

臺灣家畜日本腦炎之研究

Ⅱ 猪隻日本腦炎病毒分離及其性狀

詹益波 陳茂振 蘇杰夫 劉焜炎

(臺灣省家畜衛生試驗所)

劉永和

(中國農村復興聯合委員會)

一、緒 言

1966年筆者等³曾就臺灣全省之猪隻實施較大規模之日本腦炎HI抗體調查，獲悉越夏猪隻之全省平均陽性率為55.7%，而未越夏猪隻則為18.9%。惟為證明本省猪隻確有本病之發生由猪分離日本腦炎病毒為一重大關鍵。

有關家畜日本腦炎病毒之分離，於1936年首先由城井¹⁰等自發生神經症狀之馬分離出日本腦炎病毒，其後日本於1947~1948年發生日本腦炎之大流行時，由山本等¹⁰，田淵等²，清水等¹⁰分別由牛、山羊及猪分離得日本腦炎病毒。在臺灣則於1958年由SAN-PIN WANG等¹¹，自蚊蟲分離出日本腦炎病毒。1966年筆者等曾試由猪死產胎兒分離日本腦炎病毒但未獲成功。鑑於中村等⁶及清水等¹⁴曾以實驗感染例證明，猪隻感染日本腦炎後將發生病毒血症(Viremia)，筆者等乃於1967年擇定腦炎流行地區——新莊之養猪戶，自腦炎流行期前之5月下旬起每週採血一次，試圖由自然感染之小猪血液分離腦炎病毒，結果卒獲成功，茲將病毒分離經過及病毒性狀檢查結果報告如下，敬請海內外先進賜予指正。

二、試驗材料

1. 猪隻：為飼養於臺北縣新莊鎮農戶約2個多月齡之猪隻，經採血檢查結果無日本腦炎抗體者。
2. 白鼠：由本所動物繁殖室供應。病毒分離用者係3—5日齡之哺乳白鼠。
3. 藥品：Sodium Desoxycholate；美國Difco Lab. 製品。Ether；美國Baker chemical Co. 製品。
4. 毒株：日本腦炎病毒中山株及富士株係椿原彥吉博士於1963年由日本携來分讓本所者。
5. 抗日本腦炎病毒血清：係使用無日本腦炎抗體家兔，經高度免疫後製取。
6. HI test 用抗原：將感染白鼠腦乳劑經Aceton及Ether處理後冷凍乾燥而成。
7. 細菌濾過器：Mandler filter Allen Co. 製品，Toledo, Ohio, U.S.A.

三、試驗方法

1. 病毒分離方法：由腦炎流行地區之養猪農戶，選擇經抽血檢查無日本腦炎抗體之小猪4隻，每週採血一次，加入Acid—Citrate—Dextrose⁴阻止其凝固後以冷凍瓶水凍携返淡水本所。隨即接種於哺乳白鼠2—3窩。每次採血所得部份血液則分離血清後檢查其HI抗體，以明瞭該4隻小猪是否已感染日本腦炎。

2. HI test 血清 Acetone 處理方法：取被檢血清 0.2ml 于小試管加入 4 ml 之冷 Acetone 塞緊橡皮塞振盪 5 分鐘，遠心分離 1,500rpm 5 分鐘，棄上清。再重複上述操作一次，將沈渣擴散於試管內壁，放入玻璃乾燥瓶內以真空幫浦乾燥約 1 小時，加入 2 ml 之 PH 9.0 BBS，置 4 °C 1

夜使溶解，翌日加入 0.05ml 經生理食鹽水洗滌過之鵝血球，冰浴15分鐘，以低溫（4~10°C）遠心分離 3,000rpm 7分鐘，上清液以 1:10血清使用。

