



Nr. inw. 27 27  
3/4

2727

K. 31/53

24.-

yt. i







TECHNIKA BADAŃ  
BAKTERJOLOGICZNYCH



K 31/53

2727

# TECHNIKA BADAŃ BAKTERJOLOGICZNYCH ZE SZCZEGÓLNM UWZGLĘDNIENIEM CHORÓB ZAKAŻNYCH.

Napisali

**Dr. med. i fil. Stefan Sterling-Okuniewski**

b. kierownik Pracowni Bakterjologicznej Miejskiej w Łodzi

i

**Kazimiera Sterling**

b. asystentka Pracowni Bakterjologicznej Miejskiej w Łodzi.



WARSZAWA — E. WENDE I S-KA (LUDWIK FISZER)  
LWÓW: H. ALTENBERG, G. SEYFARTH, E. WENDE I SKA  
POZNAŃ: M. NIEMIERKIEWICZ — ŁÓDŹ: LUDWIK FISZER



WYDZIAŁ ICHIOLOGII  
KATEDRA ICHIOLOGII  
MUSEUM ICHIOLOGII



2727

ODBITO W DRUKARNI NARODOWEJ W KRAKOWIE.

## PRZEDMOWA.

*Brak krótkiego zarysu techniki bakterjologicznej w języku polskim, dotkliwie odczuwany zarówno przez nas, jak i przez innych pracowników na tem polu wiedzy, skłonił nas do opracowania niniejszego dziełka. Niemożność korzystania z niektórych źródeł zachodnich (francuskich, angielskich, włoskich i t. p.) musiała wywrzeć wpływ na wybór metod hodowania, sposobów barwienia, szczegółów technicznych i t. d.; świadomi też jesteśmy pewnych braków, jakie praca nasza posiada i z wdzięcznością przyjmujemy wszelkie uwagi fachowe, starając się wyciągnąć z nich na przyszłość odpowiednie wnioski. Pomimo tych braków zdecydowaliśmy się jednak — ze względu na wielką potrzebę wskazówek technicznych — przystąpić do wydania tej książki w nadziei, że choć w części potrafi ona zaspokoić potrzeby codziennej pracy laboratoryjnej.*

*Łódź, w marcu 1918. <sup>1)</sup>*

---

<sup>1)</sup> Ze względów, od autorów niezależnych, książka mogła ukazać się w druku dopiero w 1920 r.





---

# T R E Ś Ć.

## CZĘŚĆ PIERWSZA.

<b>Urządzenie pracowni bakterjologicznej</b> . . . . .	1-11
<b>Mikroskop; budowa; układ imersyjny; „kropla wi- sząca”; źródło światła</b> . . . . .	4
<b>Czyszczenie mikroskopu</b> . . . . .	10
<b>Systemy mikroskopów</b> . . . . .	11
<b>Wyjaławianie i odkażanie</b> . . . . .	11-15
<b>Wyjaławianie za pomocą ciepła. Przepala- nie w płomieniu. Sterylizacja sucha. Sterylizacja wilgo- tna. Wyjaławianie w parze bieżącej. Pasteuryzacja. Bio- ryzacja</b> . . . . .	12
<b>Środki chemiczne. Sublimat. Roztwór krezolowo- mydlany. Roztwór fenolu, kwasu siarkowego, solnego, azotowego. Wyskok. Eter siarkowy</b> . . . . .	14
<b>Czynności pomocnicze w pracowni bakterjolo- gicznej</b> . . . . .	15-20
<b>Urządzenie miejsca do pracy</b> . . . . .	15
<b>Odkażanie szkła</b> . . . . .	15
<b>Mycie szkła</b> . . . . .	16
<b>Wyjaławianie szkła</b> . . . . .	16
<b>Odkażanie i wyjaławianie pipetek</b> . . . . .	17
<b>Odkażanie i czyszczenie szkiełek</b> . . . . .	17
<b>Czyszczenie instrumentów</b> . . . . .	18
<b>Przygotowywanie fizjol. roztworu soli</b> . . . . .	18
<b>Przygotowywanie zawiesin bakteryjnych</b> . . . . .	19
<b>Odwłóknianie krwi</b> . . . . .	19
<b>Filtrowanie bakterji</b> . . . . .	20

## VIII

<b>Przygotowywanie pożywek . . . . .</b>	<b>21-42</b>
Odczyn pożywek . . . . .	21
Pożywki płynne . . . . .	22
Buljon zwykły . . . . .	22
„ na wyciągu Liebig'a . . . . .	23
„ z „Ragit'u“ . . . . .	23
„ na skrzepie krwi . . . . .	23
„ glicerynowy zwykły (2 <sup>1</sup> / <sub>0</sub> ) . . . . .	24
„ cukrowy zwykły (2 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> ) . . . . .	24
Żółć . . . . .	24
Mleko . . . . .	25
Serwatka lakmusowa wedł. Petruschky'ego . . . . .	25
Podłoże Hetsch-Barsiekow'a . . . . .	25
Woda peptonowa 10 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> . . . . .	26
Podłoże Sabouraud . . . . .	27
Podłoże Ungermann'a . . . . .	27
Podłoże van Riemsdijk . . . . .	27
Podłoże bezbiałkowe Uszyńskiego-Fränkela . . . . .	27
Podłoże bezbiałkowe Beck'a-Proskauer'a . . . . .	28
Pożywki stałe . . . . .	28
Agar zwykły 3 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> : a) z mięsa b) z „Ragit-agaru“ . . . . .	28
Agar cukrowy . . . . .	29
„ z czerwienią obojętną . . . . .	30
„ glicerynowy 2 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> . . . . .	30
„ glicerynowy z somatozą . . . . .	30
Podłoże Sobel'a . . . . .	31
Podłoże Conradi-Drygalskiego . . . . .	31
Podłoże Endo . . . . .	32
Agar z czerwienią Kongo (Acel-Liebermann'a) . . . . .	33
„ z zielenią malachitową (Loeffler'a) . . . . .	33
„ alkaliczny . . . . .	34
Podłoże Dieudonné'go . . . . .	34
Podłoże Hofer-Hovorka . . . . .	35
Podłoże Kabeshima . . . . .	35
Podłoże Pilon'a . . . . .	35
Agar z krwią ludzką . . . . .	36

Agar z surowicą wołową . . . . .	36
„ z płynem puchlinowym z jamy brz. . . . .	36
„ „ „ wedł. Kiefer'a . . . . .	37
„ z płynem puchlin. wedł. Jochmann'a . . . . .	37
Podłoże Mac-Neal'a . . . . .	38
Żelatyna . . . . .	38
Surowica Loeffler'a . . . . .	39
Podłoże Jundell'a . . . . .	40
Kartofle . . . . .	40
Surowica z gliceryną . . . . .	40
Pożywka Hesse-Heyden'a . . . . .	40
Agar z papką mózgową Ficker'a . . . . .	41
Pożywka Karwackiego . . . . .	41
Suche pożywki . . . . .	41
<b>Metody hodowania drobnoustrojów . . . . .</b>	<b>42-53</b>
Metoda wieloprobówkowa . . . . .	42
Metoda płytkowa . . . . .	43
Hodowle beztlenowe . . . . .	45
Przechowywanie czystych hodowli . . . . .	47
Zwierzęta, jako ogniwo przy otrzymywaniu czystej hodowli	48
Dawkowanie materiału do szczepień . . . . .	50
Pomieszczenie dla zwierząt . . . . .	51
Mierzenie ciepłoty . . . . .	51
Badanie pośmiertne zwierząt . . . . .	51
<b>Badanie drobnoustrojów . . . . .</b>	<b>53-62</b>
Badanie makroskopowe . . . . .	53
Liczenie kolonji na płytkach . . . . .	55
Badanie mikroskopowe . . . . .	56
Badanie skrawków . . . . .	56
Zatapianie w parafinę . . . . .	57
Zamrażanie skrawków . . . . .	59
Barwienie skrawków. Metody ogólne . . . . .	59
Metoda Loeffler'a . . . . .	59
Metoda Pfeiffer'a . . . . .	60



Metody specjalne: Metoda Gram'a . . . . .	60
Metoda Kühne-Weigert'a . . . . .	60
Barwienie laseczników gruzliczych . . . . .	61
Przechowywanie preparatów . . . . .	61
<b>Przygotowywanie barwników i barwienie pre-</b>	
<b>paratów . . . . .</b>	<b>62-78</b>
Roztwory macierzyste . . . . .	62
Przygotowywanie preparatów barwionych . . . . .	63
Barwniki najczęściej używane . . . . .	63
Fuksyna . . . . .	63
Błękit metylenowy . . . . .	64
Fiolet goryczkowy (gencjanowy) . . . . .	64
Barwienie metodą Loeffler'a . . . . .	65
Błękit metylenowy Loeffler'a . . . . .	65
Barwienie metodą Gram'a . . . . .	65 ✓
Barwienie metodą Fallières'a . . . . .	66
Barwienie metodą Neisser'a . . . . .	67
Barwienie metodą Lubińskiego . . . . .	67
Barwienie metodą Ziehl-Neelsen'a . . . . .	68 ✓
Barwienie metodą Ziehl-Gabbet'a . . . . .	68
Barwienie metodą Much'a . . . . .	69
Barwienie metodą Gasis'a . . . . .	70
Barwienie las gruzliczych metodą Kronberger'a . . . . .	71
Barwienie metodą Pick-Jacobsohn'a . . . . .	71
Barwienie zarodników metodą Moeller'a . . . . .	72
Barwienie otoczek metodą Johnego . . . . .	72
Barwienie rzęsek metodą Zettnow'a . . . . .	73
Barwienie rzęsek metodą Loeffler'a . . . . .	74
Barwienie rzęsek metodą Peppler'a . . . . .	74
<b>Barwienie preparatów ze krwi . . . . .</b>	<b>75</b>
Barwienie metodą Giemsa'y . . . . .	76
Barwienie metodą May-Grünwald-Giemsa'y (panoptyczna metoda Pappenheim'a) . . . . .	76
Barwienie metodą Manson'a . . . . .	77

Barwnik Manson'a . . . . .	77
Barwienie metodą Leishman'a . . . . .	77
<b>Ciemne tło . . . . .</b>	<b>77</b>
Metoda tuszowa Burni'ego . . . . .	77
Barwienie negatywne metodą Serkowskiego . . . . .	78

### **Badanie zasadniczych własności biologicznych**

<b>bakterji . . . . .</b>	<b>78-86</b>
Oddychanie tlenem . . . . .	78
Własności fermentacyjne . . . . .	79
Tworzenie zasad i kwasów . . . . .	80
Własności odtleniające . . . . .	80
Wytwarzanie siarkowodoru . . . . .	80
Wytwarzanie indolu . . . . .	81
Wytwarzanie peptonu . . . . .	82
Świecenie . . . . .	83
Odporność na działanie światła . . . . .	83
Odporność na ciepło . . . . .	84
Odporność na wysychanie . . . . .	85
Odporność na chemiczne środki dezynfekcyjne . . . . .	85
Własności chorobotwórcze . . . . .	85
Własności trujące . . . . .	86

### **CZĘŚĆ DRUGA.**

<b>Zbieranie materiału do badań bakterjologicz-</b>	
<b>nych. Naczynia . . . . .</b>	<b>87-95</b>
Krew . . . . .	87
do posiewu, do badań serologicznych . . . . .	88
Ropa . . . . .	90
Naloty i wydzieliny . . . . .	90
Kał . . . . .	91
Mocz . . . . .	91
Plwociny . . . . .	92
Płyn mózgowo-rdzeniowy . . . . .	92

## XII

Przesięki i wysięki . . . . .	93
Włosy, łuski skóry . . . . .	93
Materiał do badania krętka kiły . . . . .	93
Przedmioty, badane zwykle w chorobach zakaźnych . . . . .	94-95
<b>Technika badań bakterjologicznych w choro-</b>	
<b>bach zakaźnych . . . . .</b>	<b>95-185</b>
Badanie krwi: . . . . .	95
na obecność laseczników z grupy okrężnicy . . . . .	96
" " paciorkowców . . . . .	97
" " gronkowców . . . . .	98
" " krętków duru powrotnego . . . . .	99
" " krętków żółtaczki zakaźnej . . . . .	100
" " pasorzytów zimnicy . . . . .	101
" " świdrowców . . . . .	105
Badanie ropy: . . . . .	105
na obecność gronkowców i paciorkowców . . . . .	106
" " laseczników ropy błękitnej . . . . .	106
" " gonokoków . . . . .	107
" " laseczników błonicy . . . . .	108
" " las. ziarnistego gnilnego (Serkowskiego) . . . . .	108
" " las. węgliką . . . . .	108
" " las. nosacizny . . . . .	109
" " las. tężca . . . . .	111
" " las. obrzęku złośliwego (Pasteur'a) . . . . .	113
" " prątka gazowego (Fränkel'a) . . . . .	113
" " prątka szelestnicy (Ghon-Sachs'a) i in- nych beztlenowców, wywołujących „ga- zówki“ . . . . .	114
" " las. zgorzeli trzeszczącej (Arloing'a) . . . . .	115
" " las. Ducrey'a . . . . .	115
" " las. dżumy . . . . .	115
" " grzybka promienicy . . . . .	115
" " grzybka sporotrichon . . . . .	117
Badanie nalotów i wydzielin z jamy ust- nej, z jamy nosowo-gardzielowej, z ucha,	



ze spojówki oka, z pochwy, z owrzodzeń skórných i t. d. . . . .	117
na obecność las. błonicy . . . . .	117
"  "  las. błonicy rzekomej . . . . .	121
"  "  las. zeschnięcia . . . . .	121
"  "  las. ziarnistego gnilnego (Serkowskiego)	124
"  "  las. wrzecionowatego (Plaut-Vincent'a)	124
"  "  grzybka pleśniawki . . . . .	125
"  "  krętka bladego . . . . .	125
<b>Badanie płwociny:</b> . . . . .	128
na obecność las. gruźlicy . . . . .	129
"  "  pneumokoków (Fränkel'a) . . . . .	140
"  "  prątka otoczkowego (Friedländer'a) . . . . .	141
"  "  las. twardzieli nosa (Fritsch'a) . . . . .	142
na obecność las. grypy (Pfeiffer'a) . . . . .	142
"  "  las. Koch-Weeks'a . . . . .	143
na obecność las. ksztuśca (Bordet-Gengou) . . . . .	143
"  "  czworniaka . . . . .	144
"  "  ziarnikowca niezytowego . . . . .	144
"  "  las. dżumy . . . . .	145
<b>Badanie kału:</b> . . . . .	146
na obecność las. okrężnicy . . . . .	147
"  "  las. duru bszusznego . . . . .	149
"  "  las. durów rzekomych . . . . .	151
"  "  las. zasadotwórczego . . . . .	154
"  "  las. botulizmu . . . . .	154
"  "  las. krwawej biegunki . . . . .	155
"  "  przecinkowca cholerycznego . . . . .	162
"  "  las. gruźlicy . . . . .	167
"  "  pełzaków . . . . .	167
<b>Badanie moczu:</b> . . . . .	170
na obecność las. okrężnicy . . . . .	170
"  "  las. mlekowego gazotwórczego . . . . .	171
"  "  odmienia zwykłego . . . . .	171
"  "  odmienia Weil-Felix'a . . . . .	172

## XIV

na obecność las. ropy błękitnej . . . . .	172
„ „ las. gruźlicy . . . . .	172
„ „ gonokoków . . . . .	173
Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego:	174
na obecność meningokoków . . . . .	174
„ „ laseczn. gruźlicy . . . . .	178
Badanie wysięków i przesięków . . . . .	179
Badanie włosów, łusek skóry i t. p.:	180
na obecność grzybka strzygącego . . . . .	180
„ „ „ parcha . . . . .	181
„ „ pleśniaków . . . . .	183
„ „ drożdży . . . . .	183
Badanie ciałek Negri'ego (przy wścieklicznie)	184

#### Technika zasadniczych odczynów serologicznych . . . . . 185-246

Zbieranie krwi: od człowieka, od królika, od świnki morskiej, od b. małych zwierząt, od dużych zwierząt	185-187
Odwłóknianie krwi . . . . .	187
Przechowywanie surowic . . . . .	187
Określenia podstawowe z nauki o odporności . . . . .	188
Odczyn strącania (precypitacji) . . . . .	192
Odczyn zlepiania (aglutynacji) . . . . .	197
Aglutynacja makroskopowa . . . . .	200
„ mikroskopowa . . . . .	202
Odczyn Widal'a-Gruber'a . . . . .	203
Odczyn Castellani'ego . . . . .	207
Odczyn Weil-Felix'a . . . . .	209
Odczyn hemolityczny . . . . .	212
Odczyn wiązania dopełniacza Bordet-Gengou . . . . .	216
Odczyn Wassermann'a . . . . .	217
Odczyn Meinicke'go . . . . .	231

Odczyny bakterjobójcze . . . . .	232
Odczyn Rich. Pfeiffer'a . . . . .	233
Odcz. bakterjobójczy in vitro . . . . .	235
Określanie opsonini i bakterjotropin . . . . .	237
Odczyn Abderhalden'a . . . . .	241
<b>Dodatek</b> . . . . .	
Badanie wody . . . . .	247-250
„ mleka . . . . .	250-251
Badanie powietrza . . . . .	251-252
„ gleby . . . . .	253
Odczyn biologiczny Paul'a . . . . .	253-254
Rickettsia Prowazeki . . . . .	254-255
Tablica IV objaśniająca, w jakim okresie cierpienia należy badać przedmioty w najważniejszych chorobach zakaźnych . . . . .	256-257
Skorowidz . . . . .	258
Omyłki druku . . . . .	





---

## CZĘŚĆ PIERWSZA.

### Urządzenie pracowni bakterjologicznej.

W pracowni bakterjologicznej potrzebny jest cały szereg przyrządów ogólnych, niezbędnych do pracy przygotowawczej i specjalnej, oraz wiele przedmiotów podręcznych, potrzebnych dla każdej osoby pracującej.

Do przyrządów ogólnych należą: przyrządy do wyjąłowania (autoklaw, aparat Koch'a, suszarka do szkła), aparaty do hodowania bakterji (cieplarki, t. zw. „termostaty”, o ciepłocie 37° — dla wszelkich pożywek — i 22° dla żelatyny), lodownia, wirówka (najlepsza elektryczna, w ostateczności wodna i ręczna, jako zapasowa), waga „techniczna” i chemiczna, przyrząd do wstrząsania (trzęsawka elektryczna lub gazowa), dmuchawka, pompki wodne, filtry, kąpiele wodne, aparaty do ścinania surowicy, aparat do inaktywowania surowic. Mikrotom. Piecyk do parafiny; dalej trzymaki i klatki dla zwierząt, piecyk do palenia zwłok zwierząt. Ponadto musi być w pracowni obfita ilość szkła wszelkiego rodzaju: kolb (różnych wielkości i kształtów — okrągłych i t. zw. Erlenmeyer'a — najlepsze z trudno topliwego szkła jenajskiego), probówek (różnej średnicy i długości), płytek Petri'ego (różnej średnicy), szkiełek przedmiotowych, szkiełek przykrywkowych (18 mm × 18 mm).

Z przedmiotów podręcznych, którymi każdy pracownik musi się posługiwać, wymienić należy następujące:

Mikroskop, lampa do mikroskopu. Szkiełka przedmiotowe zwykłe i do kropli wiszącej, szkiełka przykrywkowe, szkiełka zegarkowe, szczypczyki zwykłe i Cornet'a. Wazelina (żółta i amerykańska), pendzelek cienki (lub cienkie pałeczki drewniane). Buteleczki z barwnikami. Teczki do preparatów. Statywy do probówek różnej wielkości. Probówki różnej wielkości. Pipetki miareczkowane i włoskowane, gumki do pipet, cylindry miernicze, lejki szklane i bibuła do sączenia. Uszka platynowe i druciki proste (do wkłuwania) oraz statyw do nich. Palnik Bunsena z płomieniem-oszczędzaczem, trójnóg i siatka. Bagietki proste i zgięte pod prostym kątem. Biurety. Ołówki do pisania na szkle. Płytką z podziałką do liczenia kolonji. Kolba z fiz. rozc. NaCl. Naczynie do wrzucania zakażonego szkła ze środkiem odkażającym (najlepiej 25—50% ac. sulphuricum crudum). Środek odkażający do rąk.

Stół do pracy z materiałem zakaźnym powinien być pokryty materiałem łatwo dającym się odkażać, a więc grubą szybą szklaną, lawą (doskonała mieszanina szwajcarska), w ostateczności cienkimi kaflami (niedogodne, gdyż tworzą się szpary). W stole lub przy stole powinien znajdować się zlew i kran wodociągowy z wodą bieżącą.

Praca bakterjologiczna jest zawsze połączona z pewnym niebezpieczeństwem dla pracownika na tem polu; należy nieustannie o tem pamiętać i zachowywać wszelkie środki ostrożności, ze względu na własną osobę, jak i na otoczenie. Pracować należy zawsze w fartuchach, nie jadać i nie palić podczas pracy. Przed opuszczeniem pracowni



dokładnie wymyć ręce mydłem w ciepłej wodzie (przez parę minut trąć ręce i paznokcie szczotką), poczem odkazić je przez obmycie 60—70<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wyskokiem (lub denaturowanym z dodatkiem 0,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> kw. azotowego lub 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> formaliny) lub 1<sup>0</sup>/<sub>00</sub> roztworem sublimatu (po zanurzeniu rąk w tym ostatnim płynie pozostawiamy je czas pewien nie wystawiając). Niektórzy zalecają 2—3<sup>0</sup>/<sub>00</sub> roztwór subliminy. Niebezpieczeństwo zakażenia laboratoryjnego może też zależeć od otwierania w bliskości ust probówek z wyschniętym materiałem (naprz. hodowli bac. mallei). Szczepiący w takich warunkach może znaleźć się w atmosferze z rozpylonymi bakteriami — należy więc zachować pewne środki ostrożności (wata do ust i do nosa i t. p.).

Specjalną ostrożność zachowywać należy podczas odpakowywania materiału zakaźnego (kał, mocz, krew i t. d.) — stłuczone probówki natychmiast przenieść szczypcami do jałowej probówki lub płytki; pozostałe odłamki szkła, zawalane pudełka i t. d. wrzucić do naczynia z kwasem siarkowym. W razie, gdyby materiał zakaźny prysnął lub rozlał się na stół, podłogę i t. p. — natychmiast odkazić 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworem lizolu lub 1—2<sup>0</sup>/<sub>00</sub> roztworem sublimatu; środek odkażający pozostawić na zakażonym miejscu godzinę lub dłużej, poczem zetrzeć watą lub bibułą i spalić.

Nie sposób wskazywać tu na wszelkie możliwości — praktyka wykaże, jak się należy zachowywać jeszcze w innych okolicznościach. Zawsze tylko należy pamiętać o największej ostrożności i dokładności w pracy.

Z przyrządów podanych wymaga obszerniejszego omówienia mikroskop.

## Mikroskop.

Mikroskop jest to przyrząd złożony z dwóch wsuniętych w siebie rur, stanowiących jedną całość, oraz dwóch soczewek wypukłych, znajdujących się na przeciwnych końcach owych rur. Soczewka, do której zbliżamy oko, a więc wkładana do górnego otworu, nazywa się okularzem, soczewka w dolnym otworze rury, zbliżająca się do przedmiotu, nosi nazwę soczewki przedmiotowej (objektywu). Obydwie te soczewki, ustawione na pewnej od siebie odległości (odległość ta może się zmieniać przez wsuwanie i wysuwanie rury), dają nam obraz pozorny, odwrotny i znacznie powiększony; stopień owego powiększenia zależy od siły załamującej światło w obydwu soczewkach — do różnych więc powiększeń muszą być różne soczewki (szczegóły — patrz podręcznik fizyki).

Dla skupienia lub rozsiania promieni świetlnych, które mają oświetlić przedmiot badany przez soczewki, istnieje poniżej rury, mieszczącej soczewki, lustro o dwóch płaszczyznach: wklęsłej do skupiania promieni (gdy idzie o silne oświetlenie części przedmiotu badanego), oraz płaskiej (gdy chodzi o bardziej równomierne oświetlenie całego przedmiotu).

Przedmiot badany umieszczamy na stoliku mikroskopu, leżącym pod rurą; w stoliku tym znajduje się otwór, przez który przechodzą promienie świetlne, zbierane przez lustro. W lepszych mikroskopach, oprócz lusterka istnieje jeszcze t. zw. przyrząd oświetlający (t. zw. kondensator) Abbe'go. W celu regulowania dopływu światła są jeszcze w mikroskopie zsuwalne i rozsuwalne zasłonki, złożone z szeregu

blaszek; zsuwając blaszki, otrzymujemy mały otwór, przez który wpływa światło, rozsuwając — uprzystępniamy dopływ światła (zasłonki te, działające na podobieństwo źrenicy, otrzymały też nazwę „iris“ — źrenica, „diafragma“ — przepona).

Rura ze stolikiem, przyrządami oświetlającymi i t. d. opiera się na szerokiej, ciężkiej podstawie; wszystko to stanowi t. zw. statyw. W nowszych mikroskopach statyw jest urządzony w ten sposób, że „łamie się“ na dwie części, to znaczy, za pomocą specjalnego bloczku może być rozłożony na część górną — ruchomą, ze stoliczkiem i rurą — i dolną z aparatami oświetlającymi; pozwala to patrzącemu, aby siedział wygodnie i oglądał preparat bez przykrego wyciągania szyi. Do podnoszenia i opuszczania rury służy dość gruba śruba zębata, za pomocą której przysuwamy rurę z soczewkami do preparatu, leżącego na stoliku; dokładne ustawienie odbywa się za pomocą drugiej b. subtelnej śruby „mikrometrycznej“. Do rozmaitych powiększeń służą rozmaite szkła; aby uniknąć uciążliwego wkręcania i wykręcania obiektywów (umieszczone są w dolnej części rury, przeto trudniej je wydobywać — okulary w górnym otworze wysuwają się łatwo), u dołu rury znajduje się t. zw. „rewolwer“ — szeroka blaszka, w którą odrazu wkręcamy trzy obiektywy o różnej sile powiększania; w ten sposób obracając rewolwerem z łatwością zmieniamy obiektywy.

Soczewki, zarówno okulary, jak obiektywy, są oznaczane, zależnie od swej siły powiększającej, w jednych mikroskopach, naprz. Zeiss'a, za pomocą liter, w innych — Leitz'a, Reichert'a — za pomocą cyfr. A więc *a* będzie najniższym powiększeniem, potem ACDE (te ostatnie nad-



zwyczaj silne); lub też 1 2 3...—7 im wyższe cyfry, tem silniejsze powiększenie. Ponieważ używamy jednocześnie dwu soczewek (okularu i obiektywu), przeto mogą zachodzić najrozmaitsze kombinacje, dające mniejsze lub większe powiększenie. Można więc np. brać jako okular soczewkę 1, a do niej obiektywy 3—7 i inne, można brać różne okulary 1—3—4 do jednego i tego samego obiektywu (np. 3); jest w tem różnorodność, pozwalająca na posługiwanie się mikroskopem w różnych okolicznościach, wymagająca jednak znajomości przyrządu. Wszystkie te szkła powiększające, t. zw. „suche systemy“, nie dają nam jednak — zwłaszcza, gdy chodzi o badania bakterjologiczne — ani obrazów dostatecznie jasnych, ani odpowiednio powiększonych; to też w bakterjologii posługujemy się jeszcze specjalnymi soczewkami do immersji, czyli tak zw. „układami z cieczami“, gdzie pomiędzy preparatem badanym a soczewką znajduje się nie warstwa powietrza, lecz warstwa płynu (naprz. wody w soczewkach do wodnej immersji); zwykle używamy zgęszczonego olejku cedrowego, który posiada ten sam współczynnik załamania światła co i soczewka. Promienie świetlne przechodzą więc przez jednolite środowisko, a nie przez różne, jak w układzie suchym, przez co obraz jest wyraźniejszy i silniej oświetlony. Powiększenia, które otrzymać można przy pomocy immersji wynoszą 1.000 razy i więcej. Otrzymanie tak silnych powiększeń za pomocą suchych systemów wymaga specjalnych szkieł, t. zw. „apochromatów“, lub układu fluorytowego, ale i wówczas nawet obrazy nie są ani tak czyste, ani tak jasne, jak przy immersji z olejkim cedrowym.

Badanie zapomocą immersji odbywa się w ten sposób, że na szkiełku z preparatem umieszczamy kroplę olejku cedrowego, poczem opuszczamy rurę mikroskopu, patrząc na nią z boku, dopóki nie dotknie ona cokolwiek kropli olejku; wówczas zaczynamy patrzeć przez okular; wciąż poruszając śrubą nastawiamy rurę tak, aby otrzymać obraz drobnowidzowy, choćby narazie niezupełnie jeszcze wyraźny i czysty — ostatecznie obraz regulujemy i nastawiamy do swego wzroku śrubą mikrometryczną.

Nie przedstawia to trudności, gdy mamy do czynienia z preparatami barwionymi (gdzie bakterje są zabite i zabarwione) — cokolwiek trudniej badać t. zw. „kroplę wiszącą“, bardzo często stosowaną w praktyce bakterjologicznej do badania drobnoustrojów żywych.

Kroplę wiszącą przygotowuje się w następujący sposób: na szkiełku przykrywkowym, umieszczonem na brzegu stolika mikroskopowego lub w szczypczykach (Cornet'a), umieszczamy przepalonym uszkiem platynowem kroplę fizjologicznego roztworu soli, buljonu i t. p.; kropla powinna być niezbyt wypukła, aby wszystkie jej części jednakowo dobrze można było obejrzeć. W kropli rozcieramy platynką odrobinę materiału z bakterjami (z płynów zakażonych możemy odrazu brać kroplę na szkiełko), poczem szkiełko szybkim ruchem przewracamy i nakładamy na wgłębienie specjalnego szkiełka przedmiotowego z wklęsnięciem, którego brzeg pokryto uprzednio wazeliną. Szkiełko powinno szczelnie przylegać do wazeliny — kropelka wówczas jest zupełnie zamknięta. O ile szkiełko jest przyklepione nieszczelnie, kropla szybko wysycha, przyczem tworzą się prądy, które unoszą bakterje, co pozornie sprawia wrażenie ruchu.

Aby zbadać kroplę wiszącą pod immersją, ogląda się ją poprzednio przy słabem powiększeniu. W tym celu zsuwa się zasłonkę (diafragmę), zostawiając bardzo mały otwór, aby kropla na ciemnym tle odcinała się wyraźniej, poczem przy słabem powiększeniu ustawia się ją tak, aby brzeg kropli przecinał pole widzenia. Wówczas dopiero można zastosować immersję. Diafragmę należy rozsunąć, a na preparacie — nie zmieniając jego położenia — umieszcza się kroplę olejku cedrowego.

Zmiana obiektywów w mikroskopach z obiektywami t. zw. „scentrowanymi“ odbywa się przez przesunięcie obiektywu do immersji na miejsce poprzedniego obiektywu bez podnoszenia rury, przyczem soczewka immersji powinna zetknąć się z kroplą olejku na preparacie. Jeśli obiektywy nie są scentrowane, należy unieść cokolwiek rurę, przesunąć obiektyw mały na obiektyw immersyjny, opuścić rurę aż do zetknięcia soczewki z olejkiem, poczem nastawić przy pomocy śruby mikrometrycznej (brzeg kropli powinien leżeć pośrodku pola widzenia).

Nastawienie preparatu przy pomocy immersji w kropli wiszącej jest dla niewprawnego pracownika dość trudne, gdyż mamy tu do czynienia z tłem zupełnie jasnym (dla ułatwienia można dodać do kropli odrobinę rozcieńczonego barwnika np. błękitu metylenowego, fuksyny); ruchy wykonywane śrubą mikrometryczną powinny być bardzo ostrożne; za linię orientacyjną służy brzeg kropli — delikatna siateczka leżąca nazewnątrz kropli stanowi skupienie pary, otaczającej zwykle kroplę wokoło. O ile kropli nie możemy znaleźć, można na nieruchomym stoliku lewą ręką leciuchno przesuwając preparat, na stoliku ruchomym —



kręcić śrubką stolika; brzeg kropli odcina się wyraźnie od reszty tła, a pozatem dążą ku niemu drobnoustroje, gdyż odbywa się tu żywsza wymiana gazów, to też najłatwiej dostrzedz tu ruch bakterji. Do kropli wiszącej nie należy brać wody przekroplonej, ponieważ może ona hamować ruch bakterji; do badania drobnoustrojów wyjętych z ciepłarki (37°) należy brać ciecz cokolwiek ogrzaną, aby bakterje nie utraciły ruchu wskutek zmiany ciepłoty środowiska.

Jeśli na wyjąłowym szkieleku pokrywkowym umieścimy kroplę jakiejś płynnej pożywki, do której uprzednio zaszczepiliśmy materiał zakaźny, wówczas mamy przed sobą hodowlę, w której możemy badać — zwłaszcza stosując ciepłarkę Nuttala — różne procesy biologiczne, zwłaszcza podział bakterji.

Jako źródło światła służy w dzień światło dzienne, najlepiej północne, które jest najbardziej równomierne; jako sztucznych źródeł można używać światła elektrycznego, gazowego, w ostateczności i naftowego; należy wówczas (gdy światło jest żółte) wkładać specjalne szkieleko matowe lub niebieskie w trzymak mikroskopu. Można też postawić między źródłem sztucznego światła a lusterkiem mikroskopu szklaną kulę lub kolbę litrową, napełnioną roztworem siarczanu miedzi i amoniakiem (rozczyń 0,25—0,5 gr.  $\text{Cu SO}_4$  na litr wody przekroplonej + 10  $\text{cm}^3$  25% amoniaku lub więcej, aż do zupełnej białości obrazu drobnowidzowego). Do kropli wiszącej zsuwamy zasłonkę i nastawiamy lustro wklęsłe; w silnem oświetleniu do oglądania preparatów barwionych używamy lusterka płaskiego, zasłonkę zaś rozsuwamy; w sztucznem oświetleniu korzystamy z płaskiego lusterka.

Naogół jest zasada: lusterko wklęsłe w słabych powiększeniach i blizkiem źródle światła, lusterko płaskie — przy immersji i oddalonym źródle światła; aparat Abbe'go podnosimy zupełnie do góry przy płaskim lusterku (i dalekiem źródle światła), opuszczamy przy lusterku wklęsłym (i blizkiem źródle światła).

Bardzo silnego światła wymaga t. zw. ciemne tło; na tle tem odcinają się żywe i ruchome krętki, są widoczne biczyki bakterji i t. d. Do otrzymania takich obrazów używamy małych lampek łukowych (t. zw. „Liliput“), lub lampy Nernst'a, oraz specjalne kondensatory (paraboloid — fabryki Zeiss'a, bisferyczny — Leitz'a, „Universalkondensator“ — Reichert'a), zastępujące ultramikroskop, którego naogół w bakterjologii nie używamy. Ponieważ jednak nie każda pracownia bakterjologiczna posiada instrumenty do badania na ciemnym tle, przeto najczęściej posługujemy się tuszową metodą Burri'ego, która oddaje podobne usługi, jak ciemne tło.

### Czyszczenie mikroskopu.

Mikroskop, jako przyrząd bardzo precyzyjny, wymaga wielkiej czystości; należy go czyścić przynajmniej raz na tydzień jaknajdokładniej ściereczką, a szkła (objektywy i okulary) i lusterko codzien płótnem i zamszem. Soczewkę do immersji należy po każdym badaniu osuszać z olejku kawałkiem bibuły, o ile zaś zaschnie trochę olejku (lub balsamu kanadyjskiego), wówczas zetrzeć płóciem, zmaczanem w ksylolu lub benzynie (nie trzeć zbyt długo, by nie rozkleić soczewki!); soczewki zwykłe wystarczy wycierać płóciem lub zamszem. Przyrząd po ukończonej pracy należy chować do pudełka lub pod

klosz szklany (pomalowany na czarno), by ochronić przed światłem i kurzem.

O czyszczeniu szkiełek przedmiotowych i przykrywkowych patrz str. 17—18.

### Systemy mikroskopów.

Krajowych mikroskopów, niestety, nie posiadamy, najbardziej rozpowszechnione są u nas mikroskopy niemieckie Zeiss'a, Leitz'a i Reichert'a. Najdokładniejsze i najczystsze obrazy dają mikroskopy Zeiss'a, są jednak najdroższe; zupełnie dobre są instrumenty Leitz'a i Reichert'a. Z francuskich fabryk Nacet, Stiassnie i in., z angielskich i amerykańskich Spencer, Bausch i Lomb bardzo mało są u nas rozpowszechnione.

Mikroskop Zeiss'a do badań bakterjologicznych, a więc z immersją kosztował (przed wojną) od Mk. 400, Leitz'a od 300, Reichert'a od 300; podczas wojny ceny podniosły się o 120%, a nawet wyżej.

### Wyjaławianie i odkażanie.

Badania bakterjologiczne, mające na celu wyodrębnianie drobnoustrojów, dokonywane być muszą w ściśle określonych warunkach: zarówno naczynia, jak i wszelka ich zawartość, mająca służyć jako materiał odżywczy dla bakterji, muszą być wyjaławione (sterylizowane), t. j. całkowicie pozbawione wszelkich drobnoustrojów.

Do wyjaławiania używamy w technice bakterjologicznej środków fizycznych (ciepła), rzadziej — środków chemicznych.



Wyjaławianie zapomocą ciepła bywa różnorodne:

1) Przepalanie w płomieniu. Przedmioty niewielkie, jak druciki platynowe, nożyczki, pincetki, bagietki szklane i t. p. można wyjaławiać w płomieniu. Przedmioty metalowe (prócz platyny) przez częste przepalanie w płomieniu niszczą się i dlatego ten rodzaj wyjaławiania można stosować tylko w razie nagłej potrzeby. O wyjaławianiu instrumentów patrz str. 18. Również płytki szklane, małe kolbki, pipetki, części strzykawek i t. p. można — w razie koniecznej potrzeby — wyjałowić w płomieniu.

2) Wyjaławianie przy pomocy wysokiej ciepłoty ( $140^{\circ}$ — $160^{\circ}$ ) — t. zw. „sucha sterylizacja”. Ponieważ ciepłoty  $140^{\circ}$ — $160^{\circ}$  żaden drobnoustrój (wraz z najbardziej odpornymi zarodnikami) znieść nie może — jest to najpewniejszy sposób wyjaławiania, który jednak ze względu na materiał pewnych przedmiotów (np. papier, wata i t. p.) nie zawsze daje się zastosować. Wyjaławiamy w ten sposób zwykle tylko szkło (kolby, płytki, probówki, pipetki i t. p.). O wyjaławianiu szkła patrz str. 16. Do wyjaławiania na sucho służy specjalna „suszarka” — skrzynka metalowa, zwykle kryta asbestem. Skrzynka ta ma ściany podwójne, pomiędzy którymi znajduje się warstwa powietrza, ogrzewająca się przez nagrzewanie spodu suszarki.

3) Wyjaławianie w parze powyżej  $100^{\circ}$  pod ciśnieniem — t. zw. „wilgotna sterylizacja”. Ten rodzaj wyjaławiania stosuje się do przedmiotów, które nie mogą być wyjaławiane na sucho (t. j. powyżej  $100^{\circ}$ ), a więc: pożywki stałe i płynne, fizjologiczny roztwór soli i t. d. Do wyjaławiania w ten sposób służy specjalny przyrząd t. zw. „autoklaw” (samozamykacz) :budo-

wany na podstawie znanego doświadczenia Papin'a. Jest to mocno zbudowany kocioł o tęgich ścianach, którego pokrywa zamyka się szczelnie zapomocą śrub. Przedmioty przeznaczone do wyjaławiania wstawia się w drucianym koszu na dno aparatu, poczem pokrywa zostaje szczelnie zaśrubowana, wszystkie krany zamknięte, z wyjątkiem jednego wentylu.

Gdy woda, nalana uprzednio do kotła, zaczyna się gotować, a para zacznie się wydobywać, zrazu słabszym, potem silniejszym strumieniem — wówczas należy wentyl zamknąć. Wytwarzająca się przez gotowanie wody para nie może się z kotła wydostać nazewnątrz, pozostaje w kotle, podnosząc ciśnienie oraz ciepłotę (powyżej  $100^{\circ}$ ). Z wielu doświadczeń wiadomo, że podniesione ciśnienie sprzyja szybkości wyjaławiania. Do mierzenia ciśnienia dołączony jest do autoklawu manometr, na którym cyfra czerwona wskazuje potrzebną ilość atmosfer. Gdy strzałka na manometrze dojdzie do czerwonej cyfry (co trwa 20—30 m. od chwili zamknięcia wentylu), gasimy palnik. Gdy strzałka na manometrze opadnie do 0, wypuszczamy część pary przez wentyl, poczem otwieramy pokrywę. Dla uniknięcia zbyt wielkiego ciśnienia służy bezpiecznik umieszczony zwykle w górnej części przyrządu, który w razie potrzeby unosi się do góry i wypuszcza część pary.

4) Wyjaławianie w bieżącej parze w  $100^{\circ}$ . Ten sposób wyjaławiania stosuje się w razie braku autoklawu oraz do przedmiotów, nie znoszących ogrzania powyżej  $100^{\circ}$  (naprz. pożywki z cukrami, żelatyna). Posługujemy się tu t. zw. „aparatem Koch'a“. Jest to wysoki kocioł, przykryty u góry szczelnie weń wchodzącą pokrywą z otworem

pośrodku. Na dno aparatu nalewamy wody, poczem na specjalnem denku ponad wodą ustawiamy kosze druciane z przedmiotami do wyjaławiania. Po ogrzaniu wody do 100° para unosi się z dna kotła ku górze i wydostaje się przez znajdujący się tam otwór; w ten sposób para przenika pomiędzy przedmioty wyjaławiane. Para działając w ciągu  $\frac{1}{2}$ —1 godz. zabija żywe bakterje; ponieważ najczęściej mamy do czynienia z zarodnikowcami, należy przeto wyjaławianie powtórzyć trzykrotnie (w ciągu trzech dni).

Pod pasteryzacją rozumiemy krótkie nagrzewanie od 65—70°, z następnem szybkim ochładzaniem (stosuje się do mleka).

Bioryzacją (również stosowaną do wyjaławiania mleka) nazywa się ogrzewanie rozpylonego płynu w kotle, ogrzany do 75°, przyczem giną drobnoustroje chorobotwórcze.

Dwie ostatnie metody znajdują bardzo małe zastosowanie w pracowniach bakterjologicznych.

### Środki chemiczne.

Ze środków chemicznych, używanych do wyjaławiania w pracowni bakterjologicznej stosowany jest sublimat 5‰ (do obmywania rąk 1‰); do przedmiotów metalowych używać go nie można. Do obmywania stołów, naczyń, przedmiotów metalowych i t. d., używamy 2—3‰ roztworu lizolu, 10‰ roztworu krezolowo-mydłanego, 3‰ roztworu fenolu.

Stare hodowle wrzuca się do 10—25% kwasu siarkowego (nieoczyszczanego), solnego lub azotowego.



Szkło (pipetki i t. d.) przemywa się alkoholem zmieszonym w równych częściach z eterem siarkowym.

O wyjaławianiu rąk patrz str. 2—3.

## Czynności pomocnicze w pracowni bakterjologicznej

### Urządzenie miejsca do pracy.

Każdy pracujący musi mieć do rozporządzenia cały szereg drobnych przedmiotów (patrz str. 2), których utrzymanie wymaga jak największej czystości, chroniąc osobę pracującą od ciągłego niebezpieczeństwa, na które jest narażona w pracowni bakterjologicznej (materiał zakaźny!), oraz gwarantując dokładność pracy (zanieczyszczenia!). — Dotyczy to przede wszystkim szkła, które należy jak najdokładniej odkażać, myć i wyjaławiać.

### Odkazanie szkła.

Wszystkie naczynia, w których znajdował się materiał zakaźny należy przed umyciem odkażyć, t. j. zabić pozostałe w nich bakterje. Płytki (z zakażoną pożywką, materiałem zakaźnym i t. p.) należy gotować w wodzie w emaljowanym garnku przez 20—30 minut, od chwili zagotowania. Probówki, kolbki, cylindry i t. p. należy gotować w aparacie Koch'a przez 1 godzinę lub w autoklawie przez 20—30 m. (czas gotowania liczyć zawsze od chwili, kiedy para zacznie wydobywać się z aparatu!). O ile nie można gotować naczyni z zakażonego szkła, należy je tymczasem odkażać

przez pozostawienie go w 1—2‰ roztworze sublimatu, lub w 3—5‰ roztworze lizolu albo w 10‰ roztworze kwasu siarczanego (lub w 25‰ kwasie siarczanym technicznym), poczem odkażać przez gotowanie, jak powyżej.

### Mycie szkła.

Po wygotowaniu należy szkło (płytki, probówki, kolbki, cylindry i t. d.) umyć. Uskutecznia się to przez poddanie go działaniu prądu wody bieżącej, pod którym pozostaje tak długo, dopóki resztki pożywek i t. p. nie zostaną usunięte; probówki czyści się wewnątrz specjalną szczoteczką chemiczną. Przedmioty szklane, pokryte warstwą tłuszczu, wkłada się na 5—10 minut do 2‰ roztworu sody, następnie na 20 minut do wody zakwaszonej kwasem solnym (10 cm<sup>3</sup> na 1 litr wody), poczem płucze się je wielokrotnie wodą.

### Wyjaławianie szkła.

Wszystkie przedmioty szklane, używane do celów bakteriologicznych muszą być wyjaławione, t. j., całkowicie pozbawione drobnoustrojów.

Płytki po umyciu wyciera się czystą ścierką i ustawia w drucianym koszu (można również wprost w suszarce) dnem do góry; podobnie postępujemy z cylindrami, probówkami, kolbkami, i t. d., które również ustawiamy w drucianym koszu. Po obeschnięciu szkła kosze wstawiamy do suszarki, którą nagrzewamy do 160—200°. Po skończonym wyjaławianiu należy zwrócić uwagę, aby szkło powoli stygło (nie otwierać drzwiczek suszarki natychmiast po zgaszeniu palnika!).

## Odkazanie i wyjaławianie pipetek.

Zakażone pipetki należy wstawiać do dużego cylindra ze środkiem odkazającym (1‰ roztw. sublimatu, 3‰ roztw. lizolu i t. p.); na dnie powinien leżeć kawałek waty, aby przy wkładaniu nie stłuc końca pipetki. W naczyniu tem pipetki pozostają przez 12—24 godzin, następnie wkłada się je na 1 godz. do 5‰ roztworu kwasu solnego, poczem kilkakrotnie przepłukuje wodą. Ostatecznie przemywa się je alkoholem, eterem lub benzyną, wysusza w suszarce (60°) i wyjaławia w 160—200°, jak inne przedmioty szklane. Pipetki, które były zakażone lasecznikami gruzliczymi, pozostawiamy przez 2 dni w 20‰ kwasie siarkowym, poczem przepłukujemy wodą i wyjaławiamy, jak pozostałe pipetki.

## Odkazanie i czyszczenie szkiełek przedmiotowych i przykrywkowych.

W każdym miejscu pracy, gdzie przygotowywane są preparaty z materiału zakaźnego, musi stać naczynie z płynem odkazającym. Szkiełka przedmiotowe należy natychmiast po użyciu wrzucić do naczynia napełnionego 3‰ roztworem lizolu. W płynie tym powinny pozostać przez kilka dni, poczem należy je gotować w wodzie przez  $\frac{1}{2}$  godziny i wypłukać w czystej wodzie. Po obtarciu włożyć do alkoholu (używanego) i dokładnie wytrzeć płócienną ścierką.

Do szkiełek przykrywkowych stawia się drugie naczynie z płynem odkazającym i postępuje się z nimi, jak ze szkiełkami przedmiotowymi. Ze specjalną ostrożnością należy zdejmować szkiełka przykrywkowe z tak zwanej

Technika badań bakt.





„kropli wiszącej“. Szkiełka te mają zawsze na brzegu warstwę wazeliny; zdejmujący powinien zwracać baczność uwagę, aby podczas zdejmowania szkiełka nie rozlać kropki — należy ostrożnie unieść w jednym miejscu szkiełko, poczem szybkim ruchem odkleić od szkiełka przedmiotowego i przewrócić, aby kropła była zwrócona do góry. Szkiełka wrzucamy do wody z sodą, gdzie się gotują w ciągu 15—20 min., poczem z wody po obsuszeniu przenosi się do alkoholu (50—70%), gdzie pozostają czas pewien. Wycierać ostrożnie szmatką płócienną.

### Czyszczenie instrumentów.

Po użyciu należy instrumenty (skalpele, nożyczki, pincetki i t. p.) zanurzyć w 3% roztworze lizolu, wytrzeć wata lub ścierką i gotować 10—15 minut w 2% roztworze sody. Następnie przenieść je do alkoholu, wytrzeć do sucha i wyjałowić w suszarce w 160°. Można również — w razie pośpiechu — niektóre instrumenty (pincetki, skalpele i t. p.) przepalić w płomieniu, ale przez to tępieją one i czernieją. Natomiast bez szkody przepalać można instrumenty z platyny lub irydium (igły do strzykawek).

Strzykawki (szpryce) wyjaławiamy tylko zapomocą gotowania.

### Przygotowywanie jałowego fizjologicznego roztworu soli (NaCl).

Do 1 litra wody przekroplonej dodać 8,5 gr. soli kuchennej chemicznie czystej (wżyć na wadze chemicznej),

zagotować, przesączyć przez bibułę, rozlać do kolbek po 100—200 cm<sup>3</sup> i wyjałowić w autoklawie.

### Przygotowywanie zawiesin bakteryjnych.

Na 24 godziną hodowlę agarową nalewamy ok. 5 cm<sup>3</sup> jałowego fizjologicznego roztworu soli, hodowlę zdrapujemy delikatnie drucikiem platynowym i gęstą zawiesinę zlewamy do zwężonej probówki. Po kilkominutowem wirowaniu zawiesinę zlewamy do większej probówki lub kolbki i rozcieńczamy większą ilością fizjologicznego roztworu soli (naprz. 10—20 cm<sup>3</sup> dla las. tyfusowych, przecinkowców cholerycznych i t. p. lub 30—40 cm<sup>3</sup> dla laseczki odmieńca Weil-Felix'a). Zamiast wirowania można gotową zawiesinę przesączyć przez bibułę.

Istnieje wiele metod ścisłego określania gęstości zawiesiny — naprz. liczenie kolonji w 1 cm<sup>3</sup> silnego rozcieńczenia (naprz. 1 : 1,000,000), metoda Wrighta liczenia pod mikroskopem bakterji na preparatach barwionych z krwinkami, metoda ważenia Bujwida i Szereszewskiego oraz inne — w praktyce jednak, do codziennego użytku, wystarcza sposób podany. Natomiast ścisłe liczenie ilości bakterji w danej objętości zawiesiny konieczne jest do przygotowywania szczepionek mianowanych.

### Odwłóknianie krwi.

Krew natychmiast po zebraniu wlewa się do kolbki z perełkami szklanemi, z którymi musi być przez 7—10 minut wstrząsana. Do odwłókniania krwi używa się również płynów hamujących jej krzepnięcie, jak naprz. 1,5% roztworu cytrynianu sodu lub 1% szczawianu sodu.

## Filtrowanie bakterji.

Do filtrowania bakterji używane są sączi dwojakiego rodzaju: twarde (z porcelany, gliny, krzemionki) i miękkie (z azbestu).

Ponieważ ciecz przechodzi przez pory sącza bardzo powoli, przeto, dla przyspieszenia procesu, stosuje się często sączenie pod ciśnieniem. Jako siły ssącej używa się najczęściej prądu wody z wodociągu; aparat filtrujący łączy się zapomocą bocznej rurki naczynia, w które zbiera się przesącz, ze szklaną lub metalową pompką ssącą. Aby uniknąć cofnięcia się wody do naczynia, w którym wytworzyła się próżnia, pomiędzy pompką a naczyniem powinien znajdować się wentyl.

Twarde filtry mają zwykle postać świec, próżnych w środku, z końcem przykitowanym do metalowej rurki. Świece Pasteur-Chamberland'a zrobione są z porcelany, świece Nordtmeyer'a-Berkefeld'a z krzemionki, a okrągłe filtry Pukall'a — z gliny. Przed użyciem należy świece wyjaławiać w aparacie Koch'a lub w gotującej się wodzie, bacząc, by je nagrzewać stopniowo. Po użyciu należy natychmiast usunąć nagromadzone na świecy bakterje przez płukanie bieżącą wodą, przyczem — o ile mieliśmy do czynienia z zarazkami — wyjałowić uprzednio przez gotowanie lub w aparacie Koch'a.

Miękkie filtry przygotowuje się z azbestu. Filtr Heim'a składa się z metalowego sitka, przymocowanego zapomocą metalowej rury do cylindra szklanego. Sitko obkłada się równomiernie oczyszczonym azbestem.



## Przygotowywanie pożywek.

Przygotowujemy pożywki zawsze w naczyniach jałowych, jedynie do gotowania mięsa można użyć garnka, dobrze wymytego i wysuszonego, bez wyjaławiania. Podczas sporządzania podłoży należy zachować wszelkie ostrożności, by nie zakazić podłoża, a więc: przepalać brzegi naczyń podczas otwierania lub przelewania pożywki z jednego do drugiego i t. p.; wszelkie przedmioty pomocnicze, jak bagietki szklane, pipetki, cylindry i t. p. należy dokładnie przepalić przed użyciem, kolbkę wzgl. butelkę, trzeba zamykać korkiem z waty, wraz z którym winna być uprzednio wyjałowiona.

Zasadniczo odczyn pożywek, służących do hodowania bakterji, powinien być słabo (dla przecinkowców cholery silnie) zasadowy, grzybki natomiast rosną na pożywkach kwaśnych. Do alkalizowania używamy normalnego roztworu sody, ługu potasowego lub sodowego, do zakwaszania normalnego kwasu solnego, siarkowego lub mlekowego, jako wskaźnik bierzemy papierek lakmusowy (wzgl. fenolftaleinę).

Zarówno ług, jak kwas, należy dodawać do pożywki po kropli pipetką, by nie przekroczyć właściwego odczynu. Chcąc dokładnie znać odczyn danego podłoża, oznaczamy go w stopniach, wedł. skali *M a d s e n a*, której punkt zerowy oznacza obojętny odczyn podłoża względem fenolftaleiny; jako kierunek ujemny (—), oznacza Madsen zasadowość, a jako kierunek dodatni (+) — kwasowość. Zasadowość osiąga się przez dodawanie normalnego roztworu  $\text{KOH}$ , oznaczając cyframi ilość  $\text{cm}^3$  roztworu, której użyto na litr

podłoża, naprz. 10 cm<sup>3</sup>, 25 cm<sup>3</sup> i t. d., oznaczając stopnie zasadowości: —10<sup>0</sup>, —25<sup>0</sup> i t. d. Kwasowość osiąga się przez dodawanie normalnego roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i na takiej samej zasadzie oznacza się ilość zużytych cm<sup>3</sup> kwasu na litr podłoża, jako miano tego podłoża, naprz.: +10<sup>0</sup>, +25<sup>0</sup> i t. p.

### Pożywki płynne.

Jako podstawa dla większości pożywek służy woda mięsna. Woda mięsna przygotowuje się z mięsa wołowego lub końskiego — w braku takowego z gotowych suchych preparatów (wyciąg mięsny Liebig'a, Maggi'ego, buljon w proszku „Ragit“ firmy Mercka). W ostatnich czasach zaczęto używać buljonu, przygotowanego na skrzepie krwi wołowej.

#### Buljon zwykły.

- 1 litr wody.
- 500 gr. mięsa.
- 10 gr. peptonu (Witte lub Chapoteaut).
- 5 gr. soli kuchennej.

Mięso wołowe lub końskie, starannie oczyszczone z żył i tłuszczu, zemleć w maszynce lub posiekać nożem. Gotować w emaljowanym garnku na płomieniu przez  $\frac{3}{4}$  godziny (od zagotowania) lub przez 2 godziny w aparacie Koch'a, poczem przesączyć przez bibułę. Do otrzymanej wody mięsnej dodać peptonu oraz soli kuchennej, zubożyć, ponownie zagotować na płomieniu lub w aparacie Koch'a, przesączyć i ostatecznie sprawdzić odczyn. Zupełnie przezroczysty buljon wlać do probówek po 6—8 cm<sup>3</sup>, wyjąłować w ap. Koch'a po  $\frac{1}{2}$  godz. w ciągu 3 dni lub w autoklawie jednorazowo przez  $\frac{1}{2}$  godz.

### Buljon na wyciągu Liebig'a.

- 1 litr wody.
- 10 gr. wyciągu Liebig'a.
- 10 gr. peptonu.
- 5 gr. soli kuchennej.

Wodę z wyciągiem mięsnym gotować przez 1 godzinę, następnie dodać soli i peptonu, zobojętnić, ponownie zagotować i przesączyć przez bibułę. Buljon przygotowany z gotowych preparatów mięsnych jest mętny i trzeba go po zagotowaniu z solą i peptonem strącić białkiem, t. j. dodać potrochu 1 białko kurze, dokładnie mieszając, poczem zagotować i przesączyć przez bibułę. Po ostatecznym sprawdzeniu odczynu zupełnie przezroczysty buljon rozlać do probówek i wyjaławiać, jak powyżej.

### Buljon z „Ragit'u“ (firmy Mercka).

- 1 litr wody.
- 21 gr. „Ragit-buljonu“.

Do 1 litra wody dodać 21 gr. proszku „Ragit-buljonu“ dokładnie mieszać i gotować na płomieniu lub w aparacie Koch'a. Przesączyć, strącić pozostałe męty białkiem kurzem, jak powyżej, przesączyć powtórnie i sprawdzić odczyn.

### Buljon na skrzepie krwi.

- 1500 cm<sup>3</sup> wody.
- 1000 gr. skrzepu.
- 15 gr. peptonu.
- 6 gr. soli kuchennej.

Na posiekany skrzep nalać odpowiednią ilość wody i pozostawić w chłodzie przez 24 godziny. Następnie sączyć przez gazę lub płótno i gotować w aparacie Koch'a



w ciągu  $\frac{1}{4}$ — $\frac{3}{4}$  godziny; otrzymaną ciecz przesączyć przez bibułę, przesącz odmierzyć cylindrem i dopełnić wodą do poprzedniej objętości. Następnie dodać soli kuchennej i peptonu i ponownie gotować w apar. Koch'a w ciągu  $\frac{1}{4}$  godziny; po wyjęciu ostrożnie zubożnić. Ponieważ otrzymany buljon najczęściej daje odczyn zasadowy, poleca się przed dodaniem soli i peptonu dodać  $0,5 \text{ cm}^3$  kwasu solnego na 1 litr płynu i następnie postępować ze sprawdzaniem odczynu, jak przy buljonie zwykłym.

### Buljon z domieszkami.

#### Buljon glicerynowy zwykły ( $2\frac{0}{0}$ ).

(na laseczki gruzlicy).

1 litr buljonu zwykłego.

20  $\text{cm}^3$  gliceryny.

Buljon i glicerynę dokładnie mieszać, wlać do kolbek lub probówek i wyjałowić w ap. Koch'a lub autoklawie.

#### Buljon cukrowy zwykły ( $2\frac{0}{0}$ ).

1 litr buljonu zwykłego.

20 gr. cukru gronowego (dekstrozy).

Cukier rozpuszczony w małej ilości buljonu mieszać z całą ilością buljonu, rozlać do probówek i wyjałowić w aparacie Koch'a (po  $\frac{1}{2}$  godz. w ciągu 3 dni).

### Inne podłoża płynne.

#### Żółć.

(na laseczki tyfusowe).

Jałowo zebraną żółć wołową ogrzać trzykrotnie w ką-

pieli wodnej w 100° w ciągu 1 $\frac{1}{2}$ —2 godzin, rozlać do probówek i ponownie wyjaławiać w kąpeli wodnej.

### Mleko.

(na laseczki z grupy coli).

Chude mleko przegotować w przyrządzie Koch'a, rozlać do probówek i ponownie wyjałowić w ap. Koch'a.

### Serwatka lakmusowa wedł. Petruschky'ego.

(na laseczki z grupy coli).

Rozcieńczyć mleko świeżo przegotowane półnapół wodą i dodawać po kropli rozcieńczonego kwasu solnego, dopóki strąci się sernik (kazeina). Strącony sernik przesączyć przez bibułę, przesącz zubożętnić, dodać kroplę kwasu i zagotować; o ile sernik ponownie się strąci, ponownie sączyć przez bibułę, przesącz zubożętnić, zagotować, znowu dodać kwasu, i t. d. i w ten sposób postępować tak długo, dopóki przezroczysty i obojętny przesącz nie będzie więcej oddziaływał na dodatek kwasu przez strącanie się sernika; wówczas zubożętnić ostatecznie, przesączyć aż do całkowitej przezroczystości, wyjałowić w ap. Koch'a, dodać roztworu lakmusu (ok. 2‰), rozlać do probówek i wyjałowić w ap. Koch'a. Gotowa pożywka powinna mieć zabarwienie fiołkowe.

### Podłoże Hetsch-Barsiekow'a.

(na laseczki z grupy coli).

- a) 1 litr wody przekropłonej.  
10 gr. nutrozy.
- b) 10 gr. cukru (mlekowego, gronowego,  
mannitu lub maltozy).

5 gr. soli kuchennej.

50 cm<sup>3</sup> roztworu lakmusu.

a) Do litra wody destylowanej dodać 10 gr. nutrozy <sup>1)</sup> i gotować  $\frac{3}{4}$ —1 godz. w ap. Koch'a lub ok.  $\frac{1}{2}$  godz. (od zagotowania) na płomieniu, przesączyć przez bibułę (przesącz powinien być lekko opalizujący), wyjałowić w ap. Kocha i dodać płyn b.

b) Przetgotować w małej kolbce 50 cm<sup>3</sup> roztworu lakmusu z 10 gr. cukru i 5 gr. soli.

Rozlać do probówek i wyjaławiać w aparacie Koch'a przez 3 dni po 15 minut. Pożywka powinna mieć zabarwienie fiołkowe.

### Woda peptonowa 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (t. zw. roztwór macierzysty).

(na przecinkowce cholery).

100 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej.

10 gr. peptonu Witte.

5 gr. soli kuchennej.

0,2 gr. sody krystalicznej.

0,1 gr. saletry.

Wszystko jednocześnie dodać do wody i gotować w aparacie Koch'a w ciągu 1 godziny, następnie przesączyć i wyjałowić w ap. Koch'a lub autoklawie. Otrzymaną wodę peptonową (10<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) przed użyciem rozcieńczyć 10-krotnie wodą przekroploną, aby otrzymać właściwą wodę peptonową 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, używaną do badań, i ponownie wyjałowić. O ile badamy wodę na przecinkowce choleryczne, bierzemy 9 części badanej wody i 1 część 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wody peptonowej; w ten

<sup>1)</sup> Nutroza jest to preparat białkowy z mleka krowiego, strącający się pod działaniem kwasu, jak każde inne białko.



sposób otrzymujemy pożądanę rozcieńczenie wody peptonowej (1%).

### **Podłoże van Riemsdyk.**

(na laseczki błonicy i do niej podobne).

- 1 litr wody przekroplonej.
- 10 gr. peptonu Witte.
- 5 gr. soli kuchennej.
- 10 gr. cukru gronowego.
- 60 cm<sup>3</sup> roztworu lakmusu.

Wodę z peptonem, solą i cukrem zagotować w aparacie Koch'a, przesączyć przez bibułę, zubożyć kilkoma kroplami kwasu mlekowego, dodać lakmusu, rozlać do probówek i wyjałowić. Gotowa pożywka powinna mieć zabarwienie fiołkowe.

### **Podłoże Sabouraud.**

(na grzybki).

- 1 litr wody przekroplonej.
- 40 gr. maltozy lub cukru gronowego.
- 10 gr. peptonu.

Mieszaninę zagotować, przesączyć przez bibułę, rozlać do probówek i wyjałowić.

### **Podłoże Ungermann'a.**

(na krętki Obermeyer'a, Weila i t. p.).

Do hodowania krętek zaleca Ungermann jałowo zebraną surowicę królików, w następnych pokoleniach — surowicę świnek morskich, osłą lub końską. Zawsze należy hodować bez-tlenowo, pokrywając surowicę warstwą wyjałowionej parafiny.

### **Podłoże bezbiałkowe Uszyńskiego-Fränkela.**

- 1 litr wody przekroplonej.
- 6 gr. amonu mlekowego (amon. lactici).

- 4 gr. asparaginy.
- 2 gr. dwufosforanu wapnia lub potasu.  
(natrium — lub kalium biphosphoricum).
- 5 gr. soli kuchennej.

Mieszaninę słabo zalkalizować, zagotować, rozlać do próbówek i wyjałowić.

### Podłoże bezbiałkowe Beck'a-Proskauer'a.

(na laseczki gruźlicy).

- 1 litr wody przekrojonej.
- 3 gr. fosforanu wapnia (natrium monophosphoricum).
- 4 gr. fosforanu potasu (kalium monophosphoricum).
- 0,6 gr. siarczanu magnezu (magnesium sulphuricum).
- 4 gr. asparaginy.
- 20 cm<sup>3</sup> gliceryny.

Składniki te rozpuszcza się w wodzie i dodaje się gliceryny; po rozpuszczeniu całej masy płyn przesączyc przez bibułę, rozlać do kolbek po 30—50 cm<sup>3</sup> i wyjałowić w aparacie Koch'a lub autoklawie.

### Pożywki stałe.

Podstawą dla pożywek stałych jest przeważnie agar. Agar jest to wysuszony wodorost morski agar-agar, który posiada podobne własności jak żelatyna, zasadniczo różni się jednak od niej stopniem rozpuszczalności: agar rozpuszcza się w temperaturze o wiele wyższej (ok. 100°) od żelatyny (powyżej 23°).

#### Agar zwykły 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

a) z mięsa.

- 1 litr buljonu zwykłego.
- 30 gr. agaru.

Agar drobno pokrajany lub sproszkowany dodać do buljonu; o ile mamy do czynienia z agarem w proszku

(preparat droższy — przeto często używamy włókien, które przed wrzuceniem do naczynia z buljonem należy pokrajać nożyczkami na drobne kawałki), należy go rozrobić małą ilością buljonu (300—400 cm<sup>3</sup>), aby otrzymać jednolitą zawiesinę (bez grudek), poczem dodać do pozostałej ilości buljonu. Otrzymaną ciecz słabo zalkalizować i gotować w aparacie Koch'a przez 2 godziny lub w autoklawie przez 1/2 godziny. Po wyjęciu z aparatu Koch'a lub autoklawu gorący agar sączyć przez watę w blaszanych lejkach, sprawdzić ostateczny odczyn przesączu (powinien być słabo zasadowy!), rozlać do probówek po 6—8 cm<sup>3</sup>, wyjąłować w aparacie Koch'a lub w autoklawie i przy zastyganiu ułożyć probówki skośnie, by otrzymać t. zw. „agar skośny“. Niektórzy autorzy dodają przed wstawieniem do ap. Koch'a lub autoklawu jeszcze białka kurzego dla zupełnego oczyszczenia pożywki, co jednak jest rzeczą zbędną, jeśli już do przygotowywania buljonu użyte było białko.

b) z „Ragit-agaru“ (firmy Merck'a).

1 litr wody.

42 gr. „Ragit-agaru“.

Z 42 gr. preparatu przygotować jednolitą papkę z niewielką ilością wody, poczem dodać do pozostałej ilości wody. Po sprawdzeniu odczynu (wzgl. doprowadzeniu go do słabo zasadowego) gotować przez 2—3 godzin w aparacie Koch'a, przesączyć przez watę, wyjąłować i rozlać, jak w a).

### Agar cukrowy.

1 litr agaru zwykłego.

20 gr. cukru gronowego (dekstrozy).



Cukier rozpuścić w małej ilości wody lub buljonu zwykłego i dodać do rozpuszczonego agaru zwykłego; rozlać do probówek po 12—15 cm<sup>3</sup> i wyjąłować w aparacie Koch'a. Po wyjęciu z aparatu Koch'a nie układać skośnie, lecz dać zastygnąć pożywcę w pionowym położeniu.

### **Agar z czerwienią obojętną (Neutralrot).**

(na laseczki z grupy coli).

- 1 litr 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> agaru.
- 20 gr. cukru gronowego.
- 10 cm<sup>3</sup> wodnego nasyconego roztworu czerwieni obojętnej (Neutralrot).

Przygotować 1 litr agaru 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (t. j. do litra buljonu zwykłego dodać 10 gr. agaru sproszkowanego) i dodać do niego 20 gr. cukru gronowego, następnie zagotować, przesączyć przez watę i na każde 100 cm<sup>3</sup> tego agaru cukrowego dodać 1 cm<sup>3</sup> wodnego nasyconego roztworu czerwieni obojętnej; rozlać do probówek po 12—15 cm<sup>3</sup> i wyjąłować w aparacie Koch'a po 1/2 godziny w ciągu 3 dni. Gotowa pożywka powinna mieć zabarwienie czerwono-brunatne.

### **Agar glicerynowy 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.**

(na laseczki gruźlicy).

- 1 litr agaru zwykłego.
- 20 cm<sup>3</sup> gliceryny.

Rozpuszczony agar zwykły mieszać w podanej porcji z gliceryną, rozlać do probówek, wyjąłować w aparacie Koch'a lub autoklawie, poczem skosić, jak agar zwykły.

### **Agar glicerynowy z somatozą.**

(na laseczniki gruźlicy).

- 1 litr wody przekroplonej.
- 15 gr. agaru.

- 5 gr. peptonu.
- 5 gr. soli kuchennej.
- 5 gr. somatozy<sup>1)</sup>.
- 2,5 gr. sody krystalicznej.
- 30—40 cm<sup>3</sup> gliceryny.

Przygotować agar według podanego przepisu, dodać gliceryny, rozlać do kolbek oraz probówek i wyjaławiać w aparacie Koch'a po 2 godziny w ciągu 3 dni.

### Podłoże Sobel'a.

(na laseczki z grupy coli).

- 1 litr agaru zwykłego.
- 10 gr. cukru gronowego.
- 400 cm<sup>3</sup> serwatki lakmusowej.
- 30 cm<sup>3</sup> lakmusu.

Agar przegotować z cukrem, następnie dodać serwatkę (przygotowywanie serwatki patrz str. 25) oraz lakmus, rozlać do probówek (po 3 cm<sup>3</sup>), wyjałowić w aparacie Koch'a. Gotowa pożywka powinna mieć zabarwienie fioletowe.

### Podłoże Conradi-Drygalskiego.

(na laseczki z grupy coli).

- 1 litr agaru zwykłego.
- 10 gr. nutrozy.
- 15 gr. cukru mlekowego (laktozy).
- 150 gr. roztworu lakmusu.
- 3 cm<sup>3</sup> 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu sody krystalicznej.
- 10 cm<sup>3</sup> 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu fioletu kryształowego.

Przygotować 1 litr agaru zwykłego, dodając przed zagotowaniem 10 gr. nutrozy (gotować dłużej, niż agar zwykły), poczem przesączyć na gorąco przez wate. W ma-

<sup>1)</sup> Somatoza jest to preparat, w skład którego wchodzi albumoza.

łej kolbce przegotować 150 cm<sup>3</sup> roztworu lakmusu z 15 gr. cukru mlekowego i mieszaninę tę wlać do przesączonego agaru, oraz dodać 3 cm<sup>3</sup> 10% roztworu sody krystalicznej i 10 cm<sup>3</sup> 0,1% roztworu fioletu kryształowego. Wszystko dobrze zmieszać, rozlać do kolbek po 100—200 cm<sup>3</sup> i wyjałowić w aparacie Koch'a. Przed użyciem pożywkę rozpuścić w kąpeli wodnej i rozlać na płytki Petri'ego, które należy pozostawić przez 3—5 minut otwarte, dopóki się para nie ulotni, następnie zamknąć, o ile pożywka skrzepła położyć dnem do góry, zawinąć w wyjałowiony papier i przechowywać w lodowni. Gotowa pożywka powinna mieć zabarwienie ciemno fioletowe.

Do hodowania laseczek krwawej biegunki zalecają niektórzy autorzy podłoże Conradi-Drygalskiego bez dodatku fioletu kryształowego. Nie jest to jednak konieczne, gdyż jak nam wykazały liczne badania porównawcze, szczepy dyzenteryjne rosną też i na zwykłej pożywce C.-Drygalskiego.

W celu różnicowania szczepów krwawej biegunki zamiast cukru mlekowego możemy użyć cukru gronowego, słodowego, trzcinowego, mannitu, inuliny i t. d.

### Podłoże Endo.

(ns laseczki z grupy coli).

1 litr agaru zwykłego.

6 cm<sup>3</sup> 10% roztworu sody krystalicznej.

10 gr. cukru mlekowego (laktozy).

5 cm<sup>3</sup> nasyconego alkoholowego roztworu fuksyny zasadowej (starannie przesączonego!).

25 cm<sup>3</sup> 10% roztworu siarczynu sodu (natrium sulfurosum).

Do litra agaru zwykłego dodać: 1) 6 cm<sup>3</sup> 10% roztworu sody krystalicznej, 2) 10 gr. cukru mlekowego, roz-



puszczonego w niewielkiej ilości wody przekroplonej, 3) 5 cm<sup>3</sup> roztworu fuksyny (po dokładnem wstrząsaniu pożywka nabiera barwy czerwonej), 4) 25 cm<sup>3</sup> roztworu siarczynu sodu (po zmieszaniu pożywka odbarwi się nieco); podłoże po zastygnięciu powinno mieć barwę blado-różową. Pożywkę rozlewamy na płytkę, podobnie, jak poz. Conradi-Drygalskiego; płytki zawinięte w czarny papier należy przechowywać w lodowni. Od światła, wyższej temperatury i częstego rozpuszczania pożywka zmienia swe własności (po skrzepnięciu pozostaje czerwona) i wówczas nie nadaje się do różnicowania drobnoustrojów.

### Agar z czerwieni Kongo (Acel-Liebermann'a.)

(na laseczki z grupy coli).

- 1 litr agaru zwykłego.
- 15 gr. cukru mlekowego (laktozy).
- 3 gr. czerwieni Kongo.

1 litr agaru zwykłego zagotować z 15 gr. cukru mlekowego, następnie dodać 3 gr. czerwieni Kongo, rozpuszczonej w 30 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej. Rozlać na płytki, jak podł. Endo lub Conr.-Drygalskiego. Gotowa pożywka powinna mieć zabarwienie czerwone.

### Agar z zielenią malachitową (wedł. Loeffler'a).

(na laseczki z grupy coli).

- 1 litr agaru zwykłego 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.
- 5 cm<sup>3</sup> normalnego roztworu ługu sodowego.
- 100 cm<sup>3</sup> 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu nutrozy.

Na 100 cm<sup>3</sup> agaru, przygotowanego wedł. powyższego przepisu, dodać:

- 3 cm<sup>3</sup> wyjałowionej żółci wołowej.
- 1 cm<sup>3</sup> 0,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wodnego roztworu safraniny („Safraninrein“ Grüblera).

3 cm<sup>3</sup> 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wodnego roztworu czystego błękitu  
(„Reinblau doppelt konzentriert“ Höchst.).

3—4 cm<sup>3</sup> 0.2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wodnego roztworu zieleni malachitowej  
(„Malachitgrün cryst. chem. rein“ Höchst.).

10 gr. nutrozy przegotować ze 100 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej i dodać wraz z 5 cm<sup>3</sup> ługu sodowego do 1 litra rozpuszczonego agaru. Mieszaninę przesączyć na gorąco przez watę i przechowywać w małych kolbkach w lodowni. Przed użyciem kolbkę z agarem wstawić do kąpieli wodnej i po rozpuszczeniu oraz ostudzeniu agaru dodać żółci i barwników w wyżej podanych ilościach. Po dokładnem zmieszaniu rozlać na płytki. Gotowa pożywka powinna mieć barwę jasno-zieloną.

### Agar alkaliczny.

(na przecinkowce choleryczne).

1 litr agaru zwykłego.

30 cm<sup>3</sup> 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu sody krystalicznej.

Agar zwykły zobojętnić podaną ilością roztworu sody, wyjałowić w autoklawie i rozlać na płytki. Przed użyciem płytki należy wysuszyć w cieplarni.

### Podłoże Dieudonné'go.

(na przecinkowce choleryczne).

70 części agaru zwykłego 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

30 części odwłóknionej krwi z ługiem.

Odwłóknioną krew wołową lub końską mieszać w równych ilościach z normalnym roztworem ługu potasowego i zagotować w aparacie Koch'a (1 litr gotować ok. <sup>3</sup>/<sub>4</sub> godziny). Następnie 30 części tej mieszaniny dodajemy do 70 części gorącego i ostudzonego do 50<sup>0</sup> agaru, dokładnie mieszamy i rozlewamy na płytki, które należy po skrzep-

nięciu pożywki wstawić do suszarki w 55—60° na 20 minut. Płytki z pożywką przechowywać w lodowni. Pożywka powinna mieć zabarwienie brunatne.

### **Podłoże Hofer-Hovorka.**

(na przecinkowce choleryczne).

80 cm<sup>3</sup> agaru zwykłego 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

4 cm<sup>3</sup> odwłóknionej krwi wołowej.

16 cm<sup>3</sup> normalnego roztworu ługu potasowego.

5 cm<sup>3</sup> 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wodnego roztworu fioletu kryształowego.

Do agaru przygotowanego wedł. podanego wzoru dodać fioletu kryształowego, dobrze zmieszać i rozlać na płytki; uchylone płytki wstawić na 24 godziny do ciepłarki, aby usunąć z nich amoniak. Pożywka powinna mieć kolor ciemno fioletowy.

### **Podłoże Kabeshima.**

(na przecinkowce choleryczne).

80 cm<sup>3</sup> agaru zwykłego 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

10 cm<sup>3</sup> 18<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu sody.

3 gr. hemoglobiny.

10 cm<sup>3</sup> 0,85<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu soli kuchennej.

Zagotować agar z roztworem sody, ostudzić do 50° i dodać hemoglobiny rozpuszczonej w 10 cm<sup>3</sup> roztworu soli. Po dokładnem zmieszaniu wylać na płytki.

### **Podłoże Pilon'a.**

(na przecinkowce choleryczne).

7 części agaru zwykłego.

3 części krwi ze sodą.

Zmieszać w podanych proporcjach rozpuszczony i ostudzony do ok. 60° agar z mieszaniną krwi oraz sody i rozlać



na płytki, które należy suszyć w cieplarni przy 50—60° przez 20 minut. Mieszaninę sody i krwi przygotowuje się w następujący sposób: 1 litr krwi świeżo odwłóknionej (patrz o odwłóknianiu krwi str. 19) mieszać z litrem 12% roztworu sody, dokładnie mieszać i pozostawić przez kilka (3—4) dni w chłodnym miejscu, następnie mieszaninę wyjałowić. Jałową mieszaninę można przechowywać dłuższy czas w zamkniętych naczyniach. Przed zmieszaniem z agarrem mieszaninę należy ogrzać do mniej więcej 60°.

### **Agar z krwią ludzką.**

(na gonokoki, meningokoki, gronkowce, paciorkowce).

Agar zwykły 3% rozpuścić w niewielkiej ilości (najlepiej w próbówce) i ostudzić do 50°; następnie na 6—8 cm<sup>3</sup> dodać 3—5 cm<sup>3</sup> krwi ludzkiej nieskrzepłej, dokładnie mieszać i rozlać na płytkę lub pozostawić w próbówce, ułożonej skośnie w czasie zastygania. Przed użyciem należy pożywkę wstawić na 24 godziny do termostatu, by sprawdzić jej jałowość.

### **Agar z surowicą wołową.**

(na gronkowce, paciorkowce).

Rozpuszczony i ostudzony do mniej więcej 40° agar zwykły mieszać w równych częściach lub w stosunku 1:2, 1:3 z surowicą wołową, dobrze mieszać i rozlać na płytki.

### **Agar z płynem puchlinowym z jamy brzusznej (z „ascytem“).**

(na gonokoki, meningokoki).

500 cm<sup>3</sup> agaru zwykłego.

500 cm<sup>3</sup> płynu puchlinowego z jamy brzusznej.

Jałowo zebrany płyn puchlinowy jamy brzusznej, dla pewności wyjaławiany w  $60^{\circ}$  po godzinie w ciągu 3-ech dni, zmieszać półnapół z agarem zwykłym, rozpuszczonym i ochłodzonym do  $50^{\circ}$  i rozlać na płytki lub do probówek; probówki przy zastyganiu pożywki ułożyć skośnie. Przed użyciem sprawdzić jałowość, wstawiając płytki i probówki do ciepłarki ( $37^{\circ}$ ) na 24 godziny.

### **Agar z płynem puchlinowym z jamy brzusznej według Kiefer'a.**

(za gonokoki, meningokoki).

100 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej.

3,5 gr. agaru.

5 gr. peptonu.

0,5 gr. soli kuchennej.

2 cm<sup>3</sup> gliceryny.

100 cm<sup>3</sup> płynu puchlinowego z jamy brzusznej.

Przygotowany według powyższego przepisu agar rozpuścić, ostudzić do  $50^{\circ}$  i zmieszać w równych częściach z płynem nagrzanym do  $50^{\circ}$ . Ponieważ płyn puchlinowy z jamy brzusznej jest najczęściej silnie zasadowy, należy przygotowaną pożywkę nieco zakwasić, aby miała odczyn słabo zasadowy.

### **Agar z płynem z jamy brzusznej i lakmusem według Jochmann'a.**

(na meningokoki).

95 cm<sup>3</sup> agaru z płynem z jamy brzusznej.

1 gr. cukru (gronowego, trzcinowego, słodowego, mlekowego).

10 cm<sup>3</sup> roztworu lakmusa (Kahlbauma).

0,5 gr. normalnego roztworu sody.

Po 1 gramie cukru każdego gatunku rozpuścić w 10 cm<sup>3</sup> roztworu lakmusu i wyjałowić przez 2-minutowe ogrzewanie w kąpeli wodnej, poczem do każdej próbówki dodać po 0,5 gr. jałowego normalnego roztworu sody. Następnie każdą taką „przyprawkę“ dodać do 95 cm<sup>3</sup> rozpuszczonego agaru z płynem z jamy brzusznej i rozlać na płytki. Przed użyciem wstawić do cieplarki o 37°, aby sprawdzić jałowość.

### Podłoże Mac-Neal'a.

(na pierwotniaki).

1 litr wody.

125 gr. mięsa.

25 gr. agaru.

20 gr. peptonu.

5 gr. soli kuchennej.

10 cm<sup>3</sup> norm. roztworu Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>

Do jednej części tej mieszaniny, ogrzanej do 55°, dodać 2 części odwłóknionej krwi królika, rozlać do probówek i ułożyć je w ten sposób, by pożywka zastygła skośnie. Szczepić do wody kondensacyjnej.

### Żelatyna.

1 litr buljonu zwykłego.

10 gr. peptonu.

5 gr. soli kuchennej.

150—250 gr. żelatyny (w zimie 150 gr., w lecie 250 gr.).

Do litra buljonu zwykłego dodać peptonu, soli i żelatyny i pozostawić czas jakiś w chłodzie, aby żelatyna napęczniała i częściowo się rozpuściła, poczem alkalizować 10% roztworem sody aż do słabo zasadowego odczynu i wstawić na 1 godzinę do aparatu Koch'a. Następnie



niec o ostudzić (do 50—60°) i dodać 1 białko jaja kurzego, dokładnie mieszając, ponownie zagotować w aparacie Koch'a, sprawdzić odczyn i przesączyć na gorąco przez bibułę (do sączenia żelatyny najlepiej nadaje się metalowy sączek o podwójnych ścianach, między którymi znajduje się gorąca woda). Przezroczystą żelatynę rozlać do probówek, wyjaławiać w aparacie Koch'a po 20 min. w ciągu 3 dni i przechowywać w lodowni. Wielokrotne ogrzewanie żelatyny zmienia jej własności i hamuje zdolność krzepnięcia, należy przeto zwracać uwagę, aby żelatyny zbyt wysoko i zbyt często nie nagrzewać (nigdy nie należy wyjaławiać jej w autoklawie). Od dłuższego stania żelatyna często zmienia swój odczyn — sprawdzać odczyn co czas pewien!

### **Surowica Loeffler'a.**

(na laseczki błonicy i do niej podobne).

3 części surowicy wołowej lub cielęcej.

1 część buljonu cukrowego.

Jałowo zebraną krew wołową lub cielęcą pozostawić 1—3 dni w chłodnym miejscu, aby oddzieliła się surowica. Surowicę przenieść jałową pipetką do jałowego naczynia i mieszać w podanej proporcji z buljonem cukrowym. Rozlać do probówek, po 6—8 cm<sup>3</sup>, unikając przy nalewaniu tworzenia się pęcherzyków powietrza (lać po ścianie probówki), ułożyć skośnie w cieplarni lub suszarce i ściąć surowicę w temperaturze stopniowo podnoszącej się do 90° (w tej temperaturze pozostawić około 1/2 godziny). Gotowa pożywka powinna być kremowo biała i mieć spistość agaru.

### Podłoże Jundell'a

(na laseczki błonicy i do niej podobne).

2 cz. białka kurzego

1 cz. mleka przegotowanego.

Białko i mleko dokładnie zmieszać (najlepiej na miseczce porcelanowej lub szklanej), rozlać do probówek i ściąć jak surowicę Loeffler'a. Gotowa pożywka powinna być biała i mieć spoistość agaru.

### Kartofle.

Możliwie duże kartofle umyć szczotką i mydłem, wykrajać z nich stożki o podstawie wielkości średnicy probówki (zwykle używamy do kartofli probówek większych od zwykłych), następnie stożki te przekrajać na połowę po przekątnej; umocować na kołeczku drewnianym (naprz. zapałce) i wsunąć do probówki podstawą stożka na dół. Następnie do każdej probówki nalać tyle 4<sup>0</sup>/<sub>10</sub> roztworu gliceryny, aby trzecia część kartofla była w nim zanurzona. Wyjałowić w autoklawie (co najmniej 2-krotnie).

### Surowica z gliceryną

(na laseczniki gruzlicy).

100 cm<sup>3</sup> surowicy wołowej.

2,5 cm<sup>3</sup> gliceryny.

Surowicę i glicerynę dokładnie zmieszać, wyjałowić w 57<sup>0</sup> w ciągu 4—5 godzin, rozlać do probówek po 6—8 cm<sup>3</sup> i ściąć w ciepłocie 90<sup>0</sup>.

### Pożywka Hesse-Heyden'a

(na laseczniki gruzlicy).

10 gr. pożywki Heydena.

5 gr. soli kuchennej.

- 30 gr. gliceryny.  
 10 – 20 gr. agaru.  
 1000 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej

Pożywkę tę po wyjałowieniu wylewa się po 20 cm<sup>3</sup> na płytki Petri'ego.

### Agar z papką mózgową Ficker'a

(na laseczniki gruźlicy).

- |                                    |                        |
|------------------------------------|------------------------|
| 1 cz. dobrze posiekanego mózgu     | } gotować przez 15 min |
| 1 cz. wody przekroplonej           |                        |
| 1 cz. papki mózgowej.              |                        |
| 1 cz. 2,5% wodnego roztworu agaru. |                        |
| 3% gliceryny.                      |                        |

Po gotowaniu mózgu z wodą należy przez sączenie usunąć wodę i do otrzymanej papki dodać półnapół 2,5% wodnego roztworu agaru oraz 3% gliceryny. Po wyjałowieniu w aparacie Koch'a, pożywkę rozlać do probówek lub kolbek i szybko ostudzić, aby przy krzepnięciu nie oddzieliły się warstwy miazgi mózgowej i agaru.

### Pożywka Karwackiego

(na laseczniki gruźlicy).

- 1 cz. odwłóknionego płynu surowiczego.  
 3 cz. wody przekroplonej.  
 3% gliceryny.

Płyn powoli ogrzewać w kąpeli wodnej aż do wrzenia w ciągu godziny. Po przesączeniu rozlać do probówek i wyjaławiać w 115°.

Bardzo łatwe do przygotowania (lecz wielokrotnie droższe od normalnych) są suche pożywki Dörr'a (firmy Brahma w Lipsku) wszelkiego rodzaju, a więc podłoże Conradi-Drygalskiego, Endo, agar z zielenią malachitową, Dieudonné i inne. Stosując te pożywki, zyskuje się bardzo na czasie, to też w pracowniach o niewielkim ruchu zalecać je należy



usilnie (za wyjątkiem pożywki Dieudonné, która podobno daje wyniki nieszczególne). Natomiast przy dużym ruchu, pożywki te są zbyt drogie, tembardziej, że przygotowywanie pożywek z „Ragitu“ (firmy Mercka) jest również bardzo uproszczone, zwłaszcza, o ile stosować gotowy barwnik naprz. do pożywki Endo (firmy Brahm pod Lipskiem), bądź w postaci pastylek, naprz. 1 pastylka na 8 cm<sup>3</sup> wody destylowanej lub 1 pastylka (większa) na 100 cm<sup>3</sup> agaru zwykłego, bądź w postaci proszku 12,5 gr. na 1 litr agaru zwykłego. Przepis przygotowywania suchych pożywek jest podany na torebce.

## Metody hodowania drobnoustrojów.

### Metoda wieloprobówkowa.

Chcąc otrzymać czystą hodowlę pewnego gatunku bakterji należy wyodrębnić odpowiednie kolonie bakterji z pośród ich mieszaniny. W tym celu korzystamy z kilku metod; zaczniemy od wieloprobówkowej, jako najprostszej. Odrobinę materiału, z którego chcemy wyodrębnić pewien gatunek bakterji, wprowadzamy do wody kondensacyjnej skośnej pożywki (naprz. agaru skośnego, surowicy Loeffler'a i t. p.), poczem, wodząc uszkiem od dołu do góry linją wężową, rozsmarowujemy ją na całej powierzchni próbówki. Następnie, nie przepalając uszka, wprowadzamy je do wody kondensacyjnej drugiej pożywki skośnej, rozsmarowujemy na powierzchni pożywki, poczem nieprzepalone uszko wprowadzamy do wody kondensacyjnej trzeciej pożywki skośnej i t. d. ilość próbek, użytych do doświadczenia, zależy jest od przypuszczalnej ilości gatunków bakterji w danym materiale.

### Metoda płytkowa.

Metoda ta, podobnie jak i metoda wieloprobówkowa ma na celu wyodrębnienie danego gatunku bakterji z pośród ich mieszaniny. Płytki używane przy tej metodzie powinny mieć ok. 10 cm. średnicy. W kąpeli wodnej rozpuszczamy 3 próbówki pożywki stałej (agaru lub żelatyny) i następnie czekamy, aby ostygły do ok.  $45^{\circ}$ . Następnie do pierwszej próbówki wprowadzamy uszko materiału badanego, który starannie rozcieramy na ścianie próbówki (ponad powierzchnią rozpuszczonej pożywki), próbówkę wstrząsamy, aby rozprowadzić po całej pożywce zawarty, materiał i przenosimy z niej (I-ej) uszko zakażonej pożywki do drugiej (II-ej) próbówki z rozpuszczoną pożywką. Z drugiej próbówki przenosimy uszko zakażonej pożywki do trzeciej (III ej) próbówki. Jeśli pożywka w próbówkach przez czas trwania doświadczenia skrzepła, należy ją ponownie rozpuścić w kąpeli w  $40^{\circ}$ . Rozpuszczone pożywki wraz z wprowadzonym do nich materiałem należy rozlać w odpowiednim porządku na zawczasu przygotowane i ponumerowane (I., II. i III.) płytki. Płytki powinny być ustawione na powierzchni dokładnie poziomej. Zawartość próbówek należy wylewać na płytki po dokładnem przepaleniu brzegów próbówki, używając na czynność tę jaknajmniej czasu, by uniknąć zanieczyszczenia płytek drobnoustrojami z powietrza. Po skrzepnięciu pożywki, płytki należy odwrócić przykryciem na dół i wstawić do ciepłarki o  $37^{\circ}$  — o ile używany był agar — lub o  $22^{\circ}$ , względnie ciepłocie pokojowej, o ile zastosowano żelatynę.

Wysiewanie na płytki może też odbywać się w sposób

niewielko odmienny. Rozpuszczoną i ostudzoną do 50–60° pożywkę wylewamy na płytki (rozlewanie pożywki na płytki patrz str. 32). Po całkowitem stwardnieniu pożywki przenosimy na jedną płytkę (I-a) jedno uszko materiału badanego, który zostaje po całej płytce rozarty przy pomocy przepalanej bagietki szklanej, zgiętej pod prostym kątem, lub drutu, zgiętego w kształcie trójkąta i osadzonego na ręczce. Następnie tą samą nieprzepaloną bagietką lub nieprzepalonym drutem wodzimy po płytce drugiej (II-ej) i trzeciej (III-ej), przez co, wprowadzając na nie coraz mniej materiału, otrzymujemy na nich — po 24 godzinach w 37°, względnie 22° — oddzielne kolonie. Wodząc bagietką lub drutem po płytce należy zwrócić uwagę, aby czynić to lekko, nie uszkadzając cienkiej warstwy pożywki.

Zaletą żelatyny w metodzie płytkowej jest to, że większość kolonji rośnie na niej bardziej charakterystycznie, niż na agarze. Niedogodną zaś jest ona z tego powodu, że już powyżej 22° zaczyna się rozpuszczać oraz, że ulega upłynianiu pod działaniem niektórych gatunków bakterji, co utrudnia wyodrębnianie poszczególnych kolonji. Dlatego też do przechowywania na czas dłuższy nadają się więcej płytki agarowe.

Kolonje na płytkach możemy oglądać gołym okiem, przy pomocy lupy lub pod mikroskopem (patrz badanie drobnoustrojów str. 53). Jeśli kolonja jest dość duża, aby ją dokładnie obejrzeć gołym okiem wzgl. pod lupą, wówczas obrysowujemy jej zarys na denku płytki i przenosimy ją uszkiem platynowym na agar skośny. Jeśli kolonja jest drobna (wielkości łąpka od szpilki i mniejsza), wówczas „łowimy“ ją pod mikroskopem. „Łowienie“ odbywa się



w następujący sposób: ręka, w której znajduje się uszko platynowe, opiera się małym palcem o stolik od mikroskopu; drucik wprowadza się pomiędzy otwartą płytkę i obiekttyw (nie dotknąć obiektywu!) i dotyka nim danej kolonii, następnie drucik zostaje ostrożnie usunięty z pod mikroskopu, a zebrany na nim materiał przeszczepiony na pożywki lub zużyty na preparat. Do badania orientacyjnego kolonii stosuje się t. zw. „preparaty—odbitki“ (patrz badanie drobnoustrojów str. 56).

W celu wyosobnienia niektórych gatunków bakterji naprz. zarodnikowców, stosować też można metodę ogrzewania mieszaniny bakterji, w której, pod działaniem wysokiej ciepłoty, giną wszystkie formy wegetacyjne, a przy życiu pozostają tylko zarodniki.

### Hodowle beztlenowe.

a) Hodowanie beztlenowców bez zamknięcia dostępu powietrza odbywa się w ten sposób, że świeżo przegotowany buljon, do którego dodaliśmy uprzednio jakiejś substancji odtleniającej (naprz. kawałek wątroby zwierzęcej, śledziony, nerki lub mózgu, bądź też gąbki platynowej), wyjaławiamy i natychmiast po ochłodzeniu pożywki wprowadzamy do niej odnośny drobnoustrój w możliwie dużej ilości (met. W r z o s k a - T a r o z z i).

b) Hodowanie beztlenowców z mechanicznym zamknięciem dostępu tlenu (hodowla w t. zw. „wysokiej warstwie“). Do świeżo przegotowanej i ostudzonej pożywki (żelatyny lub agaru) wszczepić odnośny drobnoustrój; zakażoną pożywkę zalać świeżą pożywką (rozpuszczoną i ostudzoną do 40°). Można też wkluć

prostym drucikiem platynowym odnośny materiał do t. zw. „wysokiej“ pożywki (świeżo przegotowanej i następnie skrzepłej). Na powierzchnię zakażonej pożywki można nałożyć — prócz takiej samej pożywki rozpuszczonej i ostudzonej — wyjałowionej oliwy, parafiny lub wazeliny. Chcąc później zbadać kolonie, należy je wybierać prostym drucikiem platynowym lub włoskową rurką szklaną („kapilarem“). Jeszcze lepiej — nadpiłować próbkę cienkim pilniczkiem, ostrożnie odłamać górną połowę próbki, aby brzeg był równy, poczem ostrożnie zdjąć kolonję platiną; o ile trudno się do niej dostać, wysuwamy pożywkę z próbki i umieszczamy ją na jałowej płytce, poczem wyjałowionym nożykiem przekrawamy słupek pożywki w odpowiednim miejscu.

Można również hodować beztlenowce w górnym kolanie kolbki fermentacyjnej.

c) Hodowanie beztlenowców w przestrzeni, z której usunęliśmy powietrze z pomocą pompy powietrznej. Długą, u góry zwężoną próbkę z zakażoną pożywką łączymy przy pomocy rurki z pompą pneumatyczną; po wypompowaniu powietrza rurka zostaje zatopiona. Sposób ten jest trudny do zastosowania.

d) Hodowanie beztlenowców w przestrzeni, z której tlen został pochłonięty przez inne ciało („metoda absorbcyjna“ Buchner'a). Zakażoną pożywkę wprowadzić do naczynia (najlepiej kolbki Buchner'a), zamkniętego szczelnie korkiem gumowym. Przed umieszczeniem w naczyniu tem próbki z zakażoną pożywką wsypujemy na dno jego 1 gr. pyrogallolu, następnie wlewamy 10 cm<sup>3</sup> 1,5% ługu potasowego (Liquor kalii

caust. rozcieńczony 10-krotnie); alkaliczny roztwór kwasu pyrogallusowego pochłania tlen. Całkowite pochłonięcie tlenu wymaga 24 godzin w temperaturze 37° (przy stosowaniu gorącego ługu reakcja przebiega nieco szybciej).

f) Hodowanie beztlenowców w przestrzeni, z której usunięto tlen przy pomocy wodoru. Do próbki lub kolbki z zakażoną pożywką wprowadzamy przez czas dłuższy czysty wodór. Wpuszczanie wodoru odbywa się w następujący sposób: przez korek próbki lub kolbki przeprowadzić należy dwie rurki różnej długości (jak przy tryskawce) – przez jedną z nich wprowadzamy z aparatu Kipp'a możliwie czysty wodór (przemyty w roztworze jodku potasu oraz roztworze kwasu pyrogallusowego z ługiem potasowym) tak długo, dopóki tlen wydobywający się drugą rurką palić się nie przestanie, a gdy to nastąpi, rurkę tlenową zatopić. Zachować wielką ostrożność — możliwość wybuchu, jeśli zawczasie zapalić wychodzący gaz!

Do oglądania w kropli wiszącej bakterji beztlenowych stosuje się specjalne szkiełka.

### **Przechowywanie czystych hodowli.**

Chcąc przechować hodowle bakteryjne postępujemy zazwyczaj w ten sposób, że skoro osiągną one największy wzrost na pożywkach skośnych, zamykamy próbki szczelnie przez założenie na opalony korek pochewki papierowej lub oblanie go parafiną; można również stosować kapki gumowe, które przed użyciem należy dokładnie wyjałowić. Najpewniej — o ile nie trzeba zbyt często otwierać — zatopić koniec otwarty próbki w płomieniu. Ho-



dowle należy co parę tygodni wzgl. miesięcy przeszczepiać na świeże pożywki, by zapobiec ich obumieraniu wskutek wysychania pożywki. Niektóre, bardziej wrażliwe gatunki, jak bac. Koch-Weeks'a, bac. pertussis, gonococci, trzeba przeszczepiać na świeże podłoże krwiste co 5—8 dni (najpóźniej).

### **Zwierzęta jako ogniwo przy otrzymywaniu czystej hodowli.**

Niektóre gatunki chorobotwórcze (naprz. laseczniki gruźlicze, wąglika, pneumokoki i w. i.) można otrzymać w czystej hodowli przez szczepienie materiału zakaźnego zwierzętom. Należy zwrócić uwagę, by inne gatunki bakterji, które mogłyby wywołać jakieś cierpienie u zwierzęcia, nie wchodziły w skład mieszaniny bakterji, z której należy dany gatunek wyodrębnić.

#### **Z a k a ż a n i e z w i e r z ą t.**

Do doświadczeń używa się najczęściej świnki morskiej, królika, białej myszy, szczura domowego. Skórę zwierzęcia należy oczyścić przez usunięcie sierści w okolicach miejsca, na którym ma być dokonane szczepienie oraz przez obmycie miejsca tego płynem odkażającym (alkoholem, sublimatem). Zakażenie zwierzęcia może być wywołane:

1) przez wtarcie zwierzęciu badanego materiału w skórę lub w ranę;

2) podskórnice: a) w fałdę skóry, przez nacięcie skóry nożyczkami i wprowadzenie do niej materiału uszkiem platynowym; do szczepienia białej myszy i szczura obiera się zwykle miejsca przy nasadzie ogona; świnkom i kró-

likom szczepi się zwykle w okolicach brzucha i piersi; b) podskórnie, przyczem posługujemy się strzykawką (najdogodniejszy jest system „Rekord“, dobry jest również Luer, nie zaleca się Pravatz'a), którą należy wyjałowić przed i po użyciu (wygotować);

3) szczepienie do otrzewnej: podnieść fałdę skóry pośrodku lub z boku brzucha, igłę strzykawki włożyć w skórę, a następnie wprowadzić ją poprzez mięśnie do jamy brzusznej. Igła powinna być dość tępa, by nie spowodować skaleczenia kiszek. Aby otrzymać nieco zawartości z jamy brzusznej, należy naciąć skórę na brzuchu i następnie, poprzez mięśnie, wprowadzić rurkę włoskową do jamy brzusznej; w rurce zbierze się trochę płynu, który następnie należy wydmuchać;

4) przy szczepieniach śródmięśniowych, do opłucnej i t. p., postępuje się jak w 3);

5) szczepienie do przedniej komory oka: po znieczuleniu kokainą rogówki przecina się ją ostrożnie u góry, blisko brzegu twardówki, i wsuwa przez utworzoną szparę materiał zakaźny, poczem oko należy na czas pewien przewiązać. Przy szczepieniach ospowych (metodą Paul'a), po znieczuleniu oka kokainą, robi się na rogówce jednego oka kilka linii drapanych lancetem lub tępą igłą, poczem wciera się materiał, który otrzymuje się przez nakłucie pęcherzyka ospowego (zawartość pęcherzyka może być uprzednio rozcieńczona fizjologicznym roztworem soli);

6) szczepienie do dróg krwionośnych: do dowolnej, łatwo dostępnej żyły (naprz. vena jugularis externa), wprowadzamy ciekłą igłę strzykawki dośrodkowo i powoli wstrzykujemy zawiesinę. Zwrócić tu należy baczną uwagę,

by nie zastrzyknąć pęcherzyków powietrza, które może wywołać natychmiastową śmierć zwierzęcia. U królika najlepiej wybrać zewnętrzną żyłę uszną; rozszerzenie się jej można osiągnąć przez silne potarcie ucha watą, zmoczoną w ksylolu lub alkoholu. Jeśli przestrzeń otaczająca żyłę zaczyna pęcznieć, jest to znak, że igła nie została prawidłowo wprowadzona;

7) zakażenie przez przewód pokarmowy: materiał zakaźny miesza się z jedzeniem zwierząt.

### Dawkowanie materiału do szczepień.

1) Płyn zakaźny, rozcieńczony wedle potrzeby ściśle określonymi ilościami jałowego buljonu lub fizjologicznego roztworu soli (naprz. 1:10, 1:100 i t. d.), wstrzykuje się miareczkowaną strzykawką.

2) Materiał niepłynny, naprz. hodowlę na skośnej pożywce, należy zdjąć uszkiem platynowym o ściśle oznaczonej wielkości<sup>1)</sup>, t. zw. uszkiem normalnem, to jest zbierającym ok. 2 mg. 24-godzinnej hodowli agarowej. Uszko takie jest wielkością stałą, rozciera się je w ściśle określonych ilościach soli lub buljonu.

Chcąc oznaczyć ilość bakterji w materiale przeznaczonym do szczepień, przenosimy 1 uszko tego materiału na pożywkę (rozpuszczony agar), wysiewamy na płytkę i po 24 godzinach obliczamy ilość kolonji (liczenie kolonji na płytce patrz str. 55).

<sup>1)</sup> Skala do przygotowywania uszek o określonej wielkości znajduje się w handlu. Jest to pałeczka o rozmaitych średnicach, na które nakłada się drucik platynowy i tworzy odpowiednią pętliczkę.



### Pomieszczenia dla zwierząt.

Zakażone świnki morskie, szczury, myszy i t. p. należy trzymać w klatkach z przedziałkami lub w wysokich słojach szklanych z drucianymi przykrywkami.

Króliki umieszcza się w klatkach drewnianych lub metalowych ze specjalnem dnem do ścieku moczu. Po zaszczepieniu zwierzęcia należy zanotować jego wagę, płęć i zabarwienie sierści; królikom, dla odróżnienia, przeciągnąć przez uszy druciki z blaszkami, na których znajdują się numerki.

### Mierzenie ciepłoty.

Mierzenie temperatury zwierzętom uskutecznia się wprowadzenie termometru maksymalnego do odbytnicy. Ciepłota normalna dla królika jest  $38,3^{\circ}$ — $39,3^{\circ}$ , dla świnki morskiej  $37,3^{\circ}$ — $39,5^{\circ}$  (przeważnie ok.  $38^{\circ}$ ).

Zwierząt używamy do szczepień wówczas, gdy chcemy się przekonać, czy badany szczep jest chorobotwórczy dla danego zwierzęcia, następnie w celu zbadania własności toksycznych przesączów bakt., oraz by się dowiedzieć, czy w danej wydzielinie (naprz. płwocinie, moczu) znajduje się poszukiwany drobnoustrój (naprz. laseczka gruźlicy), który wywołuje zmiany chorobne lub spowodza śmierć zwierzęcia.

### Badanie pośmiertne zwierząt (sekcja, obdukcja).

Badanie pośmiertne powinno być dokonywane w jak najkrótszym czasie po śmierci zwierzęcia; jeśli to nie może nastąpić, zwłoki przechowywać należy w lodowni. Zwierzęcia badanego nie należy dotykać rękoma; instru-

menty powinny być zawczasu wygotowane. Zwierzę należy rozciągnąć na desce lub płycie metalowej stroną brzuszną do góry. Kończyny trzeba wyprężyć i umocować za pomocą sznurka, który przeciąga się przez dziurki u brzegu deski lub płyty. Owłosienie na stronie brzusznej ostrzyć lub opalić, a następnie obmyć skórę płynem odkażającym (roztworem sublimatu, krezolu i t. p.). Skórę rozcina się nożyczkami wzdłuż linii środkowej od szyi aż do spojenia łonowego i oddziela się skalpelem od mięśni. Następnie przecina się warstwę mięśni poniżej wzrostka mieczykowatego, oddziela się ją od żeber i odciąga przy pomocy pincetek lub szpilek. Przy sekcji myszy i szczura można mięśni brzucha nie przecinać, lecz przerwać pincetką. Po obejrzeniu stanu narządów jamy brzusznej (i zanotowaniu go przez inną osobę), oraz po zaszczepieniu wysięku, ropy, gruzelków i t. p. na odpowiednie pożywki otwieramy klatkę piersiową, przecinając obustronnie żebra po bokach mostka; następnie podnosimy do góry mostek, aby narządy leżące w klatce piersiowej były widoczne. Chcąc wykonać posiew krwi, należy wbić jałową pipetkę do serca, poczem przenieść otrzymaną w ten sposób kroplę krwi na odpowiednią pożywkę. Podobnie postępuje się z woreczkiem żółciowym w celu wykonania posiewu żółci.

Narządy, których zawartość chcemy wysiać na pożywkę, należy wyciąć jałowym instrumentem; następnie przepalonym drucikiem platynowym przenosimy cząsteczkę narządu na pożywkę. Twarde cząstki (naprz. w narządach gruzliczych) wycinamy jałowymi nożyczkami, rozgniatamy pomiędzy dwoma przepalonymi uprzednio szkiełkami przedmiotowymi, poczem cząsteczkę przenosimy na pożywkę.

Zachować wielką ostrożność przy wykonywaniu sekcji — łatwość zakażenia!

Z ropy, wysięków, gruźłek i t. d. przygotowuje się preparaty na szkiełkach przedmiotowych i barwi się sposobami zwykłymi.

Po ukończeniu badania pośmiertnego należy włóki zwierzęcia spalić w piecu lub wrzucić do stężonego kwasu siarkowego. Deskę należy dokładnie obmyć 1—2<sup>0</sup>/<sub>00</sub> roztworem sublimatu, płytę metalową — 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworem lizolu.

### **Badanie drobnoustrojów.**

Chcąc otrzymać t. zw. „czystą hodowlę“ lub wogóle wyszukując pewnego drobnoustroju wśród innych wyrosłych na pożywce, należy drobnoustrój zbadać makroskopowo i mikroskopowo. Przedewszystkiem należy zbadać kolonie makroskopowo (najlepiej na płytce).

#### **Badanie makroskopowe.**

Cechy kolonji. Najbardziej swoisty wygląd mają kolonie na żelatynie. Również na pożywkach agarowych (agar zwykły, pożywka Endo, Conradi-Drygalskiego i in.) rozmaite gatunki drobnoustrojów wyglądają różnorodnie. Badając wygląd kolonji należy mieć na uwadze wiek kolonji, jej wielkość, barwę, wzniesienie ponad poziom pożywki, zmętnienie, tworzenie kryształów, upłynianie pożywki (rozrzedzanie pożywki żelatynowej), następnie charakter brzegu kolonji i pasa do niej przylegającego, a więc: szerokość, rysunek, wypustki, odnogi i t. p.; następnie należy zwrócić uwagę na spoistość (konsystencję) kolonji —



śluzowatość, stwardnienie, niciowatość, drobno- lub gruboziarnistość, przezroczyistość i t. d.

W celu otrzymania obfitego materiału do badania („czystej hodowli“ danego drobnoustroju):

a) przenosimy daną kolonję uszkiem platynowem na pożywkę skośną (przeważnie używa się tu agaru zwykłego), wprowadzamy ją do wody kondensowanej, zbierającej się zwykle na dnie próbówki oraz rozsmarowujemy ją ruchem wężowym po powierzchni pożywki;

b) przenosimy daną kolonję do pożywki płynnej przez roztarcie jej na ścianie próbówki ponad powierzchnią pożywki i wstrząśnięcie próbówki, aby zmyć drobnoustroje ze ścianki. Bakterje na pożywce płynnej (naprz. na najczęściej używanym buljonie) rosną niejednakowo. Niektóre wytwarzają na powierzchni błonkę, inne męt jednolity, jeszcze inne — osad na dnie lub w całej pożywce w postaci opalizującego obłoczka;

c) wprowadzamy daną kolonję do pożywki „wysokiej“, t. j. zastygłej w stanie zwykłym, a nie skoszonej (naprz. agar cukrowy, żelatyna i in.) przez wkłucie jej niezagiętym drucikiem platynowym. Różne gatunki bakterji dają rozmaity wzrost w pożywkach wysokich, i tak naprz.: żelatyna może być całkowicie niezmieniona lub przeciwnie, może utworzyć się w niej pęknięcie, szpara lub wreszcie otwór w kształcie lejka i t. p. Podobnie agar z dodatkiem cukru gronowego może być przez jedne drobnoustroje niezmieniony, przez inne „rozsadzony“ t. j. wypełniony bańkami gazu ( $\text{CO}_2$ ), powstałego przy rozkładzie cukru pożywki pod działaniem danego drobnoustroju. Pozatem, w razie potrzeby (dla dokładniejszego odróżnienia drobnoustroju

od innych doń podobnych), siejemy jeszcze na szereg pożywek specjalnych, naprz. na surowicę Loeffler'a, pożywkę Riemsdyk i in. (laseczka błonicy), na pożywkę Endo, Conradi-Drygalskiego i in. (laseczki z grupy okrężnicy) i t. d. Szczegóły — patrz w badaniach odnośnych.

**Liczenie kolonji na płytkach.** Badaną płytkę stawiamy na czarnym szkłe z odpowiednią podziałką (kwadraciki wielkości  $1 \text{ cm}^2$ ). Po obliczeniu ilości kolonji w pewnej określonej ilości kwadracików (najmniej 10-ciu) i podzieleniu otrzymanej liczby przez ilość obliczonych kwadracików, otrzymujemy liczbę przeciętną kolonji w jednym kwadraciku. Liczbę tę mnożymy przez powierzchnię płytki (określoną podług wzoru  $\pi R^2$ , w którym  $R$  = promieniowi płytki w cm.) i w ten sposób otrzymujemy przybliżoną ilość kolonji na płytce. Zamiast w kwadracikach można również obliczać kolonje na płytce w wycinkach koła wielkości płytki, narysowanego na kawałku białego papieru i podłożonego bezpośrednio pod płytkę.

Na silnie porośniętych płytkach kolonje oblicza się pod mikroskopem (przy słabem powiększeniu). Nadaje się bardzo do tego celu aparacik Brudny'ego, którego działanie polega na automatycznym liczeniu kolonji; liczenie odbywa się przez przyciskanie igły, umoczonej w tuszu, do płytek, w miejscach, gdzie znajdują się poszczególne kolonje; każde dotknięcie sztyftu zostaje oznaczone w aparacie przez posunięcie cyfry o jedną naprzód.

Jeśli obliczamy ilość kolonji w płynie (naprz. w wodzie), to do posiewu użyć należy ilości ściśle określonych ( $1 \text{ cm}^3$ ,  $0,1 \text{ cm}^3$  i t. d.); odpowiednia ilość płynu zostaje wprowadzona na płytkę, poczem nalewa się na nią rozpusz-

czoną i ostudzoną pożywkę. Obliczona ilość kolonii zawierać się będzie w  $1 \text{ cm}^3$ ,  $0,1 \text{ cm}^3$  i t. d. płynu użytego do posiewu.

### Badanie mikroskopowe.

Po badaniu makroskopowym należy przejść do badania mikroskopowego dla ostatecznego ustalenia, z jakim rodzajem drobnoustrojów mamy do czynienia. W tym celu robimy t. zw. „preparaty-odbitki“, aby uwidocznic wzajemne położenie bakterji w poszczególnej kolonii. Dokonywa się tego przez nałożenie i przyciśnięcie szkiełka przykrywkowego do badanej kolonii i zdjęcie go pincetką; po wysuszeniu i utrwaleniu preparatu na szkiełku barwimy go sposobami zwykłymi, następnie przygotowujemy „kroplę wiszącą“ (patrz str. 7), aby przekonać się, czy dany drobnoustrój obdarzony jest ruchem, oraz robimy preparaty barwione (str. 63), aby poznać morfologję oraz zachowanie się względem barwników. W celu przekonania się o obecności rzęsek, wykrycia krętków białych itd., posługujemy się ciemnym tłem (str. 77), metodą tuszową Burri'ego lub negatywną Serkowskiego (str. 78).

### Badanie skrawków.

Dla wykrycia drobnoustrojów w narządach ludzkich i zwierzęcych musimy przygotować odpowiednie skrawki z tkanek. W tym celu należy tkankę utrwalic (naprz. przez włożenie niewielkich kawałków tkanki na 24 godzin — lub krócej — do 10% roztworu formaliny albo do płynu Müller'a, Zenker'a, Flemming'a, acetonu i in.), poczem na-



leży tkankę pozbawić znajdującej się w niej wody (przez przeniesienie do coraz silniejszego wysokoku), wreszcie zatopić (w parafinę lub celloidynę). W razie braku wyżej wymienionych środków utrwalających, można włożyć tkankę od razu do wysokowartościowego alkoholu; wówczas przeciąg czasu, niezbędny do otrzymania skrawków mikrotomowych, zmniejszy się znacznie. Bez względu na sposób utrwalania, po wyjęciu z utrwalacza i przeprowadzeniu przez wysoki, należy tkankę „zatopić“.

### Zatapianie w parafinę:

1) Po wyjęciu z alkoholu absolutnego wkładamy tkankę do olejku anilinowego i pozostawiamy w nim tak długo, dopóki preparat nie stanie się przezroczysty.

2) Po osuszeniu bibułą, tkankę wkładamy do ksyłolu, w którym pozostawiamy ją tak długo, dopóki ksyłol nie przestanie zabarwiać się na żółto (ok. 20 min.).

3) Osuszyć bibułą. Tkanka powinna być przezroczysta.

4) Przenosimy tkankę do płynnej parafiny (t. zw. I-ej) o punkcie topliwości  $54^{\circ}$  (przygotowanej ze zmieszania w równych częściach dwóch gatunków parafiny: o punkcie topl.  $50^{\circ}$  i  $58^{\circ}$ ) i wstawiamy ją do cieplarki przy  $56^{\circ}$ . Po upływie  $\frac{1}{2}$ —1 godziny (zależnie od wielkości kawałka tkanki), tkankę przenosimy do świeżej, bezwzględnie czystej parafiny (t. zw. II-a) i pozostawiamy w niej 1—2 godzin.

5) Wylewamy płynną parafinę wraz z zawartą w niej tkanką do specjalnych ramek (metalowych, szklanych lub papierowych) i układamy w niej tkankę w odpowiedni sposób. Płynną parafinę pozostawia się czas jakiś w spokoju, aby utworzyła się na powierzchni błonka (można też

lekką dmuchać na powierzchnię parafiny), poczem oblewa się ją zimną wodą lub wstawia do lodowni, by ostatecznie równomiernie zakrzepła. Skrzepły blok parafiny odpowiednio obcinamy i przytapiamy do klocka drewnianego.

Do krajania tkanki używa się m i k r o t o m u. Mikrotom jest to przyrząd, za pomocą którego można otrzymywać bardzo cienkie skrawki (grubości do  $3\ \mu$ ). Do celów bakteriologicznych nadają się tylko zupełnie cienkie skrawki; metoda celloidynowa, przy której otrzymywać można tylko grube skrawki, mało jest w bakteriologii stosowana (sposób zatapiania w celloidynie — patrz podręcznik specjalny). W mikrotomie znajduje się nóż przymocowany poziomo lub pionowo (zależnie od systemu). Przy poziomym ustawieniu noża skrawek jest nieruchomy, nóż zaś, za pomocą wykonywanych przez nas ruchów, ścina skrawki tkanki, przyczem grubość tych skrawków — dzięki specjalnej płaszczyźnie pochyłej i precyzyjnemu urządzeniu śruby — może być bardzo mała. Przy pionowym ustawieniu noża sam nóż jest nieruchomy, natomiast podsuwa się doń bloczek z tkanką tak, iż za każdym ruchem korby, podnoszącym i opuszczającym — a zarazem przysuwającym do noża bloczek, odcina się pojedynczy skrawek.

Oddzielne skrawki przenosi się do płaskiej miseczki z ciepłą wodą (ok.  $40^{\circ}$ ), skąd wyjmuje się szkiełkiem przedmiotowym, posmarowanym mieszaniną gliceryny z białkiem kurzem (białko kurze ubite na pianę i zmieszane w równych częściach z gliceryną) lub roztworem samego białka. Trzymając szkiełko pochyło, pozwalamy spłynąć wodzie, resztę wody odciągamy bibułą i szkiełko kładzie-

my na parę godzin do ciepłarki. Po wyjęciu z ciepłarki postępuje się, jak podano poniżej:

- 1) Rozpuścić parafinę w preparacie przez włożenie go do ksylolu,
- 2) Włożyć preparat do absolutnego potem do 96<sup>o</sup>/<sub>o</sub> alkoholu,
- 3) " " " 70<sup>o</sup>/<sub>o</sub> " " " "
- 4) Włożyć preparat do wody na 10—20 minut.
- 5) Zabarwić preparat (o barwieniu patrz niżej).
- 6) Odwodnić preparat coraz silniejszym alkoholem (aż do absolutnego).
- 7) Przejaśnić preparat w ksylolu.
- 8) Włożyć preparat do balsamu kanadyjskiego.

### Zamrażanie skrawków.

W celu szybkiego otrzymania skrawków używa się metody zamrażania, do którego potrzebny jest balon z kwasem węglowym. Na utrwalony lub nieutrwalony kawałek tkanki puszczamy prąd kwasu, a po stwardnieniu krajemy specjalnym nożem (szczegóły patrz podręcznik specjalny).

### Barwienie skrawków. Metody ogólne.

#### Metoda Loeffler'a.

- 1) Barwić preparat błękitem metylenowym przez 3—5 minut.
- 2) Nalać na preparat 0,5—1<sup>o</sup>/<sub>o</sub> kwasu octowego na 10—20 minut.
- 3) Wsuszyć bibułą.

Odwodnić w wyskokach. Ksylol, balsam kanadyjski.



### Metoda Pfeiffer'a.

- 1) Barwić preparat fuksyną karbolową (rozcieńczoną 1:30) przez  $\frac{1}{2}$  godziny.
- 2) Odbarwić 60<sup>0</sup>/<sub>0</sub> alkoholem (do którego dodano 1 kroplę kwasu octowego), tak długo, dopóki skrawek nie stanie się szaro-fiołkowy.
- 3) Wsuszyć bibułą.

Odwodnić w wysokach. Ksylol, balsam kanadyjski.

### Metody specjalne.

#### Metoda Gram'a.

- 1) Barwić preparat gencjaną anilinową przez 5 do 30 minut.
- 2) Nalać na preparat płynu Lugol'a na 1—2 minut.
- 3) Odbarwiać wyskokiem absolutnym aż do zupełnego odbarwienia preparatu.
- 4) Spłukać wodą.
- 5) Dobarwiać wezuwiną (lub fuksyną) przez 1—2 minut.
- 6) Wsuszyć bibułą.

Odwodnić w wysokach. Ksylol, balsam kanadyjski.

#### Metoda Kühne-Weigert'a.

- 1) Barwić preparat karminem litionowym przez 2—3 minut.
- 2) Opłukać w 70<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wysokoku z dodatkiem 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub> kwasu solnego.
- 3) Zmyć wodą.
- 4) Dobarwić roztworem fioletu kryształowego (1 cm<sup>3</sup> roztworu macierzystego na 10 cm<sup>3</sup>

- wody przekrojonej z dodatkiem 1 kropli kwasu solnego) w ciągu 5—10 minut.
- 5) Działać płynem Lugol'a aż do czarnego zabarwienia preparatu (ok. 1—2 m.).
  - 6) Wysuszyć bibułą.
  - 7) Włożyć preparat do olejku anilinowego i pozostawić w nim tak długo, dopóki barwnik nie przestanie się rozpuszczać.
  - 8) Przejaśnić w ksylolu. Balsam kanadyjski.

#### Przygotowanie karminu litionowego :

Karminu 2,5—5,0

Nasyconego wodnego roztworu lithioni carbonici 100,0.

#### Barwienie laseczników gruzliczych.

- 1) Barwić preparat fuksyną karbolową na gorąco przez 15 m. lub w ciepłarce przy 37° przez 24 godziny.
- 2) Zmyć wodą.
- 3) Odbarwić 70% alkoholem z dodatkiem 3% kwasu solnego.
- 4) Zmyć wodą.
- 5) Dobarwić rozcieńczonym roztworem błękitu metylenowego przez 2—3 minut.
- 6) Zmyć wodą.
- 7) Wysuszyć bibułą.

Odwodnić w wyskokach: Ksylol, balsam kanadyjski.

#### Przechowywanie preparatów.

Preparatów bakteriologicznych zwykle nie przykrywa się specjalnymi szkiełkami, t. zw. „pokrywkowemi“ (przykryw-

kowemi), natomiast skrawki z tkanek zatapiane są w balsamie kanadyjskim i pokrywane szkiełkiem.

Warstwę oleju cedrowego, który nakładamy do oglądania preparatu pod imersją, należy bezpośrednio po każdym badaniu usunąć bibułą lub płócikiem, poczem szkiełko przemyć ksylolem (gdy olejek zaschnie — zmyć go o wiele trudniej); w ten sposób preparat jest zawsze czysty i w każdej chwili nadaje się do badania. Umieszcza się preparaty w teczkach lub specjalnych pudełkach, które chronią je od wyblaknięcia. Na każdym preparacie musi być etykieta z treścią preparatu, sposobem barwienia i datą przygotowania. O ile się nie ma odpowiednich naklejek — można pisać wprost na szkiełku atramentem lub tuszem.

## **Przygotowywanie barwników i barwienie preparatów.**

Bakterje barwią się zasadowymi barwnikami anilinowymi. Do najczęściej używanych należą: fuksyna, błękit metylenowy, gencjana fioletowa, wezuwina i in. Z wyjątkiem bakterji kwasoodpornych, prawie wszystkie bakterje barwią się roztworami wodnymi. Ponieważ roztwory wodne stosunkowo szybko ulegają rozkładowi, poleca się przygotować t. zw. roztwory macierzyste, które mogą być dłużej przechowywane i w miarę potrzeby rozcieńczane wodą.

### **Roztwory macierzyste.**

Roztwory macierzyste przygotowuje się po większej części jako roztwory nasycone. Do 96° alkoholu (o ile



chodzi o nasycony roztwór alkoholowy), lub do wody (o ile chodzi o nasycony roztwór wodny), wsypać tyle sproszkowanego barwnika, ile może go się rozpuścić w danej objętości płynu. Następnie płyn dobrze wstrząsnąć, pozostawić 1—2 dni w spokoju, poczem dokładnie przesączyć przez bibułę.

### **Przygotowywanie preparatów barwionych.**

Narysować tłustym ołówkiem kółko na szkiełku przedmiotowym, dokładnie umytem i pozbawionem śladów tłuszczu (o myciu szkiełek patrz str. 17). W kółku tem umieścić cienką pipetką lub uszkiem platynowem kroplę wody przekroplonej i rozetrzeć w niej odrobinę hodowli badanej, wziętej uszkiem platynowem. Gdy preparat wyschnie (można wysuszyć go wysoko nad płomieniem), utwalić, przeciągając szkiełko (preparat do góry) kilkakrotnie przez płomień „z szybkością krajania chleba“ aż do ogrzania do  $65-70^{\circ}$ , co rozpoznać można w przybliżeniu przez dotknięcie. Po ostygnięciu preparatu nalać odpowiedniego barwnika. Można też zrobić preparat na szkiełku przykrywkowem — utwalić przez trzykrotne przeprowadzenie przez płomień!

### **Barwniki najczęściej używane :**

#### **Fuksyna.**

##### **a) zwykła**

100  $\text{cm}^3$  wody przekroplonej

10  $\text{cm}^1$  macierzystego alkoholowego roztworu fuksyny.

## b) karbolowa

- 100 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej  
 5 cm<sup>3</sup> kwasu karbolowego  
 10 cm<sup>3</sup> macierzystego alkoholowego roztworu fuksyny.

**Błękit metylenowy.**

## a) wodny

- 100 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej  
 10 cm<sup>3</sup> macierzystego alkoholowego roztworu błękitu metylenowego

## b) Loeffler'a

- 100 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej  
 30 cm<sup>3</sup> macierzystego alkoholowego roztworu błękitu metylenowego  
 1 cm<sup>3</sup> 1 $\frac{1}{2}$  roztworu ługu potasowego.

**Gencjana fiołkowa.**

## a) anilinowa

- 100 cm<sup>3</sup> wody anilinowej  
 1,5—2 cm<sup>3</sup> macierzystego alkoholowego roztworu gencjany fiołkowej.

Wodę anilinową przygotowujemy przez dodanie do wody przekrojonej takiej ilości olejku anilinowego, by po dokładnem wstrząsaniu pozostał nadmiar olejku w postaci kropelek zawieszonych w wodzie; wówczas płyn sączymy przez sącdek z bibuły, zwilżony wodą przekrojoną. Należy zawsze używać świeżo przygotowanego roztworu!

## b) karbolowa

- 100 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej  
 10 cm<sup>3</sup> macierzystego alkoholowego roztworu gencjany fiołkowej  
 5 cm<sup>3</sup> kwasu karbolowego (ac. carbol. liquefacti).

Prócz wymienionych barwników, istnieje jeszcze wiele innych, jak: barwniki Neisser'a, wezuwina, chryzoidyna, fiolet metylenowy, błękit metylenowy Fallières'a, barwnik Pick'a, tusz, barwnik Giemsa'y, Manson'a i inne.

Do badań najprostszych (orientacyjnych) posługujemy się barwieniem pojedynczym, jak naprz. barwnikiem Loeffler'a, fuksyną i in.

### Barwienie metodą Loeffler'a.

#### Błękit metylenowy Loeffler'a

100 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej

30 cm<sup>3</sup> macierzystego alkoholowego roztworu błękitu metylenowego

1 cm<sup>3</sup> 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ługu potasowego.

Nalać na preparat błękitu metylenowego na przeciąg 1—3 minut, potem zmyć wodą.

Ciałka biegunowe (w las. błonicy), jądra itp. barwią się granatowo; ciała bakteryjne, zaródź itp. — na niebiesko. W celach różnicowania posługujemy się metodami kontrastowymi, z których najważniejsze podane są poniżej.

### Barwienie metodą Gram'a.

#### 1. Gencjana fiołkowa na wodzie anilinowej

100 cm<sup>3</sup> wody anilinowej

1,5—2 cm<sup>3</sup> nasyconego roztworu wysokowego gencjany fiołkowej.

#### 2. Roztwór Lugol'a

300 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej

1 gr. jodu

2 gr. jodku potasu

#### 3. Alkohol etylowy 76<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.



#### 4. Roztwór fuksyny

90 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej

10 cm<sup>3</sup> macierzystego alkohol. roztworu fuksyny.

Na utrwalony preparat nalać roztworu gencjany na 2 min., poczem barwnik zlać i na 30 sek. nalać roztworu Lugol'a, poczem przez 15—30 sek. odbarwiać alkoholem i dokładnie przemyć preparat bieżącą wodą. Następnie dobarwić przez 1 min. roztworem fuksyny, przemyć wodą i osuszyć bibułą. Bakterje t. zw. Gram-dodatnie (Gr. +) pochłaniają pierwotny fiołkowy barwnik (gencjanę) i nie odbarwiają się alkoholem; bakterje t. zw. Gram-ujemne (Gr.—) odbarwiają się alkoholem i nabierają zabarwienia czerwonego od fuksyny.

Do bakterji Gram-dodatnich należą: gronkowce, paciorkowce, pneumokoki, las. błonicy, las. węglika, las. gruźlicy, trądu, świńskiej czerwoni, grzybek promienicy i inne.

Do bakterji Gram-ujemnych należą: laseczniki duru brzuszego, durów rzekowych, okrężnicy, krwawej biegunki, ropy błękitnej, przecinkowce choleryczne, meningokoki, gonokoki, krętki duru powrotnego oraz kiły i inne.

#### Barwienie metodą Fallières'a.

(na laseczniki błonicy)

##### 1. Błękit metylenowy Fallières'a

100 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej

1 gr. błękitu metylenowego w proszku

8 kropel alkoholu absolutnego

0,5 gr. boraksu.

##### 2. Roztwór wezuwiny

100 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej

0,1 gr. wezuwiny w proszku (Bismarckbraun).

Na preparat nalać błękitu na 3 min., następnie zmyć wodą i na 15 sekund oblać wezuwiną, poczem zmyć wodą bieżącą.

Ciałka biegunowe barwią się na granatowo, ciała bakteryjne — na zielonawo.

### Barwienie metodą Neisser'a.

(na laseczники błonicy)

#### 1. Neisser A.

- 100 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej
- 0,1 gr. błękitu metylenowego w proszku
- 2 cm<sup>3</sup> alkoholu absolutnego
- 5 cm<sup>3</sup> kwasu octowego stężonego.

#### 2. Neisser B.

- 300 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej
- 1 gr. fioleto kryształowego (Kristallviolett)
- 10 cm<sup>3</sup> alkoholu.

#### 3. Chryzoidyna.

- 300 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej } rozpuścić
- 1 gr. chryzoidyny w proszku } na gorąco!

W probówce zmieszać w równych częściach barwniki Neisser'a A i B, nalać na preparat na 2—3 sekund, poczem zmyć wodą, odbarwić chryzoidyną przez 3 sekundy i dobrze spłukać wodą.

Ciałka biegunowe barwią się na kolor ciemno-brunatny, ciała bakteryjne — na żółtawy.

### Barwienie metodą Lubińskiego.

(na laseczniki błonicy)

1. Pyoktanina.
2. Płyn Lugol'a.
3. Roztwór wezuwiny.

Preparat po utrwaleniu i ostudzeniu szkiełka barwić pyoktanią w ciągu 1—2 minut, następnie działać płynem Lugol'a przez 15—30 sekund, poczem odbarwić wyskokiem (bardzo krótko!), zmyć wodą, dobarwić wezuwiną i zmyć wodą ostatecznie.

Ciałka biegunowe barwią się na czarno, ciała bakteryjne — na żółtawo.

### **Barwienie metodą Ziehl-Neelsen'a.**

(na laseczniki gruźlicy i inne kwasoodporne)

#### 1. Fuksyna karbolowa

100 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej

5 cm<sup>3</sup> kwasu karbolowego

10 cm<sup>3</sup> macierzystego alkoholowego roztworu fuksyny.

#### 2. 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztwór kwasu azotowego (lub 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztwór kwasu siarczanego).

#### 3. 60<sup>0</sup>/<sub>0</sub> alkohol.

#### 4. Roztwór błękitu metylenowego.

Na utrwalony preparat nalać fuksyny karbolowej i przez 3 min. lekko nagrzewać do ukazania się pary (K r ö n i g zaleca nawet zagotowywać barwnik wielokrotnie), następnie spłukać wodą, oblać kwasem azotowym na 3—5 sekund, znów obmyć wodą, odbarwić alkoholem, przemyć wodą i dobarwić błękitem metylenowym przez 1—2 minut, poczem ostatecznie spłukać wodą.

Bakterje kwasoodporne barwią się na czerwono, pozostałe — na niebiesko.

### **Barwienie metodą Ziehl-Gabbet'a.**

(na laseczniki gruźlicy i inne kwasoodporne)

#### 1. Fuksyna karbolowa (patrz str. 64).



## 2. Płyn Gabbet'a

- 80 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej
- 20 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu siarkowego
- 10 cm<sup>3</sup> wysokoku
- 1 gr. błękitu metylenowego sproszkowanego.

Utrwalony preparat oblać fuksyną karbolową i barwić, jak przy metodzie Ziehl-Neelsen'a, następnie spłukać wodą i oblać na 5—10 sekund płynem Gabbet'a, poczem ponownie spłukać wodą.

## Barwienie metodą Much'a.

(na laseczki grzylicy)

### 1. Fiolet metylenowy.

- 100 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej
- 2 cm<sup>3</sup> kwasu karbolowego
- 10 cm<sup>3</sup> macierzystego roztworu wysokowego fioletu metylenowego (Methylviolett).

2. Roztwór Lugol'a (patrz przygotowanie przy barwieniu metodą Gram'a — str. 65).
3. 5% roztwór kwasu azotowego.
4. 3% roztwór kwasu solnego.
5. Mieszanina alkoholu i acetonu (w równych częściach).
6. 1% roztwór safraniny.

Utrwalony preparat barwić fioletem metylenowym w temperaturze pokojowej przez 24—48 godzin, następnie oblać roztworem Lugol'a i pozostawić w nim przez 2—3 min. Następnie na 1 minutę poddać działaniu kwasu azotowego i przez 10 sekund kwasu solnego, poczem odbarwiać mieszaniną alkoholu i acetonu tak długo, dopóki barwnik nie przestanie się wydzielać (sprawdzić pod mikroskopem!), wysuszyć bibułą i dobarwić safraniną. Spłukać wodą jak zwykle.

Laseczniki gruzlicy barwią się na kolor ciemno fioletowy (względnie granatowy), przyczem różnicują się wyraźnie t. zw. „ciałka Much'a“.

### Barwienie metodą Gasis'a.

(na laseczniki gruzlicze)

- 95 cm<sup>3</sup> gorącej wody
- 5 cm<sup>3</sup> alkoholu absol.
- 3 gr. sublimatu (jako zaprawa)
- 1 cm<sup>3</sup> olejku anilinowego.

Mieszanię tę przez pewien czas gotować, poczem przesączyć, dodać 1 gr. eozyny wodnej, rozpuszczonej w kilku cm<sup>3</sup> wody. Przesączyć, pozostawić przez 24 godziny i znowu przesączyć.

Preparat utrwalić alkoholem. Nalać barwnik na preparat, ogrzać do pierwszej pary i pozostawić na nim przez 1 minutę.

Odbarwić następującym roztworem:

- 1 gr. ługu sodowego
- 0,5 jodku potasu
- 100 cm<sup>3</sup> wysokości 50‰.

Odbarwiacz pozostawić na preparacie przez kilka sekund, poczem zmyć wysokiem 90‰ i wodą przekroploną.

Dla uwidocznienia tła podbarwić (2—3 sekundy) następującą mieszaniną:

- 1 gr. błękitu metylenowego
- 0,5 gr. kwasu solnego
- 10 cm<sup>3</sup> wysokości
- 90 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej.

Laseczniki zabarwią się na czerwono, tło na niebiesko.

### Barwienie otoczek gruzliczych metodą Spengler'a.

1. Na utrwalony preparat nalać fuksyny karb. Ziehl'a i ostrożnie ogrzać.
2. Po zlaniu fuksyny nalać kwasu pikrynowego z wysokiem (nasycony wodny roztwór kwasu pikrynowego i alkohol abs. = odczynnik Essbach'a + alkohol absol. aa.) na kilka sekund;
3. Przemyć 60% wysokiem.
4. Odbarwić 15% kwasem octowym.
5. Przemyć 60% wysokiem.
6. Zabarwić kwasem pikrynowym z wysokiem, obmyć wodą, wysuszyć nad płomieniem.

### Barwienie otoczek i ziarnistości laseczników gruzliczych metodą Kronberger'a.

1. Na utrwalony preparat nalać fuksyny karb. Ziehl'a i ogrzać do 1-ej pary.
2. Odbarwić 15% kwasem azotowym.
3. Przemyć 60% wysokiem.
4. Barwić jodyną (tinct. jodi ofic.) rozcieńczoną 4-krotnie 60% wysokiem.
5. Przemyć silnym prądem wody.

Wysuszyć.

Otoczka laseczników barwi się na różowo, niekiedy błyszcząco czerwono, a ziarnistości — na ciemno-czerwono prawie czarno.

### Metoda Pick-Jacobsohn'a.

20 cm<sup>3</sup> wody przekropłonej

15 kropeł fuksyny karbolowej.



8 kropel maciejzystego roztworu wysokowego błękitu metylenowego.

Utrwalony preparat oblać na 8—10 sekund barwnikiem, poczem zmyć wodą.

Bakterje barwią się na granatowo, jądra komórek na niebiesko, reszta — na czerwono.

### Barwienie zarodników metodą Moeller'a.

- A. Preparat utrwalić w chloroformie przez 15 minut.
- B. Preparat utrwalić w 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> kwasie chromowym przez 30 minut.
- C. Zmyć wodą.
  1. Barwić fuksyną karbolową (patrz str. 68), przez 5 minut, silnie nagrzewając.
  2. Zmyć wodą.
  3. Działać płynem Gabbet'a (patrz str. 69) przez 15 sekund.
  4. Zmyć wodą.

Zarodniki barwią się na czerwono, ciała bakteryjne na niebiesko.

### Barwienie otoczek metodą Johne'go.

1. Barwić 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wodnym roztworem gencjany fiołkowej przez 2 minuty, lekko nagrzewając.
2. Zmyć wodą.
3. Odbarwić 1—2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> kwasem octowym przez 6—10 sekund.
4. Zmyć wodą.  
Oglądać w wodzie.

### Barwienie rzęsek metodą Zettnow'a.

Do badania rzęsek należy używać materiału z pożywek stałych (młode hodowle agarowe). Należy również zwrócić uwagę, by na jednym preparacie nie było zbyt wielkiej ilości bakterji; w tym celu trochę materiału z hodowli rozcieramy w kropli wody dest., następnie odrobinę tej zawiesiny przenosimy do dużej kropli wody, do której dodano poprzednio 1—2 uszek 2<sup>o</sup>/<sub>0</sub> roztworu kwasu osmowego. Z kropli tej przygotowujemy preparaty na szkiełkach przykrywkowych.

1. Utrwalamy bakterje zapomocą przeprowadzenia przez płomień, następnie na preparat nalewamy zaprawę (beicy) i nagrzewamy do 100<sup>o</sup> przez 5—7 minut (najlepiej na płytce metalowej).

Przygotowanie zaprawy: w 200 cm<sup>3</sup> wody ogrzanej do 50—60<sup>o</sup>, rozpuścić 10 gr. taniny i 36—37 cm<sup>3</sup> roztworu tartari sibiati (2 gr. na 40 cm<sup>3</sup> wody). Jeśli po nagraniu widoczny osad się nie rozpuści, należy dodać jeszcze trochę taniny, jeśli zaś płyn nie posiadał wcale osadu, dodać 1 cm<sup>3</sup> roztworu tartari sibiati. Zaprawa powinna być całkowicie przezroczysta; dodatek tymolu zapewnia trwałość zaprawy. Stosować zawsze na gorąco i w stanie przezroczystym.

2. Skoro szkiełka ostygły, dokładnie spłukać wodą.

3. Na każde szkiełko nalać 3—4 kropli roztworu srebra etylo-aminowego i nagrzać do silnego parowania.

Przygotowanie roztworu srebra etylo-aminowego:  
2—3 gr. siarczanu srebra, otrzymanego z azotanu

srebra przez dodanie siarczanu magnezu lub sodu, wstrząsnąć silnie i dodać 200 cm<sup>3</sup> wody przefiltrowanej, aby otrzymać roztwór nasycony. Otrzymany roztwór zmieszać w równych częściach z wodą i dodać tyle 33<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (kupnego) roztworu etylaminy, by utworzony osad się rozpuścił.

4. Obmyć wodą.

Rzęski barwią się na czarno, tło pozostaje jasne.

### Barwienie rzęsek metodą Loeffler'a.

1. Utrwalić preparaty, jak przy metodzie Zettnow'a, podziałać niżej podaną zaprawą, ogrzewając przez  $\frac{1}{2}$  – 1 minuty.

Zaprawa: 10 cm<sup>3</sup> 20<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu taniny.

5 cm<sup>3</sup> na zimno nasyconego roztworu siarczanu żelaza lub Ferr. oxydul. ammon.

1 cm<sup>3</sup> wodnego lub alkoholowego nasyconego roztworu fuksyny.

(przy barwieniu rzęsek laseczek tyfusowych należy na każde 16 cm<sup>3</sup> zaprawy dodać 1 cm<sup>3</sup> 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu NaON).

2. Zmyć wodą (silnym strumieniem) i osuszyć bibułą.

3. Odbarwiać wyskokiem.

4. Zabarwić, nagrzewając anilinowym roztworem fuksyny (do roztworu fuksyny dodać 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu NaON, aż do lekkiego zmętnienia; roztwór za każdym razem świeżo przygotowywać!).

5. Zmyć dokładnie wodą.

### Barwienie rzęsek metodą Peppler'a.

1. Przygotować i utrwalić preparaty, jak w poprzednich metodach, poczem podziałać niżej podaną zaprawą na zimno przez 1–5 minut.



Przygotowanie zaprawy: 20 gr. taniny rozpuścić w letniej kąpieli wodnej w 80 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej; po ostudzeniu dodać 15 cm<sup>3</sup> 2,5% kwasu chromowego (wolnego od H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>!). Po upływie 4—6 dni przesączyć. Przechowywać w ciepłocie pokojowej i sączyć przed użyciem.

2. Zmyć silnym strumieniem wody.
3. Barwić na zimno przez 2 minuty karbolowym roztworem gencjany fiołkowej.

Karbolowy roztwór gencjany: 10 cm<sup>3</sup> 5% alkoholowego roztworu gencjany + 2,5 cm<sup>3</sup> kwasu karbolowego na 100 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej. Roztwór ten przesączyć po kilku dniach.

4. Zmyć silnym strumieniem wody.

### Barwienie preparatów ze krwi.

Do barwienia pasorzytów znajdujących się we krwi i leżących bądź w krwinkach, bądź w osoczu stosujemy barwniki specjalne, a więc: Romanowskiego, Giemsa'y, Manson'a, May-Grünwald'a, (Jenner'a), Leishmanna i inne. Przytaczamy tu najważniejsze z nich.

Preparaty ze krwi (mazane lub w grubej kropli) utrwalamy przez 15 minut w mieszaninie alkoholu absolutnego i eteru siarczanego w równych częściach lub w alkoholu metylowym przez 2—3 minut. Po wyjęciu z wysoku oblewamy cały preparat wodą przekroploną i zostawiamy go w tym stanie również około 2 minut, poczem zmywamy wodą i barwimy.

### Barwienie metodą Giemsa'y.

(na krętki duru powrotnego, na pasorzyty zimnicy i inne).

10 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej<sup>1)</sup>

10 kropel barwnika Giemsa'y.

Wodę i barwnik mieszać w zupełnie czystem naczyniu (nie po kwasie!); roztwór przygotowywać za każdym razem świeży. Preparat utrwalony oblać przygotowanym roztworem barwnika, aby się nim całkowicie pokrył, i barwić przynajmniej w ciągu 20 minut, poczem barwnik zlać i preparat dobrze spłukać bieżącą wodą. Przy barwieniu metodą Giemsa'y pasorzyt zimnicy barwi się na jasno-niebiesko z czerwoną ziarnistością; krętki duru powrotnego barwią się na kolor fiołkowy.

### Barwienie metodą May-Grünwald-Giemsa'y (panoptyczna metoda Pappenheim'a).

(na krętki duru powrotnego i na pasorzyty zimnicy, również na gonokokki).

Na nieutrwalony preparat nalać barwnika May-Grünwald'a na 2 min., poczem dolać ostrożnie pipetką mniej więcej taką samą ilość wody przekrojonej, mieszać z barwnikiem, po 2 minutach zlać i obmyć preparat wodą bieżącą. Barwnik May-Grünwald'a, przygotowany na alkoholu metylowym, służy jako utrwalacz. Następnie barwić roztworem barwnika Giemsa'y, jak powyżej.

<sup>1)</sup> Woda przekrojona musi być bardzo dokładnie przygotowana — nie powinna zawierać nawet śladów zasad lub kwasów. Sprawdzić to można ziarenkiem hematoksyliny w sposób następujący: woda w próbówce po dodaniu hematoksyliny powinna być z początku żółta, a dopiero po 1—5 min. czerwona; jeśli woda czerwienieje natychmiast, jest w niej nadmiar zasad, jeśli się wcale nie zaczerwieni — nadmiar kwasu.

## Barwienie metodą Manson'a.

(na pasorzyty zimnicy).

Preparat utwalić według jednego z wyżej podanych sposobów i oblać barwnikiem Manson'a na 20—30 sekund, poczem zmyć wodą. Przy barwieniu tem pasorzyty zimnicy barwią się na niebiesko z czarnymi ziarnami pigmentu. Dwoinki barwią się na zielono.

## Barwnik Manson'a.

100 cm <sup>3</sup> wody destylowanej	} rozpuścić na gorąco.
5 gr. boraksu	
2 gr. błękitu metylenowego sproszkowanego.	

## Barwienie metodą Leishman'a.

Używać gotowego barwnika (firmy Grüber'a) lub 0,2 gr. proszku na 10 cm<sup>3</sup> absolutnego alkoholu metylowego.

Oblać preparat barwnikiem, po 2 min. ostrożnie pipetką nalać wody przekroplonej, zmieszać z barwnikiem, mieszanie tę zostawić w ciągu 5 minut, poczem zlać, zmyć wodą bieżącą i wysuszyć bibułą.

## Ciemne tło.

### Metoda tuszowa Burri'ego.

Na szkiełku przedmiotowym umieszczamy kroplę materjału badanego (zawiesiny, wydzieliny itp.), następnie kroplę tuszu (oryg. chińskiego), oraz kroplę jakiegokolwiek bądź surowicy ludzkiej lub zwierzęcej (jałowej — w ostateczności można się obejść i bez niej). Krople te zostają ze sobą dokładnie mieszane, poczem należy je rozprowadzić



po powierzchni szkiełka, przy pomocy szlifowanej krawędzi drugiego szkiełka przedmiotowego — podobnie jak to czynimy przy przygotowywaniu preparatów ze krwi (patrz str. 87).

Po wyschnięciu preparatu oglądamy go pod immersją. Drobnoustroje (laseczniki, krętki) wyraźnie odcinają się na ciemnym tle tuszu jako twory srebrzyste i błyszczące.

### **Barwienie negatywne Serkowskiego.**

W braku tuszu można stosować do barwienia na ciemnym tle nigrozynowy barwnik marki W. L. A.

Materiał z owrzodzenia, wydzieliny lub hodowli rozciera się na szkiełku z kroplą barwnika, lub też preparat utrwalony i wysuszony pokrywa bardzo cienką warstwą barwnika, usuwa nadmiar przez pochyłe ustawienie szkiełka i bez przemycia wodą bada po wyschnięciu, świeże preparaty na ruchy spirochet — wprost pod szkiełkiem przykrywkowym. Preparaty „odbitki“ z kolonji, bez rozcierania, pokrywa się kroplą barwnika.

## **Badanie zasadniczych własności biologicznych bakterji.**

1) **O d d y c h a n i e t l e n e m.** Większość bakterji rośnie i rozmnaża się w obecności tlenu — są to t. zw. „tlenowce“. W pewnych warunkach jednak mogą bakterje obywać się bez tlenu, noszą wówczas nazwę „względnych beztlenowców“. Odrębną zaś grupę stanowią te bakterje, dla których brak tlenu jest niezbędnym warunkiem istnienia; są to t. zw. „bezwzględne beztlenowce“. Aby się przekonać, do której z tych grup należy drobnoustrój

badany, siejemy odnośny materiał zakaźny beztlenowo według sposobów podanych na str. 45—47. Dla kontroli należy ten sam materiał posiać w sposób zwykły, przy dostępie powietrza.

2) **Własności fermentacyjne.** Bakterie posiadają zdolności rozszczepiania węglowodanów (naprz. cukrów o różnej budowie), białka lub jego pochodnych. Najczęściej sprawdzamy własności fermentacyjne, polegające na rozkładzie cukrów. Do tego celu najlepiej nadają się kolbki Eikman'a lub zwykłe probówki, zgięte pod kątem o dłuższym kolanie zamkniętem i krótszem — otwartem. Napełnia się kolbkę lub probówkę w ten sposób, aby zakażona pożywka wypełniała całkowicie górne kolano oraz część łączącą obydwie kolana. Gaz, powstały przez fermentacyjne działanie bakterji, zbiera się w górnej części zamkniętego kolana, pożywka zaś z tego miejsca zostaje wypchnięta do drugiej części przyrządu. Jako pożywka służyć tu może buljon cukrowy, pożywka Hetsch-Barsiekow'a. Przy stosowaniu tej ostatniej możemy zauważyć, prócz wytworzonego gazu, jeszcze strącenie się kazeiny z zawartej w pożywce nutrozy (o składzie pożywki Hetsch-Barsiekow'a patrz str. 25—26).

Do bakterji, rozszczepiających niektóre cukry, należy lasecznik okrężnicy, laseczniki paratyfusów, laseczniki krwawej biegunki i inne. Na podstawie tych własności fermentacyjnych pewnych gatunków bakterji oparte jest, między innymi, rozpoznanie różniczkowe gatunków, stanowiących „grupę coli”. Przy bakterjologicznem badaniu wody t. zw. „gnilne miano” ma za podstawę również własności fermentacyjne bakterji gnilnych, znajdujących się w wodzie.

Do bakterji, rozszczepiających białko, należą: przecinkowiec choleryczny, lasecznik węglik, lasecznik odmieńca (rozrzedzają żelatynę) i inne, następnie gronkowiec (rozrzedza ściętą surowicę) i in. (patrz niżej p. 6 i 7).

3) **T w o r z e n i e z a s a d i k w a s ó w.** Niektóre gatunki bakterji zmieniają podczas wzrostu odczyn pożywki, czyniąc ją bardziej kwaśną lub zasadową. Aby się o tem przekonać sprawdzamy papierkiem lakmusowym odczyn jałowej i zakażonej (po 24 g. przy 37°) pożywki. Chcąc dokładniej zbadać to zjawisko, mianujemy daną pożywkę  $\frac{1}{10}$  lub  $\frac{1}{100}$  normalnym (N) roztworem kwasu lub ługu, dodawszy do niej uprzednio lakmusu lub fenoltaleiny, jako wskaźnika. Niektóre pożywki przygotowane są odrazu z dodatkiem lakmusu (serwatka lakmusowa, podłoże Hetsch-Barsiekowa i w. in.) lub fenoltaleiny. (Patrz przygotowywanie pożywek str. 25, 26, 27, 31.)

4) **W ł a s n o ś c i o d t l e n i a j ą c e** („redukcyjne“). Istnieją bakterje, mające własność pochłaniania tlenu ze środowiska, w którym się znajdują. W celu wykazania tego zjawiska hodujemy drobnoustroje na pożywkach z dodatkiem barwnych, przez odtlenianie łatwo odbarwiających się substancji, naprz. lakmusu, błękitu metylenowego (tego ostatniego: 1—2 kropli 1% roztworu na 100 cm<sup>3</sup> pożywki). Ponieważ odbarwianie następuje w tej części pożywki, do której powietrze nie ma dostępu, przeto do obserwowania własności redukcyjnych najlepiej nadają się hodowle bez-tlenowców. Płyn, odbarwiony przez redukcję, odzyskuje przez zmieszanie z powietrzem swe zabarwienie pierwotne.

5) **W y t w a r z a n i e s i a r k o w o d o r u** stanowi cechę pewnych gatunków bakterji (t. zw. „siarczanych“)



Własność tę można sprawdzić najłatwiej przez wsunięcie do probówki z zakażoną pożywką (przed wstawieniem jej do ciepłarki) paseczka bibuły, zmoczonej w roztworze octanu ołowiu; paseczek należy przymocować korkiem w taki sposób, aby nie dotykał pożywki. Wytwarzany przez hodowlę siarkowodor, łącząc się octanem ołowiu, barwi bibułę na czarno. Łatwym do wykonania jest również odczyn Ernst'a; posługujemy się tu roztworem winianu żelaza (Ferrum tartar. oxydat. 0,5, aq. dest. 50 i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aż do odczynu zasadowego), który mieszamy w równych częściach z żelatyną. Wytwarzający się podczas wzrostu odnośnych bakterji siarkowodor barwi żelatynę na kolor czarny.

6) Wytwarzanie indolu. Lasecznik okrężnicy oraz wiele innych drobnoustrojów wytwarzają indol — produkt rozkładu białka (peptonu pożywki), powstający w obecności azotanów za dodaniem do pożywki kwasu (siarkowego lub innego). Najczęściej posługujemy się: a) sposobem Kitasato-Salkowskiego: do hodowli kilkodniowej w buljonie lub peptonie dodać  $1\text{ cm}^3$  świeżo przygotowanego 0,01% roztworu azotanu potasu ( $\text{KN O}_3$ ) i  $1\text{ cm}^3$  czystego kwasu siarczanego (1 cz. kwasu i 3 cz. wody dest.). W miejscu zetknięcia się dwóch odczynników powstaje różowy pierścień<sup>1)</sup>. Niektóre gatunki (naprz. przecinkowiec choleryczny) dają tę reakcję bez dodatku azotanu, redukując zawarte w peptonie ślady azotanów na azotany — jest to t. zw. reakcja nitrozoindolowa. b) Próba Ehrlich'a wykonywa się w sposób następujący: do  $10\text{ cm}^3$  płynnej hodowli drobnoustrojów

<sup>1)</sup> W pożywkach przygotowanych na mięsie końskim odczyn indolowy zahamowany bywa przez nadmiar cukru zawartego w mięsie.

dodaje się 5 cm<sup>3</sup> roztworu  $\alpha$  i 5 cm<sup>3</sup> roztworu  $\beta$ , poczem hodowlę należy wstrząsnąć. Mieszanka winna nabrać czerwonego zabarwienia. Roztwór  $\alpha$ : 4 gr. paradimetylamidobenzaldehydu + 380 cm<sup>3</sup> 90% alkoholu + 80 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu solnego. Roztwór  $\beta$ : nasycony roztwór wodny nadsiarczany potasu (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). c). Próba Morelli'ego: paseczek bibuły, zmoczony w nasyconym na gorąco wodnym rozczyntwie kwasu szczawowego, umieścić w probówce z zakażoną pożywką (podobnie jak się to robi przy badaniu siarkowodoru). O ile hodowla wytwarza indol — papierek zabarwi się na czerwono. Próba udaje się we wszystkich pożywkach — jedynie w żelatynie indol wytwarza się słabo i powoli.

7) Wytwarzanie peptonu (własności proteolityczne). W celu stwierdzenia własności proteolitycznych bakterji istnieje wiele metod — fibrynowa, surowicza, kazeinowa i t. d., najprostszym jest wyszczepienie badanej kultury w wyjałowionem mleku, nie zawierającym peptonu (sprawdzić). Co pewien czas, naprz. po 12—18—24 i 48 godzinach wykonywa się próbę peptonową w mleku w sposób następujący:

Przedewszystkiem należy serwatkę mleczną odbiałczyć przez gotowanie i sączenie, lub najlepiej zapomocą t. zw. „Tetraserum II“ (Tetrachlorkohlenstoffessigsäureserum).

Niewielką ilość mleka (10 cm<sup>3</sup>) należy zagotować w probówce, po ostudzeniu dodać 0,5 gr. chloroformu lub tetraserum (czterochlorku węgla), silnie skłócić, zakwasić słabym kwasem octowym, powtórnie skłócić. Białko wypada w postaci białych kłaczek i daje się łatwo odfiltrować przez zwykły sączek.

Otrzymana odbiałczona serwatka służy do wykonania próby biuretowej na obecność peptonu<sup>1)</sup>:

do 3 cm<sup>3</sup> serwatki dodaje się 3–4 krople 1% roztworu siarczanu miedzi, później 1 cm<sup>3</sup> ługu sodowego: zabarwienie różowo-fioletowe.

Według Serkowskiego, na obecność peptonu należy badać produkty spożywcze, które spowodowały zatrucia ludzi (intoksykację), jakoto: mleko, mięso, ryby, konserwy — dalej mleko wogóle, zwłaszcza jeżeli jest przeznaczone dla niemowląt (dobre mleko nie powinno dawać próby peptonowej ani zaraz, ani po 24 godzinach stania w cieplarni w 37) — wreszcie wyosobnione w czystej hodowli bakterje (z ustroju lub z produktów spoż.) w celu stwierdzenia ich własności proteolitycznych.

8. Świecenie (fosforescencja) występuje jako cecha charakterystyczna pewnych gatunków bakterji (*bact. phosphorescens*). Aby się o tem przekonać, hodujemy dane drobnoustroje na żelatynie lub agarze z zwykłym dodatkiem 1% peptonu, 0,5% gliceryny i 3% soli kuchennej, KCl lub KNO<sub>3</sub> (poczem pożywkę zobojętniamy). Do wzrostu bakterji świecących konieczny jest dostęp powietrza. Hodowle należy oglądać w ciemnem pomieszczeniu przez czas dłuższy. Niektóre gatunki fosforyzują tylko w bardzo młodych hodowlach i przez krótki czas.

9. Odporność na działanie światła. Światło działa szkodliwie na wzrost drobnoustrojów, przy-

<sup>1)</sup> Inny sposób: na 50 cm<sup>3</sup> mleka, ogrzanego do 40°, dodaje się 1 cm<sup>3</sup> kwasu octowego (20%), po przesączeniu wysypuje się nadmiar soli kuchennej, zagotowuje i jeszcze raz filtruje, w przesączu wykonywa próbę biuretową lub ninhydrinową.



czem wszystkie części widma słonecznego posiadają własności bakterjobjęcze, a więc wszystkie promienie widzialne z czerwonymi włącznie, jak i promienie niewidzialne — pozafioletkowe i pozaczzerwone; najsilniejsze jednak działanie wywiera światło nierozszczepione.

Aby się o tem przekonać, należy posiać jakiś szybko rosnący drobnoustrój (naprz. las. tyfusu) na dwóch płytkach: jedną z nich owinać czarnym papierem, drugą pozostawić bez opakowania — poczem obydwie wystawić na działanie promieni świetlnych. Po pewnym czasie (kilku godzinach) wstawić do cieplarki. Po 24 godzinach, na płycie w czarnym papierze wzrost będzie bardzo obfity, na płycie nasświetlanej — wzrostu nie będzie wcale lub drobnoustrójów będzie bardzo mało.

10) Odporność na działanie ciepła oraz na wysuszanie. W celu przekonania się o odporności bakterji w stanie wilgotnym na działanie ciepła, wciągamy do rurek włoskowatych (kapilarów) dobrze wyrośnięte płynne (naprz. buljonowe) hodowle, rurki zatapiamy i poddajemy działaniu ciepłoty w kąpeli wodnej lub w parze w ciągu określonego czasu. Następnie rurki obmywamy sublimatem, alkoholem i eterem, i wrzucamy przy pomocy jałowej pincetki do świeżej płynnej pożywki; w próbówce rurki należy roztluc jałową bagietką. Wzrost obserwujemy i sprawdzamy w ciągu kilku dni. Zarodniki znoszą ciepłotę  $60^{\circ}$  w ciągu  $\frac{1}{2}$  godziny i dłużej lub  $100^{\circ}$  w ciągu 10 minut i dłużej.

Można również zwykłe próbówki z hodowlą buljonową poddać ogrzewaniu, pozostawić kilka dni w termostacie przy  $37^{\circ}$ , poczem wysiać na świeżą pożywkę.

Działanie wysokiej ciepłoty na sucho można sprawdzić

na wysuszonych nitkach jedwabnych z hodowlą (przygotowanie patrz niżej — p. 11), które poddajemy działaniu gorącego powietrza, pary i t. d.

11) **Odporność na wysychanie.** Kawałki szkła („perełki“, „granaciki“) lub małe skrawki nici jedwabnych — uprzednio wyjałowionych — oblewamy na płycie Petri'ego hodowlą buljonową, lub zawiesiną hodowli agarowej, poczem wysuszamy (nie zabijając!) przez wstawienie do cieplarki lub w inny sposób. Po pewnym czasie (kilku dniach, tygodniach, miesiącu, roku — zależnie od celu badania) badane kawałki szkła lub nici wrzucamy do pożywki płynnej, aby się przekonać, czy nastąpi wzrost drobnoustrojów.

12) **Odporność na chemiczne środki dezynfekcyjne.** Hamujące działanie środków odkażających można sprawdzić, hodując różne gatunki drobnoustrojów na pożywkach płynnych z dodatkiem odpowiednich środków dezynfekcyjnych. Bakterjobójcze działanie środków odkażających najprościej można sprawdzić przez umieszczenie przedmiotów z wysuszonymi drobnoustrojami w roztworach danego środka odkażającego o rozmaitej sile na przeciąg różnych okresów czasu. Przed wysianiem na pożywkę należy opłukać badany przedmiot w jałowej wodzie lub środku, wiążącym środek dezynfekcyjny (który sam jednak nie działa bakterjobójczo) i dopiero wówczas przenieść na pożywkę zwykłą.

13) **Własności chorobotwórcze drobnoustrojów** sprawdza się przez zastrzykiwanie zwierzęciu (świnie morskiej, królikowi, myszy, szczurowi i t. p.) **zawiesiny drobnoustrojów**, przygotowanej na jałowym fizyo-

logicznym roztworze soli kuchennej. Szczepienie i badanie pośmiertne zwierząt patrz str. 48—53.

Chcąc oznaczyć jadowitość szczepu należy znaleźć t. zw. „dawkę śmiertelną“ (dosis letalis) dla danego zwierzęcia. W tym celu wstrzykujemy zwierzętom coraz większe dawki zawiesiny (naprz. 0,000001 — 0,00001 — 0,0001 — 0,001 cm<sup>3</sup> dla pewnych paciorkowców i t. p.), aż do chwili, gdy jedna z dawek wywoła u jednego ze zwierząt śmierć. Najmniejsza więc dawka, wywołująca śmierć zwierzęcia, nazywa się dawką „śmiertelną“.

14) Właściwości trujące. Trucizny wytwarzane przez drobnoustroje mogą być rozpuszczone w pożywce (t. zw. egzotoksyny) lub zawarte w ciele bakteryjnym (t. zw. endotoksyny). Aby sprawdzić działanie tych pierwszych (naprz. jadu błoniczego, tężca i in.), najlepiej hodowle (płynne) przesączyć (o przesączaniu bakterji patrz str. 20), a przesącz wstrzyknąć zwierzęciu. W razie niemożności sączenia, możemy badaną zawiesinę odwirować, zalać toluolem lub 0,5% fenolem — dla zabezpieczenia przed zakażeniem — poczem część płynu ponad osadem zastrzyknąć zwierzęciu. Aby sprawdzić działanie trucizn drugiego rodzaju (naprz. krwawej biegunki, cholery i in.), należy hodowlę na stałej pożywce zabić parą chloroformu lub toluolu przez zwilżenie jednym z tych płynów wacika probówki; wacik dokładnie zawijamy gumową kapką i probówkę pozostawiamy przez kilka godzin w cieplarni. Następnie po sprawdzeniu, czy hodowla została całkowicie zabita (przeszczepić na świeżą pożywkę — po 24-48 godz. nie powinno być wzrostu), wstrzyknąć zwierzęciu zawiesinę.

O dawkowaniu materiału do szczepień patrz str. 50.



---

## CZEŚĆ DRUGA.

### Zbieranie materiału do badań bakterjologicznych. Naczynia.

Zbieranie materiału do badań bakterjologicznych odbywa się według podanych poniżej wskazówek.

**Krew** w postaci pojedynczych kropeł, otrzymanych po nakłuciu brzuśca palca wypaloną igłą zwykłą lub Francke'go albo nacięciu skalpelem, po uprzednim wymyciu go eterem, bierze się do preparatów mikroskopowych w przypadkach podejrzanych naprz. o zimnicę lub dur powrotny. Kroplę krwi, umieszczoną na dokładnie oczyszczonem (woda, potem alkohol-eter. aa) szkiełka przedmiotowem, dotykamy krawędzią drugiego, pochylonego pod kątem  $45^{\circ}$  czystego szlifowanego szkiełka przedmiotowego lub przykrywkowego tak, aby rozlała się ona wzdłuż tej krawędzi i szybkim ruchem przeciągamy w kierunku kąta rozwartego pochylone szkiełko po szkiełku z kroplą, tworząc w ten sposób preparat mazaany, który po wyschnięciu na powietrzu należy utrwalić i zabarwić.

W większej ilości otrzymuje się krew przez nakłucie żyły. Po silnem opasaniu ramienia gumą lub ręcznikiem, zmywa się okolice łokcia eterem albo wyskokiem lub jodynule i wkłewa się igłę w wyraźnie zaznaczoną

wskutek zastoju środkową lub inną nabrzmiałą żyłę — wypływającą krew zbiera się, stosownie do potrzeby, do różnych naczyń i umieszcza na różnych podłożach (wzgl. miesza z niemi):

a) do posiewu: do probówek z żółcią w ilości 2—3 cm<sup>3</sup> w celu hodowania laseczek z grupy tyfusowej (spotykanych we krwi w przebiegu tyfusu brzuszego zwykle w dwu pierwszych tygodniach choroby), do probówek z rozpuszczonym i ostudzonym do 40—45° agarem w przypadkach t. zw. „zakażenia krwi“ (do kilku probówek dodać po ok. 2 cm<sup>3</sup> krwi, po dokładnem skłóceniu i opaleniu brzegów probówki wylać ich zawartość na płytki Petri'ego); zamiast agaru można użyć buljonu w ilości 250—300 cm<sup>3</sup>, do którego dodaje się 5—10 cm<sup>3</sup> krwi badanej;

b) do badań serologicznych: w celu dokonania aglutynacji (odczyn Widal'a-Gruber'a oraz odczyn Weil-Felix'a). Zbiera się kilka cm<sup>3</sup> krwi do wyjąłowanej probówki, poczem po opaleniu brzegów probówki i zatkanie jej wacikiem, ustawia pochyło w celu otrzymania skośnej płaszczyzny krwi, przez co surowica wydziela się szybciej.

Gdy trudno wziąć większą ilość krwi, można zebrać choćby kilka kropel w małej probóweczce (do aglut. mikroskopowej) z ucha lub z palca w sposób, podany przy braniu krwi do preparatów mazanych; wreszcie można zebrać niewielkie ilości do rurki włoskowatej. Zbieranie krwi do rurek włoskowatych, t. zw. „kapilarów“, odbywa się w ten sposób, że szklaną rurkę o średnicy kilku milimetrów zginamy w kształcie litery U; z jednej strony rurka

jest wyciągnięta w płomieniu i ostry koniec zatopiony, z drugiej zaś — otwarta. Do ranki wzgl. do miejsca nakłucia, przykładamy, po odłamaniu końca, ostre ramię rurki, która, jako włoskowata, wsysa sączącą się krew. Po nabraniu krwi do rurki cienkie ramię zostaje zatopione w płomieniu albo zaklejone woskiem lub lakiem.

Do odczynu z odchyleniem dopełnia-cza (naprz. do odczynu Bordet-Gengou, Wassermann'a) zbieramy 5—10 cm<sup>3</sup> krwi chorego, wziętej tak samo, jak do odczynu zlepienia.

O ile surowicy wziętej do badań serologicznych nie można natychmiast przesłać do zbadania, należy ją umieścić w chłodnym miejscu.

Dla bakterjologicznego zbadania krwi z trupa postępuje się w sposób następujący: po rozcięciu osierdzia (należy przytem unikać nadcięcia ścian serca) wyciąga się przepalonymi szczypcami serce, przypala powierzchnię prawej lub lewej komory na pewnej przestrzeni gazem lub zapalonym wacikiem, zmoczonym w spirytusie lub eterze, poczem wbija się w to miejsce wyjąłowioną strzykawkę („Rekord“, Prawatz, Luer i in.) z igłą; można też użyć wyjąłowionej z wyciągniętym włoskowato końcem rurki szklanej (naprz. podczas brania krwi z serca zwierząt, użytych do doświadczeń); ze strzykawki wlewa się krew do wyjąłowionej próbówki lub do podłoży, pod rurkę szklaną można bezpośrednio podstawić naczynia z pożywkami lub puste wyjąłowione (po opaleniu wolnego końca rurki, wbitej w serce, i brzegów podstawionych naczyń).



**Ropa.** Należy zbierać do jałowego naczynia po aseptycznym przecięciu ropnia lub po nakłuciu go jałową igłą. O ile ma się do rozporządzenia bardzo małą ilość ropy, to chwyta się ją w rurki z wyciągniętym włoskowato końcem (drugi koniec zatkany jest watą); w razie przesyłania materiału rurkę taką wkładamy do jałowej próbówki w ten sposób, iż koniec włoskowaty opiera się o dolny brzeg wacika próbówki, dzięki czemu unika się stłuczenia rurki włoskowatej. Gdy chodzi o wyciek ropny z cewki w przebiegu rzeżączki (*gonorrhoe*), to należy brać nie pierwszy wypływ, a dalszy, najlepiej przepalonym drucikiem odrazu na pożywki. Ropę — zwłaszcza pochodzenia rzeżączkowego — należy siać w najszybszym czasie, gdyż drobnoustroje swoiste, wywołujące cierpienie nader szybko wysychają i giną. O ile ropy jest bardzo mało, należy na miejscu zrobić przynajmniej dwa preparaty mazane do badania mikroskopowego.

**Naloty i wydzieliny z nosa, gardła, jamy nosogardzielowej, ucha, owrzodzeń skóry,** w przypadkach zapalenia gardła (*angina*), błonicy (*diphtheria*), płonicy (*scarlatina*), twardzieli (*rhinoscleroma*). Do zbierania nalotów służą jałowe waciki, umieszczone w wyjałowionych próbówkach w ten sposób, iż wacik, zatykający próbówkę, przytrzymuje pałeczkę lub drucik, na końcu którego przymocowany jest wacik do zebrania nalotu. Nalot z nosa można brać również przepalonymi kleszczykami z małym sterylizowanym wacikiem. Podczas brania nalotu z gardła, gdy dziecko nie chce ust otworzyć, zaciska mu się zlekka nos, wówczas otwiera ono usta mimowoli; naturalnie, brać nalot należy przynaj-

mniej w kilka godzin po płukaniu lub pendzlowaniu środkiem odkażającym. W celu zebrania nalotu z jamy nosogardzielowej przez usta można zapomocą przepalonych szczypczyków zgiąć odpowiednio drut, do którego przymocowany jest wacik, poczem znowu rozgina go się i wkłada, jak zwykle do próbówki. Po zebraniu nalotu wkłada się natychmiast wacik do próbówki i w najszybszym czasie poddaje badaniu. O ile ma się pod ręką odpowiednie podłoża (sur. Loeffler'a, surowicę z agarem) to przeciąga się wacikiem kilka razy po powierzchni podłoża, poczem tym samym wacikiem pociąga się po przepalonym szkiełku przedmiotowym, robiąc w ten sposób preparat mazany z nalotu.

**Kał.** Kał do badania nabiera się wyjąłowaną łyżeczką, przymocowaną do korka jałowego naczynia, przeznaczonego do kału, i szybko wkłada się do naczynia, unikając zawałania brzegów naczynka. Zbytecznym jest napełnianie całego naczynia, wystarczy kilka łyżeczek, wziętych z różnych miejsc danej porcyi, ostatecznie nawet jedna łyżeczka. W przypadkach *durubrzusznego* (*typhus abdominalis*) oraz *krwawej biegunki* (*dysenteria*) należy po spadku ciepłoty przynajmniej dwa razy, z przerwą tygodniową, przesyłać kał w celu zbadania na obecność drobnoustrojów swoistych (by przekonać się, czy nie mamy do czynienia z „nosicielem“ zarazków). W przypadkach, podejrzanych o krwawą biegunkę należy nadsyłać kał możliwie najszybciej.

**Mocz.** Do badania bakterjologicznego należy wypuszczony cewnikiem mocz zebrać do naczynia wyjąłowanego;

w razie niemożności założenia cewnika zmywa się watą, zmoczoną w wodzie, otwór cewki, poczem zbiera się druga porcję (t. zn., gdy część moczu w strumieniu spłynęła) do wyjałowionego naczynia.

W celu zbadania moczu z trupa obnaża się pęcherz moczowy, opala ściany i po przekłuciu ściany w tem miejscu nabiera się wyjałowioną strzykawką kilka  $\text{cm}^3$  moczu.

W przypadkach, podejrzanych o gruźlicę nerek, lepiej jest — w celu ustalenia umiejscowienia cierpienia — brać z każdej nerki mocz oddzielnie, najlepiej przez cewnik, zwłaszcza do badania moczu kobiecego (zanieczyszczenia z pochwy).

**Plwociny.** Do preparatów drobnowidzowych (naprz. w celu zbadania na obecność laseczników gruźliczych) można nadesłać plwociny w jakimkolwiek bądź czysto wymytem naczyniu, najlepiej sputa ranne, bez dodatku wody i bez antyseptyków. Do posiewów i szczepień zwierzętom należy brać naczynia jałowe; w przebiegu włóknikowego zapalenia płuc (*pneumonia crouposa*) w celu otrzymania dwoinek swoistych należy brać wyjałowione próżne płytki Petri'ego: po silnem zakasłaniu chory spluwa do płytki, którą natychmiast przykrywa się pokrywką, zawija szczelnie w papier i przesyła do zbadania.

**Płyn mózgowo-rdzeniowy**, otrzymany przy pomocy nakłucia lędźwiowego (igłą Krönig'a), zbiera się do naczynia jałowego.

W przypadkach, podejrzanych o zapalenie opon mózgowych na tle gruźliczem, a kończących się zejściem, należy w parę godzin po zgonie wziąć trochę



płyну mózgowo-rdzeniowego jałową strzykawką (otrzymuje się płyn mętny, choć za życia wydobyto płyn przezroczysty) — w płynie tym znajdujemy wiele ciałek ropnych oraz liczne laseczniki gruzlicze.

**Prześcięki lub wyścięki** do badania bakterjologicznego otrzymuje się przez nakłucie wyjałowioną strzykawką lub trójgrańcem (po odkażeniu skóry jodyną, eterem i t. p.) i zbiera do jałowego naczynia.

**Włosy, łuski skóry** do badania (w przebiegu parcha — *favus*, liszaja — *trichophytia* i in.) wrywa się lub zbiera szczypczykami, umieszcza się na wyjałowionem (dobrze przepalonym) szkiełku przedmiotowym, przykrywa drugim (również przepalonym) szkiełkiem przedmiotowym i przewiązuje nitką; takie dwa preparaty należy przesłać do pracowni.

**Materjał na zbadanie krętka kiły** (*spirochaete pallida*, w świeżych stwardnieniach kiłowych) zbiera się w ten sposób, że miejsce owrzodzone zmywa się starannie fizjologicznym roztworem soli, poczem przepalonym platynowym lub zwyczajnym drucikiem (ostatecznie rozkiem przepalonego szkiełka przedmiotowego) drażni się owrzodzenie, dopóki z głębi nie ukaże się trochę surowicy; surowicę tę umieszcza się na szkiełku przedmiotowym (unikać przytem należy domieszki krwi) i lekko rozmazuje się na niem. Dobrze jest też dodać dziesięciokrotnie rozcieńczonego tuszu (bez osadu) do kropelki wydobytej surowicy, skłócić drucikiem i rozpostrzeć w postaci preparatu rozmazanego na szkiełku przykrywkowym, poczem wysuszyć na powietrzu.

Na ogół wykonywują się w pracowniach bakterjologicznych zwykle odczyny, odpowiadające następującym cierpieniom:

## Choroba:

- Actinomycosis* (promienica).  
*Angina* (angina).  
*Cholera asiatica* (cholera azjatycka).  
*Diphtheria* (błonica).  
  
*Dysenteria* (krwawa biegunka).  
*Favus* (parch).  
*Gonorrhoe* (rzeżączka).  
*Malaria* (zimnica).  
  
*Malleus* (nosacizna).  
*Meningitis cerebrospinalis epidemica*  
 (nagminne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych) *mening. tuberculosa* — patrz gruźlica.  
*Oedema malignum* (obrzęk złośliwy).  
*Paratyphus A i B* (dury rzekome A i B).  
*Pneumonia crouposa* (zapalenie włóknikowe płuc).  
*Rhinoscleroma* (twardziel).  
*Scarlatina* (płonica).  
*Sepsis* (zakażenie krwi).  
*Syphilis* (kiła).  
  
*Tetanus* (tężec).  
*Trichophytia* (liszaj wyłysiający).  
*Tuberculosis pulmonum* (gruźlica płuc).  
*Tuberculosis renum* (gruźlica nerek).  
 „        *ossium* ( „        kości).

## Przedmioty badania:

- ropa.  
 naloty z gardła.  
 kał, zawartość jelit (od zmarłego).  
 naloty z gardła, nosa, ucha, owrzodzeń skóry.  
 krew (aglut), kał (posiew).  
 włosy, scutula.  
 ropa z cewki, moczu.  
 krew (preparaty świeże, t. zw. „gruba kropla“ oraz mazane).  
 surowica i wydzielina.  
 płyn mózgowo-rdzeniowy, wydzielina z jamy noso-gardzielowej (od otoczenia).  
  
 wydzielina z obrzęku.  
 krew (posiew, aglut), kał i moczu (posiew).  
 płwocina (zebrana jałowo).  
  
 owrzodzenie  
 naloty z gardła.  
 krew (posiew).  
 wydzielina i owrzodzenia (preparat mikroskopowy), krew (na odczyn Wassermann'a).  
 ropa.  
 włosy, łuski skóry.  
 płwocina (zebrana nie jałowo).  
 moczu.  
 ropa (z zimnych ropni).

Choroba:	Przedmioty badania:
<i>Tuberculosis — meningitis tbc</i> (gruźlicze zapalenie opon mózgowych).	płyn mózgowo-rdzeniowy za życia i po śmierci.
<i>Typhus abdominalis</i> (dur brzuszny).	krw (posiew, aglutynacja), kał (posiew), mocz (posiew).
<i>Typhus recurrens</i> (dur powrotny).	krw (preparaty mazane).

Do badań tych potrzebne są następujące przedmioty:

Szkło: Szkiełka przedmiotowe i przykrywkowe.

Probówki duże i małe (do ropy, do małych ilości surowic itp.).

Płytki Petri'ego.

Naczynia z łopatkami do kału.

Naczynia bez łopatek do moczu.

Waciki do nalotu.

Rurki włoskowate.

Podłoża: Agar, buljon, surowica Loeffler'a, żółć.

Drucik.

## Technika badań bakterjologicznych w chorobach zakaźnych.

### Badanie krwi.

Krew u osobników zdrowych jest jałowa; w wielu cierpieniach natury ogólnej drobnoustroje, wywołujące zakażenie, krążą we krwi.

Do drobnoustrojów, najczęściej spotykanych we krwi, należą laseczniki z grupy okrężnicy, oraz — w t. zw. „zakażeniu krwi“ (sepsis) — gronkowce i paciorkowce, następnie dwoinki (pneumo- i gonokoki), pałeczki Friedländer'a, w wyjątkowych razach laseczki ropy błękitnej (bac.



pyocyaneus). Hoduje się też czasem we krwi swoiste laseczniki w przebiegu gruźlicy, dżumy i wąglika.

Krew, badaną na obecność laseczek z grupy okrężnicy, wlewamy bezpośrednio (aby nie skrzepła!) od chorego w ilości kilku  $\text{cm}^3$  do probówek z zawartością 4–5  $\text{cm}^3$  wyjałowionej żółci. Żółć jest doskonałym podłożem dla laseczników z grupy coli, rozmnażają się one tam bardzo obficie, to też metodę tę nazywamy „sposobem wzbogacania“ („Anreicherungsverfahren“). Conrad i Zaleca dodawanie do świeżej żółci wołowej 10% peptonu i 10% gliceryny. W braku żółci można też krew wpuszczać do kolbki z zawartością około 200  $\text{cm}^3$  buljonu zwykłego; wzrost jednak po 24 godzinach jest mniej obfity, niż w żółci. Krew wysiewamy na płytkach z pożywką Conrad-Drygalskiego lub Endo, po raz pierwszy po 24 godzinach stania krwi w cieplarni (37°), po raz drugi — po 48 godzinach. W razie dodatniego wyniku posiewu, dokonywamy próbnej aglutynacji ze szczepem wprost z płytki (po sprawdzeniu morfologii w preparacie barwionym i ruchu w „kropli wiszącej“), lecz niezależnie od wyniku tej próbnej aglutynacji, szczep utożsamiamy biologicznie na zasadzie „sprawdzianu“ oraz wtórnej, z czystym szczepem dokonanej aglutynacji.

Pod „sprawdzianem“ pojmujemy zachowanie się drobnoustroju w szeregu pożywek specjalnych w stosunku do zachowania się jakiegoś drobnoustroju dobrze nam znanego: lasecznik okrężnicy rośnie w pożywkach tych w sposób prawie zawsze stały, a każdy z drobnoustrojów chorobotwórczych z tej grupy (laseczka duru, durów rzek., krwawej bie-

gunki) daje również mniej więcej stałe odchylenia od własności biologicznych lasecznika okrężnicy. Zwykle sprawdzamy własności wyhodowanego lasecznika na następujących podłożach: agarze zwykłym, buljonie zwykłym, agarze cukrowym, agarze z czerwienią obojętną, serwatce lakmusowej, oraz na pożywkach Barsiekow'a (z różnymi cukrami).

O własnościach biologicznych laseczników grupy okrężnicy patrz badanie kału.

Zamiast wysiewania z pożywki żółciowej na płytki z pożywką Endo lub C.-Dryg. można stosować metodę Koenigsfeld'a, który zaleca do szerokiej probówki ze skośną pożywką Endo lub Contr.-Drygalskiego nalać 1,5–2 cm<sup>3</sup> żółci i do takiej probówki bezpośrednio wlać krew badaną. Pochylając probówkę należy płynem zwilżyć całą powierzchnię pożywki; czynność tę trzeba powtórzyć kilka razy w ciągu doby.

Krew od chorych na posocznicę (*sepsis*) wpuścimy do kolbki z buljonem lub do probówki z rozpuszczonym agarem (o zbieraniu krwi patrz str. 88) i wstawiamy na 24 wzgl. na 48 godzin do cieplarki. Wyrosłe kolonje badamy makroskopowo, robimy z nich preparaty barwione i przeszczepiamy na różne pożywki, oraz w razie potrzeby szczepimy zwierzętom.

Spotykane w przypadkach zakażenia krwi paciorkowce (*streptococci*) otrzymały swą nazwę od swoistego występowania w łańcuskach (zwłaszcza w pożywkach płynnych!), złożonych z kilku, kilkunastu lub nawet więcej osobników. Paciorkowce barwią się metodą Gram'a (Gr. +); na agarze rosną w postaci małych przezroczystych kolonji; w buljonie dają osad bez zmętnienia środowiska, przy wstrząsaniu osad ten unosi się w postaci obłoczka; żelatyny nie rozrzedzają lub dopiero po dłuższym czasie.

Dla zwierząt (królików, myszy, świnek morskich) paciorkowce mogą być chorobotwórcze, ale zjadliwość szczepu dla zwierząt nie stoi w żadnym związku ze zjadliwością dla człowieka (szczep zabójczy dla człowieka może być zupełnie nieszkodliwy dla zwierzęcia). Paciorkowce najczęściej spotykamy podczas r ó ż y (*erysipelas*) i powikłań w czasie tej choroby (zakażenie ogólne) oraz w gorączce popołożowej. Odróżniamy: *streptococcus pyogenes et erysipelatos* (na podłożach z krwią dają delikatne kolonie otoczone jasną obwódką, spowodowaną hemolizą krwi), *streptococcus mitis s. viridans* (zielonkawe drobniuchne kolonie, zwykle bez obwódki), wreszcie *streptococcus mucosus* (kolonie wyraźnie śluzowate) — ostatni dla zwierząt chorobotwórczy<sup>1)</sup>.

Gronkowce (*staphylococci*) otrzymały swą nazwę od układania się w zbite masy, przypominające grona. Barwią się metodą Gram'a (Gr. +); na agarze tworzą duże, tłuste kolonie. Gronkowiec wytwarzający na pożywkach barwnik żółty otrzymał nazwę gronkowca z ł o c i s t e g o (*staphylococcus aureus*), gronkowiec nie wytwarzający barwnika — gronkowca białego (*staphylococcus albus*). Gronkowce dają w buljonie męt jednolity, często też tworzą delikatną błonkę na powierzchni, żelatynę rozrzedzają; niektóre gatunki chorobotwórcze (np. *staphyloc. pyogenes*) na pożywkach z krwią rozpuszczają („hemolizują“) otaczając kolonję krwinki (przez co tworzy

<sup>1)</sup> Klasyfikacja paciorkowców wedł. Leschke'go: 1) *Streptococcus vulgaris haemolyticus* (= *streptoc. pyogenes longus s. erysipelatis*; 2) *Streptococcus viridans s. mitior*; 3) *Streptoc. intestinalis anhaemolyticus*; 4) *Strept. herbidus*; 5) *Strept. anaerobius*; 6) *Strept. mucosus*.



się jaśniejsza obwódka dookoła kolonji). Gronkowce spotykają się w ropniach, czyrakach, zwykle znajdują się na skórze normalnej; rzadko wywołują zakażenie ogólne.

Dwoinki Fränkel'a (*pneumococci*) patrz str. 140. Lasecznik Friedländer'a (*pneumobacillus* Fr. patrz str. 141.

Dwoinki Neisser'a (*gonococci*) patrz str. 107. Lasecznik gruźlicy (*bac. tuberculosis*) patrz str. 128.

Las. wąglika (*bac. anthracis*) patrz str. 108. Lasecznik dżumy (*bac. pestis*) patrz. str. 145.

We krwi myszy wywołuje posocznicę, od której zwierzęta giną, lasecznik (*bac. murisepticus*) bardzo drobny, nieruchomy, Gr. +, warunkowo beztlenowy. Buljon lekko mąci, błonki nie wytwarza, na agarze rośnie delikatnie, przezroczyście, w żelatynie rośnie bardzo swoiście (delikatne gałązki od linii ukłucia, przechodzące czasem w delikatne męty mgliste, zawieszane w pożywce w warstwach jedna nad drugą), mleka nie strąca, na kartoflu nie rośnie.

Bardzo zbliżony do lasecznika posocznicy mysiej, a może nawet identyczny, lecz przystosowany do innego gospodarza, jest drobnoustrój wywołujący czerwonkę (różę) świń (*bac. erysipelatosuum*), występującą epizootycznie, zwłaszcza wśród rasowych i młodych osobników.

We krwi osobników chorych na dur powrotny, w okresie gorączkowym, a niekiedy i w międzygorączkowym — znaleźć można krętki Obermeier'a (spirochaete Oberm. seu typhi recurrentis, wykryte w 1868 r.). Są to twory długości od 10—30  $\mu$ , grubości około 1  $\mu$ , w postaci

długiej niteczki spiralnej o licznych skrętach (do 10 i więcej), obdarzone żywym ruchem obrotowym i postępowym. Ruch ten postrzegać można w „kropli wiszącej” ze świeżej krwi zwłaszcza na ciemnym tle; we krwi zebranej jałowo ruch ten postrzegać można czas jakiś (do 2 tyg. w ciepłocie pokojowej). Na preparatach niebarwionych krętki najlepiej widoczne są przy stosowaniu metody Burri'ego.

Preparaty do barwienia najlepiej utrwać alkoholem absolutnym + eter siarczany  $\overline{aa}$  w ciągu 10 minut lub alkoholem metylowym w ciągu 2—3 minut, poczem barwić Giemsa'ą (patrz str. 76); podręcznie dobre wyniki daje metoda Manson'a. Krętki te zachowują się względem metody Gram'a ujemnie. Na preparatach barwionych krętki leżą bądź pojedynczo, bądź też w skupieniach (warkoczykach, kłębkach).

Krętki duru powrotnego hoduje się (z trudnością!) beztlenowo wedł. Noguschi'ego w wysokiej warstwie w płynie puchlinonowym z jamy brzusznej, do którego dodano kawałek świeżej jałowej nerki królika. Zalecają też surowicę zwierzęcą (królika, barana), pokrytą warstwą jałowej parafiny.

Ze zwierząt, używanych do doświadczeń, najwrażliwsze są małpy (wążkonose), dalej szczury i myszy.

Do rzędu krętków chorobotwórczych zalicza się krętek bładny (*spirochaete pallida* seu *treponema pallidum*) i krętek żółtaczkowy zakaźny (choroby Weil'a). O krętku bladym patrz str. 125.

Krętka żółtaczkowa zakaźna (*spirochaete ictero-haemorrhagica s. nodosa*), wywołującego chorobę Weil'a, (icterus infectiosus), znaleźć można we krwi, śledzionie,

trzustce i t. d., a zwłaszcza obficie w wątrobie świnek morskich, którym wstrzyknięto dożylnie lub doosierdziowo 0,5—2,0 cm<sup>3</sup> krwi od człowieka, chorego na żółtaczkę w pierwszych dniach choroby.

Świnki podlegają cierpieniu na 4—5-ty dzień, mają podniesioną ciepłotę, chudną; na skórze i na spojówkach występują krwawe wylewy oraz wyraźna żółtaczka; włosy wypadają. Tak samo wrażliwe są młode króliki.

Krętki te zostały wykryte w okresie wojny europejskiej w Japonii przez Inada, Ido, Hoki, Kaneko i Ito (1915), w Europie jednocześnie przez Huebener'a i Reiter'a oraz Uhlenhuth'a i Fromme'go (1916).

Na preparatach ze krwi u ludzi chorych znaleźć krętki trudno; w dużej ilości znajduje się je na preparatach mazy, barwionych Giemsa'ą z wątroby świnek, lub na skrawkach z wątroby, barwionych metodą Levaditi'ego.

Są to delikatne twory o zmiennej ilości skrętów, posiadające na końcach, a niekiedy i pośrodku zgrubienia w kształcie guziczków (stąd nazwa *spiroch. nodosa*).

Do czystej hodowli nadaje się, według Ungermann'a, rozcieńczona fizjologicznym roztworem soli surowica świnek morskich lub królików (1 : 5), pokryta warstwą parafiny (hodowla beztlenowa).

U osobników chorych na zimnicę (malarję) znaleźć można we krwi podczas napadu, a także w okresach międzynaпадowych, formy rozwojowe pierwotniaka — pasorzyta zimnicy (Laveran, 1880). Istnieją trzy różne postaci pasorzytów zimnicy: 1) *plasmodium vivax* (Grassi), którego cykl rozwojowy we krwi chorego trwa



2 × 24 godz., a więc napady gorączki występują co trzeci dzień (trzeciaczka — febris tertiana), 2) *plasmodium malariae* (Marchiafava i Celli), którego cykl rozwojowy trwa 3 × 24 godz., a więc napady gorączki występują co czwarty dzień (czwartaczka — febris quartana), wreszcie 3) *plasmodium immaculatum* (Grassi), postać zwrotnikowa, gdzie okres międzynaapadowy trwać może niekiedy zaledwie kilka godzin, a okres podniesionej ciepłoty — 20-30 godzin.

U człowieka napady zostają wywoływane przez postaci bezpłciowe, t. zw. schizonty, które wdrążając się w czerwone ciała krwi, przyjmują kształt pierścienia, rosną w nich, tworzą postać dojrzałą, poczem rozpadają się na kilka lub kilkanaście drobnych ciałek (merozoitów), które znów wdrążają się w czerwone ciała krwi, i t. d.

Obok tych bezpłciowych postaci, spotykają się też formy płciowe, t. zw. gamety: większe — żeńskie (makrogamety) i mniejsze — męskie (mikrogamety). Nie kopulują (nie zlewają się) one w ustroju ludzkim; przez długi czas mogą przebywać w nim skrycie, a według niektórych autorów, mikrogamety mogą ginąć w ustroju ludzkim, makrogamety zaś rozpadają się na elementy bezpłciowe i wywołują nawroty choroby. Kopulują zaś formy płciowe w ciele pewnego gatunku komara, widlisza (anopheles); jest on „gospodarzem“ pasorzyta zimnicy.

Bada się zwykle pasorzyty zimnicy na preparatach mazy z krwi od osób chorych (rzadziej z narządów — śledziony). Utrwalanie preparatu: 2—3 minut alkohol metylowy lub 10 minut eter siarczany + alkohol absol. aa. Barwić barwnikiem Giemsa'y 20 minut lub Manson'a

30 sekund (o barwieniu patrz str. 76—77). Gdy pasorzytów jest niewiele, należy badać krew w „grubej kropli“. W tym celu nieutraloną dużą spłaszczoną wyschniętą kroplę krwi średnicy 1 cm pokrywa się rozcieńczonym barwnikiem Giemsa'y (1 kropla barwnika na 1 cm<sup>3</sup> wody przekroplonej); po 2—3 minutach następuje hemoliza krwinek czerwonych (żółty obłoczek); preparat opłukuje się świeżym roztworem Giemsa'y, barwi się 30—45 minut, opłukuje i suszy preparat.

Na preparatach barwionych odczynnikiem Giemsa'y pierścienie leżą wewnątrz czerwonych ciałek. Jedna strona pierścienia posiada jakby zgrubienie, zabarwiona jest na kolor niebieski, przeciwna strona posiada na czerwono lub fioletowo barwiące się ciało chromatynowe. Postaci dorosłe zajmują całe ciało czerwone; są to twory o kształcie nieprawidłowej, zabarwione na niebiesko, zawierające ziarenka barwnika brunatnego.

W przypadkach zimnicy trzeciaczkowej erytrocyty z dorosłymi pasorzytami są większe od zdrowych erytrocytów, a wewnątrz erytrocytu, o ile pasorzyt nie zajmuje całego ciała — widać drobniutkie karminowe nakropienia (t. zw. ziarnistość Schüffner'a); w czwartaczce erytrocyty nie są powiększone, pasorzyty mają wygląd wstążeczki przecinającej ciało. Wreszcie rozpad postaci dorosłej w trzeciaczce następuje na 15—20 lub więcej niebieskawych ciałek, z których każde posiada czerwone jąderko, w czwartaczce na 6—12 ciałek, ułożonych zwykle w rozetkę.

Dla postaci podzwrotnikowej swoiste są gamety w formie półksiężyców: pośrodku gromadzi się barwnik, bieguny są silnie zabarwione.

Na preparatach barwionych metodą Manson'a pierścienie, jak również postaci dorosłe, odcinają się swem niebieskim zabarwieniem od jasnozielonego erytrocytu; pigment pasorzyta występuje w postaci czarnych drobnych złogów.

Pasorzyta bardzo zbliżonego do pasorzyta zimnicy znaleziono między innymi we krwi małp (*Plasmodium pitheci*).

Co się tyczy hodowli in vitro, to udało się jedynie podtrzymywać życie pierwotniaków tych w próbówce. Jeśli do krwi, choćby z nielicznymi pasorzytami dodać cytrynianu sodu (lub ją inaczej odwłóknąć), następnie ogrzać  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  godziny w  $40^{\circ}$ , to w warunkach beztlenowych, w cieplarni (przy  $37^{\circ}$ ) przez pewien czas utrzymują się przy życiu.

Przy barwieniu metodą Giemsa'y narządów na obecność pasorzytów zimnicy postępujemy w sposób następujący: małe kawałki narządu (nie większe nad 5 mm.) należy utrzymywać przez 48 godzin w sublimacie alkoholowym (2 : 1), po 24 godzinach zmieniając ciecz, następnie zatopić w parafinie i pokrajać. Skrawki przeprowadzone przez ksylol, wysoki i wodę umieścić:

1) na 10 min. w mieszaninie złożonej z 2 gr. kali jodatu i 3 cm<sup>3</sup> płynu Lugola na 100 cm<sup>2</sup> wody przekrojonej, poczem przemyć wodą,

2) na 10 min. w 0,5% wodnym roztworze Natr. tiosulphur., poczem 5 min. opłukiwać wodą wodociągową, krótko wodą przekrojoną,

3) barwić barwnikiem Giemsa'y 2—12 godz. (1 kr. barwnika na 2 cm<sup>3</sup> wody — o ile barwimy dłużej); płyn zmieniać co czas pewien,

4) opłukać w wodzie przekrojonej, poczem prze-



prowadzić poprzez aceton 95 + ksylol 5, aceton 70 + ksyl. 30, ksylol, balsam kanadyjski (obojętny).

U zwierząt znajdujemy we krwi pierwotniaki, świdrowce (trypanosomy), a więc we krwi szczerów szarych *trypanosoma lewisi* (Kent 1882), we krwi koni, bydła i t. d. *trypanosoma brucei* i in. U ludzi t. zw. *trypanosoma gambiense* wywołuje cierpienie zwane śpiączką. Pozatem we krwi sów znajdujemy wiciowca *haemoproteus noctuae*, u psów t. zw. *piroplazmy* (*babesia*).

Pasorzyty te bada się w preparatach mazanych ze krwi osobników chorych; preparaty, które wyschły na powietrzu utrwala się (alkohol metylowy 2–3 minut, lub alkohol abs. + aether sulphur. aa 10 minut) i barwi Giemsa'a.

Do badania szczegółów cytologicznych utrwala się preparaty jeszcze wilgotne sublimatem wyskokowym lub cieczą Hermann'a<sup>1)</sup>.

Niektóre z tych pierwotniaków (*trypanosoma lewisi*, *haemoproteus noctuae*) można hodować w wodzie kondensacyjnej z agaru z odwłóknioną krwią króliczą (w równych częściach). Do przeszczepienia bierze się krew z serca od zachloformowanego szczura lub sowy, miesza się z niewielką ilością fizjol. roztworu soli, poczem 3 uszka lub 3 krople krwi wprowadza się jałową pipetką do pożywki. Po 3 dniach występują w hodowlach rozetki wiciowców, które szybko się rozmnażają. Hodowle utrzymują się przy życiu około miesiąca.

**Badanie ropy.** W ropy wrzodów powierzchownych naprz. czyraków, prawie zawsze spotykamy gronkowce

<sup>1)</sup> Skład cieczy Hermann'a: 1<sup>o</sup>/<sub>o</sub> chlorku platyny 75 cm<sup>3</sup>, 2<sup>o</sup>/<sub>o</sub> kwasu osmowego 4 cm<sup>3</sup>, kwasu octowego lod. 1 cm<sup>3</sup>.

(gronkowiec złocisty), w owrzodzeniach i ropowicach (phlegmonach) znajdują się niekiedy także paciorkowce lub inne drobnoustroje ropotwórcze (pneumokoki, laseczniki z grupy okrężnicy i inne). W dużych ropniach drobnoustroje znajdują się często tylko na obwodzie wrzodu, a nie w ropie wziętej z głębi. W ropniach t. zw. „zimnych“ laseczników swoistych (gruźlicy) nie znajdujemy; dla stwierdzenia istoty cierpienia szczepimy ropę świnkom.

O własnościach biologicznych gronkowców i paciorkowców patrz str. 97—98.

Zielonawe zabarwienie ropy zależne jest, po większej części, od obecności w niej drobnoustrojów, wytwarzającego zielony barwnik — laseczniki ropy błękitnej (*bac. pyocyaneus*).

Lasecznik ropy błękitnej (*bac. pyocyaneus* Gessard, 1882) jest długości 4—6  $\mu$ , silnie ruchomy, nie barwi się metodą Gram'a (Gr. —), w buljonie daje błonkę oraz męt z zielonym odcieniem w górnej warstwie pożywki, agar barwi na zielono; na pożywce Endo rośnie zwykle fioletowo. Lasecznik ropy błękitnej wytwarza barwnik pyocyaninę — ciemnozieloną, rozpuszczalną w chloroformie — oraz drugi barwnik zielono fosforyzujący, rozpuszczalny w wodzie. Pyocyanina powstaje z początku jako barwnik biały (beztlenowe hodowle są bezbarwne) i dopiero w zetknięciu z tlenem, a więc na powierzchni pożywki stałej lub przy wstrząsaniu hodowli buljonowej nabiera zabarwienia zielonego. Po dłuższym czasie zielone zabarwienie hodowli znika, a na jego miejsce występuje brunatny barwnik (pyoksantoza). Mleko pod dzia-

łaniem łasecznika ropy błękitnej zostaje strącone i nabiera barwy zielonej. Łasecznik jest przeważnie chorobotwórczy dla świnek, mniej dla królików i myszy.

W ropie z cewki moczowej, w przebiegu rzeżączki, zwłaszcza w przypadkach ostrych, znajdujemy liczne dwójki Neisser'a (gonokoki, *gonococci*, 1879 r.). Dwójki te (długości około 1,6  $\mu$ , szerokości około 0,8  $\mu$ ) są zawsze Gram —, w barwieniu metodą Pick'a barwią się na kolor granatowy, w barwieniu błękitem met. Loeffler'a — na kolor ciemno-niebieski. Gonokoki leżą przeważnie wewnątrz wielojądrowych białych ciałek krwi (wewnątrzkomórkowo) po kilka lub kilkanaście w jednym ciałku, mają postać nerek lub ziaren kawy. W świeżych przypadkach rzeżączki, gdy w wydzielinie niema jeszcze ciałek ropnych, gonokoki układają się zarówno na nabłonkach, jak również wewnątrz komórek w pasmach śluzu; również i w późnych okresach leżą one na nitkach śluzu zewnątrzkomórkowo. Gonokoki są bardzo mało odporne na warunki zewnętrzne, zwłaszcza na wysychanie i giną już nieraz po paru godzinach nawet w pokojowej ciepłocie (w temperaturze wyższej, około 45°, — jeszcze szybciej), przeto hodować je należy bezpośrednio po wzięciu materiału uszkiem platynowym z cewki na pożywkach, zawierających nieścięte białko, a więc na agarze z krwią lub na agarze z płynem z jamy brzusznej lub też na buljonie z temi samymi dodatkami. Na pożywkach stałych kolonie gonokoków są drobne, delikatne, przezroczysto-szare z żółtym odcieniem. Hodować gonokoki jest trudno, zwłaszcza w pierwszym pokoleniu; otrzymane hodowle należy prze-



szczepiać co dni parę i przechowywać w ciemności. Dla zwierząt nie są chorobotwórcze.

W ropotokach usznych, owrzodzeniach skóry i t. p. często znajdujemy laseczniki błonicy (*bac. diptheriae*); o własnościach biologicznych las. błonicy patrz str. 117.

W wydzielinach pęcherza i gruczołu krokowego spotykamy czasem laseczniki ziarniste gnilne (*granulobacillus putrificus*), opisane przez Serkowskiego; o własnościach biologicznych tego prątka patrz str. 124.

W przypadkach węglik a (*anthrax*) hoduje się z wydzieliny wrzodów prątki swoiste. Laseczniki węglika (długości 5—10  $\mu$ ), rosną w dostępie powietrza na wszelkich pożywkach, układając się w starszych, niż 24 godz. hodowlach w długie nici, przyczem pomiędzy dwiema sąsiednimi prątkami jest przerwa; nić składa się z członów zgrubiałych na końcach (postać „bambusowa“).

Laseczniki węglika są całkowicie pozbawione ruchu; barwią się metodą Gram'a (Gr. +). W ustroju zwierzęcia oraz na płynnej surowicy lasecznik węglika wytwarza otoczkę, którą można uwidocznic zapomocą specjalnej metody barwienia. W starszych hodowlach, zarówno jak i w warunkach beztlenowych, oraz w ciepłocie powyżej 18° lasecznik węglika tworzy zarodniki (o barwieniu zarodników patrz str. 72). Na agarze lasecznik węglika tworzy kolonie powierzchniowe o zabarwieniu szaro-białem, o nieprawidłowych zarysach; pod słabem powiększeniem brzeg kolonji przedstawia się bardzo swoicie: składa się on z licznych falistych nici, tworzących jak gdyby grzywę wokół kolonji. W buljonie tworzy męt w postaci osadu, żelatynę szybko rozrzedza, przyczem w pożywce „wysoc-

kiej“ od linii ukłucia bieżą delikatne włoski. Do celów rozpoznawczych posługujemy się zwykle szczepieniem zwierząt (białych myszy i świnek morskich), gdyż jedynie na samym początku cierpienia w materiale badanym (wydzielinie z czarnej krosty — pustula maligna) bezpośrednio badanie mikroskopowe pozwala na wykrycie drobnoustrojów swoistych. Po szczepieniu podskórnem zwierzęta giną w ciągu 1—3 dni. Badanie pośmiertne wykazuje znaczne powiększenie śledziony i obecność laseczników we włoskowatych naczyniach krwionośnych wszystkich narządów (szczególnie wątroby i śledziony). W razie wątpliwości możemy stosować odczyn Ascoli'ego (patrz str. 110). Zarodniki prątków wąglika są bardzo odporne na środki bakterjobójcze, przeto są często używane (na nitkach jedwabnych, kawałkach szkła — „granacikach“) do sprawdzania różnych metod dezynfekcyjnych. Wytrzymują 2—3 minutowe działanie ciepłoty 100 ; ostrożność przy badaniu!

W licznych ropniach w mięśniach i na skórze, występujących w przebiegu nosacizny znaleźć można niekiedy drobnoustroj swoisty (*bac. mallei* G e s s a r d, 1882), zwykle jednak do stwierdzenia istoty cierpienia, posługujemy się szczepieniem materiału zwierzętom (świnkom morskim). Laseczniki nosacizny są małe (3—4  $\mu$ ), cienkie, niekiedy cokolwiek zagięte, Gr. —, w barwieniu metodą Loeffler'a nie barwią się jednolicie, lecz wykazują ziarnistość (jak w las. błonicy lub gruźlicy), leżą zwykle pojedynczo. Najlepiej hodować laseczniki nosacizny w dostępie tlenu na pożywkach o odczynie obojętnym. Kolonie wyglądają na surowicy Loeffler'a jak drobne przezroczyste kropelki, na agarze zaś są białe i błyszczące; na kartoflu lasecznik

nosaczyny rośnie w postaci żółtawego nalotu, który po pewnym czasie ciemnieje i staje się czerwonawo-brunatnym.

Dla ustalenia rozpoznania należy — jak powiedziano wyżej — wstrzyknąć ropę chorych zwierząt lub ludzi zwierzętom (świnkom morskim, samcom) podskórnie lub do otrzewnowo. Po 2—3 dniach obrzęk jądra zwierzęcia (t. zw. objaw Straus'a) dowodzi, że mamy do czynienia prawdopodobnie z zakażeniem swoistym, po 14 dniach świnka pada, a w wewnętrznych narządach (wątrobie, śledzionie, płucach) znajdujemy guzki, z których można wyhodować laseczniki swoiste. Surowica osobników chorych aglutynuje laseczniki te w rozcieńczeniu 1 : 1000 i wyżej. Nie jest to aglutynacja w ścisłym tego słowa znaczeniu, lecz raczej zjawisko precypitacji — strącania — (używamy tu nie całych drobnoustrojów, lecz ułamków bakteryjnych, jak w aglutynacji gruzliczej), dla którego zachowano nazwę aglutynacji. Precypitację stosujemy też jako odczyn Ascoli'ego, polegający na tem, że surowicę osobnika, podejrzanego o nosaciznę, nawarstwia się w małej probówce specjalnym antygenem, malleiną — (naprz. malleinum siccum Toth 0,025 w 10 cm<sup>3</sup> NaCl) — w miejscu, zetknięcia się surowicy z malleiną występuje po 2 godz. przy 37° mętny pas wysokości 1—1,5 mm. tylko wówczas, gdy surowica pochodzi od osobnika chorego na nosaciznę. W celach rozpoznawczych stosuje się również wstrzykiwanie podskórne wyciągu ze zmiażdżonych prątków nosaczyny, wspomnianej już powyżej malleiny, przygotowanej podobnie jak tuberkulina (szczegóły patrz podręczniki specjalne).

Oprócz wyżej wymienionych drobnoustrojów, spotykamy w ropie jeszcze grupę beztlenowców. Do nich zali-



czamy w pierwszym rzędzie laseczniki tężca i obrzęku żółtliwego.

Lasecznik tężca (*bac. tetani* Nicolaier, 1884, Kitasato, 1885) wyhodować można z ropy lub wydzieliny z miejsca zakażonego (z rany) w przebiegu choroby, zwanej tężcem; udaje się to zwykle rzadko i dopiero zakażenie świńek morskich, królików lub myszy (skurcze mięśni w bliskości miejsca szczepienia, potem całego ciała, wreszcie śmierć) przekonywa po paru dniach, że istotnie materiał użyty do szczepienia zawierał laseczniki tężca; jeśli zaś po 5 dniach zwierzęta są zdrowe — oznacza to, że lasecznika w nim nie było. Lasecznik tężca ma długości 2—4  $\mu$ , jest cienki, obdarzony ruchem własnym, rośnie najlepiej w środowisku beztlenowym w ciepłocie ok. 37<sup>o</sup>, posiada wielką ilość rzęsek (30—50), często układa się w nici. Na jednym z dwu końców prętka tworzy się zarodnik, co nadaje jej wygląd bardzo swoisty (pałeczki od bębna); często też laseczniki układają się łącząc się po dwa końcami (t. w. postać hantlowa). Lasecznik tężca barwi się dobrze barwnikami anilinowymi, metodą Gram'a barwi się zmiennie (Gr.  $\pm$ ). Hodować można prętki tężca tylko beztlenowo, na wszelkich pożywkach o odczynie obojętnym lub słabo zasadowym (zwłaszcza gdy dodać 2% cukru gronowego lub innych substancji odtleniających) w ciepłocie 35—37<sup>o</sup>; poniżej 14<sup>o</sup> lasecznik nie rośnie. Wytwarza kwas (złożony przeważnie z kwasu węglowego i węglowodorów), odznaczający się mdłym nieprzyjemnym zapachem. Na agarze rośnie szybko; już po 24—48 godz. występują kolonie swoiste, przedstawiające pod słabym powiększeniem splot nici, biegnących we wszystkich kierunkach; w agarze

kłutym („wysokim“) bieżą we wszystkich kierunkach pod kątem prostym od linii ukłucia delikatne nici, co nadaje hodowli wygląd swoisty, przypominający drzewo. Na płycie żelatynowej po 3-ch dniach powstają kolonie o ciemnym ośrodku i promienisto wybiegających z niego niciach. W żelatynie „wysokiej“ od ukłucia tworzą się nici (jak w agarze), występują liczne pęcherzyki gazu, wreszcie pożywka zostaje rozrzedzona. Do hodowania lasecznika tężca nadaje się również pożywka z wyjałowionej papki mózgowej (przyczem pożywka zostaje zabarwiona na czarno przez wytwarzany na niej przez las. tężca siarczek żelaza). W buljonie, do którego dodano kawałki wyjałowionych świeżych narządów zwierzęcych (wątroby, gruczołów, nerki — metoda *W r z o s k a - T a r o z z i e g o*) daje męt jednolity, oraz często na powierzchni pianę. Lasecznik tężca rośnie niekiedy tlenowo w współzyciu z innymi bakteriami, tlenowcami; widocznie tlenowce, pochłaniając tlen z pożywki stwarzają dla las. tężca odpowiednie warunki istnienia. Natomiast wymaga on warunków bezwzględnie beztlenowych, gdy hoduje się go bezpośrednio z ciała chorego człowieka lub zwierzęcia. W tym celu należy dokładnie badać naciek na miejscu szczepienia lub zakażenia (rany), biorąc duże ilości wydzielin z otaczającej je tkanki, oraz, o ile mamy do czynienia z trupem lub padłem zwierzęciem, zbadać krew z serca i narządy wewnętrzne (wysiać beztlenowo!).

Jedną z najbardziej swoistych cech lasecznika tężca jest wytwarzanie ekzotoksyny, a więc jadu przedostającego się z ciała bakterji do środowiska. Jeśli drobnoustrój ten hodować beztlenowo w buljonie, to po 6—8 dniach przesączony

buljon zawiera niesłychanie złośliwą toksynę (0,000002—0,000005 cm<sup>3</sup> starczy, aby zabić mysz!) działającą wyłącznie na układ nerwowy.

Za pomocą zadawania zwierzętom (zwykle koniom) toksyny tężcowej, (początkowo osłabionej lub łącznie z antytoksyną) otrzymuje się surowicę ochronną, t. zw. antytoksynę tężcową, niweczącą działanie toksyny tężcowej i stosowaną u ludzi, chorych na tężec, w celach leczniczych.

Bardzo podobny morfologicznie do lasecznika tężca jest lasecznik obrzęku złośliwego (*bac. oedematis maligni* Pasteur, 1878), tak, iż nieraz z trudem daje się od niego odróżnić. Jest to prątek Gr. +, ruchomy (z licznymi rzęskami), układający się często w długie nici. Rośnie wyłącznie beztlenowo. Żelatynę rozrzedza, tworzy w głębszych warstwach pożywki kolonie kuliste; wzdłuż linii ukłucia w agarze „wysokim“ tworzy zmętnienie, od którego bieżą promienisto delikatne wypustki. We wszystkich pożywkach wytwarza gaz, ale bez nieprzyjemnego zapachu (w przeciwieństwie do lasecznika tężca). Tworzy w ciepłocie 30—37° zarodniki, leżące często pośrodku prętka (stąd nazwa *clostridium* — wrzecziono — *oedematis maligni*). Doświadczalnie, chorobotwórczy dla wszelkich zwierząt laboratoryjnych; naogół wywołuje cierpienie u koni, bydła, owiec, bardzo rzadko u człowieka.

Chorobotwórcze natomiast dla ludzi są najrozmaitsze drobnoustroje beztlenowe (wywołujące odmę podskórną, obrzęki, zgorzeliны gazowe, t. zw. przez Karwackiego „gazówki“), a przede wszystkim opisany przez Fränkel'a prątek gazowy (*bac. phlegmones emphysematosae*).



Jest to dość gruby, nieruchomy drobnoustrój z zaokrąglonymi końcami, Gr. +, rosnący wyłącznie w warunkach beztlenowych, najlepiej w ciepłocie 37<sup>o</sup>. W pożywkach z cukrami wytwarza dużo gazu, mleko ścina, żelatynę rozrzedza, na agarze rośnie jako szaro-biały, ciągnący się nalot. Dla królików i myszy prątek ten nie jest chorobotwórczy, u świnek morskich po podskórnym wstrzyknięciu wywołuje na miejscu wstrzyknięcia duży bolesny naciek, poczem tworzy się rozedma z rozpadem tkanki podskórnej i mięśniowej, wreszcie zjawia się jasny płyn bez zapachu. Zwierzęta padają nieraz już po 24 godzinach. U zwierząt, które po śmierci pozostawały dobę lub dłużej w ciepłocie pokojowej, postrzegamy wytwarzanie się gazu w narządach wewnętrznych (t. zw. narządy „pieniste“ — „Schaumorgane“).

Poza prątkiem Fränkel'a, Sachs, Ghon, Conradi, Bieling i in., opisali wiele innych prątków, wywołujących gazówki. Różnią się one między sobą tworzeniem zarodników, ruchliwością, zachowaniem się w stosunku do metody Gram'a, własnościami chorobotwórczemi dla zwierząt. Laseczniki Ghon'a-Sachs'a (t. zw. prątki szel estnic y) są chorobotwórcze dla świnek morskich i królików. Prątki Conradi-Bieling'a w hodowli zabijają tylko świnki, przez szczepienie zaś zakażonych narządów — i króliki. Wreszcie gazówki wywoływać może też rodzina laseczników gnilnych (prątki Bienstock'a-Klein'a).

Jako materiału do badań bakterjologicznych w gazówkach używa się rozpadającej się tkanki mięsnej z miejsca zakażenia (z rany) lub z miejsca szczepienia. Na preparatach mazanych, barwionych met. Gram'a widoczne są liczne prątki. Materiał siejemy zwykle beztlenowo; kawałki tkanki

szczepimy zwierzętom (świnkom morskim i królikom), poczem różnicujemy otrzymane hodowle.

Do grupy beztlenowców należy też lasecznik zgorzeli trzeszczącej (*bac. sarcoemphysematos bovis*, *bac. Chauvoei* Arloing 1879), wywołujący u młodego bydła, zwłaszcza wołów, obrzęki na skórze i w mięśniach, trzeszczące od ucisku wskutek obecności w nich gazu. Lasecznik ten jest ruchomy (posiada liczne rzęski), barwi się metodą Gram'a (Gr +), wytwarza zarodniki, leżące w pobliżu końca bakterji. Jest bezwzględny beztlenowcem, rośnie najlepiej w ciepłocie ok. 37° na agarze z kawałkiem jałowego mięsa surowego lub w papce mózgowej.

Doświadczalnie, lasecznik ten jest chorobotwórczy dla świnek morskich, nieszkodliwy dla królików. Człowiek jest na zakażenie prątkiem zgorzeli trzeszcz. odporny.

W ropie w przebiegu wrzodu miękkiego (*ulcus molle*) spotyka się krótkie, grube, często z barwiącymi się biegunami laseczniki Ducrey'a (*streptobacillus*, 1889), Gr —, leżące parami lub pojedynczo wewnątrz komórek lub pozakomórkowo. Laseczniki Ducrey'a rosną na agarze z krwią w postaci błyszczących ciemno-szarych kolonji, po 48 godz. w t. 37° zdejmujących się całkowicie drucikiem platynowym z powierzchni pożywki. W wodzie kondensacyjnej las. Ducrey'a układa się w długie nici.

O laseczniku dżumy znajduwanej w ropie z dymienic (bubones) patrz str. 145.

W przebiegu cierpienia wywołanego grzybką promienicy (*actinomyces*, Gasparini, Lachner-Sandoval) w patologicznie zmienionych tkankach występują gruzełki, zawierające wewnątrz białawe ziarenka

(t. zw. druzi promienicy). W ropy, wydzielającej się z rany, makroskopowo już rzucają się w oczy żółto-białawe, twarde, kuliste lub o nieprawidłowej postaci ziarenka. Pod drobnowidzem ziarenka te, zgniecione szkiełkiem przykrywkowym, mają wygląd swoisty: ze zbitego kłęбка, składającego się z nici, bieżą promienisto liczne błyszczące wypustki nitkowate, dające rozgałęzienia i na końcu zgrubiałe (t. zw. kolby). W ośrodku oprócz nici często znajdują się twory o postaci prątkowej lub kulistej. Rozmieżdzone druzi promienicy ogląda się bez zabarwienia lub barwi metodą Gram'a. Jeśli ziaren nie znaleziono, należy zrobić preparaty mazane z ropy i zabarwić je metodą Gram'a; widać wówczas nici, barwiące się na kolor fiołkowy, rozgałęzione, lub też pozginane; niektóre jednak nici, a zwłaszcza leżące w nich zarodniki, barwią się słabo.

Widuje się też twory małe w postaci prątków lub ziarniaków, niekiedy w skupieniach.

Preparaty wystarczają zwykle do stwierdzenia obecności grzybka: w celu określenia odmiany, należy grzybek wyhodować. Jedne rodzaje grzybka promienicy rosną tlenowo, inne beztlenowo. Beztlenowce rosną cokolwiek łatwiej, tlenowce — bardzo trudno. Materiał badany należy zawsze siać i tlenowo, i beztlenowo w większej ilości probówek z agarem, z surowicą Loefflera, z agarem z domieszką płynu puchlinowego (z jamy brzusznej), z buljonem i t. p. Na kilkadziesiąt probówek niekiedy zaledwie w jednej następuje wzrost, w dalszych jednak pokoleniach grzybek rośnie łatwo. Tlenowce dają kolonie bardzo podobne do kolonii lasecznika gruźlicy. Na żelatynie rośnie grzybek promienicy w ciepłocie pokojowej; pożywkę rozrzedza.



W ropie (a także w chorych tkankach) znaleźć można nici i zarodniki grzybka opisanego przez amerykańskich autorów, a dokładnie zbadanego przez Beurmann'a-Gougerot'a, nazwanego przez badaczy „*sporotrichon*”; powoduje on chorobę zwaną „*sporotrichosis*”, która wywołuje chorobne zmiany skórne, guzy (podobne do kilaków) itp., naogół podobne do zmian kiłowych lub gruźliczych. Rośnie na podłożu Sabouraud'a lub na agarze z 3–4% cukru gron. w ciepłocie pokojowej lub w 30°, w dostępie powietrza; hodowle po kilku tygodniach stają się czarne, tylko brzeg jest jaśniejszy. Chorobotwórczy dla zwierząt (świnek morskich, królików, psów i in., zwłaszcza dla szczurów).

Surowica chorych na *sporotrichosis* zlepia zarodniki w rozcieńczeniu 1:1000 i wywołuje odchylenie dopełniacza z hodowlami tego grzybka.

**Badanie nalotów i wydzielin z jamy ustnej, z jamy nosowo-gardzielowej, z ucha, ze spojówki oka, z pochwy, z owrzodzeń skórnych itd.**

W badaniu bakteriologicznym nalotów wzgl. wydzielin z jamy ustnej i noso-gardzielowej chodzi przeważnie o wykrycie lasecznika błonicy. (Bada się również na obecność gronkowców, paciorkowców, pneumokoków, prątków grypi, dwoiniek Friedländer'a, grzybka pleśniawki, wrzeczionowatych laseczników Plaut-Vincent'a, meningokoków i in.).

Lasecznik błonicy (*bac. diphtheriae* Loeffler, 1884). Materiał do badania, zebrany na wyjąłowanych wacikach (o zbieraniu materiału patrz str. 90), wysiewa się na surowicy Loeffler'a przez rozsmarowanie go na

powierzchni pożywki. Pozostały na waciku materiał rozciera się na szkiełkach przedmiotowych, utrwała w płomieniu i barwi metodą Gram'a, Loeffler'a oraz metodą, uwidoczniającą w laseczkach błonicy ciążka biegunowe (Neisser'a, Fallières'a itp.). Po 24 godzinach z hodowli na surowicy Loeffler'a należy zrobić preparaty z różnorodnych kolonji i zabarwić je wyżej wspomnianymi metodami. W razie obecności lasecznika błonicy, należy go wyodrębnić z pośród towarzyszącej mu flory, a po otrzymaniu czystej hodowli, zróżnicować ostatecznie (sprawdzić jego własności biologiczne na szeregu pożywek, zaszczerpić śwince morskiej).

Lasecznik błonicy jest nieruchomy, cienki, zmiennej długości (od 1,5  $\mu$ —4  $\mu$ ), często zgrubiały na jednym lub obydwu końcach (postać maczugowata), często nieco zgięty. Postać prątków błonicy jest w znacznym stopniu zależna od warunków, w których się on znajduje (wieku hodowli, rodzaju pożywki, ciepłoty); w starszych, niż 12 godz. hodowlach, spotykamy postaci hantlowate, wrzecionowate, lancowate. Szczególnie swoistym dla lasecznika błonicy jest układ oddzielnych osobników, przypominający rozpostarte palce dłoni, lub też pod kątem albo równoległy itp. Laseczники błonicy łatwo się barwią rozcieńczonymi barwnikami anilinowymi (np. błękitem metylenowym Loeffler'a w rozcieńcz. 1 : 9), metodą Gram'a barwią się dodatnio (przy zastosowaniu modyfikacji Langner'a — ujemnie). Laseczники błonicy z hodowli 18—20 godzinnych barwią się nierównomiernie: wewnątrz laseczników tworzą się przerwy niezabarwione, tak, że prątek ma niekiedy wygląd ziarnisty. Las. błonicy posiada zwykle na końcach owalne

ziarnka, barwiące się silniej od pozostałej zarodki — są to t. zw. „ciałka biegunowe“, („ziarenka Ernst-Babes'a“, „ciałka metachromatyczne“). Ciałka te uwidaczniają się bardzo wyraźnie w barwieniu metodą Neisser'a, Fallierès'a i in. (o barwieniu patrz str. 66—7).

Optimum ciepłoty dla lasecznika błonicy jest 33—37°.

Najodpowiedniejszą pożywką dla las. błonicy jest surowica Loeffler'a, następnie buljon oraz agar glicerynowy (5—7%). Buljon po 1—2-dniowym wzroście zostaje albo jednolicie zmacony, albo tworzą się w nim białe ziarniste kłaczkki, opadające na dno próbówki, często też na powierzchni buljonu tworzy się błonka. Po 48 godzinach odczyn buljonu ze słabo zasadowego staje się wyraźnie kwaśnym. Na agarze zwykłym prątek błonicy rośnie bardzo skąpo lub nie rośnie wcale; na agarze z gliceryną rośnie lepiej, przyczem kolonie powierzchniowe są przezroczyste, szarawo-białe. Najszybciej i najobficiej rośnie lasecznik błonicy na surowicy Loeffler'a; na pożywce tej często już po 6-ciu godzinach pojawiają się drobne, przezroczyste kolonie; po 24 godzinach kolonie są wielkości łebka od szpilki, żółtawo-białe, zlewające się ze sobą. W pożywce Riemsdijk wytwarza kwas. Jest względnym beztlenowcem. Las. błonicy wytwarza toksynę, t. zw. egzotoksynę, tj. truciznę będącą wydzieliną laseczników i przedostającą się do środowiska, w którym się znajdują bakterje. Działanie tej egzotoksyny można sprawdzić przez zastrzyknięcie przesączonej hodowli buljonowej świnie morskiej, która pada, tak samo, jak od wstrzyknięcia zawiesiny.

W celu przekonania się o zjadliwości lasecznika, a więc



do odróżnienia jej od niejadliwych dla świnek morskich laseczek rzekomobłonicych, bierzemy dwie świnki morskie (wagi ok. 250—300 gr.) i I-szej wstrzykujemy 1 uszko 24 godzinnej hodowli las. błonicy na surowicy Loeffler'a rozrtae w 4 cm<sup>3</sup> buljonu, II-giej zaś — tę samą ilość zawiesiny w buljone, oraz 3 krople surowicy przeciwbłonicy, rozcieńczonej 350 razy. O ile mamy do czynienia z błonicą, to I-sza świnka padnie po 2—4 dniach, II-ga — pozostanie przy życiu. Badanie pośmiertne padłej świnki wykazuje: zawsze silny naciek na miejscu szczepienia; w jamach ciała (brzuszej, osierdziowej, opłucnowej) często wysięki krwiste, zmiany swoiste w nadnerczach — narząd ten jest przekrwiony, cokolwiek powiększony, w tkance zaś jego znajdują się często małe kropkowane krwawe wylewy. Wszystkie narządy są zwykle jałowe — śmierć zwierzęcia następuje od zatrucia toksyną wydzielaną przez laseczniki błonicy.

Wstrzykując większym zwierzętom (koniom, osłom) toksynę błonicy (przesączoną hodowlę buljonową), otrzymuje się t. zw. surowicę antytoksyyczną przeciwbłonicy, stosowaną w celach leczniczych i ocenianą co do swojej siły w „jednostkach odporności“ lub „jednostkach siły antytoksyycznej“. Pod jednostką taką pojmujemy ilość antytoksy, którą trzeba zadać śwince morskiej (wagi około 250 gr.), aby unieszkodliwić wstrzykniętą śwince tej, ściśle określoną dawkę toksyny, zabijającą zwierzę w ciągu 4 dni.

Niekiedy hoduje się z nalotów i wydzielin laseczniki podobne morfologicznie do laseczników błonicy, różniące się jednak od niej, zarówno pod względem biologicznym, jak i działaniem na ustrój ludzki i zwierzęcy. Do prątków

tych zaliczamy lasecznika błonicy rzekomej (*bac. pseudodiphtheriae*), lasecznika zeschnięcia (*bac. xerosis*) oraz lasecznika ziarnistego gnilnego Serkowskiego (*granulobacillus putrificus S.*). Pierwszy znajduje się prawie stale w jamie noso-gardzielowej; prętka zeschnięcia spotyka się najczęściej na spojówce oka lub w nosie; ziarnisty lasecznik gnilny występuje w nosie, jamie ustnej, spojówce oka itd.

Lasecznik błonicy rzekomej (las. Hoffmann'a) jest krótki, gruby, z zaostrozonymi końcami (w kształcie cygara); barwi się metodą Gram'a dodatnio (Gr +), posiada zwykle przerwę pośrodku bakterji, ciątek biegunowych ani ziarnistości nie posiada, układa się zwykle równolegle. Na agarze — w przeciwieństwie do lasecznika błonicy — prątek błonicy rzek. rośnie bardzo obficie, na surowicy Loeffler'a — skąpo. Tworzy kolonie szaro-białe, tłusto lśniące, rozlewające się. Las. błonicy rzekomej jest bezwzględnie tlenowy. (Ważna cecha rozpoznawcza w odróżn. od las. błonicy!). Na pożywkach z cukrami nie wytwarza kwasu (pożywka Riemsdijk zostaje niezmienną); dla zwierząt nie jest chorobotwórczy.

Lasecznik zeschnięcia (*bac. xerosis*) przypomina morfologicznie długie postaci lasecznika błonicy, na surowicy Loeffler'a rośnie jednak o wiele powolniej. Metodą Gram'a barwi się dodatnio; przy barwieniu metodą Neisser'a lub Fallières'a wykazuje liczne ciemniej barwiące się ziarenka. Na agarze rośnie obficie; na pożywkach z cukrami zachowuje się jak lasecznik błonicy rzekomej; pożywki Riemsdijk nie zmienia. Dla zwierząt (świnek morskich, królików) wprowadzony dożylnie, dootrzewnowo lub podskórnice —

TABLICA I-a.

	<i>Las. błonicy</i> ( <i>bac. diptheriae</i> )	<i>Las. błonicy rzek.</i> ( <i>bac. pseudodiphtheriae</i> )	<i>Las. zeschnięcia</i> ( <i>bac. xerosae</i> )	<i>Las. ziarnisty gnilny</i> ( <i>granulobacillus putrificus</i> )
<i>Ruch.</i>	—	—	—	—
<i>Układ.</i>	Palcowaty, pod kątem, w postaci sztachel.	W postaci sztachel.	Las. często pojedyncze, niekiedy ułożone pod kątem.	Podobny zupełnie do las. błonicy.
<i>Morfologia.</i>	Krótkie lub długie, zwykle cienkie laseczniki; w starszych hodowlach tworzą maziowate czugi i hanile.	Krótkie, dość grube laseczniki w kształcie cygara, często rozdwojone pośrodku.	Grube, silnie ziarniste laseczniki, często lekko zgęste.	Podobny zupełnie do las. błonicy.
<i>Gram.</i>	+	+	+	+
<i>Ciała bieg.</i>	+	—	+	+
<i>Ziarnistość.</i>	Niekiedy obecna.	Zawsze brak.	Zawsze obecna.	Zwykle obecna.
<i>W buljonie.</i>	Met zwykle jednolity; często osad biały ziarnisty lub błonka.	Met jednolity, niekiedy i błonka.	Met jednolity.	Słaby równomierny met.
<i>Na agarze.</i>	Wzrost słaby lub całkowicie brak wzrostu. Kolonie biało - szare, przezroczyste.	Wzrost obfity. Kolonie szarawe, lśniące o rozlewającej się konsystencji.	Wzrost obfity. Kolonie białe suche. Po paru dniach zabarwienie pomarańczowe.	Wzrost obfity. Kolonie białe, masywne, nie zlewające się.



Na surowicy Loeffler'a.	Wzrost b. obfity. Kolonje białe, zlewające się.	Wzrost skąpy. Kolonje duże szarawe, zwykle niezlewające się.	Wzrost skąpy. Kolonje białe suche.	Wzrost obfity. Kolonje białe, masywne, nie zlewające się.
Na Endo.	Wzrost słaby lub brak go zupełnie. Kolonje czerwone.	Wzrost obfity. Kolonje jasne.	Wzrost obfity. Kolonje jasne.	Wzrost obfity. Kolonje blade- różowe.
Na pożywce Riemsdijk.	Zaczerwienienie.	Bez zmiany.	Bez zmiany.	Bez zmiany.
Ilość $\text{cm}^3$ $\frac{N}{15}$ kwasu na 100 $\text{cm}^3$ po- żywkę.	49 (po 46 godz.).	80 (po 46 godz.).	—	95 (po 46 godz.).
Na pożywce z mocznikiem.				
Aglutyn. <sup>1)</sup> z sur. swoistą.	Dodatnia (przeważnie).	Ujemna.	Ujemna.	Ujemna.
Dla zwierząt (podskórnice, dożylnie, do- otrzewnowo).	Świnka morska wagi 250 gr. pada po 2 do 4 dniach, wzgl. naciek na miejscu wstrzyknięcia.	Niechorobotwórczy.	Niechorobotwórczy.	Niechorobotwórczy.

<sup>1)</sup> Surowica antytoksyczna nie nadaje się; trzeba przygotować surowicę, wstrzykując królikom las. błonicy, zabite przez ogrzewanie w ciągu godziny przy 60°.

niechorobotwórczy; wtarty w spojówkę oka wywołuje ropienie. (*Patrz tablica I-a na str. 122—123*).

Lasecznik ziarnisty gnilny Serkowskiego (*granulobacillus putrificus* S., 1913) należy do drobnoustrojów, wywołujących ropienie; często powoduje miejscowe zapalenie błon śluzowych; natomiast wprowadzony zwierzętom podskórnie lub dootrzewnowo nie wywołuje zakażenia. Objawy zakażenia prątkiem są tylko miejscowe — we krwi nie wywołuje on żadnych zmian. U ludzi może powodować zapalenie pęcherza, gruczołu krokowego i in.

Lasecznik ziarnisty nie różni się morfologicznie w niczym od las. błonicy (jest cienki, delikatny, posiada ciątka biegunowe, w starszych hodowlach tworzy kolbki itd.). Metodą Gram'a barwi się dodatnio. Na surowicy Löffler'a rośnie obficie, dając masywne, nie zlewające się ze sobą kolonie. Na agarze — w przeciwieństwie do lasecznika błonicy — rośnie obficie, na pożywce Endo tworzy różowe, przezroczyste kolonie, w buljonie daje męt jednolity. Hodowany w pożywkach z mocznikiem, kwasem moczowym lub siarczanem amonu zmienia szybko ich odczyn na silnie zasadowy. Do przekonania się o tej własności służy specjalna pożywka, składająca się z buljonu (lub pożywki bezbiałkowej) z dodatkiem 1% mocznika lub 10% siarczanu amonu (bakterja uwalnia z soli amoniakalnych amoniak).

Wrzecionowaty lasecznik anginy Plaut-Vincent'a (*bac. fusiformis* Plaut-Vincenti-Lewkowicz, 1884) wywołuje niezyt (anginę) gardła. Na preparatach mazanych, barwionych rozcieńczoną fuksyną karbołową, barwnikiem Giemsa'y lub metodą tuszową Burri'ego widać liczne, długie, wrzecionowate (zaostrzone

na końcach i nieco zgrubiałe pośrodku) laseczniki Gr. —. Lasecznikom wrzecionowatym towarzyszą zwykle liczne krętki. Na preparatach, barwionych według Giemsa'y, w lasecznikach wrzecionowatych występują wyraźnie liczne ziarna chromatynowe. Las. wrzecionowaty jest bezwzględny beztlenowcem; w temperaturze 37<sup>o</sup> rośnie na agarze z surowicą lub z płynem z jamy brzusznej; po 24—48 godzinach tworzy na pożywkach tych delikatne żółtawe kolonie.

Grzybek pleśniawki (*oidium albicans*) oglądany bywa zwykle na preparatach niebarwionych w kropli wody lub gliceryny. Występuje w postaci długich, rozgałęzionych nici z poprzecznymi przegródkami. Pośród nich leżą kuliste lub cylindryczne konidja. W barwieniu metodą Gram'a jest Gr. +; barwi się również rozcieńczoną fuksyną karbolową. Grzybek rośnie na zwykłych pożywkach; na agarze tworzy białe, błyszczące, jakby porcelanowe kolonie, złożone przeważnie z komórek podobnych do drożdży i pojedynczych nici. Żelatynę nie rozrzedza.

W owrzodzeniach syfilitycznych znajdujemy krętka bladego (*spirochaete pallida*, *treponema pallidum* Schaudinn, 1905), wywołującego kiłę czyli przymiot (syphilis, lues). O braniu materiału z owrzodzeń kiłowych — patrz str. 93. Do badania krwi na obecność krętka bladego należy przynajmniej 1 cm<sup>3</sup> krwi z żyły zmieszać z dziesięciokrotnie większą ilością 1/10% kwasu solnego, dobrze odwirować — osad zbadać na preparatach mazanych. Badać można materiał z krętkami in vivo na ciemnym tle (w kropli wiszącej lub na preparatach, przygotowanych metodą Burri'ego lub Serkowskiego), lub też w utrwalonych



preparatach mazanych. Do tego najlepiej nadaje się metoda Giemsa'y: po 3-krotnem ostrożnem przeprowadzeniu preparatu przez płomień oblewamy go roztworem barwnika Giemsa'y, wysoko nad płomieniem ogrzewamy aż do pary, po 15 sekundach barwnik zlewamy i czynność tę powtarzamy 3—4 razy; przy ostatniem barwieniu zostawia się parujący barwnik na preparacie całą minutę. Barwniki anilinowe krętek wchłania z trudnością; metodą Gram'a nie barwi się.

Krętki kiły obdarzone są swoistym ruchem, ale nie postępowym; w kropli wiszącej odróżnić je łatwo od innych krętków (zwykle niechorobotwórczy *spirochaete refringens*), gdyż nawet, o ile są bez ruchu, zachowują stale wyraźne zwoje, podczas gdy inne krętki są bardziej wyciągnięte, postacią zbliżone do nitki. Na preparatach barwionych barwią się bardzo delikatnie (stąd nazwa *spiroch. „pallida“*, krętek „blady“), naprz. w barwieniu metodą Giemsa'y — na kolor jasno-różowy, podczas gdy inne krętki (naprz. *sp. refringens*) barwią się daleko silniej (łatwo barwią się też wszelkimi barwnikami anilinowymi). Krętek kiły ma przeciętnie 6—15  $\mu$  długości i posiada 6—30 drobnych, równych skrętów oraz na końcach po jednej, rzadziej po dwie długie nici.

Do barwienia krętków w tkankach z narządów stosuje się metoda Levaditi'ego: niewielkie kawałki tkanki należy utrwalić w formalinie (1 form. + 9 wody) w ciągu 24 godzin, poczem małe kawałki (grubości 2 mm.) pozostawić na noc w 95% wysokości, następnego dnia przełożyć do wody przekrojonej, którą należy zmieniać kilka razy, dopóki kawałki utrwalane

nie opadną na dno. Wówczas należy je włożyć do mieszaniny, złożonej z  $90 \text{ cm}^3$  1—1,5% roztworu azotanu srebra +  $10 \text{ cm}^3$  najczystszej pirydyny (w ciemnej flaszce ze szklanym korkiem), na 2—3 godzin w ciepłocie pokojowej i 3—5 godzin w cieplarni przy 45—50°. Następnie płyn należy zlać i, nie przemywając kawałków narządów, nalać do ciemnej butelki cieczy odtleniającej ( $90 \text{ cm}^3$  + 4% roztworu pyrogallolu +  $10 \text{ cm}^3$  czystego acetonu, do  $85 \text{ cm}^3$  takiej mieszaniny dodać  $15 \text{ cm}^3$  pirydyny). Po 12 do 15 godzinach płyn odlać, przemyć kawałki tkanki wodą, przeprowadzić poprzez wysoki oraz ksylol i zatopić w parafinie. Skrawków barwić już nie trzeba — krętki zostały posrebrzone i nabrały czarnego zabarwienia.

Krętek bładny rośnie na ściętej surowicy końskiej w „wysokiej warstwie“ w ciepłocie 37° lub też w mieszaninie obojętnego agaru (1 cz.) z surowicą końską (2 cz.). Noguchi używa 2% agaru (2 cz.) + płyn z jamy brzusznej (1 cz.), do czego dodaje kawałek świeżego jądra lub nerki królika; w agarze w „wysokiej warstwie“ umieszcza rozdrobniony materiał badany i pokrywa agar warstwą parafiny. W hodowlach mieszanych (krętki z bakterjami) krętki znajdują się zwykle w zewnętrznym pasie brzeżnym — należy przeto przenieść niewielkie ilości materiału z tej, często zmętniałej, części pożywki do świeżych próbek — otrzyma się wówczas czyste hodowle.

Ze zwierząt wrażliwe na krętka kiły są małpy, zwłaszcza wyższe gatunki (szympansy), u których można wywołać zakażenie miejscowe na każdym miejscu ciała przez wcieranie

krętków w małe ranki skórne; u niższych małp (*macacus rhesus*) udaje się zwykle wywołać zakażenie na *mons veneris*.

Ze zwierząt domowych u królika można wywołać: 1<sup>o</sup>) swoiste zmiany w rogówce (*keratitis syphilitica*) po zaszczepieniu w rogówkę lub wstrzyknięciu w przednią komorę oka materiału z krętkami kiły; występują one w kilka tygodni (do 2-ch miesięcy) po zakażeniu i prowadzą niekiedy do ogólnego zakażenia przymiotem (*lues generalisata*); 2<sup>o</sup>) przymiot moszny, gdy zaszczepić w delikatną jej skórę materiał z ludzkiego wrzodu lub z rogówki przymiotowej z licznymi krętkami — po pewnym czasie tworzy się długotrwałe (często 4—5 mies.) owrzodzenie; 3<sup>o</sup>) przymiot jądra, gdy wprowadzić materiał bezpośrednio do jądra — w silnie powiększonym jądrze znajdują się krętki w czystej hodowli.

**Badanie płwociny.** Płwocinę zebraną w słoiczku, kieliszku itp., wylewamy na płytkę i stawiamy na ciemnej powierzchni (okopcona płyta szklana, czarny papier itp.), aby rozpatrzyć się w jej makroskopowym wyglądzie. Należy zwrócić uwagę na ilość płwociny, jej spoistość, zapach, zabarwienie, ewentualnie domieszkę krwi, ropy, grudek (rozpadające się gruzełki w gruźlicy płuc) itd.

Badanie bakteriologiczne może polegać bądź na badaniu preparatów mazanych i określeniu drobnoustrojów w nich zawartych, bądź na hodowaniu drobnoustrojów, bądź wreszcie na szczepieniu materiału zwierzętom; często stosuje się wszystkie trzy metody kolejno.

W celu przygotowania preparatów mazanych wydzielamy za pomocą przepalonych drucików cząstkę



plwociny, starając się znaleźć miejsce jak najbardziej ropne, względnie cząsteczki stałe, twarde, żółtawe, pływające w śluzie (pochodzące z jam i mas serowatych w gruźlicy płuc). Wydzieloną cząstkę plwociny staramy się uczynić możliwie jednolitą przez odpowiednie rozmiżdżenie jej drucikami, poczem rozcieramy ją równomiernie pomiędzy dwoma szkiełkami przedmiotowymi. Tak przygotowane preparaty suszy się na powietrzu, utrwała w płomieniu i barwi rozcieńczonymi barwnikami anilinowymi, metodą Gram'a, oraz metodami na laseczniki kwasoodporne.

Najczęściej badamy plwocinę na obecność lasecznika gruźlicy (*bac. tuberculosis*), wykrytego przez Koch'a (1882). Istnieje cały szereg metod, służących do łatwego odróżniania laseczników Koch'a od innych drobnoustrojów, metod, opierających się na zasadzie, że prątki gruźlicze, pokryte otoczką woskowo-tłuszczową, trudno przyjmują barwnik, ale zato trudno też odbarwiają się kwasami i alkoholem; do najbardziej rozpowszechnionych metod należy metoda Ziehl-Neelsen'a oraz Gabbet'a (patrz str. 68). Na preparatach z plwociny, barwionych według powyższych metod, laseczniki gruźlicy barwią się na czerwono fuksyną karbolową, wszelkie zaś inne drobnoustroje oraz tło preparatu (komórki nabłonkowe, ciała ropne itd.) odbarwiają się kwasem oraz alkoholem i następnie przyjmują zabarwienie niebieskie błękitu metylenowego.

Na preparatach, barwionych metodą Ziehl-Neelsen'a lub Gabbet'a, laseczniki Koch'a mają postać tworów dłuższych lub krótszych (1.5—4  $\mu$ ), cienkich, cokolwiek zgiętych, leżących grupkami, pojedynczo, po dwa równolegle lub pod kątem. Barwią się nierównomiernie, posiadają

wewnątrz lasecznika ziarenka (t. zw. ziarenka Much'a, uważane przez niektórych autorów za zarodniki); pomiędzy zabarwionymi ziarenkami znajdują się przerwy jasne, które bardzo wyraźnie występują, zwłaszcza przez stosowanie modyfikacji Much'a, wprowadzonej do metody Gram'a. Spotyka się też w preparatach obok prątków oddzielne odłamki laseczek gruźliczych („drzazgi“ Spengler'a, „ziarenka“ Much'a, względnie „zarodniki“ Kronberger'a). Jeśli ilość prątków w plwocinie jest bardzo mała, w celu równomiernego rozdzielania laseczników w całej masie plwociny stosuje się metody ujednostajnienia (homogenizacji), które mają za zadanie zamienić niejednostajną masę plwociny na płyn jednostajny i rzadki oraz osadzić znajdujące się w nich laseczniki zapomocą wirówki. Dzięki metodom tym możemy w plwocinie wykryć prątki Koch'a znacznie częściej, niż to można uczynić bez ujednostajniania plwociny.

1). Metody, w których do ujednostajnienia stosuje się ług. Metoda Biedert'a: do próbki wziąć 4—5 cm<sup>4</sup> plwociny, dodać poczwórną ilość 0,2% ługu potasowego, zatkać próbkę korkiem gumowym i kłócić mocno tak długo, dopóki plwocina nie zamieni się w masę rzadką i jednostajną. Wtedy wylać na porcelanowy lub emaljowany talerzyk lub też pozostawić w próbce i nagrzewać, wciąż kłóćąc, aż do zagotowania. Następnie dodać 1—2 kropel fenoltaleiny i po kropki kwasu octowego, przyczem silnie wstrząsać aż do zniknięcia barwy czerwonej. Wreszcie odwirować i z osadu przygotować preparaty.

2) Metoda Ellerman'a i Erlandsen'a. Jest

to t. zw. metoda podwójna, w której stosuje się i ług sodowy i autoliza.

1. bierze się jedną objętość (10—15 cm<sup>3</sup>) płwociny w cylinderku miareczkowanym i  $\frac{1}{2}$  objętości 0,6% roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Mieszaninę zostawia się w cieplarni przy 37° (autoliza) na 24 godz. lub dłużej;

2. większą część płynu odlewa się, resztę wiruje. Po odwirowaniu płyn znowu odlać;

3. do jednej objętości osadu dodaje się 4 objętości 0,25% ługu sodowego. Starannie skłócić, zagotować i wirować.

Niektórzy badacze zalecają do ujednostajniania płwociny używać amoniaku.

3) **Antyformina** (po raz pierwszy stosowana przez Uhlenhuth'a i Xylander'a) znalazła szerokie zastosowanie do ujednostajniania płwociny. Antyformina jest to ciecz o barwie żółtawej i zapachu chloru; składa się z mieszaniny podchlorynu sodowego (natrii hypochlorosi) i ługu potasowego w odpowiednim stosunku; jest stałą w swem działaniu i przechowuje się dobrze. Rozpuszcza śluz, komórki, ropę, kał, sierść, włosy, skórę, a nawet kreatyninę i chitynę; rozpuszcza również łatwo wszystkie bakterje, z wyjątkiem laseczników, mających otoczkę woskową (kwasoodpornych).

a) **Metoda Uhlenhuth'a.** Antyforminę 25% miesza się z 2—3 cm<sup>3</sup> płwociny, w stosunku 2:1 lub 4:1. Po skłóceniu otrzymuje się po pewnym czasie (w ciągu kwadransa lub dłużej) jednolitą masę, do której, w celu zmniejszenia jej ciągliwości, można dodać nieco wody przekroplonej. Osad, otrzymany przez wirowanie,



należy przemyć wodą, w celu usunięcia antyforminy, która utrudnia utrwalanie preparatu. Gdy osad, w braku wirówki, bierzemy pipetką na szkiełko wprost z probówki, można zamiast przemywania, zanurzyć preparat po wysuszeniu w 2—3% roztworze sublimatu, następnie zmyć w czystej wodzie i utrwalić w płomieniu.

b) Pewną ilość plwociny mieszamy w jałowej suchej butelce z 4-krotną ilością 15% antyforminy, kłócimy dokładnie i pozostawiamy w ciepłocie pokojowej lub ciepłarce, dopóki plwocina nie zamieni się w płyn jednolity (wstrząsać kilkakrotnie w ciągu tego czasu!). Następnie: dodajemy około  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$  objętości płynu 96% wysokoku czystego lub wysokoku skażonego, wirujemy w ciągu 20—30 minut, zlewamy płyn ponad osadem, do osadu dodajemy jedną lub dwie krople kwasu octowego, kłócimy, następnie dolewamy wody przekroplonej, powtórnie wirujemy w ciągu  $\frac{1}{2}$  godziny, wreszcie z osadu robimy preparaty mazane i barwimy zwykłymi sposobami na laseczniki kwasoodporne.

Na preparatach otrzymanych za pomocą metod, w których stosujemy antyforminę, prątki gruzlicy barwią się ciemniej i są jakby grubsze oraz bardziej napęczniałe, niż w preparatach przygotowanych bezpośrednio z plwociny.

c) S c h u l t e podaje następującą modyfikację powyższej metody: do 10 cm<sup>3</sup> plwociny dodać 20 cm<sup>3</sup> 50% antyforminy, dobrze zmieszać w suchym naczyniu i pozostawić, mieszając co pewien czas, w ciepłocie pokojowej przez  $\frac{1}{2}$  godziny. Następnie, do mieszaniny dodać 30 cm<sup>3</sup> wysokoku skażonego, dobrze zmieszać i wirować w ciągu  $\frac{1}{2}$ —1 godziny.

d) Do badania małych ilości plwociny metodą antyforminową, Rosenkrantzówna podaje sposób następujący: cząsteczkę plwociny położyć na szkiełku zegarkowym i nalać na nie tyle 30% antyforminy, aby plwocina została całkowicie zanurzona. Plwocinę rozciera się w antyforminie bagietką szklaną i po dodaniu około  $1 \text{ cm}^3$  95% wysokoku, pozostawia w ciepłocie pokojowej w ciągu 20 minut. Po upływie tego czasu, z delikatnego osadu przygotowuje się preparaty mazane; osad należy rozcierać na małej przestrzeni szkiełka, następnie lekko przygrzać, by antyformina wyparowała, poczem na preparacie umieścić kroplę wody i ponownie lekko przygrzać, aby wraz z parującą wodą usunąć całkowicie antyforminę. Utrwalić i barwić sposobami zwykłymi na las. kwasoodporne.

4) Metoda antyforminy-ligroiny Lange-Nietsche'go. Kłaczki plwociny, dobrze rozbite z pewną ilością wody przekroplonej, zlać do probówki, dodać 40% antyforminy w stosunku 1 : 5 ; gdy plwocina się rozpuści, dodać ligroiny w takiej ilości, aby utworzyła nad antyforminą warstwę 2—3 mm. grubości. Po dokładnem skłóceniu obydwu płynów pozostawić przez  $\frac{1}{2}$  godziny w spokoju w ciepłocie pokojowej (lepiej w cieplarni o  $37^\circ$ ). Po upływie tego czasu ligroina wypływa na wierzch, pomiędzy nią i antyforminą wytwarza się szara warstwa, która zawiera wszystkie prątki znajdujące się w plwocinie. Utrwalić preparat w płomieniu i barwić sposobami zwykłymi na laseczники kwasoodporne.

Ilość laseczników na preparacie bywa różnorodna, za-

leżnie od stopnia gruźlicy lub też od wziętej do badania cząstki plwociny; niekiedy znajduje się kilka do kilkunastu prątków w polu widzenia, niekiedy zaś w całym preparacie znajdujemy pojedyncze osobniki po długiem i zmu-  
dnem szukaniu. Jeśli zachodzi potrzeba obliczenia laseczni-  
ków, można stosować skale Gaffky'ego, Cza-  
plewskiego.

### Skala Gaffky'ego:

1	—	w całym preparacie	1—4	laseczników,
2	—	przeciętnie na kilka pól	1	lasecznik,
3	—	„	w każdym polu widzenia	1 lasecznik,
4	—	„	„	2—3 laseczników,
5	—	„	„	4—6 „
6	—	„	„	7—12 „
7	—	„	„	dosyć dużo laseczników,
8	—	„	„	liczne laseczni-
9	—	„	„	bardzo liczne laseczni-
10	—	„	„	olbrzymia ilość laseczników.

### Skala Czaplewskiego.

Licznik ułamka wyraża liczbę laseczników widzianych w każdym polu widzenia, a mianownik liczbę odpowiednich pól widzenia. Jeżeli można naliczyć zaledwie jeden lub kilka laseczników w kilku preparatach, to mianownik oznacza się liczbą rzymską, a więc:

$\frac{10}{I}$  = 10 laseczników w jednym polu widzenia,

$\frac{\infty}{I}$  = nieskończenie wielka liczba laseczników w jednym polu widzenia,

$\frac{1}{VI}$  = 1 lasecznik na 6 pól widzenia,

$\frac{1}{III}$  = 1 lasecznik w 3 preparatach itd.



Hodowanie laseczników gruzliczych. Jeżeli na preparatach barwionych nie można wykryć laseczników gruzliczych, lub też zachodzą pewne wątpliwości co do ich swoistości, to należy stosować hodowle lub szczepić materiał zwierzętom. Do hodowania laseczników gruzliczych istnieje cały szereg pożywek specjalnych, z których najlepsze wyniki dają pożywki z gliceryną (agar glicerynowy, buljon glicerynowy, kartofle z gliceryną, surowica z gliceryną), agar z somatozą, pożywka Hesse-Heyden'a oraz agar z papką mózgową Ficker'a, pożywka Karwackiego (o przygotowywaniu tych pożywek patrz str. 40—41). Do hodowania laseczników Koch'a z płwociny duże usługi oddaje też antyformina: kłaczki płwociny rozpuszcza się w 15% roztworze antyforminy, płyn wiruje, osad przemywa kilkakrotnie jałowym fizjol. roztworem soli i wysiewa na powierzchni pożywki.

Prątek gruzlicy jest bezwzględny tlenowcem, optimum ciepłoty wynosi 37°. Rośnie bardzo powoli: po 2—7 dniach (zależnie od pożywki), tworzy drobne, suche kolonie w postaci łusek, które składają się, jak wykazują preparaty „odbitki“, z pojedynczych obok siebie poukładanych prątków, tworzących następnie delikatne, poskręcane nici. Łuski rosną stopniowo i po kilku tygodniach tworzą grubą, suchą, pomarszczoną błonę, którą pokryta jest cała powierzchnia pożywki.

Szczepienie zwierzętom płwociny, podejrzanej o obecność prątków gruzlicy.

Najpewniejsze wyniki w przypadkach wątpliwych daje szczepienie podejrzanego materiału zwierzętom. Ze zwierząt najbardziej nadają się młode świnki morskie wagi około

250 gr. W czasie szczepienia należy zachować wszelką ostrożność antyseptyki. Płwocinę można szczepić:

a) wstrzykując p o d s k ó r n i e w okolice pachwinową, przez wtarcie przemytych w fizjologicznym roztworze soli kłaczeków płwociny lub wcierając je w t. zw. „kieszęń skórą“. Często już po paru tygodniach daje się spostrzegać obrzmienie gruczołów pachwinowych. Zmiażdżenie gruczołów (metoda Bloch'a) daje jeszcze szybsze rezultaty, gdyż obrzmiewają gruczoły już po 8—14 dniach. Obrzmiały gruczoł taki należy wyciąć, rozetrzeć na szkiełku i zabarwić; można wówczas wykryć w nim prątki gruźlicze. Przez rozpuszczenie gruczołów w antyforminie można wykryć nawet nieliczne laseczniki;

b) do o t r z e w n e j; otrzymujemy rezultaty dodatnie nawet w razie najskąpszej ilości prątków gruźliczych. Po 4—6—8 tygodniach świnki padają na prosówkę; jeżeli chcemy przyspieszyć rozpoznanie, należy świnkę zabić w 2—4 tygodnie (jeśli przypuszczamy bardzo skąpą ilość laseczników — po 7 tygodniach) po szczepieniu. W razie wyniku dodatniego sekcja wykazuje na miejscu wstrzyknięcia nacieczenie lub owrzodzenie, gruczoły sąsiednie zserowaciałe, gruczoły wewnętrzne również, w narządach wewnętrznych, a zwłaszcza w śledzionie i wątrobie widać mniej lub więcej liczne gruzełki. Gruzełki należy rozmiażdżyć pomiędzy dwoma jałowymi szkiełkami przedmiotowymi, część użyć do posiewu, a część zabarwić;

c) do s u t k i (według Nattan-Lavriera); szczepienie daje szybkie wyniki. Metoda ta polega na wstrzyknięciu płynu podejrzanego do sutki świnki morskiej

w okresie karmienia. Częstkę płwociny należy rozbić w 2—3 cm<sup>3</sup> wody wyjałowionej i nagrzewać ją w 54° po 20 minut przez 2 dni. Płwocinę tak przygotowaną wstrzykuje się w sutkę świnki (na zewnątrz brodawki) w ilości 1 cm<sup>3</sup>. Pomiedzy 5-tym i 10-tym dniem, w płynie wydzielającym się z sutki, zaczynają zjawiać się laseczniki gruźlicze;

d) do wątroby (według Oppenheimer'a); szczepienie polega na tem, że materiał podejrzany wstrzykuje się śwince do wątroby, w której gruźlica rozwija się bardzo szybko i po 5—15 dniach, zależnie od ilości wstrzykniętych laseczników, można wykryć zmiany swoiste w narządach wewnętrznych. Wstrzyknięcia dokonywa się na linii sutkowej prawej pod łukiem żebrowym przez wprowadzenie igły prawie na 2 cm<sup>3</sup> głęboko, prostopadle do przepony brzusznej.

**Tuberkulina.** Pierwszym preparatem, przygotowanym przez Koch'a ze starych hodowli buljonowych gruźlicy przez gotowanie ich oraz wyciąganie alkoholem, była t. zw. „stara tuberkulina“ (Alt-Tuberkulin). Po wstrzyknięciu nawet bardzo małych ilości środka tego chorym na gruźlicę, następuje silny odczyn (zwykle ogólny, jak wzmożenie stanu zapalnego, podniesienie ciepłoty), podczas gdy w organizmie zdrowym można zauważyć tylko objawy miejscowe.

Drugi preparat, nazwany przez Koch'a „nową tuberkuliną“ („Neu-Tuberkulin T. R.“), przygotowuje się w następujący sposób: złośliwe laseczniki gruźlicy należy wysuszyć, rozmiążyć, przenieść do wody, ponownie rozgnieść i odwirować. Pierwszą porcję z ponad osadu należy odlać i używać można dopiero następnych porcji, całkowicie oddzielonych od części stałych osadu i odparowanych. Koch uodpornił tą tuberkuliną dużą ilość morskich świnek przez stopniowo zwiększające się dawki. Całkowite uodpornienie występowało po 2—3 tygodniach po zadaniu dużych dawek.



Tuberkulinę („stara“ — Alttuberkulin) stosuje się w odczynach rozpoznawczych Pirquet'a, Calmette'a, Wolff-Eisner'a, Mantoux, Moro, Petruschky i in.

Odróżniamy dwa typy lasiecznika: gruźliczego typ bydlęcy (*typ. bovinus*) w gruźlicy bydła (t. zw. perlicy) i typ ludzki (*typ. humanus*). Lasieczniki typu zwierzęcego są krótsze i grubsze, aniżeli lasieczniki typu ludzkiego, często bardzo uziarnione; w pierwszym pokoleniu na surowicy z gliceryną rosną bardzo skąpo, gorzej aniżeli typ ludzki; na powierzchni buljonu glicerynowego rosną w postaci delikatnej, lekko marszczącej się błonki; dla zwierząt są zjadliwsze, aniżeli typ ludzki (do wstrzyknięć, w celu odróżnienia od typu ludzkiego, używa się królików, które są bardzo na typ zwierzęcy wrażliwe).

Doświadczenie na zwierzętach jest konieczne, gdy chodzi o odróżnienie lasiecznika gruźlicy od innych prątków kwasoodpornych, przede wszystkim od lasieczników łożu napletkowego (*bac. smegmae*), zwłaszcza, gdy poszukuje się lasieczników Koch'a w moczu. Lasieczniki łożu napletkowego występują w łożu napletkowym, w fałdzie odbytowej, a zwłaszcza w moczu, licznie układając się na nabłonkach. Barwią się jak lasieczniki gruźlicze, ale są od nich krótsze i delikatniejsze, różnicować je można drogą szczepienia świnkom, dla których są nieszkodliwe.

W mleku i przetworach jego mogą znajdować się lasieczniki gruźlicy. Mogą jednak, podobnie jak w niektórych roślinach, znajdować się i inne prątki kwasoodporne, nie gruźlicze; stanowią one dużą grupę lasieczników rzekomo-gruźliczych. Na preparatach barwionych morfologicznie niczem nie różnią się one od prątków gruźliczych. Zasadniczo

jednak różnią się od laseczników Koch'a, które są i kwasoodporne, odbarwiają się zaś pod wpływem alkoholu. Cecha ta jednak nie jest stałą, spotykają się bowiem szczepy rzekomo-gruźlicze, które także trudno odbarwiają się nawet alkoholem absolutnym<sup>1)</sup>. Laseczniki rzekomo-gruźlicze rosną w hodowli łatwiej i prędzej, aniżeli laseczniki Koch'a. U świnek morskich wywołują nieznaczne zmiany chorobne; od wstrzyknięcia podskórnego występuje co najwyżej nieznaczne obrzmienie najbliższych gruczołów; do narządów wewnętrznych prątki rzekomo-gruźlicze dostają się bardzo rzadko i nie wywołują nigdy zserowacenia, lecz tylko ropienie lub zmiany włókniste.

Do grupy laseczników kwasoodpornych należy też l a s e c z n i k t r ą d u (*bac. leprae*). W hodowli nie otrzymano go jeszcze — przynajmniej nie ma pewności, że drobnoustroje, wyhodowane jako swoiste, istotnie wywołują trąd; spotyka się go w tkankach (w guzowatej postaci trądu) bardzo obficie; zawiera ziarna (granula), niekiedy zgrubienia na końcach (postaci inwolucyjne). Dla świnek morskich nie jest chorobotwórczy.

W przebiegu włóknikowego zapalenia płuc (pneumonia crouposa) znajdują się w płwocinie niekiedy w wielkiej

<sup>1)</sup> Do różnicowania stosować można metodę Ziehl-Neelsen'a, używając do odbarwienia alkoholu absolutnego, lub też metodę Honsell'a: 1) zabarwić preparat fuksyną karbolową (na gorąco), 2) zmyć wodą i wysuszyć, 3) odbarwić alkoholem kwaśnym przez 10 minut (alkohol abs. — 97,0. HCl — 3,0), 4) zmyć wodą, 5) zabarwić rozcieńczonym roztworem alkoholowym błękitu metylenowego.

ilości dwoinki swoiste t. zw. pneumokoki (*diplococcus lanceolatus* A. Fränkel-Weichselbaum'a, *pneumococcus*, Talamon, 1883, Fränkel, 1884). [Znaleść je można zresztą często i w jamie ustnej ludzi zdrowych]. Na preparatach, barwionych rozcieńczonym barwnikiem anilinowym lub metodą Gram'a, widać dwoinki o postaci lancetowatej (kształtu płomienia świecy) ostreimi końcami zwrócone nazewnątrz, zaokrąglonemi — ku sobie. Dwoinki te barwią się metodą Gram'a dodatnio, posiadają wyraźną otoczkę, niekiedy tworzą krótkie łańcuszki (z 4—6 osobników). Są bardzo zmiennej wielkości — obok małych osobników spotykają się bardzo wielkie. Są nieruchome, nie posiadają rzęsek, nie tworzą zarodników. Otoczki, występujące jedynie w pomysłnych warunkach, (rzadko w pożywkach) mają postać pasa barwiącego się jaśniej, aniżeli dwoinka i otaczającego drobnoustrój. Pneumokoki są względnyimi beztlenowcami; optimum ciepłoty jest  $37^{\circ}$ , rosną też i w ciepłocie  $25^{\circ}$  i  $42^{\circ}$ . Hodować je można na surowicy Loeffler'a, na agarze lub buljonie z krwią (najlepiej ludzką, hemolizy nie wywołują), na agarze z gliceryną; w dalszych pokoleniach rosną i na agarze zwykłym w postaci drobniutkich, delikatnych kolonji, przypominających krople rosy. Najłatwiej wyhodować je z krwi (serca lub narządów) zwierząt, padłych od wstrzyknięcia płwociny, zawierającej pneumokoki. Na zakażenie pneumokokami wrażliwe są zwłaszcza białe myszy ( $0,1 \text{ cm}^3$  płwociny zawierającej pneumokoki wystarcza, aby zwierzę padło po 24-48 godzinach) oraz króliki (giną po wstrzyknięciu  $0,5 - 1 \text{ cm}^3$  płwociny). Hodowle pneumokoków należy przeszczepiać na świeże pożywki co parę



dni, najwyżej co tydzień, oraz od czasu do czasu przeprowadzać przez zwierzęta. Pneumokoki rozpuszczają się w solach żółciowych (1 cm<sup>3</sup> 24 godz. hodowli buljonowej + 1 cm<sup>3</sup> 10% świeżo przygotowanego roztworu taurocholany sodu), czem różnią się od paciorkowców tworzących otoczki, a zwłaszcza od biologicznie zupełnie do nich podobnego paciorkowca *streptococcus mitis*. Do różnicowania otoczkowców służy też metoda optochinowa (Nachmann'a). Optochina (aethylhydrocupreina) działa hamująco na pneumokoki w ustroju i in vitro; w rozcieńczeniu do 1:800.000 optochina powstrzymuje rozwój pneumokoków, a na paciorkowce, meningokoki i gonokoki wywiera ona wpływ hamujący w większej koncentracji — 1:5.000. Nachmann przygotowuje buljon z płynem z jamy brzusznej z dodatkiem optochiny (1:100.000), i przechowuje go w chłodnym miejscu: pneumokoki w podłożu tem nie rosną, podczas gdy rozwój paciorkowców odbywa się prawidłowo.

Niekiedy w przebiegu ciężkiego zapalenia płuc pojawia się nie dwoinka, lecz prątko otoczkowego (*pneumobacillus, bacillus pneumoniae* Friedländer'a, 1882). Jest to krótki nieruchomy lasecznik, z zaokrąglonymi końcami, układający się niekiedy w krótkie nici; w ciele zwierzęcia tworzy wyraźną otoczkę. Barwi się wszystkimi barwnikami, Gram —. Rośnie na wszelkich pożywkach. Na agarze tworzy białawy, śluzowato szklisty, ciągnący się okład; na agarze z cukrem gronowym, oraz w buljonie z cukrem gronowym wydziela gaz i tworzy kwas. Mleka nie ścina i tem różni się od *bac. lactis aerogenes*, którego bardzo przypomina pod względem morfolo-

gicznym. Na żelatynie tworzy kuliste kolonie, wystające ponad powierzchnię; pożywki nie rozrzedza, niekiedy nadaje jej ciemną barwę; zarodników nie tworzy. Dla świnek morskich i myszy lasecznik jest chorobotwórczy po podaniu podskórnem (septicaemia).

Nadzwyczaj podobny do lasecznika Friedländer'a pod względem biologicznym jest hodowany w przebiegu twardzieli nosa lasecznik swoisty (*bac. rhinoscleromatis*, Fritsch, 1882).

W płwocinie, jak również w wydzielinie z nosa od osób chorych na grypę (influenzę) znajdujemy w wielkiej ilości (także i wewnątrz ciałek ropnych) prątki (*bac. influenzae*) opisane przez R. Pfeiffer'a (1889)<sup>1)</sup>. Jest to jeden z najdrobniejszych ze znanych drobnoustrojów (wielkości 0,2—0,5  $\mu$ ), leżący często parami (duże podobieństwo do dwoinek), niekiedy układający się w nici, nieruchomy, niewytwarzający zarodników, Gr —, barwi się dobrze rozcieńczoną (1 : 10) fuksyną karbolową. W pierwszym pokoleniu rośnie na pożywkach zwykłych wprost z nierozcieńczonej płwociny, w dalszych pokoleniach koniecznie wymaga obecności hemoglobiny; do hodowania laseczników najlepiej nadaje się agar z krwią gołębia, królika lub człowieka. W ciepłocie 37°

<sup>1)</sup> W przebiegu ostatnich epidemji grypy (1918—19) prętka Pfeiffer'a nie znajdowano albo wcale, albo naogół rzadko. Znajdywano natomiast i hodowano z ropy, płwociny itp. paciorkowce, pneumokoki, gronkowce, a także drobnoustroj swoisty *diplostreptococcus epidemicus*, Gr. +, rosnący delikatnie na agarze zwykłym, wywołujący na podłożach z krwią hemolizę.

tworzy — tylko w obecności tlenu — drobnutkie, delikatne kolonje, przypominające kropelki rosy. Jest bardzo wrażliwy na warunki zewnętrzne, zwłaszcza na wysychanie. Chorobotwórczy tylko dla ludzi; dla królików i świnek morskich — jedynie po dożylnem lub dootrzewnowem wstrzyknięciu dużych ilości czystej hodowli.

Do bakterjologicznego rozpoznania wystarcza naogół obraz drobnowidzowy w preparatach z plwociny, barwionych rozcieńczoną fuksyną karbolową — w razie wątpliwości uzupełnia się badanie hodowlą. Inne, podobne do lasecznika influenzy, drobnoustroje, znajdujące się w jamie ustnej, rosną obficie na pożywkach zwykłych i w dalszych pokoleniach nie wymagają hemoglobiny. Bardzo zbliżone w swych własnościach biologicznych i morfologicznych do lasecznika grypy są prątki Koch-Weeks'a, wywołujące zapalenie spojówek; rosną na podłożach z krwią.

Do lasecznika influenzy podobny jest też prątek krztusca (koklusu), *bac. pertussis* (Bordet-Gengou, 1900). Jest to lasecznik Gr —, łatwo barwiący się rozcieńczonymi barwnikami anilinowymi, przyczem barwi się ciemniej na biegunach, niż pośrodku, leży zwykle pojedynczo, niekiedy w łańcuskach; nie posiada ruchu, nie wytwarza zarodników. Rośnie początkowo najłatwiej na agarze z krwią (od jakiegokolwiek bądź zwierzęcia), później i na pożywkach bez hemoglobiny (agar z surowicą, z płynem puchlinowym z jamy brzusznej, wreszcie na agarze zwykłym); doskonale też rośnie w buljonie, zmiesza-



nym pół na pół z surowicą. Hodować go można z wykrztusiny osób chorych; dopiero po 48 godz. w 37° daje na pożywkach drobne, bezbarwne, okrągłe kolonie o barwie białawej. Jest tlenowcem bezwzględnym. Dla zwierząt jest niechorobotwórczy, chyba w wielkich ilościach — wówczas zabija świnki morskie, króliki i myszy.

Pozatem znajdują się często w płwocinie<sup>1)</sup>: paciorkowce (str. 97), gronkowce (str. 98), laseczniki ropy błękitnej (str. 106), czworniaki (*micrococcus tetragenus*), ziarnikowce nieżytowe (*micrococcus catarrhalis*), wreszcie mogą być i laseczniki dżumy.

Czworniak (*micrococcus tetragenus*) biały i czerwony występuje w postaci czterech ziarnikowców, ułożonych w kwadrat, otoczony otoczką. Jest Gr +. Rośnie łatwo na wszystkich pożywkach; na agarze tworzy białe, nieprzezroczyste, błyszczące kolonie, w buljonie tworzy osad (pożywka pozostaje przezroczysta); żelatyny nie rozrzedza. Chorobotwórczy dla świńek morskich.

Ziarnikowiec nieżytowy (*micrococcus catarrhalis*) jest dwoinką, leżącą pojedynczo lub w grudkach, nigdy zaś w łańcuszkach. Bardzo podobny do gono- i meningokoków, jest również Gr —, niekiedy leży wewnątrz-komórkowo wokół jądra. Rośnie na agarze z krwią lub z płynem puchlinowym z jamy brzusznej oraz na surowicy Loeffler'a. Żelatyny nie rozrzedza. W buljonie tworzy osad (po-

<sup>1)</sup> Zrzadka — laseczniki duru brzuszego w przebiegu tego cierpienia, laseczniki wąglika, laseczniki błonicy prawdziwej lub rzekomej, krętki.

żywka pozostaje przezroczysta), a po paru dniach — błonkę na powierzchni.

Lasecznik dżumy (*bac. pestis* — Kitasato-Yersin, 1894) znajduje się w płwocinie chorych (forma płucna dżumy) lub w ropie dymienic (bubonów — postać dymienicowa, bubonowa), a także we krwi (o ile następuje zakażenie ogólne — septicaemia — biorące początek bądź z dymienic, bądź ze skóry, z migdałów itp.). Badanie chorych ludzi lub zwierząt polega na: 1) przygotowaniu preparatów drobnowidzowych; 2) hodowli na płytkach agarowych w 30° i 22° oraz na płytkach żelatynowych (22°); 3) szczepieniu świnkom morskim i szczirom (najlepiej u nasady ogona) i badaniu bakteriologicznem padłych zwierząt, 4) utożsamianiu wyhodowanych drobnoustrojów zapomocą aglutynacji i precypitacji. Ze względu na niebezpieczeństwo, praca z lasecznikami dżumy dozwolona jest naogół jedynie w specjalnie urządzonych i zabezpieczonych pracowniach.

Prątek dżumy jest to krótki, gruby drobnoustrój, zaokrąglony na obydwu końcach, nieruchomy, nie wytwarzający zarodników. Barwi się wszystkimi barwnikami anilinowymi, Gr —, przeważnie posiada wyraźne zabarwienie biegunowe przy barwieniu metodą Ziehl-Neelsena, zwłaszcza w preparatach mazań, pochodzących z ustroju zwierzęcego. Wyróżnia się jednak wielopostaciowością, zarówno co do swej wielkości (nieraz długie laseczniki), jak i co do kształtu: postaci maczugowate, kuliste, wygięte, drożdżakowate — wszystko to są, zapewne, formy in-

wolucyjne, występujące w niepomysłnych dla rozwoju warunkach zarówno w czystej hodowli, jak i w ustroju zwierzęcym. Rosną najlepiej w ciepłocie 25—30° na pożywkach o odczynie obojętnym lub słabo zasadowym w warunkach tlenowych. Na agarze po 24 godzinach drobnoustrój tworzy dwa rodzaje kolonji: jedne drobne, ledwo widoczne, bardzo charakterystyczne (z ciemnym ziarnistym ośrodkiem i szerokim przezroczystym pasem nazewnątrz) oraz duże (w znacznie mniejszej ilości), nieprzezroczyste, płaskie, o gładkim, falowanym brzegu; na żelatynie tworzy na powierzchni (po 3-4 dniach) małe, przezroczyste kolonje; pożywki nie rozrzedza; w buljonie daje skąpy osad i błonkę z wyrostkami biegnącymi w głąb przezroczystej pożywki („stalaktyty“); układa się w długie nici, przypominające łańcuchy paciorkowców. Wytwarza endotoksyny; jest wysoce chorobotwórczy dla bardzo wielu zwierząt; do doświadczeń używa się zwykle świnek morskich, a częściej jeszcze szczurów (szczepienie u nasady ogona zawsze sprowadza zejście). Zwierzęta padają bez względu na sposób zakażenia (podskórnie, dootrzewnowo, per os, do spojówki oczu lub śluzówki nosa, przez wdychanie). Szczegóły i dane kliniczne — patrz podręcznik specjalny.

### **Badanie kału.**

W kale znajduje się zwykle bardzo duża ilość drobnoustrojów, o czym można przekonać się badając preparaty mazane, zabarwione rozcieńczoną fuksyną karbolową lub



metodą Gram'a. Widzimy wówczas laseczki Gr+ i Gr—, różne rodzaje ziarniaków, krętków, czworniaków, grzybków, drożdży itp.; zwykle przeważają jednak laseczniki okrężnicy (*bacillus coli communis*). Przy mlecznym odżywianiu spotykamy w kale w dużej ilości lasecznik mlekowy (*bac. lactis aërogenes*), prócz tego często rozwija się lasecznik sienny (*bac. subtilis*), lasecznik odmieńca (*bac. proteus*), lasecznik zasadowy (*bac. faecalis alcaligenes*) i inne. Z kału posianego beztlenowo rośnie tylko ok. 10<sup>0</sup>/<sub>n</sub> drobnoustrojów, przyczem przeważać będą laseczniki z grupy kwasu masłowego i laseczniki peptonizujące Flügge'go. Najważniejszymi drobnoustrojami chorobotwórczymi spotykanymi w kale są: prątki duru brzuszego i durów rzekomych, laseczniki krwawej biegunki, przecinkowiec choleryczny, lasecznik gruźlicy, rzadziej paciorkowce i gronkowce, lasecznik węglik i lasecznik ropy błękitnej.

Lasecznik okrężnicy (*bac. coli communis*, Escherich, 1886). W kale, zarówno od człowieka zdrowego, jak i chorego, spotykamy laseczniki okrężnicy. Jest to najtypowszy przedstawiciel flory kiszki. Cały szereg cierpień, jak dur brzuszny, dury rzekome, krwawa biegunka, wywołany bywa przez różne drobnoustroje swoiste, pod względem morfologicznym podobne do lasecznika okrężnicy, różniące się jednak od niego pewnymi cechami biologicznymi. Wszystkie te drobnoustroje łączymy we wspólną, obszerną „grupę lasecznika okrężnicy“.

Lasecznik okrężnicy jest krótki (2—4  $\mu$  dług.), posiada końce zaokrąglone, w młodych hodowlach obdarzony jest ruchem, barwi się dobrze rozcieńczonymi barwnikami anilinowymi, Gr—. Posiada rzęski w mniejszej jednak ilości,

niż lasecznik duru, jest względnym tlenowcem, najobficiej rośnie w ciepłocie 37<sup>o</sup>, na pożywkach z cukrem wytwarza bardzo dużo kwasu (czasem ginie nawet od nadmiaru wytworzonego kwasu), na pożywkach bezbiałkowych rośnie dobrze. Na żelatynie daje kolonie podobne do kolonji durowych, ale bardziej spoiste, okrągłe, szarawe; pod słabem powiększeniem, w młodych hodowlach, nie można ich odróżnić od kolonji tyfusowych, w hodowlach 3 - 4 dniowych różnią się od tych ostatnich spoistością i żółtem zabarwieniem; pożywki nie rozrzedza. Na agarze rośnie obficie i bardziej soczyscie, niż lasecznik durowy. W buljonie daje męt i śluzowaty osad, czasem błonkę na powierzchni. Mleko zawsze ścina; na kartoflu rośnie w postaci żółtego — w starszych hodowlach brunatnego —, lśniącego okładu. „Wysoki“ agar cukrowy (z dekstrozą) zostaje rozsadzony wskutek wytwarzanego CO<sub>2</sub>, podobnie jak i agar z czerwienią obojętną. W hodowlach buljonowych wytwarza indol w dużych ilościach. W pożywkach z cukrami (słodowym, gronowym, mlekowym), zarówno jak i z wielowartościowemi alkoholami (mannit, dulcyt), wytwarza kwas.

Jeśli lasecznik okrężnicy przedostanie się do dróg moczowych (pęcherza, cewki) wywołuje stan zapalny (cystitis, urethritis, nephritis supurrativa i in.). Pozatem może wywoływać zapalenie otrzewnej wskutek przedziurawienia ścian kiszek z jakiegokolwiek bądź powodu, następnie może przedostawać się do krwi i wywoływać ogólne zakażenie (colisepticaemia). Podobnie i u zwierząt może wywoływać w różnym stopniu stany zapalne; istnieją jednak szczepy dla zwierząt zupełnie nieszkodliwe.

Istnieje wiele odmian bakterji, opisanych przez różnych

autorów pod różnemi nazwami, które są właściwie tylko pewnemi odmianami lasecznika okrężnicy; różnią się one między sobą jedynie brakiem jednej lub kilku cech biologicznych, wymienionych wyżej.

Dla zwierząt (świnek morskich, królików) przy wprowadzeniu dożylnie, dootrzewnowo lub podskórnie las. okrężnicy zabójczy jest jedynie po zadaniu w bardzo dużych ilościach.

Lasecznik duru brzuszno (bac. typhi abdominalis Eberth, 1880). Badanie kału: jeśli kał jest stały, rozcieramy grudkę (wielkości ziarna grochu) w kilku cm.<sup>3</sup> jałowego fizjologicznego roztworu soli, jeśli zaś płynny, rozcieńczamy kilka kropel w 1 cm.<sup>3</sup> soli fizj.; o ile w kale znajdują się kłaczkowate, to zostają one zużyte do posiewu, po uprzednim opłukaniu ich w fizjol. roztworze soli. Kroplę rozcieńczonego lub przemytego materiału umieszczamy na jednej z szeregu płytek z pożywką specjalną (najlepiej Endo lub Conradi-Drygalskiego) i rozcieramy ją na całej powierzchni płytki zapomocą uprzednio przepalanej bagietki szklanej, zgiętej pod kątem prostym; następnie tą samą bagietką — nie przepalając jej — wodzimy po powierzchni drugiej, trzeciej itd. płytki, i w ten sposób, wprowadzając na płytki coraz mniej materiału, otrzymamy na nich oddzielne kolonie. Po 18 — 24 godzinach (przy 37°) badamy wzrost na płytkach. Z podejrzanych kolonii robimy preparaty mazane barwione metodą Gram'a; o ile są to laseczniki Gr.—, robimy próbną aglutynację mikroskopową (w kropli wiszącej) z wysokowartościową surowicą tyfusową (w rozcieńczeniu 1 : 200, 1 : 400); często hodowle w pierwszym pokoleniu nie zlepiają się surowicą wyso-



kowartościową swoistą i dlatego, nawet przy ujemnym wyniku aglutynacji, przeszczepiamy podejrzone kolonie na pożywkę Endo lub agar skośny.

Nazajutrz z czystej hodowli nastawiamy „sprawdzian” (str. 96), oraz zawiesinę, przygotowaną z tej hodowli, aglutynujemy wysokowartościową surowicą tyfusową.

Prątek duru brzuszego jest cienki, krótki (1—2  $\mu$ ), z zaokrąglonymi końcami, silnie ruchomy (posiada kilkanaście, przeważnie 10—12 rzęsek), na podłożach sztucznych często tworzy długie nici, zarodników nie tworzy. Rozcieńczonymi barwnikami anilinowymi barwi się łatwo, Gr— (jak wszystkie laseczniki z grupy las. okrężnicy). Rośnie na wszelkich pożywkach o odczynie słabo zasadowym, najlepiej w ciepłocie 37<sup>o</sup>. Na agarze tworzy małe, wilgotne, szaro-białe, przezroczyste kolonie (delikatniejsze i mniejsze od kolonii las. okrężnicy). Na żelatynie powierzchniowe kolonie mają wygląd swoisty: są delikatne, świecące, o zygzakowatych konturach; wewnątrz kolonii znajdują się rysy, przypominające żyłki liścia winogronowego (wygląd ten nie jest ściśle swoisty dla kolonii durowych, gdyż istnieją gatunki lasecznika okrężnicy, które dają podobne kolonie). Żelatyny nie rozrzedza. W buljonie tworzy męt jednolity. Na kartoflu rośnie w postaci żółtawo-białego nalotu. Na pożywce Endo tworzy różowe, przezroczyste kolonie. Na pożywce Conradi-Drygalskiego tworzy niebieskie przezroczyste kolonie, przypominające krople rosy (wielkości ziarenek piasku). Na agarze z zielenią malachitową Loeffler’a rośnie w postaci bardzo drobnych, przezroczystych, delikatnych kolonii. Mleka nie ścina. Na serwatce lakmusowej tworzy nieco kwasu, bez zmętnienia pożywki. Agaru z cu-

krem gronowym nie rozsadza (nie wytwarza  $\text{CO}_2$ ), agaru z czerwienią obojętną nie zmienia. Pożywkę Barsiekow'a z cukrem gronowym zaczerwienia, czasem nawet ścina; ta sama pożywka z innymi cukrami zostaje niezmieniona lub co najwyżej lekko zaczerwieniona, z wyjątkiem pożywki z laktozą, która nigdy nie zostaje zmieniona. Indolu nie wytwarza. Dla zwierząt (świnek morskich, królików i in.) jest słabo chorobotwórczy: zakażenia *per os* dawały dotychczas zawsze wyniki ujemne; natomiast zwierzęta, dłuższy czas karmione lasecznikami duru, mogą być ich wydalaczami. Zwierzęta, którym podano dożylnie lub podskórnie duże ilości laseczników tyfusowych giną przeważnie od zatrucia endotoksynami.

Laseczniki durów rzekomych A i B (*bac. paratyphi A* Brion-Kayser i *B* Achard i Bensaude, 1896) i laseczka Gärtner'a (*bac. enteritidis Gaertneri*). Rozróżniamy dwa typy laseczników paradurowych: lasecznika duru rzek. A i lasecznika duru rzek. B. Cierpienie, wywołane przez pierwszy drobnoustrój, występuje częściej w krajach zwrotnikowych, przez drugi — w naszym klimacie. Lasecznik duru rzek. B wywołuje dwójakiego rodzaju objawy kiszkowe: albo cierpienie bardzo zbliżone do przebiegu duru brzuszego, albo też ostry niezbyt kiszek (*gastroenteritis acuta, cholera nostras*). Obydwa te rodzaje cierpienia spowodowane są najczęściej zatruciem mięsem lub innymi produktami spożywczymi (owoce, jarzyny, pieczywo).

Prątek Gärtner'a, hodowany z kału przy zakaźnym zatruciu mięsem, wywołuje objawy podobne do duru rzekomego B.

TABLICA II-ga.

	Lasecznik okrężnicy	Lasecznik duru brzuszego	Lasecznik duru rzek. A	Lasecznik duru rzek. B.	Lasecznik Gaertner'a	Lasecznik zasadotwórczy
<i>Ruch.</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Gram.</i>	Staby, lub brak.	Postepowy.	Postepowy.	Postepowy.	Postepowy.	Postepowy.
<i>Zelatyna</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Buljon</i>	Nierozrzedzona, żółtawe kolonie, przypominające las, t.jf.	Nierozrzedzona, bezbarwne kolonie w postaci liścia winogr.	Nierozrzedzona.	Nierozrzedzona.	Nierozrzedzona.	Nierozrzedzona.
<i>Mcleko</i>	Męt, osad silny, zowaty często błonka.	Męt jednolity.	Męt jednolity.	Męt jednolity.	Jak Para B.	Męt jednolity
<i>Serw. lakm.</i>	Ścięte	Niezmienione.	Niezmienione.	Niezmienione.	"	Niezmienione.
<i>Basilekows</i>	Silnie zaczerw. mętna.	Lekko zaczerwieniona, przezroczysta.	Wyraźnie zaczerwieniona, lekko zmącona.	Wyraźnie zaczerwieniona; po 8 do 14 dn. powraca niebieskie zabarw.	"	Wyraźnie niebieska.
<i>Poz. z dekstrozą</i>	Ścięta.	Zaczerwieniona aż do strątu.	Zaczerwieniona i strącona	Zaczerwieniona i strąt.	"	Niezmieniona.
<i>z laktozą</i>	"	Niezmieniona.	Niezmieniona.	Niezmieniona.	"	Niezmieniona.



Poz. Barskiejowa	z mannilem	ścięta	Zaczerw., brak gazu.	Zaczerw., brak gazu.	Zaczerw., gaz,	Jak Para B.	Niezmieniona.
	z maltozą	"	Lekko zaczerw., lub niezmieniona.	Zaczerw. lub ścięta.	Zaczerw. lub ścięta	"	Niezmieniona.
Agar z cukr. gronowym	Rozsadzony (duża ilość gazu).	Niezmieniony.	Rozsadzony.	Rozsadzony.	Rozsadzony.	"	Niezmieniony.
Agar z czerw. obojętną	Rozsadzony, fluorescencja.	Niezmieniony.	Rozsadzony, fluorescencja.	Rozsadzony, fluorescencja.	Rozsadzony, fluorescencja.	"	Niezmieniony.
Conradi-Dryg.	Czerwone, duże kolonie.	Małe, przezroczyste kolonie.	Małe, delikatne niebieskawe kolonie.	Małe, delikatanie niebieskawo kolonie.	Niebieskie, soczyste kolonie.	"	Niebieskie kolonie.
Endo	Czerwone, tłuste, duże kolonie.	Małe, przezroczyste, różowe kolonie.	Małe, przezroczyste, różowe kolonie.	Małe, przezroczyste, różowe kolonie.	Małe, przezroczyste, różowe kolonie.	"	Różowe kolonie.
Zieleni mal. Loeffler'a	Wzrost bardzo skąpy lub brak go zupełnie.	B. drobne przezroczyste kolonie.	Małe delikatne kolonie.	Małe delikatne kolonie.	Wzrost obfity, kolonie z żółtym zabarw.	"	Drobne przezroczyste kolonie.
Indol	Wytwarza.	Nie wytwarza.	Nie wytwarza.	Nie wytwarza.	Nie wytwarza.	Nie wytwarza.	Nie wytwarza.

Trzy te odmiany drobnoustrojów przypominają morfologicznie w zupełności lasecznika durowego, różnią się jednak od niego, zarówno jak i między sobą, własnościami w hodowlach, odczynami surowiczymi oraz własnościami chorobotwórczymi. Lasecznik duru rzek. B oraz lasecznik Gärtner'a w hodowlach nie różnią się od siebie; własności ich podane są na tablicy II. Odróżnić je można tylko za pomocą aglutynacji. Przy pomocy odczynu aglutynacji można również oddzielić laseczniki rzekomodurowe od pozostałych laseczników z grupy coli; często jednak surowice wysokowartościowe rzekomo-durowe zlepiają laseczniki durowe i naodwrot. Zjawisko to polega na t. zw. „aglutynacji grupowej“ (conagglutinatio) i występuje zwykle tylko w niższych rozcieńczeniach, dlatego należy w takich wypadkach aglutynować szczepy aż do miana surowicy wzgl. wykonać odczyn Castellani'ego <sup>1)</sup>).

W przeciwieństwie do prątku durowego, lasecznik duru rzek. B jest silnie chorobotwórczy dla zwierząt (świnek morskich, myszy). Już minimalna dawka  $\frac{1}{10000}$ — $\frac{1}{1000}$  uszka, zadane dootrzewnowo, lub  $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{20}$  uszka, zadana podskórnice, zabija zwierzę przy objawach zakażenia.

Lasecznik duru rzek. A zabija myszy w zakażeniu zwierzęcia per os (po zadaniu w pokarmach).

O laseczniku zakaźnym (*bac. alcaligenes*) patrz tablicę II.

Lasecznik botulizmu (*bac. botulinus*). Zatrucie mięsem (zwł. kiełbasą, niekiedy konserwami), t. zw. botu-

<sup>1)</sup> Surowica durowa nawet w rozcieńczeniu bliskim miana aglutynuje laseczniki Gärtner'a; do którego z gatunków należy drobnoustroj, rozstrzygają inne cechy biologiczne.

lizm, prowadzące do porażenia układu nerwowego ośrodkowego (objawy opuszkowe), wywołane bywa przez trującą prątkę botulizmu, wykrytego w 1895 roku przez v. Ermengem'a. Las. botulizmu jest bezwzględnie beztlenowcem, długości 4—6  $\mu$ , Gram +, posiada słaby ruch, tworzy zarodniki. Najlepiej rośnie na pożywkach silnie zasadowych z dodatkiem cukru. Na żelatynie z dodatkiem cukru tworzy w młodych hodowlach okrągłe gładkie kolonie, złożone z grubych lśniących ziaren, będących w ciągłym ruchu, w starszych hodowlach kolonie stają się brunatne, brzeg staje się nieprawidłowy, ruchome ziarna układają się tylko na brzegu kolonii; pożywka zostaje rozrzedzona. Laseczka botulizmu rozkłada cukier gronowy, cukru zaś mlekowego i trzcinowego nie zmienia; mleko ścina. W buljonie cukrowym hodowle posiadają zapach kwasu masłowego. Optimum ciepłoty leży między 18° a 25°; w ciepłocie 37° tworzy w hodowli buljonowej długie nici. Zarodniki giną w ciepłocie 80° już po 1/2 godziny. Drobnoustrój wprowadzony do organizmu per os lub podskórnie wywołuje cierpienie swoiste, nie rozmnażając się jednak w ustroju; objawy chorobne następują więc wskutek działania toksyny. Na zakażenie per os bardzo wrażliwe są świnki morskie, myszy, mniej króliki. Rozpoznanie botulizmu opiera się na wykryciu drobnoustrójów i ich truczyn w pokarmach, które wywołały zatrucie. Zwierzęta, karmione zakażonym pokarmem, już po 6—12 godzin zdradzają objawy chorobne: poruszają się z trudem (porażone kończyny!), oczy mają zamknięte i giną po 24—30 godzinach.

Laseczniki krwawej biegunki (*bac. dysen-*



*teriae*). Badania kału na obecność prątków krwawej biegunki należy dokonywać w możliwie najszybszym czasie po oddaniu kału przez chorego, gdyż laseczniki te giną bardzo szybko (nawet jeśli laseczniki krw. biegunki znajdują się jeszcze w kale, zostają one w krótkim czasie zaoszczędzone przez laseczniki okrężnicy). Laseczniki swoiste wykryć można bez trudności, jeśli w kale znajdują się krwistośluzowate kłaczki; często trzeba badanie powtarzać kilkakrotnie.

Najodpowiedniejszymi podłożami do hodowania las. krwawej biegunki z kału są pożywki Endo i Conradi-Drygalskiego. Ta ostatnia pożywka, wbrew twierdzeniu niektórych autorów, że fiolet kryształowy hamuje wzrost laseczek krwawej biegunki, nadaje się bez żadnych zmian do hodowania drobnoustrojów swoistych. Badanie kału odbywa się w następujący sposób: z wyszukanych z kału kłaczek śluzowatych przygotowujemy preparaty mazane i barwimy je rozcieńcz. fuksyną karbolową; o ile w kale znajduje się lasecznik krwawej biegunki, to widzimy go na preparatach tych w prawie czystej hodowli. Następnie po opłukaniu kłaczek w jałowym fizjologicznym roztworze soli, wysiewa się je przez rozsmarowanie na płytkach z pożywką Endo lub Conradi-Drygalskiego.

Badanie płytek następuje po 16—24 godzin. w 37°. Podejrzane kolonie aglutynujemy mikroskopowo surowicami wysokowartościowymi różnych typów w rozcieńczeniu  $1/100$ ,  $1/200$  i  $1/400$  oraz przeszczepiamy na agar skośny lub pożywkę Endo, aby otrzymać czystą hodowlę, z której następnego dnia nastawiamy „sprawdzian“, oraz robimy aglutynację makroskopową; o ile podejrzanych kolonii jest na

płytkę większa ilość, robimy z nich bezpośrednio sprawdzian, przez co przyspieszamy wynik badania o 24 godz.

Zarówno pod względem etiologicznym, jak i pod względem przebiegu klinicznego, rozróżniamy dwa rodzaje krwawej biegunki: jeden rodzaj, spotykany we wszystkich klimatach — wywołowany przez bakterje, i drugi, występujący tylko w klimacie gorącym — wywołowany przez pełzaki (ameby). O postaci ostatniej mówić tu nie będziemy.

Lasecznik krwawej biegunki został wykryty przez Kruse'go (1897) i mylnie opisany jako ruchomy; omyłkę tę poprawił Shiga w tym samym roku, wskutek czego bakterji nadano nazwę Shiga-Kruse. Lasecznik ten jest bardzo jadowity — przez wytwarzanie endotoksyny wywołuje w ustroju ciężkie zatrucia. Jadowite własności szczepu Shiga-Kruse umożliwiły przygotowanie surowicy antydyzenteryjnej leczniczej.

Wkrótce po wykryciu prątka Shiga-Kruse wykryto inne szczepy (Flexner, Hiss-Russel (Y), Strong), nie wytwarzające endotoksyn, a więc mniej jadowite, wywołujące cierpienie o znacznie łagodniejszym przebiegu klinicznym. Te właśnie szczepy, Kruse oraz jego zwolennicy oznaczają, jako szczepy pseudo-dysenterji, i zależnie od różnic w aglutynacji określają A, B, C...H. Inni autorzy (Lentz i in.) dzielą drobnoustroje swoiste na: 1) szczepy jadowite: typ Shiga-Kruse i 2) szczepy mniej jadowite (giftarme): a) typ Flexner, b) typ Hiss-Russel (Y), c) typ Strong. Mniej jadowite różnią się między sobą odmienną zdolnością zmieniania cukrów (stąd podział

autorów amerykańskich na szczepy zakwaszające, tj. laseczki pseudodyzenterji, oraz nie wytwarzające kwasu, tj. szczep Sh.-Kr.

Wszystkie wymienione tu szczepy dyzenterji morfologicznie nie różnią się między sobą. Są to krótkie laseczniki Gr—, z zaokrąglonymi końcami; wielkość laseczników nie jest stała i niektóre szczepy mają długość prątków dutowych, inne zbliżone są wielkością do koków. Nie posiadają ruchu postępowego, mają natomiast bardzo silny ruch cząsteczkowy (molekularny); zarodników nie tworzą. Barwią się łatwo rozcieńczonymi barwnikami anilinowymi. Rosną na wszelkich pożywkach; wiele hodowli, zwłaszcza typu Shiga-Kruse, posiada zapach swoisty, przypominający zapach nasienia (spermy). Na agarze tworzą okrągłe, płaskie kolonie, białawe, wilgotne, przezroczyste. Na żelatynie daje typ Shiga-Kruse i Strong po 48 godz. kolonie zupełnie podobne do kolonji tyfusowych (kształt liścia winogronowego), typ zaś Flexner'a i Hiss-Russel'a (Y) tworzy kolonie wypukłe, guziczkowate. Pożywki nie rozrzedzają. Wzrost na kartoflu (słabo kwaśnym) i w buljonie nie różni się od wzrostu laseczników tyfusowych. Na pożywce Conradi-Drygalskiego typy Shiga-Kruse, Flexner i Strong tworzą okrągłe kolonie, podobne do kropelek rosy, nie zmieniając barwy pożywki. Typ Hiss-Russel daje kolonie o brzegach zygzakowatych i nieprawidłowym kształcie, pożywkę lekko zaczerwienia. Na pożywce Endo wszystkie typy dają bezbarwne kolonie. Cechą charakterystyczną dla szczepów dyzenterji, jeśli hodowle przechowywać w ciemności i ciepłocie pokojowej, jest tworzenie wtór-



nych kolonii powierzchniowych o białym porcelanowym wyglądzie.

W mleku, na agarze z cukrem gronowym i czerwienią obojętną oraz w serwatce wszystkie szczepy rosną jednakowo: mleka nie ścinają, agaru cukrowego nie rozszadają, agaru z czerwienią oboj. nie zmieniają; serwatkę lekko zaczerwieniają bez tworzenia mętu. Co do wytwarzania indolu, to szczepy te zachowują się rozmaicie: lasecznik Shiga-Kruse nigdy nie wytwarza indolu, las. Flexner'a wytwarza go zawsze (w parodniowej hodowli buljonowej), laseczniki Hiss-Russel'a i Strong'a zachowują się rozmaicie – jedne szczepy wytwarzają indol, inne nie. Rozmaicie też zachowują się te 4 typy w stosunku do cukrów: maltozy i sacharozy oraz wielowartościowego alkoholu mannitu. Do sprawdzenia tych własności może służyć albo pożywka Barsiekow'a albo pożywka Lentz'a (poż. Lentz'a składa się z agaru zwykłego z dodatkiem lakmusu oraz 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> odpowiedniego cukru); pożywka Barsiekow'a może być zaczerwieniona wzgl. strącona, pożywka Lentz'a zaczerwieniona (na pożywce tej wyraźne zmiany występują dopiero po 48 godz. przy 37<sup>0</sup>). O zachowaniu się szczepów dyzenterji na różnych podłożach patrz tablicę III.

Typ Shiga-Kruse różni się więc od pozostałych niezjadliwych typów brakiem zdolności wytwarzania kwasu w pożywkach z mannitem, ujemnym wynikiem odczynu indolowego, zjadliwością oraz własnościami aglutynacyjnymi. Najpewniejszym środkiem różniczkowym jest odczyn aglutynacyjny, przyczem konieczne jest aglutynowanie szczepów aż do rozcieńczenia bliskiego miana danej suro-

TABLICA III-cia. x)

	<i>Las. Shiga-Kruse</i>	<i>Las. Flexner'a</i>	<i>Las. Hiss-Russell'a</i> (Y)	<i>Las. Strong'a</i>
<i>Ruch</i>	Silny, cząsteczkowy.	Silny, cząsteczkowy.	Silny, cząsteczkowy	Silny, cząsteczkowy.
<i>Gram</i>	—	—	—	—
<i>Żelatyna</i>	Nierozrzedzona, kolonie w postaci liścia winogronowego.	Nierozrzedzona, kolonie wypukłe, guziczkowate.	Nierozrzedzona, kolonie wypukłe, guziczkowate.	Nierozrzedzona; kolonie w postaci liścia winogronowego.
<i>Buljon</i>	Męt jednolity (czasem osad).	Męt jednolity.	Męt jednolity.	Męt jednolity.
<i>Mleko</i>	Nieścięte.	Nieścięte.	Nieścięte.	Nieścięte.
<i>Serwat. lakm.</i>	Lekko zaczerwieniona	Lekko zaczerwieniona.	Lekko zaczerwieniona	Lekko zaczerwieniona.
<i>Poz. Bartszkow'a</i> <i>z sacharozą</i> <i>z laktozą</i> <i>z mannitem</i> <i>z maltozą</i>	Niezmieniona.	Lekko zaczerwieniona.	Niezmieniona.	Niezmieniony.
	Niezmieniona.	Niezmieniona.	Niezmieniona.	Niezmieniony.
	Niezmieniona.	Ścięta.	Ścięta.	Ścięta.
	Lekko zaczerwieniona.	Ścięta.	(lub lekko zaczerwieniona).	Niezmieniona (lub lekko zaczerwieniona).

<i>Agar z cukr. gronowym</i>	Nierozsadzony.	Nierozsadzony	Nierozsadzony.	Nierozsadzony.
<i>Agar z czerw. obojętną</i>	Niezmieniony.	Niezmieniony.	Niezmieniony.	Niezmieniony.
<i>Conradi-Drygałski</i>	Okrągłe kolonie w postaci kropel rosły.	Okrągłe kolonie w postaci kropel rosły.	Kolonie o zryzakowanym brzegu; pożywka zacerwieniona,	Okrągłe kolonie w postaci kropel rosły.
<i>Čendo</i>	Kolonie bezbarwne.	Kolonie bezbarwne.	Kolonie bezbarwne.	Kolonie bezbarwne.
<i>z mannitem</i>	niezmieniona	zacerwieniona	zacerwieniona	zacerwieniona
<i>z maltozą</i>	niezmieniona	zacerwieniona	niezmieniona	niezmieniona
<i>Poz. Lenza z saetarozą</i>	niezmieniona	niezmieniona	niezmieniona	zacerwieniona
<i>Indol</i>	Nie wytwarza.	Wytwarza (po 3-8 dobach).	Przeważnie nie wytwarza.	Przeważnie nie wytwarza

\*) Podane zachowanie się szczepów dyzenteryjnych względem cukrów stosuje się tylko do szczepów, wyhodowanych bezpośrednio z organizmu. Starsze hodowle, które rosły czas dłuższy na podłożach sztucznych, nie zachowują się tak typowo.

Technika bad. bakt.



wicy wysokowartościowej, gdyż w niższych rozcieńczeniach aglutynację swoistą maskować może aglutynacja grupowa. Większą trudność przedstawia rozróżnianie pomiędzy sobą typów niejadliwych; aglutynacja nie oddaje tu wielkich usług, gdyż nawet w rozcieńczeniach surowicy bardzo wysokich — aż do miana — występuje aglutynacja grupowa (naprz. lasecznik Strong'a zostaje aglutynowany przez surowicę wysokowartościową szczepu Hiss-Russel'a i naodwrot, lasecznik Hiss-Russel'a zostaje zaglutynowany przez surowicę Strong'a) — decydują tu pozostałe własności biologiczne.

Surowica chorych na krwawą biegunkę pod koniec 2-giego, a zwłaszcza w trzecim tygodniu cierpienia aglutynuje zwykle szczep typu, który wywołał cierpienie. Dla typu Shiga-Kruse rozcieńczenie  $1/50 - 1/100$  jest już pod względem rozpoznawczym do pewnego stopnia miarodajne, zwłaszcza dla aglutynacji makroskopowej, o ile jest ona gruboziarnista (oglądać bez lupy!) — drobnoziarnista nie jest swoista. Dla innych typów rozcieńczenie  $1/100 - 1/150$  (inni autorzy podają wyższe) może mieć znaczenie rozpoznawcze.

Przecinkowiec choleryczny (*vibrio cholerae asiatica* R. Koch, 1883). Przy zbieraniu materiału od chorych, podejrzanych o cholereę, powinna być zachowana specjalna ostrożność. Kał, zebrany do próbki lub specjalnego naczynka z łyżeczką, zakorkowuje się szczelnie i wsuwa do blaszanki, tę ostatnią zalepia się plastrem przytrzymującym i wsuwa do drewnianki. Drewniankę wkłada się do skrzynki wypełnionej wiórami, trocinami lub opilkami torfowymi; wypełnia się dokładnie załączniki; na

paczce umieszcza się napis: Pilne! Ostrożnie! Materiał zakaźny! Wzięcie, opakowanie i przesłanie materiału musi być dokonane z największym pośpiechem, w przeciwnym bowiem razie wynik opóźnia się lub może wypaść wątpliwie. Należy pracowni bakterjologicznej (o ile materiał przesłany jest z daleka) podać uprzednio przypuszczalną godzinę nadejścia materiału cholerycznego wraz z zaznaczeniem, ile prób przesłano, czy sprawa tyczy świeżych przypadków chorobnych, czy też osób podejrzanych o szerzenie zarazków, czy też chodzi o badanie następcze.

Materiał podejrzany ze zwłok: o ile bakterjologicznie nie stwierdzono choroby, należy sekcję dokonać możliwie najszybciej i ograniczyć się ogółem do otwarcia jamy brzusznej i wyjęcia trzech skrętów jelita cienkiego. Przesyłać owe części jelit należy w naczyniach o grubych ścianach ze szlifowanymi korkami i szerokimi szyjami, o ile zaś nie można znaleźć takich naczyń, wówczas w naczyniu z gładką cylindryczną szyjką, którą należy zamknąć dobrze dopasowanym, świeżo wygotowanym korkiem. Naczynia należy przed użyciem wygotować w czystej wodzie, poczem usunąć resztki wody przez silne wstrząsanie; nie należy przepłukiwać naczyń żadnym płynem odkażającym. Nie należy również dodawać do materiału, przesyłanego do badania, żadnego płynu. Naczynia zamyka się szczelnie przez owiązanie korka pęcherzem lub papierem pergaminowym. Naczynia umieszcza się w mocnej skrzynce (lecz nie w pudełku od cygar lub tekturowem), okładając je watą, trocinami, wiórami itp. w ten sposób, aby leżały nieruchomo i nie obijały się o siebie. Załącza się przytem dokładnie wypełniony załącznik. Przesyłka, zawiadomienie, itd. — jak z materiałem, podejrzany o cholereę.

Wykrycie przecinkowca cholery (w kale, treści żołądkowej i wymiocinach) odbywa się w następujący sposób:

1) a) Z kału wyszukujemy kłaczki śluzowate, przygotowujemy z nich preparaty mazane i barwimy rozcieńczoną

fuksyną karbolową; na preparatach takich widać najczęściej typowe przecinkowce w wielkiej ilości — niekiedy nawet w czystej hodowli; zdarza się jednak, że przecinkowców jest na preparatach bezpośrednich tak mało, iż nie można odróżnić ich wśród bogatej flory kiszkowej. b) Kłaczek śluzowaty rozcieramy w odrobinie wody peptonowej i przygotowujemy z niej „kroplę wiszącą“, którą na  $\frac{1}{2}$  godz. wstawiamy do cieplarki przy  $37^{\circ}$ , poczem oglądamy pod mikroskopem: przecinkowce odróżniają się od innych drobnoustrojów nader silnym ruchem postępowym oraz właściwością skupiania się na brzegu kropli.

2) a) Metoda wstępna w wodzie peptonowej („Anreicherungsverfahren“): do kilku probówek z wodą peptonową dodajemy po 1 uszku kału (zamiast probówek, możemy używać kolbek z 150 cm.<sup>3</sup> wody peptonowej — wówczas należy dodać ok. 1 cm.<sup>3</sup> kału). b) Kilka uszek materiału badanego rozcieramy na szeregu płytek (podobnie jak w badaniu kału na tyfus) z agarem zasadowym, pożywką Dieudonné'go lub Hofer-Hovorka (str. 34—35). Następnie szczepimy materiał w ten sposób, że do kilku probówek z rozpuszczonym i ostudzonym agarem oraz żelatyną wprowadzamy tylko do pierwszych z szeregu probówek po uszku badanego materiału — następne zaś probówki zostają zakażone przez wprowadzenie z pierwszej probówki jednego uszka zakażonej pożywki do drugiej, z drugiej do trzeciej itd.; zakażone pożywki zostają wylane na płytki;

3) po 6-ciu godzinach przebywania w termostacie, na powierzchni zakażonej wody peptonowej, w razie obecności w kale przecinkowców cholerycznych, two-



rzy się błonka, która składa się z czystej hodowli; <sup>1)</sup>  
 a) błonkę tę przeszczepiamy na płytki z agarem zasadowym i pożywką Dieudonné'go lub Hofer-Hovorka oraz  
 b) oglądamy w kropli wiszącej i przygotowujemy preparaty mazane, barwione rozcieńczoną fuksyną karbolową;

4) po 24 godzinach badamy płytki, i z podejrzanych kolonji:  
 a) robimy próbną aglutynację (mikroskopowo), b) przeszczepiamy na agar skośny w celu otrzymania czystej hodowli;

5) z czystej hodowli na agarze skośnym robimy aglutynację makroskopową, rozcieńczając surowicę wysokowartościową choleryczną aż do jej miana. W razie wątpliwości wykonywujemy odczyn R. Pfeiffer'a.

Przecinkowce choleryczne są to silnie ruchome drobnoustroje (posiadają 1 rzęskę) długości ok. 1,5  $\mu$ , zgięte w kształcie przecinka. Barwią się łatwo rozcieńczonymi barwnikami anilinowymi, Gr—. Odróżniamy dwa typy przecinkowców cholerycznych: krótkie i grube (przypominające ziarniaki) oraz cienkie i dłuższe. Dwa te typy tworzą nieco odmienne kolonje: typ krótki — bardziej żółte, typ dłuższy — jasne, bezbarwne. W czystej hodowli przecinkowce układają się pod kątem tworząc półkola, literę S lub nici spiralnie skręcone (postaci inwolucyjne w starszych hodowliach buljonowych). Przecinkowce są bezwzględnie tlenowcami. Rosną na wszelkich pożywkach o odczynie silnie zasadowym. Na agarze po 18—24 godz. przy 37° tworzą małe przezroczyste niebieskawe kolonje. Na specjalnej pożywce Dieudonné'go lub Hofer-Hovorka dają duże, okrągłe, jasne kolonje z gładkim brzegiem. Na żelatynie po 24 godz.

<sup>1)</sup> O ile po 6-ciu godzinach na powierzchni pożywki przecinkowców nie znaleziono, sprawdzamy wzrost jeszcze po 12 i 24 godzinach.

przy 22<sup>0</sup> makroskopowo widać małe jasne punkty, które pod słabym powiększeniem przedstawiają się jako małe, okrągłe, świecące twory z nieprawidłowo pofałdowanymi brzegami. Powierzchnia kolonii jest ziarnista i silnie załamuje światło, przez co sprawia wrażenie, iż jest posypana odłamkami szkła. Żelatynę przecinkowce z wolna rozrzedzają, tworząc w pożywce „wysokiej“ przy kłutej hodowli charakterystyczny lej wzdłuż linii ukłucia. Na silnie zasadowym buljonie rosną bardzo obficie, dając całkowite zmętnienie pożywki oraz tworząc błonkę na powierzchni. Mleko ścinają, ściętą surowicę rozrzedzają. Najodpowiedniejszym podłożem dla przecinkowców cholerycznych jest zasadowa woda peptonowa; rozmnażają się w niej one szybciej, niż inne drobnoustroje i jako bezwzględne tlenowce zbierają się na powierzchni, tworząc błonkę. Jeśli do 24 godzinnej hodowli w wodzie peptonowej dodać kilka kropel stężonego kwasu siarkowego, to wystąpi w niej ciemno-bordo zabarwienie — t. zw. odczyn nitroz o - i n d o l o w y czerwieni cholerycznej B u j w i d a (Cholera-rotreaktion); odczyn ten nie jest jednak zupełnie swoisty, gdyż z całym szeregiem przecinkowców niecholerycznych daje on również wynik dodatni — brak go natomiast jest dowodem, że badane przecinkowce nie są choleryczne (przy wykonywaniu doświadczenia trzeba zawsze nastawić kontrolę ze sprawdzoną hodowlą choleryczną w tej samej wodzie peptonowej).

Najważniejszym środkiem, pozwalającym odróżnić przecinkowce choleryczne od innych przecinkowców, spotykanych w kale, wodzie itd., są metody serologiczne. Tylko te przecinkowce można uważać za choleryczne, które zostaną zlepione przez surowicę wysokowartościową cho-

leryczną w rozcięczeniu, bliskiem jej miana, oraz rozpuszczone przez tę samą surowicę w odczynie R. Pfeiffer'a.

Lasecznik gruźlicy (*bac. tuberculosis*) może być wykryty w kale zapomocą preparatów mazanych. Najlepiej udaje się to wówczas, jeśli w kale znajdują się kłaczki ropne i śluzowate (spotykane w kale w przebiegu gruźlicy kiszek). Zwykle stosujemy metodę antyforminową, zwłaszcza gdy w kale niema ani śluzu, ani ropy. W tym celu płynny kał miesza się pół na pół z 50% roztworem antyforminy; stały kał rozciera się uprzednio w wodzie i wlewa do zwężonego naczynia, by oddzielić od osadu; do płynu ponad osadem dodaje się tyle antyforminy, aby płyn zawierał jej około 25%. Dalsze badanie (rozcieranie osadu na szkiełkach, barwienie) nie różni się w niczem od badania osadu z płwociny.

W ocenianiu wyników należy być bardzo ostrożnym. Ujemny wynik badania nie jest jeszcze dowodem, że nie mamy do czynienia z gruźlicą kiszek. W razie wyniku dodatniego należy się z tem liczyć, że chory mógł połączyć płwocinę, w której były laseczniki gruźlicy. Następnie w kale spotyka się laseczniki kwasoodporne, które jednak nie są lasecznikami Koch'a. Tylko parokrotny dodatni wynik badania — zwłaszcza, jeśli chory nie kaszle i płwociny nie połyka — przemawia za gruźlicą kiszek. Ostatecznie, tylko doświadczenie na zwierzętach może rozstrzygnąć, czy mamy do czynienia z prątkiem swoistym. W tym celu ropę, śluz lub osad z kału szczepi się śwince morskiej. O zakażaniu świnek lasecznikami gruźlicy patrz str. 136.

P e ł z a k i (*ameby*). Wśród pełzaków w kale człowieka zdrowego spotkać można często *entamoeba coli*, podczas



gdy dwie inne postaci pełzaków — entamoeba tetragena i histolytica wywołują t. zw. krwawą biegunkę pełzakową (dysenteria amoebica). W przypadkach tych, stale zdarzających się w krajach podzwrotnikowych, a niekiedy występujących i w Europie, należy badać kał na obecność pełzaków bezpośrednio przy chorym. Należy szukać je w kale zawierającym śluz, nie zaś w ropy lub krwi. W świeżym preparacie żywa amaeba histolytica lub tetragena różni się od zwykłej entamoeba coli głównie wyraźnem rozgraniczeniem zarodki zewnętrznej (ektoplazmy) od wewnętrznej (entoplazmy).

Pozostawione przez czas dłuższy w kale lub na szkiełku pełzaki chorobotwórcze kurczą się i otaczają torebką (cystą), zawierającą cztery jądra, podczas gdy jąder tych u am. coli jest osiem.

Pełzaki można badać in vivo w kropli wiszącej, najlepiej w cieczy, w której się znajdują; w razie potrzeby dodaje się kroplę fizjol. roztworu soli (w preparatach wprost z kału należy odróżniać je od leukocytów: wielkość, ruchy, postać jądra, ziarnistość!). Następnie bada się pełzaki na preparatach barwionych w następujący sposób: preparat utrwalić przez 10 min. w ogrzonym do ok. 60° sublimacie alkoholowym (2 gr. sublimatu zagotować w 30 cm.<sup>3</sup> wody, po ostudzeniu przesączyć i na 2 cz. roztworu sublimatu dodać 1 cz. wysoku absolut.), poczem umieścić na 10 min. w zimnym sublimacie alkoholowym, następnie przemieść na 30 min. do 60% wysoku z dodatkiem jodiny (w takiej ilości, aby alkohol zabarwił się na brązowo), przemyć 70% alkoholem i ostatecznie umieścić w wodzie przekroplonej. Preparaty można barwić 1) hematoksyliną

Delafield'a<sup>1)</sup> (względnie Grenacher'a) lub 2) metodą Giemsa'y.

1) Barwić rozcieńczonym barwnikiem od  $\frac{1}{2}$  do kilku godzin, opłukać wodą wodociągową, w razie przebarwienia preparatu (sprawdzać pod mikroskopem!) różnicować wysoko-  
kiem i kwasem solnym (0,1 cm.<sup>3</sup> kwasu solnego na 100 cm.<sup>3</sup> 70%  
wysokoku) aż do właściwego zabarwienia, opłukać wodą i poprzez  
wysoki 70%, 95% i absolutny, absolutny + ksyłol, ksyłol (1 min.)  
umieścić w balsamie kanadyjskim lub olejku cedrowym.

2) Po przemyciu wodą przekr. na szkiełko nalać roztworu Giemsa'y (15 kropeł na 10,0 wody przekr.), barwić w ciągu 30 min.

Wspomnieć tu należy o lasecznikach, wywołujących szereg chorób u zwierząt, głównie u tego gatunku, od którego zostały wyhodowane. Należą tu: las. cholery kur (*bac. septicaemiae haemorrhagicae*), amerykańska zaraza świń (*hog-cholera*), tyfus myszy (*bac. typhi murium*) i wiele innych.

Cechy tej całej grupy są następujące: są to laseczniki nieruchome, bez zarodników, Gr—, często barwiące się na biegunach, nie rozrzedzają żelatyny, wytwarzają indol w podłożach peptonowych, dają po 24 godz. na agarze kolonie drobne (czasem przypominające kolonie prątków okrężnicy), śluzowate, w buljonie tworzą męt jednolity, niekiedy osad lub błonkę.

Cholera kur wywołuje biegunkę z krwotocznem zapaleniem kiszek i posocznicą, amerykańska zaraza świń wywołuje zmiany w jelicie, tyfus myszy poraża myszy domowe, a zwłaszcza polne, w ciągu 1—2 tygodni, wywołując krwotoki w przewodzie pokarmowym zwierząt (zarazek ten używany jest do tępienia myszy — ostrożnie się obchodzić, przypadki zakażenia i wśród ludzi! dla zwierząt domowych — koni, świń itd. może

<sup>1)</sup> Przygotowanie: hematoksyliny 4,0, wysokoku bezwodnego 25 cm.<sup>3</sup> ałunu amoniakalnego 52,0 wody 400 cm.<sup>3</sup>, gliceryny 100,0 alkoholu metylowego 100,0.

być chorobotwórczy). Laseczniki tyfusu mysiego pod względem biologicznym (hodowle, aglutynacja) w niczem nie różnią się od laseczników tyfusu rzek. B.

**Badanie moczu.** Mocz dla badania bakterjologicznego należy zebrać do jałowego naczynia, odwirować i osad użyć do preparatów, posiewu wzgl. szczepienia zwierzętom. Jeśli ilość bakterji w moczu jest bardzo duża, naprz. przy bakteriurii, można moczu nie wirować.

Preparaty mazane z osadu przygotowuje się w sposób zwykły; jeśli osad zawiera wiele kryształów, utrwała się preparat w wysoku absolutnym (w ciągu 10 m.), jeśli zawiera tłuszcze lub krew — w mieszaninie alkoholu z eterem aa (w ciągu 3 m.). Preparaty barwi się błękitem metylenowym, metodami Pick-Jacobsohn'a, Gram'a i Ziehl-Neelsen'a.

Wyodrębnianie drobnoustrojów z moczu odbywa się przy pomocy zwykłych metod.

Szczepimy osad moczowy zwierzętom wówczas, gdy chodzi o gruźlicze cierpienie narządów moczowych.

W moczu mogą znajdować się następujące drobnoustroje chorobotwórcze: laseczniki z grupy okrężnicy, lasecznik mlekowy, lasecznik gruźlicy, prątek odmieniec, lasecznik ropy błękitnej, paciorkowce, gronkowce, gonokoki.

Lasecznik okrężnicy (*bact. coli commune*) spotykany bywa w moczu, zwykle kwaśnym, przeważnie w przebiegu zapalenia pęcherza (cystitis) i miedniczek nerkowych (pyelitis.) Wyhodować go można przez roz-tarcie kropli osadu na płytkach z pożywką Endo lub Conradi-Drygalskiego. Podobnie można wykryć laseczniki swoiste w przebiegu duru brzuszego i durów



rzekomych. Cały przebieg badania odbywa się zupełnie tak samo, jak w hodowaniu laseczników z kału (patrz str. 149). O własnościach morfologicznych i biologicznych patrz str. 150.

Lasecznik mlekowy gazotwórczy (*bact. lactis aerogenes*) wywołuje samodzielnie lub wraz z prątkiem okrężnicy zapalenie pęcherza i miedniczek nerkowych (zwłaszcza u dzieci). Jest to lasecznik Gr—, o zmiennej wielkości, z zaokrąglonymi końcami, nieruchomy; często układa się w dwoinki lub w krótkie łańcuszki w otoczkach. Rośnie na wszelkich pożywkach w temp. 37° i niższej. W hodowlach posiada często wygląd śluzowaty. Cukier gronowy zostaje przez niego rozłożony, mleko ścięte, serwatka zaczerwieniona. Od lasecznika okrężnicy różni się brakiem ruchu i niekiedy niewytwarzaniem indolu. Przypomina lasecznika Friedländer'a (wedł. niektórych autorów jest nawet identyczny), różni się od niego zwykle zachowaniem w mleku, które ścina, w przeciwieństwie do las. Friedländer'a.

Prątek odmieniec zwykły (*bac. proteus vulgaris*), przeważnie w moczu zasadowym, wywołuje samodzielnie lub wraz z las. okrężnicy zapalenie pęcherza. Jest to prątek Gr—, dość długi, układający się w nici, obdarzony żywym ruchem postępowym. Na agarze tworzy okrągłe, opalizujące kolonie, zlewające się ze sobą w postaci wilgotnego, przezroczystego okładku. Bardzo swoiście rośnie na żelatynie; tworzy na niej szare, delikatne kolonie, zagłębiające się w pożywkę i rozrzedzające ją. Na całej powierzchni pożywki kolonie odmienca tworzą wypustki, oddzielające się często od kolonji macierzystej. Odmieniec

rozkłada cukier gronowy i trzcinowy, cukru zaś mlekowego nie zmienia, ścina mleko, w buljonie wytwarza indol, w serwatce lakmusowej tworzy zasadę. Ciała białkowe rozkłada, wydzielając produkty cuchnące, w pożywkach z mocznikiem tworzy węglan amonu. Zlepia się wysokowartościową surowicą swoistą.

Odmieniec Weil-Felix'a ( $X_{19}$  — 1915) hodowany z moczu (niekiedy i z krwi) od chorych na dur plamisty, postacią zbliża się do typu odmienca zwykłego. Jest to lasecznik Gr—, ruchomy, często układający się w nici. Na pożywce Conradi-Drygalskiego tworzy niebieskie kolonie, na Endo — po 24 godzinach bezbarwne, przy dłuższym staniu, różowe kolonie; agar z cukrem gronowym rozsadza po 18 godz., z cukrem mlekowym — po 48 godzinach; żelatynę rozrzedza po 48 godzinach. Na płytce rośnie jak odmieniec zwykły. Co do własności serologicznych, to lasecznik Weil-Felix'a zostaje zlepiony przez surowicę wysokowartościową swoistą, oraz (co ma pod względem praktycznym doniosłe znaczenie) przez surowice, pochodzące od chorych na dur plamisty (szczegóły patrz odczyn zlepiania). Dla człowieka ani dla zwierząt — niecho-robotwórczy.

Lasecznik ropy błękitnej (*bac. pyocyaneus*) wywołuje samodzielnie lub wraz z innymi drobnoustrojami zapalenie pęcherza. Hodować go można na pożywkach zwykłych, którym nadaje wyraźne zielone zabarwienie. O własnościach biologicznych patrz str. 106.

Lasecznik gruźlicy (*bac. tuberculosis*) spotykany bywa w moczu podczas gruźlicy narządów moczowych; mocz ma wówczas odczyn kwaśny tak długo, dopóki w pęcherzu

nie pojawiają się bakterje rozkładowe. Z odwirowanego osadu przygotowujemy preparaty mazane i barwimy je metodą na laseczniki kwasoodporne. Ilość prątków gruźlicy w moczu jest rozmaita: przy gruźliczem zapaleniu pęcherza znajduje się je często w dużej ilości, ułożone pojedynczo, grupkami lub w postaci litery S. W innych wypadkach, naprz. w gruźlicy nerek, wykrycie lasecznika gruźlicy z moczu może być bardzo utrudnione i należy przejrzeć kilkanaście preparatów, aby znaleźć pojedyncze laseczniki. O ile podejrzana jest jedna z nerek, wówczas należy zebrać mocz z każdej nerki oddzielnie, poczem badać obydwie porcje oddzielnie w preparatach mazanych wzgl. szczepić osad świnkom morskim,

Szczepienie osadu świnkom morskim jest najpewniejszym środkiem wykrycia laseczników gruźlicy w moczu. Do doświadczeń używa się młodych zwierząt, wagi ok. 250 gr., którym szczepi się 1—2 cm<sup>3</sup> osadu zawieszzonego w fizjol. roztworze soli.

O ile w osadzie jest wiele różnych drobnoustrojów, działamy nań 4—5% roztworem antyforminy przez czas pewien, następnie osad przemywamy jałowym fizjologicznym roztworem soli. O szczepieniu i badaniu świnek zakażonych patrz str. 136—137. Dla przyspieszenia rozpoznania posługiwać się można doskórnem zadaniem tuberkuliny zakażonym świnkom (patrz podręcznik specjalny).

W przebiegu rzeżączki w włóknach śluzowych moczu znajdujemy *g o n o k o k i* (*gońococci*). W osadzie na preparatach mazanych, barwionych metodą Gram'a, Pick'a itp. widoczne są dwoinki swoiste, leżące zewnątrz lub wew-



nątrz komórek ropnych. O własnościach biologicznych gonokoków patrz str. 107.

**Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego.** W normalnym płynie mózgowo-rdzeniowym żadnych drobnoustrojów nie znajdujemy — płyn taki jest zupełnie przezroczysty, zawiera pojedyncze komórki nabłonkowe i limfocyty. Natomiast w przebiegu rozmaitych chorób, połączonych z zapaleniem opon mózgowych, spotkać można w poszczególnych przypadkach w wydobytym płynie mózgowo-rdzeniowym dwoinki Fränkel'a, diplobacillus Friedländer'a, paciorkowce, gronkowce, laseczniki influenzy, duru, okrężnicy, dżumy; najczęściej jednak zapalenie opon mózgowych spowodowane bywa przez dwoinki nagminnego zapalenia opon mózgowych (drętewicy karku — *meningitis cerebrospinalis*) oraz laseczniki gruźlicy:

W celu otrzymania płynu mózgowo-rdzeniowego należy:

1. Chorego ułożyć na lewym boku, możliwie najbardziej podciągając kolana do ciała, zgiąć grzbiet;
2. dokładnie odkazić skórę w okolicy lędźwiowej;
3. wbić wyjąłowany bezpośrednio przed użyciem trójgraniec Krönig'a o kilka cm. w lewo od linii środkowej między trzecim i czwartym kręgiem lędźwiowym, aż do przewyciężenia pewnego wyczuwalnego oporu — u dorosłych mniej więcej na 4 cm. głęboko, u dzieci — ok. 2 cm.;
4. wypływający płyn zebrać do wyjąłowanej probówki, zatkać korkiem, i możliwie najszybciej, zwłaszcza gdy chodzi o wykrycie meningokoków, poddać badaniu.

Nagminne zapalenie opon mózgowych („drętewica karku“) zawsze wywołana bywa przez specjalne dwoinki, wykryte przez Weichselbaum'a (1887), t. zw. meningokoki (*meningococcus, diplobacillus intracellularis Weichs.*) Płyn

od chorych na to cierpienie jest mętny, zawiera bardzo wiele ciałek ropnych. Po odwirowaniu i przygotowaniu z osadu preparatów mazanych, barwionych następnie metodą Gram'a, błękitem metylenowym lub barwn. Giemsa'y, gdy chodzi o różnicowanie elementów komórkowych — o ile płyn jest gęsty, nie trzeba wirować, a bezpośrednio z płynu robić preparaty — widać dvoinki, leżące wewnątrz ciałek ropnych, po kilka, a nawet kilkanaście osobników, a także wolno leżące w płynie; barwią się — jedne silniej, inne słabiej; zawsze Gr.—, są postaci charakterystycznej (nerek, bułeczek, ziaren kawy), wielkości różnorodnej (niektóre osobniki są wielkie, inne drobne), układają się niekiedy w czwórki.

Obecność tych wewnątrzkomórkowo leżących dvoinek w płynie mózgowo-rdzeniowym, jest naogół wystarczająca do potwierdzenia rozpoznania drętewicy karku. Niekiedy jednak dvoinki te znaleźć trudno, zwłaszcza, gdy w płynie jest stosunkowo mało ciałek ropnych lub nie znajduje się typowego wewnątrzkomórkowego układu drobnoustrojów. Można płyn wstawić na 12—24 godzin do ciepłarki w 37° i osad odwirowany badać powtórnie na preparatach mazanych, oraz posiać na pożywkach specjalnych. Ponieważ meningokoki są bardzo mało odporne, należy dokonywać posiewu w jaknajszyszym czasie po wydobyciu płynu. Optimum wzrostu — w ciepłocie 37°, na pożywkach, do których dodano surowicy ludzkiej lub zwierzęcej; drobnoustroj ten wrażliwy jest zwłaszcza w pierwszych pokoleniach — później rośnie nawet na zwykłym agarze. Najlepiej rośnie na agarze z płynem puchlinowym z jamy brzusznej, na agarze z surowicą, na surowicy Loeffler'a;

rośnie zwykle już po 24 godz., rzadko dopiero po 48 godz., w postaci szklistych, przezroczystych kolonji. Na agarze z krwią ludzką (2 cm.<sup>3</sup> płynnego agaru + 3 cm.<sup>3</sup> krwi ludzkiej) rośnie doskonale w postaci niebieskawo-szarych kolonji. Na żelatynie nie rośnie z powodu zbyt niskiej ciepłoty (22°) potrzebnej dla żelatyny, w buljonie tworzy męt i błonkę. Czyste hodowle należy przeszczepiać bardzo często — początkowo co drugi dzień, później co kilka dni. Trzymać w ciepłocie wyższej od 25°, w ciemności, w szczelnie zamkniętej próbówce.

Na preparatach barwionych z czystej hodowli spotykamy taką samą różnorodność wielkości, jak w preparatach bezpośrednich z płynu (postaci wielkie i małe, dwoinki, czwórki, słabiej lub silniej barwiące się). W celu ostatecznego sprawdzenia szczepu stosuje się aglutynację, do czego używa się swoistej surowicy wysokowartościowej. Do surowicy rozcieńczonej  $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{200}$  itd. dodaje się zawiesiny meningokokowej w fizjolog. roztworze soli i umieszcza na 24 godz. w cieplarni przy 37° (wyjątkowo trudno aglutynujące szczepy trzyma się w ten sposób przez 24 godz. w ciepł. 50—55°). Ujemny wynik aglutynacji nie dowodzi jednak, że wyhodowane dwoinki nie są meningokokami, istnieją bowiem szczepy nietypowe, zwane przez niektórych autorów parameningokokami, które zlepiają się tylko surowicą, przygotowaną z takich samych szczepów. Surowica chorych również zlepia lekko ( $\frac{1}{50}$ ) zawiesinę meningokoków. Dla zwierząt meningokoki nie są, naogół, chorobotwórcze, w większych ilościach szkodliwe są dla świnek morskich, niekiedy i dla myszy.

Dwoinkę Weichselbaum'a znajduje się nie tylko w płynie



mózgowo-rdzeniowym od chorych na drętvicę, ale i u osób z otoczenia chorego w jamie noso-gardzielowej; są to t. zw. „roznosiciele“ zarazka drętownicy. Badanie sanitarne polega właśnie na zbadaniu całego otoczenia w celu wykrycia roznosicieli, którzy mogą szerzyć chorobę. W tym celu należy wziąć wydzielinę z jamy nosogardzielowej (o sposobach brania patrz str. 91) i natychmiast posiać ją na odpowiednie dla meningokoków pożywki. Po 24 godz. należy zbadać florę na pożywce. Mogą się tu jednak nastroczyć duże trudności rozpoznawcze, gdyż cały szereg drobno-ustrojów, jak: *micrococcus catarrhalis* (str. 144), *diplococcus crassus*, *diplococcus flavus*, *micrococcus cinereus* pod względem morfologicznym niczem nie różnią się od dwoinki Weichselbaum'a; *micrococcus catarrhalis* jest również Gr—. Rozstrzyga tu ostatecznie sprawę aglutynacja z surowicą meningokokową, a także wzrost na pożywkach z lakmusem i z różnymi cukrami. Różnice biologiczne widoczne są z załączonej tabliczki:

	Dekstroza	Lewuloza	Laktoza	Maltoza	Sacharoza	Galaktoza
<i>Meningococcus</i>	+	○	○	+	○	○
<i>Micrococcus catarrhalis</i>	○	○	○	○	○	○
<i>Diplococcus crassus</i>	+	+	+	+	+	+
„ <i>flavus</i>	+	+	○	+	○	○
<i>Micrococcus cinereus</i>	○	○	○	○	○	○

+ oznacza rozszczepienie cukru, polegające na zakwaszeniu lakmusu i zmianie barwy pożywki z niebieskiej na czerwoną.  
○ oznacza bez zmiany.

A więc *micrococcus catarrhalis* i *microc. cinereus* nie rozszczepiają żadnego cukru, *diplococcus crassus* rozszczepia

wszystkie rodzaje, *diplococcus flavus* różni się od *meningokoka* tem, że rozszczepia lewulozę. O przygotowaniu pożywki z cukrami patrz str. 37.

Płyn mózgowo-rdzeniowy, wydobyty podczas zapalenia opon mózgowych na tle gruźliczym, jest zwykle przezroczysty, niekiedy opalizujący, zawierać może dużo limfocytów z domieszką wielojądrowców obojętnochłonnych. Jeśli płyn jest wyraźnie ropny, wówczas na preparatach mazanych (bezpośrednio z płynu lub z osadu otrzymanego po odwirowaniu) i barwionych jedną z metod na laseczki kwasoodporne, znaleźć można laseczniki gruźlicy. Można też na osad ropny podziałać antyforminą, jak przy płwocinie (str. 131—133). W płynie, gdzie osad jest bardzo skąpy, najłatwiej znaleźć laseczniki swoiste w siateczce włóknikowej, która tworzy się, gdy płyn stoi w lodowni przez dłuższy czas (po 6—24 godz.). Siateczkę tę wyjmuje się w całości drucikiem platynowym, rozsmarowuje na szkiełku przedmiotowym, suszy na powietrzu, utrwała i barwi.

Do badania płynu mózgowo-rdzeniowego na obecność laseczników gruźliczych zaleca się brać część płynu, wpływającą pod koniec zabiegu, gdyż zwykle zawiera ona w sobie najwięcej prątków swoistych.

W celu ostatecznego sprawdzenia rezultatów badania szczepi się płyn (odwirowany osad w ilości 1—2 cm<sup>3</sup>) świnie morskiej, która pada w razie obecności drobno-ustroju swoistego po 2—3 tygodniach (str. 136—137). Można też dokonać posiewu osadu na pożywkach, odpowiednich dla lasecznika gruźlicy (str. 135). O potrzebie badania płynu mózgowo-rdzeniowego, wziętego pośmiertnie

w przypadkach, podejrzanych o gruźlicze zapalenie opon mózgowych, patrz str. 92.

**Badanie wysięków i przesięków.** Płyny, przeznaczone do badania bakteriologicznego, muszą być zebrane do naczynia jałowego. Badanie odbywa się w ten sam sposób co w płynie mózgowo-rdzeniowym (preparaty wykonane z osadu, hodowle, szczepienie zwierzętom).

W płynach — zwykle wysiękowych — wydobytych z jamy brzusznej, podczas zapalenia otrzewnej, znajduje się laseczniki z grupy okrężnicy (las. duru!), a także inne drobnooustroje z flory kiszkowej (o ile zapalenie powstaje naprz. wskutek przedrażnienia ściany kiszkowej) jak odmienne, laseczniki ropy błękitnej; następnie gronkowce, paciorkowce (o ile zakażenie otrzewnej bierze początek z kobiecych narządów płciowych), gonokoki, w zakażeniach pooperacyjnych często hodują się paciorkowce. W przewlekłym zapaleniu otrzewnej doniosłą rolę odgrywają laseczniki gruźlicze (szczepić płyn świnkom morskim!).

W płynach opłucnowych natury surowiczej przeważnie znajduje się laseczniki gruźlicy; w razie ujemnego wyniku mikroskopowego badania osadu oraz ujemnego posiewu należy szczepić płyn świnkom morskim.

W płynach ropnych z opłucnej znajdujemy najczęściej paciorkowce, pneumokoki, gronkowce, laseczniki gruźlicy, niekiedy — w przebiegu duru brzuszego — laseczniki Eberth'a, zrzadka prątki influency lub czworniaki; zdarza się flora mieszana — pneumokoki z paciorkowcami lub gronkowcami. W płynach ropnych gnilnych, oprócz drob-



noustrojów ropnych, znajduje się też beztlenowce i laseczniki gnilne, niekiedy i bac. fusiformis (str. 124—125).

### Badanie włosów, łusek skóry i t. p. na grzybki.

O pobieraniu materiału — patrz str. 93.

Grzybki rosną naogół na zwykłych pożywkach bakteryjnych, o odczynie jednak kwaśnym, a więc na papce z chleba (czerstwy chleb dobrze zemieć, umieścić w kolbie Erlenmeyer'a i zalać wodą, aby utworzyła się papka, poczem wyjałowić), na odwarze śliwkowym lub brzeczce (piwnej) + agar; bardzo nadaje się również pożywka Sabouraud (str. 27).

Podejrzany włos lub łuskę skórną bada się pod drobnowidzem (pod słabem powiększeniem) na szkiełku przedmiotowym bądź bezpośrednio, przyciskając szkiełkiem przykrywkowym, bądź w cieczy o składzie następującym: wyskoku i liq. ammonii caust. aa 25,0, glicerini 15,0, aq. destill. 35,0. Można też włos wzgl. scutula odtłuścić w alkoholu i eterze, podziałać 10% ługiem i badać w glicerynie lub też, po skupieniu całego materiału badanego na jednym miejscu, oblać 1—2 kroplami 30% ługu potasowego i lekko nagrzewać.

Do barwienia grzybków używa się zasadowych barwników anilinowych, naprz. błękitu Loeffler'a.

Najważniejsze z grzybków chorobotwórczych są: grzybki liszaja strzygącego (wyłysiającego) i parcha.

Grzybek strzygący (*trichophyton tonsurans*) występuje pod drobnowidzem w postaci nici grzybni (mycelium), dość równomiernych (grubości ok. 4  $\mu$ ) lub rozczłonkowanych, przeważnie nierozgałęzionych, oraz okrą-

głych lub podłużnych, czasem zlekka zabarwionych na żółto zarodników (konidja), układających się w łańcuszki. Występuje dwupostaciowo: o dużych zarodnikach (tr. *macrosporon seu megalosporon*) wewnątrz włosów, oraz o małych zarodnikach (tr. *microsporon s. Audouini*) nazewnątrz włosa.

Rośnie w ciepłocie 20—24° równie dobrze, jak w 37°, na wszelkich pożywkach, bogatych w węglowodany. *Tr. megalosporon* na agarze z glikozą (3,7% + 1% peptonu) rośnie w postaci białoszarych suchych kolonji, tak iż kultura jest jakby posypana gipsem; hodowle z maltozą są u brzegów żółte, pod spodem czerwone, na kartoflach ponsowawe. Od szczepienia świnkom morskim grzybka na brwi powstaje łuszczycowe zachorzenie skóry. *Tr. microsporon* rośnie nawet na zwykłym agarze, gdy położyć włos na pożywce skośnej, po 7—10 dniach występują typowe kolonje, które po 4 tyg. osiągają średnicy ok. 5 cm. i posiadają swoiste białe zabarwienie. Pozatem siać należy materjał i na innych podłożach (agar z 4% maltozą, kartofle).

Grzybek parcha (*Achorion Schoenleinii*, 1839) rośnie najłatwiej przy 37°, wymaga wiele azotu, na pożywkach bogatych w węglowodany daje wzrost skąpy. Do hodowli w celu wyodrębnienia zarodników grzybka dobrze jest materjał rozetrzeć z przepaloną krzemionką (patrz niżej) lub umieścić w wysoku (50°—95°) na czas pewien (kilka godzin lub nawet dłużej, do 24 godz.). Najdogodniej hodować grzybka według met. Plaut'a na szkiełkach przedmiotowych w sposób następujący: kilka włosów lub parę łusek skórných (materjał możliwie najświeższy!) umieszcza

się na jałowym szkiełku przedmiotowym, przyciska się mocno drugim jałowym szkiełkiem przedmiotowym, aby pozostało na nim trochę materiału do badania. Na każde ze szkiełek przedmiotowych kładzie się po szkiełku pokrywkowym z nóżkami woskowymi (kropelka wosku na każdym z 4-ch jego rogów). Szkiełka przedmiotowe z materiałem zakażonym umieszczamy na szklanej podstawie, stawiamy na talerz głęboki, przykrywamy kloszem szklanym (wys. ok. 7 cm. i o średnicy ok. 12 cm.) i nalewamy na talerz wody. Wewnątrz górnej części klosza umieszcza się bibułę z otworem pośrodku (do obserwowania hodowli), przymocowaną do klosza za pomocą nóżek woskowych; przy podnoszeniu klosza należy baczyć, aby kropla wody nie padła na szkiełko, hodowla bowiem poszłaby na marne. Hodować trzeba w ciepłocie ok. 35° (dla grzybka strzygącego ok. 20°); aby uchronić szkiełko pokrywkowe od wody kondensacyjnej, przeciąga się nad nim pasek bibuły, umocowany na nóżkach woskowych do brzegów szkiełka przedmiotowego; pasek taki należy zmieniać codziennie. Gdy nastąpi wzrost grzybka, przenosi się trochę materiału z brzegu hodowli na odpowiednie pożywki (agar z 2% peptonu i 4% maltozy i in. — patrz wyżej) bądź bezpośrednio, bądź po uprzednim roztarciu z przepaloną krzemionką w jałowej miseczce porcelanowej (nie za mocno, aby nie uszkodzić grzybków). Hodowle mają wygląd pomarszczonych woskowatych błon. Pod drobnowidzem — zarówno na preparatach badanych bezpośrednio (włosy, łuszczyki), jak i z hodowli — widoczne są dość silnie rozgałęzione nici grzybni, grubości 3—5  $\mu$ , jednolicie szkliste lub zlekką ziarniste, składające



się z oddzielnych członów, niekiedy kolankowato powyginaanych ze zgrubieniami na biegunach oraz zarodniki (konidja), posiadające kształt kulisty, częściej owalny, beczkowaty lub cylindryczny.

Dla zwierząt chorobotwórczy. Szare myszy zapadają nawet po nakarmieniu materiałem zakażonym (scutula na głowie); najlepiej szczepić u nasady ogona.

G r z y b e k p l e ś n i a w k i (*oidium albicans*) — patrz str. 125.

P l e ś n i a k i rosną i na zwykłych pożywkach, lepiej jednak na kwaśnych (kartofle, papka z chleba, agar z odwarem sliwkowym i t. d.). Najważniejsze:

1. p l e ś ń (*mucor*, *Zygomycetes*) — unoszące się z grzybni (*mycelium*) nici, t. zw. strzępki (*hyfy*) posiadają na końcach kuliste twory, zarodnie t. zw. *sporangia* z zarodnikami wewnątrz;

2. k r o p i d l a k (*aspergillus*, *Ascomycetes*) — unoszące się z grzybni ku górze nici posiadają na końcach swoiste rozszerzenia, z których we wszystkich kierunkach bieżą wypustki, t. zw. *sterigmy*, tworzące na końcach zarodniki (*konidia*);

3. p e n d z l a k, k i s t k a (*penicillium*, *Ascomycetes*) odróżnić łatwo dzięki poczłonkowaniu grzybni; unosząca się z tej ostatniej ku górze nić posiada na końcu pęczek wypustek, podstawek (*basidia*), z których bieżą sterygmy z konidiami; całość ma wygląd pendzelka, stąd i nazwa.

D r o ż d ż e (*Saccharomycetes*) rosną na płytkach słabo kwaśnych, barwią się zwykłymi barwnikami anilinowymi, zarodniki zaś — fuksyną karbolową (zagotować, opłukać 4% kwasem siarczanym i zabarwić kontrastowo błękitem

metylenowym). Pod drobnowidzem grzybni niema, lecz widać twory komórkowe o kształcie owalnym, układające się bądź w masy, bądź w nici; rozmnażają się zapomocą pączkowania — w jednym lub w kilku miejscach komórki macierzystej powstają uwypuklenia, które powiększają się, powoli nabierają kształtu komórki macierzystej i odłączają się od niej lub pozostają w związku. Wewnątrz niektórych komórek widać tętniczki. Zarodniki tworzą się przy braku materiału odżywczego. Pewne gatunki wywołują fermentację wysokową (*Saccharomyces cerevisiae* — piwną, *S. ellipsoideus* — winną).

### Badanie ciałek Negri'ego (przy wścieklicznie).

W 1903 r. Negri wykrył w mózgu osobników chorych na wścieklicznę, zwłaszcza w wielkich piramidalnych komórkach rogu Ammon'a ciałka o kształcie okrągłym lub gruszkowatym, o średnicy 1—20  $\mu$ ; twory te mają znaczenie rozpoznawcze. Do badania ciałek Negri'ego należy utrwalić małe kawałki (2—3 mm grubości) istoty szarej z rogu Ammon'a w cieczy Zenker'a i zatopić w parafinę. Skrawki barwić metodą L e n t z'a (modyfikacja metody Mann'a):

1. 1 min. barwić w rozcieńcz. eozynie (Eosin extra Höchst 0,5 w 100 cm.<sup>3</sup> 60<sup>o</sup>/<sub>o</sub> wysokoku),
2. opłukać wodą,
3. 1 min. barwić w błękitie metyl. Loeffler'a,
4. opłukać, wysuszyć bibułą,
5. różnicować:
  - a) aż do różowego zabarwienia w alkoholu absolutnym, do którego dodano 5 kropli 1<sup>o</sup>/<sub>o</sub> NaOH w alkoh. absolut.
  - b) aż do niebieskawych zarysów komórek glejowych w alkoholu absolutnym 5<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, do 30 cm.<sup>3</sup> którego dodano 1 kroplę 5<sup>o</sup>/<sub>o</sub> kwasu octowego,
6. opłukać w wysokoku absolutnym. Ksylol, balsam kanadyjski.

O ile zależy na pośpiechu, można badać ciała Negri'ego nie w skrawkach, lecz na preparatach, utwalonych na poczekaniu na szkiełku przedmiotowym (van Gieson). W tym celu cząsteczkę istoty szarej z rogu Ammon'a kładziemy na zupełnie czyste (przepalone w płomieniu) szkiełko przedmiotowe, przykrywamy drugim i lekko uciskając, zsuwamy jedno z drugiego, miarkując odpowiednio siłę ucisku. Otrzymane w ten sposób preparaty z zachowanymi komórkami zanurzamy na minutę w wysoku metylowym, z niego przenosimy do absolutnego etylowego w celu opłukania usunięcia metylowego, poczem barwimy metodą Lentz'a<sup>1)</sup>).

Do badania ciałek nadaje się również metoda Stutzer'a: barwienie błękitem metyl. Loeffler'a i obrabianie skrawków 1<sup>o</sup>/<sub>6</sub> roztworu taniny.

## Technika zasadniczych odczynów serologicznych.

O zbieraniu krwi do badań serologicznych od człowieka patrz str. 87—89.

Zbieranie krwi od królika. Zwykle w pracowniach bakterjologicznych używa się do doświadczeń królików lub świnek morskich. Chcąc otrzymać niewielką ilość krwi od królika obmywamy eterem ucho, ostrym skalpelem lub nożyczkami przecinamy najlepiej widoczną żyłę i spływające z niej krople krwi zbieramy do zwężonej probówki. (Dla lepszego uwidocznienia żyły można ucho przetrzeć ksylolem). W ten sposób można zebrać do kilkunastu cm.<sup>3</sup> krwi. Aby krew zatamować wystarczy na ranę przyłożyć kawałek waty i przymocować go szczypczkami do zaciskania naczyń lub też przytrzymać czas jakiś palcem. Po skrzepnięciu krwi należy ją odwirować, surowicę ze-

<sup>1)</sup> Patrz Palmirski i Karłowski. Wodowstręt u ludzi. Warszawa 1911.



brać jałową pipetką i po rozlaniu do szczelnie zamykanych probówek lub ampułek, przechowywać w lodowni.

Chcąc otrzymać większą ilość krwi, należy zwierzę uspić chloroformem lub eterem, następnie, po ostrzyżeniu sierści w okolicy mostka i obmyciu skóry alkoholem, otworzyć klatkę piersiową. Z bijącego serca wyciąga się krew strzykawką lub cienką pipetką. Dobrym jest też sposób wykrwawiania zwierzęcia zapomocą przecięcia tętnicy szyjowej. W tym celu, po uspieniu zwierzęcia, przecina się z prawej lub lewej strony szyi (po ogoleniu sierści i odkażeniu skóry) skórę i tkankę podskórną i pracując na tępo uwidacznia się tętniące naczynie, zaciska je na pewnej przestrzeni u góry i dołu w odległości 1—2 cm. pincetkami Péan'a, chwyta trzecią pincetką powyżej górnej pincety ścianę naczynia, przecina tętnicę, poczem, po zdjęciu górnej pincety Péan'a — kieruje się pincetą, przytrzymującą ścianę naczynia, strumień krwi do podstawionego jałowego naczynia. W ten sposób można otrzymać kilkadziesiąt cm.<sup>3</sup> krwi.

Zbieranie krwi od świnki morskiej. Od świnek bierzemy krew wprost z serca. W tym celu świnkę morską układamy nieruchomo na stronie grzbietowej, strzyżemy przy skórze okolicę mostka i, po zmyciu danego miejsca sublimatem, wbijamy cienką igłę dobrze ciągnącej strzykawkę „Record“, Luer'a lub in. między 3—4-tym zębem u lewego brzegu mostka. O ile natrafiliśmy na serce — możemy szybkim ruchem wciągnąć do szprycy 5 cm.<sup>3</sup> krwi lub więcej. W razie potrzeby większej ilości krwi od świnek, jak naprz. do odczynu Wassermann'a, można wziąć w ten sposób krew od kilku zwierząt. Zabieg

ten można powtarzać u tej samej świnki w odstępach 6—8 tygodniowych bez wpływu na własności krwi i surowicy oraz na stan zdrowotny zwierzęcia.

Od bardzo małych zwierząt, jak myszy i szczury, krew bierze się z serca lub przez nacięcie końca ogona.

Od ptaków krew najlepiej brać z naczyń leżących na wewnętrznej stronie skrzydeł.

Zbieranie krwi od dużych zwierząt. W celu otrzymania większej ilości krwi od dużych zwierząt, jak od barana, konia i t. p., golimy okolicę szyjową, uciaskamy sznurem tę stronę szyji, skąd mamy zamiar wziąć krew, a gdy żyła szyjowa stanie się zupełnie widoczną, wbijamy szeroką igłę lub trójgraniec i wpuszczamy płynącą krew bezpośrednio do naczynia, połączonego z igłą zapomocą węża gumowego, lub też — jak u barana — ciągniemy szprycą. W ten sposób można wziąć od barana kilkadziesiąt cm.<sup>3</sup> krwi, od koni, osłów i t. p. nawet po parę litrów. Szczegóły patrz podręcznik serologii.

O odwłóknianiu krwi patrz str. 19.

Przechowywanie surowic. Surowice normalne przechowywać należy w lodowni z dodatkiem 0,5%<sup>1)</sup> kw. karbolowego lub 1% chloroformu lub toluolu. Przed użyciem wstawić otwarte naczynie z surowicą do ciepłarki, aby ulotnił się środek dezynfekcyjny. Surowice wysokowartościowe można przechowywać w stanie płynnym i suchym. W stanie płynnym należy: 1) do surowicy dodać

<sup>1)</sup> 0,5% kw. karbolowego znaczy: dodać tyle acidi carbol. liquefacti, aby ilość jego w stosunku do płynu, do którego został dodany, wynosiła 0,5%.

środka przeciwnilnego, naprz. 0,3—0,5% kwasu karbowego i przechowywać w lodowni; 2) przesączyć (surowice precypitujące) przez świecę Berkefeld'a pod ciśnieniem (str. 20); 3) surowicę rozlać do ampułek, zatopione ampułki przechowywać w lodowni. W celu przechowywania surowicy w stanie suchym należy rozlać ją na duże płytki w cienkiej warstwie i wstawić do ciepłarki, aby wyparowała z niej woda, a gdy surowica całkowicie wyschnie, zeszkrobać ją przepalonym nożykiem lub łopatką i przechowywać w zatopionych probówkach. Przed użyciem należy rozpuścić w fizjologicznym roztworze soli w stosunku 0,1 gr. suchej surowicy na 1 cm.<sup>3</sup> soli = 1 cm.<sup>3</sup> surowicy.

## Określenia podstawowe z nauki o odporności.

W surowicy od chorych ludzi lub też od chorych zwierząt znajdują się różnorodne ciała ochronne (precypityny, aglutyniny, bakteriolizyny, hemolizyny i t. d.), powstające wskutek obecności w ustroju ciał wywołujących je. A więc:

1. Wszelkie ciało obce (białko), które po przedostaniu się w pewien określony sposób do ustroju zwierzęcego wywołuje w ustroju tym powstawanie t. zw. „ciał ochronnych“ („przeciwciał“) nazywa się antygenem (*antigenum*). Przykłady antygenów:

a) drobnoustroje chorobotwórcze, wywołujące zakażenie naturalne u ludzi (naprz. laseczniki duru brzuszego, krętki, paciorkowce i t. d.) lub zakażenie sztuczne w celu uodpornienia sztucznego danego osobnika (laseczniki duru, przecinkowce cholery



i t. d. przy szczepieniach ochronnych) lub też w doświadczeniach na zwierzętach;

b) o b c e b i a ł k a pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego, wywołujące u zwierząt, którym są zadane, ciała ochronne (przeciwciała).

2. Od zadania ustrojowi zwierzęcemu jakiegoś antygenu (drogą podskórną, dożylną, dootrzewnową lub niekiedy dokiszkową) w ustroju tym powstają t. zw. c i a ł a o c h r o n n e (Immunkörper), inaczej zwane także p r z e c i w c i a ł a m i, n i w e c z n i k a m i (Antikörper).

Z załączonej tabliczki widać, jakie antygeny wywołują odpowiednie przeciwciała:

<i>Antygen.</i>	<i>Ciało ochronne.</i>
Jady (toksyny)	Przeciwjady (antytoksyny)
Białka bakteryjne	a) Precypityny } posiadające własności: a) zsiadania b) Aglutyniny } się (coagulation) i b) zlepiania (agglutination).
Bakterje	
Bakterje	Bakterjolisyny, posiadające własności rozpuszczania (lysis).
Bakterje	Bakterjotropiny posiadające własności opsoniczne,
Większość ciał białkowych	Odpowiednie ciała, t. zw. Bordet'a, wiążące dopełniacz oraz ciała uczulające — wywołujące odczyn uczulenia (anaphylaxis)
Erytrocyty	Hemolisyny, posiadające własność rozpuszczania (lysis)

Wreszcie, jako antygen, mogą być użyte przeciwciała (aglutyniny, hemolisyny i t. d.), wówczas wywołują tworzenie się antyaglutynin, antyhemolisyn i t. d., niweczających działanie aglutynin, hemolisyn i t. d.

3. Surowice, które zawierają ciała ochronne, otrzymują nazwę s u r o w i c o c h r o n n y c h (Immunsera). O ile jakiegoś przeciwciała wytwarza się w surowicy danego

zwierzęcia bardzo wiele, to znaczy, o ile surowica takiego zwierzęcia staje się na obecność danego ciała bardzo czuła (działa jeszcze w bardzo wielkim rozcieńczeniu, naprz. 1:20.000 i wyżej), wówczas surowicę taką nazywamy **wysokowartościową**.

Jako przykłady najczęściej stosowanych surowic wysokowartościowych przytoczyć należy:

a) surowicę aglutynującą (zlepiającą) i precypitującą (strącającą);

b) hemolizującą (rozpuszczającą czerwone krwinki).

- a) Po kilkorazowym zaszczepieniu zwierzętom tego samego drobnoustroju (jako antygeny) w surowicy zwierzęcia szczepionego występują ciała ochronne (przeciwciała), zlepiające zawiesinę drobnoustrojów wstrzykiwanych. Są to **zlepniki (aglutyniny)**, a surowica zawierająca je w sobie nazywa się **zlepiającą (aglutynującą)**. Gdy surowica jest „**wysokowartościowa**“, wówczas nawet w wielkim rozcieńczeniu zlepią zawiesinę drobnoustroju wstrzykiwanego — jest więc dla niego **swoią**. Po zakażeniu naturalnem — pod wpływem zarazka, wywołującego chorobę, — powstają we krwi osobnika zakażonego (podczas choroby i pozostają niekiedy na czas jakiś po chorobie — naprz. podczas duru brzuszego, krwawej biegunki, cholery i in.) ciała ochronne, t. zn. surowica od chorych takich działa w pewien sposób na zarazki odpowiednie, naprz. surowica chorych na dur brzuszny w pewnym rozcieńczeniu zlepią i unieruchamia (aglutynuje), rozpuszcza i t. d. **laseczniki Eberth'a**. Pod względem praktycznym fakt ten

posiada doniosłe znaczenie i znajduje ogromne zastosowanie. Jeśli zadawać zwierzęciu wyciąg z bakterji, z mięsa lub wogóle jakiegokolwiek białko, wówczas surowica takich zwierząt, nawet w wielkiem rozcieńczeniu, daje strąty tylko z białkiem wstrzykiwanem; z innymi zaś białkami strątu nie daje. Surowica taka nazywa się strącająca (precypitująca).

b) Po kilkakrotnem wstrzykiwaniu zwierzętom (królikom) komórek z innego gatunku, naprz. krwinek barana, w surowicy tych zwierząt powstaną ciała ochronne (przeciwciała), rozpuszczające krwinki baranie, t. zw. „hemolizyny“. Surowica taka nawet w bardzo wielkiem rozcieńczeniu może rozpuszczać czerwone ciała krwi barana (ale nie rozpuści krwinek żadnego innego zwierzęcia) i dlatego też nazywa się surowicą wysokowartościową hemolityczną. Surowicę hemolityczną nazywa się też inaczej, od jednego z jej dwóch składników, dwuchwytnikiem (amboceptorem) hemolitycznym; mianowicie składa się ona: 1<sup>o</sup> z dopełniacza, znajdującego się w każdej surowicy świeżej i ginącego przy pokojowej ciepłocie zwykle już po 24 godz. lub przy nagraniu surowicy do 55—56<sup>o</sup> w ciągu 1/2 godziny, oraz 2<sup>o</sup> ze składnika niewrażliwego na ciepło i przez dłuższy czas niezmiennającego swych własności, t. zw. dwuchwytnika, wiążącego z jednej strony dopełniacz własny lub, po zniknięciu go, dopełniacz innej, świeżej surowicy, z drugiej zaś — antygen (w zakażeniu lub w doświadczeniu).



## Odczyn strącania (precypitacji).

Założenie teoretyczne: po zmieszaniu surowicy wysokowartościowej z antygenem swoistym, w odpowiednich ilościach, powstają osady. Zjawisko to nosi nazwę strącania (precypitacji) i polega na tem, że jeśli parokrotnie wprowadzimy zwierzęciu, naprz. królikowi, parenteralnie, t. j. z ominięciem układu trawiennego (pod skórę, do otrzewnej, do żyły), białko pochodzące od innego zwierzęcia (a nawet białko roślinne) to surowica królika, w odpowiednim rozcieńczeniu, da swoisty osad tylko w zetknięciu z białkiem gatunku użytego do wstrzyknięcia, a nie da go z białkiem żadnego innego gatunku.

Zastosowanie: odróżnianie białka ludzkiego od zwierzęcego (przy badaniu krwawych plam w badaniach sądowych), odróżnianie białka różnych gatunków zwierząt (przy wykrywaniu zafałszowań w mięsie) i t. p.

A. Odróżnianie krwi ludzkiej (względnie innego białka) od zwierzęcej. Do tego celu potrzebne są:

a) surowica wysokowartościowa (zupełnie przezroczysta), swoista dla danego rodzaju białka. Surowicę tę otrzymuje się przez 4—5-krotne wstrzykiwanie królikowi dożylnie lub dootrzewnowo odpowiedniej krwi lub surowicy (najlepiej ogrzanej do 37°) w odstępach 5—6 dni. Pewną ilość wstrzykiwanej surowicy należy w stanie jałowym przechować do kontroli; można surowicę przechowywać też w stanie suchym. Surowica wysokowartościowa powinna być całkowicie przezroczysta (przesączyć przez wyjałowiony filtr Berkefeld'a!), nie powinna opalizować (zbierać surowicę nie

w okresie trawienia zwierzęcia, a w kilka godzin po jeździe!). W celu przekonania się, jak czuła jest surowica wysokowartościowa, wykonywamy następującą próbę: badaną krew rozcieńczamy fizjologicznym roztworem soli 1:1000, 1:5000, 1:10000 i 1:20000. Do 2 cm.<sup>3</sup> każdego z tych rozcieńczeń dodajemy bez wstrząsania po 0,1 cm.<sup>3</sup> surowicy wysokowartościowej. W rozcieńczeniu 1:1000 powinno wystąpić zaraz lub najpóźniej po 1—2 minutach wyraźne zmętnienie, zaś po 3—5 minutach zmętnienie powinno następować i w dalszych próbkach, a po 30 min. (w ciepłocie pokojowej) zupełnie się uwiocznąć. Surowica musi być jałowa; dla zabezpieczenia jej od zakażenia dodać 0,5% kwasu karbolowego;

b) rozcieńczona substancja badana [naprz. płamy krwi, nasienie (sperma) i t. p.]; do rozcieńczania stosuje się wyłącznie fizjologiczny roztwór soli. Rozcieńczenie badanego białka powinno wynosić ok. 1:1000. Otrzymany roztwór powinien być bezbarwny, przy wstrząsaniu powinien tworzyć dużą ilość piany, gotowany z kilkoma kroplami kwasu azotowego winien dać tylko słabe zmętnienie;

c) wysuszone próby krwi rozmaitych gatunków zwierząt do kontroli (rozcieńczone 1:1000);

d) fizjologiczny roztwór soli;

e) absolutnie czyste próbki, najlepiej z t. zw. „kołnierzykami“ (z odwiniętym nazewnątrz brzegiem u góry), odpowiedni statyw, pipetki miareczkowane z podziałką na  $\frac{1}{100}$  cm.<sup>3</sup>.

Wykonanie odczynu. Do 5-ciu próbek nalewamy:

1-sza prob. 2 cm.<sup>3</sup> badanego roztworu krwi + 0,1 cm.<sup>3</sup> surowicy wysokowartościowej (odczyn właściwy).

- 2-ga prob. 2 cm.<sup>3</sup> fizjol. roztw. soli + 0,1 cm.<sup>3</sup> surowicy wysokowartościowej (kontrola).
- 3-cia prob. 2 cm.<sup>3</sup> roztworu krwi tego zwierzęcia (ew. człowieka), o którą chodzi + 0,1 cm.<sup>3</sup> surowicy wysokowartościowej (kontrola).
- 4-ta prob. 2 cm.<sup>3</sup> badanego roztworu krwi (kontrola).
- 5-ta prob. 2 cm.<sup>3</sup> roztworu krwi innego zwierzęcia + 0,1 cm.<sup>3</sup> surowicy wysokowartościowej (kontrola).

Jeśli w próbówce 1-szej (odczyn właściwy) oraz 3-ciej (kontrola z krwią wiadomą) wynik będzie dodatni; w pozostałych zaś próbkach — ujemny, to obecność odpowiedniej krwi wzgl. białka w badanej próbie jest dowiedziona. Wynik dodatni odczynu polega na tem, iż najpóźniej po upływie 1—2 min. po dodaniu surowicy wysokowartościowej występuje lekkie zmętnienie na dnie próbówki, następnie w ciągu 5 minut osad powinien stać się wyraźniejszy, a po następnych 10 minutach — opaść na dno.

Surowica używana do całego doświadczenia powinna pochodzić z jednej ampułki. Jeśli przez dłuższe przechowywanie na dnie ampułki osiadzie osad, to należy użyć surowicy z górnej warstwy, ostrożnie zbierając ją pipetką.

Do każdego płynu trzeba mieć oddzielną pipetkę. Surowicę należy nalewać ostrożnie po ścianach próbówki. Probówki pozostają w ciepłocie pokojowej i nie powinny być wstrząsane.

**Modyfikacja włoskowa (kapilarowa) Hausera.** Jest ona bardzo dogodna, gdy mamy do badania bardzo małe ilości podejrzanego białka. Po kropli rozcieńzonego



białka i surowicy przenosimy przy pomocy rurki włoskowatej na dwa wkleśłe szkiełka, poczem najprzód biało, następnie surowicę ostrożnie wciągamy do rurki włoskowatej. Podobnie zostają wykonane kontrole. Rurki ustawia się na deseczce pokrytej warstwą plastyliny; wyniki określa się na ciemnym tle.

Odczyn strącania stosuje się nie tylko do krwi, ale i do nasienia (spermy), moczu i t. d.; daje on dobre wyniki nawet wówczas, gdy naprz. plamy krwi ludzkiej pokryte są umyślnie krwią zwierzęcą.

Erytrocytowa metoda strącania (precypitacji) różni się od poprzedniej tem, że jako antygen, wstrzykiwany królikom, służy nie surowica, lecz czysty roztwór hemoglobiny. Tą drogą otrzymujemy surowicę wysokowartościową, która wywołuje zmętnienie w odpowiednich roztworach hemoglobinowych. Do wstrzykiwań królikom używa się roztworu, otrzymanego przez wirowanie i przemywanie roztworem soli odpowiedniej krwi tak długo, dopóki surowica zupełnie nie zostanie usunięta (próba na biało — jak wyżej — z płynem ponad krwinkami!). Osad z krwinek miesza się z 3—4-krotną ilością wody przekroplonej, wstrząsa i ponownie wiruje; następnie do 9 części całkowicie przezroczystego roztworu hemoglobiny dodaje się 1 część fizjolog. roztworu soli. Roztwór ten można czas jakiś przechowywać. Płyn ten wstrzykuje się królikom w odstępach czasu 1—3 tygodniowych, 20 cm<sup>3</sup> do otrzewnej lub 2 cm.<sup>3</sup> dożylnie. Przed trzecią iniekcją następuje próbne zebranie krwi, w której sprawdza się wysokość miana oraz swoistość. Przy metodzie tej można stosować również i rurki włoskowate (patrz wyżej o modyfikacji Hauser'a).

**B. Wykrycie zafałszowań w mięsie.** Do tego celu potrzebne są:

a) surowice wysokowartościowe, swoiste dla tych gatunków białka, o wykrycie których chodzi nam przy badaniu (najczęściej chodzi o wykrycie mięsa końskiego). Surowica

przygotowana w sposób, podobny jak przy A, musi być jałowa, nieopalizująca, o mianie ok. 1 : 20000 ;

b) wyciąg z badanego mięsa, przygotowany jak następuje:

z głębi podejrzanego kawałka mięsa wykrawa się 30 gr., możliwie z miejsca chudego (zachowując absolutną czystość!). Posiekane mięso przenosi się do jałowej kolbki Erlenmeyer'a objętości 100 cm.<sup>3</sup>, zalewa 50 cm.<sup>3</sup> jałowego fizjolog. roztworu soli i miesza szklaną bagietką. (Solone mięso należy uprzednio obmyć z soli przez umieszczenie go w dużej kolbie i przemywanie wodą przekroploną w ciągu 10 min.). Mięso wraz z fizjol. roztworem soli pozostaje przez 3 godziny w ciepłocie pokojowej lub przez noc w lodowni, po dodaniu kilku kropel chloroformu. Aby się przekonać, czy wyciąg zawiera dostateczną ilość ciał białkowych, należy ok. 2 cm.<sup>3</sup> skłócić w probówce: jeśli utworzy się delikatna piana, która trzyma się czas dłuższy — nadaje się on do badania.

Wyciąg musi być dokładnie przesączony; z chudego mięsa przez sącze z bibuły, z mięsa tłustego lub peklowanego — przez wypaloną krzemionkę.

Po otrzymaniu przezroczystego przesącza, o ile zawiera on więcej, niż 1 część białka na 300 części roztworu soli, należy go rozcieńczyć. W celu sprawdzenia należy 1 cm.<sup>3</sup> przesącza zagotować w probówce z kroplą kwasu azotowego (cięż. wł. = 1,53). Jeśli wystąpi silny męt, który natychmiast opadnie na dno, jako osad, jest to znak, że roztwór jest zbyt silny i że należy go tak długo rozcieńczać, dopóki płyn po dodaniu kwasu tworzyć będzie tylko jednostajną opalizację, opadającą po 5 min. w postaci minimalnego osadu. Przed rozpoczęciem doświadczenia należy sprawdzić odczyn przesącza, który winien być obojętny lub słabo zasadowy;

- c) wyciągi z mięsa wieprzowego i wołowego (do kontroli);
- d) całkowicie przezroczysta normalna surowica królika;
- e) fizjologiczny roztwór soli.

- Wykonanie próby w następujących próbkach:
- 1-sza prob. 1 cm.<sup>3</sup> badanego wyciągu + 0,1 cm.<sup>3</sup> wysokowart. surow. antykońskiej.
  - 2-ga prob. 1 cm.<sup>3</sup> badanego wyciągu + 0,1 cm.<sup>3</sup> normalnej surowicy królika.
  - 3-cia prob. 1 cm.<sup>3</sup> wyciągu z mięsa końskiego + 0,1 cm.<sup>3</sup> wysokowart. surow. antykońskiej.
  - 4-ta prob. 1 cm.<sup>3</sup> wyciągu z mięsa wieprzowego + 0,1 cm.<sup>3</sup> wysokowart. surow. antykońskiej.
  - 5-ta prob. 1 cm.<sup>3</sup> wyciągu z mięsa wołowego + 0,1 cm.<sup>3</sup> wysokowart. surow. antykońskiej.
  - 6-ta prob. 1 cm.<sup>3</sup> jałow. fizjolog. roztworu soli + 0,1 cm.<sup>3</sup> wysokowart. surow. antykońskiej.

Jeśli w 1-szej i 3-ciej próbce po 5 minutach utworzy się zmętnienie, które po następnych 5 min. wzmoże się, a po 30 minutach (najpóźniej) utworzony osad opadnie na dno — oznacza to, iż badany wyciąg istotnie pochodzi z mięsa końskiego.

Odczyn strącania znajduje zastosowanie i w badaniach bakteriologicznych; jeżeli zwierzęta były uodporniane jakimiś drobnoustrojami, naprz. lasecznikami duru brzuszego i t. p., to surowica zwierząt tych strąca globulinę z przesączu hodowli buljonowej tylko tego gatunku bakterji, które były użyte do szczepienia. Praktycznie stosowany do wykrycia nosaczyny, jako odczyn *Ascoli*'ego, patrz str. 110.

### Odczyn zlepiania (aglutynacji).

Założenie teoretyczne. Zjawisko aglutynacji polega na tem, że drobnoustroje w rozcieńczonej surowicy



swoistej zostają przez nią pozbawione ruchu — o ile go posiadały — oraz zlepione w grudki; gdy więc do jednolitej zawiesiny hodowli tyfusowej dodamy surowicy wysokowartościowej tyfusowej w pewnym rozcieńczeniu, to zlepione bakterje opadną w postaci osadu na dno naczynia, a płyn ponad osadem będzie przezroczysty. Zarówno do przygotowania zawiesin bakteryjnych, jak i do rozcieńczenia surowicy używa się fizjologicznego roztworu soli.

**Zastosowanie.** Odczyn aglutynacyjny ma praktyczne zastosowanie w dwóch kierunkach; służy on: I. do różnicowania wyhodowanych, a nieokreślonych jeszcze drobnoustrojów zapomocą wiadomych surowic wysokowartościowych, oraz II. do rozpoznawania szeregu chorób zakaźnych (dur brzuszny, cholera, krwawa biegunka i in.) na podstawie zachowania się surowicy chorego względem znanych nam drobnoustrojów.

Surowicę wysokowartościową otrzymuje się przez kilkakrotne dożyłne wstrzykiwanie królikowi (lub innemu zwierzęciu) żywej lub zabitej w  $60^{\circ}$  (1 godz.) zawiesiny bakteryjnej. Wstrzykiwania powinny następować mniej więcej co tydzień; krew należy wziąć od zwierzęcia w 7—10 dni po ostatnim wstrzyknięciu. Surowicę przed użyciem (i przechowaniem) należy „zmianować“, t. j. przekonać się, jakie jest najwyższe rozcieńczenie, w którym surowica lepia jeszcze bakterje danego gatunku.

Odczyn zlepiania wykonać można do badania gołym okiem (makroskopowo) lub do badania pod drobnovidzem (mikroskopowo).

Do wykonania odczynu aglutynacji potrzebne są:

a) do aglutynacji makroskopowej:

1. probówki (13 cm. długości na 13 mm. szerokości lub 10 cm.  $\times$  10 mm.).
  2. pipetki miareczkowane (z podziałką na  $\frac{1}{100}$  cz. w 1 cm.<sup>3</sup>),
  3. pipetki włoskowate,
  4. fizjologiczny roztwór soli,
  5. lupa ;
- b) do aglutynacji mikroskopowej:
6. szkiełka przykrywkowe,
  7. szkiełka przedmiotowe z wklęsnięciami do kropli wiszącej,
  8. mikroskop.

I. Do zróżnicowania danego gatunku bakterji należy z zawiesiną, przygotowaną z 12—24 godz. hodowli agarowej tego gatunku (o przygotowaniu zawiesiny patrz str. 19), wykonać próbę aglutynacji. Jeśli sprawdzany drobnoustrój zostaje zlepiony przez surowicę wysokowartościową w rozcieńczeniu bliskim miana jej, wówczas możemy go zaliczyć do tego gatunku, którym posługiwaliśmy się przy otrzymaniu surowicy. W niskich rozcieńczeniach ( $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{100}$ ) surowica wysokowartościowa może zlepić i inne, pokrewne z badanym gatunkiem drobnoustroje — jest to tak zwana współaglutynacja, aglutynacja grupowa (conagglutinatio); surowica tyfusowa, naprz. zlepią w niższych rozcieńczeniach nie tylko prątki tyfusowe, ale i laseczniki paratyfusowe, coli i t. p., w wyższych zaś zlepią jedynie prątki Eberth'a.

Ujemny wynik próby aglutynacyjnej nie jest jednak dostatecznym dowodem, że drobnoustrój badany nie należy do gatunku, użytego do przygotowywania surowicy wyso-

kowartościowej; istnieją bowiem szczepy, trudno lub wcale nie zlepiające się odpowiednią surowicą wysokowartościową bezpośrednio po wyhodowaniu ich z organizmu, a nabywające własności zlepiania się dopiero po wielokrotnem przeszczepianiu na sztuczne pożywki. W takich wypadkach, różnicowanie gatunków musi opierać się li tylko na podstawie innych własności biologicznych.

### Wykonanie aglutynacji makroskopowej.

Surowicę wysokowartościową należy rozcieńczyć fizjologicznym roztworem soli 1) rozcieńczenie  $a = 1/100$  ( $0,1 \text{ cm.}^3$  surowicy i  $9,9 \text{ cm.}^3$  roztworu soli) i 2) rozcieńczenie  $b = 1/1000$  ( $1 \text{ cm.}^3$  rozcieńczenia  $a$  i  $9 \text{ cm.}^3$  fizjol. roztworu soli). Do szeregu probówek nalewamy rozcieńczonej surowicy, zawiesiny bakteryjnej oraz fizjologicznego roztworu soli w następującym porządku:

1-sza prob.  $1 \text{ cm.}^3$  surowicy rozcieńcz.  $a + 1 \text{ cm.}^3$  zawiesiny = rozcieńczenie 1 : 200.

2-ga prob.  $0,5 \text{ cm.}^3$  surow. rozcieńcz.  $a + 0,5 \text{ cm.}^3$  f. roztworu soli +  $1 \text{ cm.}^3$  zawiesiny = rozcieńczenie 1 : 400.

3-cia prob.  $0,2 \text{ cm.}^3$  surow. rozcieńcz.  $a + 0,8 \text{ cm.}^3$  f. roztworu soli +  $1 \text{ cm.}^3$  zawiesiny = rozcieńczenie 1 : 1000.

4-ta prob.  $1 \text{ cm.}^3$  surow. rozcieńcz.  $b + 1 \text{ cm.}^3$  zawiesiny = rozcieńczenie 1 : 2000.

5-ta prob.  $0,5 \text{ cm.}^3$  surow. rozcieńcz.  $b + 0,5 \text{ cm.}^3$  f. roztworu soli +  $1 \text{ cm.}^3$  zawiesiny = rozcieńczenie 1 : 4000.



6-ta prob.  $0,25 \text{ cm.}^3$  surow. rozcińcz.  $b + 0,75 \text{ cm.}^3$   
 f. roztworu soli  $+ 1 \text{ cm.}^3$  zawiesiny = rozciń-  
 czeniu 1 : 8000 i t. d.

Prócz odczynu właściwego należy nastawić 2 kontrole, które mają na celu przekonanie się: 1) czy bakterje w użytej do badania zawieszynie nie zlepiają się same przez się (per se), w tym celu należy do 1 próbówki nalać  $1 \text{ cm.}^3$  zawiesiny i dodać  $1 \text{ cm.}^3$  fizjol. roztworu soli (odpowiadający ilościowo zużytej do innych próbek surowicy wysokowartościowej); 2) czy użyta do badania surowica wysokowartościowa jest istotnie „wysokowartościową“, t. j., czy w najsilniejszym rozcińczeniu (mianie) zlepia gatunek bakterji, z którego została przygotowana — w tym celu należy nalać  $1 \text{ cm.}^3$  silnego rozcińczenia surowicy wysokowartościowej i dodać  $1 \text{ cm.}^3$  zawiesiny gatunku bakterji, z którego surowica została przygotowana.

Wszystkie próbówki wstawiamy na 2 godziny do cieplarki, poczem sprawdzamy wyniki. Niektóre bakterje, zwłaszcza nieruchome, zlepiają się bardzo powoli — odczyn może być oglądany dopiero po 20—24 godzinach pozostawiania próbek w cieplarce. Przy oglądaniu należy próbówki po kolei wyjmować ze statywu i trzymać nieco powyżej wysokości głowy. Przy wyniku dodatnim, t. j. przy silnej aglutynacji, w przezroczystym płynie znajdują się wyraźne kłaczkki, które po dłuższym staniu opadają na dno w postaci białego osadu. Przy wyniku ujemnym płyn jest jednolicie mętny, niczem nie różni się od płynu przed pobytem w cieplarce i jest taki sam, jak w kontroli 1-ej (zawiesina drobnoustrojów  $+ \text{ fizjol. roztw. soli}$ ). Gdy płyn nie jest jednolicie mętny, aglutynacja nie jest jednak wy-

rażna, posługujemy się lupą, która pomaga do obejrzenia małych nawet zlepków.

### Wykonanie aglutynacji mikroskopowej (w „kropli wiszącej“).

Aglutynacja mikroskopowa znajduje zastosowanie zwykle wówczas, gdy chcemy przyspieszyć wynik badania lub mamy bardzo skąpo materiału do zbadania.

Odrobinę materiału (naprz. z podejrzanej kolonii na płytce) rozcieramy w kropli rozcieńczonej surowicy wysokowartościowej na szkiełku przykrywkowym; można też materiał badany najprzód rozetrzeć w dużej kropli fiz. soli na szkiełku przedmiotowym, a dopiero z przygotowanej zawiesiny przenosić krople na szkiełka przykrywkowe i mieszać z kroplami odpowiednich rozcieńczeń surowic wysokowartościowych. Przy aglutynacji mikroskopowej ograniczamy się zwykle do rozcieńczeń 1 : 100, 1 : 200 i 1 : 400. Szkiełko z zawiesiną podejrzanego drobnoustroju oraz surowicą wysokowartościową umieszczamy na szkiełku przedmiotowym z wkłnięciem otoczonym wazeliną, czyli robimy t. zw. „kroplę wiszącą“. Podobnie, jak i przy aglutynacji makroskopowej, należy przygotować obiedwie kontrole: 1) zawiesinę bez surowicy, 2) zawiesinę sprawdzonego szczepu odpowiedniego (t. j. z gatunku, z którego przygotowano surowicę wysokowartościową) z surowicą wysokowartościową swoistą. Szkiełka umieszczamy na 20 min. w cieplarni, poczem oglądamy je pod słabym powiększeniem mikroskopu. O ile odczyn jest dodatni, a więc nastąpiła aglutynacja, wówczas w całym polu widzenia widać zlepione grudki dro-

bnoustrojów (porównać z kontrolą 2-gą, gdzie aglutynacja powinna być wybitnie dodatnia). O ile odczyn jest ujemny — wówczas drobnoustroje są jednolicie rozmieszczone w całym polu widzenia (porównać z kontrolą 1-szą — z samą zawiesiną, w której nawet śladów aglutynacji być nie powinno).

II. Odczyn aglutynacji do rozpoznania klinicznego z surowicą od chorego, podejrzanego o jakieś cierpienie, i z zawiesiną zarazków, wywołujących cierpienie to. Jako przykład służyć może:

Odczyn Widala-Gruber'a. Odczyn ten polega na zjawisku, spostrzeżonem we Francji przez Widal'a, a w Niemczech przez Gruber'a, iż w surowicy chorego na dur brzuszny wytwarzają się, zwykle począwszy od drugiego tygodnia choroby, i utrzymują się czas jakiś we krwi ozdrowieńca po przebytem cierpieniu ciała swoiste, wywołane we krwi przez laseczniki durowe (działające jako antygen); ciała te mają własność zlepiania laseczników tyfusowych, zawieszonych w fizjologicznym roztworze soli lub buljonie. Odczyn ten więc ma na celu skontrolowanie własności aglutynacyjnych surowicy chorego na dur brzuszny lub ozdrowieńca po tem cierpieniu.

Do odczynu potrzebne są:

1. spłuczyna (zawiesina) 24 godz. hodowli agarowej las. tyfusowych ze szczepu, łatwo zlepiającego się surowicą wysokowartościową swoistą, lub 24 godzinną hodowlą buljonową,
2. spłuczyna (zawiesina) 24 godz. hodowli agarowej lub hodowla buljonowa las. duru rzekomego B. względnie duru rzek. A lub Gaertner'a ze szczepu,



łatwo zlepiającego się surowicą wysokowartościową swoistą,

3. surowice wysokowartościowe do sprawdzenia odpowiednich zawiesin,
4. surowica chorego,
5. fizjologiczny roztwór soli.

Z krwi chorego, zebranej w rurkach włoskowatych lub próbkach zwężonych, należy po odwirowaniu zebrać surowicę i rozcieńczyć w stosunku 1 : 12,5 (naprz. 0,1 cm.<sup>3</sup> surowicy i 1,15 cm.<sup>3</sup> fizjol. roztw. soli lub 0,5 cm.<sup>3</sup> surowicy i 5,75 cm.<sup>3</sup> fizjol. roztw. soli). Następnie ustawić przynajmniej dwa rzędy probówek (jeden dla zawiesiny lasczników tyfusowych, drugi dla las. duru rzek. B, wzgl. trzeci dla duru rzek. A oraz czwarty dla Gärtner'a) po 6 sztuk w każdym rzędzie i rozcieńczać w nich surowicę badaną, jak następuje: do 1-szej probówki nalewamy 1 cm.<sup>3</sup> rozcieńczonej surowicy (1 : 12,5); do 2-giej, 3-ciej i 4-tej nalewamy po 0,5 cm.<sup>3</sup> fiz. roztworu soli i następnie robimy dalsze rozcieńczenia przez nalewanie po 0,5 cm.<sup>3</sup> płynu z 1-szej do 2-giej, 2-giej do 3-ciej, z 3-ciej do 4-tej prob. (kłócić!); z ostatniej probówki 0,5 cm.<sup>3</sup> płynu wylewamy do pustego naczynia. W ten sposób w każdej probówce będzie po 0,5 cm.<sup>3</sup> płynu; rozcieńczenie surowicy badanej w każdej następnej probówce będzie dwa razy większe niż w poprzedniej (w 1-szej — 1 : 12,5, w 2-giej — 1 : 25, w 3-ciej — 1 : 50, w 4-tej — 1 : 100). Do wszystkich probówek dodajemy po 0,5 cm.<sup>3</sup> zawiesiny bakteryjnej i wówczas otrzymujemy rozcieńczenia ostateczne: w 1-szej 1 : 25, w 2-giej 1 : 50, w 3-ciej 1 : 100 i w 4-tej 1 : 200. Prócz odczynu właściwego należy przygotować dwie kontrole

w celu sprawdzenia: 1-o, czy bakterje w użytych do badania zawiesinach nie zlepiają się same przez się (per se) [0,5 cm.<sup>3</sup> zawiesiny odpowiedniego drobnoustroju i 0,5 cm.<sup>3</sup> fizjol. roztw. soli]; w próbkach tych zawiesina powinna być równomiernie mętna — odczyn aglutynacji ujemny; 2-o, czy bakterje w użytych do badania zawiesinach zlepiają się pod działaniem surowicy wysokowartościowej swoistej w silnem jej rozcieńczeniu [0,5 cm.<sup>3</sup> surowicy wysokowartościowej w rozcieńczeniu bliskim jej miana i 0,5 cm.<sup>3</sup> zawiesiny] ; w próbkach tych powinien znajdować się przezroczysty płyn z zawieszonymi w nim kłaczkami, opadającymi przy dłuższem staniu na dno próbki w postaci osadu — odczyn aglutynacji dodatni.

Statyw z próbkami pozostawiamy przez 2 godziny w ciepłocie 37<sup>o</sup>, poczem oglądamy gołem okiem wzgl. przy pomocy lupy. W razie potrzeby można przygotować dalsze rozcieńczenia w sposób wyżej podany.

Jako dodatni wynik odczynu Widala (makroskopowo) uważa się zwykle aglutynację w rozcieńczeniu 1:50 lub wyżej, widoczną gołem okiem lub bardzo wyraźną przy oglądaniu lupą. Stopień i siłę aglutynacji określamy zapomocą plusów, przyczem stosujemy stopniowanie następujące: + (poszczególne kłaczki, większość bakterji niezlepionych) — oznacza ślady aglutynacji; ++ (większość bakterji jest zlepiona) — słabą aglutynację; +++ (prawie wszystkie bakterje są zlepione w duże kłaczki) — wyraźną aglutynację; ++++ (wszystkie bakterje zlepione w duże kłaczki) wybitną aglutynację. Do oceny pierwszych dwóch stopni (+ i ++) przeważnie posługujemy się lupą, dwa drugie (+++ i ++++) widoczne

są gołym okiem. Aglutynację ujemną oznaczamy (—) lub 0.

Niektórzy badacze używają zamiast spłuczyny hodowli agarowej, hodowli buljonowej z dodatkiem 1% formaliny. Stosowane też bywa t. zw. „Typhusdiagnosticum“ Ficker'a (zabita spłuczyna hodowli tyfusowej i paratyfusowej), wówczas, gdy nie ma się możliwości samemu przygotowania żywej zawiesiny.

Odczyn Widala dokonywane jest również z surowicami chorych na krwawą biegunkę; nie ma on tu jednak wielkiego znaczenia rozpoznawczego, gdyż występuje dodatkowo przeważnie dopiero pod koniec drugiego, a nawet w trzecim tygodniu choroby. Zawiesinę przygotowuje się ze szczepów Flexner'a, Shiga-Kruse, Hiss-Russel (Y), dokładnie sprawdzonych i pochodzących, o ile to możliwe, z danej epidemji. Jako wynik dodatni uważana jest zwykle aglutynacja z surowicą rozcieńczoną 1:50—1:100, zwłaszcza dla szczepów Shiga-Kruse (o charakterze zlepow patrz str. 162). Należy jednak zwrócić uwagę na to, że surowice, aglutynujące silnie szczep Shiga, aglutynują również, choć w słabszych rozcieńczeniach i inne szczepy (Hiss-Russel'a, Flexner'a).

Odczyn Widala może być również wykonany mikroskopowo. Technika różni się od makroskopowej tem, że rozcieńczona surowica zostaje zmieszana z zawiesiną nie w probówce, a na szkiełku przykrywkowym w „kropli wiszącej“, oraz, że czas przebywania w ciepłocie 37° wynosi 20 min. Surowica zostaje rozcieńczona w szeregu probówek, jak przy aglutynacji makroskopowej; następnie na szkiełku przykrywkowym umieszcza się kroplę rozcień-



czony surowicy oraz kroplę zawiesiny i po dokładnem zmieszaniu obydwu kropeł nakłada się szkiełko przykrywkowe na szkiełko przedmiotowe z wklęsnięciem, otoczonem wazeliną. Po 20 minutowem pozostawianiu szkiełka w ciepocie  $37^{\circ}$  oglądamy kroplę pod słabem powiększeniem mikroskopu i oznaczamy wyniki, jak przy aglutynacji makroskopowej.

Podczas wojny obecnej odczyn Widala-Grubera stracił nieco na wartości, gdyż bardzo wielu osobom zadano ochronnie szczepionkę tyfusową, a u osobników takich przez czas jakiś po szczepieniu (nawet do kilkunastu miesięcy) krążą w surowicy aglutyniny swoiste dla lasecznika tyfusowego. Utrudnia to stosowanie odczynu W.-Gr. jako środka rozpoznawczego w przebiegu choroby, podejrzanej o dur brzuszny. Wielu autorów uważa, iż u chorych szczepionych, nawet stosunkowo niedawno, odczyn W.-Gr., może nabierać cech rozpoznawczych dopiero w rozcieńczeniu surowicy  $1/200$ , inni autorzy jeszcze podwyższają rozcieńczenie ( $1/300$ ,  $1/400$ ). Dla osób nieszczepionych jednak odczyn W.-Gr. bynajmniej nie utracił na wartości.

Odczyn Castellani'ego. Wiele surowic od chorych ma własność zlepiania nietylko szczepu swoistego, t. j. tego gatunku, który spowodował zakażenie, lecz i innych, pokrewnych mu szczepów. Jest to tak zwana współaglutynacja (zlepianie grupowe, *conagglunatio*). Chcąc odróżnić, czy dany chory jest zakażony przez dwa różne drobnoustroje (t. zw. „zakażenie mieszane“), czy też tylko surowica jego posiada zdolności współaglutynacyjne, należy dokonać próby Castellani'ego. Odczyn ten polega na tem, że surowica osobnika, uodpornionego przeciwko

jednemu drobnoustrojowi (głównemu), o ile daje aglutynację grupową, traci swe własności wpływania na inne (poboczne) drobnoustroje, które uprzednio aglutynowała, tylko wówczas, gdy zetknąć ją z tym właśnie szczepem (głównym), jakim dany osobnik był zakażony. Jeżeli zaś nasycić ją jakimś innym szczepem (współzlepianym — pobocznym), wówczas aglutyniny dla szczepu głównego pozostają bez zmiany t.j. surowica aglutynuje szczep ten tak samo, jak uprzednio, przed nasyceniem. Surowica zaś osobnika, zakażonego dwoma różnymi drobnoustrojami, naprz. A i B, po nasyceniu jej drobnoustrojem A, traci tylko własność zlepiania A, zaś po nasyceniu jej drobnoustrojem B, traci tylko własność zlepiania B.

Wykonanie odczynu: Do dwóch cienkich probówek (jakich używa się do aglutynacji makroskopowej) nalać po 0,5 lub 1 cm.<sup>3</sup> badanej surowicy, zlepiającej, naprz. i laseczniki tyfusowe i jakiś inny drobnoustrój, naprz. lasecznik okrężnicy, poczem do jednej probówki *a* dodać 4—8 dużych uszek 24 godz. hodowli agarowej laseczników tyfusowych, do drugiej *b* taką samą ilość hodowli laseczników okrężnicy. Zawiesiny te (które powinny być równomierne i nie zawierać kłaczek) wstawia się na 12 godz. do ciepłarki. Po upływie tego czasu zawartość probówek należy odwirować, zebrać płyn z nad osadu pipetką jałową, do płynu tego ponownie dodać odpowiednich hodowli (tyfusowej i las. okrężnicy). O ile po 12 godz. (37°) dodane drobnoustroje nie będą więcej zlepiane, należy zawiesiny ponownie silnie odwirować w celu oddzielenia masy bakteryjnej, płyn z ponad otrzymanego osadu zebrać pipetką jałową i do płynu tego dodać w probówce *a* — zawiesiny laseczników okrężnicy, w probówce *b* — zawiesiny bak-

terji tyfusowych. Jeśli w próbówce *a* wystąpi dodatni odczyn aglutynacji z lasecznikami coli, a w próbówce *b* wystąpi dodatni odczyn aglutynacji z lasecznikami tyfusowymi — wówczas znaczy to, iż mamy do czynienia z zakażeniem mieszanem: i tyfusowem i prątkiem okrężnicy. Jeśli zaś aglutynacja nastąpi tylko w próbówce *b*, gdzie surowicę nasycano lasecznikami okrężnicy, a potem dodano laseczników tyfusowych — oznacza to, że poprzedni objaw zlepiania laseczników okrężnicy polegał na współaglutynacji, zakażenie zaś było wywołane tylko przez laseczniki tyfusowe.

Praktycznie, zastosowanie tego odczynu jest naogół stosunkowo niewielkie.

Od współaglutynacji (conagglutinatio) odróżniać należy aglutynację rzekomą (pseudoagglutinatio). Pod nazwą „zlepiania rzekomego“ rozumieć należy zlepianie bakterji, które nie jest zależne od działania surowicy, lecz wyłącznie albo od przyczyn fizycznych, albo własności danych bakterji. Niektóre gatunki bakterji, naprz. las. gruźlicze, gronkowce, paciorkowce, już w hodowlach stale tworzą zlepki.

Odczyn Weil-Felix'a polega na własności, spostrzeżonej przez Weil'a i Felix'a (1915), iż surowice chorych na dur plamisty w pewnem rozcieńczeniu zlepiają laseczniki odmienia (X<sub>19</sub>), wyhodowanego z moczu chorych na wymienione cierpienie (o odmieniu Weil-Felix'a patrz str. 172). Zjawisko to należy tłumaczyć, prawdopodobnie, jako paraglutynację, gdyż odmieniec X<sub>19</sub> nie wywołuje duru plamistego. Pod paraglutynacją pojmujemy (Kuhn, Woithe, Ebeling) zjawisko zlepiania drobnoustrojów, nieswoistych dla danej surowicy (naprz. zlepianie



lasecznika okrężnicy przez surowicę od chorych na krwawą biegunkę lub dur brzuszny). Paraglutyniny znikają z surowicy szybciej, niż aglutyniny swoiste.

Aglutyniny odmiencowe występują we krwi chorych na dur plamisty począwszy od drugiej połowy pierwszego tygodnia choroby; pozostają w niej do kilku tygodni po chorobie, a niekiedy nawet i dłużej. Zawiesinę, używaną do odczynu, przygotowuje się z 24 godz. hodowli agarowej (agar musi mieć odczyn słabo zasadowy lub obojętny). Zawiesina ta powinna być rzadka (skośną hodowlę agarową spłukuje się w ok. 50 cm.<sup>3</sup> fizjolog. roztworu soli), gdyż w ten sposób zmniejsza się ilość ciał hamujących aglutynację, zawartych w ciele odmięca<sup>1)</sup>. Niektórzy autorzy zalecają dodawanie do zawiesiny środków antyseptycznych (alkoholu, 0,5% karbolu, 0,5% fenolu, 1% formolu) lub zwiększać jej własności aglutynacyjne przez ogrzewanie do 60<sup>0</sup> i wyżej w ciągu 1/2—2 godzin; najlepsze jednak wyniki daje zawiesina żywa, codzień świeżo przygotowywana, nieogrzewana, bez dodatku środków przeciwnilnych.

Weil i Felix przekonali się, że w wyhodowanych przez nich szczepach od chorych na dur plamisty, można wyodrębnić dwojakie hodowle: postaci H („Hauchbildung“) i postaci O („ohne Hauchbildung“).

<sup>1)</sup> Najlepszym z dotąd wyhodowanych szczepów jest szczep Weil'a i Felix'a X<sub>19</sub>, który jest też powszechnie używany. Technika badaczów niemieckich: z 16—18 godz. hodowli agarowej (w próbówce 160×16 mm.) przygotować zawiesinę, spłukując hodowlę 2 cm.<sup>3</sup> fiz. NaCl: do próbek z rozcieńcz. surow. 1/50, 1/100, 1/200 (wzgl. wyżej) dodać po 1 kropli zawiesiny tej, wstawić do ciepłarki (37<sup>0</sup>) — po 2 godz. obejrzeć i zanotować wynik.

Autorzy ci zwracają uwagę, że grudki przy właściwym odczynie powinny być drobne, gdyż wywołane zostają przez specjalne receptory, znajdujące się w surowicy chorych na dur plamisty oraz w surowicy zwierzęcia, któremu wstrzykiwano zawiesinę z kolonii O; surowice te nie aglutynują odmienia innego gatunku. Natomiast surowica zwierzęcia, któremu wstrzykiwano zawiesinę z kolonii H, wywołuje aglutynację gruboziarnistą i to nie tylko ze szczepem X<sub>19</sub>, lecz również z innymi rodzajami odmieńców — posiada więc receptory dwojakie.

Rozcieńczenia surowic zostają tak samo przygotowane, jak przy odczynie Widal'a. Naogół odczyn wykonywa się makroskopowo. Do surowicy rozcieńczonej 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100 i t. d., po 0,5 cm.<sup>3</sup> w każdej probówce, dodaje się po 0,5 cm.<sup>3</sup> zawiesiny, przez co otrzymuje się rozcieńczenia ostateczne 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 i t. d. Prócz odczynu właściwego przygotować należy dwie kontrole: 1) 0,5 cm.<sup>3</sup> zawiesiny + 0,5 cm.<sup>3</sup> surowicy w wysokim rozcieńczeniu, o której wiemy z góry, że daje wybitnie dodatni odczyn zlepienia, oraz 2) 0,5 cm.<sup>3</sup> zawiesiny + 0,5 cm.<sup>3</sup> fizjol. roztw. soli. Probówki wstawia się na 4—6 godz. do cieplarki lub pozostawia 15—18 godz. w ciepłocie pokojowej, poczem ocenia wyniki, posługując się lupą. Wyniki oznacza się plusami, podobnie jak przy odczynie Widal'a. W kontroli 1-szej aglutynacja powinna być wybitnie dodatnia, w 2-giej — zawiesina powinna pozostać bez zmiany. Za miano rozpoznawcze uważamy wyraźną aglutynację z surowicą rozcieńczoną 1 : 200.

Surowice w słabszym rozcieńczeniu (1 : 50) niekiedy

gorzej zlepiąją laseczniki odmienca, niż w silniejszym. Zamowienie to przypisać należy działaniu pewnych ciał, znajdujących się w surowicy, których ilość przez coraz większe rozcieńczanie surowicy odpowiednio się zmniejsza.

Odczyn Weil-Felix'a jest swoisty dla duru plamistego (występuje w 90—98% przypadków duru plamistego), i nie występuje w rozcieńczeniu surowicy wyższem, niż 1 : 100 przy innych cierpieniach.

### Odczyn hemolityczny.

Założenie teoretyczne: wstrzykując kilkakrotnie zwierzęciu co 5—7 dni zawiesinę czerwonych ciałek krwi, pochodzących od zwierzęcia innego gatunku, wywołujemy w surowicy jego powstawanie przeciwciał, mających własność rozpuszczania krwinek (wywoływania hemolizy, hemolizowania) tego gatunku zwierzęcego, którego krwinki były użyte do wstrzykiwania. Jeśli naprz. wstrzykiwać królikowi zawiesinę krwinek baranich, to surowica królika, w pewnem rozcieńczeniu, będzie miała własność rozpuszczania krwinek baranich w obecności jakiegokolwiek świeżej surowicy normalnej (dopełniacza). Surowica taka otrzymała nazwę d u c h w y t n i k a — amboceptora hemolitycznego (patrz str. 223); po jakimś czasie (zwykle ok. 24 godz.) po zebraniu jej od zwierzęcia ginie składnik wrażliwy na ciepło (dopełniacz) — i od tej chwili surowica bez obecności świeżego dopełniacza (zwykle pochodzącego od świnki morskiej) nie działa, jest w stanie unieczynnienia (inaktywacji). Świeżą surowicę można sztucznie pozbawić dopełniacza — a więc unieczynnić (inaktywować) — ogrzewając ją przez  $\frac{1}{2}$  godz. przy  $56^{\circ}$ .

Ciała, zwane h e m o l i z y n a m i (rozpuszczające obce



krwinki), są ściśle swoiste i można je uwidocznić w doświadczeniu w próbówce.

Zastosowanie praktyczne: odczyn stosuje się wówczas, gdy chodzi o zbadanie, czy w danej surowicy znajdują się hemolizyny, swoiste dla znanego nam gatunku krwinek, lub czy dany gatunek krwinek jest swoisty dla przeciwciał hemolitycznych znanej nam surowicy. Praktycznie stosuje się jako t. zw. „układ hemolityczny“ do badań z wiązaniem dopełniacza (odczyn B o r d e t - G e n g o u, W a s s e r m a n n'a — patrz str. 216). Układ hemolityczny składa się z 3-ech składników: 1) unieczynnionego dwuchwytnika hemolitycznego, 2) dopełniacza świeżej surowicy (zwykle świnki morskiej), 3) zawiesiny krwinek swoistych. Do wykonania odczynu potrzebne są:

1. 5% zawiesina krwinek baranich w fizjologicznym roztworze soli,
2. surowica wysokowartościowa królika, któremu wstrzykiwano kilkakrotnie zawiesinę krwinek baranich (dwuchwytnik hemolityczny) [o sprawdzaniu jej patrz str. 224],
3. świeża surowica od świnki morskiej (dopełniacz),
4. pipetki z podziałką na dziesiąte i setne części  $\text{cm.}^3$  (t. zw. pipetki serologiczne),
5. próbówki 5 cm.  $\times$  5 mm. lub 10 cm.  $\times$  10 mm.

Próbówki ustawiamy w statywie w dwa rzędy i kolejno piszemy na nich wzrastające rozcieńczenia surowicy: naprz. na 1-szej  $\frac{1}{100}$ , na 2-giej  $\frac{1}{500}$ , na 3-ciej  $\frac{1}{1000}$ , na 4-tej  $\frac{1}{2000}$  i t. d.

- 1-sza prob.: 0,1  $\text{cm.}^3$  surow. nierozcieńcz. + 9,9  $\text{cm.}^3$  fizjol. roztworu soli = rozcieńcz. 1 : 100 (I).

2-ga prob.:  $1,0 \text{ cm.}^3$  surow. rozcieńcz. (I) +  $4,0 \text{ cm.}^3$  fizjol. roztw. soli = rozcieńcz. 1 : 500.

3-cia prob.:  $1,0 \text{ cm.}^3$  surow. rozcieńcz. (I) +  $9,0 \text{ cm.}^3$  fizjol. roztw. soli = rozcieńcz. 1 : 1000 (II).

4-ta prob.:  $1,0 \text{ cm.}^3$  surow. rozcieńcz. (II) +  $1,0 \text{ cm.}^3$  fizjol. roztw. soli = rozcieńcz. 1 : 2000.

Z tego rzędu probówek, w których znajdują się rozcieńczenia surowicy, przenosimy pipetką po  $0,5 \text{ cm.}^3$  do odpowiednich probówek drugiego rzędu. Następnie dodajemy do każdej probówki drugiego rzędu po  $0,5 \text{ cm.}^3$  zawiesiny krwinek, po  $0,5 \text{ cm.}^3$  dopełniacza (rozcieńczonego  $\frac{1}{20}$ ) i po  $1 \text{ cm.}^3$  fizjolog. roztworu soli, poczem dobrze kłócimy, aby krwinki wytworzyły jednolitą zawiesinę, a nie opadły na dno. W ten sposób w każdej probówce znajduje się  $2,5 \text{ cm.}^3$  mieszaniny (można też odczynu dokonywać z podwójnymi dawkami, t. j. w  $5 \text{ cm.}^3$ ), złożonej:

1. z  $0,5 \text{ cm.}^3$  dwóchwytnika hemolitycznego,
2. z  $0,5 \text{ cm.}^3$  dopełniacza,
3. z  $0,5 \text{ cm.}^3$  5‰ zawiesiny krwinek,
4. z  $1,0 \text{ cm.}^3$  fizjolog. roztworu soli.

Należy również sprawdzić:

a) czy fizjologiczny roztwór jest odpowiedni, t. j. czy sam nie rozpuszcza krwinek (t. j. czy nie jest rozczynek „hyper“- lub „hypotonicznym“). W tym celu mieszamy:  $2 \text{ cm.}^3$  fizjolog. roztw. soli +  $0,5 \text{ cm.}^3$  zawiesiny krwinek;

b) w jakiej dawce należy stosować dopełniacz. Aby się o tem przekonać dawkujemy dopełniacz, jak następuje:

- 1-sza prob.: dopełniacza rozcieńcz.  $\frac{1}{20}$   $1 \text{ cm.}^3$  + fizjol. roztw. soli  $0,5 \text{ cm.}^3$  + dwóchw. hem. rozc.  $\frac{1}{100}$   $0,5 \text{ cm.}^3$  + zawiesiny krwinek  $0,5 \text{ cm.}^3$ .

- 2-ga prob.: dopełniacza rozcieńcz.  $\frac{1}{20}$  0,7 cm.<sup>3</sup> + fiz. roztw. soli 0,8 cm.<sup>3</sup> + dwuchw. hem. rozc.  $\frac{1}{100}$  0,5 cm.<sup>3</sup> + zawiesiny krwinek 0,5 cm.<sup>3</sup>.
- 3-cia prob.: dopełniacza rozcieńcz.  $\frac{1}{20}$  0,5 cm.<sup>3</sup> + fiz. roztw. soli 1 cm.<sup>3</sup> + dwuchw. hem. rozc.  $\frac{1}{100}$  0,5 cm.<sup>3</sup> + zawiesiny krwinek 0,5 cm.<sup>3</sup>.
- 4-ta prob.: dopełniacza rozcieńcz.  $\frac{1}{20}$  0,4 cm.<sup>3</sup> + fiz. roztw. soli 1,1 cm.<sup>3</sup> + dwuchw. hem. rozc.  $\frac{1}{100}$  0,5 cm.<sup>3</sup> + zawiesiny krwinek 0,5 cm.<sup>3</sup> i t. d.

Użyty do kontroli tej dwuchwytnik hemolityczny musi być już uprzednio sprawdzony co do swych własności hemolitycznych.

Odczyn właściwy oraz obydwie kontrole, należy wstawić na 2 godziny do cieplarki (przy 37°), wstrząsać probówki kilkakrotnie w ciągu tego czasu, poczem określić wynik.

Najsilniejsze rozcieńczenie, przy którym jeszcze nastąpiła hemoliza zupełna, nazywamy „m i a n e m” danej surowicy. H e m o l i z a z u p e ł n a jest wówczas, gdy płyn jest przezroczysty, barwy szkarłatnej, bez żadnego osadu na dnie. O ile krwinki, w postaci osadu, choćby nieznacznego, opadają na dno probówki, płyn jest jednak zabarwiony — wówczas mamy h e m o l i z ę n i e z u p e ł n ą, częściową. Wreszcie, kiedy wszystkie krwinki opadły na dno, a płyn ponad nimi jest bezbarwny — wówczas mówimy o b r a k u h e m o l i z y. Co do kontrol, to w kontroli a) hemoliza nastąpić nie powinna, w kontroli b) w probówce, w której ilość dopełniacza jest odpowiednia (w naszym doświadczeniu w 3-ciej), hemoliza powinna być całkowita, w probówkach, gdzie go jest zbyt mało, hemolizy



nie będzie. Może też nie wystąpić hemoliza w próbkach, gdzie dopełniacza jest zbyt wiele — jest t. zw. „z a h a m o w a n i e h e m o l i z y“, występujące również niekiedy i wskutek obecności w każdej surowicy ciał, hamujących hemolizę.

### Odczyn wiązania dopełniacza (odchylenia dopełniacza) Bordet-Gengou.

Założenie teoretyczne: jeśli zmieszamy w pewnym stosunku antygen, z którego przygotowano surowicę swoistą, i przeciwciała (a więc unieczynnioną surowicę swoistą — dwóchwytnik) w obecności dopełniacza, to trzy te substancje utworzą związek stały, przyczem dopełniacz zostanie związany przez dwóchwytnik, który z drugiej strony wiąże antygen. Jeśli, naprz. zmieszamy w odpowiednich ilościach zawiesinę laseczników tyfusowych (antygen), unieczynnioną surowicę zwierzęcia, któremu kilkakrotnie wstrzykiwano zawiesinę laseczników tyfusowych, (dwuchwytnik) i świeżo zebraną surowicę świnki morskiej (dopełniacz), to po jakimś czasie (1—2 godz. w ciepłocie 37° lub około 3 godz. w ciepłocie pokojowej) dopełniacz zostanie z w i ą z a n y. Zjawisko wiązania (lub odchylenia) dopełniacza można wykazać, stosując jako wskaźnik „układ hemolityczny“ (patrz str. 212). Otóż, jeśli zmieszamy antygen (naprz. zawiesinę laseczników tyfusowych) i przeciwciała (naprz. odpowiednią surowicę wysokowartościową zwierzęcą lub surowicę chorego na dur brzuszny) w obecności dopełniacza, to dopełniacz zostanie związany przez surowicę badaną (działająca jako dwóchwytnik), a po dodaniu do mieszaniny unieczynnionej surowicy hemolitycznej i zawie-

siny krwinek (baranich), krwinki nie zostaną rozpuszczone przez surowicę hemolityczną. Tłomaczy się to tem, że potrzebny do rozpuszczenia krwinek dopełniacz został już w układzie głównym związany, a więc przez to „odchylony” od układu hemolitycznego, skutkiem czego w układzie tym hemoliza nie mogła nastąpić, została „zahamowana”. O ile jednak użyte do doświadczenia antygen i surowica nie były swoiste, naprz. jeśli wzięliśmy surowicę przecinkowców cholerycznych i surowicę zwierzęcia, któremu kilkakrotnie wstrzykiwano zawiesinę prątków tyfusowych, to dopełniacz pozostanie nieużyty przez nie i będzie mógł być związany przez dwuchwytnik układu hemolitycznego, dzięki czemu nastąpi w układzie tym hemoliza.

Zastosowanie praktyczne odczyn Bordet-Gengou ma wówczas, gdy trzeba wykryć, czy znany nam antygen i nieznana surowica odpowiadają sobie („pasują wzajemnie do siebie”), t. j. czy surowica zawiera swoisty dwuchwytnik, i naodwrot, czy nieznany antygen odpowiada znanej nam surowicy.

Odczyn wiązania dopełniacza stosuje się do badania krwi na bąblowce (echinokokki), na nosaciznę i t. p. Najczęstsze jednak zastosowanie znalazł on jako odczyn Wassermann'a.

Odczyn Wassermann'a oparty jest na tem, że ciała swoiste, zawarte w surowicy chorego na kiłę czyli przymiot (lues, syphilis), w zetknięciu z antygenem kiłowym w próbówce wiążą dopełniacz świeżej surowicy świnki morskiej, wskutek czego nie może nastąpić hemoliza w układzie hemolitycznym, dodanym do tej samej próbówki.

Do wykonania odczynu potrzebne są następujące odczyn-

niki: 1) surowica chorego, 2) antygen, 3) dopełniacz, 4) zawiesina krwinek baranich, 5) dwuchwytnik hemolityczny, 6) surowica syfilityka, 7) surowica człowieka zdrowego, 8) fizjologiczny roztwór soli.

1) **S u r o w i c a c h o r e g o.** Krew, zebraną z żyły, po skrzepnięciu należy odwirować, by oddzielić surowicę. Surowicę należy przenieść jałową pipetką do probówki i unieczynić ją (inaktywować), t. j. usunąć z niej dopełniacz przez ogrzanie do  $56^{\circ}$  w ciągu  $\frac{1}{2}$  godziny. Surowicę należy unieczynić w jak najszybszym czasie po wzięciu krwi (w ciągu pierwszych 24—48 godz.), gdyż po dłuższym czasie w surowicy nieogrzonej mogą wytwarzać się w większej ilości ciała, hamujące hemolizę. Zwykle prawie każda surowica, wzięta w większej ilości, hamuje hemolizę, lecz dawki używane do badań (0,1, 0,2 lub nawet wyższe) nie wpływają hamująco na układ hemolityczny.

2) **A n t y g e n.** Jako antygen używa się wodnego, alkoholowego lub acetonowego wyciągu z luetycznej wątroby noworodka. Używane też są wyciągi z normalnych narządów (serca świnki morskiej, wątroby ludzkiej) lub też lipidów, lecytyny i t. p. Wyciąg wodny: rozdrobnioną wątrobę syfilityczną + 4 części płynu Koch'a (fizjol. roztwór soli + 0,5% fenolu) na 24 godz. umieścić na trzęsawce, odwirować zlekką i płyn z nad osadu użyć jako antygen. Wyciąg alkoholowy przygotowuje się w następujący sposób: na dobrze posiekany narząd nalać 96% alkoholu w stosunku 1 gr. tkanki i 9 cm.<sup>3</sup> wysokości, dobrze wstrząsnąć ręką lub na trzęsawce, umieścić na 12 godz. w cieplarni przy  $50-60^{\circ}$ , wstrząsając wielokrotnie w międzyczasie, następnie pozostawić jeszcze 24 godz. i przesączyć



do ciemnej flaszki; można też nie wstawiać do cieplarki, lecz przez kilka dni (4—5) pozostawić w ciepłocie pokojowej, wstrząsając codzien kilkakrotnie. Silne antygeny alkoholowe należy rozcieńczać w stosunku 1 : 3, 1 : 4, niekiedy nawet 1 : 30, 1 : 50 i wyżej. Zamiast alkoholu można użyć acetonu, stosując tę samą technikę przygotowywania.

Antygen z cholesteryną przygotowuje się w sposób następujący: na świeże serce wołowe, zemłone w maszynce, należy nalać wysokości absolutnego w stosunku 1 : 5 (1 cz. serca i 5 cz. wysokości) i pozostawić w cieplance przy 37° przez 2—3 dni, często wstrząsając, przesączyć i rozcieńczyć alkoholem absolutnym w stosunku 1 : 3. Następnie trzeba dodać 1% roztworu cholesteryny taką ilość, aby czystej cholesteryny było w wyciągu 0,4—0,1%. Antygen ten należy przed użyciem rozcieńczyć fizjologicznym roztworem soli w stosunku 1 : 5 (3 cm<sup>3</sup> antygenu rozcieńczyć roztworem fizjologicznym w 2-ch porcjach: 1-a — dodać 1 cm<sup>3</sup> i mieszać bardzo delikatnie, 2-a — dodać 14 cm<sup>3</sup> i dobrze skłócić).

Antygeny wodne używane są w stanie nierozcieńczonym. Zwykle posługujemy się antygenami wysokowymi, które na ogół w ciągu paru lat nie zmieniają swych własności. Każdy antygen należy sprawdzić: 1) w jakiej dawce najwyższej i najniższej działa z surowicą kiłową (zwykle sprawdza się z wieloma surowicami), t. j. w jakiej dawce wywołuje zahamowanie hemolizy, 2) czy sam przez się nie wywołuje hemolizy krwinek baranich. W tym celu nastawiamy w szeregu probówek rozcieńczenia antygenu w fizjologicznym roztworze soli. Przy rozcieńczaniu do probówek najprzód

nalewa się fizjol. roztworu soli, a dopiero później po ścianie naczynia (próbówki) antygen, ostrożnie i powoli mieszając obydwie płyny. Z każdego rozcieńczenia bierzemy różne dawki, naprz.:

Rozcieńczenia A (1 : 2):

- 1) próbówka 1 cm<sup>3</sup>
- 2) „ 0,8 cm<sup>3</sup>
- 3) „ 0,6 cm<sup>3</sup>
- 4) „ 0,5 cm<sup>3</sup>
- i t. d.
- 8) „ 0,1 cm<sup>3</sup>

Rozcieńczenia B (1 : 3):

- 1) próbówka 1 cm<sup>3</sup>
- 2) „ 0,8 cm<sup>3</sup>
- 3) „ 0,6 cm<sup>3</sup>
- 4) „ 0,5 cm<sup>3</sup>
- i t. d.
- 8) „ 0,1 cm<sup>3</sup>

późem uzupełnia się fizjol. roztworem NaCl ilość płynu w każdej próbówce do 1 cm<sup>3</sup>, dodaje się 0,1 cm<sup>3</sup> surowicy chorego na kiłę + 0,9 cm<sup>3</sup> fizjol. roztworu soli, 0,5 cm<sup>3</sup> dopełniacza + 0,5 cm<sup>3</sup> fizjol. roztworu soli; po dokładnem skłóceniu, próbówki należy umieścić na godzinę w cieplarni (w 37°), poczem dodać do każdej próbówki po 1 cm<sup>3</sup> : 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-ej zawiesiny krwinek baranich i dwuchwytnika hemolitycznego w odpowiednim rozcieńczeniu. Bada się następnie, gdzie nastąpiła jeszcze zupełna hemoliza — sąsiednia próbówka, w której wystąpiło już zahamowanie hemolizy, będzie zawierała dawkę najniższą antygenu. Dawkę najwyższą określić trzeba po ustaleniu dawki, w której antygen hamuje sam przez się, bez surowicy luetycznej. W tym celu, wraz z pierwszą serją próbówek, wstawić należy do cieplarki drugą taką samą serję, gdzie jednak wszędzie zamiast surowicy kiłowej dodano po 1 cm<sup>3</sup> fizjol. roztworu soli. Dawka, znajdująca się w próbówce, w której niema hemolizy, jest to dawka,

w jakiej antygen hamuje sam przez się („per se“). Sąsiednia zaś próbówka, w której jest hemoliza zupełna — o ile w odpowiedniej próbówce z surowicą syfilityczną jest zahamowanie zupełne — zawiera najwyższą dawkę antygeny, używaną zwykle do badań. Przy antygenach kupnych zwykle wskazywana jest dawka najwyższa, co pewien czas należy ją jednak sprawdzać, gdyż siła antygeny może zmniejszyć się z biegiem czasu. Każdą surowicę należy badać przynajmniej z dwoma antygenami.

3) D o p e ł n i a c z. Jako dopełniacz (znajdujący się w każdej świeżej surowicy), służy świeża surowica świnki morskiej (o zbieraniu krwi od świnek patrz str. 186). Dopełniacza należy używać tego dnia, w którym był zebrany (wzgl. w ciągu następnych kilku dni, o ile przechowywać go na lodzie i do 1 cm<sup>3</sup> świeżej surowicy świnki dodać 0,3 cm<sup>3</sup> 24<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu soli, przed użyciem zaś do 1 cm<sup>3</sup> osolonego dopełniacza dodać 8,7 cm<sup>3</sup> wody przekrojonej — przez co otrzymuje się 10 cm<sup>3</sup> 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> dopełniacza z ilością soli kuch., jak w fizjologicznym roztworze). Zaleca się zbierać do każdego badania dopełniacz od kilku świnek i mieszać wszystkie surowice razem.

Zwykle bierzemy 0,05 cm<sup>3</sup> dopełniacza na każdą próbówkę, t. j. 1 cm<sup>3</sup> 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> dopełniacza, rozcieńczonego fizjol. roztworem soli. Niektórzy badacze zalecają używać 1 cm<sup>3</sup> 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> dopełniacza (t. j. 0,1 cm<sup>3</sup> w każdej próbówce); jest to jednak, jak się okazało z szeregu badań, ilość zbyt wielka, utrudniająca niekiedy hemolizę.

Dopełniacz może posiadać różną siłę — zawsze więc trzeba ją uprzednio sprawdzić. W tym celu w szeregu próbek należy przygotować rozcieńczenia dopełniacza



tak, aby znajdowało się dopełniacza: w 1-ej probówce —  $0,1 \text{ cm}^3$ , w 2-giej —  $0,09 \text{ cm}^3$ , w 3-ej —  $0,08 \text{ cm}^3$ , w 6-ej —  $0,05 \text{ cm}^3$ , w 8-ej —  $0,03 \text{ cm}^3$ . W każdej probówce uzupełniamy fizjolog. roztworem soli ilość płynu do  $1 \text{ cm}^3$ , dodajemy po  $1 \text{ cm}^3$  rozcieńczonego (sprawdzonego) dwuchwytnika hemolitycznego, po  $1 \text{ cm}^3$  5% zawiesiny krwinek baranich i po  $2 \text{ cm}^3$  fizjolog. roztworu soli, a więc:

W probówce:	Dopełniacza	fizjol. roztw. s.	dwuchwytnik hemolit.	zaw. krwinek	fizjol. roztw. s.
1-ej	$0,1 \text{ cm}^3 + 0,9$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 2$	$\text{cm}^3$
2-ej	$0,09 \text{ cm}^3 + 0,91$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 2$	$\text{cm}^3$
3-ej	$0,08 \text{ cm}^3 + 0,92$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 2$	$\text{cm}^3$
4-ej	$0,07 \text{ cm}^3 + 0,93$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 2$	$\text{cm}^3$
5-ej	$0,06 \text{ cm}^3 + 0,94$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 2$	$\text{cm}^3$
6-ej	$0,05 \text{ cm}^3 + 0,95$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 2$	$\text{cm}^3$
7-ej	$0,04 \text{ cm}^3 + 0,96$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 2$	$\text{cm}^3$
8-ej	$0,03 \text{ cm}^3 + 0,97$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 1$	$\text{cm}^3 + 2$	$\text{cm}^3$

Dopełniacz jest „ciepłochwiejny“, t. j. wrażliwy na wysoką ciepłotę — ginie po  $\frac{1}{2}$  godziny w ciepłocie  $55-56^{\circ}$ ; umyślnie zniszczenie go w surowicy nazywa się unieczynnieniem (inaktywacją), dodanie go zaś w odpowiedniej ilości do surowicy i przywrócenie w niej własności — reaktywacją.

4) Zawiesina krwinek baranich. O zbieraniu krwi od barana patrz str. 187. Krew, zebraną do jałowej kolbki ze szklanymi perełkami (wzgl. z 1% cytrynianem

lub szczawianem sodu), po dokładnem odwłóknieniu jej, nalewamy do probówek zwężonych i, po oznaczeniu na nich tłustym ołówkiem granicy płynu, dokładnie wirujemy. Po odwirowaniu, surowicę zebraną ponad krwinkami odciągamy pipetą i do krwinek dodajemy taką samą ilość fizjolog. roztworu soli, kłócimy i ponownie wirujemy. Przemywanie to należy powtórzyć trzykrotnie, aby całkowicie usunąć surowicę z zawiesiny. Po usunięciu ostatniej porcji roztworu soli rozcieńcza się krwinki w stosunku  $1 \text{ cm}^3$  gęstej masy krwinek na  $20 \text{ cm}^3$  fizjol. roztw. soli (przez co otrzymuje się 5% zawiesinę krwinek). Po pewnym czasie (po kilku dniach, zwłaszcza w ciepłocie pokojowej) krwinki hemolizują, t. j. rozpuszczają się, same przez się; aby temu zapobiec, należy dodać do zawiesiny roztworu formolu (40% formaldehydu kupnego) w stosunku 1 : 700, (t. j. 3 krople roztworu formolu na  $100 \text{ cm}^3$  zawiesiny krwinek) i przechowywać ją w chłodnem miejscu.

5) D w u c h w y t n i k h e m o l i t y c z n y. Przez 3—4-krotne wstrzykiwanie królikowi do żyły usznej, podskórnice lub do otrzewnej po  $5 \text{ cm}^3$  lub więcej 25—30%-ej zawiesiny krwinek baranich w kilkodniowych odstępach czasu, surowica zwierzęcia nabiera własności rozpuszczania krwinek baranich *in vitro* (w probówce). Przed ostatecznym upustem krwi od królika należy wziąć jej trochę na próbę i przekonać się, w jakim rozcieńczeniu posiada ona własności hemolityczne (technika str. 224). Surowica powinna rozpuszczać krwinki conajmniej w rozcieńczeniu 1 : 1000. Po przekonaniu się o sile surowicy, bierzemy od zwierzęcia za życia większą ilość krwi lub zabijamy je, a zebraną jałowo surowicę przechowujemy, jak wszelkie surowice

wysokowartościowe (w ampułkach zatopionych, w miejscu ciemnym i chłodnym). Siłę dwóchwytnika hemolitycznego należy sprawdzać za każdym razem przed dokonaniem właściwego odczynu. W tym celu przygotowujemy wzrastające rozcieńczenia dwóchwytnika, naprz. od 1 : 400 aż do miana ostatecznego (określonego poprzednio i podanego na ampułkach z surowicą) i bierzemy po 1 cm<sup>3</sup> każdego rozcieńczenia, więc 1-a probówka zawiera 1 cm<sup>3</sup> rozcieńczenia 1 : 400, 2-a 1 cm<sup>3</sup> rozcieńczenia 1 : 600, 3-a 1 cm<sup>3</sup> rozcieńczenia 1 : 1000 i t. d. Następnie do każdej probówki nalewamy po 1 cm<sup>3</sup> 5% dopełniacza (t. j. po 0,05 cm<sup>3</sup>), po 1 cm<sup>3</sup> 5% zawiesiny krwinek baranich i po 2 cm<sup>3</sup> fizjolog. roztworu soli (w ten sposób ogólna ilość płynu w każdej probówce wynosi 5 cm<sup>3</sup>), poczem po dokładnem wstrząśnięciu probówek wstawiamy je do cieplarki. W ciągu 5 m. do 1 godziny powinna nastąpić hemoliza we wszystkich probówkach. O ile jednak, z biegiem czasu, surowica osłabiła swe własności hemolityczne, wówczas rozcieńczenie w ostatniej probówce, w której jeszcze nastąpiła zupełna hemoliza, stanowić będzie właściwe miano surowicy. Do właściwego odczynu używamy rozcieńczenia dwóchwytnika 2—3 razy mniejszego od największego rozcieńczenia, w jakim nastąpiła jeszcze hemoliza (t. j. od miana).

6) Surowice od jednej lub paru osób, niewątpliwie chorych na kiłkę (najlepiej z różnych okresów choroby), które dają odczyn Wassermann'a wybitnie dodatni.

7) Surowice od jednej lub paru osób z drowych, wzgl. nawet chorych, lecz napewno nie na kiłkę (jednak zaleca



się w tym razie ostrożność, gdyż w pewnych cierpieniach, naprz. w durze plamistym, durze powrotnym, zimnicy, płonicy i in. odczyn Wassermann'a może dawać wynik dodatni, lepiej jest więc brać surowice od osób zupełnie zdrowych).

8) Fizjologiczny roztwór soli należy przygotować przez dokładne odważenie 8,5 gr. soli kuchennej i rozpuszczenie jej w 1 litrze jałowej wody przekroplonej. Chcąc się przekonać, czy roztwór zawiera dokładnie 0,85% soli kuchennej, należy go zmianować azotanem srebra.

Odczyn Wassermann'a, według metody oryginalnej, którą tu podajemy, wykonywuje się w 5 cm<sup>3</sup> płynu, t. j. w każdej probówce — po dodaniu wszystkich składników i dopełnieniu solą — ogólna ilość płynu powinna wynosić 5 cm<sup>3</sup>; można jednak odczyn wykonać i w 2,5 cm<sup>3</sup> płynu. Właściwy odczyn musi być poprzedzony przez kontrolę dwóchwytnika i dopełniacza. Dopiero po ustaleniu dawek i sprawdzeniu dobroci tych składników można przystąpić do właściwego odczynu.

Naogół, stosuje się określenie ilościowe przeciwciał, znajdujących się w surowicy badanej, a nie zadawalnia się tylko stwierdzeniem ich obecności, niekiedy jednak może starczyć tylko wykazanie obecności przeciwciał. Do mianowania (ilościowego określenia) przeciwciał istnieją trzy drogi: I-a) brać stałe dawki surowicy i coraz mniejsze dawki antygeny (dopełniacza ilość stała), II-a) brać stałe dawki antygeny i coraz mniejsze dawki surowicy (dopełniacza ilość stała), III-a) brać stałe dawki surowicy i antygeny, a różne ilości dopełniacza. Okazało się, że najpraktyczniejszą jest droga pierwsza — stałe dawki suro-

wicy, a różne, coraz mniejsze dawki antygeny; zalecając więc ją, podajemy ją poniżej. Odczyn Wassermann'a wykonywane się zwykle przynajmniej z dwoma antygenami; poniżej, dla przykładu bierzemy tylko jeden (dla każdego innego trzeba brać te same próbówki, z wyjątkiem kontroli surowic).

Odczynniki składowe umieszczane są w probówkach w następującym porządku: najprzód surowica, potem antygen, dalej dopełniacz — po odpowiednim czasie dwuchwytlik hemolityczny i zawiesina krwinek.

### I. Metoda ze stałą dawką surowicy i ze zmniejszającymi się dawkami antygeny.

W próbówce	surowicy bad.	fizjol. roztw. soli	antygeny	fizjol. roztw. soli	5% dopełniacza
1-ej:	0,1 cm <sup>3</sup>	+0,9 cm <sup>3</sup>	+0,1 cm <sup>3</sup>	+0,9 cm <sup>3</sup>	+1 cm <sup>3</sup>
2-ej:	0,1	" +0,9	" +0,075	" +0,925	" +1 "
3-ej:	0,1	" +0,9	" +0,05	" +0,95	" +1 "
4-ej:	0,1	" +0,9	" +0,025	" +0,975	" +1 "
5-ej:	0,1	" +0,9	" +0,01	" +0,99	" +1 "

Pozatem należy sprawdzić, czy surowica, w dawce wziętej do badań oraz 2 razy większej, nie hamuje hemolizy per se, oraz czy krwinki badane nie rozpuszczają się same przez się (ta ostatnia kontrola zwykle jest już jednak dokonana przy sprawdzaniu antygeny lub dopełniacza). Mamy więc:

W próbówce	surowicy bad.	fizjol. roztw. soli	fizjol. roztw. soli	5% dopel-niacza
6-ej:	0,1 cm <sup>3</sup>	+ 0,9 cm <sup>3</sup>	+ 1 cm <sup>3</sup>	+ 1 cm <sup>3</sup>
7-ej:	0,2 cm <sup>3</sup>	+ 0,8 cm <sup>3</sup>	+ 1 cm <sup>3</sup>	+ 1 cm <sup>3</sup>
	surow. chor. kilowego			
8-ej:	0,1 cm <sup>3</sup>	+ 0,9 cm <sup>3</sup>	+ 1 cm <sup>3</sup>	+ 1 cm <sup>3</sup>
	surowicy zdrowego			
9-ej:	0,1 cm <sup>3</sup>	+ 0,9 cm <sup>3</sup>	+ 1 cm <sup>3</sup>	+ 1 cm <sup>3</sup>

Probówki 8 a i 9-a można pominąć, o ile antygen był przed badaniem sprawdzony.

Zawartość każdej próbówki należy dobrze skłócić, poczem na 1 godzinę wstawić do ciepłarki przy 37° (lub pozostawić przez 3 godziny w ciepłocie pokojowej) i po upływie tego czasu do każdej próbówki dodać po 1 cm<sup>3</sup> 5% zawiesiny krwinek baranich oraz po 1 cm<sup>3</sup> rozcieńczonego dwóchwytnika hemolitycznego<sup>1)</sup>, zawartość każdej próbówki dobrze skłócić i powtórnie umieścić w ciepłarce na 1 godzinę (lub przez 3 godz. pozostawić w ciepłocie pokojowej); poczem określamy wynik, próbówki wstawiamy do lodowni i po 24 godzinach porównujemy z wynikiem pierwszym (naogół obydwaj wyniki powinny być

<sup>1)</sup> Dawka dwóchwytnika powinna być 2,5—3 razy większa od miana dwóchwytnika, jeśli więc naprz. miano wynosiło 1 : 3000, to do badań bierzemy rozcieńczenie 1 : 1000, jednak zbyt silna dawka może hamować hemolizę.



identyczne); niekiedy, dla przyspieszenia określenia wyniku, można po wyjęciu z ciepłarki zawartość probówek wirować i w ten sposób usunąć wątpliwości.

Wynik oznaczamy stopniowaniem za pomocą plusów: (+) — ślady, (++) — słabo dodatni, (+++) — wyraźnie dodatni, (++++) — wybitnie dodatni; ujemny wynik oznacza się (—). O ile nie mianujemy badanej surowicy, a stwierdzamy tylko obecność przeciwciał swoistych, piszemy wynik „dodatni“ lub „ujemny“, przy mianowaniu określenia te są jednak niewystarczające. O ile więc we wszystkich probówkach, gdzie znajduje się nawet najmniejsza dawka antygeny, jest zupełne zahamowanie, (t. zn. krwinki nierozpuszczone osiadają na dnie, a ponad osadem płyn jest przezroczysty i bezbarwny), wówczas wynik oznaczamy +++++, jako „wybitnie dodatni“; o ile w najniższych dawkach nastąpiła częściowa lub nawet zupełna hemoliza (brak osadu, płyn przezroczysty koloru czerw. laku), jeśli w wyższych jednak mamy zupełne zahamowanie, wówczas oznaczamy +++++, jako „wyraźnie dodatni“. Jeśli w probówkach z niższymi dawkami antygeny nastąpiła zupełna hemoliza, a w paru probówkach z wyższymi — częściowe ale wyraźne zahamowanie, możemy oznaczyć to jako ++, odczyn „słabo dodatni“. Wreszcie, jeśli w probówkach z wyższymi dawkami nie mamy zupełnej hemolizy, która musi wystąpić w probówkach z kontrolą (surowica badana nie powinna hamować hemolizy, nawet w dawce dwa razy większej od dawki użytej do badań), wówczas określić to można +, jako „ślady zahamowania“. Naturalnie, wyniki te nie dadzą się ująć

w schemat i podczas określania mogą nastąpić różne kombinacje; w tym razie wprawa i doświadczenie badacza rozstrzygają sprawę. O ile we wszystkich próbkach z antygenami krwinki są zupełnie rozpuszczone (płyn przezroczysty koloru laku, zupełny brak osadu) wynik oznaczamy jako „ujemny”. W kontroli z surowicą, jak już powiedziano, wszędzie musi wystąpić hemoliza zupełna; o ile w kontroli z surowicą badaną jest zahamowanie, oznacza to, że surowica hamuje sama z siebie; należy określić wówczas dawkę, w której surowica nie hamuje i z dawką tą wykonać powtórne badanie. O ile przygotowano próbki 8-mą i 9-tą, to w 8-mej powinno być wybitne zahamowanie hemolizy, a 9-tej — hemoliza zupełna.

II. Metoda ze stałą dawką antygeny i ze zmniejszającą się dawkami surowicy.

W próbce:	Surowicy badanej	fizjol. roztw. soli	antygeny	fizjol. roztw. soli	5% dopełniacza
1-ej:	0,1	cm <sup>3</sup> +0,9	cm <sup>3</sup> +0,1	cm <sup>3</sup> +0,9	cm <sup>3</sup> +1
2-ej:	0,075	„ +0,925	„ +0,1	„ +0,9	„ +1 „
3-ej:	0,05	„ +0,95	„ +0,1	„ +0,9	„ +1 „
4-ej:	0,025	„ +0,975	„ +0,1	„ +0,9	„ +1 „
5-ej:	0,01	„ +0,99	„ +0,1	„ +0,9	„ +1 „

Zawartość próbek należy dobrze skłócić, wstawić do ciepłarki (37°) na 1 godz. (lub pozostawić w ciepłocie pokojowej przez 3 godziny), poczem do każdej próbki dodać: po 1 cm.<sup>3</sup> rozcieńczonego

dwuchwytnika hemolitycznego i po 1 cm.<sup>3</sup> 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> zawiesiny krwinek baranich. Po dokładnem zmieszaniu wstawić na 1 godz. do ciepłarki (lub pozostawić w ciepłocie pokojowej przez 3 godziny), poczem określać wynik podobnie, jak w metodzie pierwszej. Kontrola surowicy samej — jak w metodzie o stałej dawce surowicy.

III. Metoda ze zmiennymi dawkami dopełniacza nie znalazła zastosowania.

Modyfikacje odczynu Wassermann'a:

Bauer-Hecht nie biorą sztucznych dwuchwytników, lecz tylko znajdujące się zwykle we krwi ludzkiej (t. zw. „normalne” dwuchwytniki), również i jako dopełniacz stosują własny dopełniacz surowicy (nie unieczynnianą więc surowicy badanej); tak samo Margareta Stern używa surowicy nie unieczynnionej. Autorka ta stosuje  $\frac{2}{5}$  lub  $\frac{1}{5}$  najwyższej dawki antygeny (w celu uniknięcia zahamowań nieswoistych) oraz 3—4 większą od miana dawkę dwuchwytnika hemolitycznego.

Noguchi i Czernogubow używają dwuchwytników hem. do krwinek ludzkich. Noguchi używa bardzo małych dawek surowicy czynnej lub większych surowicy unieczynnionej.

Kronmayer i Trinchese zalecają poczwórną dawkę surowicy z zachowaniem oryginalnych dawek pozostałych odczynników.

Mandelbaum przed unieczynnieniem rozcieńcza surowicę (0,5 cm.<sup>3</sup> surowicy i 2 cm.<sup>3</sup> fizjol. roztw. soli), następnie unieczynia ją, przez co giną w surowicy ciała, hamujące hemolizę same przez się (nieswoiste).

Walle i Pribram badają na szkiełkach z wkłknięciami (jak do kropli wiszącej), biorąc te same odczynniki, tylko w minimalnych ilościach. Jest to t. zw. „mikroreakcja”.

Istnieje jeszcze wiele innych modyfikacji odczynu Wassermann'a (Weidanza, Müller'a, Tägego, Hoehnego



i in.) — niewątpliwie jednak najlepsze wyniki daje metoda oryginalna.<sup>1)</sup>

## Odczyn Wassermann'a dokonywać można nietylko

<sup>1)</sup> Odczyn Meinicke'go oparty jest na tej samej podstawie, co i W a R, z tą różnicą, że odczyn między białkowo-lipoidalnymi ciałami surowicy kłowej i antygenem uwidacznia się nie za pomocą systemu hemolitycznego, lecz przez wytwarzanie się kłaczek czyli precypitację.

Oryginalny antygen W a R albo też otrzymany z wołowego serca (Venulet — Łódź) rozcieńcza się wodą przekroploną w stosunku 1 : 8; wodę wpuszcza się z biurety nie prędzej, jak w ciągu 4 minut, niezależnie od jej ilości. 0,8 cm.<sup>3</sup> antygenu, rozcieńczonego w ten sposób, dodaje się do 0,2 cm.<sup>3</sup> surowicy, zinktywowanej w ciągu 15 min. przy 55—56°. Antygen lepiej przygotować 2—3 godz. przed użyciem; powinien on tylko słabo opalizować. Surowica, którą należy możliwie wcześniej inaktywować (w ciągu 1—2 doby), musi potem przynajmniej 3 godz. stać w lodowni. Bardzo zhemolizowana surowica nie nadaje się do badania; mętną trzeba odwirować. Następnie próbki z surowicą i antygenem, dobrze zmieszane, wstawia się na 18—20 godzin do ciepłarki przy 37°; nazajutrz spostrzegamy we wszystkich próbkach obecność kłaczek. Teraz określamy stosunek powstałych kłaczek do soli, dodając do wszystkich próbek po 1,0 cm. miareczkowanego uprzednio roztworu soli kuchennej; po 1-o godzinnem staniu w ciepłarce kłaczki w normalnej surowicy zupełnie znikają, w luetycznej natomiast zachowują się w mniejszym lub większym stopniu, zależnie od siły reakcji. Ślady reakcji (mniejsze, dostrzegalne przez lupę kłaczki) oznaczamy przez +; wybitny wynik (++++) można stwierdzić gołym okiem. Samo miareczkowanie soli, wymagane przez Meinicke'go ze względu na zmienne własności rozcieńczonego antygeny, odbywa się w ten sposób, że do szeregu próbek z wykłaczkową normalną surowicą dodaje się po 1,0 cm. soli wzrastającej koncentracji, poczynając od 1,6‰ aż do 2,4‰; najniższa koncentracja, zwykle nie przekraczająca 2‰, a wystarczająca do rozpuszczenia w ciągu 1 godz. w ciepłarce normalnych kłaczek, używana jest następnie w głównym badaniu. Każdorazowe miareczkowanie jest zbyteczne przy używaniu tego samego antygeny. Ze względów oszczędnościowych można powyższe dawki surowicy antygeny i soli zmniejszyć o połowę (Venulet).

z surowicą chorego, ale i z płynami pochodzącymi z ustroju chorego, podejrzanego o kiłkę: najczęściej bada się płyn mózgowo-rdzeniowy, przyczem inaktywuje się go, jak surowicę (niektórzy autorzy uważają to za zbędne). O ile stosować metodę ze stałą dawką płynu, wówczas należy brać 0,6 cm.<sup>3</sup> lub przynajmniej 0,4 cm.<sup>3</sup> płynu, o ile ze stałą dawką antygeny, wówczas płyn należy mianować od 0,1—1 cm.<sup>3</sup>. Naogół technikę stosuje się taką samą, jak w badaniu surowicy.

Można też badać przesięki (z opłucnej, osierdzia, jamy brzusznej, wodniaka, wylewów stawowych), po uprzednim unieczynnieniu (dawka 0,1 cm.<sup>3</sup>) oraz mleko kobiece (na parę dni przed i po urodzeniu dziecka), przyczem dawkę należy określić za pomocą kontroli mleka kobiet niekiłowych.

### Odczyny bakterjóbójcze.

**Założenie teoretyczne.** W surowicy ludzi chorych na niektóre choroby zakaźne (naprz. dur brzuszny, cholera i in.) lub zwierząt, którym wstrzykiwano zawiesinę drobnoustrojów (naprz. przecinkowca cholerycznego), występują ciała zabijające lub rozpuszczające drobnoustroje swoiste (drobnoustroje te rozpadają się na ziarenka-granula). Ciała, rozpuszczające drobnoustroje, otrzymały nazwę bakterjolizyn, a sam objaw — bakterjolizy; ciała w surowicy, zabijające bakterje, zowią się bakterjocydynami.

Zastosowanie praktyczne znalazła bakterjóbójczość, gdy chodzi o utożsamienie wyhodowanego szczepu lub o spraw-

dzenie, czy dana surowica zawiera odpowiednie bakterjolizyny lub bakterjocydyny.

Zjawisko bakterjolizy można badać *in vivo* (w ustroju zwierzęcym). Odczyn bakterjolityczny *in vivo* nazywa się odczynem Rich. Pfeiffer'a.

Odczyn Rich. Pfeiffer'a polega na tem, że jeżeli do otrzewnej świnki morskiej wstrzyknąć zawiesinę bakterji w rozcieńczonej surowicy wysokowartościowej, swoistej dla danego drobnoustroju, to bakterje te zostaną przez surowicę — o ile posiadały ruch — unieruchomione, następnie rozpuszczone, t. j. rozpadną się na ziarenka („Granula“); jeśli natomiast drugiej śwince wstrzyknąć ten sam gatunek bakterji zawieszonych w rozcieńczonej nieswoistej lub normalnej surowicy — zjawiska rozpuszczania nie będzie, drobnoustroje nie zmieniają swego kształtu, wzgl. nie tracą swego ruchu. Odczyn ten stosuje się przy różnicowaniu drobnoustrojów z wydzielin wody i t. p. (najczęściej, gdy chodzi o odróżnienie przecinkowców cholerycznych od przecinkowców niechorobotwórczych, laseczników durowych od rzekomodurowych).

Do odczynu tego potrzebne są:

1. 4 świnki morskie wagi 200—300 gr.,
2. surowica wysokowartościowa o bardzo wysokiem mianie bakterjolitycznem. Surowicę bakterjolityczną wysokowartościową otrzymuje się tak samo, jak inne surowice wysokowartościowe (patrz str. 190); musi ona działać w ten sposób, że przynajmniej 0,0002 gr. surowicy powinno wystarczyć, aby 1 uszko (2 mg.) 18-24 godzinnej hodowli zjadliwej tego gatunku, którego użyto przy przygotowy-



waniu surowicy (naprz. prątków tyfusu, przecinkowców cholery), zadane dootrzewnowo w 1 cm.<sup>3</sup> buljonu śwince morskiej rozpadło się w ciągu godziny całkowicie na ziarna. „Miano“ surowicy musi więc wynosić przynajmniej 0,0002 gr.

3. surowica normalna królika,
4. 18—24 godzinna hodowla agarowa badanego drobnoustroju;

poza to: strzykawka z tępą igłą, nożyczki, pincetki, rurki włoskowate (kapilary), naczynka zwężone w kształcie kiełiszki do mieszania cieczy, przeznaczonych do badania, szkiełka przedmiotowe z wklęsnięciem, szkiełka przykrywkowe, pipetki serologiczne (miareczkowane na dziesiąte i setne części cm.), buljon jałowy, jałowy fizjologiczny roztwór soli.

**Wykonanie odczynu.** Do trzech naczynek zwężonych nalać po 1 cm.<sup>3</sup> buljonu i po 1 uszku badanej hodowli agarowej, które należy rozetrzeć na ścianie probówki. Do naczynia I-szego dodać ilość surowicy wysokowartościowej w dawce 5-krotnie większej od jej miana, do naczynka II-go — w dawce 10-krotnie większej od jej miana, do naczynka III-go — ilość surowicy normalnej w dawce 50-krotnie większej od miana surowicy wysokowartościowej. (Surowica normalna do kontroli powinna pochodzić od zwierzęcia tego samego gatunku, co i zwierzę, od którego była wzięta surowica wysokowartościowa). Wszystkie trzy dawki surowicy muszą być rozcieńczone w jednakowej ilości płynu (naprz. 0,2—0,5 cm.<sup>3</sup>). Do IV-go naczynka (kontrola) nalać 1 cm.<sup>3</sup> buljonu, rozetrzeć w nim 1 uszko hodowli agarowej danego szczepu i dodać tyle fizjologicz-

nego roztworu soli, aby ilość cieczy równała się ilości cieczy w każdym z trzech naczynek. Zawartość każdego naczynia zostaje dokładnie zmieszana i wstrzyknięta kolejno odpowiedniej śwince. W tym celu skórę na stronie brzusznej zwierzęcia należy przeciąć nożyczkami i zawartość odnośnego naczynka wstrzyknąć strzykawką do otrzewnej. Po 20 minutach, a następnie po 1 godzinie, należy wprowadzić przez nadcięte na skórze miejsce włoskowatą pipetkę do jamy brzusznej, poczem zbadać wydobytą wydzielinę w kropli wiszącej. U świnki I-szej i II-giej najpóźniej po upływie godziny, powinno w wydzielinie być widoczne rozpadanie się bakterji na ziarenka. W wydzielinie z otrzewnej III-ciej i IV-tej świnki bakterje powinny pozostać zupełnie niezmienione.

Odczyn bakterjobójczy *in vitro* służy do wykrycia ciał bakterjobójczych w surowicy chorych. Do wykonania odczynu potrzebne są:

1. surowica chorego unieczynniona (przez  $\frac{1}{2}$  godz. ogrzewana do  $56^{\circ}$ ) oraz rozcieńczona 50—100 fizjologicznym roztworem soli,
2. świeżo zebrana surowica królika (dopełniacz), rozcieńczona 10—15 razy,
3. spłuczyna 24 godz. hodowli agarowej lub hodowla buljonowa drobnoustroju, względem którego bada się surowicę na obecność bakterjolin, rozcieńczona 500 razy fizjologicznym roztworem soli;

następnie: próbówki jałowe, fizjologiczny roztwór soli, jałowe płytki Petri'ego, jałowe próbówki z agarem, jałowe pipetki na 10-te części cm.<sup>3</sup>, kąpiel wodna z termometrem, cieplarka na  $37^{\circ}$ .

**Wykonanie odczynu.** Do 12-stu ustawionych w statywie i ponumerowanych kolejno probówek nalać po 1 cm.<sup>3</sup> jałowego fizjolog. roztworu soli. Do 1-szej probówki dodać 1 cm.<sup>3</sup> unieczynnionej rozcieńczonej surowicy chorego i doskonale mieszać z roztworem soli. Następnie z 1-szej probówki odlać tą samą pipetką 1 cm.<sup>3</sup> płynu do 2-giej probówki, mieszać z zawartym w niej 1 cm.<sup>3</sup> roztworu soli, z 2-giej probówki przenieść 1 cm.<sup>3</sup> płynu do 3-ciej, z 3-ciej do 4-tej i t. d. aż do 12 probówki (z ostatniej probówki 1 cm.<sup>3</sup> wylewa się). Następnie do każdej probówki (która zawiera po 1 cm.<sup>3</sup> surowicy w coraz wyższym rozcieńczeniu) dodać po 0,5 cm.<sup>3</sup> zawiesiny bakteryjnej i po 0,5 cm.<sup>3</sup> dopełniacza. Jako kontrole służą:

I. a) i b): Do każdej probówki fizjolog. roztworu soli 1,5 cm.<sup>3</sup> + zawiesiny bakteryjnej 0,5 cm.<sup>3</sup>.

II. fizjolog. roztworu soli 1 cm.<sup>3</sup> + dopełniacza 0,5 cm.<sup>3</sup> + zawiesiny bakteryjnej 0,5 cm.<sup>2</sup>.

Do probówki 1-szej a) [kontroli] n a t y c h m i a s t dodać rozpuszczonego i ostudzonego do 40<sup>0</sup> agaru i po zmieszaniu wylać na płytkę (zachować wszelkie ostrożności, aby nie zanieczyścić!). Płytkę ta będzie wskazywała ilość bakterji w 1 cm.<sup>3</sup> zawiesiny, użytej do badania.

Wszystkie pozostałe probówki wstawia się na 3—4 godzin do cieplarki, poczem do każdej probówki dolewa się ostudzonego agaru, jak przy kontroli 1-szej a) Kontrola 1-sza b) wskazuje, w jakim stopniu rozmnożyły się bakterje przez czas pozostawania w cieplarce (bez działania surowicy). Kontrola II-ga wskazuje, że dopełniacz sam, bez surowicy chorego, nie hamuje wzrostu bakterji.

Pozostałe 12 płytek można oglądać już po 12 godzi-



nach; obliczać ilości kolonji niema potrzeby, gdyż prze-  
ważnie zwracamy uwagę tylko na duże różnice.

### Określanie opsonin (i bakterjotropin).

Pod nazwą opsonin rozumiemy pewne ciała w surowicy, które przygotowują w odpowiedni sposób bakterje, aby te ostatnie mogły być pożarte przez leukocyty. Opsoniny znajdują się w surowicy ludzi zdrowych; ilość ich zmniejsza się podczas zakażenia, powiększa zaś w okresie zdrowienia. Przekonano się, że opsoniny w surowicy ludzi uodpornionych (t. zw. „Immun-opsoniny“) są znacznie mniej wrażliwe na wysoką ciepłotę, niż normalne: opsoniny w surowicy normalnej zostają zniszczone od krótkotrwałego nagrzewania przy 55—60°, swoiste zaś opsoniny (Immunops.) wytrzymują ciepłotę 60°. Z tego powodu substancje te nazwano bakterjotropinami. Bakterjotropiny są swoiste i przygotowują bakterje zdolne do fagocytozy (pochląniania bakterji przez białe ciała krwi).

Na badaniu ilości opsonin w surowicy chorego polega metoda rozpoznawcza Wright'a. Jeśli podczas nieznaney nam choroby znajdujemy w surowicy chorego mało opsonin dla pewnego zarazka, to możemy przypuścić, że właśnie zarazek ten jest przyczyną zakażenia. Natomiast wielka ilość opsonin w jakiejś surowicy (w porównaniu z surowicą normalną) pozwala przypuszczać, że osobnik, od którego dana surowica pochodzi, przebył odnośną chorobę.

Różne gatunki bakterji zachowują się rozmaicie względem opsonin. Wright dzieli je na kilka grup: 1. bakterje,

które w wysokim stopniu poddają się działaniu opsonicznemu i bakterjolitycznemu surowicy (przec. cholery, las. tyfusu), 2. bakterje wrażliwe na opsoniny i słabo wrażliwe na bakterjolizyny (las. okrężnicy, las. krwawej biegunki), 3. bakterje bardzo wrażliwe na opsoniny, a nie wrażliwe na bakterjolizyny (gronkowce, paciorkowce), 4. bakterje nie wrażliwe ani na opsoniny, ani na bakterjolizyny (las. błonicy, las. zeschnięcia).

**Zasada metody:** Określoną objętość surowicy chorego miesza się z równymi objętościami zawiesiny bakteryjnej i przemytych leukocytów. Po umieszczeniu mieszaniny tej w ciepłocie 37° przygotowuje się z niej preparaty barwione. Na preparatach tych oblicza się ilość bakterji, pożartych przez leukocyty. Otrzymanej stąd liczbie przeciętnej nadał Wright nazwę liczby fagocytowej; stosunek tej liczby w surowicy chorego do tejże liczby w surowicy normalnej, którą przyjmujemy jako jednostkę, nazwał on wskaźnikiem opsonicznym czyli:

$$\text{Wskaźnik ops. (index ops.)} = \frac{\text{Przec. liczba bakterji zawartych w jednym fagocycie surow. chorego}}{\text{Przec. liczba bakterji zawartych w jednym fagocycie surow. normal.}}$$

Wskaźnik ten ma tylko wówczas znaczenie, gdy jest albo większy, albo mniejszy od jedności. Niski wskaźnik opsoniczny wyraża zmniejszoną odporność surowicy względem zarazka; przy sztucznem uodpornianiu wskaźnik opsoniczny wzrasta.

Zastosowanie praktyczne odczynu Wright'a polega na: a) rozpoznaniu zakażenia, b) stwierdzeniu siły zakażenia, c) kontroli liczenia, d) stwierdzeniu końca zakażenia.

Do wykonania odczynu potrzebne są :

1. surowica chorego,
2. surowica normalna (do kontroli),
3. zawiesina bakteryjna,
4. przemyte białe ciała krwi (leukocyty),

następnie: rurki włoskowate (kapilary), szkiełka zegarkowe lub przedmiotowe z wklęsnięciami, utrwalacze, barwniki.

Zbieranie krwi od chorego powinno odbywać się w różnych porach dnia i w różnych okresach zakażenia. Surowica winna być zupełnie pozbawiona krwinek. O ile surowica zebrana jest jałowo, można ją przechowywać przez kilka dni w ciemności.

W celu zbierania niewielkich ilości surowicy, potrzebnych do badania Wright zaleca specjalne rurki włoskowate (patrz str. 88).

Normalną surowicę zbiera się w ten sam sposób, jak surowicę chorego; surowicę zupełnie zdrowego człowieka można uważać za wystarczającą kontrolę; kontrolę należy powtarzać kilkakrotnie.

Zawiesina bakteryjna powinna być przygotowana z 24 godz. hodowli. Gęstość zawiesiny podług Wright'a powinna wynosić 7—10 miliardów bakterji w 1 cm.<sup>3</sup> (o obliczaniu ilości bakterji patrz str. 55).

Przemyte leukocyty otrzymujemy przez zebranie kropli krwi z palca, dodanie do niej 1,5% cytrynianu sodu i wielokrotne wirowanie w fizjolog. roztworze soli; w osadzie zawarte są leukocyty.

Wykonanie odczynu jest następujące: w pipetce, której jeden koniec wyciągnięty jest w długą rurkę włoskowatą, a drugi opatrzony gumką, robimy na rurce włoskowatej,



w odległości 2—3 cm. od jej końca, znaczek atramentem. Do znacзка tego wciągamy surowicę badaną, poczem wpuszczamy warstwę powietrza, przez co surowica wznosi się nieco ku górze; z kolei wciągamy do znacзка ciałka krwi — znowu warstwę powietrza, wreszcie zawiesinę bakteryjną i warstwę powietrza. W ten sposób wszystkie trzy składniki w równych ilościach znajdują się w rurce. Całą zawartość rurki należy przez naciśnięcie gumki przenieść na wklęsnięcie szkiełka przedmiotowego lub na szkiełko zegarkowe i zmieszać przez kilkakrotne wciąganie i wydmuchiwanie płynu z rurki. Po parokrotnem dokładnem zmieszaniu wszystkich trzech składników ostatecznie wciąga się płyn do rurki tak, aby znajdował się w niej dość daleko od wylotu, który zatapia się nad płomieniem. Tak samo postępuje się z surowicą normalną (kontrolą). Pipetki umieszczamy na 20 min. w cieplarni, poczem, po odpiłowaniu zatopionego końca, umieszczamy na szkiełkach przedmiotowych po kropli wypływającego z opuszczonej pipetki płynu, przygotowujemy preparaty mazane (podobnie, jak preparaty ze krwi, patrz str. 87), które utrwalamy i barwimy. Do utrwalania preparatów używamy najczęściej nasyconego roztworu sublimatu, do barwienia zaś — tioniny karbolowej (0,25 gr. tioniny na 100 cm.<sup>3</sup> 10% wody karbolowej), karbolowej fuksyny Ziehl-Neelsen'a (dla las. gruźlicy), metody May-Grünwald'a i in.

Na preparatach barwionych poszukujemy białych ciałek, układających się zwykle najobficiej wzdłuż brzegów i na końcach preparatu. Obliczamy, ile pożartych drobnoustrojów znajduje się w każdym ciałku, i po obliczeniu 100 ciałek obliczamy liczbę przeciętną. Na preparatach z surowicą

normalną postępuje się w ten sam sposób. Stosunek otrzymanej liczby przeciętnej dla surowicy badanej do liczby przeciętnej dla surowicy (wzgl. 2—3 surowic) normalnej stanowi wskaźnik. Jeśli naprz. przeciętna dla surowicy badanej wynosiła 4, a dla surowicy normalnej 6, wówczas wskaźnik będzie  $\frac{4}{6}$  (0,66).

### Odczyn Abderhalden'a.

**Założenie teoretyczne.** We krwi kobiet ciężarnych znajdują się zaczyny, rozszczepiające białko tkanki łożyskowej, zaś we krwi chorych na raka — zaczyny rozszczepiające białko tkanki nowotworowej. Ujawnienie się tych zaczynów zależy, według Abderhalden'a, od obecności w surowicy substancji, obcych dla osocza („plasmafremde“), pochodzących w surowicy kobiet ciężarnych z łożyska, w surowicy chorych na raka — z tkanki rakowatej. Ponieważ zaczyny te we krwi kobiet ciężarnych występują bardzo wcześnie, przeto wykrycie ich może być stosowane praktycznie do celów rozpoznawczych. Z podanych przez Abderhalden'a dwóch metod: optycznej i dializacyjnej, opiszemy tę ostatnią. Polega ona na tem, że białko w stanie koloidalnym (klejowatym) nie przenika (dyfunduje) poprzez błony zwierzęce, podczas gdy najbliższe wytwory rozszczepienia białka (peptony) przechodzą przez takie błony.

W odczynie Abderhalden'a zatem, o ile w specjalnych woreczkach dializacyjnych zetknie się białko swoiste (z łożyska lub tkanki rakowatej) z surowicą, w której są zaczyny swoiste, wówczas surowica ta rozszczepi białko.

a wytwór rozszczepienia (pepton) przeniknie poprzez błonę woreczka do płynu, w którym woreczek umieszczono. Za pomocą bardzo czułego odczynnika, ninhydryny (patrz niżej), można wykryć w płynie tym najmniejsze nawet ilości peptonu. O ile w woreczku umieszczono surowicę nie zawierającą zaczynu, wraz z odpowiednim białkiem, białko pozostanie nie rozszczepione; w płynie, w którym umieszczono woreczek dializacyjny, nie można wykryć nawet śladów peptonu.

Odczyn wymaga nadzwyczajnej dokładności wykonania (nawet ślady białka od dotykania woreczków rękoma mogą dać dodatni wynik próby ninhydrynowej, należy przeto posługiwać się jałowymi szczypczykami!). Szkło musi być wyjałowione.

Przed dokonaniem właściwego odczynu należy: 1) przygotować tkankę z narządów, 2) sprawdzić wartość woreczków dializacyjnych, 3) przygotować surowice badane oraz do kontroli.

**Przygotowywanie tkanki.** Tkanek (łożysko, guz), z gruba oczyszczoną z krwi, kraje się na małe kawałki, wyciska krew na sitku pod strumieniem wody (można też sączyć przez płótno), poczem przegląda każdy kawałek oddzielnie, czy nie zostały na nim ślady krwi: kawałki ze skrzepłą krwią odrzuca się, a pozostałe kawałki płucze się w wodzie bieżącej tak długo, dopóki tkanka nie stanie się zupełnie biała; przemywanie powinno trwać — zależnie od rodzaju tkanki — od 3—6 godzin. Przemytą tkankę umieszcza się w około 100 razy większej ilości wody przekrojonej i zagotowuje. Do gotującej się wody należy dodać kilka kropel kwasu octowego lodo-



watego (5 kropel na 1 litr wody); po 10-minutowem gotowaniu wodę odlać przez sitko, tkankę płukać w ciągu 5 minut wodą przekoaloną, znowu gotować w takiej samej, jak poprzednio, ilości wody przekoalonej przez 10 minut (bez dodatku kwasu octowego), poczem wodę odlać, tkankę opłukać i czynność tę powtórzyć 6 razy. Za 6-ym razem tkankę należy gotować tylko w 5-krotnej ilości wody; aby się przekonać, czy w tej ostatniej porcji wody nie znajdują się ślady peptonu, po przesączeniu jej do 5 cm<sup>3</sup> przesączu dodajemy 1 cm<sup>3</sup> 1% roztworu ninhydryny i wykonywujemy próbę ninhydrynową w sposób podany poniżej. O ile po upływie 1/2 godziny próba wypadnie ujemnie (zupełny brak fioletowawego zabarwienia płynu) — tkanka nadaje się do użytku. O ile próba wykaże choćby najdrobniejsze ślady fioletowawego zabarwienia, to tkankę trzeba ponownie gotować i ponownie sprawdzić. Gotową tkankę należy przechowywać w jałowej wodzie przekoalonej, pokrytej warstwą toluolu.

2) Sprawdzenie woreczków dializacyjnych. Woreczki otrzymać można od firmy Schleich und Schüll, Dürren (Nr. 579 A), średnicy 16 mm, wysokości 50 mm. Woreczki należy sprawdzić a) na nieprzepuszczalność dla białka, b) na przepuszczalność dla wytworów rozszczepienia białka (peptonów).

a) Woreczki należy dobrze rozmoczyć w wodzie, poczem do każdego woreczka wlać 2,5 cm<sup>3</sup> 5% roztworu białka kurzego lub surowicy, zupełnie pozbawionej hemoglobiny; należy przytem zwrócić baczną uwagę, by nie zanieczyścić zewnętrznej strony woreczka. Woreczek umieszcza się w małej kolbce Erlenmeyer'a z zawartością

20 cm<sup>3</sup> jałowej wody przekroplonej. Zarówno wodę w kolbce jak i zawartość woreczka pokrywa się warstwą toluolu wysokości 0,5 cm; kolbkę przykrywa się szklaną pokrywką i na 16 godzin umieszcza w cieplarni przy 37°. Po upływie tego czasu bierze się 10 cm<sup>3</sup> płynu z kolbki (bez toluolu) i dokonywa się z nim próby biuretowej w celu przekonania się, czy znajduje się w nim białko. Próby biuretowej dokonywuje się w następujący sposób: do 10 cm<sup>3</sup> badanego płynu dodaje się 2,5 cm<sup>3</sup> 33% ługu sodowego i po skłóceniu nawarstwia się wodnym roztworem (1: 5000) siarczanu miedzi; o ile w płynie z kolbki znajduje się białko, wówczas w pasie zetknięcia się obydwóch płynów występuje różowawe lub fioletowawe zabarwienie. (Można też dla wykrycia białka posługiwać się próbą na białko z kwasem sulfosalicylowym).

b) Woreczki sprawdzane na nieprzepuszczalność białka należy dokładnie przemyć wodą przekroploną, poczem przenieść na sito i przez 1/2 godziny płucać w bieżącej wodzie. Następnie woreczki napełnia się 2,5 cm<sup>3</sup> roztworem 1% peptonu jedwabnikowego (Seidenpepton) i postępuje w ten sam sposób, jak przy sprawdzaniu woreczków na przepuszczalność białka (a). Następnie z płynem z kolbki należy dokonać próby ninhydrynowej: Do 10 cm<sup>3</sup> płynu dodajemy 0,2 cm<sup>3</sup> 1% wodnego roztworu ninhydryny, ogrzewamy nad płomieniem i gotujemy w ciągu 1 minuty (aby płyn gotował się równomiernie, wkłada się do płynu pałeczkę długości 10 cm). Po upływie 1/2 godziny powinno nastąpić fioletowawe zabarwienie (unikając dotykania woreczków i kolbek rękoma!). Sprawdzone woreczki płucze się dokładnie w jałowej wodzie przekroplonej.

nej, zanurza się na 30 sekund do wrzącej wody i przechowuje w jałowej wodzie, pokrytej warstwą toluolu i chloroformu.

3) **O t r z y m y w a n i e s u o w i c y.** Surowicę otrzymuje się przez nakłucie żyłne, gdy chory jest naczczo. Zupełnie suchą igłą bierze się 20 cm<sup>3</sup> krwi do jałowego naczynia. Krew zostawia się w ciepłocie pokojowej, gdy po 5—6 godzinach wydzieli się surowica, ostrożnie zlewa się ją do probówki zwężonej i dwukrotnie wiruje po 5—10 minut. Surowica powinna być zupełnie pozbawiona hemoglobiny; nie powinna przed użyciem stać dłużej, niż 12 godzin.

**W y k o n a n i e o d c z y n u** wymaga niezwykle dokładnej i ostrożnej pracy. Przed nastawieniem właściwego odczynu należy sprawdzić, czy tkanka nadaje się do użytku. W tym celu 3—5 gr. tkanki gotuje się w ciągu 5 minut w 5-krotnej ilości wody przekroplonej, następnie sączy przez twardy sączek i 5 cm<sup>3</sup> przesącza gotuje się przez 1 min. z 1 cm<sup>3</sup> 1% ninhydryny. Jeśli po 1/2 godzinie nie wystąpią nawet ślady fioletowawego zabarwienia, to tkanka nadaje się do użytku. Jeśli zaś próba wykazuje zabarwienie, to tkankę należy ponownie gotować w 5 krotnej ilości wody przekroplonej w ciągu 10 min. i czynność tę powtarzać tak długo, dopóki próba nie wypadnie ujemnie.

Sprawdzony woreczek dializacyjny umieszcza się w suchej jałowej kolbce Erlenmeyer'a; w woreczku umieszcza się około 0,5 gr., nadającej się tkanki i 1,5 cm<sup>3</sup> surowicy badanej. Po starannem opłukaniu zewnętrznej strony woreczka, przenosimy go do innej kolbki Erl., w której znaj-



duje się 20 cm<sup>3</sup> jałowej wody przekrojonej. Do kolbki, jak również i do woreczka nalewamy toluolu w dużej ilości, tak aby warstwa jego wynosiła ok. 0,5 cm<sup>3</sup>.

W drugiej kolbce umieszczamy woreczek z taką samą ilością tkanki, lecz bez surowicy (kontrola) i również zalewamy toluolem.

Kolbki wstawia się na 16 godz. do cieplarki (przy 37°); po upływie tego czasu bierzemy jałową suchą pipetką 10 cm<sup>3</sup> płynu z kolbki i wykonywamy z nim próbę ninhydrinową z 0,2 cm<sup>3</sup> 1% roztworu ninhydryny. Wynik oceniamy po 1/2 godzinie.

Dodatni wynik próby ninhydrinowej (fioletowawe zabarwienie płynu z kolbki) oznacza, iż surowica badana zawiera zczyny, rozszczepiające białko użyte do badania, t. j. jeśli do doświadczenia użyta była tkanka z łożyska, oznacza to, iż surowica pochodzi od kobiety ciężarnej, jeśli zaś od chorego podejrzanego o nowotwór, ma to dowodzić, iż surowica pochodzi od chorego na raka.

---

## DODATEK.

### Badanie wody.

W celu oceny wody z epidemiologicznego punktu widzenia, należy ją zbadać drobnowidzowo i bakterjologicznie (jak również chemicznie, lecz badania chemicznego tu nie poruszamy).

Badanie mikroskopowe wody służy do określenia w niej planktonu i nektonu (pierwotniaków, wyczołków, okrzemek, wodorostów, jaj robaków i t. p.).

Do badania bakterjologicznego woda musi być zebrana w sposób dokładny. Jako naczyni do prób używa się dużych butli szklanych, zawczasu wyjałowionych w pracowni. Do zbierania prób wody z głębszych warstw służyć mogą jałowe (100 cm.<sup>3</sup>) flaszeczki, zawierające około 100 gr. śrutu, zamknięte korkami z waty; po odkorkowaniu zanurzyć je można na sznurku. Próby wody stale bieżącej bierze się przez napełnienie jałowych naczyń. Z kranu wodociągowego lub ze studni krytej wypuszcza się uprzednio przez parę minut wodę i dopiero wówczas napełnia wyjałowione butle; o ile zachodzi potrzeba, to należy brać próby również i ze zbiornika. Z rzek, jezior i t. d. należy brać próby z powierzchni i z głębszych warstw, a jeśli bada się wodę rzeczną — ze środka rzeki oraz z jej prawego i lewego brzegu w celu określenia miejsca zakażenia.

Przyrządy do badania wody na miejscu: płytki Petri'ego, butle, flaszeczki do brania prób oraz napełnione wodą przekroploną do rozcieńczeń, sznur, puszka z pipetkami miareczkowanymi, probówki z podłożami i próżne jałowe, termometr, druciki platynowe, pincety, palnik spirytusowy, ołówki, papier i nalepki; o ile możliwe, termofoz z rozpuszczonymi pożywkami i oziębacz ze stałymi. Do automatycznego zbierania prób wody

na pewnej głębokości różne przyrządy, jako to Sclavo, Es m a r c h'a i inne.

Jako pożywek do badania ilościowego bakterji zawartych w wodzie używać należy żelatyny, przygotowanej według zwykłego sposobu.

B a d a n i e i l o ś c i o w e w o d y. Posiew powinien następować bezpośrednio po wzięciu próby. Próby, nadsyłane do pracowni po pewnym dopiero czasie, o wiele gorzej nadają się do dokładnego określenia ilości bakterji, gdyż jedna część zarazków podczas przesyłki rozmnaża się, inna — ginie.

Odmierzamy wodę zapomocą jałowych miareczkowanych pipet, silnie zanieczyszczone próby rozcieńczamy jałową wodą przekroploną. Posiew wykonywa się w ten sposób, że pewną ilość wody — 1 cm.<sup>3</sup> lub część jego — przenosimy na dno jałowej płytki, na którą wlewamy następnie rozpuszczonej w próbówce żelatyny i poruszamy płytką, aby żelatyna po zmieszaniu się z badaną wodą, równomiernie rozlała się po płytce, poczem pozostawiamy płytki w ciepłocie 20—22°. Po 2 dniach można już przystąpić do liczenia kolonji; jeśli kolonji, rozrzedzających żelatynę, jest bardzo wiele, to możemy zacząć liczyć już po 1 dobie. O liczeniu kolonji na płytkach patrz str. 55. Liczenie należy powtarzać w ciągu kilku dni. Zaleca się robić kilka prób z rozmaitych ilości wody ( $\frac{1}{10}$  cm.<sup>3</sup>,  $\frac{1}{4}$  cm.<sup>3</sup>,  $\frac{1}{6}$  cm.<sup>3</sup>, 1 cm.<sup>3</sup>), poczem obliczać przeciętną.

Do najczęściej spotykanych w wodzie drobnoustrojów należą bakterje, rozrzedzające żelatynę i wytwarzające barwniki (bac. violaceus, prodigiosus, pyocyaneus — ten ostatni w wodach zanieczyszczonych). Często spotykamy również laseczniki z grupy okrężnicy, których obecność w wodzie wskazuje na zanieczyszczenie jej wydaliniami. W celu określenia stopnia tego zanieczyszczenia stosuje się t. zw. „g n i l n e m i a n o” (inaczej Colimiano): do 4-ch kolbek fermentacyjnych lub U rurek wlewa się pożywkę peptonową z cukrem gronowym, z dodatkiem lakmusu, i wodę badaną, rozcieńczoną  $\frac{1}{1}$ ,  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{1000}$  i  $\frac{1}{10000}$  cm.<sup>3</sup>, wstawia na 24 godziny do ciepłarki (37°), poczem stwierdza się wytworzenie gazu i zmianę zabarwienia pod wpływem b. coli com.; o ile użyto podłoża Barsiekow'a, spozstrzega się i wypadanie kazeiny. Mało zanieczyszczona woda wytwarza gaz w 1—2 kolbkach z mniejszem rozcieńczeniem, silnie zakażona lasiecznikami okrężnicy — i w dalszych. Istnieje szereg prób, opartych na wytwarzaniu gazu przez bac. coli: próba E i j k m a n n'a (zmieszać wodę z pożywką — 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub>



cukru gronowego, 10% peptonu i 5% NaCl — w stosunku 1:8 w rurce fermentacyjnej Eijkmann'a, umieścić na 24 godz. w cieplarni o 46° i zbadać ilość wytworzonego gazu), próba amerykańska (wytwarzanie gazu w jałowej żółci wołowej z dodatkiem 1% cukru mlekowego i peptonu), próba angielska Houston'a i in.

Pozatem w wodzie badanej mogą znajdować się różne drobnoustroje chorobotwórcze, przedewszystkiem laseczniki duru brzuszego i przecinkowce cholery. Do wyodrębnienia jednak tych zarazków używa się już nie kilku cm.<sup>3</sup> wody, lecz osadu z dużej objętości wody (dla wykrycia bac. typhi abd.) lub posługuje wzmoczeniem zawartych w niej drobnoustrojów (dla wykrycia vibr. cholerae).

Laseczniki duru brzuszego (patrz str. 149) otrzymuje się w większej ilości; 1) przez przesączanie dużej ilości wody, naprz. przez świece Chamberland'a lub Berkefeld'a — zawartość sączka przenosi się na pożywki swoiste; 2) przez przesączanie 5—10 litrów wody przez małe krążki krzemionkowe lub kaolinowe średnicy 2 cm. (grubości 4—8 mm.) zapomocą specjalnego przyrządu filtracyjnego Serkowskiego, t. zw. osadzacza (sedimentatora); 3) przez wyparowywanie == sposób Faust-Heim'a: 100 cm.<sup>3</sup> wody w 4 szerokich płaskich naczyniach wyparowuje się w ciepł. 25° w podłużnej skrzynce, przez którą przepływa ogrzane powietrze — pozostałość wysiewa się na pożywkach swoistych; 4) przez utworzenie osadu drogą mechaniczną — sposób Ficker'a: do 2 litrów wody dodać 7 cm.<sup>3</sup> 10% roztworu siarczanu żelaza i 8 cm.<sup>3</sup> 10% roztworu sody krystalicznej; gdy osadzi się wodorotlenek żelazowy, płyn nad nim zlewa się, osad zaś rozpuszcza w połowie objętości winianu potasowego i wyszczepia na podłożach swoistych. Müller dodaje do 3 litrów wody badanej 5 cm.<sup>3</sup> liq. feni oxychlorati, miesza bagietką i po godzinie otrzymany osad przenosi na podłoże swoiste; do miękkiej wody należy dodać trochę ługu. Vallet i Schüder do 2 litrów wody dodają 20 cm.<sup>3</sup> 7,5% wodnego roztworu podsiarkanu sodu i 20 cm.<sup>3</sup> azotanu ołowiu, po upływie doby — jeszcze 14 cm.<sup>3</sup> 100% roztworu podsiarkanu sodu, poczem po osadzeniu przenoszą 1/2 cm.<sup>3</sup> z górnej przezroczystej warstwy na pożywki swoiste; 5) przez wzmoczenie w badanej wodzie ilości laseczników tyfusowych (Sterling-Okuniewski): pewną ilość wody badanej (naprz. 1/2 litra (miesza my pół na pół lub w stosunku 2:1 wzgl. 3:1 z jałową żółcią wołową, wstawiamy do cieplarki (37°) na 24—48 godzin, poczem osad, otrzy-

many po odwirowaniu 100 - 200 cm.<sup>3</sup> tej mieszaniny wysiewamy na podłożach swoistych.

Dalsze badanie i różnicowanie — patrz str. 149 i nast. Naogół wykrycie laseczników tyfusowych w wodzie połączone jest z dużymi trudnościami i badanie rzadko daje wynik dodatni.

Przecinkowce cholery wykrywa się najłatwiej przy pomocy metody wzmoczenia ilości ich w wodzie badanej, mianowicie do wody dodaje się peptonu i soli kuchennej, aby w ten sposób stworzyć najdogodniejsze środowisko dla warstw przecinkowców. Jeśli do rozporządzenia jest większa ilość badanej wody, to do 900 cm.<sup>3</sup> dodaje się 100 cm.<sup>3</sup> „macierzystego“ roztworu peptonu (str. 26), dobrze miesza i rozlewa do kolbek po 100 cm.<sup>3</sup>. Po 8—12 godzinach pozostawiania kolbek w cieplarni (37°) z powierzchniowych warstw przygotowuje się preparaty i przeszczepia na płytki z pożywkami swoistymi (str. 34—35). O badaniu szczegółowem i różnicowaniu — patrz str. 163—166; o odczynie R. Pfeiffer'a — str. 233.

### Badanie mleka.

Mleko zdrowych zwierząt w wymionach jest jałowe i dopiero podczas dojenja zanieczyszcza się przez najrozmaitsze drobnoustroje, znajdujące się na skórze i włosach zwierząt, na rękach osób dojących, w brudnych naczyniach i t. p. Zanieczyszczone mleko ulega w krótszym lub dłuższym czasie — zależnie od ilości znajdujących się w niem drobnoustrojów oraz od ciepłoty zewnętrznej — zepsuciu. Przy odpowiedniej ciepłocie rozwijają się i rozmnażają przede wszystkim bakterje kwasu mlekowego, z których najpospolitszy jest *Streptococcus lactis*. Jest to dwoinka, rosnąca na słabozasadowych pożywkach z dodatkiem 2% cukru mlekowego lub gronowego oraz kilkoma kroplami wyjałowionej wodnej zawiesiny kredy (pożywka staje się nieprzezroczysta!), tworząca wokół przezroczysty krąg. W czystej hodowli zakwasza mleko w ciepł. 37° w ciągu 24 godz., o ile jednak dodać do mleka 2% sody, kwas nie wytwarza się. Następnie należy tu grupa laseczników (tlenowych i beztlenowych) peptonizujących kazeinę, a więc zarodnikowców, wytrzymujących parogodzinne nagrzewanie do 100° (optimum ciepłoty 24—44°, a dla niektórych gatunków, t. zw. termofilowych, nawet do 54°) oraz laseczników, wytwarzających barwniki (naprz. barwnik niebieskawy, *bac. cyanogenes*). Od chorego

zwierzęcia hoduje się niekiedy drobnoustroje chorobotwórcze z grupy las. okrężnicy (naprz. bac. paratyphi B.), paciorkowce (*Streptococcus mastidis*) i gronkowce, wywołujące zapalenie wymion i t. p.; natomiast z rąk dójki lub w inny sposób przedostać się mogą do mleka inne drobnoustroje, chorobotwórcze dla człowieka, naprz. laseczniki duru brzuszego, błonicy, przecinkowce cholery i t. d. Pod względem praktycznym stosunkowo jednak najdonioślejsze znaczenie posiada obecność w mleku laseczników gruzliczych (hodowane prątki gruzlicze należą do typu zwierzęcego, str. 138). O lasecznikach rzekomo gruzliczych w mleku patrz str. 139.

Badanie mleka na obecność prątków gruzliczych polega na badaniu preparatów mikroskopowych oraz na szczepieniu zwierząt. Jako materiał do badania służy osad, otrzymany przez odwirowanie lub osadzanie dużej objętości mleka oraz śmietanki, którą oddzielnie lub łącznie z osadem należy rozsmarować cienką warstwą na szkiełkach przedmiotowych. Preparaty po wyschnięciu zanurza się w celu, rozpuszczenia tłuszczu, na 5—10 minut w chloroformie albo ksylołu, następnie na 1—2 min. w alkoholu i barwi (bez utrwalania w płomieniu) met. Ziehl-Gabbet'a. Metoda antyforminowa: do 5 cm.<sup>3</sup> mleka dodać 5 cm.<sup>3</sup> eteru, 10 cm.<sup>3</sup> 25<sup>0</sup>/<sub>10</sub> roztworu antyforminy i 25 cm.<sup>3</sup> fiz. NaCl, wirować 1/2 godz.; osad służy do preparatów barwionych i szczepienia zwierząt. Szczepienie odbywa się w ten sposób, iż zdrowym świnkom morskim wstrzykuje się podskórnie ok. 3 cm.<sup>3</sup> obfitego osadu i śmietanki, zmieszanych dokładnie z wodą jałową; w razie obecności las. gruzliczych zwierzęta padają i w badaniu pośmiertnem (str. 51) znajdujemy gruzełki w wątrobie, śledzionie i in. narządach oraz zsewowanie gruczołów chłonnych.

Badanie drobnowidzowe osadu mlecznego (na preparatach barwionych) pozwala na wykrycie, oprócz laseczników gruzliczych, paciorkowców, gronkowców, niekiedy i laseczników typu bac. coli.

### Badanie powietrza.

W powietrzu zawsze znajdują się jakieś drobnoustroje; aby przekonać się o tem, wystarczy na czas pewien (1/2—1 godz.) postawić parę jałowych otwartych płytek Petri'ego z agarem, żelatyną i t. p., poczem płytki przykryć, wstawić do ciepłarki i badać dnia następnego; na płytkach, które zaledwie parę minut stały otwarte, znajdujemy mniej lub więcej liczne



drobnoustroje (najczęściej czworniaki, wytwarzające barwniki, pleśniaki). Pod względem praktycznym największe znaczenie posiada badanie na obecność laseczników grzyliczych (naprz. w sanatoriach, salach szpitalnych, szkołach, fabrykach i t. p.); w tym celu zapomocą jałowych, zwilżonych w buljonie gąbek, zbiera się kurz, osiadły na różnych przedmiotach, wy-ciska płyn z gąbek i po posianiu na różnorodne podłoża (między in. i na swoiste dla las. gruzł. — str. 40—41), podobnie jak płwocinę, wstrzykuje się świnie morskiej (str. 136). Już podczas wojny wszechświatowej badacze francuscy wykazali, że w pomieszczeniu, w którym znajdują się laseczniaki grzylicy, wystarczy poprostu umieścić świnki morskie (w klatce), aby przekonać się o obecności tych drobnoustrojów; po 4—8 tyg. zwierzęta te padają, a badania sekcyjne wzgl. anatomo-patologiczne wykazują, że zginęły one od grzylicy.

Badanie ilościowe wykonywa się w ten sposób, że pewną określoną ilość powietrza zapomocą pompki o wiadomej pojemności przepuszcza się bądź:

a) powoli przez kilka  $\text{cm}^3$  jałowej wody lub buljonu, poczem 1  $\text{cm}^3$  płynu takiego wyszczepia się na płytce żelatynowej (tlenowo i beztlenowo) — ilość wyrosłych kolonii odpowiada ilości bakterji w takiej objętości powietrza, jakiej odpowiada 1  $\text{cm}^3$ , naprz. 30 litrów powietrza przepuszczono przez 10  $\text{cm}^3$  wody lub buljonu; zatem 1  $\text{cm}^3$  płynu = 3 litrom powietrza, jeśli więc ilość bakterji w 1  $\text{cm}^3$  płynu oznaczmy X, to w 1 litrze powietrza znajduje się  $\frac{X}{3}$  bakt.;

bądź b) przez 2 jałowe sączki z ziaren szklanych (wielkości 0,25—0,5 mm wielkości, umieszczone w specjalnej rurce) — poczem z ziaren szklanych robi się tlenowo i beztlenowo posiewy na żelatynie i agarze (met. Fickera — Galli-Valerio).

## Badanie gleby.

W glebie (w ziemi) znajdują się do pewnej głębokości (do 1,5 m. różne drobnoustroje, zarówno pożyteczne, zwłaszcza dla rolnictwa (drobnoustroje, rozkładające związki azotowe, t. zw. bakt. denitryfikujące, oraz przyswajające azot, t. zw. nityfikujące), jak i szkodliwe. Z ostatnich wy-

mienić należy chorobotwórcze dla człowieka: las. tężca (str. 111), las. obrzęku złośliwego (str. 113) oraz różne prątki beztlenowe, wywołujące zgorzeliiny gazowe, obrzęki gazowe i t. p., jak prątek gazowy (str. 113), prątek szelestnicy (str. 114), chorobotwórcze dla bydła: lasecznik zgorzeli trzesczącej (str. 115), prątek węglika (str. 108 — chorobotwórczy i dla ludzi) oraz wiele innych; nieraz przez drobne zadrażnienia lub duże rany drobnoustroje te przedostają się wraz z ziemią do organizmu i tu wywołują objawy ciężkiej choroby.

W celu zbadania gleby bierzemy jałowem naczyniem pewną jej ilość i wysiewamy tlenowo oraz beztlenowo na płytkach lub też uprzednio wrzucamy do jałowego odczynu fiz. NaCl, poddajemy na trzęsawce dokładnemu skłóceniu (w ciągu 1—2 godz.) i z płynu robimy posiewy tlenowo oraz beztlenowo (na żelatynie — agar mniej się nadaje, gdyż zarasta go bardzo szybko nader pospolity w ziemi *bac. mycoides*).

W celu zbadania głębszych warstw gleby bierze się próby bądź po wykopaniu dołu ze ścian jego na pewnej głębokości, bądź też zapomocą specjalnego przyrządu wiertniczego (naprz. Frankel'a), który wydobyć może ściśle określoną ilość ziemi, tak iż można dokonywać badań ilościowych. Wysiew powinien odbywać się natychmiast po wzięciu materiału, gdyż wskutek zwłoki jedne drobnoustroje się mnożą, inne giną; twardą ziemię należy doskonale rozetrzeć w jałowym moździerzu agatowym.

## Odczyn biologiczny Paul'a

(w celu rozpoznania ospy, Variola).

Na jednym oku królika na zakokainizowanej rogówce tępą igłą robi się w kratkę kilka zadrażeń nabłonka, przenosi na miejsce podrapane zawartość pęcherzyka ospowego (świeżą lub też wysuszoną na szkiełku, a zmytą w pracowni jałowym fiz. NaCl) i wciera ją w to miejsce; na drugim oku robi się na rogówce dla kontroli tylko zadrażnienia. Niekiedy po 24, zwykle jednak po 48—72 godzinach tworzą się — o ile mamy do czynienia z ospą — widoczne nieraz gołym okiem wzniesienia; jeśli oko ostrożnie wyłuszczyć (unikając przecięcia naczyń, aby nie nastąpiło krwawienie) i gałkę oczną zanurzyć na parę minut w alkoholu z sublimatem, wówczas owe wzniesienia przyjmują kształt okrągłych białych pla-

mek. O ile odczyn wypadł ujemnie lub nieswoiście (od zbyt silnego po-  
drapania rogówki, owrzodzeń od gronkowców i t. p.), wówczas widać  
tylko albo blizny, albo jakieś rozlane, białoszarawe, nie wypukłe owrzod-  
zenia, które można odróżnić od zmian swoistych.

### Rickettsia Prowazeki.

Rola, jaką odgrywają wszy w przenoszeniu duru plamistego (typhus  
exanthematicus s. petechialis), skłoniła wielu badaczy do poszukiwania  
zarazka swoistego w ciele tego owadu. Już Ricketts i Wilder (1910)  
postrzegali we wszach zakażonych, ale niekiedy i w normalnych, prątki o za-  
barwieniu biegunowem; Sergent, Foley i Vialatte opisali u większo-  
ści wszy od chorych na dur wysypkowy „coccobacilles”, których nie spo-  
strzegali we wszach normalnych. Lecz dopiero podczas wojny badania  
da Rocha-Lima'y, Töpfer'a, Otto'a, Rud. Weigla i in. posunęły  
nasze wiadomości tak daleko, iż dziś na podstawie tych prac z wielkim  
prawdopodobieństwem przyjąć możemy, iż opisany poniżej twór t. zw.  
„Rickettsia Prowazeki” jest zarazkiem duru osutkowego (plamistego).

Na skrawkach zakażonych wszy udało się da Rocha Lima'ie wy-  
kazać, że znajdujące się we wszy drobnoustroje przedostają się do ko-  
mórek nabłonkowych przewodu pokarmowego i wywołują w nich, silnie  
się rozmnażając, zmiany swoiste. Okazało się przytem na drodze doświad-  
czalnej, że jedynie krew od chorych na dur plamisty jest w możności  
zakazić wesz owymi drobnoustrojami. Z wielu setek wszy, umieszczanych  
na chorych na dur plamisty lub ozdrowieńcach, na chorych na płonicę lub  
na zapalenie płuc przez jednakowy okres czasu, udało się wykryć owo  
zakażenie przewodu pokarmowego tylko u tych owadów, które ssaly krew  
chorych na dur plamisty w okresie gorączkowym (można też sztucznie za-  
kazić zdrowe wszy, wprowadzając do ich przewodu pokarmowego zarazki  
ze wszy zakażonych). Czy postrzegane we wszach, zwłaszcza w komórkach  
nabłonkowych, twory są istotnie bakterjami, orzec trudno — zdaniem  
da Rocha, nie jest wykluczone, że mamy tu do czynienia z grupą  
chlamydozoa-strongyloplasmata, grupą, której stanowisko  
w klasyfikacji nie jest jeszcze zupełnie ustalone; da Rocha nazwał owe  
ciałka „Rickettsia Prowazeki”.

Pomimo, iż rickettsje znajdują się we wszy zakażonej w takiej ilości,  
iż na preparacie mazanym z wszy ma się wrażenie, że to jest czysta ho-



dowla drobnoustrojów, wszystkie próby wyhodowania — czy to tlenowo, czy beztlenowo, z dodatkiem płynu przesiękowego, krwi, ekstraktów z wszy i t. p. — zawiodyły.

Rickettsja Prowazeki należy do najmniejszych, znanych nam zarazków, jest gr. ujemna, barwi się zwykłymi, zasadowymi barwnikami anilino-wymi bardzo trudno i nader słabo, met. Giemsa'y zabarwia się w swoisty świecący kolor czerwony, kontury zarazka jednak po wszystkich zabarwie-niach nie występują ostro, lecz są raczej zamazane; dopiero po zastoso-waniu zapraw lub przepojeniu solami srebra, jak również na preparatach cyanochinowych i tuszowych, drobnoustrój występuje w postaci tweru znacznie większego i lepiej wykształconego. Zasadnicza postać zarazków jest eliptyczna; bardzo krótkie, prawie kuliste w chwili powstawania, wy-ciągają się one później cokolwiek, aż do podziału nowego na dwie krótkie części. Po podziale młode elementy pozostają jeszcze przez chwilę połą-czone ze sobą, wskutek czego powstaje swoista postać: biskoptowa lub hantli; znajdujemy również formy rickettsji o silnie zabarwionych biegunach, przypominające laseczniki z ciałkami biegunowemi.

Na skrawkach z wszy zakażonych rickettsje Prowazeki leżą, jak już zaznaczono, w komórkach nabłonkowych w wielkich ilościach; po-czątkowo zajmują one ściśle określoną część komórki i dopiero przez dal-szy rozrost wypełniają całe jej ciało, silnie je rozciągają, tworzą uwypu-klenie w kierunku światła кишки; wzdęcia te mogą się od komórki od-dzielić i tworzą duże skupienia, widoczne zwykle na skrawkach. Rickettsja Prowazeki jest jedynym, dotychczas znanym nam, wyłącznie wewnątrzko-mórkowym pasorzytem jelita wszy, i tem różni się od innych drobnoustro-jów, które znajdujemy niekiedy i we wszy naturalnej, a które tak wielko-ścią, jako też postacią swą i masowem wystąpieniem najzupełniej ją przy-pominają; właściwość wewnątrzkomórkowego pasorzytnictwa jest więc głów-nym sprawdzianem zakażenia wszy przez rickettsje Prowazeki.

TABLICA IV.

Choroba	Co badać u chorego	Kiedy badać	Co badać		Uwagi
			u otoczenia	u ozdrowieńców	
<i>Błonica</i> (diphtheria)	<p>błony i śluz z powierzchni błony śluzowej górnych dróg oddechowych</p> <p>a) kał wzgl. przedmioty (bieliznę, zawałaną kałem, treść zółdka, wymiociny)</p> <p>b) surowicę na aglutynację</p>	od samego początku choroby	<p>błony i śluz z powierzchni błony śluzowej górnych dróg oddech.</p> <p>a) kał aż do wyniku ujemnego, t. j. aż do zniknięcia w kale przetrzinków cholery</p>	—	—
<i>Cholera azjatycka</i> (cholera asiatica)	<p>a) kał wzgl. przedmioty (bieliznę, zawałaną kałem, treść zółdka, wymiociny)</p> <p>b) surowicę na aglutynację</p>	<p>a) od początku choroby</p> <p>b) pod koniec choroby w okresie zdrowienia i później</p>	<p>a) kał, badania parokrotne</p>	<p>a) kał aż do wyniku ujemnego, t. j. aż do zniknięcia w kale przetrzinków cholery</p>	Badania wód studziennych, rzek (w miejscu czepiania wody przez ludność)
<i>Czerwonka, krwawa biegunka</i> (dysenteria)	<p>a) wypróznienia krwawo-słuzowe, słuzowe lub ropne</p> <p>b) surowicę na aglutynację</p>	<p>a) od początku choroby</p> <p>b) od końca 2-go wzgl. początków 3-go tygodnia</p>	a) kał	<p>wypróznienia aż do wyniku ujemnego(tj. aż do zniknięcia w kale drobnoustr. swoist.)</p>	—
<i>Dur brzuszny</i> (typhus abdominalis)	<p>a) krew na posiew</p> <p>b) surowicę na aglutynację odcz. Widala-Grubera</p> <p>c) kał i mocz</p> <p>d) wycięta różyczkę na posiew b. małe prakt. zastosowanie!</p>	<p>a) w 1-ym tyg. choroby (czasem i dłużej)</p> <p>b) od połowy lub końca 2-go tyg. choroby aż do końca choroby i okresu zdrowienia</p> <p>c) począwszy od połowy lub końca 2-go tyg. choroby</p> <p>d) w drugim tygodniu choroby</p>	<p>c) kał—badania parokrotne</p>	<p>c) kał i mocz aż do wyniku ujemnego (aż do zniknięcia laszczników tyfusowych)</p>	Badania wód studziennych i produktów spożywczych (mleko).
<i>Dury rzekome</i> (paratyphus A, B, Gaertnera)	<p>a) krew na posiew</p> <p>b) surowicę na aglutynację (odcz. Widala-Grubera)</p> <p>c) kał i mocz</p> <p>d) jak w durze brzuszny</p>	<p>a) na początku choroby</p> <p>b) zwykle pod koniec pierwszego wzgl. od początków drugiego tygodnia choroby aż do końca choroby i okresu zdrowienia</p> <p>c) zwykle od drugiego tyg. choroby (niekiedy wcześniej)</p>	<p>c) kał—badania parokrotne</p>	<p>c) kał i mocz aż do wyniku ujemnego (aż do zniknięcia laszczników rzekomodurowych)</p>	Badania produktów spożywczych (mięso, konserwy, mleko i t. p.).
<i>Dur plamisty</i> (typh. exanthematicus, febris petechialis)	<p>a) krew na posiew (wynik ujemny! zrzadka hod. odm. Weill-Felix)</p> <p>b) surowicę na aglutynację (odcz. Weill-Felix)</p>	<p>a) w pierwszym tygodniu choroby</p> <p>b) od drugiej połowy pierwszego tygodnia</p>	—	—	—
<i>Dur powrotny</i> (febris recurrens)	preparaty miazne ze krwi (nieutwalone albo utwalone)	najlepiej w okresie napadowym	—	—	—

<i>Kiła, przymiot</i> ( <i>Syphilis, lues</i> )	a) preparaty mazane z treści (płynu surowiczego) wrzodu pierwotnego wzgl. z cieczy śródtkankowej gruczołów chłon. b) krew (surowicę) na odczyn Wassermann'a c) płyn mózgowo-rdzeniowy na odczyn Wassermann'a	a) z chwilą zjawienia się owrzodzenia b) w kilka tygodni (5—6) od początku choroby, wielokrotnie co czas pewien podczas choroby, po każdym leczeniu i t. d.	—	b) co pewien przeciąg czasu powtarzać badania krwi	—
<i>Opon mózgowych nagminne zapalenie</i> ( <i>meningitis cerebro-spinalis epidemica</i> )	a) płyn mózgowo-rdzeniowy b) wydzielinę z jamy nosogardzielowej	a) w ciągu choroby b) w ciągu choroby	b) wydzielinę z jamy nosogardzielowej	b) wydzielinę z jamy nosogardzielowej aż do wyniku ujemnego	—
<i>Rzeżączka, tryper</i> ( <i>gonorrhoe</i> )	preparaty mikroskopowe oraz posiew z wydzielin cewki moczowej, z nitek w moczu, z wydzielin spojówki	w okresie choroby i międzychorobowym	—	preparaty mikroskopowe (jak od chorego) aż do wyniku ujemnego	—
<i>Zimnica</i> ( <i>malaria</i> )	a) preparaty mazane z krwi (nieutwalone lub utwalone) b) gruba kropla z krwi	a) najlepiej w okresach napadowych b) w okresach napadowych i międzynapadowych	—	a) preparaty mazane z krwi aż do wyniku ujemnego b) gruba kropla z krwi	—

Tablica objaśniająca, w jakim okresie cierpienia należy badać przedmioty w najważniejszych chorobach zakaźnych.



## SKOROWIDZ.

- Abderhalden'a odczyn 241  
Absorbcyjna metoda Buchner'a 46  
Actinomycosis 115  
Acel-Liebermann'a pożywka 33  
Aceton 56  
Achorion Schoenleini 181  
Agar alkaliczny 34  
  „ cukrowy 29  
  „ z czerwieni Kongo 33  
  „ 2<sup>o</sup>/<sub>o</sub> glicerynowy 30  
  „ z krwią ludzką 36  
  „ z papką mózg. wg. Fickera 41  
  „ z pł. puchlinowym wg. Jochmann'a 37  
  „ z pł. puchlinow. wg. Kiefer'a 37  
  „ z „Ragit'u“ 29  
  „ z surowicą wołową 36  
  „ z somatozą 30  
  „ z zielenią malachitową 33  
  „ zwykły 28  
Aglutynacja w kropli wiszącej 202  
  „ makroskopowa 200  
  „ mikroskopowa 202  
  „ rzekoma 209  
  „ wspólna 207  
Aglutynacji odczyn 197  
Aglutyniny 190  
Alcaligenes bac. 154  
Amboceptor hemolityczny 191, 212  
Ameby 167  
Amerykańska zaraza świń 169  
Anginy Plaut-Vincent'a lasecz. 124  
Anopheles 102  
Anthrax, bac. 108  
Antyforminowa metoda ujedn. plwociny 131  
Antygen 188  
Antygen do odczynu Wassermann'a 218  
Antytoksyna tężcowa 113  
  „ błonicza 120  
Apochromatyczne soczewki 6  
Arloing 115  
Ascoli'ego odczyn 109, 110, 197  
Ascomycetes 183  
Aspergillus 183  
Autoklaw I, 12  
Azotowy kwas 14  
  
Babesia 105  
Badanie drobnoustrojów 53  
Bakterji filtrowanie 20  
Bakterjobójcze odczyn 232  
Bakterjotropiny 237  
Barwienie skrawków 59  
Barwników przygotowywanie 62  
Bauer-Hecht'a modyfikacja odcz. Wassermann'a 230  
Beck'a-Proskauer'a pożywka 28  
Berkefeld'a-Nordtmeyer'a świece 20  
Beurmann'a-Gougerot'a grzybek 117  
Beztlenowe hodowle 45  
Biedert'a metoda ujednost. plwociny 130  
Biegunka krwawa p. dysenteria 155  
Biegunowe ciała 119  
Bieling'a-Conradi prątki 114  
Bienstock'a-Klein'a prątki 114  
Biologiczne własności bakterji 78  
Bioryzacja 14  
Błękit metylenowy Loeffler'a 65, 69

- Błękit metylenowy wodny 65  
 Błonicy lasecznik 108, 117  
 Błonicy rzekomej lasecznik 121  
 Bordet-Gengou lasecznik 143  
 " " odczyn 213, 216  
 Botulizmu las., botulinus bac. 154  
 Buchnera metoda absorbcyjna 46  
 Bujwida nitrozoindolowy odczyn 166  
 Buljon z „Ragit'u“ 23  
 „ na wyciągu Liebig'a 23  
 „ zwykły 22  
 Burri'ego metoda tuszowa 56, 77, 100  
 Castellani'ego odczyn 207  
 Celli 102  
 Chauvoei bac. 115  
 Chemiczne środki odkaż. 14  
 Cholery kur las. 169  
 Cholery przecinkowiec 162, 163  
 Chorobotwórcze własności bakterji 85  
 Ciemne tło 10, 56, 77  
 Ciepłoty mierzenie u zwierząt 51  
 Clostridium oed. mal. 113  
 Coli communis bac. 147, 170  
 Coli-miano 79, 248  
 Conagglutinatio 207  
 Conradi 96, 114  
 Conradi-Bieling'a prątki 114  
 Conradi-Drygalskiego podłoże 31  
 Czaplńskiego skała oblicz.  
 las. gruźlicy 134  
 Czerwonka świń 99  
 Czworniak 144  
 Dawkowanie materiału do szczepień 50  
 Dawka śmiertelna 86  
 Dializacyjna metoda Abderhalden'a 241  
 Dieudonné'ego podłoże 34, 164  
 Diphteriae bac. 108, 117  
 Diplococcus crassus 177  
 „ flavus 177  
 „ lanceolatus 140  
 Diplostreptococcus epidemicus 142  
 Dopełniacz 212, 221  
 Dörr'a pożywki suche 41  
 Drożdże 183  
 Ducrey'a lasecznik 115  
 Dur — patrz tyfus  
 Dwuchwytnik hemolit. 191, 212, 223  
 Dysenteria amoebica 168  
 Dysenteria, bac. 155  
 Dżumy lasecznik 99, 115, 145  
 Eberth'a lasecznik duru brz. 149  
 Egzotoksyn wytwarzanie 112  
 Ehrlich'a odczyn indolowy 8  
 Ellerman'a i Erlandsen'a  
 met. ujednostajnienia plwociny 130  
 Endo pożywka 32  
 Entamoeba coli 167  
 „ histolytica 168  
 „ tetragena 168  
 Enteritidis Gaertneri bac. 151  
 Ermengem'a lasecznik botulizmu 155  
 Ernst'a odczyn 81  
 Ernst-Babesa ziarenka 119  
 Erysipelatos streptococcus 98  
 Erysipelatos suum bac. 99  
 Erytrocytowa met. strącania 195  
 Escherich 147  
 Esmarch 248  
 Eijkman'a kolbki 79, 248  
 Fagocytowa liczba 238  
 Fallières'a barwienie 66, 118  
 Fenol 14  
 Fermentacyjne własności bakterji 79  
 Fickera pożywka 41  
 „ „Typhus-diagnosticum“ 206  
 „ sposób badania wody 249  
 Filtrowanie pod ciśnieniem 20  
 Filtry twarde 20  
 „ miękkie 20  
 Fiolet goryczkowy 64  
 Fiolet metylenowy 69  
 Fizjologicznego roztworu soli przygo-  
 towywanie 18  
 Flemming'a płyn 56  
 Flexner'a las. krw. biegunki 157  
 Fosforescencja bakterji 83

- Fränkel'a dwoinki 99, 140  
 Fränkel'a prątek gazowy 113  
 Friedländera prątek otoczkowy 141  
     "    lasecznik 99  
 Fromme 101  
 Fuksyna zwykła 63  
     "    karbolowa 64  
 Fusiformis bac. Plaut-Vincenti 124  
  
 Gabbeta plyn 69  
 Gaffky'ego skala oblicz. lasecz. gruzlicy 134  
 Gamety 102  
 Gärtner'a lasecznik 151  
 Gasisa barwienie 70  
 Gazówki 113  
 Gazowy prątek Fränkel'a 113  
 Gencjana anilinowa 64  
     "    karbolowa 64  
 Gessard 106, 109  
 Giemsa'y barwienie 76, 100, 169  
 Ghon 114  
 Gleby badanie 252  
 Gnilne miano 79, 248  
 Gonokoki 99, 107  
     "    w moczu 173  
 Gram'a met. barwienia bakterji 65  
     "    "    "    skrawków 60  
 Gram — dodatnie bakterje 66  
     "    ujemne bakterje 66  
 Granulobacillus putrificus (Serkowski) 108, 124  
 Grassi 101  
 Gronkowiec biały 98  
     "    złocisty 98  
 Gruba kropla 103  
 Gruzlicy lasecznik 99, 172  
     "    laseczników barwienie 61  
     "    "    hodowanie 135  
     "    laseczniki w kale 167  
     "    "    w płwocinie 129  
     "    "    w pł. mózg.-rdz. 178  
 Grypy prątki 142  
 Grzybki — badanie 180  
 Grzybek parcha 181  
  
 Grzybek strzygący 180  
 Haemoproteus noctuae 105  
 Hauser'a modyf. odczynu strącania 194  
 Heim'a sączki 21  
 Heim'a-Faust'a badanie wody 249  
 Hematoksyliną barwienie pełzaków 168  
 Hemolityczne miano 215  
 Hemolityczny odczyn 212  
 Hemolityczna surowica 191  
 Hemolizyny 213  
 Hermann'a ciecz 105  
 Hesse-Heyden'a pożywka 40  
 Hetsch-Barsiekow'a pożywka 25, 152, 160  
 His-Russel'a (Y) las. dyzent. 157  
 Hodowli czystych przechowywanie 47  
 Hofer-Hoverka pożywka 35, 165  
 Hoffmann'a las. błonicy rzekomej 121  
 Hog-cholera 169  
 Homogenizacja płwociny 130  
  
 Ilość bakt. w materiale do szczepień 50  
 Imersja 6  
 Imersyjne soczewki 6  
 Inaktywacja surowicy 212  
 Index opsoniczny 238  
 Indolu wytwarzanie 81  
 Influenzae bacil. 142  
 Instrumentów czyszczenie 18  
  
 Jednostka odporności 120  
 Jochman'a agar. z pł. puchlin 37  
 John'ego barwienie otoczek 72  
 Jundell'a pożywka 40  
  
 Kabeshima podłoże 35  
 Kafu badanie 146  
     "    zbieranie do badania 91  
 Karłowski 185  
 Kartofle 40  
 Karwackiego „gazówki“ 113  
     "    pożywka 41  
 Kent 105  
 Kiefera agar z pł. puchl. 37



- Kiły krętek 92  
 Kistka (penicillium) 183  
 Kitasato-Salkowskiego od-  
 czyn indolowy 81  
 Kitasato-Yersin las. 145  
 Koch Rob. 137, 162  
 Koch'a aparat 1, 13  
 Koch-Weeks'a las. 143  
 Koenigsfeld'a metoda 97  
 Kolonji cechy 53  
 Kolonji liczenie 55  
 Kongo-czerwień — pożywka 33  
 Krętek blady 100, 125  
 Krętek Obermeiera 99  
 Krętek żółtaczki zakaźnej 100  
 Krezolowo-mydłany roztwór 14  
 Kronberger'a barwienie 71  
 Kronmayer'a i Trinchese'go  
 modyf. odcz. Wass. 230  
 Kropidlak (aspergillus) 183  
 Kropla wisząca 7, 56  
 Krwawej biegunki las. 155  
 Kwawa biegunka pełzakowa 168  
 Krwi badanie 95  
 „ odwłóknianie 19  
 „ zbieranie do badania 87, 88, 89  
 „ „ odzwierząt 185, 186, 187  
 „ „ na odcz. Wasserm. 218  
 Krwinek baranich zawiesina 222  
 Krztuśca las. 143  
 Kühne-Weigert'a met. barwie-  
 nia skrawków 60  
  
 Lactis aerogenes bac. 171  
 Lakmusowa serwatka 25  
 Lange-Nietschego met. uje-  
 dnostaj. płwociny 133  
 Langner'a barwienie 118  
 Laveran 101  
 Leishman'a barwienie 77  
 Leprae bac. 139  
 Lewkowicz-Plaut-Vincent  
 las. 124  
 Levaditiego barwienie 101, 126  
 Litionowy karmin 60  
  
 Lizol 14  
 Loeffler'a barwienie rzęsek 74  
 „ „ skrawków 59  
 „ „ błękit metylenowy 65  
 Loeffler'a lasecznik 117  
 „ „ pożywka 33  
 „ „ z surowicą 39  
 Lugol'a roztwór 65  
 Lubińskiego barwienie 67  
  
 Łoju napletkowego las. 138  
 Łowienie kolonji 44  
  
 Mac-Neal'a pożywka 38  
 Macierzyste roztwory barwników 62  
 Madsen'a skala do oznaczania  
 miana pożywek 21  
 Makrogamety 102  
 Makroskopowe badanie kolonji 53  
 Malachitowa zieleń w agarze 33  
 Malaria 101  
 Mallei bac. 109  
 Malleina 110  
 Mandelbaum'a modyf. odczyn  
 Wasserm. 230  
 Manson'a barwienie, barwnik 77, 100  
 Marchiafava 102  
 May-Grünwald-Giemsay met.  
 barwienia 76  
 Meinicke'go odczyn 231  
 Meningokoki 174  
 Metachromatyczne ciała 119  
 Micrococcus catarrhalis 144, 177  
 „ cinereus 177  
 „ intracellularis Weichs. 174  
 „ tetragenus 144  
 Mikrogamety 102  
 Mikroskopowe badanie drobroustr. 56  
 Mikroskopu budowa 4  
 „ czyszczenie 10  
 „ systemy 11  
 Mikrotom 1, 58  
 Mleka badanie 250  
 Mlekowa pożywka 24  
 Mlekowy gazotwórczy las. 171

- Mocz u badanie 170  
 „ zbieranie do badania 91  
 Moellera barwienie zarodników 72  
 Morelliego odcz. indolowy 82  
 Mucor (zygomycetes) 183  
 Mueller'a płyn 56  
 Mucha barwienie 69  
 „ ciałka 70  
 Müller'a sposób badania wody 249  
 Murisepticus bac. 99  
  
 Nalotów badanie 117  
 „ zbieranie do badania 90  
 Nattan-Lavriera metoda szczepienia 136  
 Negatywna met. barw. 56, 78  
 Negriego ciałka 184  
 Neissera barwienie 67, 118  
 „ dwoinki 99, 107  
 Nicolaier III  
 Nigrozynowy barwnik 78  
 Ninhydrynowa próba 246  
 Nitrozo-indolowy odczyn 81, 166  
 Noguchi-Czernogubowa metody odcz. Wasserm 230  
 Noguchiego sposób hodow. 100  
 Nosacizny las. 109  
  
 Obermeiera krętki 99  
 Obrzęku złośliwego las. 113  
 Ochronne ciała 189  
 Odchylenia dopełniacza odczyn 216  
 Oddychanie bakterji tlenem 78  
 Odkazanie II  
 „ rąk 3  
 Odmieniec zwykły 171  
 „ x<sub>19</sub> 172  
 Odporność bakterji na chem. środ. odkazania 85  
 Odporność bakterji na ciepło 84  
 „ „ „ światło 80  
 „ „ „ wysychanie 85  
 Odtleniające własności bakt. 80  
 Oedematis maligni bac 113  
  
 Oidium albicans 125, 188  
 Okrężnicy las. 147, 170  
 Oppenheimer'a met. szczepienia 137  
 Opsoniny 237  
 Optochinowa met. (Nachmann'a) 141  
 Otoczkowy las. Friedländer'a 141  
  
 Paciorkowce 97  
 Palmirski 185  
 Pappenheim'a met. panoptyczna 76  
 Paraglutynacja 209  
 Parameningokoki 176  
 Paratyphi A, B. bac. 151  
 Parcha grzybek 181  
 Pasteur 113  
 Pasteur-Chamberland'a świece 20  
 Pasteuryzacja 14  
 Paula'a odczyn 253  
 Pełzaki 167  
 Penicillium, kistka, pendzlak 183  
 Pepplera barwienie rzęsek 74  
 Pepton jedwabnik. 244  
 Peptonowa woda 26  
 Peptonu wytwarzanie 82  
 Pertussis bac. 143  
 Pestis bac. 99, 145  
 Pfeiffer'a barwienie skrawków 60  
 „ las. grypy 1+2  
 „ odczyn 233  
 Phlegm. emphys. bac. 113  
 Pick-Jacobsohn'a barwienie 71  
 Pierwotniaki 105  
 Pilon'a podłoże 35  
 Pipetek odkazanie 17  
 Piroplazmy 105  
 Plasmodium immaculatum 102  
 „ malariae 102  
 „ vivax 101  
 „ pitheci 104  
 Plaut-Vincent-Lewkowicz las. 124  
 Pleśniaki 183  
 Pleśniawki grzybek 125, 183  
 Płwociny badanie 128  
 Płynu mózgowo-rdzeniowego bad. 174

- Płynu mózgowo-rdzeniowego zbieranie do badania 92  
 Płytkowa metoda 43  
 Pneumobacillus (Friedländer'a) 141  
 Pneumokoki 99, 140  
 Pomieszczenie dla zwierząt 51  
 Pośmiertne badanie zwierząt 51  
 Posocznicy las. 99  
 Powietrza badanie 251  
 Pożywek przygotowywanie 21  
 Precypitacji odczyn 192  
 Precypitacyjna surowica 191  
 Preparatów barwienie 56, 62, 63  
   " z krwi barwienie 75  
 Preparaty -- odbitki 56  
 Preparatów przechowywanie 61  
 Promienicy grzybek 115  
 Proteus vulgaris 171,  $\frac{1}{10}$  - 172  
 Przecinkowiec cholery 162  
 Przeciwciała 189  
 Przesieków badanie 179  
   " zbieranie do badania 92  
 Pseudoagglutinatio 209  
 Pukall'a filtry 20  
 Pyocyaneus bac. 106, 172  
 Pyocyanina 106  
 Pyoksantoza 106  
 Pyoktanina 67  
 Pyrogallol 46  
  
 Ragit 23, 29, 42  
 Rąk mycie 3  
 Redukcyjne własności bakterji 80  
 Refringens spirochaete 126  
 Rhinoscleromatis bac. 142  
 Rickettsje Pro wazeki 254  
 Riemsdijk van, pożywka 27, 119  
 Rocha-Lima, da, 254  
 Ropy badanie 105  
 Ropy błękitnej las. 106, 172  
 Ropy zbieranie do badania 89  
 Rosenkrantzówny met. ujednost. plwociny 133  
 Róża, paciorkowiec 98  
  
 Sabouraud'a pożywka 27, 117  
 Saccharomycetes 183  
 Sarcophysem. bov. bac. 115  
 Schaudinn'i spirochaete, treponema pall. 125  
 Schüffner'a ziarnistość 103  
 Schultego met. ujednost. plwociny 132  
 Sekcja zwierząt 51  
 Septicaemiae haem. bac. 169  
 Serkowskiego barwienie negatywne 56, 78  
 Serkowskiego las. ziarn. gn. 108, 124  
 Serkowskiego odczyn peptonowy 83  
 Serwatka lakmusowa 25  
 Shiga-Kruse bac. dysent. 157  
 Siarczane bakterje 80  
 Siarkowodoru wytwarzanie 80  
 Skóry łusek badanie 180  
   " " zbieranie do bad. 92  
 Skrawków badanie 56  
 Smegmae bac. 138  
 Sobel'a podłoże 31  
 Spenglera barw. otocz. gruźl. 71  
 Spirochaete ictero-haem. s. nodosa 100  
   " Obermeieri 99  
   " pallida 82, 100, 125  
   " refringens 126  
 Sporotrichon 117  
 Sprawdzian 96  
 Staphylococcus albus, aureus 98  
 Sterling-Okuniewskiego spos. badania wody 249  
 Stern Marg. modyf. odcz. Wass. 230  
 Sterylizacja sucha 12  
   " wilgotna 12  
 Strącania odczyn 192  
 Strącająca surowica 191  
 Strausa objaw 110  
 Streptobacillus Ducrey 115  
 Streptococcus erysipelatos, mitis, mucosus, pyogenes 98



- Stronga bac. dys. 157, 160  
 Sublimat 14  
 Surowic przechowywanie 187  
 Surowice wysokowartościowe 190  
 Świecenie bakterji 83  
 Świdrowce 105  
 Szelestnicy prątki 114  
 Szczepienie zwierząt 49  
 Szkl'a mycie 16  
 „ odkażanie 15, 17  
 „ wyjaławianie 16
- Tarozzi'ego - Wrzoska met.  
 hod. beztl'en. 45, 112  
 Tetani bac., tężca las. 111  
 Toksyna błonicza 119  
 „ tężcowa 113  
 „ 189  
 Trądu las. 139  
 Treponema pallidum 100, 125  
 Trichophyton megalosporon, microsporon 181  
 Trichophyton tonsurans 180  
 Trujące własności bakterji 86  
 Trypanosoma brucei, gambiense, lewisi 105  
 Tuberculosis bac. 99, 129, 172  
 Tuberkulina 137  
 Tuszowa metoda Burri'ego 56, 77, 100  
 Twardzieli nosa las. 142  
 Tyfus (dur) brzuszny: las. Ebertha 149  
 „ „ „ Widal'a-Gruber'a odczyn 203  
 Tyfus mysi 169  
 Tyfus (dur) plamisty: Rickettsja Pro-wazeki 254  
 Tyfus (dur) plamisty: Weil-Felix'a odczyn 209  
 Tyfus (dur) plamisty: Weil-Felix'a odmieniec 172  
 Tyfus (dur) powrotny — krętki Obermeiera 99
- Tyfusy (dury) rzekome: A, B, Gaertner'a las. 151
- Uhlenhuth'a metoda antyforminowa 131  
 Ujednastajnianie płwociny 130  
 Układ hemolityczny 213  
 Ungermann'a pożywka 27, 101  
 Unieczynnianie surow. 212  
 Uszyńskiego - Fränkel'a pożywka 27
- Venulet 231  
 Vibrio cholerae as. 162
- Wąglika las. 99, 108  
 Wassermann'a odczyn 213, 217  
 „ odczynu modyfikacje 230  
 Weichselbaum'a dwoinki 174  
 Weigl Rud. 254  
 Weila choroba 100  
 Weil-Felix'a odczyn przy tyf. plam. 209  
 Weil-Felix'a odmieniec 172  
 Wiązania dopełniacza odczyn 216  
 Wieloprobówkowa metoda 42  
 Widal'a - Gruber'a odczyn 203  
 Widlisz (anopheles) 102  
 Włośów badanie 180  
 „ do badania zbieranie 92  
 Wody badanie 247  
 „ przekropl. przygotowanie 76  
 Woreczków dializacyjnych sprawdzanie 243  
 Wright'a met. opsoninowa 237  
 Wrzoska - Tarozzi'ego met. hod. beztl. 45, 112  
 Wściekliczna 184  
 Wskaźnik opsoniczny 238  
 Współaglutynacja 207  
 Wydzielin badanie 117  
 „ zbieranie do badania 90  
 Wyjaławianie 11  
 Wysięków badanie 179

- Wysiłeków zbieranie do badania 92  
 Wysoka warstwa 45  
 Wysokowartościowe surowice 190  
 Wzbogacania, wzmoczenia metoda 96,  
 164, 249, 250  
 Xerosis bac. 121  
 Y (Hiss-Russel) las. dyzent. 157  
 Zafałszowań w mięsie wykrycie 195  
 Zakażenie zwierząt 50  
 Zakażenie krwi 97  
 Zamrażanie skrawków 59  
 Zasad i kwasów wytwarzanie 80  
 Zasadotwórczy las. 154  
 Zatapianie w parafinę 57  
 Zawiesin bakteryjnych przygotow. 19  
 Z enker'a płyn 56  
 Zeschnięcia las. 121  
 Zettnow'a barwienie rzęsek 73  
 Zgorzeli trzeszczącej las. 115  
 Ziarenkowiec nieżytowy 144  
 Ziarnisty las. gnilny 108, 124  
 Ziehl-Gabbet'a barwienie 68  
 Ziehl-Neelsen'a barwienie 68  
 Zimnicy pasorzyt 101  
 Zlepiająca surowica 190  
 Zlepiania odczyn 197  
 Zlepianie grupowe (conagglutinatio)  
 207  
 Zlepianie rzekome (pseudoagglutina-  
 tio) 209  
 Zlepniki 190  
 Zwierząt badanie pośmiertne 51  
 „ zakażenie 48  
 Żelatyna 38  
 Żółć 24  
 Żółtaczkę zakaźnej krętek 100



# O M Y Ł K I D R U K U.

Na str. 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 39, 40, 51, 53, 74, 88, 95, 96, 130, 147, 151, 155 zamiast: laseczka, laseczki, laseczek, powinno być: lasecznik, laseczniki, laseczników; na str. 62, 64, 65, 75 zamiast gencjana fiołkowa — fiolet gorczakowy. Opuszczono:

str. 94. *Anthrax* (wąglik)

Treść pęcherzyków, krew, plwociny, kał.

str. 95. *Typhus exanthematicus* (tyfus, dur plamisty, osutkowy)

krew (posiew, aglutynacja).

Pozatem :

Str.	Wiersz		Zamiast:	Powinno być:
	od góry	od dołu		
1		8	parafiny; dalej	parafiny. Dalej
2	5		żółta i amerykańska	żółta amerykańska
3	20		rozłał	wylał
6	20		co i soczewka	, co soczewka
10	11		specjalne kondensatory	specjalnych kondensatorów
	13		zastępujące	zastępujących
11	17		120 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	1200 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
12		10	asbestem	azbestem
13		8	, który	, a który
17		8	dni	godzin
21		9	ług, jak kwas	ługu, jak kwasu
25	11		dopóki strąci się	dopóki nie strąci się
27		1	(amon. lactici).	(ammon. lactici).
28	2, 10		wapnia	sodu
		8	od	niż
30		5	skosić	ułożyć skośnie
37	10		za	na
38		11	szczepić do wody	szczepić w wodzie
45	2		stolik od mikroskopu	stolik mikroskopu
46		13	z pomocą	za pomocą
47		13	możliwość wybuchu	możliwy wybuch
48		3—2	uszkciem platynowym	uszkciem platynowem
51	6—7		zaszczepieniu	szczepieniu
51	12		prze-	przez
54	7		wody kondensowanej	wody kondensacyjnej
55		8	płytk,	płytki
58	10—11		sposób	o sposobie
63		12—11	kilkakrotnie	trzykrotnie
66		13	durów rzekowych	durów rzekomych



Str.	Wiersz		Zamiast:	Powinno być:
	od góry	od dołu		
67		9	odbarwić	podbarwić
75		8	Leishma'a	Leishman'a
79	10		Eikman'a	Eijkman'a
80		3	zmieszanie	zetknięcie
86	14		tych pierwszych	pierwszych
93		14	materiał na zbadanie	materiał do badania
96	9		wzbogacania"	wzmoczenia"
100		1	znaleść	znaleźć
101	14	5	"	"
103	15—16		o kształcie nieprawidłowej	o kształcie nieprawidłowym
104	11		ogrzzać	ogrzewać
105		10	zachloformowanego	zachloroformowanego
106	13		drobnoustrojów	drobnoustroju
	14		laseczniki	lasecznika
108		5	pod słabem powiększeniem	przy słabem powiększeniu
109		12	znaleść	znaleźć
111		14	jej	mu
115		6	znajdywanej	znajdowanym
117	7		wspomnianemi metodami	według wspomnianych metod
119	3		uwidaczniają	uwidoczniają
		6	w którym	w którym
120	1—2		jej — laseczek	go — laseczników
129, 163 178			znaleść	znaleźć
138	3		lasecznika: gruźliczego	lasecznika gruźliczego:
142		4	znajdywano	znajdowano
168	8		amaeba	amoeba
174		11	w lewo	nalewo
177	7—8		odpowiednie... pożywki	odpowiednich... pożywkach
183	11		lepie	lepiej
200		12, 10, 7, 4, 2	= rozcięnczenie	= rozcieńczeniu
207		6	conagglunatio	conagglutinatio
222		14	0,03	0,93
232	2		o kiłą	o kiłę
244	8		dokonywuje się	dokonywa się
248—9		1 i 2 g.	Eijkmann'a	Eijkman'a
249		10	feni	ferri
255	10		tweru	tworu

















24-

K/1945/b

16.12.52

№ 004563



BIBLIOTEKA  
Instytutu im. M. Nenckiego

2727