

jak wzmożony ruch gospodarczy, obrót zwierzętami itp., a wydaje się on przynajmniej w naszych warunkach jak gdyby związany z przebiegiem temperatury. Wrażenie to potęguje świadomość, że daty urzędowego stwierdzenia pomoru były i są jeszcze dość znacznie odległe od dat wystąpienia pierwszych objawów choroby, a tym bardziej od chwili inwazji wirusa pomoru.

Mechanizm oddziaływania szkodliwych temperatur na organizm świni nie został jeszcze dostatecznie poznany. Zjawisko to można tłumaczyć teorią Selyego, zgodnie z którą zarówno wysokie, jak i niskie temperatury wywołują ujemny wpływ na mechanizm obronny organizmu, poprzez zmiany w układzie przysadkowo-nadnerczowym. W warunkach naturalnych ujemny wpływ wysokich temperatur na organizm, szczególnie u takiego gatunku zwierzęcia, jak świnia, jest daleko częstszy aniżeli temperatur niskich, przed którymi wydatną ochronę stanowią pomieszczenia. Ujemny wpływ zimna na organizm świń jest jednak niewątpliwy i zo-

stał potwierdzony również u nas eksperymentalnie (1).

Wszechstronne zbadanie problemów związanych z wpływem warunków atmosferycznych na organizm zwierzęcy mieć będzie niewątpliwie duże znaczenie praktyczne. Już samo poznanie sezonowości pomoru świń i wprowadzenie określonych terminów szczepień zapobiegawczych dało wyniki, które dowodzą, że oprócz dobrych szczepionek i odpowiedniej organizacji pracy, konieczne jest głębsze poznanie ekologii chorób zakaźnych.

Piśmiennictwo:

1. Kaszubkiewicz Cz.: Med. Wet. 1962, 19, Nr 6, 295.
2. Kamphaus S.: Die Blauenhefte, Marburg — L. 162, Nr 2, 10.
3. Oberfeld H., Samól S.: Bull. Off. Epiz. 1961, 56, str. 329.
4. Samól S.: Med. Wet. 1949, 15 Nr 3, 140.
5. Samól S.: Med. Wet. 17, Nr 8, 449.
6. Stryszak A.: Epizootologia Ogólna PWRL, Warszawa, 1961.
7. Wiszniewski W.: Przegl. Geofizyczny 1960, 5 (13), Nr 1, 31.
8. Wiszniewski W.: Konsultacje ustne.

Adres autora: dr Stefan Samól, Warszawa, ul. Opoczyńska 6 m 3.

FELIKS ANCZYKOWSKI

W sprawie wytwarzania szczepionki 19 do uodporniania bydła przeciw brucelozie

Z Zakładu Chorób Bydła Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: doc. dr FELIKS ANCZYKOWSKI

Szczepionka 19 zawiera, jak wiadomo, żywe brucele, które u odpornianego zwierzęcia powodują lekką postać czynnej brucelozy. Z reguły kończy się ona wyzdrowieniem, ale zwierzę nabywa tą drogą odporność swoistą, która w większości przypadków chroni je przed zakażeniem zjadliwym szczepem terenowym. Podanie zwierzęciu bruceli nieżywych, względnie zabitych stanowi niewystarczający bodziec do wywołania pożądanej odporności.

Skuteczność szczepionki zależy od żywotności i jednorodności populacji bruceli, znajdującej się w dawce uodporniającej. Brucele należą jednak do grupy drobnoustrojów, które cechuje duża zmienność i wrażliwość na niesprzyjające warunki otoczenia; łatwo dochodzi do zmian dysocjacyjnych, i w nieodpowiednich warunkach owe bakterie zamierają. W tych okolicznościach maleje oczywiście skuteczność uodporniającego preparatu. Dlatego szczepionka 19 jest kłopotliwa zarówno dla zakładu, który ją wytwarza, dla organów kontrolujących jej wartość, jak i dla terenowej służby weterynaryjnej, która ją stosuje w masowym uodpornianiu bydła przeciw brucelozie.

W niniejszym doniesieniu zamierzono krytycznie omówić podstawowe składniki szczepionki 19, niektóre szczegóły techniki jej

przyrządzania, i wysunąć własne sugestie co do pewnych zmian w oparciu o wyniki badań własnych, bądź uwypuklić tematykę prac, które należałoby podjąć dla potwierdzenia lub odrzucenia nasuwających się hipotez.

1. Wybór szczepu produkcyjnego

W naszych warunkach aktualnie nie ma uzasadnionej potrzeby zamiany szczepu Buck-19 na ewentualnie inny szczep, i podejmowanie w tym kierunku jakichkolwiek prac badawczych byłoby zgoła niewskazane. W problemie brucelozy naszego kraju istnieją bowiem daleko ważniejsze i pilne zagadnienia, które się powinno doświadczalnie rozstrzygnąć, bądź opracować w postaci syntez, i jako gotowe recepty przekazać do wykorzystania w terenie (12).

2. Przechowywanie szczepu produkcyjnego

Najdoskonalszą metodą przechowywania szczepu produkcyjnego jest utrzymanie go w stanie zliofilizowanym. Ale i ta forma przechowywania wymaga pewnej specjalistycznej zapobiegliwości; nawet drobne odchylenie w sporządzaniu zawiesiny podlegającej wysuszeniu w stanie zamrożenia, jak również nieznaczne zdawałoby się błędy techniczne w samej liofilizacji wpływają nierzadko wydat-

nie na jakość i trwałość liofilizatu. Zasadniczym warunkiem udania się liofilizacji jest sporządzenie zawiesiny o pełnej jednorodnej żywotności.

Jednym z najczęściej spotykanych błędów technicznych jest uszkodzenie bruceli mechanicznie wskutek obijania bakterii o ścianę naczynia, zwłaszcza w czasie splukiwania wraz z perełkami szklanymi (*Drimmelen* — 13, 15; *Anczykowski* — 3, 4). Niżej przytoczone wyniki doświadczenia ilustrują ujemny wpływ na żywotność zbyt energicznego zmywania spluczyny.

Hodowlę 48-godziną szczepu 19 na agarze skośnym splukano ostrożnie za pomocą odżywczej wody peptonowej, do której nie dodano płynu buforowego (3, 4) i wysiano na butelki Roux. Po upływie 72 godzin splukano hodowlę odżywczą wodą peptonową wraz z perełkami szklanymi w ten sposób, że całą partię butelek podzielono na 2 grupy; jedną część butelek (A) splukiwano w dotychczasowy sposób, zaś drugą część butelek (B) zmywano ostrożnie — ruchami przypominającymi odsiewanie przez sito — unikając obijania bakterii o ściany butelek. Otrzymałe spluczyny sprawdzono na czystość i zlano do dwóch kolb; zawiesinę z butelek grupy (A) zlewano bez szczególnych ostrożności, natomiast zawiesinę z butelek grupy B — ostrożnie po ścianie kolby. Z kolei każdą zawiesinę A i B rozdzielono do 3 mniejszych kolb i dodano rozpuszczony w odżywczej wodzie peptonowej TTC w takiej ilości, aby ostateczne stężenie TTC w zawieszynie wynosiło 1:500. Dalsze postępowanie było analogiczne, jak przy sporządzaniu standaryzowanej zawiesiny do aglutynacji (5—11). Uzyskane wyniki ilustruje tabela 1.

Tab. 1. Intensywność barwy (w stopniach ekstynkcji) 0,5 Vol. % zawiesiny sprawdzano za pomocą fotokolorymetru Pulfricha

Splukiwano hodowlę w zwykły sposób (zawiesina A)	Splukiwano hodowlę ostrożnie (zawiesina B)
1,51	1,80
1,56	1,77
1,33	1,89
średnio: 1,47	1,82

Stwierdzono około 0,2 razy słabsze zabarwienie zawiesiny, z którą postępowano zbyt mało ostrożnie, co odpowiada o tyle samo spadkowi żywotności danej populacji bakterii. Okazało się mianowicie, że intensywność redukcji TTC stanowi wykładnik żywotności tych bakterii, a przynajmniej aktywności metabolicznej. Nadto zawiesina A wypadła dodatnio w próbie wirowania (?). Oznacza to, że część drobnoustrojów zawiesiny zredukowała TTC słabo lub nie zredukowała zupełnie, ponieważ brucele były nieżywe. Innymi słowy, wskutek posługiwania się mniej ostrożną techniką splukiwania część bakterii została uszkodzona, a w pewnym odsetku wręcz zabita.

Dlatego zbyt energiczne splukiwanie hodowli połączone z obijaniem bakterii o ściany naczyń należy traktować jako swego ro-

dzaju błąd w sztuce. Również nie powinno się zlewać zawiesiny z dużej wysokości na dno naczyń; należy ją zlewać po ścianie kolby, albo za pomocą lejka z długim odprowadzeniem (*Drimmelen* — 14, 15, 16; *Anczykowski* — 4). Wydaje się niepożądane nawet gwałtowne wciąganie zawiesiny do pipety. Powinno się pilnie zwracać uwagę, aby przed użyciem były ostudzone opalane pipety, szyjki kolb, wyloty cylindrów itp. (4). Osłabia żywotność zawiesiny światło dzienne pomieszczeń laboratoryjnych, zwłaszcza w dniu słoneczne. Można zmniejszyć ów wpływ i ujednolicić warunki świetlne w laboratorium przez wymianę szyb przezroczystych na zielone (4). Fizjologiczny roztwór soli kuchennej należy całkowicie wykluczyć z procedury przygotowywania żywotnej zawiesiny bruceli (3, 4). Do przygotowania podłoża używa się wody przekrojonej podwójnie i za pomocą szklanych destylatorów; domieszka metali w wodzie destylowanej oddziałuje dysgenetycznie na brucele (*Drimmelen* — 14). Wszelkie szkło używane do hodowli, do sporządzania zawiesiny, jak również do liofilizacji — musi być obojętne. Naczynia muszą odpowiadać wymogom pod względem kształtu: np. zbyt duże różnice w grubości warstwy podłoża, jak to ma miejsce w butelkach Roux o wklęsłych do wewnątrz ścianach, podobnie zresztą jak i na płytkach Petriego, dają rozmaity pod względem obfitości wzrost, i można się wtedy również liczyć z niejednorodnym składem populacji bakterii pod względem żywotności i właściwości antygenowych (4). Okazało się wadliwe zamykanie naczyń korkami z waty (*Romvary* i *Prohaszka* — 21); wata zawiera nienasycone kwasy tłuszczowe (kwas olejowy, kwas linolenowy), które przedostają się do podłoża po skropleniu się pary w toku wyjalawiania i wpływają hamująco na wzrost bruceli. Zamiast waty powinno się używać ligniny. Za szkodliwe uważać trzeba hodowanie zarazków, bądź manipulowanie żywymi brucelami w pomieszczeniach, w których znajduje się ozon (posługiwanie się lampami kwarcowymi do odkażania pomieszczeń); ozon nie tylko niszczy drobnoustroje, ale również stymuluje niepożądaną zmienność szczepu produkcyjnego. Podobne zastrzeżenia można mieć do rozpylania środków odkażających w powietrzu. Zamiast stosować tego rodzaju odkażanie powinno się położyć duży nacisk na techniczną czystość. W ogóle należy przyjąć jako zasadę, że w danym wypadku zarazek musi być wręcz pielęgnowany — trzeba go chronić w miarę możliwości przed wszelkimi wpływami zarówno niszczącymi go, jak i obniżającymi żywotność bruceli, bądź sprzyjającymi niepożądaną zmienności mutacyjnej i dysocjacyjnej.

Duże znaczenie ma wiek hodowli, z której sporządza się spluczynę. Moim zdaniem do

liofilizacji powinno się używać 48-godzinnej hodowli szczepu 19.

Spadek ilości żywych bakterii w jednostce wagi lub objętości w następstwie liofilizacji przypisywano dotychczas głównie wpływowi jakości samego aparatu liofilizacyjnego oraz zawieszalnika. Z powyżej przytoczonych faktów wynika, że jakość liofilizatu zależy również i w dużym stopniu od żywotności i jednorodności spłuczyny, którą się liofilizuje. Mieszanina żywotnych, osłabionych i martwych bruceli reprezentuje każdorazowo układ, który w ogóle przesądza o ilości żywych zarzązków tuż po zakończeniu procedury liofilizacji, i przypuszczalnie ma wpływ na przeżywalność bruceli w czasie przechowywania liofilizatu. Nie można także wykluczyć ewentualności, że podobne błędy techniczne sprzyjają zmienności (antygenowej i dysocjacyjnej) bruceli ocalałych.

W dotychczas obowiązujących instrukcjach wytwarzania szczepionki 19 nie przewidziano właściwej kontroli zawiesiny na żywotność ani przed, ani po liofilizacji. Przeżywalność bruceli w procesie liofilizacji, jak i w okresie przechowywania liofilizatu sprawdza się metodą płytkową. Ta metoda nie odzwierciedla bezpośrednio i plastycznie wahań w żywotności zawiesiny. Wydaje się uzasadnione zalecić następujący sposób postępowania:

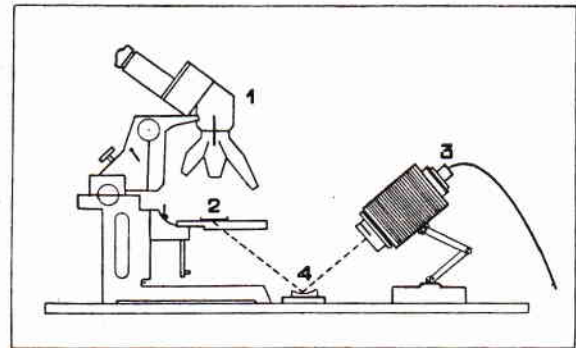
Do świeżo otrzymanej zawiesiny o gęstości 15 Vol⁰/₀ (gęstość ustala się za pomocą wirowania w probówkach Hopkinsa-Fitcha) dodaje się jałowego roztworu TTC 1:125 w takiej ilości, aby ostateczne stężenie chlorku tetrazolu wynosiło 1:500. Bardziej szczegółowe wskazówki znajdują zainteresowani w oddosnej publikacji (6). Po ostrożnym wymieszaniu wstawia się materiał do cieplarki (37°C) na 4 godziny. Co godzinę miesza się zawiesinę dla usprawnienia wymiany gazowej. Następnie zabija się zawiesinę w łaźni wodnej o t° 65°C przez 1/2 godziny, odwirowuje przez 75 minut przy około 2750 obr./min. i sprawdza osad. Niejednorodnej barwy osad uformowany w postaci pierścieni świadczy, iż użyto do liofilizacji zawiesinę niejednorodną pod względem żywotności. Prócz tego można sprawdzić intensywność barwy zawiesiny fotokolorymetrycznie; w odczynie wizualnym na fotokolorymetrze Pulfricha powinno się otrzymać wartość $2,0 \pm 0,4$ (10).

Oprócz dużej i wyrównanej żywotności, przeznaczona do liofilizacji populacja szczepu 19 musi czynić zadość wymogom kontroli na zmienność dysocjacyjną. Moim zdaniem jest niesłuszne domaganie się, aby zarówno do liofilizacji, jak i do produkcji poszczególnych serii szczepionki były używane populacje złożone wyłącznie z form *S sensu stricto*. Jest to stanowisko teoretyczne — w praktyce nieosiągalne; chodzi tu raczej o wykluczenie

formy M i R. Służą ku temu następujące metody.

Metoda Henry'ego (Henry — 17; Stableforth — 22). Na płytce Petriego o równej (nie wklęsłej do wewnątrz) powierzchni wylewa się cienką warstwę agaru glicerynowego z dodatkiem glukozy. W naszych warunkach wystarczające wyniki otrzymuje się z klarownym agarem ziemniaczanym. Odpowiednio rozrzedzoną zawiesinę rozprowadza się równomiernie na powierzchni agaru i hoduje przez 4 dni w temp. 37°C. Wyrosłe kolonie ogląda się w nieco zmieniony sposób pod lupą, której powiększenie wynosi około 15 razy. Mianowicie wyjmuje się lusterko z uchwytu i wklęsłą powierzchnią ku górze umieszcza się je przed lupą w odległości około 10 cm. Na lustro skierowuje się snop światła z lampy mikroskopowej oddalonej o około 15 cm od lusterka. W tych warunkach odbite od powierzchni lusterka promienie padają od spodu lupy na płytkę pod kątem około 45° (patrz schemat Nr 1).

SZKIC GRAFICZNY TECHNIKI BADANIA W KIERUNKU ZMIAN DYSOCJACYJNYCH PRZ. BRUCELLA



OBJAŚNIENIE: 1. POWIĘKSZENIE W LUPIE
2. HODOWLA NA PŁYTKCE
3. LAMPA MIKROSKOPOWA
4. ZWIERCIADŁO WKŁĘSŁE

Kolonie gładkie są z reguły mniejsze, barwy niebieskawej lub zielonkawej. Kolonie szorstkie są jaśniejsze i matowe, o powierzchni drobnoziarnistej. W wielu przypadkach jest zmieniona tylko część kolonii w postaci wycinka koła, co szczególnie wyraźnie rzuca się w oczy w miejscach bardziej gęstego wzrostu na płytce. Oczywiście spotyka się również szereg kolonii pośrednich.

Oryginalna metoda Henry'ego nie jest zbyt czuła. W szczególności nie łatwo jest wyszukać kolonie zmienione śluzowato. Znacznie czulsza i wygodniejsza w praktyce okazała się metoda Henry'ego zmodyfikowana przez White'a i Wilsona (23), która polega na tym, że 96-godz. hodowlę bruceli na płytce Petriego zalewa się dość obficie na 15 sekund wodnym roztworem 1:2000 fioletu krystalicznego, po czym zlewa się barwnik do naczynia zawierającego środek odkażający i ogląda płytkę pod lupą, jak w oryginalnej metodzie Henry'ego.

Kolonie gładkie są niebiesko-zielone aż do głębi fioletowej; kolonie R — niebiesko-czerwone; natomiast kolonie M wykazują ziarnistość barwy ceglastej albo ceglasto-czerwonej. Jeśli na płytce znajdują się kolonie S lub R, otaczające je podłoże wykazuje

barwę jasno-fioletową; ale przy obecności M, cała powierzchnia podłoża bywa jaśniejsza z odcieniem żółtawym.

Otrzymane populacje wyselekcjonowanych kolonii można ponadto sprawdzić za pomocą termoaglutynacji i w próbie z akryflawiną (11).

Do termoaglutynacji używa się spluczynę z 4-dniowej hodowli. Gęstość spluczyny powinna wynosić 10 Vol%. Odmierzoną porcję zawiesiny gotuje się w probówce bakteriologicznej przez 2 godz. w łaźni wodnej. Wynik odczytuje się niebawem po zakończeniu gotowania i po raz drugi następnego dnia po przetrzymaniu materiału w t° pokojowej. W pierwszym odczycie bierze się pod uwagę tylko obecność lub brak osadu na dnie probówki, zaś w drugim — zarówno intensywność wypadania bakterii na dno probówki, jak i występowanie pierścieniowatego wyjaśnienia zawiesiny od góry. W probówkach, w których wynik uznano za ujemny, pierścieniowate wyjaśnienie zaznacza się w znikomym stopniu lub nie występuje zupełnie, i nie stwierdza się osadu na dnie probówek. Ocenę przeprowadza się wg skali od minusa (—) do czterech plusów (++++).

Odczyn z akryflawiną nastawia się również z 10 Vol% zawiesiną w ogólnie przyjęty sposób. Wyniki odczytuje się również dwukrotnie — zaraz po wycięciu z ciepłarki, a następnie po przetrzymaniu prób w t° pokojowej do następnego dnia. W ocenie stosuje się skalę od minusa (—) do czterech plusów (++++) (11).

Przy okazji wydaje się słuszne wysunąć za potrzebowanie pod adresem krajowego przemysłu; na rynku jest brak tabletkowanej akryflawiny. Sprawia to zbędny kłopot odważania akryflawiny przy sporządzaniu każdorazowo świeżego roztworu. Obecnie niektóre laboratoria sprowadzają takie tabletki z zagranicy.

Wskazane jest posługiwanie się termoaglutynacją i odczynem z akryflawiną jednocześnie; obie próby nawzajem się uzupełniają (11). Stwierdzono, że są to na ogół próby czulsze aniżeli płytkowe metody kontroli, nie wyłączając próby Henry'ego zmodyfikowanej przez White'a i Wilsona. W próbie płytkowej należałoby przyjąć, że wskaźnik ilościowy dysocjacji *) nie powinien przekraczać wartości 1, zaś 1+ w odczynie termoaglutynacji lub z akryflawiną powinien stanowić podstawę do wykluczenia zawiesiny szczepu standardowego z liofilizacji.

*) Wskaźnik jakościowy dysocjacji oznacza odsetkową zawartość kolonii poszczególnych form zdysocjowanych — form M lub R — natomiast wskaźnik ilościowy dysocjacji przedstawia sumaryczną odsetkową ilość wszystkich form zdysocjowanych (M i R) — względem form uznawanych praktycznie za gładkie, bez względu na to czy są to formy S, czy też formy przejściowe, ale nie dające się zaszeregować do form M lub R na podstawie prób kontrolnych w kierunku zmienności dysocjacyjnej.

W ten sposób, jeśli jest nam znana żywotność zawiesiny, oraz jej współczynnik ilościowy i jakościowy dysocjacji przed liofilizacją i po liofilizacji, staje się łatwiejsze dostrzeganie wad aparatu liofilizacyjnego, tudzież bardziej trafna jest ocena procesu liofilizacji w ogóle.

3. Regeneracja liofilizatu

Do rozpuszczenia składników i zawieszenia masy bakteryjnej w ampułce liofilizatu powinno się używać wodę peptonową lub bulion, a nie roztwór fizjologiczny NaCl (3). Potrząsanie ampułką dla przyspieszenia zawieszenia bakterii należy uważać za niewłaściwe, lub za szkodliwe; być może jest praktycznie obojętne obracanie ampułki między dłońmi.

Wysiewu liofilizatu powinno się dokonywać raczej na świeżo sporządzone podłoże, oraz na płytki nie podsuszone przez dłuższy czas w cieplarni przez 24 godz. Chodzi tu o soczystość agaru.

W kontroli na dysocjację stosuje się zarówno metodę Henry'ego oryginalną, jak jej modyfikację; prócz tego stosuje się termoaglutynację i próbę z akryflawiną (w modyfikacji własnej). Wskaźnik ilościowy dysocjacji 15, uważany dotychczas za górną granicę przydatności wyselekcjonowanej populacji, wydaje się zbyt wysoki. Wynik na 1+ w termoaglutynacji lub w odczynie z akryflawiną jest ostrzejszym wymogiem, chociaż bynajmniej nie wygórowanym w masowej produkcji.

W oparciu o wyniki badania na dysocjację pobiera się jedną kolonię z wysiewu populacji uznanej za odpowiednią. Powinno się otrzymywać bujny wzrost zarazka w ciągu 2 dób hodowania. Jeśli wzrost jest mało obfity, należy wykonać jeszcze 1—2 pasaży.

4. Hodowanie i przygotowywanie

Agar ziemniaczany jest dotychczas najlepszym podłożem do namnażania szczepu 19. Z uwagi jednak na zmiany zachodzące w ziemniakach w miarę ich przechowywania w okresie zimowo-wiosennym, zaleca się sporządzać ten wyciąg jesienią (np. w listopadzie) w takiej ilości, aby pokryć zapotrzebowanie na niego do następnego zbioru ziemniaków (Stableforth — 22).

Agaru nie sący się. Klarowne podłoże otrzymuje się drogą dekantacji. Zresztą w zwykłym cyklu produkcyjnym można posługiwać się agarem nieklarownym. Skład podłoża został podany standardowo przez autorytatywne czynniki organizacji międzynarodowych (Stableforth — 22 i inni).

Wymogi co do szkła podano już powyżej. Wymaga szczególnego podkreślenia czystość szkła; w końcowym cyklu mycia należy je

oplukiwać wodą przekroploną otrzymaną ze szklanych destylatorów.

Do posiewów butelek Roux używa się raczej gęstszej zawiesiny (*Huddleson* — 18).

Usuwanie wody kondensacyjnej z butelek Roux przy zakładaniu posiewów jest zbędne.

Powinno się unikać styczności żywej zawiesiny z gumą. Wprawdzie nie jest łatwo zastąpić gumowe złącza lewarowe, jednak posługiwanie się węzłem gumowym zamiast przewodów szklanych wydaje się niewłaściwe. Są w tej sprawie pożądane dalsze badania.

Okres wylegania hodowli w cieplarni nie powinien w żadnym wypadku przekraczać 3 dni (około 72 godzin), zawiesina z hodowli 4-dniowych zawiera już domieszkę słabo żywotnych i być może nawet martwych bruceli (2). Należy uważać za nierozstrzygnięte pytanie czy w produkcji szczepionki nie byłoby słuszne sporządzać zawiesinę z 2-dniowych hodowli, tj. w fazie logarytmicznego wzrostu populacji bakteryjnej. Błędne jest uzależnianie długości okresu wylegania hodowli produkcyjnych na podstawie pobieżnej oceny na oko intensywności wzrostu hodowli; jeśli dany posiew wykazuje słabszy wzrost w czasie, chodzi tu najczęściej o niekorzystny układ środowiska, i w tych przypadkach przedłużanie okresu wylegania pogłębia niejednorodność populacji pod względem żywotności i właściwości antygenowych. Niekiedy szczep słabo wyrasta wskutek wyczerpania. Powinno się wtedy przepasażować go albo wręcz zmienić populację.

Wahania temperatury cieplarki nie powinny przekraczać górnej granicy 37,5°C. W świetle obserwacji własnych raczej są pożądane wahania w obrębie niższej temperatury, tj. od 36—37°C.

Usunięcie wody kondensacyjnej z butelek Roux przed splukaniem hodowli jest nieodzowne. Chodzi tu o usunięcie ewentualnie wykształconych form zdysocjowanych, i o zmniejszenie domieszki składników podłoża w szczepionce.

Dotychczas zalecany płyn buforowany do splukiwania hodowli nie jest pozbawiony zastrzeżeń i w tej sprawie powinno się podjąć odpowiednie badania.

Dodawanie perełek szklanych do butelek Roux przed splukaniem jest w praktyce wskazane. Po dodaniu płynu buforowanego należy powierzchnię wzrostu zwilżyć i na przeciąg około 10 minut ułożyć butelki płasko powierzchnią wzrostu ku górze — aby hodowla rozmiękla. W wysuwanych dotychczas obawach, aby składniki podłoża nie przedostawały się do splączyny, nie uwzględniano okoliczności, że niepomierne większe jakościowe straty szczepionki zachodzą wskutek mechanicznego uszkodzenia splukiwanej zawiesiny. Zresztą w ogóle trudno jest mówić w danym wypadku o większej domieszce

składników podłoża w splączynie, o ile procedura splukiwania hodowli przebiega sprawnie; przy dobrej organizacji pracy kontakt płynu z podłożem nie powinien być dłuższy, jak 15—20 minut, czyli podobnie długo jak przy posługiwaniu się dotychczasową techniką. Mechaniczne splukiwanie hodowli za pomocą przechylnych urządzeń należy wykluczyć. Powinno się splukiwać hodowlę uważnie, przestrzegając skrupulatnie ostrożności (patrz wyżej), aby nie obniżać żywotności komórek bakteryjnych.

Podane uwagi odnoszą się do namnażania szczepu na podłożu stałym. Od stosunkowo niedawna (*Drimmelen* — 14, 15; *Hulse* — 20; i inni) zaczęto w produkcji szczepionki 19 stosować płynne podłoża przewietrzane. Pomyślnie wyniki uzyskano w poważnych laboratoriach, i moim zdaniem powinno się tę metodę wykorzystać w naszym kraju.

Jako standardową ilość żywych bruceli w 1 ml szczepionki, zgodnie z zaleceniami organizacji międzynarodowych, przyjęto 16 miliardów, co odpowiada 80 miliardów bruceli w dawce uodporniającej. Zakład produkcyjny jest zmuszony i powinien wytwarzać preparat z większą początkowo zawartością żywych zarazków w jednostce objętości, aby preparat czynił zadość wymogom seryjnej kontroli. Jednak powinno się ustalić górną granicę gęstości zawiesiny. Jest niestłuszne pozostawienie pełnej swobody zakładowi produkcyjnemu w przyjmowaniu dowolnie współczynnika większej ilości bruceli w dawce, aniżeli obowiązuje ramowy standard. Moim zdaniem jest do przyjęcia bez zastrzeżeń dawka 20 miliardów w 1 ml, a w żadnym przypadku nie powinna ona przekraczać 25 miliardów i takie zobowiązanie należałoby umieścić w instrukcji.

Oprócz dotychczasowych kontroli należałoby badać zawiesinę na żywotność za pomocą metody przyżyciowego barwienia jej TTC (patrz wyżej). Należy kontrolować jej intensywność i homogenność barwy. Przy zastosowaniu tej metody okaże się najprawdopodobniej zbędne liczenie żywych bruceli metodą płytkową. Bliższe szczegóły postępowania znajdują zainteresowani w odpowiednim piśmiennictwie (2—11).

Dotychczasowe uwagi wiążą się z wytwarzaniem szczepionki 19 płynnej. Okazało się jednak, że można ten preparat zastąpić produktem znacznie trwałszym utrzymującym niewspółmiernie dłużej swe właściwości uodporniające. *Hulse* (19, 20), *Drimmelen* (15, 16) i szereg innych laboratoriów w różnych krajach pokusiło się o opracowanie technologii wytwarzania szczepionki liofilizowanej. Uzyskano już wysoce zadowalające wyniki, chociaż w dalszym ciągu są prowadzone badania — nie udało się pokonać wszystkich trudności. W każdym razie liofilizat szczepionki 19

może już czynić zadość wymogom kontroli po upływie 1 roku i należy to traktować jako duży sukces. I te osiągnięcia powinno się adaptować w naszym kraju.

Piśmiennictwo:

1. Anczykowski F.: Med. Wet. Nr 6, 258 (1946).
2. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-2, 159 (1959).
3. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-3, 325 (1960).
4. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-2, 135 (1959).
5. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-3, 337 (1960).
6. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-3, 345 (1960).
7. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-3, 353 (1960).
8. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-3, 361 (1960).
9. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-3, 369 (1960).
10. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-3, 381 (1960).
11. Anczykowski F.: Roczn. N. Rol., 69-E-3, 397 (1960). 255 (1953).
12. Anczykowski F.: Med. Wet. Nr 3, 129 (1956).

13. Drimmelen G. C.: South Afric. J. Sci. Vol. 49 No 8, 255 (1953).
14. Drimmelen G. C.: Onderstepoort J. Vet. Res. Vol. 27, No 2, 205 (1956).
15. Drimmelen G. C.: Onderstepoort J. Vet. Res. Vol. 27, No 2, 215 (1956).
16. Drimmelen G. C.: WHO (Bruc.) 194, 3 July (1958).
17. Henry B. S.: J. Infect. Dis. 52, 374 (1933).
18. Huddleson I. F.: Quart. Bull. Michigan Agr. Exp. Sta. Vol. 37, No 1, 14 (1954).
19. Hulse F. C.: Proc. Royal Soc. Vol. 51, No 5, 377 (1958).
20. Hulse E. C.: Arch. Belges Med. Soc. Hig Med. Trav. Med. Leg. No 7, 506 (1959).
21. Romvary J. i L. Prohaszka: A. A. L. No 1/1955 Ref. w Med. Wet. No 2, 116 (1956).
22. Stableforth A. W.: Advances in the control of Zoonoses. WHO/FAO Seminar Zoonoses. Genewa (1953).
23. White F. C. a J. B. Wilson J. Bact. Vol. 61, No 2, 239 (1951).

Adres autora: doc. dr Feliks Anczykowski, Puławy, Instytut Weterynarii.

HIGIENA I TECHNOLOGIA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

JAN BOJARSKI

Badania termooporności enterokoków, wyizolowanych z surowca i pasteryzowanych konserw mięsnych

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydz. Wet. WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr EDMUND PROST

Enterokoki są drobnoustrojami występującymi powszechnie w środowisku człowieka i zwierząt a także w żywności. Występowanie tych drobnoustrojów w surowcu a następnie w konserwach mięsnych ma jednakże szczególne znaczenie ze względu na trwałość tych produktów.

Grupa enterokoków charakteryzuje się mianowicie pewnym zespołem cech, które pozwalają tym drobnoustrojom w wielu wypadkach na przetrwanie tak działania czynników konserwujących jak i warunków przechowywania. Własnościami tymi są wg *Shermana*: wysoka tolerancja na sól kuchenną (6,5%), oporność w środowisku alkalicznym (pH 9,6), zdolność do wzrostu w niskiej (+10°C) i wysokiej temperaturze (+45°C), zdolność redukcji błękitu metylenowego oraz oporność na ogrzewanie w temp. 60°C przez 30 minut (1, 3, 7).

Stosunkowo duża oporność na działanie wysokiej temperatury powoduje, że drobnoustroje te znajdujące się w konserwach pasteryzowanych, obniżają ich trwałość oraz powodując niekorzystne zmiany organoleptyczne. Z tych względów termooporność enterokoków stanowi dość zasadniczy problem w ocenie trwałości konserw pasteryzowanych (2, 3, 6, 8).

Badania własne

Założeniem pracy było:

1) określenie porównawcze termooporności enterokoków wyizolowanych z surowca mięsne-

go, przeznaczonego do produkcji konserw pasteryzowanych, oraz z treści konserw pasteryzowanych,

2) określenie wpływu działania bodźców termicznych na termooporność enterokoków,

3) określenie wpływu środowiska na termooporność enterokoków.

Materiały i metody

Badanie przeprowadzono na 54 szczepach wyizolowanych z surowca mięsnego, przeznaczonego do produkcji szynki puszkowych oraz na 108 szczepach, wyizolowanych z gotowego już produktu (szynki pasteryzowane). Wymienione szczepy izolowano i określano metodą hodowlaną i mikroskopową. Jako podłoża używano: bulionu z 6,5% NaCl, bulionu o pH 9,6, podłoża wg Hajna i Perry, podłoża z azydkiem sodu w modyfikacji Burzyńskiej oraz 3% agaru.

Do oznaczania termooporności enterokoków używano 24-godz. hodowli bulionowych, ustalając gęstość masy bakteryjnej na ok. 300 tysięcy drobnoustrojów w 1 ml, posługując się skalą Mc Farlanda. Wymienioną zawiesinę badanych enterokoków napełniano w ilości 1 ml ampułki szklane, które umieszczano w ultratermostacie Höpplera i poddawano działaniu temperatur +60°, +65°, +67,5°, +72,5° i +75°C przez okres 15 i 30 minut. Po przeprowadzonym zabiegu termicznym hodowlę bulionową oziębano do temp. +15°C i dokonywano kontroli żywotności przez posiewy na płytki agarowe oraz obserwację wzrostu.

Określenie wpływu bodźców termicznych na termooporność enterokoków przeprowadzono:

a) przez kontrolę wrażliwości na temperaturę szczepów enterokoków, których nie poddano działaniu wysokiej temperatury,