3.HI test 方法：依照筆者等於第 1 報⁸ 所述之方法實施。

4.Ether 感受性試驗方法：在病毒乳劑中加入20% Ether，放入 Screw cap 試管內以絆創膏紮緊振盪，置 4°C20 小時，另以病毒稀釋液代替 Ether 同樣處置之病毒乳劑為對照，翌日倒出 Petri dish 內，置室溫去蓋，使 Ether 蒸發，15分鐘後接種於幼齡白鼠腦內，測定其感染價並與對照做比較。

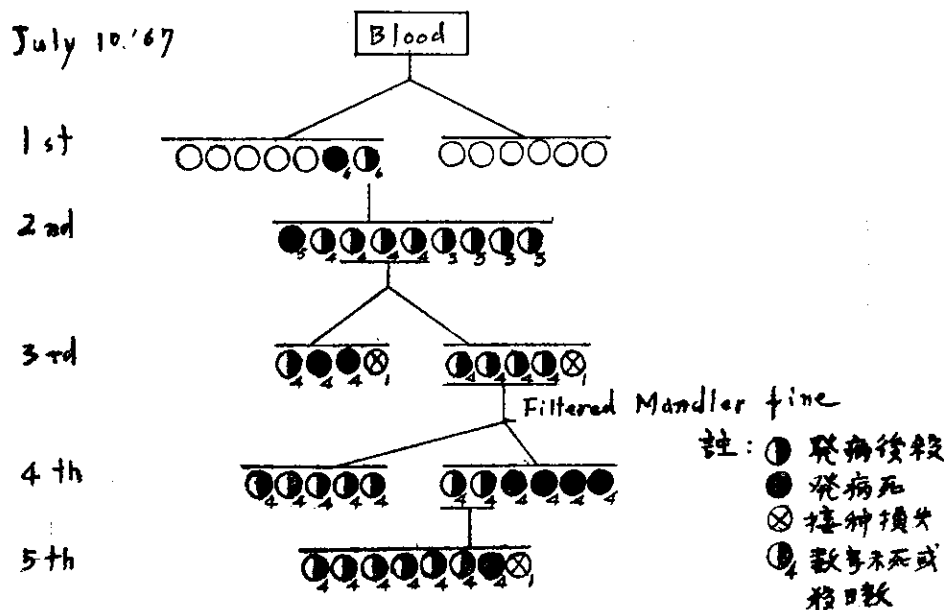
5.Sodium Desoxycholate 感受性試驗方法：將病毒乳劑經 Mandler fine 細菌濾過器濾過後以 2% 血清 PBS10 進稀釋，每支試管加入等量0.2% Sodium Desoxycholate 置 37°C1 小時，另以病毒稀釋液代替 0.2% Sodium Desoxycholate 同樣操作之病毒液為對照，將實驗組與對照組之各小試管內容分別接種於幼齡白鼠腦內測其感染價並與對照做比較。

四、試驗結果

1. 猪日本腦炎病毒分離結果

病毒分離工作自1967年5月22日開始，每週採血一次，前後共採血13次，終於7月10日所採血並接種於兩窩哺乳白鼠中之二隻於第 6 日發病，採取其腦製成乳劑，再接種於 9 隻哺乳白鼠結果，全數於第 3 日發病，呈顯興奮、戰慄症狀，至第 4 日則呈顯痙攣、痲痺等神經症狀。至第 3 代時以 Mandler Bacteriological filter fine 濾過後，將濾液接種於第 4 代，結果仍於第 3 日發病，部份於第 4 日即斃死。病毒分離後通過白鼠繼代情形，請參見圖 1。

