

WYSTĘPOWANIE *VIBRIO FETUS* W GŁĘBOKO MROŻONYM NASIENIU BUHAJÓW

Roman Hoppe, Alicja Wilkosz, Barbara Książek

Instytut Chorób Niezakaźnych Wydział Weterynarii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego — Akademia Rolnicza w Warszawie

Dodawanie antybiotyków do rozcieńczalników nasienia buhajów stosowane jest dla zahamowania namnażania się zarówno niepatogennej jak i chorobotwórczej flory bakteryjnej. W temperaturze około 5°C najsilniejsze działanie hamujące ma streptomycyna i penicylina, a w temperaturze pokojowej sulfanilamid [1]. Przyjmuje się ogólnie [1], że chorobotwórcze szczepy *Vibrio* w nasieniu rozcieńczonym rozcieńczalnikiem mlekowo-żółtkowym giną, jeśli dodatek dihydrostreptomycyny jest nie mniejszy niż 500 γ na 1 ml rozcieńczalnika i rozcieńczone nasienie pozostaje co najmniej 6 godzin w temp. 5°C.

Mc Entee i wsp. [2], unasieniając 94 jałówki nasieniem buhajów zakażonych, rozrzedzonym rozcieńczalnikiem cytrynianowo-żółtkowym z dodatkiem 500 j. m. penicyliny, 500 γ streptomycyny i 3 mg sulfanilamidu na 1 ml rozcieńczalnika, przetrzymywanym w temp. 5°C również poniżej 6 godz, nie stwierdzili zakażenia u żadnej jałówki.

Już jednak w 1959 r. wykazano [1, 3], że zarówno *Vibrio fetus* jak również *Brucella abortus* i inne drobnoustroje chorobotwórcze przeżywają w nasieniu w temp. —79°C, mimo obecności w nim antybiotyków, jeżeli zawiera ono niezbędny dla ekwilibracji dodatek gliceryny.

Do podjęcia badań nad przeżywalnością *Vibrio fetus venerealis* w nasieniu buhajów mrożonych w ciekłym azocie skłoniło autorów wyizolowanie tego drobnoustroju z płodów poronionych przez krowy, unasieniane takim nasieniem 2 buhajów.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badaniu na obecność *Vibrio* poddano 375 porcji nasienia z 5 ejakulatów buhaja R oraz 108 porcji z 1 ejakulatu buhaja H. Nasienie zamrożone było w kulkach i przez okres 2 lat przechowywane w ciekłym azocie

(—196°C). Rozcieńczalnik nasienia zawierał 1000 j. m. penicyliny i 0,001 g streptomycyny w 1 ml oraz 8⁰/o glicerolu. Pojedyncze kulki rozmrożono w 1 ml płynu fizjologicznego i po odwirowaniu przy 3000 obrotów przez 15 min, 2 krople supernatantu wysiewano na agar z krwią, pożywkę Florent (agar z dodatkiem chlorowodoru cysteiny i zieleni brylantowej) oraz na pożywkę płynną Bartletta. Posiewy inkubowano w atmosferze 92⁰/o azotu i 8⁰/o tlenu; kontrolę wzrostu mętwika przeprowadzono w mikroskopie kontrastowo-fazowym co 96 godz przez 8 dni. Wyizolowane szczepy *Vibrio* badano morfologicznie oraz w kierunku produkcji katalazy i H₂S; wrażliwość szczepów *Vibrio fetus* na antybiotyki określono metodą krążkową.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak podano w tabeli, z 375 porcji buhaja R w 139 (37,06⁰/o) i ze 108 porcji buhaja H w 45 (41,67⁰/o) uzyskano na pożywce Bartletta wzrost *Vibrio* noszącego cechy morfologiczne *Vibrio fetus venerealis*. Pięćdziesiąt szczepów z różnych ejakulatów, przebadane w kierunku właściwości biochemicznych, wykazało obecność katalazy i brak wytwarzania siarkowodoru, co pozwoliło je sklasyfikować jako mętwika chorobotwórczego — *Vibrio fetus venerealis*. Procent obecności mętwika w 5 ejakulatach buhaja R wahał się między 34,4 i 45⁰/o. Oczyszczone szczepy były wrażliwe na penicylinę i streptomycynę.

Tabela

Występowanie *Vibrio fetus venerealis* w głęboko mrożonym nasieniu buhajów

Ejakulatory buhajów	Liczba badanych porcji nasienia	Liczba (%) wyizolowanych szczepów <i>Vibrio fetus venerealis</i>	Liczba katalazowa	Produkcja H ₂ S
Rollema's 11/40	63	23 (36,5)	1,1-1,3	—
Rollema's 21/469	82	29 (35,3)	0,4-1,3	—
Rollema's 26/486	90	31 (34,4)	0,5-1,3	—
Rollema's 33/111	60	27 (45,0)	1,0-1,3	—
Rollema's 34/112	80	29 (35,0)	1,0-1,4	—
Heros 1920/33	108	45 (41,6)	0,4-1,2	—
Razem	483	184 (37,0)		

Uzyskane wyniki wykazały olbrzymie niebezpieczeństwo używania głęboko mrożonego nasienia od buhajów, u których nie zostało wykluczone zakażenie mętwikiem płodowym. Nie ulega wątpliwości, że procent zakażonych porcji był jeszcze wyższy niż to wykazało badanie drogą ho-

dowli na podłożach. Unasieniane takim nasieniem krowy, a zwłaszcza jałówki jałowieją w wysokim stopniu, a ponieważ badań ich w kierunku wibriozy się nie podejmuje dopóki nie dochodzi do ronień, przyczyna jałowienia pozostaje nieustalona.

Jako metodę zapobiegania dopuszczeniu głęboko mrożonego nasienia zakażonych buhajów należy stosować albo próbę biologiczną na jałówkach albo badanie bakteriologiczne co najmniej 10 porcji zamrożonego nasienia z kilku ejakulatów. Badania takie winny wykonywać laboratoria, mające już doświadczenie w diagnostyce wibriozy. Objęte nimi powinny być buhaje z obniżonym procentem zacielen oraz te, które były leczone z powodu zakażenia mętwikiem i zostały uznane za wyleczone na podstawie badania bakteriologicznego wypłuczyn lub próby biologicznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Eibl K.: Lehrbuch der Rinderbesamung, P. Parey, 1959.
2. McEntee K., Huyhes D. E., Gilman H. L.: Cornell Vet. XL, IV, 395, 1954.
3. Morgan W., Brinley J., Merlose D., Stewart D.: J. Comp. Path. 257, 1959.
4. Orthey A. E., Gilman H. L.: J. Dairy Sci. 37, 416, 1954.

P. Гоппе, А. Вилькош, Б. Ксёнжек

НАЛИЧИЕ *VIBRIO FETUS* В ГЛУБОКО ЗАМОРОЖЕННОМ СЕМЕНИ БЫКОВ

Резюме

Анализировали 375 порций семени из 5 эякулятов быка R и 108 порций из I эякулята быка H на наличие *Vibrio fetus* в связи с установлением заражения им обоих быков. Разбавитель семени содержал 1000 м.е. пенициллина и 0,001 г стрептомицина в 1 мл и 8% глицерола; замороженное семя было в виде шариков и сохранялось в жидком азоте (-196°C) в течение 2 лет.

Отдельные шарики размораживали в 1 мл физиологической жидкости и после центрифугирования со скоростью 300 оборотов в минуту в течение 15 минут, посеивали 2 капли супернатанта на питательную среду Бартлетта и на агар с кровью, а затем инкубировали в атмосфере 92% азота и 8% O_2 . Наличие *Vibrio fetus* проверяли в 96-часовых промежутках в течение 10 дней. Рост вибрионов происходил исключительно на жидкой питательной среде Бартлетта; из 375 порций семени быка R на 139 (37,06%), а из 108 порций семени быка H на 45 (41,67%).

Процент вибрионов в 5 эякулятах быка R колебался в пределах 34,4-45,0%. Пятьдесят штаммов из разных эякулятов анализировали на биохимические свойства, определяя их как каталазо--положительные и H₂S-отрицательные *Vibrio fetus venerealis*, восприимчивые к пенициллину и стрептомицину.

R. Hoppe, A. Wilkosz, B. Książek

VIBRIO FETUS OCCURRENCE IN DEEPLY FREEZED SEMEN OF BULLS

Summary

375 portions of semen from 5 ejaculates of R bull and 100 portions from 1 ejaculate of H bull were analyzed for the *Vibrio fetus* occurrence in connection with infection of both above bulls with this microorganism. The semen diluent contained 100 i.u. of penicillin and 0.001 g of streptomycin in 1 ml as well as 8% of glycerol; the frezed semen was in the shape of rolls and was stored for 2 years in the liquid nitrogen (—196°C).

Individual rolls were defreezed in 1 ml of physiological liquid and, upon centrifuging at the rate of 3000 rpm within 16 minutes, 2 drops of supernatant were sown on the Bartlett's nutrient medium and on the agar with blood, which were thereupon incubated in the atmosphere of 32% nitrogen and 8% O₂. The test for the *Vibrio fetus* occurrence was carried out every 96 hours for 10 days. The growth of the microorganism occurred on the Bartlett's medium only: from 375 portions of the R bull semen by 139 (37.06%) and from 108 portions of the H bull semen by 45 (41.67%).

The per cent of *Vibrio fetus* in 5 ejaculates of the H bull fluctuated within 34.4-45.0%. Fifty strains from various ejaculates were analyzed for biochemical properties; they have been defined as catalaze-positive and H₂S-negative *Vibrio fetus venerealis* susceptible to penicillin and streptomycia.