

- nom urownje bielekowego pitanja" Sb. rab. po izuczenju pit. cennosti i ispolzowanja kormowych sredstw. Wołogda 1941 r.
17. Drakin E. I.: Trudy W. I. Z. t. 18, 1950.
18. Lebjedjew I. A.: Doklady WASHNIE. wyp. 3, 1948.
19. Osjetrow P. A.: „Teoreticzeskoje obosnowanje dozy U. I. obliczenja s/ch žiwotnych". Charków 1953.
20. Seńczuk W. S.: Z Gigiena i Sanitaria nr 9, 1957.
21. Skobeljew W. P.: Swjetotechnika Nr. 6, 1956.
22. Skorochodźko A. K.: „Opyt wyraszczlwanja tlej-jat w nieotapliwajemych pomjeszczeniach pri niskich temperaturach woźducha". Kijew 1953.
23. Sołun A. S., Dancig N. M., Sokołow M. W.: Żiwotnowodstwo Nr. 4, 1958.
24. Sonikow P. M.: Wietierinarja Nr. 9, 1950.
25. Caruk G. F.: „Osobennosti rosta i njeATORYCH fizjologičeskich pokazatelej u tlej-jat mołocznoego perjoda w usłowjach zimnego i žagernego soďerżanja w lesostejpnogji zonie Ukrainy. Kand. dissertacija 1955.
26. Szarabrin I. G.: Wietierinarja Nr. 9, 1955.
27. Szarabrin I. G.: Z. Wietierinarja Nr. 11, 1958.

Adres autorki: dr inż. Romana Kleiszna, Warszawa, ul. Hoża 66/68.

### Келшня Р. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА В КОСТЯХ ЖИВЫХ ТЕЛЯТ РЕНГЕНО-ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПРОФ. И. Г. ШАРАБРИНА.

Автор с помощью переносного рентгеновского аппарата, фотооссеометра (конструкции Шарабрина) и эталона плотности (костного клина) исследовал отложение фосфорно-кальциевых солей в хвостовом позвонке у 12 телят (1-14 месячных), которых подвергали в зимнем периоде ультрафиолетовому облучению. В результате этих исследований оказалось, что содержание упомянутых солей к 1 месяцу жизни животного увеличилось почти втрое в сравнении с контрольными — на 15,8 — 21,1%. Метод Шарабрина позволяет по

автору достаточно точно определять прижизненное содержание фосфорно-кальциевых солей в костях животных.

### Kleiszna R. — Determination of Mineral change in bones of live calves by the Radiophotometric Method of prof. Szarabrin.

Prof. Szarabrin (U.S.S.R.) has worked out a radiophotometric method applied to the „summary” determination of the mineral components in mg/mm<sup>2</sup> of bones in vivo.

The method is easy in performance and permits the carrying out of long-range studies.

To carry out these studies are necessary:

1. A bone density standard (wedge taken from a long bone's hard substance),
2. Photoossemeter (an instrument constructed by Prof. Szarabrin),
3. A portable X-ray apparatus.

The course of the bone-formative process in the 5th sacral vertebra in 12 calves of black-white breed during their growth (from 1 to 14 months of age) and the effect of the ultra-violet rays received in the winter period on that process were studied by Prof. Szarabrin's method.

It was found that for the period of 13-14 months the phosphoric-calcium salt content in the 5th sacral vertebra was increased about three times proportionally to the growth of calves.

12 calves irradiated with ultra-violet rays had about 15,8-21% more mineral salts than the control (non-irradiated) group.

The experiment confirmed that the radiophotometric method of Prof. Szarabrin permits the accurate determination of the phosphoric-calcium salt content in bones of live animals.

## PRAKTYKA LABORATORYJNA

MARIE KAMIŃSKI, EUGENIUSZ GAJOS

### Niektóre zagadnienia serologii

Laboratoire d'Histophysiologie, College de France  
Kierownik: prof. JACQUES BENOIT

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych WSR Wrocław  
Kierownik: prof. dr LESŁAW OGIELSKI

Zastosowanie precypitacji dyfuzyjnej w agarze, elektroforezy oraz immunoelktroforezy do badania mięsa, produktów mięsnych lub innego materiału pochodzenia zwierzęcego umożliwia dokładniejsze niż dotychczas badanie i identyfikowanie białek zwierzęcych (6).