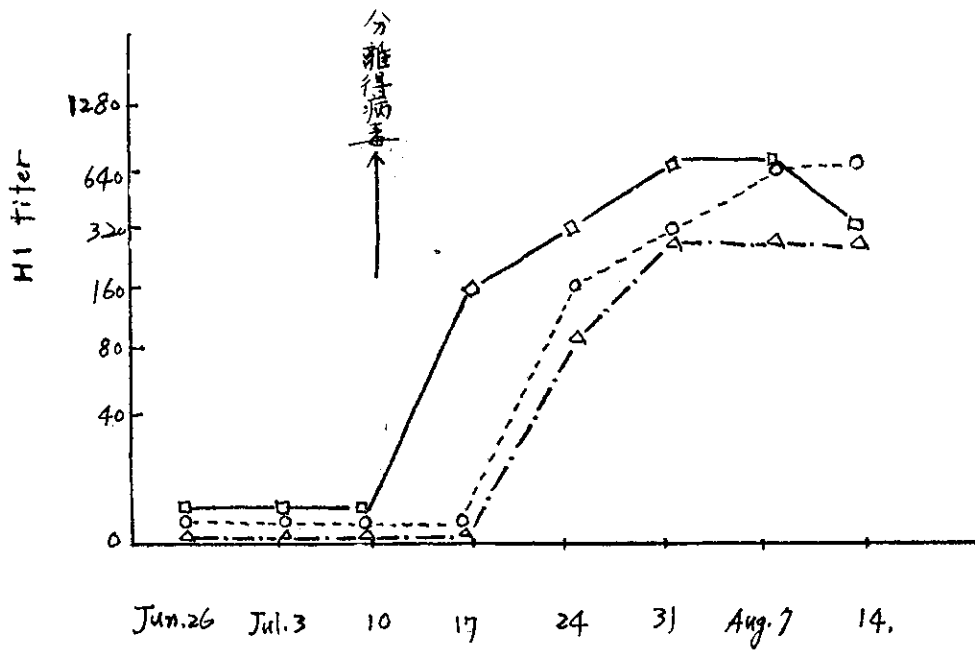
圖 1 病毒分離及哺乳白鼠繼代情形



2. 病毒分離供試猪隻 H I 抗體出現情形

病毒分離供試猪隻於每週採血時分離血清檢查其 H I 抗體之出現情形結果，至分離得病毒之 7 月 10 日，其 H I 抗體均為陰性，一週後之 7 月 17 日已有 1 隻轉呈陽性，其 H I 價一躍上升至 1:160，另 2 隻亦於 2 週後之 7 月 24 日轉呈陽性，其 H I 價為 1:160 及 1:80，並於 3~4 週後達最高峯。由上述檢查成績可知猪隻於感染日本腦炎而發生 Viremia 後，在一週至 2 週之內其 H I 抗體即出現而轉呈陽性（見圖 2）。

圖2 病毒分離與豬隻HI抗体出現情形



3. 分離病毒對於各種動物血球之凝集性

至目前所知日本腦炎病毒對於綿羊、鵝、初生雛等動物之血球具有凝集性，為明瞭分離所得病毒對於馬、黃牛、綿羊、豬、兔、天竺鼠、鵝、成鷄、初生雛等動物血球之凝集性，依據 Clarke & Casals¹ 之方法，實施紅血球凝集反應結果分離所得病毒對於鵝、初生雛及成鷄（凝集價僅有 1:100）之紅血球具有凝集性，但其對於馬、黃牛、綿羊、豬、兔、天竺鼠等動物之紅血球則無凝集性，而日本腦炎病毒富士株則對於鵝、初生雛及綿羊（凝集價僅達 1:500）之紅血球有凝集性，但對於馬、黃牛、豬、兔、天竺鼠、成鷄之紅血球則無凝集性（詳見表 1。）

表 1 分離病毒與日本腦炎富士株對於動物血球之凝集性

紅血球	毒株 稀釋倍數	分離所得病毒							日本腦炎富士株							
		100	500	1000	2000	4000	8000	Cont.	100	500	1000	2000	4000	8000	Cont.	
馬		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
黃牛		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
綿羊		-	-	-	-	-	-	-	+	⊕	-	-	-	-	-	-
豬		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
兔		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
天竺鼠		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鵝		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
成鷄		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
初生雛		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

註：+ 完全凝集

⊕ 不完全凝集

- 不凝集

4. 分離病毒紅血球凝集反應之最佳PH值

Arbo virus 之紅血球凝集反應對於 PH 值極為敏感¹⁷，其 PH 值必須在 6.2~6.8 之間始可發生紅血球凝集反應，但其抗原則須在 PH 9.0 時最安定，故必須將紅血球浮游於 PH 值較低之磷酸緩衝食鹽水 (PH 5.3~6.2) 使抗原液與血球浮游液等量混合時，獲得最適宜之 PH 值。為明瞭分離所得病毒紅血球凝集反應之最佳 PH 值，配製各種不同 PH 值 (PH 6.0~7.0) 之磷酸緩衝食鹽水浮游紅血球並與日本腦炎中山株為對照實施 HA test 結果列如表 2。

表 2 分離病毒與日本腦炎中山株之 HA test 適宜 PH 值

PH	分 離 所 得 病 毒							日 本 腦 炎 中 山 株						
	100	500	1000	2000	4000	8000	Cont.	100	500	1000	2000	4000	8000	Cont.
6.0	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
6.2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	⊕	-	-	-
6.4	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	±	-
6.6	+	+	+	⊕	-	-	-	+	+	⊕	-	-	-	-
6.8	+	+	±	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

註：+ 完全凝集 ⊕ 不完全凝集 ± ⊕與一之中間型 - 不凝集

由表 2 可知分離病毒與日本腦炎中山株之 HA test 最佳 PH 值均為 6.4，但分離病毒之適宜 PH 值稍偏於 6.6 而中山株則稍偏於 6.2。

5. 分離病毒接種於白鼠腹腔及皮下之病原性

Arbo A 羣病毒之宿主域較 Arbo B 羣病毒為廣，以末稍徑路接種於動物亦可使其發生致死性腦炎。反之 Arbo B 羣病毒之宿主域較狹，JBE, SLE 以腦內接種可引起致死性腦炎者僅限於 Mouse 及 Hamster，而對 Guinea pig, Rat, Rabbit 等則無病原性¹⁸。為明瞭分離病毒接種於白鼠腹腔及皮下之病原性乃將該病毒 10 進稀釋後每一階段稀釋液各接種於 3 隻體重 15~18g 之白鼠，另以日本腦炎病毒中山株為對照。結果如表 3 所示僅分離病毒腹腔接種組有部份白鼠發病斃死，分離病毒皮下組及 JEV 中山株腹腔，皮下組均全數健存。日本腦炎病毒中山株雖接種於白鼠腹腔內亦失去其病原性，極可能是由於該毒株已長期以腦內接種繼代，以致失去對末稍組織之親和性所致。

