

電離放射線에 依하여 不活化된 Salmonella typhi의 免疫反應 研究

韓國原子力研究所 放射線生物學研究室

李 康 淳 · 閔 鳳 熙 · 張 正 淳

=Abstract=

A study on the Immune Response of Salmonella Typhi Inactivated by Gamma Ray

Kang Soon Rhee, Bong Hee Min, Chung Soon Chang

Radiation Biology Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute

For the preparation of non-infective vaccine against typhoid fever, the authors had carried out an investigation on the possibilities of using ^{60}Co γ -ray irradiation for the inactivation of Salmonella typhi Ty 2.

The following results were obtained.

- 1) Chicks shortly after hatching were higher susceptible than mice to intracerebral injection with S. typhi.
- 2) In safety test on experimental animal, ^{60}Co γ -ray irradiated vaccines demonstrated no clinical symptom while the phenol treated vaccines revealed several cases of narcosis by intraperitoneal injection in chicks.
- 3) The rabbit antisera immunized with ^{60}Co γ -ray irradiated and phenol treated vaccine revealed almost same agglutinin titers to each other.
- 4) In potency test in chicks, there was no significance in the protective capacity between ^{60}Co γ -ray irradiated and phenol treated vaccines.

緒 論

細菌의 不活化 方法으로는 物理的 또는 化學的 方法等 여러가지 方法이 있으나 使用 目的에 따라 보다 適當한 方法의 選擇이 必要하다.

現在 使用되고 있는 vaccine 의 大部分은 物理的 또는 化學的 處理에 依하여 菌을 弱毒化 乃至 殺菌시키어 使用하고 있으나, 이같은 處理는 菌體의 抗原構造의 變化를 誘發시킬 수 있으며 完全한 抗原性的 維持

가 困難하다.

따라서 免疫抗原의 製造를 爲한 菌體의 不活化 方法에는 抗原性的 維持, 生體에 對한 安全性等 여러가지 問題點이 있기 때문에 不活化 方法도 크게 制限을 받게 된다.

이같은 抗原의 製造方法으로 Traub et al.(1951)¹⁾은 電子線을 利用하여 rabies vaccine 의 製造可能性을 報告한 바 있으며, Polley(1961)²⁾는 감마線 照射에 依한 mump, influenza, herpes simplex 및 small pox vaccine 製造方法의 優秀性을 報告한 바 있다.

最近에 이르러 감마線 또는 電子線과 같은 電離放射線을 菌體 抗原性分에 크게 影響을 주지 않는다는 事實이 研究 報告됨으로서 放射線 照射에 依한 免疫抗原의 製造研究가 크게 注目되고 있다.

우리나라에 있어서도 崔(1968)³⁾ 등은 감마線 照射 結核菌을 抗原으로 BCG 와 比較實驗하여 감마線 照射菌의 優秀성을 報告한 바 있으며, 千(1964)⁴⁾ 등은 감마線 照射 腸티브스菌의 抗體產生能에 化學處理 腸티브스菌에 比하여 若干 優秀하였음을 報告하였다.

著者들은 電離放射線으로 S. typhi Ty 2株를 不活化하였을 때 誘發되는 菌體成分의 여러 變化等을 報告⁵⁾한 바 있다.

이같은 基礎的인 成績들을 土臺로 電離放射線으로 不活化한 S. typhi Ty 2株 抗原이 生體 免疫에 如何히 反應하는가를 究明할 目的으로 電離放射線으로 不活化한 抗原의 安全性, 抗體產生 및 防禦實驗等을 實施하여 若干의 成績을 얻었기에 報告하고자 한다.

實驗材料 및 方法

1. 菌株 및 細菌培養

本 實驗에 使用한 菌株는 Salmonella typhi Ty 2株로 國立保健院으로부터 分株받아 寒天斜面培地에서 37°C, 18時間 培養한 後 4°C 冷藏庫에 保管 使用하였으며, 細菌의 增殖培地로서는 nutrient broth를 使用하였다.

2. S. typhi Ty 2株에 對한 動物感受性 實驗

마우스 A/hamster 株에 對한 腦內接種은 Landy et al. (1957)⁶⁾ 方法에 準하였고, 병아리(leghorn, white)에 對한 腦內接種은 Schaffer et al.(1964)⁷⁾ 方法에 準하여 實驗을 實施하였고, 그 結果를 Reed and Muench(1938)⁸⁾ 方法에 따라 LD₅₀ dose를 求하였다.

3. 供試 抗原

Nutrient broth (37°C, 24時間)에 增殖한 細菌을 生理食鹽水로 3回 遠沈 洗滌한 後 0.02 M PBS에 浮遊 (10⁸~10⁹cells/ml)시켜 試驗管에 分注한 後 韓國原子力 研究所 所在 BNL Shipboard Irradiator (25,000 Ci Co⁶⁰ γ-ray source)를 利用하여 950 Krad/hour의 dose rate로 500 Krad, 1,000 Krad, 2,500 Krad 및 5,000 Krad의 線量을 各各 照射하여 電離放射線 照射 抗原을 製造하였으며, 對照群으로서는 國立保健院에서 製造한 腸티브스 vaccine(Lof No. 7223, 以下 NIH vaccine 이라 略함) 및 著者들이 製造한 0.45% phenol 處理(37°C, 2 hrs)

抗原을 各各 使用하였다.

4. 照射 抗原의 安全 實驗

1) 培養實驗

照射抗原을 1% peptone broth 및 nutrient broth에 接種하고 37°C에서 7日間 3回 繼代培養하면서 細菌의 增殖有無를 觀察하였다.

2) 動物實驗

照射抗原을 孵化後 1~2日된 병아리(leghorn, ♂)에 있어서는 腦內接種群에 0.5 ml를, 腹腔內接種群에 있어서는 0.5 ml를, 그리고 마우스(A/hamster, ♂) 腦內接種群에는 0.03 ml를, 腹腔內接種群에는 0.5 ml를 各各 接種한 後 7日間 實驗動物의 生死를 觀察하였다.

5. 照射抗原의 抗體產生實驗

照射抗原을 健康한 家兔(Swiss albino rabbit, ♂, 體重 2.0~2.5 kg) 3首를 一群으로 하여 Harrell et al. (1965)⁹⁾ 方法에 準해 3~4日 間隔으로 6回 耳靜脈 免疫 注射하고, 1週日 間隔으로 少量 間歇 採血하여 抗體價를 測定하였다.

抗體價 測定은 Widal 凝集反應을 利用한 試驗管內 凝集試驗으로 測定하였다.

6. 抗血清의 被動防禦實驗

Suh et al. (1965)¹⁰⁾ 方法에 依하여 抗血清의 被動防禦實驗을 實施하였다.

即 各各의 抗原을 免疫하여 얻은 家兔 抗血清 0.1 ml 적을 병아리 大腿部에 筋肉免疫하고 24時間後 腸티브스菌液(300 cells/ml) 0.05 ml 적을 各各 腦內接種하여 細菌增殖에 依한 實驗動物의 致死率을 實驗하였다.

實驗結果 및 考察

1. S. typhi Ty 2株에 對한 實驗動物의 感受性

S. typhi Ty 2株에 對한 實驗動物의 感受性을 比較 實驗코자 마우스 및 병아리에 細菌溶液을 腦內接種하여 그 致死率을 實驗하였던 바 그 成績은 Table 1 및 Table 2에서 보는 바와 같다.

Table 1 및 2에서 볼 수 있는 바와 같이 完全致死에 必要한 腦內接種量은 마우스 1.4×10⁶ cells 以上, 병아리 1.5×10² cells 以上으로 병아리가 마우스에 比하여 顯著하게 높은 感受性을 나타내었으며, 마우스의 LD₅₀ (I.C.)는 2.057×10⁶ cells, 병아리의 LD₅₀ (I.C.)는 7.764 cells로서 병아리가 마우스에 比하여 約 2.65×10⁴

Table 1. Intracerebral virulence of *S. typhi* Ty 2 in mouse

No. of cells inoculated	Outcome	No. of mouse		Mortality	%	No. of cells for LD ₅₀
		Servival	Death			
1.4×10 ⁷	D ₁ D ₂ D ₃ D ₃ D ₃ ¹⁾	0	5	12/12	100	2.057×10 ⁵
1.4×10 ⁶	D ₁ D ₃ D ₃ D ₄ D ₄	0	5	7/7	100	
1.4×10 ⁵	D ₃ D ₄ S ₇ S ₇ S ₇ ²⁾	3	2	2/5	40	
1.4×10 ⁴	S ₇ S ₇ S ₇ S ₇ S ₇	5	0	0/8	0	
1.4×10 ³	S ₇ S ₇ S ₇ S ₇	5	0	0/13	0	

1) D₁~D₄ denote dead mice within 1~4 days after intracerebral inoculation respectively.

2) S₇ denotes survival mouse for 7 days after inoculation.

Table 2. Intracerebral virulence of *S. typhi* Ty 2 in chick

No. of cells inoculated	Outcome	Mortality	%	No. of cells for LD ₅₀
1.5×10 ³	D ₁ D ₁ D ₁ D ₁ D ₂ D ₂ D ₂ D ₂ ¹⁾	27/27	100	7.764
1.5×10 ²	D ₁ D ₁ D ₁ D ₂ D ₂ D ₂ D ₂ D ₂	17/17	100	
1.5×10 ¹	D ₁ D ₂ D ₂ D ₂ D ₂ D ₂ S ₇ S ₇ ²⁾	7/10	70	
1.5×10 ⁰	S ₇ S ₇ S ₇ S ₇ S ₇ S ₇ S ₇	0/13	0	
1.5×10 ⁻¹	S ₇ S ₇ S ₇ S ₇ S ₇ S ₇ S ₇	0/23	0	

¹⁾ D₁ and D₂ indicate dead chicks within 1 and 2 days after intracerebral inoculation, respectively.

²⁾ S₇ denotes survival chick for 7 days after inoculation.

배의 높은感受性を 나타내었다.

S. typhi Ty 2株의 virulence를測定하기 위한方法으로서 마우스 腹腔內 接種法이 *S. typhi* 菌株間의 virulence를比較할 수 있을 정도로 銳敏하였다는報告¹¹⁾를 嚆矢로 하여 그後 많은 研究가 進行되어 腹腔內 接種의 檢査 내지 改善을 가져왔다. 即 마우스 腹腔內 接種方法은 致死에 必要한 接種細菌數 및 接種量이 많기 때문에 *S. typhi*의 菌體內毒素에 依한 致死(24~48時間內)가 불가피하며, 따라서 菌體의 正確한 virulence의 測定이 困難하다.

그後 Norton et al.(1935)¹²⁾이 腹腔內 接種보다 腦內 接種方法의 銳敏性 내지 正確性を 報告한 바 있으나 實效를 보지 못하였고, Landy et al.(1957)¹³⁾이 이를 確認함으로써 이 方法이 많이 利用되어 왔다.

Gaines et al.(1961)¹³⁾은 *S. typhosa* Ty 2株에 感受성이 높은 實驗動物로서 마우스(LD₅₀ I.C.=3.7×10² cells, LD₅₀ I.P.=3.5×10⁶ cells)를 使用 實驗한 바 있으나 그後 Shaffer et al.(1964)⁷⁾ 및 Suh et al.(1965)¹⁰⁾은 孵化後 1~2日된 雛아리가 *S. typhi* Ty 2株에 對하여 相當한 感受性(LD₅₀ I.C.<10 cells)이 있다고 報告한 바 있다.

本 實驗에 있어서도 *S. typhi* Ty 2株에 對한 感受성은 마우스에서 보다 雛아리에서 顯著하게 높아 Shaffer et al.(1964)⁷⁾ 및 Suh et al.(1965)¹⁰⁾ 등의 實驗結果와 一致함을 알 수 있었다.

2. 照射抗原의 安全性

⁶⁰Co 500 Krad, 1,000 Krad, 2,500 Krad 및 5,000 Krad 照射에 依하여 製造된 放射線 照射 抗原과 phenol 處理 抗原(0.45% phenol, 37°C, 2 hrs 處理 및 NIH vaccine)의 細菌 不活化를 觀察코자 培養液에 3回 繼代培養한 培養成績과 實驗動物에 接種하여 抗原의 安全度를 實驗한 成績은 Table 3에서 보는 바와 같다.

S. typhi Ty 2 (in PBS)의 放射線 感受성은 200 Krad 以上の 照射로서 完全 不活化¹⁴⁾되었으나 放射線 照射 抗原 製造時 생길 수도 있는 放射線 抵抗性 病原性 細菌의 汚染을 考慮하여 安全 線量인 500 Krad 以上の 線量을 照射하였던 바 *S. typhi* 및 汚染細菌을 完全히 不活化시킬 수 있었으므로 500 Krad 以上の 線量을 照射線量으로 撰定하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 500 Krad 以上の 放射線 照射 또는 0.45% phenol 處理로서 細菌의 完全 不活化

Table 3. Safety test of irradiated antigen on bacteriological culture medium and experimental animal

Antigen		Cultivation			Chicken		Mouse	
		1 st	2 nd	3 rd	0.05ml I.C. ¹⁾	0.5ml I.P. ²⁾	0.03ml I.C.	0.5ml I.P.
Irradiated	500 Krad	NG ³⁾	NG	NG	6/25 ⁴⁾	2/25	0/25	0/25
	1,000 Krad	NG	NG	NG	4/25	4/25	0/25	0/25
	2,500 Krad	NG	NG	NG	3/25	3/25	0/25	0/25
	5,000 Krad	NG	NG	NG	4/25	2/25	0/25	0/25
Phenol treated	0.45% phenol 37°C, 2 hrs	NG	NG	NG	5/25	2/25	1/25	0/25
	NIH	NG	NG	NG	6/25	4/25	0/25	0/25
Physiological saline (Control)		NG	NG	NG	5/25	3/25	0/25	0/25

¹⁾ Intracerebral inoculation.

²⁾ Intraperitoneal inoculation.

³⁾ No growth in peptone broth and nutrient broth.

⁴⁾ No. of chicks or mice dying within the period of observation/total number inoculated.

가 가능하였으며 또한 이같은處理에 의하여製造된抗原을實驗動物에接種했을 때發病 내지致死現象은 없는 것으로 나타났다.

병아리에對한安全實驗에 있어서抗原의腦內接種 또는腹腔內接種에서不規則한致死率을 나타내었으나對照群에서도 거의 같은致死率을 나타낸 것으로 보아抗原接種에 의한致死라기 보다는 다른要因에 의한致死로 생각된다. 그러나 특히 phenol處理抗原 및 NIH vaccine의 병아리腹腔內接種實驗에 있어서는實驗動物의約50%가接種直後若干의痲痺現象을 일으켜輕한痲痺을1~2時間繼續한後回復되었으며 이같은痲痺現象은個體에 따라 커다란差異가 있었다. 이러한副作用은抗原內에含有되는 phenol濃度 및接種量에 따라 크게影響을 받아 phenol의濃度를增加했을 때 또는腹腔內注射量을增加하였을 때 그症狀은 더

욱顯著하였던點으로 보아 phenol로處理한抗原은副作用誘發의原因이 될 수도 있다는推測도 가능하다.

3. 照射抗原의 抗體產生能

電離放射線을 500 Krad, 1,000 Krad, 2,500 Krad 및 5,000 Krad 照射한各抗原을家兔에免疫하였을 때免疫에 따른抗體產生力價를 phenol處理抗原과比較實驗한成績은 Table 4에서 보는 바와 같다.

Table 4에서 보는 바와 같이放射線照射抗原 및 phenol處理抗原의抗體產生能에는 커다란差異가 없었으며, 또한放射線照射抗原에 있어서照射線量에 따른抗體產生能의變化를觀察할 수 없었다.

Rhee et al. (1973)⁵⁾은 S. typhi Ty2株에電離放射線의線量을 달리하여菌體成分의變化를觀察한結果高線量을照射했을 때菌體成狀의若干의變化는誘發되나

Table 4. Immunization of irradiated antigen for the preparation of rabbit antiserum and its antibody titer

Antigen		Immunization and bleeding schedule						Antibody titer				
		d-0	d-3	d-5	d-10	d-14	d-18	d-25	1 st	2 nd	3 rd	4 th
Irradiated	500 Krad	1st bleeding and 0.3 ml	0.6 ml I.V.	2nd bleeding and 1.2 ml I.V.	2.4 ml I.V.	3rd bleeding and 3.0 ml I.V.	3.0 ml I.V.	4th (total) bleeding	<10	160	1280	10,000
	1,000 Krad								<10	40	640	9,000
	2,500 Krad								<10	40	160	8,000
	5,000 Krad								<10	40	320	10,000
Phenol treated	0.45% phenol 37°C, 2 hrs	1st bleeding and 0.3 ml	0.6 ml I.V.	2nd bleeding and 1.2 ml I.V.	2.4 ml I.V.	3rd bleeding and 3.0 ml I.V.	3.0 ml I.V.	4th (total) bleeding	40	160	1280	10,000
	NIH								<10	40	1280	10,000
Immunization and bleeding		↓ ↑	↑	↓ ↑	↑	↓ ↑	↑	↓				

↓ : bleeding

↑ : immunization

이때 菌體의 抗原成分의 變化는 없는 것으로 나타났으며 萬一 抗原性의 低下를 招來한다 하더라도 phenol 에 의한 低下와 類似하였다.

Chun et al. (1964)¹²은 冷凍乾燥 狀態의 腸티브스菌 (42-A-58)을 1, 100 Krad 의 감마線을 照射하여 家兔 免疫實驗을 實施한 結果 放射線 照射群이 化學處理群(0.3 % phenol 또는 33% alcohol 處理)에 比하여 若干 높은 凝集價를 나타내었으나 이들 兩者間의 顯著한 差異는 없었다고 하였다.

또한 Choi et al. (1968)¹³ 등도 300, 000 R 을 照射한 冷凍乾燥 cholera 菌의 抗體產生能을 實驗한 結果 菌株에 따라 若干의 差異는 있었으나 放射線 照射菌의 抗體產生能이 顯著하게 높았음을 報告한 바 있다.

그러나 Polley (1961)²²에 의한 influenza, mump 및 vaccinia virus 의 放射線에 의한 不活化 實驗에서는 2, 000 Krad 以上の 감마線 照射로서 이들 virus 의 補體 結合能力이 低下하였다고 報告함으로써 放射線에 의한 抗原性의 低下를 指摘한 바 있다.

이같은 抗原性의 低下는 electron 을 利用한 rabbies vaccine 製造 可能性을 實驗한 Traub et al. (1951)¹¹의 實驗結果에서도 證明되었으며, 線量을 2倍로 增加하여 照射함에 따라 virus 의 抗原성은 若干 減少하였다고 한다.

이는 細菌과 virus 의 構成成分에 있어 많은 差異가 있기 때문인 것으로 생각된다. 卽 細菌의 體成分에는 DNA, RNA 以外에 多糖類, 脂質 및 蛋白質等을 많이 含有하고 있어 이들 物質이 放射線에 對하여 保護作用을 나타내는 것으로 考慮할 수 있으나, virus 는 그 主成分이 DNA 또는 RNA 로 構되어 있기 때문에 放射線에 의한 障害가 크기 때문이라 생각되며, 著者들의

實驗에서 抗原에 照射한 放射線 線量 程度로는 抗原性의 減少現象은 認定할 수 없는 것으로 생각 된다.

4. 抗照射抗原 血清의 防禦能

電離放射線 照射 抗原으로 免疫하여 얻은 抗血清의 實驗動物에 對한 被動 防禦能을 實驗한 成績은 Table 5에서 보는 바와 같다.

Table 5에서 보는 바와 같이 正常 家兔血清을 注射한 對照群에서는 68.0%의 致死率을 나타내었으나 放射線 照射 抗原 및 phenol 處理 抗原의 家兔血清을 注射한 實驗群에서는 12~28%의 致死率을 보여 이들 抗原에 의한 抗血清의 防禦效果를 認識할 수 있었다.

S. typhi 의 抗血清에 의한 병아리 被動防禦實驗은 Shaffer (1965)¹⁴ 및 Suh et al. (1965)¹⁰에 의하여 報告된 바 있으며, 이들은 S. typhi 菌株에 따른 凝集原에 따라 그 抗血清의 防禦能力이 크게 影響을 받는다고 하였다. 특히 Suh et al. (1935)¹⁰은 凝集原을 달리하는 Salmonella 의 여러 serotype 을 닭에 免疫하여 이들 各各에 의한 抗血清을 製造하여 이 免疫血清의 防禦能을 實驗한 結果 S. typhosa H 901의 免疫血清이 顯著한 防禦能을 나타내었으며, S. typhosa Ty 2 및 S. typhosa Vi I 의 抗血清에서도 防禦效果를 實驗한 바 있다.

Shaffer (1965)¹⁴에 의하면 Vi 抗原과 O 抗原에 對한 抗體를 가지는 닭 抗血清에서 被動防禦能이 顯著히 높았음을 指摘한 바 있으며, 이로서 Vi 抗原과 O 抗原을 가지는 S. typhosa Ty 2의 抗血清에 의한 높은 防禦能을 期待할 수 있으나 O, H 抗原만을 가지는 S. typhosa H 901 免疫血清에서 가장 높은 防禦能을 나타냈음을 報告한 바 있다.

本 實驗에 使用한 S. typhi Ty 2 株는 O, H 및 Vi 抗

Table 5. Comparison of passive protection ability of radiated and phenol treated vaccine

Rabbit antiserum prepared with radiation and phenol		Immunization		Challenged after 24 hours	Mortality	%		
		No. of chick	Dose and route	Dose and route				
Irradiated	500 Krad	25	Intramuscular injection of 0.1 ml antisera on each thigh	15 cells/0.05 ml/I.C.	6/25*	24		
	1,000 Krad	25			5/25	20		
	2,500 Krad	25			5/25	20		
	5,000 Krad	25			5/25	20		
Phenol treated	0.45% phenol 37°C, 2hrs	25					3/25	12
	NIH	25					7/25	28
Normal rabbit serum (control)		25					17/25	68

* : The ratio of the numerator to the denominator indicates the proportion of chicks dead and chicks tested.

原을 가지는 菌株로서 이 菌株의 virulence가 強力함 이 認定되어 vaccine 製造에 利用되는 菌株이다.

著者들의 實驗에 있어서는 菌體 全體를 抗原으로 使用하였기 때문에 이 菌體의 各各의 抗原成分의 防禦能을 比較하기 곤란하며, 따라서 앞으로 抗原成分에 따른 抗體產生能 및 防禦能 實驗을 隨行함으로서 좀더 強力하고 效果的인 vaccine의 製造가 可能할 것으로 생각된다.

結 論

現在 腸티브스 백신은 化學劑 處理에 依하여 製造 使用되고 있으며, 이 化學劑 處理로 因하여 誘發될 수도 있는 副作用때문에 安全性이 問題되고 있다.

化學劑 處理 代身 放射線을 利用하여 腸티브스 백신을 製造하여 化學劑 處理백신과 比較實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

(1) S. typhi Ty 2 菌體에 對한 感受性은 마우스(LD₅₀, 2.057 × 10⁵ cells/I. C.)에서 보다 병아리(LD₅₀, 7.764 cells/I. C.)에서 顯著히 높았다.

(2) Phenol 處理 抗原은 병아리 腹腔內 接種으로 50%가 輕한 麻痺現象을 일으킨 후 回復되었으나 電離放射線照射 抗原接種에서는 이러한 現狀을 觀察할 수 없었으며 높은 安全性을 나타내었다.

(3) 電離放射線照射 抗原의 抗體產生能 및 家兔抗血清의 被動 防禦能은 phenol 處理 抗原과 類似하였다.

REFERENCES

- 1) Traub, F.B., Friedemann, U., Brasch, A. and Huber, W.: High intensity electrons as a tool for preparation of vaccines. *J. Immunol.*, 67, 379, 1951.
- 2) Polley, J.R.: Preparation of non-infective antigens with gamma radiation. *Can. J. Microbiol.*, 7, 135, 1961.
- 3) Choi, B. S., Suh, I. S. and Lew, J.: Immunological studies on Co⁶⁰ irradiated vibrio cholera. *Woosuk Med. J.*, 5, 175, 1968.

- 4) Chun, S.Y., Choi, T.K. and Lew, J.: Immunological studies on gamma ray irradiated S. typhi. *Kor. Cent. J. Med.*, 6, 651, 1964.
- 5) Rhee, K.S., B.H. Min, and C.S. Chang: Effects of radiation on Salmonella typhi Ty 2 cell. *Kor. J. Microbiol.*, 11, 79, 1973.
- 6) Landy, M., Gaines, S. and Sprinz, H.: Studies on intracerebral typhoid infection in mice. I. Characteristics of the infection. *Brit. J. Exp. Path.*, 38, 15, 1957.
- 7) Shaffer, M.F., Bridges, J.F., Clemmer, D.I. and Pontoppidan, K.C.: Susceptibility of chicks to experimental infection with Salmonella typhosa. *Amer. J. Hyg.*, 80, 377, 1964.
- 8) Reed, L.J. and Muench, H.A.: Simple method of estimating fifty percent end points. *Amer. J. Hyg.*, 27, 493, 1938.
- 9) Harrell, W.K. and Ashworth, H.: Procedure manual for bacterial and fungal diagnostic reagent. U.S. National Communicable Disease Center for Disease Control, p. 38, 1965.
- 10) Suh, I.S. and Shaffer, M.F.: Intracerebral virulence of Salmonella typhi strains in chicks. *Hawaii Medical J.*, 2, 154, 1965.
- 11) Grinnell, F.B.: A study of the dissociation of the Rawlings strain of B. typhosum with special reference to its use in the production of antityphoid vaccine. *Jour. Exper. Med.*, 56, 907, 1932.
- 12) Norton, J.F. and Dingle, J.H.: Virulence tests for typhoid bacilli and antibody relationships in antityphoid sera. *Amer. Jour. Pub. Health*, 25, 609, 1935.
- 13) Gaines, S. and Tully, J.G.: Comparison of intracerebral and intraperitoneal infective techniques for assaying mouse virulence of Salmonella typhosa strains. *Amer. Jour. Hyg.*, 74, 60, 1961.
- 14) Shaffer, M.F.: Sero-protection against intracerebral Salmonella typhosa infection in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118, 71, 1965.