

黃豆蛋白水解物作為傷寒疫苗液體 培養基的研究*

III. 培養物及其濾液的抗原性

林飛卿 章谷生 鄭寶芬 李新章†

(上海第一醫學院)

†(華南醫學院)

過去我們^[1,2]曾報告過用黃豆蛋白水解物培養傷寒桿菌陸軍 58 型,在不斷通入空氣的狀況下,經 8 小時的培養,最後細菌的生長濃度,要比在同一培養基或肉浸液中,採用靜止培養法高 5—8 倍。本文中繼續研究用此法培養所得細菌的毒力與抗原性問題,以檢查其是否符合製造傷寒疫苗的要求。傷寒桿菌的毒力與抗原性,是與該菌的 O 和 Vi 抗原密切相關的,因此在本實驗中,我們改用了含有豐富 O 和 Vi 抗原的傷寒桿菌 Ty₂ 型菌株,以代替含 Vi 抗原較少的陸軍 58 型菌株。試驗結果證明,該菌不僅在我們的培養條件下生長旺盛,而且保有良好的 O + Vi 抗原,表現在對實驗動物有很強的毒力與免疫作用。此外還證明,在培養物的液體部分,尚含有相當豐富的溶解性抗原,對實驗動物有良好的抗原性。

試驗材料與方法

(一) 材料

1. 培養基 按前法^[1]一次製成黃豆蛋白酸水解物 5 批,混合後,測定其所含總氮量為 7.56 毫克/毫升,氮氮量為 4.0 毫克/毫升,氯化鈉為 29.535 毫克/毫升。總氮量/氯化鈉為 1/3.9,用前將總氮量稀釋至 2.7 毫克/毫升,每 100 毫升稀釋培養基中加 K₂HPO₄ 0.2 毫克,並校正酸鹼度至 pH 7.4—7.6,即成為試驗用的培養基。此時氯化鈉的濃度為 $3.9 \times 2.7 = 10.52$ 毫克/毫升,比生理鹽水中的含量較高,但在實際應用中,對於細菌的繁殖並無妨礙。培養基製成後,分裝在裝有橡皮塞的燒瓶中,保存在 4°C 冰箱中,至少二年不發生改變。

* 1956 年 8 月 5 日收到。

李瑛英同志曾參加本實驗具體工作。

2. 菌種 (1) 傷寒桿菌 Ty₂ 型菌株: 是為本試驗的研究對象, 此菌的生長, 不需要色氨酸, 故可在酸水解物培養基中繁殖, 對體重 14—16 克小白鼠腹腔內注射的 LD₅₀ 為 50—100 百萬細菌。 (2) 傷寒桿菌 Vi—I 與 901—O 菌株: 用其製成 0.2% 蟻醛鹽水菌液, 作為測定免疫血清中的 Vi 與 O 抗體用的抗原。

3. 傷寒 Vi 與 O 診斷血清的製備 用傷寒桿菌 Ty₂ 與 901—O 型分別製成酒精^[3] 與蟻醛菌液, 每毫升含菌 1,000 百萬, 按 Felix 氏^[4] 方法免疫家兔。免疫前, 測定家兔血清內的正常抗體。當正常血清中傷寒桿菌 O 抗體的滴定度不超過 1/500, Vi 抗體不超過 1/10 者, 方可應用。免疫方法為靜脈注射疫苗兩次, 劑量為 500 和 1,000 百萬, 兩次間相隔一星期, 在第二次注射後 7 日取血, 分離血清, 測定其中所含傷寒 Vi 與 O 抗體。用傷寒桿菌 Ty₂ 型所製的免疫血清, 尚須用傷寒桿菌 901—H 型菌液, 吸去 O 與 H 抗體, 使僅留 Vi 抗體。吸收後的 Vi 血清凝集度為 1/64—1/128。傷寒桿菌 901—O 型免疫血清的 O 抗體凝集度為 1/2,560—1/10,240。製成後, 在血清中加入苯汞硼酸至 1:50,000 作為保存劑。