表 3 分離病毒與日本腦炎中山株接種於白鼠腹腔及皮下之病原性

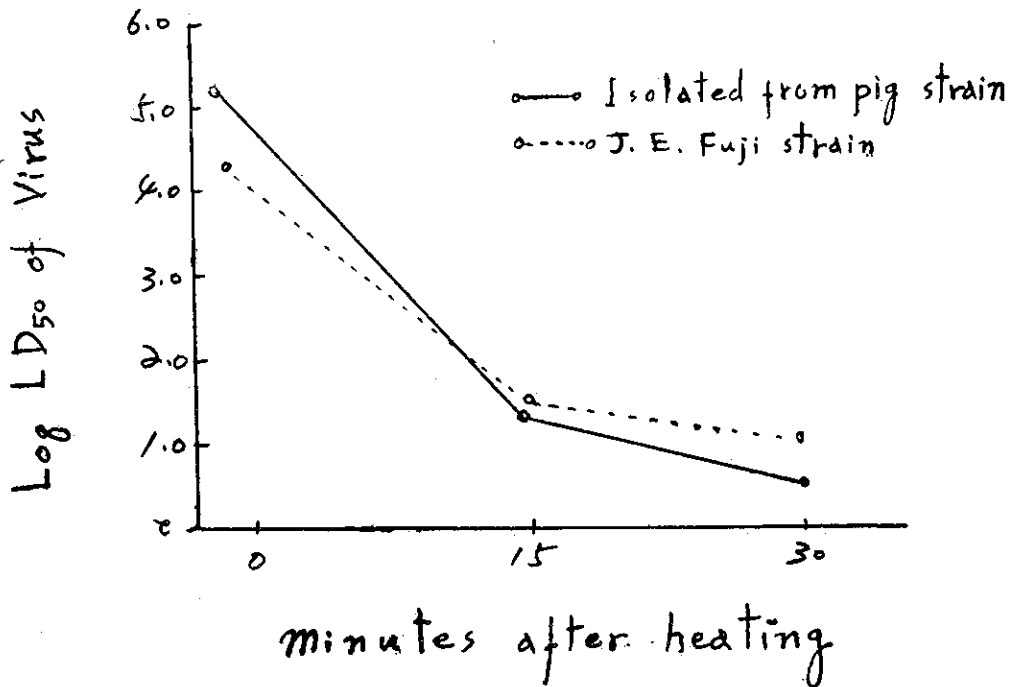
稀 釋 倍 數	分 離 病 毒			日 本 腦 炎 中 山 株		
	腹 腔 內	皮 下		腹 腔	皮 下	
10 ⁻¹	● ₅ ● ₅ ● ₆	○	○	○	○	○
10 ⁻²	● ₆ ○ ○	○	○	○	○	○
10 ⁻³	○ ○ ○	○	○	○	○	○
10 ⁻⁴	○ ○ ○	○	○	○	○	○

註：● 發病斃死，數字示斃死日數 ○ 健存

6. 分離病毒對於熱之抵抗力

為明瞭分離病毒對於熱 (56°C) 之抵抗力，以日本腦炎病毒富士株為對照，分別於加熱前，加熱15分鐘及加熱30分鐘後，接種於體重9~12公分之白鼠，結果如圖3所示，兩種毒株均受到56°C之滅能作用。分離病毒在加熱前之 Log LD₅₀ 為 5.16，56°C15' 後降低為 LD₅₀ 1.5，56°C30' 後再降低為 <0.8。富士株加熱前之 Log LD₅₀ 為 4.16，56°C15' 後降低為 1.5，56°C30' 後再降為 <1.16，兩毒株間並無顯著差異。

圖3 分離病毒與日本腦炎富士株於56°C之抵抗力



7. 分離病毒對於 Ethyl ether 及 Sodium desoxycholate 之感受性

吾人已知日本腦炎病毒對於20% Ethyl ether 及 0.1% Sodium desoxycholate 具有感受性，為瞭解分離病毒是否亦對於該兩種藥品具有感受性，乃實施感受性試驗，所得成績列如表4。分離病毒對於20% Ethyl ether 試驗羣與對照羣之差數為 Log LD₅₀ > 2.9，對於0.1% SDC 之差數為 > 2.3。JEV Fuji strain 對於20% Ethyl ether 之差數為 > 3.0。可知分離病毒對於20% Ethyl ether 及 0.1% Sodium desoxycholate 均具有感受性。

表4 分離病毒對於 Ethyl ether 與 Sodium desoxycholate 之感受性。

Virus	20% Ethyl Ether			0.1% SDC		
	試驗羣	對照羣	差數	試驗羣	對照羣	差數
Pig strain	< 1.0	3.9	> 2.9	< 1.0	3.3	> 2.3
JE Fuji	< 1.3	4.3	> 3.0	※	※	

註：數字示 Log LD₅₀

※ 示未實施

8. 分離病毒與各種腦炎病毒之交叉 HI test

將分離病毒與分讓所得 JEV, West Nile Virus, St. Louis Encephalitis Virus, Western Equine Encephalomyelitis Virus 分別免疫家兔，製取免疫血清後與分離病毒，JEV Nakayama 及 Fuji 等三種抗原實施交叉 HI test 結果，三種抗原與分離病毒，JEV, WN, SLE 等血清之間，雖略有強弱程度之差異，但全部互相呈顯類屬反應，但三種抗原與 WEE 免疫血清之間則完全不成立 HI 反應。

