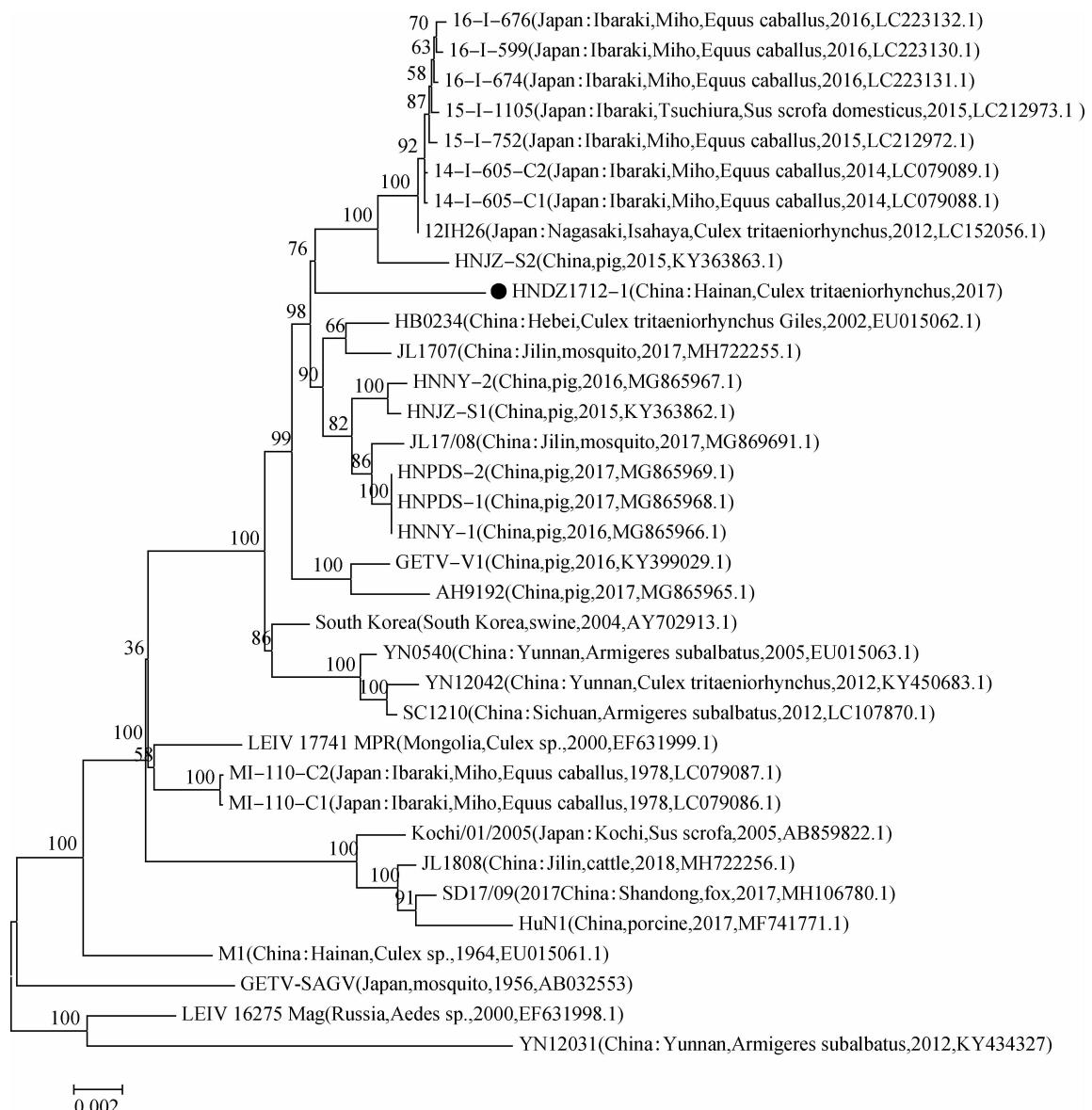


注: ●为2018年分离株; ●为2017年分离株

图2 海南省3株乙脑病毒分离株编码区核苷酸序列系统进化分析

进行氨基酸差异位点分析。结果发现同1955年发现的马来西亚原始株(MM2021)进行对比,其他盖塔病毒分离株均存在7个共同的氨基酸差异位点,分别位于E27(丝氨酸S→苯丙氨酸F)、E90(苏氨酸

