

Antygeny bydłace z surowicami krów chorych dały te same wyniki, jakie dawały antygeny typu „O” ze świnek morskich.

Stosowanie antygeny z materiału bydłacego jest wygodniejsze, ponieważ z jednej sztuki można go otrzymać w bardzo dużych ilościach.

Na zakończenie muszę zaznaczyć, że w pracy mojej brak doświadczeń kontrolnych z surowicami krów zdrowych. Odkładam tę pracę do późniejszego czasu, kiedy epizootcja pryszczycy w Polsce wygaśnie. Rozumie się bowiem samo przez się, że w okresie panowania pryszczycy wynalezienie takich sztuk, o których można by powiedzieć na pewno, że nie przechorowały pryszczycy, względnie nie zetknęły się ze zwierzętami chorymi, przedstawia bardzo wielkie trudności.

#### W n i o s k i.

1. Metoda odchylenia dopełniacza daje na świnkach morskich, zakażonych doświadczalnie, względnie uodpornionych, wynik zupełnie ściśle z punktu widzenia swoistości wszystkich trzech typów. Jako antygen nadaje się najlepiej świeży wyciąg z naskórków pęcherzy pryszczycowych. Świnka daje surowicę reagującą już po upływie kilku dni. Jeszcze w kilka miesięcy po zakażeniu surowica zawiera dostateczną ilość ciał odpornościowych.
2. Surowice krów dotkniętych pryszczycą dają wynik słaby, zarówno co do stopnia zahamowania, jak co do swoistości typowej. Całkowitego zahamowania nie otrzymuje się wcale.
3. Świeże pęcherze pryszczycowe krów dotkniętych pryszczycą dają antygen nie ustępujący pod względem siły i swoistości antygenowi ze świnek morskich.

1. Ascoli Zeitr. Infek. Haustiere 1910. S. 310.
2. Grundriss der Serologie 1921.
3. Cluca Journal of Hygiene XXVIII 1929 S. 325.
4. Helm Zbl. f. Bakt. 1933/34.
5. Miessner Deutsche Tierärztl. Wsch. 1933 S. 242.
6. Kanya i Olach Ztschr. f. Immunforsch. 1938 S. 92.

#### P i ś m i e n n i c t w o.

7. Krag i Schmidt Ztschr. f. Immunforsch. 91. 1937 S. 409.
8. Trautwein Archiv. Tierheilkunde 1927 56 S. 505.
9. Trautwein i Repin Archiv. Tierheilk. 62 S. 479 1930/31.
10. Toschio Ztschr. Infek. d. Haustiere 28 S. 111. 1925.
11. Brachmann Dtsche Tierartl. Wsch. 71. S. 713. 1920.

Zakład Mikrobiologii i Higieny Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej.

Kierownik: Prof. Dr JOZEF PARNAS.

JOZEF PARNAS

## Szczepionka biliowana przeciw Brucellozie\*)

Vaccin bilié contre la brucellose.

(Avec un résumé en français)

Zaginionemu bez wieści asystentowi  
Markowi ŚLUCZAŃSKIEMU —  
poświęcam.

Pod względem charakteru odporność powstająca w ustroju w przebiegu Brucellozy zbliżona jest najbardziej do odporności w przebiegu gruźlicy. W obu procesach chorobowych odporność jest inna zupełnie niż w przebiegu wielu chorób zaraźliwych ostrych. Jeśli zakażenie węglikiem, różycą, ospą, odrą, doprowadza po pewnej walce ustroju z zarazkiem do jego całkowitego zniszczenia i wyeliminowania z organizmu, zaś w surowicy i tkankach powstają ciała odpornościowe chroniące krócej lub dłużej ustrój od ponownego zakażenia, — to w przebiegu gruźlicy i brucellozy, ciała odpornościowe tworzą się tak długo, jak długo w organizmie istnieją masy zarazka żywego lub zabitego. W momencie zniknięcia z tkanek ostatnich resztek prątka Kocha lub Brucelli, kończy się szybko odporność i organizm staje się skłonny do ponownego zakażenia. Jeśli w przebiegu węglika,

różycy, odrzy czy zgonzeli gazowej surowiça rekonwalescenta daje efekt leczniczy, a jeszcze lepszy surowiça zwierzęcia hyperimmunizowanego, — to wobec gruźlicy czy Brucellozy, tego rodzaju surowice są prawie że pozbawione jakiegokolwiek działania leczniczego lub zapobiegawczego. Wreszcie szczepionka zabita stwarza większe lub mniejsze warunki odporności wobec chorób grupy pierwszej, — tak samo sporządzona szczepionka nie jest w stanie wywołać nawet minimalnej odporności przeciw gruźlicy czy Brucellozie. Na tej podstawie grupie chorób zaraźliwych dających zjawiska odporności czynnej czy biernej, — przeciwstawiamy choroby,