表五 分離病毒與各種腦炎病毒之交叉 HI test

Virus antigen	HI antibody titer					
	Anti serum					
	Pig strain	JE Nakayama	JE Fuji	West Nile	SLE	WEE
Pig strain	640	320	320	160	160	<10
JE Nakayama	640	320	160	320	320	<10
JE Fuji	320	160	320	160	160	<10

9. 分離病毒與日本腦炎免疫血清之中和試驗

由小豬血液分離得本病毒後，為求慎重起見擬送往日本實施同定工作，恰農復會李組長崇道於該(1967)年10月上旬前往日本出席OIE亞洲區域會議，乃煩請李組長携往日本家畜衛生試驗場實施中和試驗。承該場 Virus 第2研究室以子宮切除不給初乳之小豬免疫之抗 JEV Sagara serum 與筆者等之分離病毒使用 Porcine Kidney stable cell line (ESK No. 1)，並以分離自生來即振顫之豬腦之 JEV Sagara strain 為對照實施中和試驗，結果列如表6，分離所得病毒力價為 5.7 log TCID₅₀，而 JEV Sagara strain 為 5.3 log TCID₅₀ 極為相近，並同被免疫小豬血清所中和。

表六 分離所得病毒之中和試驗

毒株	JEV Sagara serum	病毒稀釋					病毒力價 (Log TCID ₅₀)	中和指數 (Log)
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		
臺灣	—		4/4	4/4	4/4	1/4	5.7	3.0
	1:10		1/4	0/4	0/4	0/4	2.7	
Sagara	—			4/4	3/4	0/4	5.3	2.6
	1:10	4/4	1/4	0/4	0/4	2.7		

註：分母為接種 ESK 試管支數
分子為發生 CPE 試管支數

五、討 論

豬不顯性感染日本腦炎時，必有短時日之病毒血症 (Viremia) 已由中村等^{5, 7}，清水等^{14, 16}

及 Scherer¹² 等以實驗感染例予以證明。至於由自然感染豬隻之病毒分離，中村等⁹ 曾於1960年7月8日由日本長野縣購入供實驗用之小豬10頭，於到達翌日採血檢查結果，自其中8頭之血液分離到日本腦炎病毒。此次筆者等策劃由自然感染小豬之血液分離日本腦炎病毒時，為求增加分離之機會，並節省哺乳白鼠隻數，乃採取將4隻豬血液混合後接種於2—3窩哺乳白鼠之方法，並卒獲成功。可知假如自腦炎流行期前，在不同地區頻回採血，並增加採血小豬隻數，分別接種於哺乳白鼠則由自然感染小豬分離多株日本腦炎病毒，當無多大困難。

分離 JEV 所使用之動物或組織培養細胞，中村等⁹ 曾以白鼠及各種組織培養細胞實施比較試驗結果，其敏感度之順序為(1)哺乳白鼠，(2)CE plaque 法及3—4週齡白鼠(3)Hamster Kidney cell (4)CE。大谷等¹⁰ 亦稱生後2—4日齡哺乳白鼠之感受性最高。因此筆者等實施病毒分離試驗時乃使用3—5日齡之白鼠。由接種兩窩13隻中僅2隻發病一事觀之，其血中病毒量似極為微量，但仍使哺乳白鼠發病斃死，可知其感受性甚高。

本試驗 JEV 分離供試豬隻於自然感染而發生 Viremia 後1—2週內其 HI 抗體即陽轉，基於此由 HI 抗體陽轉時期之調查亦可推定豬隻發生 Viremia 之時期。目前雖尚未確知自然感染後至發生 Viremia 之時間究竟需時多久，(中村等⁷ 曾以點鼻實驗感染獲知接種病毒後1—7日之間將發生 Viremia)。將來如解明自然感染至發生 Viremia 之時間，則亦可由 HI 抗體陽轉時期推定自然感染時期。