T→缬氨酸V)、E102(丙氨酸A→缬氨酸V)、E122(异亮氨酸I→苏氨酸T)、E213(精氨酸R→丝氨酸S)、E314(丙氨酸A→缬氨酸V)、E323(谷氨酸E→天冬氨酸)。



注: ●为2017年分离株

图3 HNDZ1712-1病毒株基于编码区序列的系统进化分析

(3)核苷酸序列测定:对OYA病毒筛选阳性的5批蠓虫标本(HNDZ1717-1、HNDZ1717-2、HNDZ1718-1、HNDZ1741-2、HNDZ1831)使用阿卡斑病毒S和M基因扩增引物测序。结果显示,S片段长度均为699个核苷酸,编码233个氨基酸。

使用6对阿卡斑病毒M片段引物进行M基因扩增和核苷酸序列测定,结果仅在HNDZ1717-1和HNDZ1718-1两批标本中获得阿卡斑病毒M片段基因序列,M片段为4206个核苷酸,编码1401个氨基酸。

阿卡斑病毒基于S、M片段基因的系统进化分析:将这5批阿卡斑病毒S基因序列与GenBank中30株分离于不同国家、不同年代、不同基因型阿卡

斑病毒S片段绘制系统进化树。结果显示这5株阿卡斑病毒S基因序列形成单独的进化分支(图4)。

将编号为HNDZ1717-1和HNDZ1718-1的M基因序列与GenBank中分离于不同国家、不同年代阿卡斑病毒M基因片段序列绘制系统进化树。结果显示,HNDZ1717-1和HNDZ1718-1位于同一进化分支(图5)。

## 讨 论

本研究所采集吸血昆虫以三带喙库蚊居多,为海南省优势蚊种。当地以种植水稻为主,是三带喙库蚊最主要的孽生地。海南省历史上为乙脑高发区,自1980年以来发生过多次乙脑流行,早在1985年,

