

# 百日咳菌苗效力試驗\*

陳正仁 何秋民 王福賢

(衛生部生物製品研究所)

菌苗的效力試驗是測定菌苗好壞的準繩，是從事生物製品工作的重要工作方法。但因試驗動物種的不同、體重的不同，用腹腔、鼻腔、氣管、腦內、噴霧、吸入等方法的不同以及免疫方法與次數的不同均能影響菌苗效力試驗的結果。有些學者如 Leslie 1931年<sup>[7]</sup>，Culotta 1938年<sup>[8]</sup>，Kendrick 1947年<sup>[5]</sup>，春日忠善 1954年<sup>[9]</sup>等氏作過百日咳菌苗效力試驗的工作，且蘇聯生物製品法規、匈牙利生物製品法規以及美國生物製品標準法則也皆有百日咳菌苗效力試驗之規定，但方法上各有不同，且目前我國生物製品法規內尚無百日咳菌苗效力試驗之具體規定，茲根據上述影響免疫力之一些因素進行試驗，並用 LD<sub>50</sub>，ED<sub>50</sub> 以及絕對致死量的方法進行比較，本文報告初步試驗結果。

## 試驗材料

### (一) 菌苗

- (1) 衛生部生物製品研究所出品之百日咳菌苗。
- (2) 用非一相菌所作之非一相百日咳菌苗。

### (二) 小鼠

- (1) 昆明種小白鼠(純瑞士種)。
- (2) 混合種小白鼠。

(三) 攻毒用一相百日咳桿菌 18323 號菌株。

(四) 攻毒用培養基 30% 羊血土豆甘油瓊脂培養基。

(五) 攻毒用稀釋劑 1% 胰素消化乳酪素液。

## 試驗的方法及結果

### (一) 毒力與稀釋後放置時間的關係

作效力試驗時攻毒操作是很重要的，而攻毒操作中最重要的是掌握菌的毒力，文獻

\* 1956年10月12日收到。

[10]上認為百日咳菌的毒力與稀釋後放置時間有關,因此在試驗之先,對毒菌 18323 號進行了試驗,將該菌懸於 1% 消化乳酪素內於不同溫度放置不同時間後,作活菌計數,同時注射小白鼠,以觀察其毒力,將土豆甘油培養基上經 24 小時培養之 18323 菌刮入 1% 消化乳酪素液內用光電比濁計測定濃度由 26.32 億/毫升之菌液用 10 倍稀釋方法稀釋至  $10^{-6}$ ,用  $10^{-6}$  之菌液在稀釋後即刻與又在  $5^{\circ}\text{C}$  冰箱及  $20^{\circ}\text{C}$  室溫放置  $1\frac{1}{2}$  及 3 小時後,各接種 0.1 毫升於 30% 土豆甘油瓊脂大管斜面,在木盤上平放於  $37^{\circ}\text{C}$  培養 5 日,數記生長菌落之數目,共作三次結果見表 1。並於稀釋後  $\frac{1}{2}$  小時內及稀釋後 2 小時各作毒力試驗 3 次,結果見表 2。

表 1 18323 菌株在 1% 消化乳酪素液內於不同溫度放置不同時間活菌數之比較

試驗號 放置溫度及 活菌計數 的時間	1		2		3		三次平均數	
	5°C	20°C	5°C	20°C	5°C	20°C	5°C	20°C
	稀釋後立即活菌數	29	26	14	18	17	17	20
稀釋後 $1\frac{1}{2}$ 小時活菌數	27	24	16	16	21	23	21	21
稀釋後 3 小時活菌數	32	26	16	18	18	17	22	20

表 2 18323 菌株在 1% 消化乳酪素液內於稀釋後不同時間作毒力試驗的比較

試驗號	稀釋後於 $20^{\circ}\text{C}$ 室溫放置 $\frac{1}{2}$ 小時	稀釋後於 $20^{\circ}\text{C}$ 室溫放置 2 小時
	小鼠 $\text{LD}_{50}$ 菌數	小鼠 $\text{LD}_{50}$ 菌數
1	151	365
2	177	167
3	205	152
平均數	154	242