\*) Z prac nieogłoszonych na skutek wojny. — Praca wykonana w Państwowym Instytucie Naukowym Gospodarczego Wiejskiego w Puławach i w Akademii Medycyny Wet. we Lwowie.

które nie stwarzają tych zjawisk, a cechują się objawami odporności śródzakaźnej, określonej nazwą praemunitio (Prämunität). Należy zaznaczyć, że na pograniczu obu grup zakażeń leżą schorzenia zakaźne cechujące się stanami długotrwałego nosicielstwa, względnie zakażenia bezobjawowego (dur brzuszny, dur plamisty, paratyfus, niedokrwistość zakaźna). Ich mechanizm odpornościowy zbliżony jest do zjawisk odporności i odporności śródzakaźnej.

Burnett i Russeff wysunęli tezę: w przebiegu Brucellozy istnieje tak długo odporność, jak długo w ustroju znajdują się żywe zarazki i derywaty ich ciał. Pogląd ten znajduje doświadczenia poparcie w dwu fenomenach: Kocha i Burnetta.

Fenomen Kocha: 1) świnka morska wolna od gruźlicy, zakażona prątkami Kocha, daje całą skalę objawów zakażenia od odczynu pierwotnego (Primäraffekt) do zakażenia ogólnego. 2) świnka morska chora na gruźlicę, zakażona ponownie drogą podskórną, zamiast zmian typowych dla gruźlicy w miejscu zakażenia i objawów ogólnych reaguje tylko powstaniem odczynu miejscowego, prowadzącego szybko do gruźliczego owrzodzenia, które szybko ulega wyleczeniu. Fenomen Kocha jest dowodem dużej odporności i możliwości obrony ustroju zakażonego gruźlicą przeciw ponownemu zakażeniu (reinfekcji).

Fenomen Burnetta: 1) Jeśli śwince morskiej wolnej od Brucellozy wstrzykniemy dootrzewnowo żywą Brucellę, a po tygodniu oglądać będziemy narządy jamy brzusznej, to nie widzimy tam żadnych prawie zmian, mimo, że zarazek daje się wyhodować w dużej ilości ze śledziony, czy węzłów chłonnych regionalnych.

2) Jeśli wstrzykniemy dootrzewnowo żywą Brucellę śwince morskiej już zakażonej 6—7 tygodni przedtem Brucellą, to przy sekcji stwierdzamy w jamie brzusznej liczne ropnie, zrosty pozapalne, naboły włóknikowe, ale w tych wszystkich ogniskach żywego zarazka już nie widzimy. To zlokalizowanie procesu i zabicie Brucelli jest dowodem odporności śródzakaźnej.

Fenomen Burnetta tłumaczy nam objawy Brucellozy (ropnie, zapalenia dróg rodnych i wymienia, ropnie podskórne i stawowe) jako rezultaty reinfekcji, której źródło może się znajdować w samym zakażonym ustroju.

Praktyka wykazała, że przy pomocy samych tylko środków higienicznych, alimentarnych i izolacyjno-dezynfekcyjnych nie potrafimy zlikwidować Brucellozy, zwłaszcza w ośrodkach silnie zakażonych. Wielu specjalistów wysuwa konieczność zastosowania masowych szczepień, obok ścisłego przestrzegania wymienionych zabiegów ogólnych. Zabita szczepionka przeciw Brucellozie okazała się zupełnie bezwartościową. Szczepionka żywa daje efekt zapobiegawczy, ale jako zjadliwa, jest groźna dla matek ciężarnych oraz stwarza duże ilości siewców zjadliwej Brucelli. Dlatego też nie wolno jej stosować.