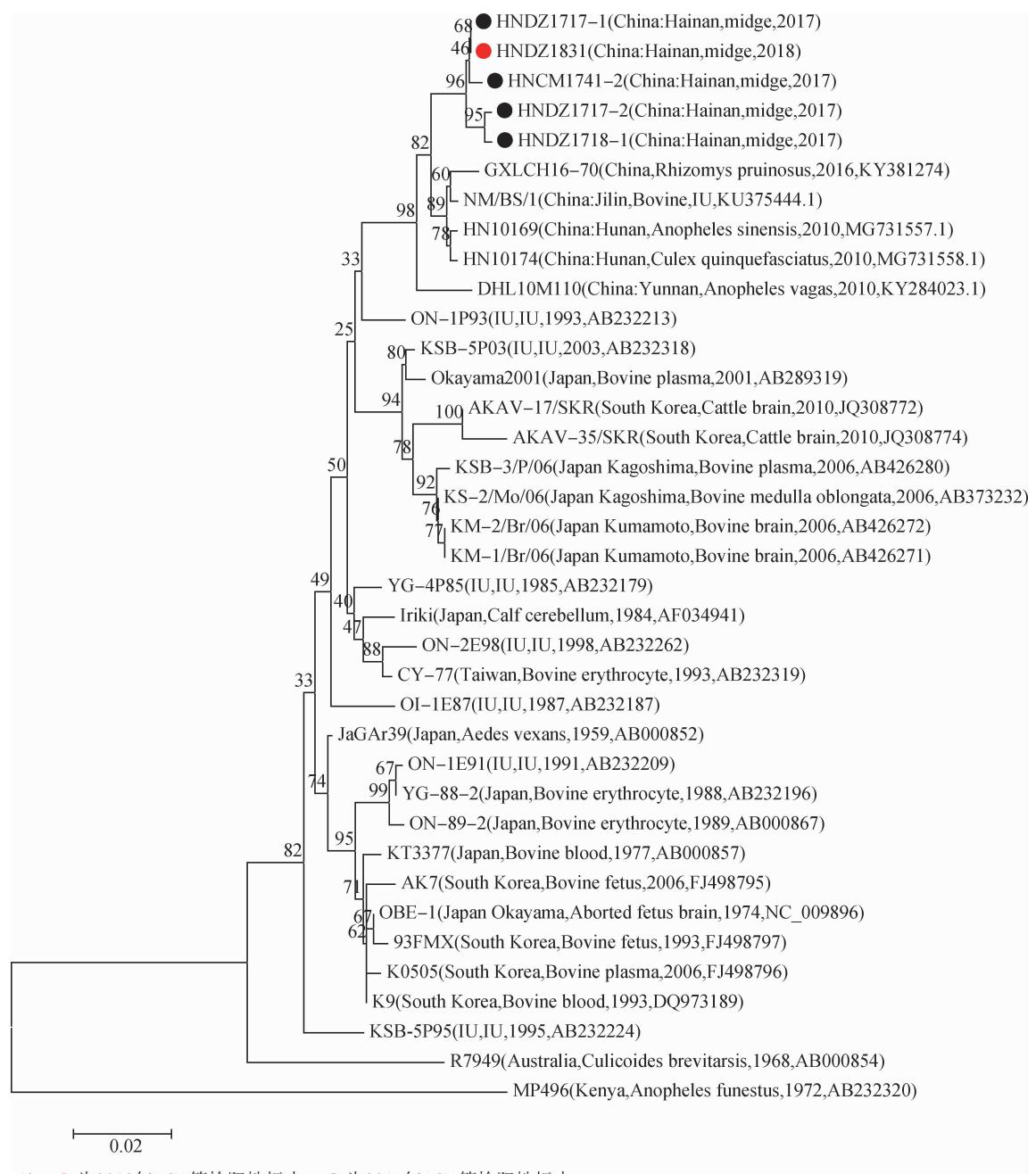
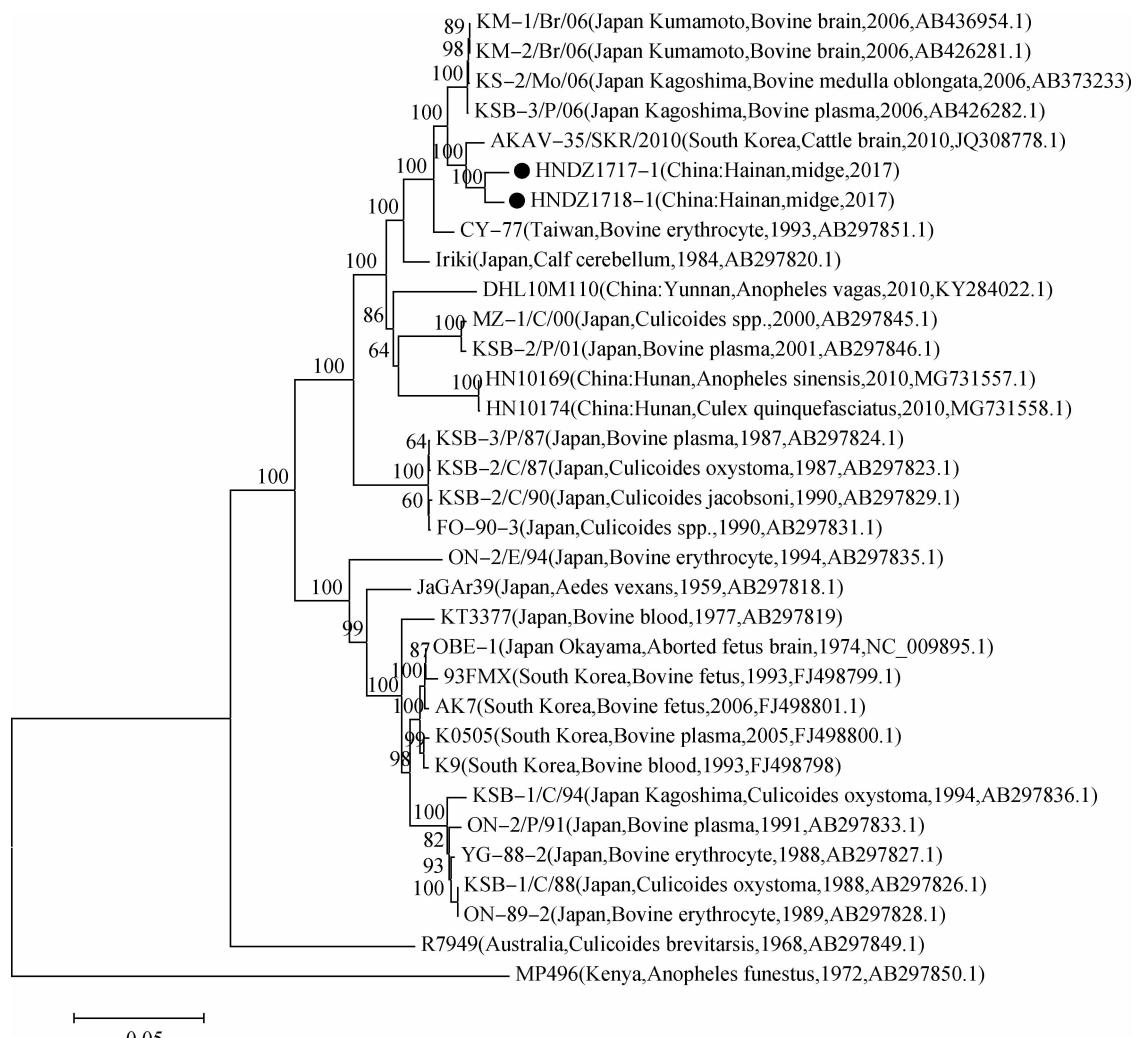