Tematem niniejszego artykułu są niektóre dalsze opracowania zagadnień serologii dotyczących weterynarii.

Problem gatunkowego różnicowania białek nie przedstawia obecnie większych trudności w przypadkach badania białek różnogatunkowych, pod warunkiem że nie są one zdenaturowane, tj. zachowują zdolność reagowania w odczynach serologicznych. Zastosowanie odczynu precypitacji próbkowej wg Uhlenhuta, wiązania dopełniacza, lub innych metod, pozwala odróżnić białko ludzkie od zwierzęcego oraz różnicować obcogatunkowe białka zwierzęce.

W określonych przypadkach zachodzi konieczność różnicowania białek w obrębie po-

krewnego gatunku zwierząt, np. zwierząt przeżywających lub jednokopytnych.

Wiadomo, że uodpornianie królików (lub innych zwierząt) białkami surowic krwi jakiegokolwiek zwierzęcia, powoduje wytwarzanie się przeciwciał dla białka uodporniającego oraz równocześnie dla białek pokrewnego gatunku. Powyższe reakcje, tzw. krzyżowe utrudniają różnicowanie gatunków klasycznym odczynem precypitacji próbkowej, z powodu obecności nieswoiście reagujących przeciwciał, których absorbcja lub rozcieńczenie zmniejsza ilość precypityn, nawet do zupełnego ich zaniku.

W celu różnicowania białek zwierząt blisko spokrewnionych zastosowano odczyn precypitacji dyfuzyjnej w agarze (1). Jako antygeny użyte zostały świeże surowice krwi kozy, owcy i wołu, elektroforetycznie wyosobnione białka surowic krwi (albumina i gamma-globulina), świeże mięso wymienionych zwierząt. Do wykonania odczynu precypitacji użyto króliczych surowic precypitujących

białka kozie, owcze i wołowe. Stosowane surowice odpornościowe precypitowały białka przeżuujących zwierząt domowych, natomiast nie reagowały z białkami innych gatunków zwierząt.

Badane antygeny białkowe naniesiono do agaru umieszczając je w linii prostej, tak aby tworzące się łukowate precypitaty miały możliwość zetknięcia się swymi zakończeniami. Równolegle do badanych antygenów naniesiono do agaru surowice precypitujące, które dyfundowały do agaru jednolitym, prostym frontem naprzeciw antygenów. W wyniku tak nastawionych pomiarów uzyskano dodatni wynik reakcji każdej surowicy odpornościowej z każdym z badanych antygenów, jak to zresztą wynika z założeń bliskiego pokrewieństwa białek. Różnica przejawiała się natomiast charakterystycznym zachowaniem się utworzonych precypitatów.

Stwierdzono, że białka wołowe sąsiadując w agarze z białkami kozy i owcy, tworzą ze wszystkimi użytymi surowicami precypitującymi łuki precypitacyjne przecinające — „krzyżujące” się z precypitatem kozy i owcy. Zjawisko to tłumaczy się niejednorodnością białek. Białka kozy i owcy umieszczone obok siebie w każdym przypadku tworzyły łączące się linie precypitacyjne, podkreślając tym bliskie pokrewieństwo, lub być może nawet identyczność antygenową.

W każdym doświadczeniu z pełną normalną surowicą krwi, świeżym mięsem lub wyosobnionymi frakcjami białkowymi (albumina, gamma-globulina) otrzymywano regularnie powtarzające się wyniki, tzn. białka kozy i owcy reagują jak jednorodne, zaś białka wołowe były zawsze niejednorodne.

Przedstawiony powyżej sposób różnicowania gatunkowego białek wydaje się mieć praktyczne zastosowanie, szczególnie w przypadkach badań usługowych, mniej zaś w badaniach naukowo-teoretycznych. Kilkakrotnie rozcieńczenie badanego materiału przed nastawieniem oznaczeń zmniejsza ogólną ilość białka, zachowując jednak w ilości dostatecznej do wykonania reakcji białka, takie jak albumina i globulina-gamma.

Idealnym rozwiązaniem problemu byłoby użycie swoiście reagujących surowic, precypitujących białka przeżuwaczy domowych. Z uwagi na to, że otrzymywanie takich surowic jest trudne, wydaje się możliwe stosowanie powyżej przedstawionego sposobu badań, używając do różnicowania pokrewnych białek surowice precypitujące nieswoiste w obrębie gatunku, z zastrzeżeniem że nie reagują one z białkami innych gatunków zwierząt.