4. 通氣裝置 此次所用的吹氣頭, 係上海市國營玻璃廠出品的玻質 (sintered glass) 氣體過濾器, 直徑 3 厘米。使用時, 用真空抽氣機使培養基表面產生負壓。此時瓶外空氣經過棉花濾器與吹氣頭進入培養基中。用此種吹氣頭所產生的氣泡較粗, 在 8 小時的培養過程中, 無外溢現象, 因而可以不加抗泡沫劑, 比較方便(附裝置圖如下)。

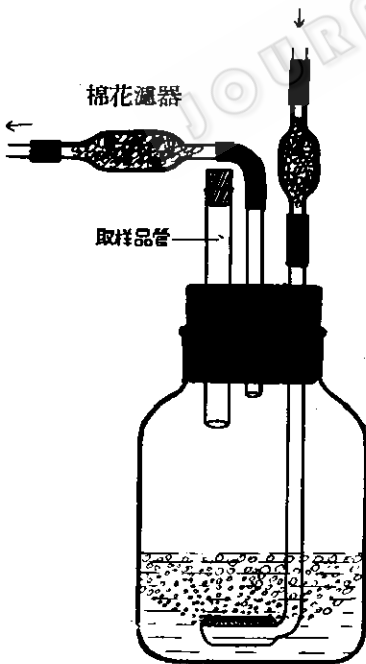


圖 1 通氣培養裝置

(二) 操作法

在盛有 250 毫升液體培養基的 1,000 毫升容量玻璃瓶中, 接種同一培養基的 16 小時培養物 2.5 毫升, 即 1% 容量。在 37°C 水箱中孵育 2 小時, 此時培養基已呈顯著混濁, 即可加入葡萄糖液至 0.3%, 並開始通氣。在通氣開始後的 4、6 與 8 小時各取樣品, 測定: (1) 培養物的酸鹼度; (2) 細菌的濃度; (3) 在傷寒 Vi 與 O 血清中的可凝集性; (4) 對小白鼠的毒力; (5) 小白鼠中的自動免疫試驗; (6) 引起家兔產生 Vi 與 O 抗體的作用和應用家兔免疫血清做小白鼠的保護試驗。同時應用肉浸液瓊脂培養物作為對照。

此外, 為了證實液體部分中尚含有大量溶解性抗

原，我們還將不同時期培養物，加鹼糾正其 pH，並用柏克非氏濾器過濾，在濾液中加入苯汞硼酸至 1:50,000，然後分別 (1) 用血凝試驗測定濾液內所含的 Vi 抗原；(2) 對小白鼠的自動免疫；(3) 引起家兔產生 Vi 與 O 抗體的作用和應用家兔免疫血清做小白鼠的保護力試驗。

在我們的實驗中，最長的培養時期為 8 小時，此後由於細菌濃度很高，培養基極粘稠，繼續通氣時，則所產生的氣泡有溢出瓶外的傾向，不易控制，故未繼續進行。

試 驗 結 果

(一) 液體培養物

1. 酸鹼度 在加入葡萄糖後短期內，培養基的 pH 值迅速下降，至 4 小時末，一般降至 pH 5.6—6.0，繼續培養時則 pH 逐步上升，至 8 小時末恢復至 pH 7.6 左右。如果在初期時加入葡萄糖過多，則 pH 就可能降至 5.0，此時即不易恢復，細菌的生長因而停止。

2. 液體培養基中細菌生長的濃度 培養物的細菌計數法係採用比濃計與傾注培養中之活菌計數。所用的細菌比濃計，係根據華東生物製品所由中央發給的標準比濃計，用硬質玻屑自製。用此比濃計所得的結果，在 8 小時培養過程內，與用活菌計數的結果基本上是相同的。