图4 以S片段核苷酸序列为基础上的系统进化分析

游志勇等<sup>[2]</sup>就从海南省中、东部地区的三带喙库蚊中分离出4株乙脑病毒。本研究在海南省蚊虫标本中再次分离出3株乙脑病毒,提示时隔30多年乙脑病毒在海南省各地区仍广泛存在。这3株乙脑病毒均分离自三带喙库蚊,表明三带喙库蚊仍是当地乙脑的主要传播媒介。系统进化树分析结果显示这3株乙脑病毒均为Ⅰ型乙脑病毒,而在1980年代我国台湾地区<sup>[17]</sup>、福建省、广东省、北京市<sup>[18]</sup>、浙江省<sup>[19]</sup>等地分离出的乙脑病毒均为Ⅲ型乙脑病毒,但是自2000年以来,Ⅰ型乙脑病毒已成为大多数流行地区的主要

基因型<sup>[20-21]</sup>。本研究也表明乙脑病毒已逐渐由Ⅲ型转变为Ⅰ型,而基因型替代产生的可能影响目前尚不清楚。

盖塔病毒不仅能引起牲畜疾病,造成巨大经济损失,而且还可感染人类。2017年夏季在湖南省一个养猪场发生一次盖塔病毒感染的大流行,结果造成大约200头仔猪在出生后5~10 d死亡,150多头孕猪死产或木乃伊胎<sup>[22]</sup>。Zhai等<sup>[4]</sup>报道1964年Yang等在海南省保亭县从库蚊标本中首次分离到1株甲型病毒。时隔50多年,再次分离到1株盖塔病毒,提示



注: ●为2017年PCR筛选阳性标本

图5 以M片段核苷酸序列为基础上的系统进化分析

海南省仍有盖塔病毒存在。截至2017年我国已在11个省采集的库蚊、阿蚊、按蚊和蠓虫标本中分离到盖塔病毒,盖塔病毒已经成为在中国分布最广的甲病毒<sup>[23-24]</sup>。系统进化分析结果显示HNDZ1712-1与甲病毒不在同一分支且相差较远可能是由于甲病毒与HNDZ1712-1从不同的源泉地迁徙而来,具体原因仍需进一步研究。氨基酸位点差异结果表明本研究得到的盖塔病毒与其他盖塔病毒分离株一样,与原始毒株均存在7个共同的氨基酸突变位点,从而导致病毒表面蛋白电位发生变化,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,但是尚需进一步研究证实。