Podobny problem stanowiło różnicowanie pokrewnych gatunków surowic krwi zwierząt jednokopytnych, tj. konia, osła oraz ich hybrydów — muła i osło-muła. Doświadczenia wykonane techniką elektroforezy w żelu

agarowym i na skrobi oraz immunoelektroforezy w odniesieniu do białek surowic krwi wymienionych zwierząt, nie dawały wyraźnie różnicujących wyników. Wykazywano na ogół te same frakcje białkowe w surowicach krwi badanych zwierząt z nieznacznymi tylko różnicami migracji.

Istotne różnice i podobieństwa pomiędzy omawianymi zwierzętami zaobserwowano w obrębie (zakresie) hydrolizujących enzymów — esteraz. Doświadczenia wykonano techniką elektroforezy na skrobi i na agarze. Po zakończeniu elektroforetycznych rozdziałów surowic krwi konia, osła, muła i osło-muła elektroforogramy wywołano reakcjami specyficznymi dla esteraz, jako substratów użyto: alfa-naftyl, beta-naftyl, octan indoxylu. Stwierdzono, że alfa i beta naftyl oraz indoxyl użyty do reakcji z esterazami surowic krwi konia, muła, osło-muła wykazywały obecność dwóch frakcji esteraz. Jedna z esteraz cechowała się dużą szybkością migracji oraz intensywną plamą po wybarwieniu. Druga frakcja esteraz migrowała wolniej a plama jej była mało intensywna.

W celu ustalenia umiejscowienia omawianych enzymów na elektroforogramie, wykonywano najpierw reakcje na esterazy, a następnie barwiono białka czernią amidową. W wyniku takiego postępowania ustalono, że pasmo esteraz szybkich znajdowało się tuż za albuminą, drugie pasmo esteraz uwidoczniano w strefie alfa globulin (Slow alphas).

W badanych surowicach krwi osła wykazywano obecność tylko jednej frakcji powolnie migrujących esteraz. Analogiczne wyniki uzyskano także w badaniach elektroforetycznych na agarze.

Z wykonanych badań wyciągnięto wniosek, że w surowicy krwi konia znajdują się dwie frakcje esteraz, w surowicy krwi osła tylko jedna. Krzyżówki tych zwierząt dają potomstwo pod względem esteraz przypominające konia. Na tej podstawie można odróżnić surowicę krwi osła od surowic krwi konia, muła, osło-muła.

Wyniki badań wydają się potwierdzać badania Landsteinerja, który badając zjawiska aglutynacji zwierząt jednokopytnych stwierdził nieco większe powinowactwo muła do konia niż do osła. Podobnie też badania *Nikołajczuk* wykonane z hemoglobina zwierząt jednokopytnych wykazały dwie frakcje hemoglobiny u konia i muła, a tylko jedną frakcję hemoglobiny u osła.

System esteraz badano także u kaczek rasy Pekin i Khaki, u których w każdym przypadku obserwowano tylko jedną strefę szybko migrujących esteraz. Enzymy te migrują nieco wolniej niż albumina surowicy (3). Jest rzeczą ciekawą, że o ile u zwierząt jednokopytnych każda z dwóch stwierdzonych frakcji esteraz jest jednolita, o tyle u kaczek pasmo esteraz składa się z 1—6 linii. Wahania

obejmowały ilość i nasilenie linii, brak było różnic w migracji elektroforetycznej, tj. we wszystkich badanych próbkach (400 surowic krwi kaczej), esterazy zajmowały takie samo położenie na elektroforogramie.

Poza esterazami surowic krwi kaczek badano białka surowic krwi kaczek rasy Pekin, Khaki oraz ich krzyżówek. Elektroforezą na skrobi wykazano w nich 19 frakcji białkowych, na agarze zaś do 8 frakcji. Obydwoma sposobami badań wykazywano wahania indywidualne w natężeniu poszczególnych frakcji białkowych aż do ich zupełnego braku, podobnie też w niektórych surowicach poszczególnych osobników obserwowano niejednakową szybkość migracji elektroforetycznej niektórych frakcji białkowych (3).