在 6 次試驗中，經 8 小時通氣培養後，細菌的最後生長濃度動搖在 50,400 百萬細菌/毫升至 60,600 百萬/毫升之間。在我們的工作條件下，細菌最後的生長濃度，顯然與空氣的進入量有關。我們所用的吹氣頭，其孔粗細很不一致。產生氣泡小而多的吹氣頭，在培養前階段時，對細菌的生長有利，但當細菌濃度上升，培養基的粘度增高時，細小的氣泡已不易形成，而孔大而粗的吹氣頭反而較好。8 小時後，由於培養物的粘度太高，所形成的泡沫不易自滅，常向外溢出。如有適當的抗泡沫劑和在培養後期補加葡萄糖，培養物的最後細菌濃度，可能還可以增高。

3. 在傷寒 Vi 與 O 血清中的可凝集性 將不同時期的培養物，用離心機高速沉澱 30 分鐘，除去上層清液，將沉澱物與傷寒 Vi 與 O 血清做玻片凝集試驗，檢查其是否保有豐富的 Vi 抗原。

在 5 個試驗中，用不同時期的培養物與診斷血清做玻片凝集試驗，結果發現在全部試驗中，培養物與傷寒 Vi 血清均凝集良好，與傷寒 O 血清始終不凝集。此點可以說明，經過 8 小時培養後，該菌株始終保持着良好的 Vi 抗原含量。

4. 對小白鼠的毒力試驗 傷寒桿菌的毒力試驗，是根據其所含的 Vi 與 O 抗原。

將培養物用肉浸液配成 3—4 個相差一倍的稀釋度,在一小時內,注射於體重 14—16 克小白鼠的腹腔內,每一稀釋度用 5 只小白鼠,觀察 5 日,根據小白鼠的死亡數量,計算出該培養物的 LD₅₀,同時還應用了 16 小時肉浸液瓊脂培養物作為對照。

在 5 個試驗中,我們比較了不同時期培養的培養物對小白鼠的毒力作用,結果發現在 8 小時的培養時期內,液體培養物對小白鼠的 LD₅₀ 劑量均為 100 百萬細菌以下,與肉浸液瓊脂培養物的毒力相仿。在不同培養期內,所得細菌的毒力平均數如下:

液體培養基: 2° = 61.5 百萬/毫升

4° = 61.0 百萬/毫升

6° = 56.0 百萬/毫升

8° = 81.0 百萬/毫升

固體培養基: 16° = 82.0 百萬/毫升

5. 小白鼠的自動免疫試驗 我們比較了 Felix 氏^[5] 與 Landy 氏^[6] 的自動免疫試驗方法。前者採用固定的免疫劑與不同量的對抗劑。後者則採用不同量的免疫劑與固定的對抗劑。結果我們發現 Landy 氏方法較 Felix 氏方法為敏感,所以選用了 Landy 氏方法。試驗方法係將培養物製成酒精疫苗。用前以生理鹽水將其稀釋成 5—7 個相差 4—5 倍的稀釋度,注射在體重 14—17 克小白鼠的腹腔內,每一稀釋度注射 10 只小白鼠,7 日後,在小白鼠的腹腔內注射傷寒桿菌 Ty₂ 型活菌 100 百萬,容量 0.5 毫升,觀察 5 日。在注射對抗劑量的同時,測定了對抗用菌株的毒力試驗。根據小白鼠的死亡數,用 Reed 與 Muench 氏方法計算出保護 50% 小白鼠免死於對抗劑所需的最少劑量的疫苗。一個代表性的試驗列於表 1。

表 1 液體與肉浸液瓊脂培養物的酒精疫苗在小白鼠中的自動免疫試驗的比較

疫苗來源 \ 免疫劑量	10**	2	0.5	0.1	0.02	0.005	0.001	保護 50% 小白鼠所需最小量的疫苗
4° 液體培養物	0/10*	1/10	0/10	1/10	8/9	5/9	6/9	0.029**
8° 液體培養物	0/10	3/10	4/10	1/10	2/9	6/10	7/10	0.016
肉浸液瓊脂培養物	0/10	2/10	1/9	0/9	6/10	4/9	9/9	0.020