感染阿卡班病毒可引起牛和羊的流产、死产、先天性关节病和脑水肿<sup>[25]</sup>,是造成牛羊等动物性疾病的重要原因。阿卡班病毒的传播媒介是蚊虫和库蠓,库蠓是其主要传播媒介,阿卡班病毒首次于

1959在日本群马县赤羽村采集的蚊虫中分离到<sup>[26]</sup>,之前未见报道。本研究在海南省采集的蠓虫中PCR筛选出阿卡班病毒,预示海南省可能又出现了新的吸血昆虫传播的病毒,尚需进一步加强对阿卡班病毒在蚊虫、蠓虫及动物中感染状况的监测,监测其对动物的危害尤为重要。

本研究存在不足。此前发表的文章在GenBank无法找到1980年代乙脑病毒分离株的基因序列,无法进行30年间乙脑病毒的氨基酸位点差异的分子生物学分析比较。

综上所述,继1980年代以来,从海南省的蚊虫标本中再次分离到乙脑病毒和盖塔病毒、蠓虫标本中检测到阿卡班病毒。应加强乙脑病毒、盖塔病毒和阿卡班病毒对人畜动物感染状况及疾病负担的监测,以减少对当地公共卫生健康的危害。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] 郑雅匀,王志玉,梁国栋.海南省虫媒病毒调查研究状况[J].中国媒介生物学及控制杂志,2011,22(6):607-610. DOI:10.3969/j.issn.1006-4028.2001.01.038.
- Zheng YY, Wang ZY, Liang GD. Review on arbovirus studies in Hainan province, China [J]. Chin J Vector Biol Control, 2011, 22 (6):607-610. DOI:10.3969/j.issn.1006-4028.2001.01.038.
- [2] 游志勇,王逸民,赵子江,等.海南岛两个虫媒病毒分离物的初步鉴定[J].病毒学报,1988,(1):11-17. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.000388.
- You ZY, Wang YM, Zhao ZJ, et al. Preliminary identification of two arbovirus isolates from Hainan island [J]. Chin J Virol, 1988, (1):11-17. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.000388.
- [3] 周俊梅,江丽芳,高阳,等.登革2型病毒海南分离株全长E基因的测定与分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2003,23 (4):304-306. DOI:10.3760/j.issn:0254-5101.2003.04.021.
- Zhou JM, Jiang LF, Gao Y, et al. Gene sequencing and analysis of the envelope protein of dengue 2 virus isolated in Hainan China [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2003, 23 (4) : 304-306. DOI:10.3760/j.issn:0254-5101.2003.04.021.
- [4] Zhai YG, Wang HY, Sun XH, et al. Complete sequence characterization of isolates of *Getah virus* (genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*) from China [J]. J Gen Virol, 2008, 89(Pt 6): 1446-1456. DOI:10.1099/vir.0.83607-0.
- [5] 董必军,陈文州,李秀维,等.首次从海南岛蚊虫和蝙蝠中分离出两株基孔肯雅病毒[J].中国媒介生物学及控制杂志,1993,4 (3):205-208.
- Dong BJ, Chen WZ, Li XW, et al. Two isolates of *Chikungunya virus* isolated from *Culex fatigans* and bats, for the first time in Hainan, China [J]. Chin J Vector Biol Control, 1993, 4(3) : 205-208.
- [6] 赵春生,蒋廉华,余兴龙,等.从海南省蝙蝠脑中分离出1株罗斯河病毒及其血清抗体调查[J].中国兽医学报,1997,17(3): 241-243. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.1997.03.010.
- Zhao CS, Jiang LH, Yu XL, et al. Isolation of ross river virus and its antibody prevalence in Hainan province [J]. Chin J Vet Sci, 1997, 17(3) : 241-243. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.1997.03.010.
- [7] 蒋廉华,赵春生,刘金华,等.海南省虫媒病毒分离物的初步鉴定[J].中国媒介生物学及控制杂志,1998,9(4):258-260. DOI:10.3969/j.issn.1003-4692.1998.04.006.
- Jiang LH, Zhao CS, Liu JH, et al. preliminary identification on arbovirus isolates from Hainan province [J]. Chin J Vector Biol Control, 1998, 9 (4) : 258-260. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4692. 1998.04.006.
- [8] 游志勇,王逸民,赵治国,等.海南省两株环状病毒的分离与鉴定[J].病毒学报,1990,6(3):272-276. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.000613.
- You ZY, Wang YM, Zhao ZG, et al. Isolation and identification of two strains of orbivirus in Hainan province [J]. Chin J Virol, 1990, 6(3):272-276. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.000613.
