

# 家鷄对乙型脑炎病毒自然感染的研究\*

吳皎如 吳樹吟 張華杰

(福建省流行病学研究所)

## 引 言

乙型脑炎的动物宿主,据文献記載馬<sup>[1-3]</sup>、猪<sup>[4]</sup>、牛<sup>[5]</sup>、羊<sup>[6]</sup>曾由病兽的脑組織中分离出乙型脑炎病毒株,但对禽类带毒情况,文献上尚少見报告。仅于1947年, A. A. Сморгодинчев, Л. Я. Яблоновская<sup>[7]</sup>等在疫区检查196个野生禽类时分离出4株乙型脑炎病毒,其中1株系由山鷄脑組織分离出。此外,于1946年 Hammon, Reeve, Burroughs 等氏<sup>[8]</sup>在实验室作实验时,曾証明乙型脑炎病毒皮下注射鷄体时血中可以发现病毒;鴨类靜脉注射乙型脑炎病毒时,亦可产生毒血症。1946年 Sabin, Ginder, Matamoto 三氏<sup>[9]</sup>在日本、琉球和东京各地的鷄血清中未曾查出抗乙型脑炎抗体,由家鷄脑組織中分离出乙型脑炎病毒尚未見有报导。1954年夏季在福建乙型脑炎严重疫区某地农村中,当乙型脑炎流行高峯时,家鷄大量病死。当时我們怀疑家鷄致死原因,可能是鷄瘟流行,所以沒有注意,也沒有主动采取标本作病毒检查。家鷄发病情况,据农民反映,起初家鷄不吃东西,不活泼約1日,繼則头部下垂,眼閉,不能走动,数小时后死亡。当地农民和防疫人員怀疑和乙型脑炎有关系,自动送病鷄3头要求檢驗。我們將鷄脑取出作成悬液后,接种小白鼠乳鼠脑內。經8日,其中一个标本的小白鼠发病,症状典型;分离的毒株,經血清学检查为乙型脑炎病毒。我們对此株病毒尚不敢肯定是由鷄脑組織分离出,因当时亦在分离病人脑組織,且分离出十余株病毒;所以怀疑是否工作人員对标本发生意外污染或标本弄錯。1955年夏季又在該地区工作。严重疫区的农村发生家鷄死亡症状与1954年相同;我們开始注意家鷄突然发病死亡和乙型脑炎有关系。乃布置实验工作,避免一切可污染的机会,如专人作分离实验,同时不作其他材料的分离病毒工作,动物玻璃缸盖以鉄綫紗罩;不与其他动物混在一起。結果由四个病鷄脑組織中分离出二株病毒。經鑑定亦系乙型脑炎病毒。此时我們相信家鷄可以传染乙型脑炎病毒。茲将分离及鑑定情况报导如下。

## 材料与方法

以病鷄的脑組織为分离病毒的材料。死亡病鷄在15分钟內取脑組織。1954年的三个病鷄中有二个病鷄已死亡,一个瀕死;1958年四个病鷄俱系发病时即送檢驗室,采取材料,所以1955年的病鷄脑組織比1954年新鲜。

病鷄脑組織取出后立即放入已冷冻的研鉢內研磨成10%悬液。以pH8.0冰冻的牛肉湯为稀释液。将悬液先放于-20℃內冻结1—2小时,然后取出融化,以低速度离心10

\* 1957年11月8日收到。

分钟抽取上清液,每个标本注射三个4—8日乳鼠颅内,每批标本俱观察21日。如见小白鼠发病即取出解剖,以脑组织传代,但不作盲传。

**病毒鉴定:**将新分离的病毒毒株以血清学方法,赤血球凝集反应<sup>[10]</sup>,动物感染范围实验和交互保护试验鉴定其种属血清学方法,我们曾作赤血球凝集抑制试验,交互补体结合反应及交互中和反应等。

**赤血球凝集方法:**凝集素按照周培安氏方法制备,温度采取4°C、23°C和37°C三种,赤血球悬液采取人类、山羊、绵羊、牛、猪、马、猫、兔、豚鼠、小白鼠、鸡、鸽子等十二种动物的赤血球。

## 实验结果

1. 分离结果 两年来(1954—1955)从七个病鸡分离出3株病毒。

2. 病毒鉴定结果 对于分离病毒的鉴定,首先我们怀疑是否鸡瘟病毒,所以鉴定鸡瘟病毒的方法亦加以应用。

1) 赤血球凝集反应:以新分离的鸡病毒及中山株及地方株与不同动物赤血球作凝集反应;结果见表1。

表1 1955年由红鸡分离的病毒和各种动物赤血球作赤血球凝集反应

赤血球种类	鸡 <sub>1</sub> 病毒株			对 照 病 毒					
	4°C	23°C	37°C	中山株,乙型脑炎毒株			龙检 <sub>1</sub> 乙型脑炎毒株		
				4°C	23°C	37°C	4°C	23°C	37°C
人类赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
绵羊赤血球	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80
山羊赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
牛赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
猪赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
马赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
猫赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
兔赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
豚鼠赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
小白鼠赤血球	—	—	—	—	—	—	—	—	—
鸡赤血球	1:320	1:160	1:80	1:320	1:160	1:80	1:320	1:160	1:80
鸽子赤血球	1:1280	1:640	1:80	1:32	1:160	1:40	1:2560	1:1280	1:640

由表1可见由鸡分离的病毒,确非新城鸡瘟病毒,因其对许多种动物的赤血球俱不凝集他的作用和中山株及福建省分离的龙检<sub>1</sub>乙型脑炎病毒毒株的赤血球凝集谱相类似。又以抗中山株乙型脑炎病毒的高价免疫血清与鸡<sub>1</sub>毒株作赤血球凝集抑制反应,仍以中山株和龙检<sub>1</sub>乙型脑炎病毒作对照。结果抗中山株的免疫血清能抑制鸡<sub>1</sub>的赤血球凝集现象,抑制的强度与对照中山株、龙检相类似。

2) 动物感染范围试验:将感染鸡病毒的小白鼠脑组织悬液分别接种豚鼠、兔、鸽、鸡胚卵黄囊及绒毛尿囊膜,结果见表2,即是豚鼠、兔及鸽俱不发病;鸡胚胎卵黄囊接种后经24小时鸡胚胎死亡,但内脏未发现明显的出血点,皮肤有些出血斑。经绒毛尿囊膜接种

后, 在 37°C 孵育 72 小时, 絨毛尿囊膜上有明显的病灶, 但无出血点。由动物感染范围实验的结果可以看出鸡<sub>1</sub>、鸡<sub>2</sub>、鸡<sub>3</sub>各毒株非新城鸡瘟毒株。

表 2 由鸡分离出的毒株作动物感染范围试验结果

	小白鼠 (四星期)		豚鼠 (250 厘米)		白兔		鸽子	鸡 胚 胎	
	脑内	腹腔	脑内	腹腔	脑内	腹腔	肌内	卵黄囊内	絨毛尿囊膜上
鸡 <sub>1</sub> 毒株	++++	+	±	0	0	0	0	24小时死亡	明显的病灶无出血点
鸡 <sub>2</sub> 毒株	++++	+	±	0	0	0	0	24小时死亡	明显的病灶无出血点
鸡 <sub>3</sub> 毒株	++++	+	±	0	0	0	0	24小时死亡	明显的病灶无出血点
圣路易脑炎, 毒株	++++	-	±	0	0	0	0	±	明显的病灶无出血点
乙型脑炎毒株, 中山株	++++	+	±	0	0	0	0	±	明显的病灶无出血点
龙检, 毒株	++++	+	±	0	0	0	0	24小时死亡	明显的病灶无出血点
淋巴脉絡膜脑膜炎, 毒株	++++	±	++++	0	0	0	0	+	明显的病灶无出血点

±: 说明注射后有些不活泼, 在豚鼠体温升高 1°C 但二、三日恢复常态。  
 +: 说明小白鼠有病态, 鸡胚胎不活泼, 血管暗赤。

3) 交互补体结合反应和交互中和反应将鸡<sub>1</sub>、鸡<sub>2</sub>、鸡<sub>3</sub>各毒株制成抗原及免疫血清和中山株及龙检<sub>1</sub>的毒株的抗原及免疫血清作交互补体结合反应, 结果见表 3。补体结合反应的结果俱为强阳性。将鸡<sub>1</sub>、鸡<sub>2</sub>、鸡<sub>3</sub>各毒株及各免疫血清和中山株, 龙检<sub>1</sub>株的毒株及免疫血清作交互中和反应。结果见表 4。中和指数亦达 1,000, 由此两种反应的结果亦可证明由鸡分离各毒株系乙型脑炎毒株。