San-pin Wang 等¹¹ 曾將由臺灣之蚊子分離所得之日本腦炎病毒以腦內，經鼻、腹腔等徑路接種於成熟白鼠，結果腦內接種者發生典型症狀而斃死，經鼻接種者發生不規則症狀而斃死，腹腔接種者則全數健存。筆者等曾將由豬分離所得病毒，以腹腔及皮下接種於15~18gm之白鼠，結果僅腹腔接種之低倍數稀釋者發病斃死。San-pin Wang 等之成績與筆者等之成績稍有出入，極可能是由於 San-pin Wang 等所使用之白鼠為成熟白鼠，而筆者等所使用者為15~18gm未完全成熟之白鼠，亦即所使用白鼠之週齡不同，其感受性亦不同所致。

筆者等⁸ 曾於1968年3月至7月調查臺灣各縣豬隻日本腦炎 HI 抗體陽轉時期結果，臺灣各縣豬隻之陽轉時期係在6月下旬至7月下旬之間，而臺北縣之陽轉時期為7月下旬。此次病毒分離供試豬隻之陽轉時期為7月17日及7月24日，可見1967年臺北縣豬隻之陽轉時期當亦在7月中旬至7月下旬之間。換言之，1967年及1968年臺北縣豬隻 HI 抗體之陽轉時期約略相同。

六、結 論

為證實本省豬隻確有日本腦炎之發生，乃擇定腦炎流行地區養豬農戶之豬隻，自1967年5月下旬起每週採血一次，並接種於哺乳白鼠，試圖由自然感染之小豬血液分離日本腦炎病毒。結果由當年7月10日所採取之血液分離得日本腦炎病毒。

該病毒可通過 Mandler Bacteriological filter fine，可凝集鵝、初生雞及成雞(對成雞之凝集價甚低)之紅血球。該病毒 HA test 之最佳 PH 值為 6.4，接種於15~18gm白鼠之腦內或腹腔，可使白鼠發病斃死，但如接種於皮下則無致病力。並且可受到 56°C 之滅能作用，對於 0.1% Sodium Desoxycholate 及 20% Ether 具有感受性，可被日本腦炎免疫豬血清所中和。

又豬隻於感染日本腦炎而發生 Viremia 後，在 1—2 週之內，其 HI 抗體即出現而轉呈陽性。

註：本文要旨曾於民國五十六年十一月臺灣省畜牧獸醫學會年會上提出報告。

誌 謝

本試驗承蒙農復會李組長崇道、楊顧問守紳及陳所長守仕之指導與鼓勵，敬致衷心之謝忱。又承日本家畜衛生試驗場 Virus 第2研究室實施分離病毒之中和試驗，至深銘感，謹此申謝。

引用文献

- (1) Clarke & Casals (1958) : Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 561—573
- (2) 田淵英一、細田哲哉、秋山輝、成田亮一 (1951) : 山羊の日本脳炎に就いて・家畜衛生試験場研究報告 No. 23. 165—176.
- (3) 詹益波、呂清泉、陳茂振、劉燃炎、劉永和 (1967) : 臺灣家畜日本脳炎之研究。I. 越夏及未越夏猪日本脳炎之H I 抗體調査。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 4 : 1—11.
- (4) Nobuto. K. (1965) : *Modern Media* 11 : 368—374.
- (5) 詹益波、劉燃炎、陳茂振、李新進、劉永和 (1968) : 臺灣家畜日本脳炎之研究VI, 各縣猪隻日本脳炎H I 抗體陽轉時期, 母猪移行抗體之移行徑路及消失試驗, 臺灣省畜牧獸醫學會五十七年大會宣讀論文摘要。
- (6) 中村稔治、高松泰人、宮本猛 (1950) : 子豚における日本脳炎經鼻感染試験並びにワクチン應用試験。日本獸醫協會雜誌 3 : 240—244.
- (7) 中村J・中村H、野崎 (1964) : 仔豚と仔羊における日本脳炎ウイルス感染試験・ウイルス (12回學會記録), 14 : 252—253.
- (8) 中村稔治 (1967) : 動物の日本脳炎, 感染源の提供。神經研究の進歩11 : 223—233.
- (9) 中村稔治、中村肇、竹原孝一、川窪淳、刑誠海、野崎イワ子 (1965) : 獸疫としての日本脳炎及びそのワクチンに関する研究, ウイルス, 15 : 216.
- (10) 大谷明、奥野剛 (1967) : 日本脳炎ウイルス分離法, ウイルス實驗學各論, 國立予防衛生研究所學友會編 124—127.
- (11) San-pin Wang, J. Thomas Grayston & Stephen M. K. Hu (1962) : Encephalitis on Taiwan. III. Virus isolation from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 11 : 141—148.
- (12) Scherer, W. F., Moyer. J. T. & Izumi, T. (1959) : Immunologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan. V. Maternal Antibodies, Antibody Responses and Viremia following Infection of Swine. *J. Immunol.*, 83 : 620—626.
- (13) Shimizu, T. and Y. Kawakami (1949) : Report of Gov. Exp. Sta. *Anim. Hyg.*, 22, 117.
- (14) Shimizu, T., Kawakami, Y., Fukuhara, S., Matumoto, M. (1954) : Experimental stillbirth in pregnant swaine infected with Japanese Encephalitis virus. *Jap. J. Exp. Med.* 24 : 363—375.
- (15) 清水武彦 (1964) : Arthropod-born Encephalitis Viruses の宿主域、獸醫微生物學pp. 570.
- (16) 清水、川上 (1949) : 豚の流行性死産に就いて (特に日本脳炎との關係に就いて第2編日本脳炎ウイルスの仔豚に對する感染試験。家衛試研究報告, 22 : 151—158.
- (17) 須川章夫 (1967) : 日本脳炎血球凝集抑制反應。家畜傳染病の診斷 pp52—54.
- (18) 城井尙義、安藤啓三郎、佐藤久藏、大久保薫、中山富雄、市川收、山田誠 (1936) : 吾邦に於ける馬の流行性腦炎の原因學的研究。實驗醫學雜誌。21, 117—146.
- (19) 山本修太郎、椿原彦吉、吉田孝、原田熊幸 (1949) : 牛の日本脳炎に就いて。家畜衛生試験場研究報告 No. 22, 197—203.

Studies on Japanese Encephalitis of Domestic Animals in Taiwan

II. The isolation of Japanese Encephalitis virus of pigs and its properties

I. P. Chan, M. J. Chen, J. F. Su, J. Y. Liu

Taiwan provincial Research Institute for Animal Health

Y. H. Liu

Joint Commission on Rural Reconstruction

In order to prove the fact that pigs were infected with Japanese Encephalitis in Taiwan. We investigated on the pigs that selected from the stock farms of J. E. infected area. Trying to isolate the J. E. virus from naturally infected pig blood. We started the experiment, suckling mice inoculated with blood which taken from pigs that bled once a week, at the May. 22, 1967. After all, J. E. virus has been isolated from the pigs blood that bled on 10, July.

The isolated virus was filterable through the Mandler Bacteriological filter fine and could agglutinate the erythrocytes of goose, one-day old chicken and adult chicken. but the HA titer of adult chicken was too low. The best PH value for operating the HA test was 6. 4.

The isolated virus caused mice's (15--18gm) death by brain and intraperitoneal inoculation, but not by subcutaneous inoculation. And was sensitive to 0.1% Sodium Desoxycholate and 20% Ether. This virus attenuated by 56°C. 30' Inactivation and could be also neutralized by J. E. swine immunity sera. The HI antibody titer could be detected within 1-2 week after the infected pigs showed viremia.