

WSTĘPNE BADANIA NAD WYKRYWANIEM WIRUSÓW W NASIENIU BUHAJÓW

JERZY BRANNY

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM w Krakowie

Kierownik: prof. dr Zdzisław Przybylkiewicz

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt,
Instytut Zootechniki w Krakowie

Kierownik: prof. dr Wł. Bielański

Sprawa kontroli jałowości mikrobiologicznej nasienia, używanego do inseminacji jest jednym z problemów, wynikającym z coraz szerszego stosowania sztucznego unasieniania zwierząt. Szczęólnego znaczenia nabiera to zagadnienie w wypadkach długotrwałego konserwowania nasienia w stanie zamrożonym (w temperaturze -79 , -183 względnie -196°C). Ten sposób przechowywania nasienia w niskich temperaturach stwarza bowiem niebezpieczeństwo równoczesnego utrzymywania przy życiu czynników chorobotwórczych i tym samym możliwość przenoszenia ich na większą liczbę unasienianych zwierząt, co w efekcie może grozić poważnymi skutkami hodowlanymi i ekonomicznymi. Sprawa kontroli jałowości bakteriologicznej nasienia była przedmiotem wielu badań, które w wyniku doprowadziły do opracowania metod, pozwalających na sklasyfikowanie pobieranego nasienia. Do tej pory natomiast zbyt mało uwagi poświęcono zakażeniom wirusowym i z tego powodu brak jest właściwego rozeznania wpływu zakażeń wirusowych na wartość nasienia.

Z badań Boutersa (1964) wynika, że liczne przypadki zapalenia jąder względnie nasieniowodów o nierozpoznanej etiologii, powodujące obniżenie się wartości nasienia mogły być wywołane przez wirusy. Bouters zakażał zdrowe buhaje wirusami wyizolowanymi z jąder i nasieniowodów, wykazujących stany zapalne, w wyniku czego u zdrowych zwierząt po

3—4 tygodniach inkubacji obserwowano znaczne obniżenie się wartości nasienia. Ustępowało ono po okresie mniej więcej 3 miesięcy od momentu zakażenia. Roslanowski (1963) podaje, że także w Czechosłowacji stwierdzono u buhajów stany zapalne narządów rozrodczych wywołane przez wirusy.

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano danych co do występowania wirusów w nasieniu buhajów. Celem podjętych badań było określenie częstości występowania wirusów w nasieniu buhajów użytkowanych w PZUZ, których nasienie w przyszłości ma być konserwowane w niskich temperaturach.

MATERIAŁ I METODYKA

A. Hodowle tkankowe

Jako podłoży do izolowania czynników cytopatogennych* użyto tkanki nerkowej 3—4-miesięcznych zarodków bydłych. Tkanekę nerkową po przemyciu i pokrojeniu na drobne fragmenty trypsynowano w 0,25% roztworze w temperaturze 37°C, zmieniając co 15 minut. Komórki zawieszano w płynach odżywczych składających się: 80% soli Earle'a, 10 części 10-krotnie stężonego roztworu Eagle'a, 10% surowicy cielęcej względnie w płynie Parkera z dodatkiem 10% surowicy cielęcej. Zawiesinę komórek rozlewano do flaszek Roux i umieszczano w cieplarni o temperaturze 37°. Po uzyskaniu pełnego wzrostu tkanki, który następował zwykle po 6 dniach od momentu założenia hodowli, hodowlę trypsynowano, zawieszano w opisanym płynie i zakładano z niej hodowle próbowkowe. W wyrosniętych hodowlach próbowkowych bezpośrednio przed wprowadzeniem badanego nasienia, zmieniano płyn na podtrzymujący. Płyn podtrzymujący zawierał te same składniki co płyn wzrostowy a jedynie zmniejszono w nim stężenie surowicy cielęcej do 2%.

B. Nasienie

Nasienie pobierano do sztucznej pochwy z zachowaniem wszystkich wymogów higieny. Każdą próbkę nasienia w ilości 1 ml odmierzano do próbki, zawierającej 250 µg streptomycyny i 1000 jedn. penicyliny, co zapobiegało namnażaniu się bakterii. Do doświadczenia użyto 91 ejakulatów pochodzących od 91 buhajów.

* Ze względu na trudności w określeniu przynależności systematycznej drobno-ustrojów wykazywanych w badanym nasieniu, zgodnie z przyjętym w piśmiennictwie wirusologicznym zwyczajem użyto w niniejszej pracy wstępnego określenia „czynnik cytopatogeny“.

Do hodowli tkankowych w probówkach wprowadzano badane nasienie w ilości 0,1 ml rozcieńczone 1 : 10 roztworem glukozy. Każdą próbkę nasienia posiewano na 4 hodowle probówkowe. W razie wystąpienia efektu cytopatogenego materiał pasażowano na dalsze 4 hodowle probówkowe. W każdej serii doświadczenia pozostawiono po 10 probówek z hodowlą tkankową, jako kontrolę. Jeśli w pięciu kolejnych pasażach wystąpił efekt cytopatogeny, wynik uznawano za dodatni.

WYNIKI

W oparciu o podane powyżej kryteria stwierdzono obecność czynników cytopatogenych w 14 spośród badanych 91 ejakulatów, co stanowi 15,4 %.

| | | | |
|----------|-------------|--------------|----------|
| PZUZ — A | — 20 próbek | — 3 dodatnie | — 15,0 % |
| PZUZ — B | — 43 próbek | — 6 dodatnie | — 13,9 % |
| PZUZ — C | — 22 próbek | — 4 dodatnie | — 18,2 % |
| PZUZ — D | — 6 próbek | — 1 dodatnie | — 16,6 % |

Ogółem — 91 próbek — 14 dodatnie — 15,4 %

Miano zakaźne izolowanych czynników dla 2—3 pasażu wahało się między 10^{-5} i 10^{-8} , w zależności od pochodzenia czynnika. Bliższe określenie przynależności systematycznej izolowanych czynników cytopatogenych oraz ich wpływ na wartość nasienia będzie tematem dalszych badań. Określenie gatunku wyizolowanych czynników natrafia bowiem na duże trudności z powodu braku odpowiednich surowic wzorcowych.

DYSKUSJA

Wyizolowanie czynników cytopatogenych z nasienia, pochodzącego od buhajów użytkowanych w PZUZ, może rzucić pewne światło na etiologię niektórych schorzeń dróg rodnych. Pomimo wielkiej dbałości o zabezpieczenie aseptyki wszystkich zabiegów związanych z coraz szerzej stosowanym sztucznym unasienianiem, stale zdarzają się wypadki stanów zapalnych i nieżyłtów dróg rodnych unasienianych krów, przy czym dość często jako przyczynę tych stanów podaje się zakażenia bakteriami, uważanymi za saprofity. Wykazanie obecności wirusów w nasieniu pozwala na przypuszczenie, że może tu zachodzić pewnego rodzaju współdziałanie pomiędzy wirusami a bakteriami. Wprowadzenie wraz z nasieniem do dróg rodnych wirusów, może tak dalece zmienić warunki panujące w środowisku pochwy, szyjki macicznej względnie macicy, że bakterie, stanowiące nor-

malną mikroflorę dróg rodnych zdrowych krów mogą znacznie się namnożyć, sprawiając wrażenie jedyne go czynnika odpowiedzialnego za te schorzenia.

WNIOSKI

1. W nasieniu buhajów użytkowanych w PZUZ wykazano obecność wirusów w 15,4%.
2. Wyjaśnienie znaczenia etiologicznego wyhodowanych wirusów w patogenezie stanów chorobowych narządów rodnych krów unasiennianych zakażonym nasieniem wymaga również dalszych obserwacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Bouters (1964): Nature, 201, 217—218.
2. Roslanowski K. (1963): Med. Wet., 19 (1), 13.

Е. Б р а н н ы

ВСТУПИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОБНАРУЖИВАНИЮ ВИРУСОВ В СЕМЕНИ БЫКОВ

Резюме

С целью избежания опасности возможного перенесения вирусных инфекций вместе с семенем, которое было подвержено длительной консервации в замороженном состоянии, предприняли попытку определения частоты появления вирусных факторов в семени быков. Испытания вели с семенем быков, используемых в государственных станицах искусственных осеменений.

В качестве основы для изолирования вирусных факторов употребляли почки 3—4-месячных зародышей крупного рогатого скота. Клетки заворачивали в питательных жидкостях, состоящих из соли Эарля — 80%, десятикратно концентрированного раствора Эагля — 10% и 10% из телячей сыворотки или жидкости Паркера с 10% прибавкой телячей сыворотки.

Сперму собирали в искусственное влагалище. До каждого мл семени прибавляли 1000 единиц пенициллина с целью избежания увеличения бактерий. К пробирочному выращиванию почек вводили 0,1 мл испытуемого семени, разбавленного раствором глюкозола в отношении 1:10. Если в очередных 5 пассажах выступил цитопатогенный эффект, его призна-

вали положительным. Из 91 эякулятов, происходящих от 91 быка из 4 Г. С. И. А., 14 быки положительными, что равняется 15,4%. Инфекционное число изолированных факторов колебалось между 10^{-5} и 10^{-8} .

J. Branny

PRELIMINARY INVESTIGATIONS ON THE DISCOVERY OF VIRUSES IN BULLS SEMEN

Summary

Aiming to exclude the danger of possible transportation of virus infection with frozen semen, which underwent long preservation, an attempt was made to determine the frequency of virus occurrence in bulls semen. The investigated semen was collected from bulls exploited at A. I. Centers.

The substratum isolating the virus factors was the kidney of 3—4 months old cattle embryo. The medium consisted of 80% Earl's salt, 10 portions of 10 times concentrated Eagles solution and 10% calf serum or of Parker's fluid with the addition of 10% calf serum.

The semen was collected by means of an artificial vagina. To each ml of semen there was added 250 μ g streptomycin and 1000 units of penicillin aiming to prevent the multiplication of bacteria. The examined semen was introduced into the test-tube cultures of kidney in the dose of 0,1 ml diluted with glycerol. The rate of semen dilution was 1:10. The result was recognized as positive when the cytopathogenic effect occurred in 5 consecutive passages.

Among 91 ejaculates collected from 91 bulls which came from 4 A. I. Centers, 14 (15.4%) showed a positive result. The infectious titer of the isolated factors ranged between 10^{-5} — 10^{-8} .