由表 1 及表 2 可清楚的看出 18323 菌株在 1% 消化乳酪素液於  $5^{\circ}\text{C}$  及  $20^{\circ}\text{C}$  放置 3 小時內活菌數無變化,在  $20^{\circ}\text{C}$  放置  $\frac{1}{2}$  小時及 2 小時對小鼠之毒力也一致無差別,與文獻<sup>[10]</sup>一定要在 1 小時內作完,否則會影響試驗結果之說法不相符合,且可肯定毒力及免疫力試驗如在 2 小時後作完,應不因時間因素影響試驗結果。

## (二) 不同攻毒方法作毒力試驗的比較

將  $37^{\circ}\text{C}$  經 24 小時培養的 18323 號菌刮入 1% 消化乳酪素液內,用三種方法,感

染小鼠：(1) 注射 0.04 毫升於腦內；(2) 在 1% 哥羅仿 9% 乙醚麻醉下滴 0.03 毫升於鼻腔內；(3) 注射 0.5 毫升於腹腔。小鼠均用 16—18 克者，腦內及鼻腔方法各觀察 14 日，腹腔方法觀察 4 日，由多數試驗結果可看出用腦內方法顯示出對小鼠之毒力甚強，一般  $LD_{50}$  劑量為數十個菌，鼻腔及腹腔方法顯示出對小鼠的毒力弱，一般為數十萬及數千萬至數億個菌，詳見表 3。且由腦內方法觀察到小鼠死亡較規律，鼻腔方法則不規律。

表 3 腦內、鼻腔、腹腔三種方法對小鼠毒力試驗的比較

注射毒菌方法	試驗結果 ( $LD_{50}$ 菌數)					
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	五次平均
腦內注射	78	21	80	51	50	56
鼻腔滴入	1,222,297	254,015	345,354	102,000	319,368	448,607
腹腔注射	540,000,000	1,040,000,000	350,000,000	1,100,000,000	66,000,000	619,000,000

除由表 3 可看出同種同體重小鼠用三種不同方法作毒力測定結果，腦內方法顯示出對小鼠毒力最強，鼻腔滴入及腹腔法則甚低。且腹腔方法不規律，鼻腔方法對同種但不同體重的小鼠的毒力則因小鼠體重的不同而有顯著的不同（見表 4），所以我們認為腦內注射是適於  $LD_{50}$ 、 $ED_{50}$  及絕對致死量三種方法作免疫力試驗的攻毒方法。

### (三) 不同體重小鼠對百日咳桿菌的抵抗力之比較

我們用同種不同體重小鼠，並用腦內、鼻腔、腹腔三種注射方法各進行試驗四次，能明確看出來不同體重之小鼠對百日咳菌之抵抗力是有不同，但與注射方法有關，詳見表 4。

由表 4 可看出鼻腔滴入方法中，11—14 克小鼠之  $LD_{50}$  菌最高數萬個菌，16—18 克者為數十萬個菌，20—22 克則為數千萬個菌，故明顯看出體重不同小鼠用鼻腔滴入方法，對百日咳菌之抵抗力有顯著之不同；但用腦內及腹腔方法則 11—14 克、16—18 克與 20—22 克的各組小鼠對百日咳桿菌之抵抗力無顯著的差別。

### (四) 不同種小鼠對百日咳菌抵抗力的比較

用 16—18 克純瑞士種小白鼠及混合種小白鼠及三種注射方法各作毒力測定兩次見表 5。

又用腦內注射方法繼續作了 20 次試驗，其結果純瑞士種小白鼠  $LD_{50}$  菌數 30% 為 101—200 個菌，70% 為 201—500 個菌，平均為 264 個菌。混合種小鼠  $LD_{50}$  菌數 15% 為 101—200 個菌，85% 為 80—20 個菌，平均為 64 個菌。因此我們可以清楚的

表 4 不同體重小鼠用不同注射方法對百日咳桿菌抵抗力的比較

注射方法	小鼠體重及結果				
	試驗號	11—14 克小鼠 LD <sub>50</sub> 菌數	16—18 克小鼠 LD <sub>50</sub> 菌數	20—22 克小鼠 LD <sub>50</sub> 菌數	24—26 克小鼠 LD <sub>50</sub> 菌數
鼻腔滴入	1	41,640	345,354	43,860,000	65,790,000
	2	37,832	254,015	—	—
	3	100,900	1,222,297	—	—
腦內注射	1	39	78	105	510
	2	33	21	105	217
	3	23	16	6	—
	4	56	80	18	—
腹腔注射	1	5.2 億	5.4 億	7.3 億	59 億
	2	1.6 億	10.4 億	5.9 億	—
	3	3.1 億	3.5 億	6.3 億	—
	4	3.9 億	11.0 億	11.2 億	—

表 5 不同種小鼠用三種不同方法對百日咳桿菌毒力的比較

小鼠種類及結果 試驗號數及注射方法		純 瑞 士 種 小 鼠 LD <sub>50</sub> 菌 數	混 合 種 小 鼠 LD <sub>50</sub> 菌 數	純瑞士種與混合種 LD <sub>50</sub> 菌數之比
腦 內 方 法	1	418	32	1 : 7.9
	2	261	53	
腦 內 方 法 平 均		339	43	
鼻 腔 方 法	1	4,244,516	102,000	1 : 26
	2	6,579,000	319,303	
鼻 腔 方 法 平 均		5,411,758	210,684	
腹 腔 方 法	1	0.76 億	0.76 億	1 : 1.07
	2	0.76 億	0.66 億	
腹 腔 方 法 平 法		0.76 億	0.71 億	

看出來，不同種小鼠對百日咳菌的抵抗力有顯著的不同，且與注射方法有關，純瑞士種小鼠用腦內方法對百日咳菌的抵抗力比混合種小鼠大 5—7 倍，用鼻腔方法比混合種小鼠大 25 倍，用腹腔方法則與混合種無差別。故作百日咳菌毒力試驗時，除注意注射方法外，尚應注意小鼠的種別。

### (五) 不同種小鼠免疫力試驗的比較

用 7—9 克純瑞士種及混合種小白鼠，各皮下免疫兩次，每次 5 億/0.5 毫升，第一次與第二次相距 7 日，第二次免疫後 10 日，注射含於 1% 消化乳酪素液之 18323 號毒菌 0.04 毫升於小鼠腦內，觀察 14 日。同一批菌苗用純瑞士種小鼠作免疫力試驗兩次，結果能保護 25,800 及 30,200 個 LD<sub>50</sub>，用混合種小鼠兩次結果只能保護 266 及 437 個 LD<sub>50</sub>，用不同批菌苗，純瑞士種及混合種小鼠各作免疫力試驗 20 次，結果純瑞士種小白鼠 20 次中有 4 次能保護 1,001—5,000 個 LD<sub>50</sub>，有 16 次能保護 5,001—50,000 個 LD<sub>50</sub>，平均能保護 25,274 個 LD<sub>50</sub>。混合種小白鼠 20 次中有 10 次能保護 101—1000，有 9 次能保護 1,001—5,000 個 LD<sub>50</sub>，只有一次能保護 10,000 個 LD<sub>50</sub>，平均能保護 1,700 個 LD<sub>50</sub>。故清楚地能看出純瑞士種小白鼠所顯示的免疫力較混合種小白鼠顯著的高，一般均高 10 倍以上。故作免疫力試驗以及判別免疫力試驗結果時應注意小鼠之種別。

### (六) 用 LD<sub>50</sub>，ED<sub>50</sub>，及絕對致死量三種方法作免疫力試驗的比較

LD<sub>50</sub> 及絕對致死量方法係將 7—9 克小鼠各免疫兩次，每次 5 億/0.5 毫升於皮下，攻毒時對照及免疫小鼠各分成 5 組，用 10 倍稀釋含不同菌數的 18323 號毒菌進行腦內

表 6 同一批菌苗 LD<sub>50</sub> 及絕對致死量兩種方法作免疫力試驗的比較

試驗 號 數	LD <sub>50</sub> 方法		非一相 菌免疫 小鼠能 保護 LD <sub>50</sub> 數	注射絕對致死量方法					非一相 菌苗 免疫小鼠 注射 1 D. C. L.* 活存率
	對照小 鼠 LD <sub>50</sub> 菌數	免疫小 鼠能保 護 LD <sub>50</sub> 數		對照小 鼠一絕 對致死 量菌數	免 疫 小 鼠				
					注射 1 D.C.L. 活存率	注射 10 D.C.L. 活存率	注射 100 D.C.L. 活存率	注射 1000 D.C.L. 活存率	
1	143	1366	—	800	90%	100%	90%	—	—
2	80	2857	—	800	100%	90%	100%	—	—
3	49	899	0	800	75%	75%	63%	—	0%
4	32	794	0	8000	70%	60%	—	—	0%
5	30	10371	0	800	70%	70%	80%	—	0%
6	155	366	—	800	63%	73%	45%	54%	—
7	52	371	—	8000	50%	50%	25%	—	—
8	62	1011	—	800	62%	75%	50%	—	—
9	51	1549	—	800	87%	37%	50%	50%	—
10	80	2846	—	800	100%	66%	88%	33%	—
11	35	4846	—	800	75%	75%	75%	25%	—
12	414	1069	—	8000	55%	88%	44%	33%	—
13	21	922	—	105	100%	85%	64%	40%	—
14	42	1884	—	800	86%	86%	80%	—	—

\* 1 D. C. L. 為一絕對致死量。

注射。LD<sub>50</sub> 方法用 Reed 氏計算法。絕對致死量方法則用對照及免疫小鼠各組分別計算死亡百分率方法計算結果。ED<sub>50</sub> 方法用 3 倍稀釋的 5 種不同濃度菌液免疫小鼠，攻毒時對照小鼠分 5 組用腦內方法注射不同量毒菌，各組免疫小鼠均注射同一攻擊量毒菌 (500—1000 LD<sub>50</sub>)，用 Reed 氏法計算對照小鼠 LD<sub>50</sub> 菌數及免疫組能保護 50% 的最小免疫量。將 210 批菌苗用前兩種方法同時作免疫力試驗 14 次，並用非一相菌苗作對照 3 次，用 13 批原液用 3 種方法同時作免疫力試驗 7 次。結果見表 6，表 7：

表 7 同一批菌苗 LD<sub>50</sub>，ED<sub>50</sub> 及絕對致死量三種方法作免疫力試驗的比較

試 驗 號	LD <sub>50</sub> 方法		ED <sub>50</sub> 方法		對照及免疫小鼠各注射絕對致死量方法				
	對照 LD <sub>50</sub> 菌數	免疫組 能保護 LD <sub>50</sub> 數	免疫組 攻毒量 (LD <sub>50</sub> 數)	ED <sub>50</sub> 之 免疫量	對照一 絕對致 死量菌 數	免 疫 小 鼠			
						注射 1 D.C.L.	注射 10 D.C.L.	注射 100 D.C.L.	注射 1000 D.C.L.
						活存率	活存率	活存率	活存率
15	102	1947	754	0.6 億	8000	64%	86%	64%	0%
16	80	8547	1000	1.0 億	8000	64%	56%	—	—
17	44	1247	100	1.0 億	8000	69%	46%	62%	42%
18	80	3125	1000	1.6 億	8000	67%	62%	57%	7%
19	80	1764	1000	0.8 億	8000	73%	67%	33%	8%
20	179	7702	447	0.4 億	8000	91%	75%	83%	33%
21	155	9370	510	0.46 億	8000	91%	81%	60%	40%

由表 6，表 7 的結果可看出，用 LD<sub>50</sub> 方法 210 批菌苗 14 次結果中最高能保護 10,371 個 LD<sub>50</sub>，最低能保護 366 個 LD<sub>50</sub>，大多數在 500—2000 之間。13 批原液 7 次結果，最高能保護 9370 個 LD<sub>50</sub> 最低能保護 1247 個 LD<sub>50</sub>，一般為數千個 LD<sub>50</sub>，由此可見同一批菌苗在多次試驗中可能偶而有數十倍之差，絕大多數有 10 倍以內之差別。用絕對致死量法時，免疫小鼠注射 1，10，100，1000 個絕對致死量，兩批菌苗 21 次試驗，注射一個絕對致死量者最低能保護 50%，最高保護 100%，一般能保護 60—80%，注射 10 絕對致死量者 21 次試驗中，19 次能保護 50% 以上。注射 100 絕對致死量者 19 次試驗中有 16 次能保護 50% 以上。注射 1000 絕對致死量者 12 次中尚有兩次能保護 50% 以上。用 ED<sub>50</sub> 方法，13 批菌苗 7 次試驗中最大 ED<sub>50</sub> 免疫劑量為 1.6 億，最小為 0.4 億，相差 4 倍，一般相差 1—3 倍。總之用腦內攻毒及 3 種免疫力試驗方法均能看出一相菌苗雖然因方法不同，在多次試驗結果中均有一定範圍以內之差別，但均能表示出一相菌苗有相當強度的免疫力，且非一相菌苗在連續 3 次同批試驗中，用 LD<sub>50</sub> 及絕對致死量方法均顯示毫無免疫力。

## 討 論

免疫方法不同及次數不同是會影響免疫力的結果的，Leslie<sup>[7]</sup> 最早用皮下兩次免疫方法，Kendrick<sup>[5]</sup> 用腹腔兩次免疫方法，春日<sup>[9]</sup> 用腹腔一次免疫的方法，我們在這方面作的試驗不多，在傷寒及百日咳方面均證明腹腔免疫比皮下免疫效果好，但皮下免疫也能產生相當免疫力，在百日咳方面一次皮下免疫不如兩次及3次皮下免疫好，又兩次與3次免疫的結果無顯著的差別。在採取與人體免疫一致及嚴格要求免疫力試驗的兩個原則下，我們確定了皮下兩次免疫的方法。

免疫力試驗攻毒方面 Silverthorne<sup>[2]</sup> 用腹腔注射，Burnet<sup>[3]</sup> 用鼻腔滴入，Bradford<sup>[4]</sup> 用氣管內注射，Kendrick<sup>[5]</sup> 用腦內注射及藤田浩<sup>[6]</sup> 用噴霧吸入等方法；我們只對腹腔注射，鼻腔滴入及腦內注射3種方法進行比較，發現腹腔及鼻腔方法小鼠死亡不規律，且需大量毒菌才能使小鼠致死，均不適用於作  $LD_{50}$  方法。且鼻腔滴入又有嚥入胃內及因小鼠種及體重之不同而對百日咳菌之抵抗力有顯著之不同。從另一方面看鼻腔滴入方法接近人類自然感染的情況，故應在提高與改進滴鼻技術的情況下作進一步的研究。至於腦內注射方法雖也有因小鼠種不同而對百日咳菌毒力有不同的抵抗力，但尚有一定的規律，且同種小鼠體重的大小對腦內注射毒力的結果無影響。許多一相百日咳桿菌用腦內方法顯示毒力很低，但國際菌 18323 號則毒力甚強，因此適合於用  $LD_{50}$ 、 $ED_{50}$  及絕對致死量3種方法進行試驗之用。另外我們用腹腔注射方法及鼻腔滴入方法作了十多次免疫力試驗，有時免疫小鼠顯示有免疫力，有時則無免疫力，有時死亡不規律，且免疫小鼠比對照小鼠死亡還多，是否是因毒性或過敏的關係是值得研究的。因為這些原因，我們選擇了腦內注射的攻毒方法。我們用皮下注射免疫兩次，每次5億，相距7日，第二次免疫後10日，用18323號菌株腦內攻毒，用  $LD_{50}$  及絕對致死量法計算。在數年中共用20株一相百日咳菌種，作了50次免疫力試驗及20批一相百日咳菌苗，各作40次免疫力試驗，結果均能看出相當強度之免疫力。

一般菌苗免疫力試驗多用  $LD_{50}$ 、 $ED_{50}$  及絕對致死量3種方法。我們用  $LD_{50}$  的方法在兩批菌苗21次試驗中除個別一次的結果相差約30倍外，大多數在5倍左右；用  $ED_{50}$  方法在同批菌苗7次試驗中  $ED_{50}$  免疫劑量相差1—4倍；Burrows氏<sup>[11]</sup> 以為  $LD_{50}$  方法可能有10倍以內之差別，Kendrick<sup>[12]</sup> 用同批菌苗經45次試驗， $ED_{50}$  劑量相差有1—10倍，最多相差20倍，同一批菌苗既然能有10倍之差，那麼不同批菌苗的結果，如相差在可能範圍（10倍以下）以內，就很難說那個比那個好。用絕對致死量方法21次試驗中注射一個絕對致死量者，全部能保護50%，最高100%，最低50%，一般在

60—80%；注射 10 個絕對致死量者 21 次中有 19 次能保護 50%，注射 100 個絕對致死量者 19 次中有 15 次能保護 50%；且在 21 次試驗中有 5 次免疫小鼠注射 10 個絕對致死量者，比注射 1 個絕對致死量者活存率反高，因此可說明對照及免疫小鼠各注射 1 個絕對致死量的方法是比較鬆的方法，且因免疫小鼠各組分別計算，常有因小鼠之個體差異而影響結果的可能。總之我們認為  $LD_{50}$ ， $ED_{50}$  及絕對致死量三種方法均能在質的方面肯定菌苗有效或無效，根據任何一種方法一兩次的結果很難精確的肯定那一批菌苗比另一批好或壞，但將試驗菌苗與對照菌苗，同時多作些次數，或將小鼠數目加多，用統計學方法將多次結果進行計算，或注意免疫組活存小鼠的體重等問題，可能使我們在菌苗免疫力試驗方面得出更精確的結果，是值得我們作進一步的試驗。

## 摘 要

(一) 將懸於 1% 消化乳酪素液之 18323 號菌液於  $5^{\circ}\text{C}$  及  $20^{\circ}\text{C}$  放置  $1\frac{1}{2}$  及 3 小時各作活菌計數之結果無差別。在  $\frac{1}{2}$  小時及 2 小時內用小鼠作毒力試驗結果亦一致無差別。

(二) 用腦內與腹腔注射方法及鼻腔滴入方法作毒力試驗，初步看出腦內注射方法所得結果較好，因腹腔注射及鼻腔滴入方法均需大量毒菌，且死亡不規律。小鼠體重之大小對鼻腔滴入方法之毒力試驗影響甚大。腦內注射方法小鼠死亡規律，需菌數少，且小鼠體重之差別對腦內注射之毒力試驗無影響。

(三) 不同體重小鼠對百日咳菌之抵抗力有不同，體重小的小鼠對百日咳菌比較敏感，特別在鼻腔滴入方法最明顯。

(四) 不同種小鼠對百日咳菌之抵抗力有不同，且注射百日咳菌苗後所產生的免疫力也不同。純瑞士種小鼠比混合種小鼠對百日咳菌抵抗力大，且顯示出的免疫力亦較大。

(五)  $LD_{50}$ ， $ED_{50}$  及絕對致死量方法均能在質上肯定一相菌苗與非一相菌苗有免疫力與無免疫力，但均不能精確的肯定不同批一相菌苗間的定量差別。



## 參 考 文 獻

- [1] Standfast, A. F. B., *J. Gen. Microbiol.*, 5: 250, 1951.
- [2] Silverthorne, N., *Cand. Public Health J.*, 29: 233, 1938.
- [3] Burnet, F. M. & Tinimins, C., *Brit. J. Exper. Path.*, 18: 83, 1937.
- [4] Bradford, W. L., *Am. J. Path.*, 14: 377, 1938.
- [5] Kendrick, P. L., *Am. J. Public Health*, 37: 803, 1947.
- [6] 藤日浩、山本宜男、金子順一，日本細菌學雜誌，10 (3):907, 1955.
- [7] Leslie, P. H. & Gardner, A. D. *J. Hyg.*, 31: 423, 1931.
- [8] Culotta, C. A., Martin, F. L. & Liefow, A. A., *Yale J. Biol. & Med.*, 10: 233, 1938.
- [9] 春日忠善，日本細菌學雜誌，9 (2):99, 1954.
- [10] Wadsworth, A. B., *Standard Methods*, third edition, p. 766, 1947.
- [11] Burrows, W., *J. Infect. Dis.*, 81: 157, 1947.
- [12] Kendrick, P. L., Updyke, E. L. & Eldering, G., *Am. J. Public Health*, 37: 179, 1949.

JOURNALS.IM.AC.CN

## POTENCY TEST FOR PERTUSSIS VACCINE

CHEN CHEN-JEN, HO CHIU-MIN and WANG FU-HSIEN

*National Vaccine and Serum Institute, Peking*

(ABSTRACT)

We have carried out experiments dealing with the various factors which might influence the potency test for pertussis vaccine and the results are summarized below:

1. H. pertussis strain No. 18323 grown on Bordet-Gengou medium for 24 hours was suspended in 1% solution of casamino acids. After the bacterial suspension had been kept separately at 5° and 20°C, duplicate sets of viable count and virulence test were carried out at ½—1½ and 2—3 hours intervals with identical results. This indicates practically no noticeable alternation of viability and virulence within 3 hours after being prepared at room temperature.

2. Virulence tests have been compared in mice in three different ways: (a) intracerebral injection of 0.04 ml, (b) intraperitoneal injection of 0.5 ml and (c) nasal inoculation of 0.03 ml, of bacterial suspension of known concentration. The intracerebral method was found to be satisfactory for the mice died more regularly and also only a small number of organisms was needed, usually 100 bacilli being enough to cause 50% mortality of the injected mice.

3. The weight of the mice used has been found to influence the result of the virulence test. Young mice weighing 11—14 gm. are more susceptible while large ones above 20 gm. are more resistant. This is well illustrated particularly in the nasal method.

4. Another factor is the species susceptibility of the mice. The Swiss mice originated from Indian Haffkine Institute have been found to be more resistant, while a mixed species raised locally is more susceptible. Because of this, results of the potency test reveal some difference in different species of mice.

5. Three applicable methods, LD<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub> and 100% mortality have all shown to be valuable in determining the potency qualitatively but not sensitive enough quantitatively. For instance, vaccines made from phase I organisms showed immunological effect while those from non-phase I organisms did not yield any. On the other hand, one lot of vaccine tested at different periods might show protection with variable quantitative results, even with 10 times differences.

In conclusion, we have worked out a method for potency test for pertussis vaccine by immunizing mice with two subcutaneous injections of 5 millions of bacilli each at weekly intervals and challenging with virulent organisms intracerebrally 10 days after the last immunizing dose. The results are calculated by either LD<sub>50</sub> or 100% mortality. The advantage of ED<sub>50</sub> is still under experiment.