* 分子代表死亡數,分母代表試驗小白鼠的總數。

** 單位為百萬細菌。

毒力對照試驗: 100 百萬細菌 4/5

50 百萬細菌 5/5

25 百萬細菌 3/5

12 百萬細菌 3/5

LD₅₀ = 17 百萬細菌

從表 1 中可知上兩種疫苗對小白鼠的自動免疫作用，沒有明顯的區別。

6. 引起家兔產生 Vi 與 O 抗體與應用家兔免疫血清對小白鼠的保護作用 將培養 8 小時液體培養物的酒精疫苗免疫家兔，按 Landy 氏^[6] 方法免疫，在免疫前，該項家兔血清中的正常傷寒桿菌 Vi 抗體凝集度不超過 1/10，O 抗體不超過 1/500。共計靜脈內注射疫苗 3 次，劑量為 500、1,000 與 1,000 百萬細菌，兩次注射的間隔為一週，在第三次注射後一星期取血，分離血清，不加保存劑，貯存在 -20°C 冰箱中待用。對照應用肉浸液瓊脂培養物酒精疫苗，兩組家兔各 16 只，體重在 2 公斤以上。

免疫家兔血清中傷寒抗體滴定度，係用個別血清分別測定。作為抗原懸液的菌種是傷寒桿菌 Vi—I 與 901—O 的蟻醛菌液，濃度為 300 百萬/毫升。

免疫家兔血清對小白鼠的保護力試驗方法，係將兩組免疫家兔血清分別等量地混合後進行，我們也比較了 Felix 氏^[7] 與 Landy 氏^[6] 方法。第一種方法係用固定量免疫血清注射在小白鼠的肌肉內，48 小時後，用不同對抗劑量作腹腔內注射，第二種方法係注射不同量免疫血清於小白鼠的腹腔內，一小時後，仍在腹腔內注射固定量對抗劑。比較結果，我們認為第二種方法的結果敏感得多，故將其採用。試驗時，將免疫血清用生理鹽水配成 5 個或較多個相差 4—5 倍的稀釋度，注射在體重 14—17 克小白鼠的腹腔內，每一稀釋度用 10 只小白鼠，一小時後，在腹腔內注射傷寒桿菌 Ty₂ 型 100 百萬細

表 2 兩種酒精疫苗免疫家兔血清中的傷寒抗體滴定度及其對小白鼠的保護作用

免疫用疫苗的來源	8 小時液體培養物	肉浸液瓊脂培養物	正常家兔血清(對照)
免疫家兔血清中 Vi 抗體的滴定度	<1:5	0*	1
	1:5	0	4
	1:10	1	4
	1:20	2	0
	1:40	3	3
	1:80	7	3
	1:160	2	1
	1:320	1	0
O 抗體滴定度	1:5, 120	0	3
	1:10, 240	3	13
	1:20, 480	13	0
混合家兔血清的保護作用	0.00119 毫升	0.00320 毫升	>0.2 毫升

* 表中數字代表家兔的數量。

毒力試驗： 100 百萬細菌 4/4
 50 百萬細菌 2/4
 25 百萬細菌 1/4
 LD₅₀ = 30.75 百萬

菌,作為對抗劑。同時應用了正常家兔血清作為對照,並測定了對抗菌的毒力。

從表 2 中,顯示液體培養物的免疫作用比固體培養物的免疫作用為高,這些區別是與其他學者的見解相符合^[8, 9]。液體疫苗之所以有較高免疫作用原因之一,是由於液體內尚存在着溶解性抗原,而此種溶解性抗原,在固體培養基中被瓊脂吸收而損失。為了證實這一點,在以後的試驗中,我們將培養物用柏克非氏濾器過濾;並用各種方法測定其中所含抗原與其對實驗動物的免疫作用。

(二) 液體培養物的濾液

1. 用血凝試驗法測定濾液中的溶解性抗原 我們應用了 Landy 氏^[10] 的血凝試驗法測定濾液中的 Vi 抗原,但用同一方法,則不能測出其中的 O 抗原。試驗方法,係將不同培養時期的濾液用生理鹽水稀釋至不同倍數,在各管中加入等量曾經洗濯過三次的 10% 家兔紅血球懸液,混合後,放在 37°C 水箱中 2 小時,每隔 15 分鐘振搖一次,取出後,再將血球用生理鹽水洗濯兩次,最後配成 1% 血球懸液。

正式試驗時,放小試管若干排於試管架上,每排試管內分別加入用不同稀釋度濾液所致敏的 1% 家兔血球 0.1 毫升與不同稀釋倍數的傷寒 Vi 血清 0.2 毫升,在 37°C 水箱中放置 2 小時,即可觀察結果。為了避免家兔血球的自凝現象,作為洗濯與配製血球用的濾液,一律用 3% MgSO₄ 以代替生理鹽水^[11]。

表 3 用血凝試驗法測定濾液中的傷寒 Vi 抗原

致敏用濾液及其稀釋度	4°C			6°C				8°C						
	1/2	1/4	1/8	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1/4	4	4	—	4	4	4	4	—	4	4	4	4	2	—
1/8	4	—	—	4	4	4	4	—	4	4	4	4	2	—
1/16	4	—	—	4	4	3	3	—	4	4	4	4	2	—
1/32	4	—	—	4	4	3	3	—	4	4	4	4	2	—
1/64	4	—	—	4	3	3	3	—	4	4	4	4	2	—
1/128	4	—	—	3	3	2	2	—	4	4	3	4	2	—
1/256	4	—	—	2	2	2	2	—	4	3	3	3	2	2
1/512	2	—	—	1	1	2	2	—	1	1	4	4	1	—
1/1024	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—
1/2048	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

從表 3 中,顯示培養時間愈長,則濾液中的抗原愈高。我們雖然不能用此法測出濾液中傷寒菌的 O 抗原,但在以後的家兔免疫試驗中, O 抗原顯然也是存在的。

2. 小白鼠的自動免疫試驗 按過濾前細菌的濃度 (4° = 15,600 百萬細菌/毫升, 6° = 34,800, 8° = 51,200), 將 4° 與 8° 濾液分別用生理鹽水稀釋成爲幾個相隔 4—5 倍

的稀釋度，注射於小白鼠腹腔內，容量為 0.5 毫升，一星期後在小白鼠的腹腔中注射傷寒桿菌 Ty₂ 型活菌 100 百萬細菌，觀察 5 日，同時做了對抗菌株的毒力試驗。一個代表性的實驗結果，列於表 4。

表 4 4° 與 8°C 液體培養物的濾液對小白鼠的自動免疫試驗

相當於過濾前的細菌濃度	100 [*]	50	10	2	0.5	0.1	0.02	保護 50% 小白鼠的最少濾液量
4° 濾液	2/9 ^{**}	3/10	2/10	6/10	5/10	5/10	6/10	1.14 [*]
8° 濾液	0/10	0/10	3/10	5/10	6/10	7/10	7/10	1.02

* 單位為百萬細菌。

** 分子代表死亡數，分母為試驗用小白鼠總數。

毒力對照試驗： 200 百萬細菌 5/5
 100 百萬細菌 4/5
 50 百萬細菌 1/5
 25 百萬細菌 0/5
 LD₅₀ = 76 百萬細菌

表 4 結果與表 1 相比，濾液對於小白鼠的自動免疫作用，雖僅等於全培養物之 1/39—1/64，但 8 小時培養物濾液可以稀釋至 5 萬倍，對小白鼠仍有保護作用，所以濾液的免疫作用是相當強的。表 4 的資料中，4° 與 8°C 濾液中抗原的濃度係用培養時間愈長，濾液性中的保護性抗原也愈多。過濾前培養物中細菌的數量來表示。

引起家兔產生傷寒 Vi 與 O 抗體及家兔免疫血清對小白鼠的保護作用 將未稀釋濾液免疫家兔，用靜脈注射兩次，劑量各為 0.5 與 1.0 毫升，其中間隔一星期，第二次注射後 7 日取血。每種濾液注射兩只家兔，血清的保存，Vi 抗體的測定，以及測定其對小白鼠的保護作用等方法，均與液體培養物同，所得結果，列於表 5：

表 5 用濾液免疫後家兔血清中的傷寒抗體與其對小白鼠的保護作用

家兔免疫用的濾液	4°	6°	8°
免疫血清中的傷寒 Vi 抗體	1/16, 1/16	1/16, 1/64	1/32, 1/128
免疫血清中的傷寒 O 抗體	1/512, 1/512	1/2048, 1/2048	1/2048, 1/4096
混合血清的保護作用	0.0168 毫升	0.002 毫升	0.0005 毫升

毒力試驗： 200 百萬細菌 5/5
 100 百萬細菌 4/5
 50 百萬細菌 2/5
 LD₅₀ = 65 百萬細菌

用 6 小時濾液免疫家兔的血清保護作用，與用液體培養物酒精疫苗所製的家兔免疫血清相仿（表 2），二組家兔血清中的 Vi 抗體含量很相近，但後者中的傷寒 O 抗體比前者多出將近 10 倍，因之我們認為免疫血清的保護作用，主要決定於 Vi 抗體的含量。

討 論

一般認為傷寒桿菌的免疫作用是由於其所含的 Vi+O 抗原，但關於這兩種抗原與其相應抗體在免疫作用上有何區別，各學者的意見尚未一致。Felix 氏倡用酒精疫苗，以保存其中的 Vi 抗原，並自 1943 年起，已在英國軍隊中廣泛施用。Felix 氏的發現，已受到很多學者的支持^[12,13,6]。此外，許多學者^[6,7,14]都以實驗動物證實含有 Vi 抗體的血清，可以保護小白鼠抵抗有毒活菌的感染，但僅含 O 抗體的血清，祇有抵抗死菌感染的作用。Landy 氏^[6]還指出，免疫血清中 Vi 抗體的含量與血清對於小白鼠的保護作用完全平行。近年來，Webster^[15]與 Landy^[16]等氏還從大腸桿菌 5396/38 與付大腸桿菌 ballerup 型中用化學方法抽出 Vi 抗原，可使實驗動物與人體產生 Vi 抗體，後者能保護小白鼠抵抗有毒活菌的感染。不過以上作者均不否認傷寒 O 抗原的免疫作用，但也指出了製造傷寒疫苗時，必須設法保存 Vi 抗原。

在另一方面，由患者體內分離的傷寒菌株，不一定具有 Vi 抗原，而且血清內有 Vi 抗體的病人，其預後並不較好於血清內無 Vi 抗體者。在製造疫苗方面，雖然很多國家仍未選用含 Vi 抗原最豐富的菌株，並用石炭酸作為保存劑，但應用效果仍很顯著。以上各點似乎說明，Vi 抗原與抗體在傷寒的免疫機制中，並不起決定性的作用，但也可能由於目前我們測定 Vi 抗原與抗體的方法不够完善。此外，過去認為加熱與石炭酸能破壞傷寒疫苗中的 Vi 抗原，但 Luippold 氏^[12]發現，將純 Vi 抗原用 0.5% 石炭酸保存時，其抗原性至少可保存 9 個月而不變。Felix 氏^[16]亦指出 Vi 抗原在石炭酸溶液中，在短時期內是穩定的。總之，關於 Vi 抗原的穩定性與免疫作用尚需進一步的澄清，以便作為今後改進疫苗的指南。