Inny kierunek doświadczeń obejmował badanie zmian w białkach i niektórych enzymach surowicy i pełnej krwi kaczej zachodzących w toku rozkładu. Próbki materiału pobranego jałowo przechowywano w czasie do 6 tygodni w temperaturze  $+37^{\circ}$ . W doświadczeniach stosowano technikę elektroforezy na skrobi, na agarze, immunoelektroforezy, histochemiczną technikę barwienia białek, lipoi glikoprotein, niektóre reakcje enzymatyczne (peroksydazy, esterazy).

Jak wynika z wykonanych badań, w toku przechowywania pełnej krwi i surowicy krwi kaczej zachodzą w nich zmiany przejawiające się przyspieszeniem, lub zwalnianiem szybkości migracji w polu elektrycznym poszczególnych frakcji białkowych, zmniejszaniem się ich ilości oraz zanikaniem obecności i aktywności niektórych badanych enzymów. Badając krew i surowicę krwi kaczej w trakcie rozkładu zauważono występujące analogie i rozbieżności. Tak więc stwierdzono, że prealbumina ( $\rho$ ) we krwi i surowicy kaczej przesuwają się w kierunku anody (bardziej niż w próbce kontrolnej), ze stopniowym osłabieniem natężenia tej frakcji białek. Albumina we wszystkich próbkach krwi nie wykazuje żadnej zmiany szybkości migracji, natomiast w surowicy krwi albumina przesuwają się w kierunku anody o jedną długość plamy, w czasie między 1 i 6 tygodniem przechowywania w temp.  $+37^{\circ}$ . Obserwowano też stopniowe zanikanie frakcji alfa i gamma-globulin.

W próbkach krwi między 1 i 6 tygodniem konserwacji nie wybarwiały się strefy lipoprotein, jakkolwiek w zamrożonych próbkach kontrolnych wykazywano lipoproteinową część prealbumin oraz alfa<sub>1</sub> i alfa<sub>2</sub> lipoprotein.

W próbkach surowic krwi kaczych lipoproteinową część prealbumin wykazano we wszystkich próbkach, z tym jednak, że począwszy od 2 tygodnia przechowywania wybarwiona plama jest coraz słabsza (wyczerpywanie się frakcji-zanikanie). Lipoproteiny alfa<sub>2</sub> przesuwają się w kierunku anody aż do

pozycji lipoprotein alfa<sub>1</sub>. Wybarwiona plama jest mało zwarta, dyfundująca.

Strefy glikoprotein we krwi kaczek wybarwiają się we frakcji prealbumin i alfa globulin. W miarę postępu rozkładu glikoproteiny prealbumin wybarwiają się stosunkowo słabo, lepiej natomiast w alfa-globulinie, gdzie nie zmieniają one szybkości migracji, a tylko natężenie wybarwionych plam. Glikoproteiny frakcji, prealbumin w badanych surowicach krwi wykazują wszystkie jednakowe przyspieszenie migracji w porównaniu z próbkami kontrolnymi.

Porównując immunoelektroforogramy próbek krwi kaczej kontrolnych i przechowywanych w czasie 1—3—6 tygodni stwierdzono, że precypitacja albumin występuje jeszcze po trzecim tygodniu konserwacji. Precypitaty albuminy znajdują się w tej samej odległości od rezerwuaru (miejsca startu) we wszystkich próbkach, co potwierdza wyniki elektroforezy. W obrębie alfa-globulin brak jest znaczniejszych różnic między próbką kontrolną i przechowywaną 1 tydzień w  $37^{\circ}\text{C}$ . Różnica ta pojawia się w okresie późniejszym, tj. w próbkach konserwowanych 3 i 4 tygodnie. Obserwuje się stopniowo osłabienie i zanikanie łuku precypitacji tej frakcji.

Immunoelektroforogram wybarwiony czernią amidową wykazuje obecność lipoprotein i ich precypitacji wyłącznie w próbach kontrolnych, podobnie jak to wykazano elektroforetycznie.

