

基因 I 型猪乙型脑炎灭活疫苗免疫原性评价

冯 瑶, 岳辉喜, 刘洪明, 曹三杰, 伍 锐, 黄小波, 文翼平, 赵 勤, 文心田*

(四川农业大学动物医学院猪病研究中心, 成都 611130)

摘 要: 为了评估猪基因 I 型乙型脑炎病毒 YA1 株、CZ 株灭活疫苗的免疫原性, 通过将 YA1 株、CZ 株乙脑病毒分别在乳鼠脑内连续传代, 获得了高病毒含量的鼠脑病毒液。将佐剂 ISA206 分别与灭活的 YA1 株、CZ 株乙脑病毒液混合, 制备成鼠脑灭活苗。将 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗以及 HW1 株商品化鼠脑灭活苗分别免疫接种小鼠、豚鼠、仔猪, 采用间接 ELISA 试验、血凝抑制试验、病毒中和试验以及攻毒保护试验分别检测 IgG 抗体、血凝抑制抗体、中和抗体的产生情况以及疫苗对小鼠的攻毒保护率。结果显示 YA1 株、CZ 株灭活苗在小鼠和仔猪上产生的 IgG 抗体、在豚鼠上产生的血凝抑制抗体、在仔猪上产生的中和抗体以及对小鼠的攻毒保护率均高于 HW1 株。结果表明乙脑病毒 YA1 株、CZ 株灭活苗的免疫原性优于 HW1 株, 其中 CZ 株灭活苗的免疫原性最优。

关键词: 乙型脑炎病毒; 基因 I 型; 基因 III 型; 灭活苗; 免疫原性

中图分类号: S813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)05-0889-07

The Immunogenicity Evaluation of Inactivated Vaccines of Swine Japanese Encephalitis Virus Genotype I

FENG Yao, YUE Hui-xi, LIU Hong-ming, CAO San-jie, WU Rui, HUANG Xiao-bo,
WEN Yi-ping, ZHAO Qin, WEN Xin-tian*

(Research Center of Swine Disease, College of Veterinary Medicine,
Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The objective of this study was to evaluate the immunogenicity of inactivated vaccines of swine Japanese encephalitis virus genotype I of YA1 and CZ strains. High titer viruses were obtained by serial passages on suckling mouse brains. Then inactivated vaccines of YA1 and CZ strains were prepared by mixing these inactivated viruses with adjuvant ISA206, respectively. Furthermore, the immunogenicity of inactivated vaccines were evaluated in mice, guinea pigs and piglets. IgG antibody, hemagglutination inhibition antibody, plaque reduction neutralizing antibody and vaccine protection rate were detected through indirect ELISA test, hemagglutination inhibition test, plaque reduction neutralization test and protection rate test, respectively. These results showed that inactivated vaccines of YA1 and CZ strains produced higher IgG antibody, hemagglutination inhibition antibody, plaque reduction neutralizing antibody, and vaccine protective rate than HW1 strain in these experimental animals. These results indicated that the immunogenicity of inactivated vaccines of YA1, CZ strains was better than inactivated vaccine of HW1 strain. Above all, the immunogenicity of the inactivated vaccine of CZ strain was the best.

Key words: Japanese encephalitis virus; genotype I; genotype III; inactivated vaccine; immunogenicity

收稿日期: 2016-12-01

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203082)

作者简介: 冯 瑶(1991-), 女, 四川广安人, 硕士生, 主要从事猪基因 I 型乙型脑炎病毒疫苗的研究, E-mail: fengyao1005@163.com