- [9] Gao XY, Nasci R, Liang GD. The neglected arboviral infections in mainland China [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(4) : e624. DOI:10.1371/journal.pntd.0000624.
- [10] Liu H, Gao XY, Liang GD. Newly recognized mosquito-associated viruses in mainland China, in the last two decades [J]. Virol J, 2011, 8:68. DOI:10.1186/1743-422X-8-68.
- [11] 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.
- [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.0136257.
- [13] Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, et al. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. Am J Trop Med Hyg, 1997, 57 (6):709-718. DOI:10.4269/ajtmh.1997.57.709.
- [14] Attoui H, Jaafar FM, Belhouchet M, et al. *Liao ning virus*, a new Chinese seadornavirus that replicates in transformed and embryonic mammalian cells [J]. J Gen Virol, 2006, 87 (Pt 1) : 199-208. DOI:10.1099/vir.0.81294-0.
- [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, Fu SH, Guo XF, et al. Identification of a newly isolated Getah virus in the China-Laos border, China [J]. Biomed Environ Sci, 2017, 30(3):210-214. DOI:10.3967/bes2017.028.
- [17] Chiou SS, Liu HC, Chuang CK, et al. Fitness of Japanese encephalitis virus to Neuro-2a cells is determined by interactions of the viral envelope protein with highly sulfated glycosaminoglycans on the cell surface [J]. J Med Virol, 2005, 76(4) : 583-592. DOI:10.1002/jmv.20406.
- [18] Ni HL, Barrett ADT. Molecular differences between wild-type Japanese encephalitis virus strains of high and low mouse neuroinvasiveness [J]. J Gen Virol, 1996, 77 (7) : 1449-1455. DOI:10.1099/0022-1317-77-7-1449.
- [19] 严菊英,王建跃,王忠发,等.浙江省分离到基因Ⅲ型乙型脑炎病毒[J].中华预防医学杂志,2012,46(8):722-727. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2012.08.011.
- Yan JY, Wang JY, Wang ZF, et al. Identification of genotype Ⅲ Japanese encephalitis virus isolated in Zhejiang province [J]. Chin J Prev Med, 2012, 46 (8) : 722-727. DOI: 10.3760/cma.j. issn.0253-9624.2012.08.011.
- [20] Wang HY, Liang GD. Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects [J]. Ther Clin Risk Manag, 2015, 11:435-448. DOI:10.2147/TCRM.S51168.
- [21] Gao XY, Liu H, Li MH, et al. Insights into the evolutionary history of Japanese encephalitis virus (JEV) based on whole-genome sequences comprising the five genotypes [J]. Virol J, 2015, 12:43. DOI:10.1186/s12985-015-0270-z.
- [22] 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.
- [23] Liang GD, Li XL, Gao XY, et al. Arboviruses and their related infections in China: a comprehensive field and laboratory investigation over the last 3 decades [J]. Rev Med Virol, 2018, 28 (1):e1959. DOI:10.1002/rmv.1959.
- [24] 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.
- [25] Wang JD, Blasdell KR, Yin H, et al. A large-scale serological survey of Akabane virus infection in cattle, yak, sheep and goats in China [J]. Vet Microbiol, 2017, 207: 7-12. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.05.014.
- [26] Li XL, Cui SH, Gao XY, et al. The spatio-temporal distribution of Japanese encephalitis cases in different age groups in mainland China, 2004-2014 [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(4) : e0004611. DOI:10.1371/journal.pntd.0004611.

(收稿日期:2019-04-27)

(本文编辑:斗智)