表 3 由鸡分离出病毒和中山株及龙检作交互补体结合反应结果

免疫血清	血清对照	病 毒 抗 原															
		鸡 <sub>1</sub> 毒株			鸡 <sub>2</sub> 毒株			鸡 <sub>3</sub> 毒株			中山株			龙检株			正抗原
		1.0 单位	1.5 单位	2.0 单位	1.0 单位	1.5 单位	2.0 单位	1.0 单位	1.5 单位	2.0 单位	1.0 单位	1.5 单位	2.0 单位	1.0 单位	1.5 单位	2.0 单位	1,1,5,2 单位
鸡 <sub>1</sub> 病毒	—	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	3	—
中山株	—	4	4	3	4	4	4	4	3	3	4	4	4	4	3	3	—
龙检, 毒株	—	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	4	4	4	—
鸡 <sub>2</sub> 病毒	—	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4	—
鸡 <sub>3</sub> 病毒	—	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4	—

表 4 相互中和试验

免疫血清	鸡 <sub>1</sub> 毒株		中山株		龙检, 毒株		鸡 <sub>2</sub> 毒株		鸡 <sub>3</sub> 毒株	
	50% 致死量	中和指数	50% 致死量	中和指数	50% 致死量	中和指数	50% 致死量	中和指数	50% 致死量	中和指数
鸡 <sub>1</sub> 毒株	10 <sup>-4.5</sup>	2,200	10 <sup>-5</sup>	1,000	10 <sup>-4</sup>	1,000	10 <sup>-5</sup>	1,000	10 <sup>-5</sup>	1,000
鸡 <sub>2</sub> 毒株	10 <sup>-4.5</sup>	2,200	10 <sup>-5</sup>	1,000	10 <sup>-4</sup>	1,000	10 <sup>-4.5</sup>	2,200	10 <sup>-5</sup>	1,000
鸡 <sub>3</sub> 毒株	10 <sup>-4.5</sup>	2,200	10 <sup>-5</sup>	1,000	10 <sup>-4</sup>	1,000	10 <sup>-5</sup>	1,000	10 <sup>-4</sup>	10,000
中山株	10 <sup>-5</sup>	1,000	10 <sup>-4</sup>	10,000	10 <sup>-4</sup>	1,000	10 <sup>-5</sup>	1,000	10 <sup>-5</sup>	1,000
龙检, 毒株	10 <sup>-5</sup>	1,000	10 <sup>-4.5</sup>	2,200	10 <sup>-3</sup>	10,000	10 <sup>-4.5</sup>	2,200	10 <sup>-5</sup>	1,000
正常血清	10 <sup>-3</sup>		10 <sup>-3</sup>		10 <sup>-7</sup>		10 <sup>-3</sup>		10 <sup>-3</sup>	

4) 交互保护試驗: 將鸡<sub>1</sub>毒株制成疫苗免疫一批小白鼠, 并以中山株和龙检<sub>1</sub>毒株亦制成疫苗各免疫一批小白鼠。然后以鸡<sub>1</sub>毒株和中山毒株, 龙检毒株为攻击病毒接种各免疫小白鼠結果見表 5。保护指数俱在 10,000 以上, 此項实验証明鸡<sub>1</sub>毒株是乙型脑炎病毒。

表 5 交互保护試驗

免疫鼠組	鸡 <sub>1</sub> 毒 株		中 山 株		龙 检, 毒 株	
	50%致死量	保护指数	50%致死量	保护指数	50%致死量	保护指数
鸡 <sub>1</sub> 毒 株	10 <sup>-3</sup>	100,000	10 <sup>-5</sup>	10,000	10 <sup>-3</sup>	28,180
中 山 株	10 <sup>-4</sup>	10,000	10 <sup>-4</sup>	100,000	10 <sup>-4</sup>	2,200
龙 检 <sub>1</sub> 毒 株	10 <sup>-4</sup>	10,000	10 <sup>-4.5</sup>	28,180	10 <sup>-2.5</sup>	35,480
正常小鼠	10 <sup>-8</sup>		10 <sup>-9</sup>		10 <sup>-7.5</sup>	

## 討 論

家鸡在严重疫区的发病季节和当地乙型脑炎流行最高峯的季节相符合, 并由病鸡脑組織內分离出脑炎病毒。这証明家鸡能传染乙型脑炎, 但对乙型脑炎的流行有否可能起动物宿主的作用尚須进一步研究。