* 通信作者: 文心田, 教授, 博士生导师, E-mail: xintian3211@126.com

流行性乙型脑炎(epidemic encephalitis B)又称日本乙型脑炎,简称乙脑,是由黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus)的乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)引起的一种蚊媒性人兽共患传染病^[1]。该病属于自然疫源性疾,可通过蚊虫叮咬传播,在流行季节,病毒很容易通过“猪—蚊—猪”的方式扩散。乙脑病毒广泛分布于世界各地,特别是亚洲、西太平洋国家以及澳大利亚北部,现认为该病毒起源于马来西亚及印度尼西亚,并随着基因的不断进化,该病毒迅速在亚洲及周边地区扩散蔓延^[2-4]。根据乙脑病毒 C/PrM 及 E 基因序列的差异,可将乙脑病毒分为具有明显地域特点的 5 个基因型,其中基因 I、II、III 型主要分布在亚洲,基因 IV 型主要分布在印度尼西亚,而基因 V 型最先分离自马来西亚,而后也相继在中国和韩国发现该型病毒^[5-8]。近年来,随着全球气候、环境的不断改变,乙脑病毒基因型的分布有了较大变化,比如在中国、韩国、日本、越南等国相继分离到基因 I 型乙脑病毒,而在 2007 年之前只存在基因 III 型乙脑病毒的印度,也分离出了基因 I 型乙脑病毒^[9-13]。

我国是一个养猪大国,乙脑在猪群中的感染较为常见,母猪感染后可出现高热、流产、产死胎及木乃伊胎,公猪多表现为睾丸炎。乙脑除杀灭蚊虫及免疫接种外,目前尚无特效疗法,而现行我国兽用乙脑疫苗只有 SA14-14-2 株减毒活疫苗及 HW1 株鼠脑灭活苗,且均为基因 III 型。研究发现,基因 III 型疫苗对基因 I 型乙脑病毒只能产生部分保护力,因此开发基因 I 型乙脑疫苗显得尤为迫切^[14]。笔者通过对 2 株基因 I 型乙脑病毒的免疫原性进行筛选,拟挑选出一株免疫原性显著优于商品化乙脑灭活苗的毒株,为我国养猪业基因 I 型乙脑的防控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 生物材料

乙型脑炎病毒 YA1 株、CZ 株, BHK-21 细胞均由四川农业大学猪病研究中心保存; SPF 级昆明小鼠、清洁级豚鼠购自简阳达硕动物科技有限公司; 4 周龄仔猪购自雅安某猪场。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基、新生牛血清、青链霉素购自 GIBCO 公司; 佐剂 ISA206 购自法国 Seppic 公司; 猪乙型脑炎油乳剂灭活苗购自武汉中博生物股份有

限公司; 猪乙型脑炎抗体检测试剂盒购自武汉科前生物股份有限公司。

1.3 病毒的鼠脑传代

分别取冻干保存的 YA1 株、CZ 株乙脑病毒于 BHK-21 细胞上复苏,待细胞出现 80% CPE 后收获病毒液。取收获的病毒液以 25 μL 脑内接种 7 日龄昆明乳鼠, 2 d 内死亡的小鼠不计。待小鼠出现离群、弓背、抽搐等明显症状后剖取鼠脑,用 DMEM 培养基制备成 10% 无菌鼠脑病毒液。取该病毒液继续脑内接种 7 日龄乳鼠,连续传代 5 次。

1.4 小鼠半数致死量(LD₅₀)的测定

将待测病毒液用不含血清的 DMEM 培养基作 10 倍梯度稀释至 $10^{-5} \sim 10^{-10}$, 每个稀释度脑内接种 2 周龄小鼠,每个稀释度 5 只,每只 40 μL ,弃 2 d 内死亡的小鼠不计,其余小鼠连续观察 14 d,记录小鼠死亡情况。按照 Reed-Muench 法计算 YA1 株、CZ 株乙脑病毒复苏后的细胞毒与鼠脑毒第 5 代的 LD₅₀。

1.5 鼠脑灭活苗的制备

分别将灭活的 YA1 株、CZ 株鼠脑毒(灭活条件:体积分数 0.02% 甲醛, 37 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 48 h, 体积分数 0.02% 的硫代硫酸钠终止灭活)与等体积的 ISA206 佐剂加热至 31 $^{\circ}\text{C}$ 。佐剂以 350 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 预乳化 5 min,将病毒液缓慢倒入佐剂中,继续以 350 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 乳化 5 min,乳化结束后室温静置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.6 小鼠免疫试验

1.6.1 小鼠 IgG 抗体水平的测定 3 周龄 SPF 级昆明雌鼠 20 只,随机分为 4 组,每组 5 只。分别用 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗、HW1 株商品化鼠脑灭活苗以及 PBS 对小鼠进行免疫,每只腹腔接种 0.5 mL, 2 周后同等剂量加强免疫一次。分别于免疫后 0、2、4、6、8 周断尾采血,分离血清,按照武汉科前公司的乙脑抗体检测试剂盒检测血清中 IgG 抗体水平,并使用 SPSS 对数据进行分析。

1.6.2 小鼠免疫攻毒保护试验 3 周龄 SPF 级昆明雌鼠 80 只,随机分为 8 组,每组 10 只。分别用 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗原液、10、100 倍稀释液以及 HW1 株商品化鼠脑灭活苗对小鼠进行免疫,每只腹腔注射 0.3 mL,同时设置一组空白对照。免疫 1 周后以同等剂量加强免疫一次。二免后 1 周用乙脑强毒 YA1 株鼠脑毒第 10 代脑内攻毒,每只注射 25 μL (100LD₅₀),连续观察 14 d,记录小鼠发病死亡情况。

1.7 豚鼠免疫试验

1.7.1 豚鼠的分组及免疫 300~400 g 成年清洁级豚鼠 16 只,随机分为 4 组,每组 4 只。分别用自制的 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗、HW1 株商品化鼠脑灭活苗以及 PBS 对小鼠进行免疫,每只肌肉注射 0.5 mL,初次免疫后 2 周以同等剂量加强免疫 1 次。二免后 2 周心脏采血,分离血清,采用 HI 试验检测豚鼠血清血凝抑制抗体水平。

1.7.2 血凝试验 以 YA1 株为感染毒株,脑内接种 7 日龄乳鼠,待乳鼠发病后收取鼠脑采用蔗糖-丙酮提取法制备乙脑病毒血凝素。取 96 孔 V 型微量板,每孔加入 pH 9.0 的 BABS 25 μL ,每排的第一孔加入 25 μL 血凝素,混匀后吸取 25 μL 至第二孔作等量倍比稀释至倒数第二孔,并从倒数第二孔中吸去 25 μL 。最后一孔不加血凝素作红细胞对照。每孔加入 BABS 25 μL ,混匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 60 min,最后每孔中加入 50 μL 0.33% 的鸽红细胞悬液,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后判断结果。

结果判定:++++ (#) 表示红细胞 100% 被凝集;+++ 表示红细胞约 75% 被凝集;++ 表示红细胞约 50% 被凝集;+ 表示红细胞约 25% 被凝集;- 表示红细胞不被凝集。以出现“++”以上凝集的血凝素最高稀释倍数的倒数为其血凝效价。HI 试验中抗原采用 4 单位凝集抗原。

1.7.3 血凝抑制试验(HI) 取灭活后的待检血清 50 μL ,加入 pH 9.0 BS 150 μL 、25% 的高岭土 200 μL ,振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取上清。加入 50 μL 鸽红细胞泥,混匀,冰浴吸附 20 min,1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清,即为 1:8 稀释度的被检血清。

取 96 孔 V 型微量板,每孔加入 pH 9.0 的 BABS 25 μL ,于每排第一孔加入 25 μL 处理过的被检血清,混匀后吸取 25 μL 至第二孔,混匀,以此倍比稀释至最后一孔,最后一孔弃 25 μL 。于每孔中加入 25 μL 4 单位的血凝素,室温作用 1 h 后加入 50 μL 0.33% 的鸽红细胞悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后判断结果。

1.8 仔猪免疫试验

1.8.1 仔猪抗体水平的测定 28 日龄乙脑抗体阴性仔猪 20 头,随机分为 4 组,每组 5 只。分别用自制的 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗、HW1 株商品化鼠脑灭活苗以及 PBS 对仔猪进行免疫,每只肌肉注射 2 mL,首免后 14 d 以同等剂量加强免疫一次。

所有仔猪于首免后 0、1、2、3、4、5 周采血,分离血清,使用武汉科前公司乙脑抗体检测试剂盒检测血清 IgG 抗体,并使用 SPSS 对数据进行分析。

1.8.2 空斑减少中和试验 仔猪 2 免后 2 周,无菌采血并分离血清。用不含血清的 DMEM 培养基 2 倍梯度稀释待检血清,56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min。取 100 μL 适当稀释梯度的待检血清与含 100 PFU 的乙脑病毒等体积混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后,加入长满单层 BHK-21 细胞的 6 孔细胞培养板中,每孔 200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h 后弃病毒液,按 2 mL \cdot 孔⁻¹ 加入含 1.25% 甲基纤维素的维持液,于 37 $^{\circ}\text{C}$,含 5% CO_2 培养箱中连续培养 3~5 d,弃维持液,结晶紫染色液染色固定 20 min,流水反复冲洗细胞板,根据病毒蚀斑形成数计算血清中和抗体效价。

2 结果

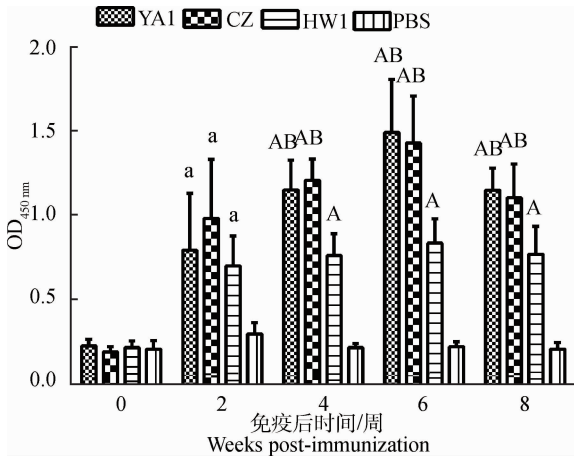
2.1 病毒毒价的测定

复苏后的乙脑病毒 YA1 株、CZ 株细胞毒的 LD₅₀ 较低,分别为 10^{3.7}、10^{4.4} LD₅₀ \cdot 0.04 mL⁻¹,在鼠脑上连续传代 5 次后病毒 LD₅₀ 明显上升,分别为 10^{7.0}、10^{7.5} LD₅₀ \cdot 0.04 mL⁻¹。

2.2 小鼠免疫试验效果

2.2.1 小鼠血清乙脑 IgG 抗体的检测 免疫 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗和 HW1 株商品化鼠脑灭活苗组的小鼠在免疫后的第 2 周都能产生一定的抗体,与 PBS 对照组相比差异显著 ($P < 0.05$),但各免疫组间差异不显著;免疫后第 4 周,3 种灭活苗组小鼠的抗体水平进一步提升,与 PBS 对照组相比差异均极显著 ($P < 0.01$),其中 YA1、CZ 株灭活苗组小鼠与 HW1 株灭活苗组小鼠抗体水平差异极显著 ($P < 0.01$),但组间差异不显著;免疫后第 6 周,各灭活苗组小鼠抗体水平还有一定的提高,与 PBS 对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$),其中 YA1、CZ 株灭活苗组小鼠与 HW1 株灭活苗组小鼠抗体水平相比差异极显著 ($P < 0.01$),组间差异仍不显著;免疫后第 8 周,各组小鼠抗体水平均出现下降,但与 PBS 对照组相比抗体水平差异仍极显著 ($P < 0.01$),其中 YA1 和 CZ 株灭活苗组相比 HW1 株灭活苗组小鼠抗体水平差异仍极显著 ($P < 0.01$),组间差异依然不显著,详见图 1。YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗的免疫原性均优于 HW1 株商品化鼠脑灭活苗,但组间差异不显著。

2.2.2 小鼠免疫攻毒保护试验 2 免后 7 d 对小



与 PBS 对照组相比, a. $P < 0.05$, A. $P < 0.01$; 与 HW1 组相比, b. $P < 0.05$, B. $P < 0.01$; 与 YA1 组相比, c. $P < 0.05$, C. $P < 0.01$

