

molizynę oraz fermentowały mannitol. Wykryto 3% szczepów gronkowców koagulazododatnich, lecz pozbawionych pozostałych enzymów, 90% szczepów koagulazododatnich i jednocześnie fosfatazododatnich, 87% szczepów koagulazododatnich i jednocześnie lipazododatnich.

3. Zabiegi sanitarno-higieniczne okazały się skuteczne w walce z zakażeniami solanek zalewowych gronkowcami potencjalnie chorobotwórczymi.

Piśmiennictwo

1. Burbianka M., Pliszka A.: Mikrobiologiczne badanie produktów żywnościowych, 1963.
2. Dedié — B. M. T. W. 1961. 9.
3. Dorożkova J.: Labor. Dzieło 1965. 5.
4. Frazier W. C.: Food Microbiology. 1958. New York.
5. Gałuszka J.: Med. Wet. 1958. 8.
6. Gołębiowski St.: Med. Wet. 1958. 6.
7. Grün L.: Staphylokokken in Klinik und Praxis. 1964. Stuttgart.
8. Hauge S.: Off. Int. Epizooties. 1953. 40.
9. Kafel St.: Med. Wet. 1963. 9.
10. Kafel St.: Med. Wet. 1966. 2.
11. Lachowicz T., Romanowski T.: Ac. Microb. Pol. 1958. 1.
12. Pliszka A.: Gronkowcowe zatrucia pokarmowe. 1962. Warszawa.
13. Poszepczyński W.: Technologia przetwórstwa mięsnego. Cz. II. 1962.
14. Rosati T.: Off. Int. Epizooties. 1953. 40.
15. Sirotinina N.: Żurnal Mikrob. Epidem. i Immunologii 1962. 1.
16. Trawiński A., Trawińska J.: Higiena i przetwórstwo mięsa. 1963.

Adres autora: dr Stanisław Gołębiowski, Łódź 12, ul. Bolesława 5.

Голе́мбиовски С., Вежхоловска С., Лех Я.: **Патогенные микроорганизмы в заливном рассоле.**

Провели бактериологический контроль заливных рассолов в направлении палочек *Salmonella* и рожки свиней а также коагулазоположительных (K+) стафилококков. Образцы рассолов брали 2, 5, 9 дня после наполнения бассейнов с сырым свежим рассолом, делали посевы на среды обогащения и инфицировали белых мышей. Всего исследовали 63 пробы рассолов из 23 разных бассейнов. Палочек *Salmonella* не установлено. Палочки рожки свиней изолировали из 8,7% бассейнов и из 4,8% образцов рассолов. Коагулазоположительные стафилококки нашли в 65,2% бассейнов и в 69,8% проб рассолов. Подробному исследованию подвергли 232 штамма стафилококков разлагающих маннитол. Из этого числа образовали: коагулазу (K) — 89,7%, гемолизин (H) — 86,6%, фосфатазу (Ф) — 88,4%, липазу (Л) — 83,6% штаммов. Названные свойства наблюдали в разных ассоциациях. Штаммов которые образовали K, Г, Ф. и Л. было 77,2%. Отсутствие корреляции присутствия K. и Л. наблюдали у 12%, K. и Ф. у 10%, Ф. и Л. у 6,4% штаммов. Изолировали 3% штаммов коагулазоположительных стафилококков но не образующих других ферментов, 90% штаммов K+, и Ф., 87% штаммов K+ и Л+. Установили, что правильно проведенная дезинфекция помещений с бассейнами успешно ликвидирует инфекцию заливных рассолов коагулазоположительными положительными стафилококками.

Gołębiowski St., Wierzchołowska S., Lech J. — **Pathogenic bacteria in brine baths.**

The aim of the investigations was bacteriological examination of a brine bath. The authors looked for *Salmonella*, trichina of measles in pigs and coagulase-positive staphylococcus. Samples were taken 2,5, and 9 days after baths with product were filled with fresh brine. The samples were sown on a culture medium and also white mice were infected with them. Altogether 63 samples were taken from 23 different baths. *Salmonella* was not found. Measles was found in 8.7% of baths and 4.8% of brine samples, and coagulase-positive staphylococcus was found in 65.2% of baths and 69.8% of brine samples. 232 strains of staphylococcus isolated were more thoroughly investigated decomposing mannitol. Of this number 89.7% produced coagulase, 86.6% produced haemolysin, 88.4% phosphatase, 83.6% lipase. The above-mentioned properties occurred among the strains in various associations. 77.2% of strains possessed coagulase, haemolysin, phosphates and lipase, Absence of correlation in the occurrence of coagulase and lipase was observed in 12% of strains, of coagulase and phosphatase in 10%, and of phosphatase and lipase in 6.4%. 3% of coagulase-positive staphylococci were observed without any other enzymes. 90% of strains were simultaneously coagulase — positive and phosphatase — positive, 87% were simultaneously coagulase — positive and lipase — positive. The effectiveness of properly carried out disinfection of pickling plant in combatting coagulase-positive staphylococcus infection of brine baths was established.

Gołębiowski S., Wierzchołowska S., Lech J. — **Pathogene Mikroorganismen in der Salzlake.**

Zweck der Untersuchungen bildete die bakteriologische Überprüfung der Salzlake. Man fandete nach *Salmonellastäbchen*, *erysipelotheix rhusiopathiae* s. und Koagulasopositiven *Staphylokokken*. Die Proben wurden am 2,5 und 9 Tag nach Füllung mit frischer Salzlake das Rohmaterial enthaltender Becken, entnommen und ausgesetzt auf vermehrende Böden und infizierte weisse Mäuse. Im allgemeinen wurden 63 Proben der Salzlake aus 23 verschiedenen Becken überprüft. *Salmonellastäbchen* sind nicht festgestellt worden. *Rotlaustäbchen* aus 8,7% der Becken und 4,8% der Salzlake isoliert, dagegen Koagulasopositive *Staphylokokken* in 65,2% der Becken und 69,8% der Salzlake gefunden. Genauer wurden 232 isolierte, Mannitol zersetzende Stämme überprüft. Unter diesen erzeugten 89,7% der Stämme Koagulase, 86,6% Phosphatase und 83,6% die Lipase. Genannte Eigenschaften traten in Stämmen verschiedener Assoziationen hervor. So waren es 77,2% der Stämme mit Koagulase, haemolysinen, Phosphatase und Lipase. Mangel an Korrelation im Auftreten der Koagulase und Lipase wurde bei 12%, Koagulase und Phosphatase bei 10%, Phosphatase und Lipase bei 6,4% der Stämme beobachtet. Nachgewiesen wurde 3% der Koagulasopositiven doch der restlichen Enzyme entbehrenden *Staphylokokkenstämme*, 90% der Koagulasopositiven und gleichzeitig Phosphatasopositiven, 87% Koagulasopositiven und gleichzeitig Lipasopositiven Stämme. Wirksamkeit der richtig durchgeführten Desinfektion der Pökelräume im Kampf gegen Infizierung der Salzlake mit Koagulasopositiven *Staphylokokken* ist bestimmt worden.

EUGENIUSZ GAJOS, YVONNE LE GARREC, CHARLES PILET

Próby wykrywania pałeczek *Brucella* w tkankach zwierzęcych metodą immuno-fluorescencji

Chaire de Microbiologie, Immunologie et Pathologie générale — Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Laboratoire de recherches I.N.R.A. 94 — Alfort, France

Problem wykrywania pałeczek *Brucella* w mięsie zwierząt rzeźnych i łownych stanowi temat badań wielu autorów. Podkreślają oni znaczny odsetek zwierząt w których mięśniach i narządach wewnętrznych wykrywane są te bakterie (5, 6, 9, 15, 20, 22, 23).

Jak wiadomo, pałeczki *Brucella* odznaczają się stosunkowo powolnym wzrostem na pożywkach oraz potrzebą odpowiednich warunków hodowli. Okres ich namnażania i klasycznej diagnostyki bakteriologicznej wymaga około 3—6 dni.

W obecnym czasie coraz większe zainteresowanie pracowników laboratoryjnych budzi metoda immuno-fluorescencji (IF) pozwalająca wykrywać i diagnozować bakterie (wirusy) w czasie około 30—90 minut. Metoda ta znajduje już zastosowanie w wielu dziedzinach badań teoretycznych i praktycznych, a piśmiennictwo z tego zakresu jest bardzo bogate (2, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 19, 21, 25).

Zasadą metody immuno-fluorescencji jest odczyn serologiczny zachodzący pomiędzy poszczególnymi komórkami bakteryjnymi, lub ich skupiskami oraz swoistymi dla nich przeciwciałami „znaczonymi”, tj. połączonymi z fluorochromem. Fluorochrom jest to substancja, która pobudzona przez wiązkę światła (długość fali 300—400 Å), przetwarza otrzymaną energię, emitując światło o większej długości fali, znikające jednak po ustaniu pobudzenia. Odczynnik ten posiada zdolność łączenia się z białkami (immuno-globuliną) nie znosząc ich zdolności do reagowania w odczynach serologicznych. Wyniki badań metody IF odczytuje się w mikroskopie umożliwiającym oglądanie preparatów w ciemnym polu widzenia, zarówno w świetle białym, jak też i w ultrafioletowym. Zależnie od zdolności powiększania używanego mikroskopu możliwym jest oostrzeżenie reakcji nawet pojedynczych komórek bakteryjnych.

W niniejszej publikacji zostały przedstawione badania wykonane na temat wykrywania pałeczek *Brucella* w narządach wewnętrznych zwierząt laboratoryjnych doświadczalnie zakażonych tymi drobnoustrojami oraz w próbkach narządów bydła. Założeniem pracy były próby ustalenia możliwości adaptacji metody immuno-fluorescencyjnej do seryjnych badań diagnostycznych narządów wewnętrznych (mięsa) zwierząt rzeźnych. Mogłoby to być usprawnieniem diagnostyki bakteriologicznej nie tylko pałeczek *Brucella*, ale także odpowiednich innych drobnoustrojów, ważnych w higienie i kontroli sanitarnej mięsa oraz innych produktów spożywczych zwierzęcego pochodzenia.

MATERIAŁ I METODY

ad. 1) Przeciwciała znaczne

Surowice aglutynujące uzyskano przez uodparnianie królików domięśniowo podawanymi dawkami pałeczek *Brucella* w zawieszinie o gęstości 165 miliardów bakterii w 1 ml, z dodatkiem adjuwantu Freund. Zwierzęta otrzymywały po 12 iniekcji à 1 ml zawiesiny w ciągu 6 tygodni. Poziom aglutynin w otrzymanych surowicach wynosił 1:1280—1:2560, stwierdzany metodą aglutynacji próbowkowej.

Stwierdzono, że wyprodukowane surowice aglutynujące pałeczki *Brucella* zawierały wspomniana dla niektórych drobnoustrojów. W celu wyeliminowania wspomnianych wykonywano ich absorpcję przez świeżo przeszczepiane szczepy bakteryjne: *Salmonella para B*, *S. typhimurium*, *S. interitidis*, *S. Bellrup* Bet-

hesda, *E. coli*, *Hafnia*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* A, *Pasteurella multocida*, *P. pseudo-tuberculosis*.

Surowicę precypitującą białko królicze uzyskano przez uodparnianie kozy domięśniowo podawanymi dawkami normalnej surowicy krwi królika (12 iniekcji à 2 ml surowicy w ciągu 6 tygodni). Do badań używano surowicę precypitującą o mianie 1:1000, stwierdzone odczynem precypitacji dyfuzyjnej w agarze. Równocześnie też ustalono swoistość działania tej precypityny.

Preparaty przeciwciał aglutynujących i precypitujących znaczonych izotiocyanatem fluoresceiny (BD Merieux-Lyon) sporządzano wg techniki Coons'a (3, 4) stosując proporcję fluorochrom/gamma globulina równą 1:40. Zawartość białka w preparatach oznaczono metodą biuretową w modyfikacji Ardry (1). Nadmiar fluorochromu znajdujący się w roztworze gamma globuliny eliminowano drogą: dializy, adsorpcji na kolumnie sephadex'u G-50 (Pharmacia, Uppsala, Szwecja). Preparaty przeciwciał aglutynujących absorbowano ponadto sproszkowaną wątrobą i śledzioną myszek i szczurów białych (40), wg proporcji: 33 mg proszku 1 ml roztworu znaczonych gamma globulin. W toku znakowania pobierano próbki z poszczególnych etapów preparacji i oznaczano wysokość miana przeciwciał.

Zawiesiny bakteryjne: *B. abortus*, *B. Melitensis*, *B. suis* oraz wymienione uprzednio drobnoustroje użyte do wykonania absorpcji wspomnianych, badania wykonywano z zawiesinami poszczególnych szczepów, jak też z ich mieszaninami.

Narządy wewnętrzne:

Próbki śledziony, wątroby, węzłów chłonnych pachwinowych białych myszek rasy Swiss oraz białych szczurów rasy Wistar. Zwierzęta zakazano do otrzewno podawanymi dawkami żywych pałeczek *B. abortus* 544, w dawce 10 miliardów bakterii pro animal. W czasie 8—90 dni po zakażeniu, zwierzęta usypiano chloroformem lub eterem oraz pobierano próbki narządów do badań IF. Ze świeżo pooranych narządów sporządzano preparaty odbite lub mrożone. Preparaty utrwalano acetonem o temperaturze -10° w ciągu 5—10 minut, a następnie po odparowaniu acetonu wykonywano właściwe badanie IF.

Kontrolę w tej części doświadczenia stanowiło badanie śledziony, wątroby, węzłów chłonnych myszek i szczurów białych niezakazanych, hodowanych w zwykłych warunkach wivarium. Ponadto badano też myшки hodowane w warunkach asetycznych, tzw. „germ-free” (C_3H/k_x).

Próbki śledziony i węzłów chłonnych wołowych pobrane były w rzeźni, bezpośrednio po uboju zwierząt. W tym przypadku nie dysponowano materiałem kontrolnym.

ad 2) Metoda immuno-fluorescencji stosowana była w następujących wariantach:

a) Odczyn bezpośredni IF — na utrwalone preparaty nanoszono niewielkie ilości przeciwciał znaczonych. Całość umieszczano w komorze wilgotnej o temp. $+37^{\circ}$ na okres 30 minut, po czym płukano preparaty wodą bieżącą i buforowanym płynem fizjologicznym w ciągu 10—15 min. Po wysuszeniu pokrywano preparaty kroplą gliceryny i szkiełkiem nakrywkowym, a następnie odczytywano w mikroskopie fluorescencyjnym używając filtru BG-12, w ciemnym polu widzenia.

b) Odczyn pośredni IF — w pierwszym etapie próby na utrwalone preparaty nawarstwiano reagu-

jącą swoiście, pełną, surowicę króliczą, aglutynującą pałeczki *Brucella* (nieznaczoną). Całość pozostawiano w komorze wilgotnej o temp. $+37^{\circ}$, na okres 30 minut. Po odpłukaniu preparatów w drugim etapie próby nanoszono znaczoną izotiocyanatem fluoresceiny immuno-globulinę kozy, precypitującą białko królika. Preparaty powtórnie przetrzymywano w komorze wilgotnej i płukano według poprzedniego schematu.

c) Odczyn inhibicji (blocking test) — na utrwalone preparaty nanoszono krople nieznaczonych surowicy królika aglutynującej pałeczki *Brucella*. Po 30 minutach przetrzymywania preparatów w komorze wilgotnej, a następnie po ich odpłukaniu pokrywano je roztworem znaczonej izotiocyanatem fluoresceiny króliczej gamma globuliny aglutynującej swoiście pałeczki *Brucella*. Preparaty ponownie przenoszono do komory wilgotnej po czym płukano i suszono jak poprzednio.

Równolegle z badaniem wykonanym metodą immuno-fluorescencji, ten sam materiał analizowano: w posiewach na podłożu agarowym „Albimi”; barwieniem metodą Pick-Jacobson'a.

Wyniki

Wyprodukowane przez nas surowice aglutynujące pałeczki *Brucella* wykazywały obecność wspomnian dla szeregu bakterii. Po wykonanej absorpcji surowice te w IF reagowały dodatnio wyłącznie z pałeczkami *Brucella*. Swoistość tę sprawdzono zarówno z zawiesinami poszczególnych szczepów bakteryjnych, jak też z ich mieszaninami.

W toku preparacji przeciwciał znaczonych izotiocyanatem fluoresceiny obserwowano obniżanie się ogólnego ich poziomu. Stwierdzono np., że wyjściowe miano aglutynin 1:2560 w jednej z surowic, w końcowym stadium znakowania nie przekroczyło 1:640. Preparacja ta mogła być stosowana do IF w rozcieńczeniu do 1:40.

W trakcie znakowania przeciwciał precypitujących obserwowano około 10-krotny spadek ich poziomu. Precypityny te zarówno przed, jak i po znakowaniu reagowały swoiście i nie zachodziła konieczność wykonywania absorpcji.

Wydaje się, że obniżanie się poziomu przeciwciał w procesie ich znakowania można by tłumaczyć poddawaniem gamma globuliny odpornościowej takim manipulacjom, jak kilkakrotne wytrącanie siarczanu amonu, absorpcja przez bakterie oraz sproszkowane narządy, adsorpcja na kolumnie sephadex'u.

Większość badań na zwierzętach doświadczalnych wykonana została z użyciem śledziony, jako narządu predysponowanego do wychwytywania drobnoustrojów znajdujących się w organizmie. Ponadto, z narządu tego stosunkowo łatwo można sporządzać preparaty mikroskopowe, nie ulegające modyfikacjom w toku ich opracowywania.

Węzły chłonne okazały się dość trudne do badania IF, głównie z powodu znacznej ilości ciał tłuszczowatych znajdujących się w ich budowie. Utrwalanie preparatów acetonem z reguły powoduje zacieranie się ich obrazu.

Zaobserwowano, że wątroba także jest na-

rzędem mniej przydatnym w tego rodzaju analizie.

Po wstępnej serii doświadczeń zaniechano techniki immuno-fluorescencji pośredniej, pomimo iż jest ona uważana za bardziej czułą niż IF bezpośrednia. Główną trudność przedstawiało całkowite odpłukanie nadmiaru białka surowicy aglutynującej użytej w pierwszym etapie próby. Z tego też względu odczyn precypitacji zachodzący w drugiej części badania był bardziej ogólny i powodował dość intensywną fluorescencję całego preparatu.

W doświadczeniach nie uzyskano także inhibicji odczynu IF przez zawiesiny komórek bakteryjnych, tzn. w preparatach obserwowano fluorescencję badanych drobnoustrojów, chociaż teoretycznie wynik IF powinien być być ujemny. Metoda ta stosowana przez innych autorów (16, 24) dawała zmienne wyniki.

Metoda IF bezpośredniej okazała się najbardziej praktyczną, i ją też głównie stosowano w niniejszej pracy. Badając preparaty śledziony zwierząt doświadczalnie zakażonych pałeczkami *Brucella* obserwowano lekko fluoryzującą strukturę komórkową tego narządu, na której tle dobrze widoczne są komórki, których cytoplazma wypełniona jest sfagocytowanymi bakteriami. Komórki te odznaczają się intensywną fluorescencją. Wydaje się, że komórkami fluoryzującymi są granulocyty, posiadają one bowiem typowe dla nich jądro wielopłatowe.

Obecność bakterii w komórkach narządów może być wykazana barwieniem Pick-Jacobson'a, które barwi różnicująco bakterie i podłoże. Jest to jednak metoda nie mająca żadnej swoistości serologicznej, nie różnicująca drobnoustrojów na gramododatnie i gramoujemne. Ponadto bakterie wewnątrz-komórkowo obserwowano zarówno u zwierząt zakażonych, jak i kontrolnych.

Badając w IF preparaty odbite wołowej śledziony i węzłów chłonnych stwierdzono obecność granulocytów wypełnionych fluoryzującymi ziarnistościami, przy czym obserwowano wahania natężenia i barwy fluorescencji. Spośród próbek pobranych z 10 wołowych tusz mięsnych nie stwierdzono żadnej o wyraźnie negatywnej fluorescencji. W posiewach bakteriologicznych tego materiału nie wykazano obecności pałeczek *Brucella*. Z doświadczeń tych jednak trudno jest wyciągnąć daleko idące wnioski, gdyż w badaniach nie dysponowano materiałem kontrolnym, a skrawki śledziony i węzłów chłonnych były od zwierząt przy-
padkowych.

Jedną z zasadniczych trudności zastosowania metody IF do badania narządów wewnętrznych zwierząt doświadczalnych było praktycznie niemożliwym znalezienie zwierząt kontrolnych, tzn. takich u których reakcje IF są wyraźnie negatywne.

Według uzyskanych wyników w narządach wewnętrznych niezakażonych myszek i szczurów białych, a nawet u myszek „germ-free” w preparatach IF stwierdzano obecność komórek, wielkością i nasileniem fluorescencji zbliżonych do tej jaka cechowała granulocyty wykazywane w narządach zwierząt doświadczalnie zakażonych pałeczkami *Brucella*.

Obserwowano ponadto brak zdolności wyników badania bakteriologicznego oraz IF. W preparatach śledzimy niektórych zwierząt zakażonych wyniki IF były ujemne, natomiast w posiewach wykazywano obecność pałeczek *Brucella*. W innych przypadkach odczyn IF był dodatni, a z posiewów wyosobniono bakterie inne aniżeli *Brucella*, i te których używano do absorpcji wspólnian.

W przypadku badania zawiesin bakteryjnych uzyskiwano prawidłowe kontrole oraz wyniki wyraźnie ujemne lub dodatnie dla określonych układów: drobnoustroje — przeciwciała znaczone.

Omówienie

Metoda immuno-fluorescencji okazała się swoistą w przypadku badania zawiesin bakteryjnych. W określonych układach bakterie-przeciwciała znaczone, odróżniano tą metodą pałeczki *Brucella* od innych drobnoustrojów. Stwierdzono, że surowice aglutynujące w swej fazie wyjściowej nieswoiste względem odpowiednich bakterii, mogą stracić wspólnianą w wyniku stosowanej absorpcji.

W przypadku badania śledzimy na obecność pałeczek *Brucella* uzyskane wyniki nie były zadawalające. Zarówno bowiem w materiale pochodzącym od zwierząt zdrowych, jak też i od zwierząt zakażonych obserwowano obecność komórek fluoryzujących bez wyraźnych cech różnicujących.

Podobnie jak wielu innych autorów (3, 10, 12, 17) stwierdzono, że w przypadku badania bakterii w tkankach zwierzęcych metodą IF wykazuje brak swoistości, który można tłumaczyć tym że:

a) w toku znakowania przeciwciał zachodzi częściowa denaturacja białek, które mogą wytrącać się nieswoiście bez reakcji serologicznych;

b) istnieje pokrewieństwo antygenowe oraz reakcje krzyżowe bakterii; możliwość absorpcji jednej surowicy odpornościowej (eliminowanie wspólnian) jest ograniczona, a zatem jedna preparacja przeciwciał znaczonych może być swoista tylko w określonym zakresie;

c) w odczynach serologicznych mniej czułych niż IF, nieznaczny stopień nieswoistości surowic odpornościowych nie odgrywa większej roli; w immuno-fluorescencji, która jest metodą bardzo czułą wkraczającą w zakres serologii mikroskopowej fakt ten odgrywa zasadniczą rolę;

Zastosowanie metody immuno-fluorescencji do badania narządów wewnętrznych zwierząt doświadczalnych w aspekcie adaptacji tej metody do seryjnych analiz narządów zwierząt rzeźnych w odniesieniu do brucellozy wydaje się być przedwczesne i wymagające dalszych badań dotyczących głównie wyprodukowania odpowiednich surowic diagnostycznych, ustalenia materiału kontrolnego i standardów przeciwciał znaczonych. Na obecnym etapie rozwoju, metoda IF nastęrcza wiele trudności, nawet w badaniu zwierząt doświadczalnych. Należy przypuszczać, że w przypadku analiz materiału niewiadomego pochodzenia, będącego w różnym stanie świeżości i w różnym stanie bakteriologicznym, trudności te jeszcze wzrosną.

Wnioski

1) W przypadku badania zawiesin bakteryjnych metoda immuno-fluorescencji może dać regularne i powtarzające się wyniki.

2) W przypadku wykrywania pałeczek *Brucella* w tkankach zwierzęcych metoda powyższa nastęrcza szereg trudności, a przede wszystkim nie jest swoistą.

3) Pomimo bezsprzecznie wielu dodatknych cech metody IF, praktyczne jej zastosowanie w seryjnych analizach zwierzęcych narządów wewnętrznych (mięsa) wydaje się być kwestią otwartą i jak dotychczas, nie przekraczającą zakresu badań doświadczalnych.

Piśmiennictwo

1. Ardry R.: Dosage des protéines par la réaction du biuret; détermination d'un coefficient spécifique d'absorption. Ann. Biol. Clin. 1960, 18, 214.
2. Biegeleisen J. Z., Moody M. D., Marcus B. B., Flynt J. W.: The use of fluorescein-labeled anti-*Brucella* suis globulin for demonstrating *Brucella* antigen in animal tissues. Amer. J. Vet. Res. 1962, 23, 592.
3. Coons A. H., Kaplan M. H.: Localization of antigen in tissue cells. J. Exptl. Med. 1950, 91, 1.
4. Coons A. H., Leduc E. H., Connolly J. M.: Studies on antibody production. J. Exptl. Med. 1955, 102, 49.
5. Entel H. J.: *Brucella* Bacterien in Fleisch und Fleisch-herzeugnissen. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1959, 72, 461.
6. Galanis N.: Contribution à l'étude de la Brucellose bovine en inspection des viandes. Bull. Acad. Vet. 1959, No 10, 695.
7. Goldstein G., Slizys I. S., Chase M. W.: Studies on fluorescent antibody staining. J. Exptl. Med. 1961, 114, 89.
8. Grundboeck M.: Metoda przeciwciał fluoryzujących i jej zastosowanie w medycynie weterynaryjnej. Med. Wet. 1964, 20, 36.
9. Hay J.: Brucelloza u zwierząt w Polsce. Med. Wet. 1960, 10, 577.
10. Janney G. G., Berman D. T.: Staining intracellular *Brucella* organisms by means of fluorescent antibodies. Amer. J. Vet. Res. 1962, 23, 596.
11. Jentsch K. D.: Nachweis von Brucellen mit fluoreszierenden Antikörpern. Arch. Exp. Vet. Med. 1963, 17, 921.
12. Jentsch K. D.: Nachweis von Brucellen mit fluoreszierenden Antikörpern. Arch. Exp. Vet. Med. 1964, 18, 967.
13. Kristow N. P., Woronowa E. A., Pieskowa W. A.: Primiowanie fluorescencyjnych antyciał dla wydzielenia *Brucell*. Sbornik Naučných Rabot L.N.I.W.I. 1965, 11, 58.
14. Lafaix Ch.: Application de l'immuno-fluorescence au diagnostic bactériologique et sérologique de la coqueluche. Praca doktorska 1964 — Paris.
15. Leresche E., Despres P., Valette H.: Quelques aspects des Brucelloses dans l'inspection des viandes. Schw. Arch. Tierheilk. 1957, 99, 440.
16. Moody M. D., Goldman M., Thomason B. M.: Staining bacterial smears with fluorescent antibody. J. Bact. 1956, 72, 357.
17. Ovinnikov N. M.: An appraisal of the fluorescent antibody method in gonorrhoea. Bull. Org. Mond. Santé, 1963, 29, 761.

18. Pilet Ch., Le Garrac Y.: Controle sur petits animaux de laboratoire du pouvoir immunogène des vaccins anti-brucelliques inactifs. Ann. Inst. Past. Paris 1961, 104, 35.
19. Pomales-Lebron A., Stinebring W. P.: Intracellular multiplication of *Brucella abortus* in normal and immune mononuclear. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 1957, 94, 78.
20. Prost E.: Zagadnienie brucellozy w higienie produktów zwierzęcych. Med. Wet. 1963, 19, 310.
21. Saurat P., Chantal J.: L'immunofluorescence. Rev. Med. Vet. (Lyon) 1966, 117 (3), 217.
22. Schaal E.: Recherches quantitatives sur la présence de *Brucella abortus* dans le pis et les ganglions des animaux destinés à la boucherie. Die Fleischwirtschaft 1960, 8, 630.
23. Simintzis G., Thiovolet T.: Diagnostic sérologique de la Brucellose bovine par la méthode des anticorps fluorescents. Rec. Méd. Vet. Alfort 1965, 144, 35.
24. Thomason B. M., Moody M. D., Goldman M.: Staining bacterial smears with fluor scent antibody. J. Bact. 1956, 72, 362.
25. Wolf P. L., Pearson B., Rosenblatt M., Vazquez J., Jarkowski T.: A rapid method to diminish nonspecific reactions in immunofluorescence. Amer. J. Clin. Path. 1965, 43, 47.

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JERZY MORSTIN

Organizacja inseminacji i utrzymanie buhajów w eksperymentującym Zakładzie Unasieniania Bydła w L'Aigle (Francja)

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki w Krakowie
Kierownik: prof. dr W. BIELAŃSKI

Zakład Sztucznego Unasieniania bydła w L'Aigle (CIA) podlega Międzydepartamentalnej Spółdzielni Sztucznego Unasieniania i Ulepszenia Rasy Normandzkiej. Zakład użytkowuje wyłącznie buhaje rasy normandzkiej. Zwierzęta, utrzymywane w dobrych warunkach higienicznych są bardzo dobrej kondycji.

W ciekawy i ekonomiczny sposób, według pomysłu R. Cassou, rozwiązano problem pomieszczeń dla buhajów. Przez cały rok zwierzęta trzymane są na wolnym powietrzu, każde w osobnym namiocie z wybiegiem. Szkielet namiotu w formie połowy kopuły skonstruowany jest z rurek metalowych i pokryty materiałem ze sztucznego tworzywa. W zależności od wiatru czy deszczu, namiot może być łatwo przestawiony w dowolnym kierunku. Wybieg w kształcie elipsy o powierzchni ok. 12 m² otoczony jest przewodem elektrycznym pod napięciem o słabej mocy. Podłoga wybiegu wyłożona jest masą bitumiczną, dla izolacji przed wilgocią. Na legowisku buhaja pod namiotem codziennie zmienia się słomę. Zalety tego typu pomieszczeń dla buhajów są bardzo duże: stosunkowo mały koszt konstrukcji, jej lekkość i łatwość transportu oraz skuteczna ochrona buhaja od wiatru, deszczu i słońca.

Pielegnacja zwierząt jest bardzo staranna: codziennie są one czyszczone, a mniej więcej raz na tydzień myte w specjalnie do tego celu przystosowanym pomieszczeniu. Do wody dodawany jest środek chemiczny bardzo silnie pieniący się i mający właściwości dezynfekujące. Racice buhajów utrzymywane są w stanie nienagannym.

Zywienie buhajów jest intensywne: dziennie otrzymują 3 kg koncentratu mieszanki treściwej i 8 kg siana. W lecie część siana zastępuje się niewielką ilością zielonki — (przy dużej ilości skarmiania zielonki stwierdzono ujemny wpływ na jakość nasienia). Dzienna dawka paszy jednego buhaja zawiera ok. 1.200 g. białka og. str. Wodę do picia podaje się w ograniczonym. Zwierzęta poiją się bezpośrednio przed karmieniem.

Bardzo dużą uwagę zwraca się na codzienny ruch zwierząt. Spacer odbywa się na bieżni, porośniętej trawą, w sposób bardzo oryginalny: pracownik dosiada konia, prowadząc buhaja za kółko nosowe na kilkumetrowej linie, której długość reguluje w miarę potrzeby. Spacer każdego buhaja trwa 15 min. Po kilku pierwszych minutach stępa, jeździec zmusza buhaja do galopowania (ok. 300 m). Buhaje ciężkie (o wadze wyższej niż

1.200 kg) i starsze prowadzone są w ręce. Opisany wyżej sposób dozowania ruchu świadczy o łagodnym charakterze zwierząt, co niewątpliwie związane jest z cechą rasy, lecz również jest rezultatem dobrego traktowania zwierząt. Przy obsłudze i pielęgnacji 72 buhajów w L'Aigle zatrudnionych jest 11 pracowników fizycznych.

Obowiązujące we Francji przepisy wymagają, aby buhaje przeznaczone do sztucznego unasieniania miały sprawdzoną wartość produkcyjną, nie miały wad dziedzicznych, ani wad budowy oraz były wolne od chorób zakaźnych. Nad stroną sanitarno-weterynaryjną Zakładu czuwa Instytut Weterynarii w Paryżu. W przypadku choroby wzywany jest wolnopraktykujący lekarz wet.

Młode buhaje wyceniane są na podstawie użyteczności potomstwa. W ciągu ok. 3 miesięcy pobiera się nasienie, którym zapładnia się 300—400 krów. Buhaj może być użyty do masowej produkcji po uzyskaniu ceny dodatniej.

Pobieranie nasienia od buhajów używanych do produkcji odbywa się trzy razy tygodniowo. Dla każdego buhaja ułożony jest indywidualny plan pobierania nasienia, ustalający ewentualne dłuższe przerwy w pobieraniu. W zależności od zapotrzebowania nasienia i indywidualnych właściwości buhaja, przerwy wynoszą 3—7 dni. Każdorazowo pobiera się po 2 ejakulatory. Pobieranie nasienia odbywa się na ciekawie skonstruowanym, ruchomym manekinie. Manekin ustawiony jest na podwoziu na małych kółkach pneumatycznych. Z przodu zaczyna się linę, która nawijając się na bęben, napędzany silnikiem elektrycznym, ciągnie fantom. Manekin obsługiwany jest przez dwóch pracowników. Jeden, siedzi pod manekinem i trzymając pochwę u wylotu otworu do wprowadzenia prącia — pobiera nasienie, drugi, stojąc z przodu fantomu, hamuje wózek w czasie kopulacji buhaja. Po oddaniu nasienia, lina, nawijająca się na bęben, wyciąga manekin spod buhaja. Miałem możliwość przekonać się, że urządzenie to działa sprawnie i szybko. Dla nielicznych buhajów (tylko 5 na 72), które nie chcą oddawać nasienia na manekinach, używa się jako podkładki woła. Woła stawia się na środku manezu bez poskromu. Trzyma go jedynie pracownik. Bezpośrednio po oddaniu przez buhaja nasienia, wół zostaje wyprowadzony spod niego. Według opinii fachowców z L'Aigle, stosowanie poskromu jest niewskazane, zarówno dla