W badanych surowicach krwi łuk precypitacji prealbumin widoczny jest w kontroli oraz w próbach po 1, a niekiedy i po 2 tygodniu przechowywania, po czym zanika. W odniesieniu do albuminy występowało już po upływie 1 tygodnia wyraźne przyspieszenie migracji, a łuk jej precypitacji jest coraz dłuższy. Podobnie, już po 1 tygodniu globuliny-alfa<sub>1</sub> wykazują wyraźne przesunięcie w kierunku anody, przy czym w stosunku do albuminy jej pozycja jest bez zmian (tzn. w przesunięciu jest taki sam dystans). Gamma globulina ulega modyfikacji przejawiającej się stopniowym przesuwaniem się łuku precypitacji w kierunku katody, z częściowym osłabieniem natężenia precypitatów.

We krwi i surowicach kaczych badano peroksydazy w reakcji z benzydynam oraz esterazy w ich reakcjach z beta-naftolem.

W badanych próbkach krwi trudno było stwierdzić zmiany w zakresie peroksydaz, z uwagi na obecność hemoglobiny, co we wszystkich oznaczeniach dawało zawsze wynik dodatni. W próbkach surowic krwi, obecność peroksydaz reagujących z benzydynam stwierdzono jedynie w próbkach przechowywanych w czasie do trzech tygodni, z nieznacznym przyspieszeniem migracji. W próbkach przechowywanych 4, 5, 6 tygodni nie wykazywano czynności peroksydaz.

Esterazy we krwi były obecne nawet po 6 tygodniach konserwacji, chociaż aktywność ich była zmniejszona, natomiast w surowicach krwi kaczek zniknęły one prawie zupełnie już po 1 tygodniu inkubacji.

Zmiany podobne do opisanych, zachodzące w toku rozkładu surowicy krwi kaczek wykazywano także i w surowicy krwi ludzkiej (5).

Przechowywanie próbek krwi ludzkiej w temp. +37°C w czasie kilku tygodni spowodowało zmiany szybkości migracji elektroforetycznej niektórych białek (albumina migruje szybciej; siderofilina i globulina  $\beta_2A$  wolniej), analiza immunoelektroforetyczna wykazywała częściowe trawienie gamma-globuliny. Obserwowano też zmiany w obrębie esteraz i hemoglobiny.

## Piśmiennictwo

1. Kamiński M., Gajos E.: Identification immunochimique d'antigènes sériques et de viande d'animaux domestiques. Annales de Médecine Légale (w druku).
2. Kamiński M., Gajos E.: Comparative study of carboxylic esterases in sera of Horse, Donkey and their hybrids. Nature (w druku).
3. Kamiński M., Gajos E.: Etudes de serum de Canards. I. Fractionnement électrophorétique sur gel de gélose et caractérisation de fractions. II. Activité estérasiq ue des fractions en fonction de l'âge de l'animal et de la conservation de l'échantillon. XI Colloquium — Protides of the Biological Fluids, Bruges Belgium May 1963.
4. Kamiński M., Gajos E.: Modifications du sang et du serum de Canard au cours de vieillissement. (w przygotowaniu do druku).
5. Kamiński M., Gajos E.: Modifications de propriétés électrophorétiques de protéines du sang humain. Revue Française d'études cliniques et biologiques. Nr 9, tom VII, 1962.
6. Ogiński L., Gajos E.: Zagadnienia serologicznego badania mięsa i produktów mięsnych. Medycyna Wet., nr 6, 1962.

Adres autora: dr Eugeniusz Gajos, Wrocław, ul. Norwida nr 29.