Compared with PBS group, a. $P < 0.05$, A. $P < 0.01$; Compared with HW1 group, b. $P < 0.05$, B. $P < 0.01$; Compared with YA1 group, c. $P < 0.05$, C. $P < 0.01$

图 1 不同疫苗免疫小鼠前后抗体水平的动态变化
Fig. 1 Kinetic change of antibody level in mice of different vaccines post immunization

鼠进行脑内攻毒。结果(图 2)显示, YA1 株鼠脑灭活苗原液、10 倍稀释液、100 倍稀释液对小鼠的保护率分别为 70%、50%、30%, CZ 株鼠脑灭活苗原液、10 倍稀释液、100 倍稀释液对小鼠的保护率分别为 80%、60%、40%, HW1 株商品化鼠脑灭活苗对小鼠的保护率为 60%。CZ 株鼠脑灭活苗免疫原性优于 YA1 株及 HW1 株鼠脑灭活苗。

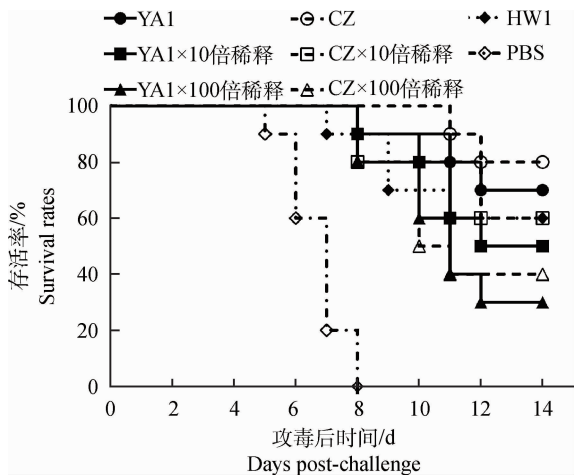
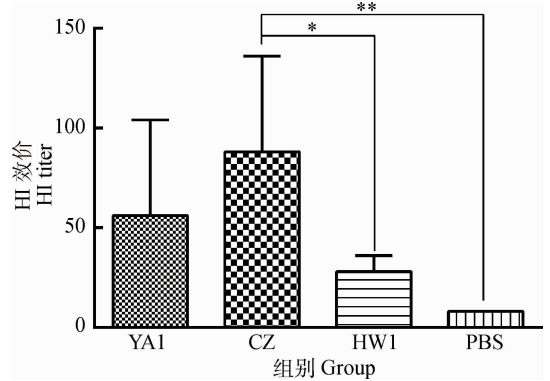


图 2 小鼠免疫攻毒后存活率
Fig. 2 Survival rate of the immunized mice after challenge

2.3 豚鼠免疫试验效果

制备的 YA1 株乙脑病毒血凝素抗原的血凝效价为 $1 : 2^8$, 可用于血凝抑制试验。2 免后 2 周, CZ

株灭活苗组豚鼠产生的血凝抑制抗体水平显著高于 HW1 株 ($P < 0.05$)、极显著高于 PBS 对照组 ($P < 0.01$), 但与 YA1 株之间差异不显著(图 3)。YA1 株、HW1 株灭活苗组豚鼠以及 PBS 对照组豚鼠产生的血凝抑制抗体之间差异不显著。结果表明, CZ 株灭活苗的免疫原性优于 YA1 株和 HW1 株。

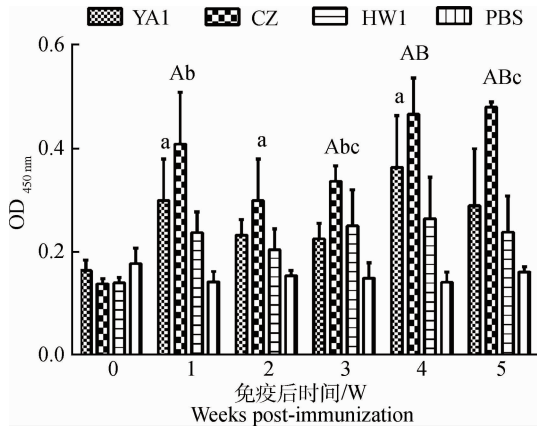


*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$
图 3 豚鼠血凝抑制抗体检测结果
Fig. 3 Results of hemagglutination inhibition antibody detection of guinea pigs

2.4 仔猪免疫试验

2.4.1 仔猪血清乙脑 IgG 抗体检测 结果见图 4。YA1 株灭活苗组仔猪在免疫后一周与 PBS 对照组相比抗体水平显著上升 ($P < 0.05$), 免疫后两周抗体水平出现一定水平的下降, 并在加强免疫后两周抗体水平回升并显著高于 PBS 对照组 ($P < 0.05$)。CZ 株灭活苗组在免疫后一周抗体水平显著上升, 极显著高于 PBS 对照组 ($P < 0.01$), 显著高于 HW1 商品化灭活苗组 ($P < 0.05$), 第二周抗体水平有所下降, 二免后一周抗体水平回升至极显著高于 PBS 组 ($P < 0.01$), 显著高于 HW1 株商品化灭活苗组和 YA1 株灭活苗组 ($P < 0.05$), 并在二免后两周抗体水平上升至极显著高于 HW1 株商品化灭活苗组和 PBS 对照组 ($P < 0.01$), 二免后三周抗体水平还略有上升, 仍极显著高于 HW1 株商品化灭活苗组和 PBS 对照组 ($P < 0.01$), 显著高于 YA1 株灭活苗组 ($P < 0.05$)。HW1 株商品化灭活苗抗体水平虽有一定的起伏, 但与 PBS 对照组相比, 差异不显著。结果显示, YA1 株和 CZ 株灭活苗的免疫原性优于与 HW1 株商品化灭活苗, 且 CZ 株灭活苗相比 YA1 株灭活苗显示出更高的免疫原性。

2.4.2 空斑减少中和试验 2 免后 2 周, CZ 株灭活苗组仔猪产生的中和抗体效价显著高于 YA1



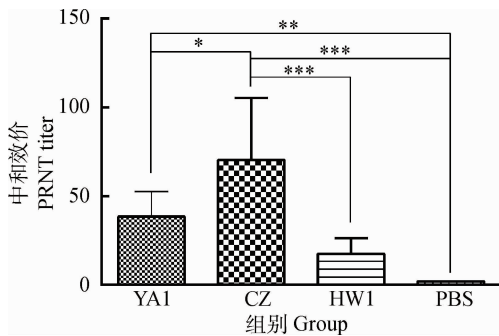
与 PBS 对照组相比, a. $P < 0.05$, A. $P < 0.01$; 与 HW1 组相比, b. $P < 0.05$, B. $P < 0.01$; 与 YA1 组相比, c. $P < 0.05$, C. $P < 0.01$

Compared with PBS group, a. $P < 0.05$, A. $P < 0.01$; Compared with HW1 group, b. $P < 0.05$, B. $P < 0.01$; Compared with YA1 group, c. $P < 0.05$, C. $P < 0.01$

图 4 不同疫苗免疫仔猪前后抗体水平的动态变化

Fig. 4 Kinetic change of antibody level in piglets of different vaccines post immunization

株灭活苗组 ($P < 0.05$), 极显著高于 HW1 株商品化灭活苗组和 PBS 对照组 ($P < 0.001$); YA1 株灭活苗组仔猪产生的中和抗体效价极显著高于 PBS 对照组 ($P < 0.01$), 但与 HW1 株商品化灭活苗组之间差异不显著; HW1 株灭活苗组仔猪产生的中和抗体效价与 PBS 对照组相比差异不显著。结果表明, YA1 株、CZ 株灭活苗的免疫原性高于 HW1 株, 其中 CZ 株更高。



*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$

图 5 仔猪血清中和抗体检测结果

Fig. 5 Results of serum neutralizing antibody detection of piglets

3 讨论

早先乙脑病毒的流行病学研究主要集中在 E 蛋白和小部分的基因组序列上, 较少进行综合性分析, N. Han 等^[15]收集了 873 份拥有完整基因组与宿主信息的乙脑病毒序列, 发现基因 I 型和基因 III

型乙脑病毒在遗传和宿主多样性方面存在显著差异, 相比 III 型病毒, I 型病毒具有更窄的宿主范围和更少的人源分离株。L. P. DO 等^[16]以同等病毒含量的基因 I 型和基因 III 型乙脑病毒同时接种 C6/36 细胞(蚊源)、PS 细胞(猪源)及 RD 细胞(人源), 在病毒传代过程中发现, I 型病毒更适于在 C6/36、PS 细胞中增殖, 而 III 型病毒更适于在 RD 细胞中增殖, 这也就解释了基因 I 型如何替代基因 III 型成为优势基因型, 同时也解释了基因 I 型乙脑病毒很少从人源材料中分离到。B. K. Kang 等^[17]在对基因 I 型和基因 III 型乙脑病毒的抗原关系进行比较后发现, 免疫 I 型和 III 型病毒所产生的血清能有效中和相对应基因型的乙脑病毒, 不能中和不同基因型的病毒。目前猪乙脑的预防主要采用减毒活疫苗 SA14-14-2, 围绕该毒株展开的工作也较多^[18-19], 该疫苗毒株源于人用疫苗毒株, 且为基因 III 型, 而国内乙脑流行的优势基因型已从 III 型转变为 I 型^[20]。基因型的转变对病毒的传播及疫情的暴发所带来的影响不得而知, 但重新评价当前基因 III 型乙脑疫苗的有效性以及研发基因 I 型乙脑疫苗是最有效的控制措施。

本研究使用的 2 个毒株均为基因 I 型, 其中 YA1 株为猪源毒株, CZ 株为蚊源毒株。在小鼠免疫试验中发现, 自制的 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗相较于 HW1 株灭活苗, 具有更好的免疫原性, 在首免后 2 周就能产生较高的 IgG 抗体。在接下来的小鼠攻毒保护试验中未经稀释的 YA1 株、CZ 株灭活苗的攻毒保护率分别为 70%、80%, 都高于 HW1 株灭活苗 60% 的攻毒保护率, 且 CZ 株灭活苗 10 倍稀释液的攻毒保护率也有 60%。该试验攻毒方式采用脑内攻毒, 相比传统腹腔攻毒模式, 病毒不用通过血脑屏障即可直接感染中枢神经系统, 因此相较于腹腔攻毒, 其保护率较低, 但在免疫原性筛选过程中其结果仍具有参考性。在豚鼠免疫试验中, 通过测定 YA1 株、CZ 株、HW1 株鼠脑灭活苗免疫豚鼠后所产生的血凝抑制抗体, 显示 YA1 株、CZ 株灭活苗产生的血凝抑制抗体明显高于 HW1 株。而在仔猪免疫试验中, 通过测定 YA1 株、CZ 株、HW1 株鼠脑灭活苗免疫仔猪后所产生的 IgG 抗体以及中和抗体的水平, 同样也得出 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗的免疫原性优于 HW1 株, 同时 CZ 株的免疫原性优于 YA1 株。本研究成功筛选出一株免疫原性好, 可用于制备猪用基因 I 型乙脑鼠脑灭活苗的毒株, 这不

仅为我国养猪业防控乙脑的流行奠定了一定的基础,还为猪用基因 I 型乙脑减毒活疫苗的研发提供了一株免疫原性好的毒株。

4 结 论

两株基因 I 型乙脑病毒 YA1 株、CZ 株鼠脑灭活苗在小鼠、豚鼠、仔猪上的免疫原性均优于商品化乙脑病毒鼠脑灭活苗 HW1 株,其中 CZ 株乙脑病毒鼠脑灭活苗相较于 YA1 株显示出更高的免疫原性。为猪用基因 I 型乙脑减毒活疫苗的研发提供了好的材料。

参考文献(References):

- [1] 周玉鹏,张亮,伍锐,等. 基因 I 型和基因 III 型日本脑炎病毒 RT-LAMP 鉴别检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(2): 135-141.
ZHOU Y P, ZHANG L, WU R, et al. Establishment of an RT-LAMP assay for identification of Japanese encephalitis virus genotype I and genotype III [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(2): 135-141. (in Chinese)
- [2] WANG H Y, LIANG G D. Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, 11: 435-448.
- [3] SOLOMON T, NI H L, BEASLEY D W C, et al. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia [J]. *J Virol*, 2003, 77(5): 3091-3098.
- [4] GAO X Y, LIU H, WANG H Y, et al. Southernmost Asia is the source of Japanese encephalitis virus (genotype 1) diversity from which the viruses disperse and evolve throughout Asia [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(9): e2459.
- [5] MOHAMMED M A F, GALBRAITH S E, RADFORD A D, et al. Molecular phylogenetic and evolutionary analyses of Muar strain of Japanese encephalitis virus reveal it is the missing fifth genotype [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(5): 855-862.
- [6] LI M H, FU S H, CHEN W X, et al. Genotype V Japanese encephalitis virus is emerging [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5(7): e1231.
- [7] TAKHAMPUNYA R, KIM H C, TIPPAYACHAI B, et al. Emergence of Japanese encephalitis virus genotype V in the Republic of Korea [J]. *Virol J*, 2011, 8: 449.
- [8] LE FLOHIC G, PORPHYRE V, BARBAZAN P, et

al. Review of climate, landscape, and viral genetics as drivers of the Japanese encephalitis virus ecology [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(9): e2208.

- [9] CHEN S P. Molecular phylogenetic and evolutionary analysis of Japanese encephalitis virus in China [J]. *Epidemiol Infect*, 2012, 140(9): 1637-1643.
- [10] YUN S M, CHO J E, JU Y R, et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus circulating in South Korea, 1983-2005 [J]. *Virol J*, 2010, 7: 127.
- [11] MA S P, YOSHIDA Y, MAKINO Y, et al. Short report: a major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 69(2): 151-154.
- [12] NGA P T, DEL CARMEN PARQUET M, CUONG V D, et al. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from South-east Asia to East Asia [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 6): 1625-1631.
- [13] FULMALI P V, SAPKAL G N, ATHAWALE S, et al. Introduction of Japanese encephalitis virus genotype I, India [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(2): 319-321.
- [14] FAN Y C, CHEN J M, CHEN Y Y, et al. Reduced neutralizing antibody titer against genotype I virus in swine immunized with a live-attenuated genotype III Japanese encephalitis virus vaccine [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 163(3-4): 248-256.
- [15] HAN N, ADAMS J, CHEN P, et al. Comparison of genotypes I and III in Japanese encephalitis virus reveals distinct differences in their genetic and host diversity [J]. *J Virol*, 2014, 88(19): 11469-11479.
- [16] DO L P, BUI T M, PHAN N T. Mechanism of Japanese encephalitis virus genotypes replacement based on human, porcine and mosquito-originated cell lines model [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(4): 333-336.
- [17] KANG B K, HWANG J M, MOON H, et al. Comparison of the antigenic relationship between Japanese encephalitis virus genotypes 1 and 3 [J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2016, 5(1): 26-30.
- [18] 李自力,陈焕春,徐高原,等. 表达乙脑病毒 PrM 基因重组伪狂犬病病毒的构建 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(1): 53-58.
LI Z L, CHEN H C, XU G Y, et al. Construction of recombinant virus strain TK-/gK-/PrM⁺ recombinized by pseudorabies virus Ea mutant strain TK/

- gK⁻/LacZ⁺ and PrM gene of Japanese encephalitis virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(1): 53-58. (in Chinese)
- [19] 王晓杜,赵凡凡,代 兵,等. 猪日本乙型脑炎病毒 DNA 复制子载体的构建及外源基因表达分析[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(1): 111-118.
WANG X D, ZHAO F F, DAI B, et al. Construction of DNA replicon vector of swine Japanese encephalitis virus and application of exogenous gene expression analysis[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(1): 111-118. (in Chinese)
- [20] PAN X L, LIU H, WANG H Y, et al. Emergence of genotype I of Japanese encephalitis virus as the dominant genotype in Asia[J]. *J Virol*, 2011, 85(19): 9847-9853.

(编辑 白永平)