Masowe doświadczenia amerykańskie, opracowane w 1936 roku przez Mohlera początkują metodę szczepień zarazkiem żywym osłabionym, awirulentnym. Szczepem awirulentnym Nr. 19 zaszczepiono 17.000 cieląt półrocznych. Z tej masy obserwowano 8182 krów cielnych, z tego 5673 w pierwszej połowie ciąży, reszta w drugiej. Z tej ilości, u 7872 (96,2%) poród odbył się normalnie, u 310 (3,8%) były roniecia i inne objawy Brucellozy. Cyfry te są b. ciekawe i zachęcające. Co do odczynu aglutynacji, który nas stale ciekawi u zwierząt szczepionych, jako moment stanowiący podstawę do stworzenia obrazu o stanie zakażenia Brucellozą, — to z liczby 7872 zwierząt rodzących normalnie u 6526 (82,9%) stwierdzono aglutynację dodatnią, z 1346 rodzących normalnie 399 (5,1%) dało aglutynację dodatnią i 947 zwierząt (12%) wątpliwą. Ponieważ w grupie 310 zwierząt roniących 182 (58,7%) dało aglutynację ujemną, zaś 99 (31,9%) dodatnią i 29 (9,3%) wątpliwą — stwierdzono, że z cyfry 7882 krów cielnych, tylko 128 (1,6%) poroniło na skutek zakażenia Brucellozą.

W jesieni 1938 r. studiując problemy patogenezy i odporności Brucellozy, oraz wyniki szczepień przeciw gruźlicy szczepionką BCG w całym świecie, wychodząc z założenia analogii Brucellozy z gruźlicą, — postanowiłem zastosować metodę Calmette-Guerina w odniesieniu do Brucelli. Szczep Brucelli (Br. bovis) wyhodowany przeze mnie z płodu poronionego, pasażowany kilkakrotnie przez świnkę morską drogą szczepienia dootrzewnowego silnie zjadliwy dla świnek i myszy zacząłem hodować na żółci bydłowej: jako pożywkę używałem bulionu wątrobowego z dodatkiem 30% żółci o „pH” 7,4. Co 7 dni przesiewałem Brucellę z żółci na agar wątrobowy z dodatkiem 20% żółci („pH” — 7,4) na płytkę Petri poczem znowu na bulion z żółcią. Taką hodowlę przeprowadzałem przez rok 1938/39 do wybuchu wojny. Ewakuując się z Puław przywoziłem szczep do Lwowa i tu kontynuowałem hodowlę przez okres 1939/40 roku aż do lutego 1941.

*Charakterystyka szczepu wyjściowego Br b/w.* Na płytce Petriego rośnie w postaci kolonii S. Zawieszalność kolonii w roztworze fizjologicznym; b. dobra. Termoaglutynacja: ujemna

|                     | Aglutynacja kwaśna |     |     |     |     |     |     |     | rivanol | trypan-<br>blau |
|---------------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----------------|
|                     | pH 6,6             | 6,2 | 6,0 | 5,6 | 5,2 | 5,0 | 4,6 | 4,0 |         |                 |
| szczep<br>wyjściowy | —                  | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —       | —               |

#### Szczepienie myszy:

Szczepem Br b/w zaszczepiono 3 myszki dootrzewnowo (dawka 0,1 zawiesiny hodowli agarowej). Wszystkie 3 myszki padły do 8 dni. Objawy kliniczne: posmatnienie, nastroszenie włosa, siedzą skulone, drżą, apetyt upośledzony, potem brak, pragnienie wzmożone, charactwo, agonia i śmierć. Zmiany sekcyjne: Tumor lienis et lymphoglandularum cavitatis abd. Septicaemia. Wysiew ze śledziony, węzłów chłonnych, krwi, wątroby: dodatni.

#### Szczepienie świnek morskich:

1) 4 świnki morskie wagi 350 g wysokociężarne, zaszczepiono 0,2 zawiesiny hodowli agarowej Br b/w. Do 16 dni 3 z nich poroniły, płody martwe.

2) 8 świnek (samców) wagi 300 g zaszczepiono dootrzewnowo 0,2 zawiesiny hodowli agarowej.