1957 年度我們在疫区作动物宿主血清等調查时亦由 55 个家鸡抽取血液作补体結合反应和中和反应。結果补体結合反应有三个阳性, 补体結合抑止試驗亦有另三个阳性, 血清稀釋度为 1:32, 阳性率为 10%, 但中和反应全部阴性。这說明家鸡对乙型脑炎有近期隱性感染。

家鸡传染乙型脑炎的媒介, 我們怀疑三种昆虫: 鸡蜱螨、蚊类和台湾蠓。对蜱螨我們曾作病毒分离在数量約二、三百个中未分离出病毒。蚊类除伊蚊分离出病毒外, 当地其他蚊类未曾分离出病毒。伊蚊嗜血习惯对鸡不喜欢吸血, 因此可能性最大是蠓。他們常在鸡羣周围飞旋, 可以在飼养鸡羣的地方捕集許多蠓。但分离鸡蜱螨的时间系在 4 月份, 可能此時間太早, 温度过低, 病毒在昆虫体内发育不好, 所以未能分离出。在文献上曾記載 Hammon, W. M. 氏曾由鸡蜱中分离出一株脑炎病毒, 所以鸡蜱亦可能为乙型脑炎媒介宿主。

家鸡是农村家家飼养的家禽; 在实验室作实验, 家鸡可以发生毒血症, 这是 Hammon, W. M. 等氏的报导。虽然我們沒有由家鸡血液中分离出乙型脑炎病毒, 但由于許多家鸡罹患乙型脑炎而死亡, 可以推想到这些家鸡可能有一时期有毒血症, 这就扩大了流行性乙型脑炎的昆虫传播机会, 对于本病的流行病学上有重大意义。

## 总 結

1. 本文叙述在乙型脑炎严重流行区家鸡可以感染乙型脑炎, 并且死亡率非常高。
2. 分离出的 3 株病毒, 經用病毒学方法鑑定其生物学特性与标准病毒中山株及福建分离的龙检株相同。
3. 家鸡是农村中主要家禽对于乙型脑炎的播传有重大意义。

## 参 考 文 献

- [1] Kii, N., Ando, K., Sato, K., Okubo, K., Nakayama, T., Ichikaw, S. and Yamada, N., *Zikken, Igaku*, **Zassi**, **21**: 117, 1937.
- [2] Kii, N., Kuchii, T. and Kitaoka, N., *Rikugun Zui-Danpo*, **400**: 1203, 1942.
- [3] Burns, K. F., Tigert, W. D. and Matumoto, M., *Am. J. Hyg.*, **50**: 27, 1949.
- [4] Burns, K. F., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **75**: 621, 1950.
- [5] Shimizu, T., Mochizuki, H., Sugawa, Y., Okazaki, K., and Matumoto, M., *2nd Rept. Jap. Equine Encephalitis*, P. 111, 1951.
- [6] Tabuchi, E., Hosoba, T., Akiyama, Y., and Narita, R., *2nd Rept. Jap. Equine Encephalitis*, P. 165, 1951.
- [7] А. А. Смородиной, Л. Я. Яблоновская и Д. И. Фибиков, *Неуровирусные инфекции*, 225—234.
- [8] Hammon, W. M., Reeves, W. C. and Burroughs, R., 1946, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **N. Y.**, **61**: 304, 1946.
- [9] Sabin, A. B., Ginder, D. R. and Matumoto, M., 1946 *Amer. J. Hyg.*, **46**: 341, 1945.
- [10] 周培安, *微生物学报*, **4**: 67, 1956.

## ON THE STUDY OF ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATED FROM NATURALLY INFECTED CHICKEN

WU, C. J., WU, S. N. AND CHANG, H. C.

During the epidemics of B type encephalitis in 1954 and 1955 in Fukien, epizootic simultaneously occurred among chicken causing the loss of several hundred heads. From seven dead or dying birds, three strains of encephalitis virus were isolated from chicken brains, and identified to be B type encephalitis by the following tests: Hemagglutination test of a great variety of red blood cells; hemagglutination inhibition tests with serum prepared with Yakanawa strain; range of animal pathogenicity; cross neutralization and complement fixation tests with known B type encephalitis virus; and, finally, cross protection test in white mice. All the tests clearly indicated that the viruses isolated were not New Castles Disease virus, but B type encephalitis indistinguishable from those isolated from human cases in the same localities.

Attempt was made to isolate the virus from *Lashiohelea taiwana* captured from the chicken crops. However, probably owing to the early season, no positive results were obtained. But the possibility of chicken as a source of infection of B type encephalitis virus must now be considered in the control of this disease.