在我們的實驗結果中，發現培養物的濾液中，含有大量可溶性抗原——Vi 與 O 抗原，特別是 Vi 抗原。該濾液具有良好的抗原性，表現在對小白鼠的試驗中，將 8 小時培養物濾液稀釋至 50,000 倍後，仍能保護小白鼠抵抗 Ty₂ 活菌的感染。用該濾液製成的免疫血清，僅用 0.0005 毫升對小白鼠即有保護作用。自然，濾液中同時還存在有 O 抗原，但濾液的免疫作用，與其中所含的 Vi 抗原是平行的（比較表 2 與 5），而與 O 抗原則不平行。因之，我們認為保存傷寒疫苗中的 Vi 抗原是很重要的。

在固體培養基中，這種可溶性抗原，顯然被瓊脂所吸收，而遭受損失。

液體培養基與深層培養法的其他優點，正如 Хейфец 氏^[18]所指出的，它是最符合經濟的條件。Хейфец 氏指出在深層培養中，細菌生長的緩慢期較靜止培養法為短，繁殖率加速，（傷寒桿菌在靜止培養法中每繁殖一代為 40 分鐘，而在深層培養法中為 25 分鐘），同時細菌生長的最後濃度要比靜止培養法高 10—20 倍。換言之，在通氣條件下，細菌能繼續生長，直至營養與能的來源用完為止，但在靜止培養中，當細菌僅耗去 1/10—1/20 的營養時，細菌即停止生長。捷克專家馬列克氏^[19]也指出，在深層培養中，個別細菌的性質是一致的，而且在培養過程中，細菌的退化或 R 型是不常見的。相反地，在培養過程中，R 型的沙門氏菌照例總是變為純 S 型的。

在我們的實驗條件下，最高細菌生長濃度為 60,600 百萬/毫升，比靜止培養法高 8—10 倍，比傷寒疫苗的標準濃度高 60 倍。8 小時後由於泡沫太多，所以未繼續培養，但我們認為如果能克服這一點，繼續培養生長是可能的，因經 8 小時培養後，細菌的濃度仍在上升，而在用傾注培養法作活菌計數時，細菌數量與比濁計數法始終是平行的，這點表示細菌仍在迅速增殖中。同時，培養物與其濾液的抗原性，在培養過程中，一直與細菌濃度相平行，此說明本培養基對於傷寒桿菌 Ty₂ 型的生長與抗原的形成是很適合的。

總 結

1. 傷寒桿菌 Ty₂ 型菌株，不需要色氨酸，能在黃豆蛋白水解物中生長。在培養時通入大量空氣的條件下，經 8 小時培養後，最高生長濃度可達每毫升含菌 60,600 百萬，比用靜止培養法要高 8—10 倍。

2. 在 8 小時培養期內，液體培養物始終保持着豐富的 Vi 與 O 抗原，表現在培養物與傷寒 Vi 血清有良好的可凝集性，在 O 血清中不凝。此外，培養物對小白鼠的毒力試驗，小白鼠自動免疫試驗，引起家兔產生傷寒 Vi 與 O 抗體，以及家兔血清對小白鼠的保護作用，均比對照的固體培養物為佳，而且在引起家兔產生抗體與家兔血清對小白鼠的保護作用上，比對照高出 2—3 倍。

3. 液體培養物的濾液中，含有大量 Vi 與 O 抗原，特別是 Vi 抗原。培養時間愈長，則濾液中的抗原愈多。濾液對實驗動物有良好的免疫作用，能引起自動免疫、被動免疫和 Vi 與 O 抗體的產生。

4. 比較用液體培養物與濾液免疫家兔後，家兔血清中的抗體含量及其對小白鼠的保護試驗，後者的效價主要決定於血清中的 Vi 抗體含量，而與 O 抗體含量的關係則不

大。

參 考 文 獻

- [1] 鄭寶芬、林國鎮、余傳霖、林飛鵬, 微生物學報 2(1): 5—12, 1954.
- [2] 林飛鵬、余傳霖、鄭寶芬、林國鎮, 微生物學報 2(1): 13—24, 1954.
- [3] Felix, A. *Brit. Med. J.*, 1: 391—395, 1941.
- [4] Felix, A., & Anderson, E. S., *J. Hyg.*, 49: 288, 1951.
- [5] Felix, A., *ibid.*, 49: 266, 1951.
- [6] Maurice Landy, *Am. J. Hyg.*, 57—58: 148, 1953.
- [7] Felix, A., *J. Hyg.*, 38: 751, 1938.
- [8] Sokhey, S. S., *Bull. World Health Org.*, 3: 33 & 43, 1950.
- [9] Staub, A. M., & Combes, R., *Bull. Hyg.*, 28: 466, 1953.
- [10] Maurice Landy & Esther Lamb, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 82: 593, 1953.
- [11] C. M. Chu *J. Hyg.* 46: 239—246, 1948.
- [12] George F. Luippold, *Am. J. Pull. Hlth.* 36: 15—25, 1946.
- [13] Benzoic, G., *Excerpta Medica*, section IV, 8: 401, 1955.
- [14] Grasset, E. & Lewin, W., *Brit. J. Exp. Path.* 18: 460—469, 1937.
- [15] Webster, Marion E., Landy, M., & Freeman, M. E., *J. Immunol.* 69: 135—146, 1952.
- [16] Maurice Landy, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 80: 55—58, 1952.
- [17] Felix, A., *J. Hyg.*, 50: 515, 1952.
- [18] Л. В. Хейфец, Журнал микроб. эпидем. и иммуноб. 58—71, 1955.
- [19] 馬列克, 中國微生物學會通訊, 2(3): 6—12, 1955.

SOYBEAN PROTEIN HYDROLYSATE AS LIQUID CULTURE MEDIUM FOR TYPHOID VACCINE PRODUCTION

III. THE ANTIGENICITY OF CULTURE AND ITS FILTRATE

LIN FEI-CHING, CHANG KU-SHENG, CHENG PAO-FEN and *LI HSIN-CHANG

Shanghai First Medical College

**Hwa-Nan Medical College*

(ABSTRACT)

B. typhosus Ty₂ strain does not require tryptophane as essential amino acid, and can therefore grow luxuriantly in the soybean protein acid hydrolysate medium. The final bacterial concentration in this medium after 8 hours of aerated cultivation was 60,600 million organisms per cc..

Throughout 8 hours of aerated cultivation, the culture remained inagglutinable in pure antityphoid O serum, LD₅₀ of such culture was about 50—100 million organisms for white mice and finally in a single dose of 0.02 million organisms it protected mice against subsequent challenge with 100 million of living *B. typhosus* Ty₂ strain. The above compares favorably with control culture, employing same bacterial strain grown on meat-infusion agar for 16 hours. In rabbit, the liquid culture induced good formation of Vi+o antibody and the immune rabbit serum protected white mice in as little as 0.00119 cc., while antiserum produced with meat-infusion agar culture contained less Vi+o antigen and required 0.0032 cc. to protect white mice against the same challenging dose:

The filtrate of soybean-protein acid hydrolysate culture contained considerable amount of Vi+o antigen, especially Vi antigen, as measured by hemagglutination test. The minimal amount of filtrate required to protect white mice is a little over one million organisms/cc. (in terms of bacterial concentration in culture before filtration). Rabbit serum, immunized with this filtrate, contained very rich amount of Vi, and less amount of O-antigen, and protected mice in 0.0005 cc. Comparison of Vi-antigen contents and protective power of rabbit serum immunized with liquid culture and with the filtrate showed there is close relationship between Vi-antibody titre and the protective power for white mice.

Thus, under condition of deep aeration, soybean protein acid hydrolysate medium proved to be more efficacious as medium for production of typhoid vaccine with *B. typhosus* Ty₂ strain than the conventional meat infusion agar method.