I grupa: (2 św. m.) zachloroformowane po 14 dniach. Sekcja: obrzęk śledziony, ogniska nekrotyczne w śledzionie, wątrobie, obrzęk węzłów chłonnych; wysiew z tych miejsc: dodatni.

II grupa: (2 św. m.) zachloroformowane po 28 dniach. Sekcja: obrzęk śledziony, węzłów chłonnych, zrosty śledziowo-otrzewnowe, ogniska nekrotyczne w śledzionie, wątrobie, płucach, obrzęk stawów, obrzęk i zapalenie jąder. Wysiew: dodatni.

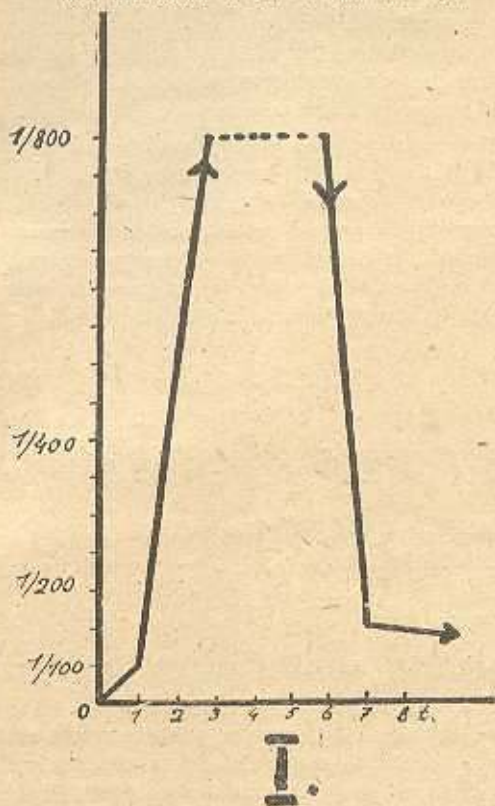
III grupa: (2 św. m.) zachloroformowane po 42 dniach. Sekcja: obrzęk śledziony, ogniska nekrotyczne, zapalenie ropne stawu skokowego i kości, obrzęk jąder. Wysiew dodatni.

IV grupa: (2 św. m.) zachloroformowane po 56 dniach. Sekcja: obrzęk śledziony nieznaczny. Wysiew: dodatni.

*Charakterystyka szczepu wyjściowego Br b/w po 202 pasażach na żółci (Szczep Nr. Br/202).* Na płytce Petriego rośnie w postaci kolonii typowych S, oraz kolonii szorstkawy, suchych, zróżnietych z podłożem. (SR). Zawieszalność kolonii w roztworze fizjologicznym: średnia; obok części utrzymującej się w zawiesinie, część opada na dno w postaci zbitego osadu. Termoaglutynacja: częściowo dodatnia.

|                  | Aglutynacja kwaśna |     |     |     |     |     |     |     | rivanol | trypan-<br>blau |
|------------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----------------|
|                  | pH 6,6             | 6,2 | 6,0 | 5,6 | 5,2 | 5,0 | 4,6 | 4,0 |         |                 |
| Szczep<br>Br/202 | +                  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +       | +               |

Łączna przeciętna krzywa mian aglutynacyjnych 8-miu świnek morskich w okresie obserwacji.



#### Szczepienie myszy:

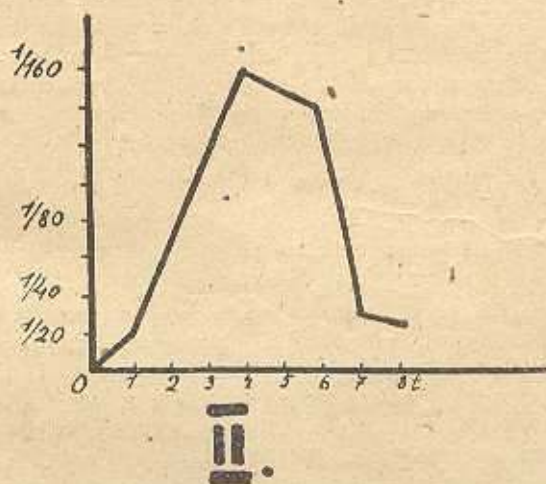
Szczepem Brb/202 zaszczepiono 5 myszek dootrzewnowo, (dawka 0,1 zawiesiny hodowli agarowej). Myszkę zachloroformowano po 10, 20, i 30 dniach. Sekcja: 1) lekki obrzęk śledziony i węzłów chłonnych. 2) Brak zmian anatomo-patologicznych widocznych gołym okiem. Wysiew: 1) Brucella, 2) Brucella, 3) Brucella. 2. kontrolne myszki żyły 3 miesiące.

#### Szczepienie świnek morskich:

4 świnki morskie wagi 350 g. wysoko-ciężarne zaszczepiono dootrzewnowo 0,2 zawiesiny hodowli agarowej Br/202. U żadnej świnki m. nie stwierdzono poronienia. Doświadczenie powtórzono na 4 świnkach morskich wysoko-ciężarnych i 5 królikach wysoko-ciężarnych; poronienia nie stwierdzono.

2) 8 świnek m. (samców) wagi 300 g zaszczepiono dootrzewnowo 0,2 zawiesiny hodowli agarowej.

I grupa (2 świnki m.) zachloroformowane po 14 dniach. Sekcja: obrzęk śledziony nieznaczny, ognisk nekrotycznych prawie nie widać. Wysiew dodatni.



Łączna przeciętna krzywa mian aglutynacyjnych 8-miu świnek morskich w okresie obserwacji.

II grupa (2 świnki m.) zachloroformowane po 28 dniach. Sekcja: brak zmian widocznych gołym okiem. Wysiew dodatni.

III grupa: 2 św. m. zachloroformowane po 42 dniach. Sekcja: brak widocznych zmian. Wysiew: dodatni, skąpy.

IV grupa: (2 św. m.) zachloroformowane po 56 dniach. Sekcja: brak zmian. Wysiew: dodatni — b. skąpy.

Szczep Brb/202 w porównaniu do szczepu Br b/w jest mało zjadliwy; właściwie można go nazwać awirulentnym.

Doświadczenie z rewersją szczepu biliowanego Brb/202.

Celem przebadania możliwości rewersji, dokonano 15 pasażów na myszkach oraz 10 pasażów na świnkach m. Między jednym pasażem a drugim hodowano Brucellę na agarze z krwią. Oba szczepy: pasażowane, oznaczone Br<sub>1</sub>/202 i Br<sub>2</sub>/202, można tak scharakteryzować: Szczep Br<sub>1</sub>/202: na płycie Petriego kolonie S i SR. Zawieszalność w roztworze fizjologicznym średnia. Termoaglutynacja, agl. kwaśna, z rivanolem i tripaflawina, wskazują na mieszaninę typów S i SR.

Szczepienie dootrzewnowe myszy, świnek m. wysoko-ciężarnych i świnek-samców, wykazało, że jest to szczep awirulentny. Rewersja wirulencji nie nastąpiła.

Szczep Br<sub>2</sub>/202: wynik doświadczenia identyczny.

Szczep Brb/202 zachowywał się tak, jak szczep zabity Brucelli.

Uzyskawszy szczep awirulentny, postawiliśmy sobie zadania następujące:

- 1) Przebadac na cielętach i dorosłym bydło oraz owcach jakie miana aglutynacyjne daje Brb/202 po 1, 2 i 3 krotnym szczepieniu, jak długo one się utrzymują, kiedy znikają i jakie nasilenie przybiera poprzedzający je odczyn wiązania dopełniacza oraz następujący po nich odczyn alergiczny.
- 2) Przebadac szkodliwość Brb/202 dla krów wysokociężnych i owiec.
- 3) Wypróbować odpornościowe działanie szczepionek Brb/202 bez lanoliny i z lanoliną.
- 4) Przebadac indeks fagocytarny u zwierząt szczepionych Brb/202. O planach badań zawiadomilem Akademię Nauk w Moskwie i utrzymującego ze mną korespondencję prof. dr. Johannes Schmickla w Lipsku. Wojna 1941 r. przerwała badania.

W latach 1939—45 stosowano poraz pierwszy w Niemczech szczepionkę biliowaną Demmitza (Abortus — Bang — Gallékultur — Impfstoff — Behring). To mnie skłania do opublikowania podanych wyżej uwag i dotychczasowych, nieskończonych jeszcze doświadczeń.

Tiergesundheitsamt w Hannoverze dokonał szczepień w 2 większych ośrodkach wszystkich cieląt półrocznych. Wyniki oceniono jako dobre. Szczepionka biliowana nie wywołała ronień u krów ciężarnych. Uchroniła zwierzęta szczepione od ronienia.

Pragnąłbym kontynuować badania nad szczepionką biliowaną, o ile uzyskamy poparcie materialne Min. Rol. i R. R. oraz P.L.W.

#### Wnio ski

- 1) Szczepionka biliowana przeciw Brucellozie może, zdaje się, rozwiązać zagadnienie zwalczania choroby w ośrodkach silnie zakażonych przez masowe przeszczepienie młodzieży półrocznej.
- 2) Ze szczepu wirulentnego Brucelli Brb/w drogą 202 pasażów na żółci, uzyskano w roku 1941 (rozpoczęto pasażów w 1938 r.) szczep Brb/202, który okazał się awirulentny i zachowywał się w organizmie zwierzęcia szczepionego jak szczep zabity, (ale szczep S, z małą domieszką R).
- 3) Nasz szczep Brb/202 nie wykazał rewersji w pasażach na zwierzętach doświadczalnych.

## VACCIN BILIE CONTRE LA BRUCELLOSE.

## R é s u m é

L'auteur imite, en se basant sur une analogie étroite qui existe entre le mécanisme immunologique de la tuberculose et de la brucellose, la méthode de Calmette-Guérin de production de vaccin. Il commença en 1938 des passages de brucelles sur bile, mais la guerre de 1941 interrompit ces expériences. En rentrant du front il fit connaissance du fait, que les Allemands vaccinaient pendant la guerre en masse des veaux au moyen d'un vaccin bilie, produit par les Instituts

Béhring. Ceci le provoque à publier ses expériences inachevées, dont les résultats peuvent être résumés ainsi que suit:

1) Le vaccin bilie contre la brucellose paraît pouvoir résoudre le problème de la lutte contre cette maladie dans les contres fortement infectés, grâce à une vaccination massive de la jeunesse âgée de six mois.

2) On obtint par 202 passages d'une souche virulente de brucelles Brb/w sur bile, une souche Brb/202, qui se démontra avirulente dans l'organisme de l'animal et se comporta comme une souche tuée. Ce n'était pas une souche R, mais une souche S, avec une faible proportion de souche R.

3) Notre souche Brb/202, n'offrit pas de réversion dans des passages sur des animaux d'expérience.

## 2. Epizoocjologia i bakteriologia stosowana

Zakład Mikrobiologii i Higieny Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej.

Kierownik: Prof. Dr JÓZEF PARNAS,

LEO ERENBERG

## Nowoczesna diagnostyka bakteriologiczna materiałów zakaźnych

## 2. Beztlenowce.

**Pobieranie i przesyłanie materiału do badania bakteriologicznego na beztlenowce.**

Przy nekrobacillozie materiał można pobierać przyżyciowo, w pozostałych schorzeniach beztlenowcowych — ze zwłok, nie później niż w 6 godzin po śmierci. Z ognisk w mięśniach i z naciezionej tkanki łącznej podskórnej pobiera się niewielkie wycinki po 2—3 g, opala nad płomieniem spirytusowym i wkłada do próbówki. Korzystne jest wzięcie wysięku z miejsc chorobowo zmienionych do pipetek pasteurowskich, po uprzednim przypaleniu tych miejsc mykokaurem. Do pipetek nabiera się również wysięk z klatki piersiowej i krwi z serca, po czym pipetki zatapia się. Z organów mięsnych pobiera się materiał, jeżeli widoczne są w nich zmiany anatomo-patologiczne. Materiał pobrany umieszcza się w 25—30% jałowym roztworze gliceryny. Można również (za wyjątkiem wypadków podejrzanych o necrobacillozę), pobrany materiał pociąć na małe kawałki, wysuszyć w temperaturze pokojowej, po czym przesyłać już w stanie suchym do laboratorium.

Z miejsc, z których pobiera się materiał, sporządza się preparaty mazane na szkiełkach podstawowych, które utrwała się nad płomieniem. Celowym okazało się przesyłanie preparatów odciskowych (Klatschpräparate) z powierzchni wątroby i mięśni.

Wodę do badania na obecność chorobotwórczych beztlenowców pobiera się z dna danego zbiornika wraz z piaskiem i mułem do jałowych litrowych butelek.

Przy pobieraniu wody z głębszych zbiorników można się posługiwać aparatem Esmarcha, przyborem Roux lub aparatem Sklavo-Czaplewskiego.

Ziemie pobiera się z warstw powierzchniowych lub rzadziej z głębszych (za pomocą świdra Fränkla) i przesyła w szklanych banieczkach lub małych skrzynkach z dykty.

**Szelestnica.**

*Etiologia: Clostridium chauvoei.*

**Materiał do badania.**

Należy nadsyłać części chorobowo zmienionych mięśni i wycinki śledziona. Wskazane jest nadsylenie preparatów odciskowych z mięśni i z powierzchni wątroby.

**Metodyka badania:**

1. *Mikroskopowanie* preparatów odciskowych. Występują laseczki z zakręglonymi końcami, pojedyncze, czasem podwójne, rzadziej ułożone w nici. W zwłokach tworzą się

zarodniki kształtu eliptycznego, umiejscowione w środku lub w końcu laseczki. Laseczka ruchoma, otoczek nie tworzy.

2. *Wysiew na pożywki zwykłe i na płytki Zeisslera z glukozą i krwią.* Hodowlę zakładamy w warunkach beztlenowych i dla kontroli w warunkach tlenowych. Jeżeli materiał jest silnie zanieczyszczony tlenowcami, to powierzchnię mięśni i narządów polewa się spirytusem i pobiera jałowo ze środka małe wycinki tych narządów, które wysiewa się do 100-gramowych flakonów z bullonem wątrobowym. Po 36 godzinach pobiera się z tych flakonów po 7—8 cm hodowli do próbek, mikroskopuje dla orientacji i podgrzewa próbki w temperaturze 60° w ciągu 30 min. lub 75° w ciągu 20 min., celem zabicia form wegetatywnych. Z tych próbek wysiewa się materiał na pożywki dla hodowli beztlenowców. Scott radzi dodawać do płynnych pożywek dla beztlenowców 0,5% fenolu, który hamuje wzrost tlenowców, a nie przeszkadza wzrostowi Cl. Chauvoei. Po 24 godz. powinien na płytkach Zeisslera wystąpić wzrost charakterystycznych kolonii typu IV-go. Jeżeli po 24 godz. nie ma wzrostu, należy płytki przetrzymać w termostacie do 6-ciu dni. Charakterystyczne kolonie wylawia się, mikroskopuje i przesyła na pożywki dla hodowli beztlenowców. Wobec możliwości występowania form zasocjowanych, należy pasażować materiał przez kilka płytek Zeisslera.

3. *Zakażenie zwierząt doświadczalnych.* Materiałem zakaźnym i hodowlą 24-godzinną zakaża się 2 świnki morskie domięśniowo. Świnkę obserwuje się przez 6—7 dni. Zawiesina sporządzona z materiału dla zakażenia świnki winna być skoncentrowana (1:3, 1:5) i dobrze rozmieszana. Przed wstrzyknięciem podgrzewa się ją na łaźni wodnej do 70°, w ciągu 10 min. Świnka ginie po 1—2 dobach (16—36 godz.). Królik zakażony najczęściej pozostaje przy życiu lub ginie po 3—6 dniach.

**Obraz anatomo-patologiczny u zwierząt doświadczalnych.**

Sekcja świnki morskiej wykazuje w okolicy zastrzyku krwotoczne zapalenie tkanki łącznej podskórnej; mięśnie są zabarwione na brązowo lub ciemno-czerwony kolor. Na skórze występują rozlane i punkcikowate wylewy śródskórne. Skóra oddziela się z trudem od mięśni. Węzły limfatyczne są powiększone i soczyste. W okolicy pachowej występuje niewielka ilość pęcherzyków gazu. Hodowle o zmniejszonej zdolności mogą nie powodować śmierci zwierzęcia, lecz tylko owrzodzenia i martwicę skóry i mięśni w miejscu zastrzyku.