## ZAGADNIENIA SPOŁECZNO-ZAWODOWE

WŁADYSŁAW LUTYŃSKI

Warszawa

### Przepisy dotyczące służby weterynaryjnej wydane w 1963 r.

#### I. Przepisy o zwalczaniu chorób u zwierząt.

1. Istotne zmiany w obowiązującym systemie prawnym dotyczącym uprawnień i obowiązków służby weterynaryjnej w zakresie zwalczania chorób odzwierzęcych wprowadziła ustawa z dnia 13 listopada 1963 r. o zwalczaniu chorób zakaźnych (Dz. U. nr 50, poz. 279). Przepisy prawne obowiązujące do czasu wydania tej ustawy nie dawały w zasadzie służbie weterynaryjnej żadnych uprawnień w zakresie zwalczania chorób odzwierzęcych, poza uprawnieniami wynikającymi z przepisów o zwalczaniu zaraźliwych chorób zwierzęcych. Nowa ustawa wprowadziła ważną zasadę, że przy zwalczaniu u zwierząt chorób odzwierzęcych objętych odpowiednim wykazem ustalonym przez Radę Ministrów należy zawsze stosować przepisy o zwalczaniu zaraźliwych chorób zwierzęcych, mimo że niektóre z tych chorób nie są zwalczane z urzędu w trybie tych przepisów. Wykaz chorób zakaźnych będących chorobami odzwierzęcymi, ogłoszony w Dzienniku Ustaw nr 58 pod poz. 314, zawiera następujące jednostki chorobowe: brucelloza, salmonelloza, grzybica woszczynowa, strzygąca i drobnozardzikowa, listerioza, włośienno-kleszczowe zapalenie mózgu i inne postaci zapalenia mózgu, nosacizna, choroba papuzia i inne ornitozy, pryszczycza, różycza, świerzby, tasiemczyce i choroby wywołane przez larwy tasiemców, toksoplazmoza, tularemia, wąglik, wścieklizna, leptospiroza.

W myśl nowych przepisów w razie wystąpienia podejrzenia u zwierząt nosacizny, wąglik, pryszczycy, różycy, wścieklizny lub świerzbu owiec i koni należy stosować dotychczasowy sposób postępowania, gdyż ustawa o chorobach zakaźnych nie narusza przepisów o zwalczaniu zaraźliwych chorób zwierzęcych. Jeżeli u zwierząt wystąpią inne choroby odzwierzęce objęte wykazem należy w myśl nowych przepisów również stosować ogólne przepisy o zwalczaniu zaraźliwych chorób zwierzęcych. W wykonaniu tego przepisu każdy lekarz wet. powinien powiadomić o podejrzeniu choroby odzwierzęcej powiatowego lekarza wet. Powiatowy lekarz

wet. powinien wdrożyć odpowiednie postępowanie administracyjne, stosując odpowiednie dla danej jednostki chorobowej środki przewidziane art. 26 przepisów o zwalczaniu zaraźliwych chorób zwierzęcych. Jedynie w razie konieczności wybicia na określonym terenie zwierząt gospodarskich chorych, podejrzanych o chorobę, lub podejrzanych o zarażenie się, zarządzenie o wybicciu powinno wydać prezydium wojewódzkiej rady narodowej na wniosek wojewódzkiego lekarza wet. zgłoszony w porozumieniu z wojewódzkim inspektorem sanitarnym. Przy ustaleniu wysokości i wypłacie odszkodowania należnego z tytułu wybicia zwierząt stosuje się również zasady określone w przepisach o zwalczaniu zaraźliwych chorób zwierzęcych, tj. w zasadzie art. 79 tych przepisów. Jak wynika z uzasadnienia do omawianej ustawy na zwalczanie w tym trybie „nowych” chorób odzwierzęcych przewidziano w budżecie na r. 1964 (fundusz epizootyczny) kwotę 1 mln zł. Ustawa wprowadza też zasadę, że pracownikom służby wet. zatrudnionym przy zwalczaniu chorób odzwierzęcych przysługuje prawo do ochrony przyznanej pracownikom państwowym w przepisach prawa karnego, a ponadto w razie zachorowania pracownika służby wet. na chorobę zakaźną pozostającą w związku przyczynowym z zatrudnieniem przy zwalczaniu tej choroby, stosunek pracy z tym pracownikiem nie może być rozwiązany bez jego zgody do czasu uzyskania zdolności do pracy, bądź uznania go za inwalidę, jednak w okresie nie przekraczającym 1 roku. Przepis ten, należący w zakresie służby wet. do przepisów prawa pracy, będzie miał również zastosowanie w razie zarażenia się pracownika brucellozą, ale tylko wówczas, jeżeli zakażenie powstało w wyniku czynności wykonanych w związku z realizacją ustawy. Art. 24 ustawy zobowiązuje ponadto ministrów Zdrowia i Opieki Społecznej oraz Rolnictwa do określenia zasad współpracy służby zdrowia i służby weterynaryjnej w zakresie zwalczania chorób odzwierzęcych.

Rozporządzenie wykonawcze Rady Ministrów do omawianej ustawy z dnia 20 grudnia 1963 r. (Dz. U. nr 58, poz. 314) wprowadziło ponadto obowiązek: