

2013–2014年日本腦炎病媒蚊及病毒分子流行病學

蘇千玲*、楊正芬、張淑芬、舒佩芸

(Japanese encephalitis virus, JEV)

1990			genotype III, GIII		
			genotype I, GI		
	GI	GIII			GI
GIII					2005–
2007			GIII	2008–2012	
	GI				2013–2014
			37,637	11	29
	RT-PCR(reverse transcription-PCR)		96	JEV	
	94	2			
			2013–2014		
	GIII			GI	

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心
通訊作者：蘇千玲*
E-mail : sue@cdc.gov.tw

投稿日期：2015年4月8日
接受日期：2015年7月22日
DOI : 10.6524/EB.20160412.32(7).001

前言

日本腦炎(Japanese encephalitis)是臺灣重要的病媒病毒傳染病[1–5]，感染日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)後，大部分的人是沒有症狀的，但少數的病患會有嚴重症狀包括頭痛、高燒、痙攣、抽搐或昏迷等，致死率可達 30%。日本腦炎的恢復期較長，有 30%–50%的患者會有神經性及精神性的後遺症。日本腦炎病毒屬於黃病毒科(Flaviviridae)，黃病毒屬(Flavivirus)的病毒。黃病毒為單股正向 RNA 病毒，全長約 11 kb，基因體結構除了 5' 與 3' 端的非轉譯區外，轉譯區依序可分為 3 個結構基因[Capsid (C), Premembrane/Membrane (prM), Envelope (E)]與 7 個非結構基因[Non-structural protein 1 (NS1), NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5]共 10 個基因[6]。

日本腦炎的流行區包含了亞洲大部份的地區、西太平洋島嶼及澳洲北部，也是亞洲地區最重要的病毒性腦炎傳染病。每年約有 35,000 至 50,000 人感染日本腦炎，造成約 10,000–15,000 人死亡。由於日本腦炎是經由病媒蚊的傳播，所以疫情的流行與氣候及季節兩大因素有關[7]。在熱帶地區，日本腦炎為散發性流行，全年皆有，印度南部、印尼、馬來西亞、新加坡及泰國南部的流行皆屬於此類；在溫帶及亞熱帶地區，日本腦炎的流行則有明顯的季節性，主要發生在夏季，尤其是雨季，發生的型態是爆發性，通常持續二到三個月，中國、日本、臺灣、印度北部、泰國北部、緬甸北部及越南的流行屬於此類。預防注射的有效實施，日本、南韓、臺灣及中國大陸的病例已減少很多，但鄰近的許多國家，包括菲律賓、印尼、馬來西亞、印度、尼泊爾等國亦有許多日本腦炎患者，也常有流行的發生。

日本腦炎的傳播，最主要的病媒蚊是以三斑家蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)為主；而環紋家蚊(*C. annulus*)、白頭家蚊(*C. fuscocephala*)、尖音家蚊(*C. pipiens*)、東鄉斑蚊(*Aedes togoi*)、白吻家蚊(*C. vishnui*) 和環喙家蚊(*C. annulirostris*)等均能媒介此病[8]。流行初期病毒利用動物→蚊→動物的方式傳播，當流行範圍擴大後出現動物→蚊→人的途徑。臺灣仍以豬為主要的增幅動物(amplifying animal)，病毒在豬體內增幅後開始人的流行[9,10]。臺灣流行季節主要在每年 5 至 10 月，病例高峰通常出現在 6–7 月。1955 年，日本腦炎被列為通報傳染病，1968 年開始全面實施疫苗接種，民眾罹患日本腦炎的情況即大幅降低。目前臺灣每年的確定病例數在 10 至 37 例間，已成為可控制的傳染病。

日本腦炎病毒分子流行病學的研究方面，依據親緣性分析，可將日本腦炎病毒分成 5 種基因型別，即 Genotype I–V(G I–V) [11–13]，1990 年以前，G III 病毒株是亞洲主要的流行株。然而，在過去 20 年間各國的監測研究資料顯示，G I 病毒株陸續傳播至中國、日本、越南、韓國、和泰國[14–17]等地，取代 G III 病毒株。Nabeshima 等人報告日本的 G I 病毒株是來自東南亞和東亞大陸[18]，雖然其傳播機制並不十分清楚，但可能的途徑包括帶病毒的病媒蚊隨風遷移及候鳥的遷徙等。Jan 等人於 2000 年之文獻，將臺灣地區 1983 至 1994 年間由蚊子

分離出的日本腦炎病毒以 *partial C/preM* 基因進行親緣性分析，發現所有病毒株皆屬於 GIII，並可分成 3 個 clusters[19]。臺灣在 1994 年後一直缺乏有系統的監測計畫與研究資料，因此對日本腦炎病毒之基因型與地理分佈並不清楚。自 2005 年我們開始透過基因體計畫進行日本腦炎病毒監測，以 *Envelope* 基因進行親緣性分析，結果顯示 2005–2007 年間從蚊子、豬或人所分離出之病毒株，*Envelope* 皆屬於 GIII，2008 年首次發現有 2 株病毒屬於 GI（臺北市關渡自然公園及宜蘭縣五結鄉養豬場）[5]。2009–2012 年，發現大部分陽性病媒蚊感染之日本腦炎病毒皆屬於 GI，僅少數地方之日本腦炎病毒屬於 GIII。本研究持續監測 2013–2014 年日本腦炎病媒蚊的種類及病毒分子流行病學。

材料與方法

- 一、病毒株來源：日本腦炎病毒之疫苗株病毒係購自 ATCC(*Nakayama-ATCC*)。
- 二、日本腦炎病毒分離：日本腦炎病毒株係由病媒蚊研磨液經由 C6/36 蚊蟲細胞株體外細胞培養方法所分離，為避免病毒株產生變異，分離出病毒株於 T-25 培養瓶擴大培養後即分裝，冷凍於負 80°C 低溫冷凍櫃中。病毒的鑑定方法可使用病毒專一性單株抗體，如 JEV group-specific (E3.3) 做免疫螢光染色，或使用 real-time RT-PCR (real-time reverse transcription-PCR) 鑑定病毒的種類。
- 三、日本腦炎病媒蚊採集：在流行季節採集病媒蚊，是最有效的分離日本腦炎病毒的方法，步驟如下：
 - (一) 5 月至 7 月每周調查採集 1–2 次，選擇台灣北、中、南、東各地緊鄰水稻田之養豬戶及溼地，以人工掃網或乾冰掛網方式採集病媒蚊。
 - (二) 人工掃網採集時間在下午 6–9 時，乾冰掛網方式採集時間在下午 6 時至隔日清晨，採集到的蚊蟲放入一般紙杯中帶回實驗室，分類及記錄採獲蚊蟲數。
 - (三) 挑選已吸血之蚊子，在 25°C 下，以 10% 糖水餵食 5 天後，依種類、性別、地點、日期，每 50 隻集成 1 池(1 pool)。將每池蚊蟲使用組織研磨器 (tissue lyser II, Qiagen, Hilden, Germany) 研磨，將每池蚊蟲混合在 500 μ l 緩衝液中研磨使成均質化，再離心得上清液，取上清液進行 RNA 抽取及 RT-PCR 篩檢日本腦炎病毒陽性檢體。
- 四、病毒核酸之抽取及純化：主要原理為利用裝有矽土–膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與核醣核酸結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。取 140 μ l 蚊蟲研磨上清液，使用 QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) 及自動化核酸萃取儀(Qiagen QIAcube, Germany) 萃取 RNA，最後將 RNA 溶於 70 μ l 純水(Water, containing 0.02% sodium azide)。
- 五、引子(primer)的設計與合成：引子的設計可依不同的需要而定，其功能是在有效地擴增模版 DNA 序列。我們共用 2 套特異性的引子組來篩選日本腦炎病毒，分別為(1) **flavivirus-specific**: 60 nM (final concentration) FL-F1:

5'-GCCATATGGT ACATGTGGCT GGGAGC-3 ; 60 nM FL-R3:
5'-GTKATTCTTG TGTCCCAWCC GGCTGTGTCA TC-3 ; 60 nM FL-R4:
5'-GTGATGCGRG TGTCCCAGCC RGCKGTGTCA TC-3'。(2) **JEV-specific:**
200 nM JE3F1: 5'-CCCTCAGAAC CGTCTCGGAA -3' ; 200 nM JE3R1:
5'-CTATTCCCAGGTGTCAATATGCTGT-3'。

- 六、利用 RT-PCR 篩檢日本腦炎病毒陽性病媒蚊檢體：利用 one-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR 篩檢日本腦炎病毒陽性病媒蚊，使用 Mx3000 quantitative PCR system (Stratagene, La Jolla, California, USA) 做 RT-PCR 增殖反應。詳細的檢驗方法如以前的研究敘述[20]：使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ l 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix、RNase-free Water、核酸引子、0.5 μ l QuantiTect RT Mix，最後加入 10 μ l 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μ l。再進行 one-step SYBR Green RT-PCR 反應：50°C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95°C 15 分鐘，45 次循環之 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 20 秒、77°C 30 秒。
- 七、核酸定序及分析：對於具有代表性的分離病毒株，以病毒培養液為材料，進行整個結構基因的定序工作，RT-PCR 產物經瓊膠電泳分離及純化後，以 ABI Prism 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems) 核酸定序儀定序。日本腦炎病毒結構基因定序所使用之引子（表一），以 DNA Star、Clustal W software、MEGA version 6 (<http://www.megasoftware.net/>) 進行核酸序列比對及演化親緣性分析。
- 八、感染日本腦炎病毒蚊蟲之最大概似估計 (The maximum likelihood estimates, MLEs)：以 Biggerstaff 所著作之 PooledInf-Rate software (www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/sofeware.htm) 計算蚊蟲之日本腦炎病毒感染率。

表一、日本腦炎病毒結構基因定序所使用之引子

Primer	Sequence (5' to 3')	Genomic region*
JE5UTRF	AGA AGT TTA TCT GTG TGA ACT TCT TGG	5'UTR (1–27)
JE616R	CCT CAC ACA TGT AGC CGA CGT CT	PrM (593–615)
JE747R	TTC GCT TGG AAT GCC TGG TCC G	PrM (723–744)
JE747F	CGG ACC AGG CAT TCC AAG CGA A	PrM (723–744)
JE1309F	GGA AGC ATT GAC ACA TGT GCA AAA TT	E (1308–1333)
JE1360F	AGA ACA ATC CAG CCA GAA AAC ATC	E (1359–1382)
JE1448R	CGC TGA ATA ATT CCC ATG GTT TTC	E (1425–1448)
JE1839F	AGG CTG AAA ATG GAC AAA CTG GC	E (1839–1861)
JE1878R	GGT TGT GCC TTT CAG AGC CAG TTT	E (1854–1877)
JE2602R	AGG GAT CTG GGC GTT TCT GG	NS1 (2583–2602)
JE2636R	GCC TTC CTT GTG CGC TTT GT	NS1 (2617–2636)

* Numbering from GenBank accession number AY303795. RT-PCR = reverse transcription-polymerase chain reaction; JEV = Japanese encephalitis virus; C = capsid; prM = premembrane; E = envelope; UTR = untranslated region

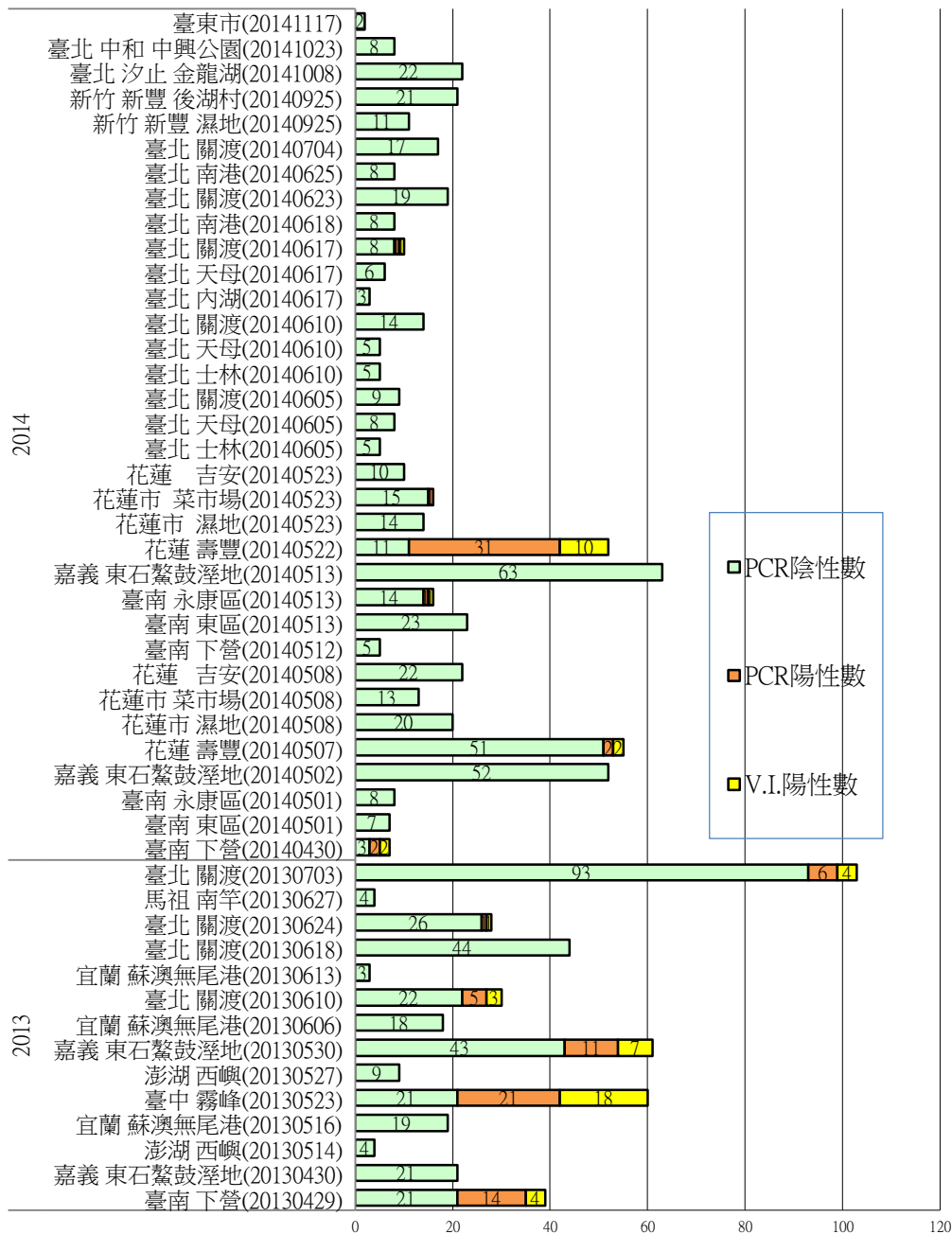
結果

一、2013–2014 年日本腦炎病媒蚊採集：

為了瞭解臺灣日本腦炎病毒之病媒蚊種類及病毒感染率，我們在 2013 年 4–7 月及 2014 年 4–11 月，分別在北、中、南、東各地區採集病媒蚊，共得到 37,637 隻蚊蟲，包括 11 屬 29 種，其中以三斑家蚊最多(63.29%, 23,822/37,637)，其次為環蚊家蚊(14.00%, 5,271/37,637)及熱帶家蚊(10.08%, 3,792/37,637)。所採集之蚊蟲分為 954 池(pool)，以 RT-PCR 篩選 JEV 陽性檢體，並進行日本腦炎病毒分離（表二、圖一）。共有 96 池為 JEV 陽性，分離出 53 株日本腦炎病毒，仍以三斑家蚊為日本腦炎的最主要病媒蚊，其 JEV 的感染率為千分之 4.37(95% CI: 3.55–5.32)，其次為環蚊家蚊，感染率為千分之 0.38(95% CI: 0.07–1.25)。日本腦炎病毒陽性病媒蚊主要出現在 4–6 月為高峰，地點的分布仍是北、中、南、東四大區塊均有，且以豬舍的陽性率較高。

表二、 感染日本腦炎病毒蚊子之最大概似估計（2013–2014 年）

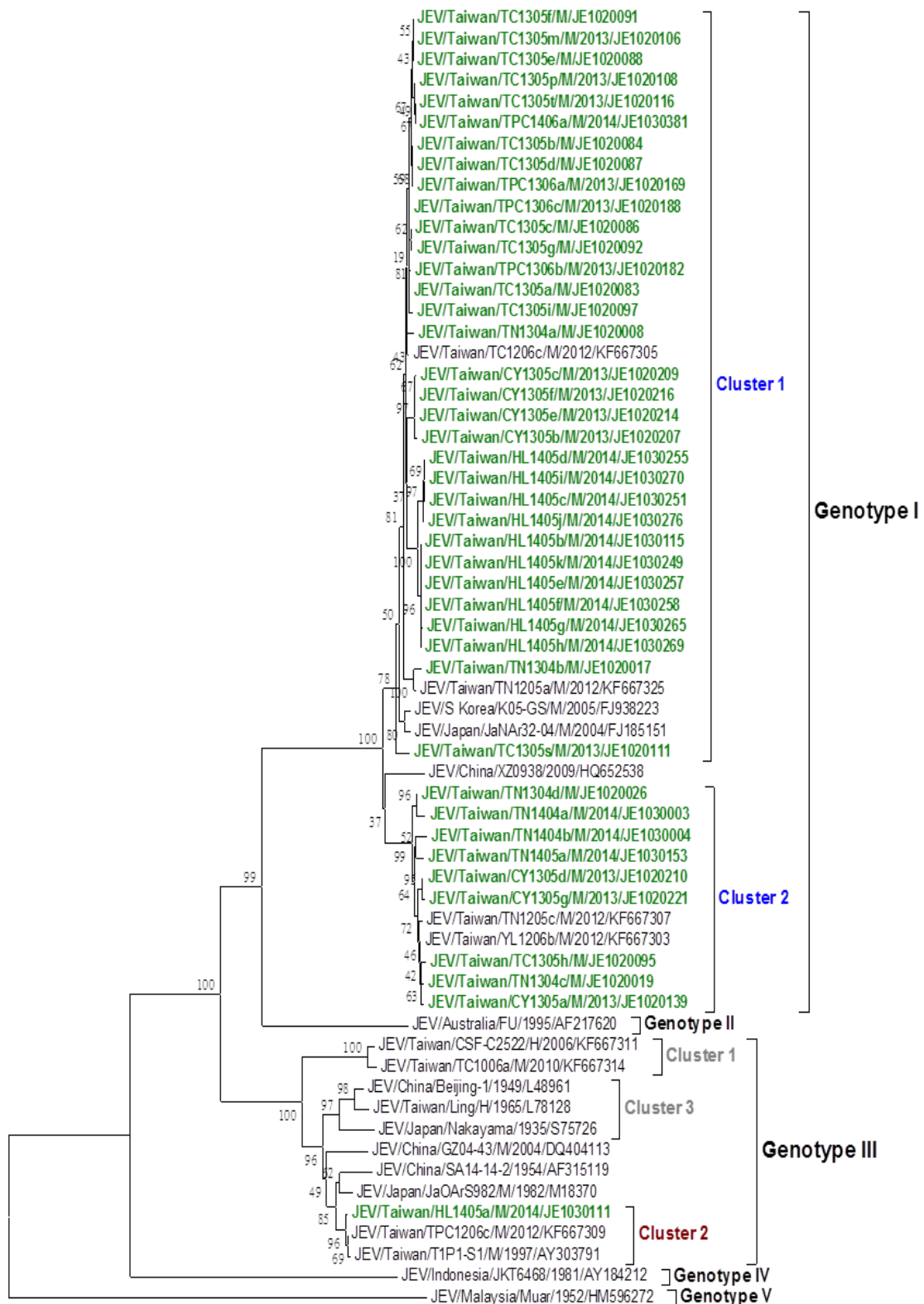
蚊蟲種類	感染率 (%)	最大概似估計值 (95% 信賴區間)	捕獲總池數	陽性總池數	蚊蟲隻數	
<i>Aedes aegypti</i>	0.00	0.00	499.14	2	0	3
<i>Aedes albopictus</i>	0.00	0.00	5.60	34	0	626
<i>Aedes lineatopennis</i>	0.00	0.00	793.45	1	0	1
<i>Aedes penghuensis</i>	0.00	0.00	231.16	1	0	6
<i>Aedes vexans</i>	0.00	0.00	11.05	7	0	262
<i>Anopheles sinensis</i>	0.00	0.00	29.73	5	0	73
<i>Anopheles tessellatus</i>	0.00	0.00	17.48	11	0	158
<i>Armigeres subalbatus</i>	0.00	0.00	13.53	21	0	244
<i>Coquillettidia crassipes</i>	0.00	0.00	231.31	2	0	8
<i>Culex annulus</i>	0.38	0.07	1.25	134	2	5271
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	0.00	0.00	40.80	5	0	57
<i>Culex brevipalpis</i>	0.00	0.00	107.15	8	0	26
<i>Culex fuscanus</i>	0.00	0.00	657.62	2	0	2
<i>Culex fuscocephala</i>	0.00	0.00	391.79	2	0	4
<i>Culex malayi</i>	0.00	0.00	408.88	1	0	3
<i>Culex mimeticus</i>	0.00	0.00	793.45	1	0	1
<i>Culex murrelli</i>	0.00	0.00	13.08	9	0	226
<i>Culex nigropunctatus</i>	0.00	0.00	793.45	1	0	1
<i>Culex pipiens</i>	0.00	0.00	2.52	46	0	1443
<i>Culex quinquefasciatus</i>	0.00	0.00	0.99	101	0	3792
<i>Culex rubithoracis</i>	0.00	0.00	59.29	2	0	28
<i>Culex sitiens</i>	0.00	0.00	2.60	30	0	1383
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	4.37	3.55	5.32	511	94	23822
<i>Culicoides oxystoma</i>	0.00	0.00	16.35	3	0	150
<i>Heizmannia taiwanensis</i>	0.00	0.00	408.88	1	0	3
<i>Mansonia uniformis</i>	0.00	0.00	70.74	9	0	40
<i>Ochlerotatus togoi</i>	0.00	0.00	793.45	1	0	1
<i>Tripteroides bambusa</i>	0.00	0.00	657.62	2	0	2
<i>Uranotaenia novobscura</i>	0.00	0.00	793.45	1	0	1
總計				954	96	37637



圖一、2013-2014 年日本腦炎病媒蚊 RT-PCR 及病毒分離結果

二、日本腦炎病毒 E 基因的親緣性分析：

分離出之日本腦炎病毒進行 E 基因定序及演化親緣性分析結果(圖二)。2013 年間所分離到的日本腦炎病毒株全部屬於 GI, 未分離出 GIII 病毒株。2014 年間所分離到的日本腦炎病毒株除了在花蓮有一株屬於 GIII 外, 其餘在臺灣南部、東部及北部的日本腦炎病毒株皆屬於 GI。GI 日本腦炎病毒株可分為二個族群(cluster)。cluster 1 與 2 之病毒株自 2009 年後, 已廣泛分佈於全臺灣, 病毒與中國大陸、越南、日本的病毒相似。2014 年的 GIII 病毒株屬於 cluster 2, 與 2012 年臺北關渡之病毒株極為相似, 且與中國大陸及日本的病毒相似。



圖二、日本腦炎病毒株 E 基因親緣演化樹分析

(本研究 2013–2014 年採集的病媒蚊體內日本腦炎病毒之基因以綠色字體表示)

三、綜合 2005–2014 年日本腦炎病毒基因型在臺灣的分布，目前臺灣日本腦炎病毒的基因型別主要為 GI，但亦存在少量的 GIII（表三）。

表三、臺灣日本腦炎病毒株基因型別之地區分布（2005–2014 年）

地區	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
臺北市	nd	nd	GIII	GI GIII	GI	GI	GI	GI GIII	GI	GI
臺中市	GIII	GIII	nd	GIII	GI	GI GIII	GI	GI	GI	nd
臺南市	nd	nd	GIII	nd	nd	GI	nd	GI	nd	GI
高雄市	GIII	nd	nd	nd	nd	GI GIII	nd	nd	GI	nd
宜蘭縣	GIII	GIII	nd	GI GIII	GIII	GI	GI	GI	GI	nd
花蓮縣	GIII	GIII	GIII	GIII	GIII	GI	nd	GI	nd	GI GIII

*nd = not determined

討論

臺灣於 1968 年起開始實施日本腦炎預防接種後，病例數就急速下降，目前已成為可以控制的傳染病。由病媒蚊監測結果顯示，從春季至秋季，在臺灣北、中、南、東各地區仍活躍著日本腦炎病毒陽性的病媒蚊，尤其是在豬舍與水稻田附近，最容易發現日本腦炎病媒蚊的蹤跡。故預防接種及避免被病媒蚊叮咬，對於日本腦炎傳染病的控制非常重要。

由文獻中日本腦炎病毒基因序列及演化分析結果，目前亞洲地區的病毒是以 GI 病毒株為主。我們的監測結果顯示，臺灣地區 2007 年以前分離之病毒株均屬於 GIII，但 2008 年後開始在北部分離出少數 GI 病毒株，在 2009–2012 年間 GI 病毒株快速取代 GIII 病毒株。2013 年時發現臺灣大部分地區之日本腦炎病毒株皆屬於 GI（臺北市、臺中市、臺南市、嘉義縣），2014 年在南部、東部及北部的日本腦炎病毒株也均屬於 GI，只有在花蓮發現一株 GIII，顯示臺灣地區日本腦炎病毒隨著年代而改變，GIII 病毒幾乎消失，被 GI 病毒所取代。由病毒基因序列及演化分析結果也顯示臺灣的日本腦炎病毒仍在持續變化中，可能原因除了本土病毒株持續進行演化以更加適應環境外，每年也有新的病毒不斷引進，一旦新引進的病毒可以適應新的生態環境時，則有可能進而取代原有的本土病毒，使臺灣日本腦炎病毒主要的流行株隨著時間再度發生改變。故未來仍有必要持續監測病毒在臺灣的演化及流行病學的研究，以保障民眾的健康。

我們於 2005–2014 年間由病媒蚊監測的結果，不但發現日本腦炎病毒的基因型由 GIII 轉移至 GI，也在 2012 年的人類日本腦炎的確定病例中分離出 GI 病毒，顯示不僅傳播日本腦炎的病媒蚊所攜帶的病毒基因型發生轉變，GI 病毒也造成

臺灣民眾的感染。臺灣在 2010–2014 年，GI 為主要日本腦炎病毒流行的期間，人類感染日本腦炎確定病例數仍維持在 16–32 例之間，未有明顯變化，可能是因為 GI 與 GIII 病毒同屬於一種血清型，故疫苗株雖屬於 GIII 病毒，但對於 GI 病毒的感染仍具有足夠的保護力。但由於目前的觀測時間仍有限，未來仍應持續監測病毒的變化與病例數的相關性。

監測結果發現臺灣地區最常見傳播日本腦炎疾病的病媒蚊以在豬舍及濕地的三斑家蚊為主，且陽性病媒蚊在每年 4 月下旬即開始出現於全臺灣，6 月到達高峰。因此建議防疫單位可在流行季節來臨前，加強宣導個人保護措施，避免至高危險區域。高風險的族群應施打疫苗，以免於遭受日本腦炎的威脅。

由於交通便捷及氣候變遷等因素，各種新興及再浮現病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，對人類健康所造成的威脅日益嚴重，建立一套完整的病媒性傳染病監測系統是十分重要的。藉由實驗室為基礎的病毒學即時監測系統，建立日本腦炎病毒基因資料庫，應用於病毒親緣關係分析，以瞭解本土流行病毒株之來源、擴散及分布情形及新病毒之引進情形，可以對流行疫情的現況與防治工作提供重要的資訊。建立完整的病原體基因資料庫是一種重要的資產，對於疫苗與治療藥物開發。以及致病機轉研究提供極有用的資訊。

參考文獻

1. Chang SF, Huang JH, Shu PY. Characteristics of dengue epidemics in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2012; 111: 297–9.
2. Huang JH, Su CL, Yang CF, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008–2010. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87: 349–58.
3. Huang JH, Liao TL, Chang SF, et al. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: a molecular epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77: 903–9.
4. Shu PY, Su CL, Liao TL, et al. Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003–2007: geographic distribution and genotype shift. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 1039–46.
5. Huang JH, Lin TH, Teng HJ et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 876–8.
6. Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler, et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990; 44: 649–88.
7. Vaughn DW, Hoke CH Jr. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. *Epidemiol Rev.* 1992; 14: 197–221.
8. Hu SMK, Grayston JT. Encephalitis on Taiwan II. Mosquito Collection and Bionomic Studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1962; 11: 131–40.

9. Wu YC, Huang YS, Chien LJ, et al. The epidemiology of Japanese encephalitis on Taiwan during 1966-1997. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61: 78–84.
10. Su CL, Yang CF, Teng HJ, et al. Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes in Taiwan during 2005-2012. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(10): e3122.
11. Williams DT, Wang LF, Daniels PW, et al. Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2471–80.
12. Uchil PD, Satchidanandam V. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65: 242–51.
13. Solomon T, Ni H, Beasley DW, et al. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in Southeast Asia. *J Virol.* 2003; 77: 3091–8.
14. Nga PT, del Carmen Parquet M, Cuong VD, et al. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia. *J Gen Virol.* 2004; 85: 1625–31.
15. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004; 10 (suppl 12): 98–109.
16. Nitatpattana N, Dubot-Pérès A, Gouilh MA, et al. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 1762–5.
17. Wang HY, Takasaki T, Fu SH, et al. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. *J Gen Virol.* 2007; 88: 885–94.
18. Nabeshima T, Loan HT, Inoue S, et al. Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. *J Gen Virol.* 2009; 90: 827–32.
19. Jan LR, Yueh YY, Wu YC, et al. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62: 446–52.
20. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, et al. Development of Group- and Serotype-Specific One-Step SYBR Green I Real-Time Reverse Transcription-PCR for Dengue Virus. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2408–16.