

MONIKA PIASECKA-SERAFIN

Wyjaławianie przy pomocy promieni nadfioletu kontenerów biologicznych na nasienie samców konserwowane w ciekłym azocie — 196°C

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki

Kierownik: prof. dr S. WIERZBOWSKI

Jedną z podstawowych form profilaktyki w zakresie higieny nasienia mrożonego w niskich temperaturach (—196°C) jest utrzymywanie kontenerów biologicznych, przeznaczonych do transportu i przechowywania nasienia w stanie odpowiedniej jałowości. Zagadnienie jałowości kontenerów biologicznych a tym samym zapobieganie wtórnym zakażeniom konserwowanego materiału np. nasienia jest aktualne zawsze, bez względu na formę przechowywania i opakowania (np. fiolki, słomki itp.), nabiera jednak szczególnej wagi wobec bezpośredniego kontaktu materiału biologicznego z ciekłym azotem jak to ma miejsce w czasie przechowywania nasienia w formie zamrożonych nieosłoniętych kulek.

Jak wykazały publikacje autorów zagranicznych (1, 2, 12) oraz badania własne (5, 6, 7) drobnoustroje chorobotwórcze i inne przeżywają w środowisku ciekłego azotu (—196°C) i w sprzyjających warunkach mogą spowodować zakażenie konserwowanego nasienia. Okazało się, że dla wywołania trwałego zakażenia kulek nasienia drogą ciekłego azotu w jałowym kontenerze jest potrzebna duża ilość bakterii zawartych w kulkach, które mogą stanowić źródło zakażenia (6, 7).

Stwierdzono jednak, że w czasie przechowywania nasienia bezpośrednio w ciekłym azocie z biegiem czasu na dnie i ścianach kontenera gromadzi się osad. Dla nasienia konserwowanego w formie nieosłoniętych kulek bezpośrednio w ciekłym azocie (—196°C), zakażony osad jest o wiele bardziej niebezpieczny niż zakażone kulki nasienia w kontenerze wolnym od osadu (10). W przytoczonym doświadczeniu zakażenie zamrożonych kulek nasienia nastąpiło już w ciągu 2 godzin od włożenia nasienia do kontenera wypełnionego świeżym azotem ale zawierającego zakażony osad.

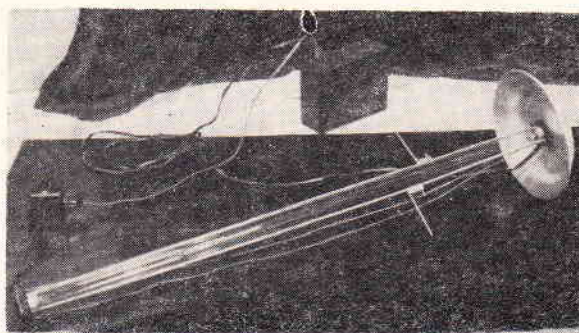
Proces odkładania się osadu a tym samym jego kontakt z przechowywanym nasieniem należałoby ze względów profilaktycznych przerywać poprzez okresowe przemieszczanie konserwowanego nasienia do czystego wyjałowionego kontenera stosując wymianę kontenerów. Zasadą obowiązującą powinno być szybkie przeniesienie pojemników z nasieniem ażeby ich kontakt z temperaturą otoczenia był ograniczony do niezbędnego minimum, ze względu na niebezpieczeństwo rozmrożenia lub uszkodzenia plemników.

Jak wykazały spostrzeżenia własne wyjaławianie kontenerów w PZUZ wg metod tradycyjnych natrafia na trudności i nie może być przestrzegane.

Dla usprawnienia powszechnego stosowania zabiegów profilaktycznych przy konserwacji nasienia mrożonego, podjęto próbę opracowania łatwego w obsłudze urządzenia przeznaczonego do wyjaławiania kontenerów wykorzystując znane działanie promieni nadfioletu.

Lampowy wyjaławiacz kontenerów

Lampowy wyjaławiacz kontenerów składa się z promiennika nadfioletu osadzonego w oprawkach połączonych ze sobą przewodami elektrycznymi oraz tarczy odbłyiskowej, osłony chroniącej otoczenie przed promieniowaniem nadfioletowym, regulatorów wysokości umieszczonych na prowadnicach, zasilacza elektrycznego (stanowiącego część oddzielną dla ułatwienia przenoszenia) (rys. 1). Promiennik nadfioletu zastoso-



Ryc. 1. Lampowy wyjaławiacz kontenerów

Fot. M. Pazdan

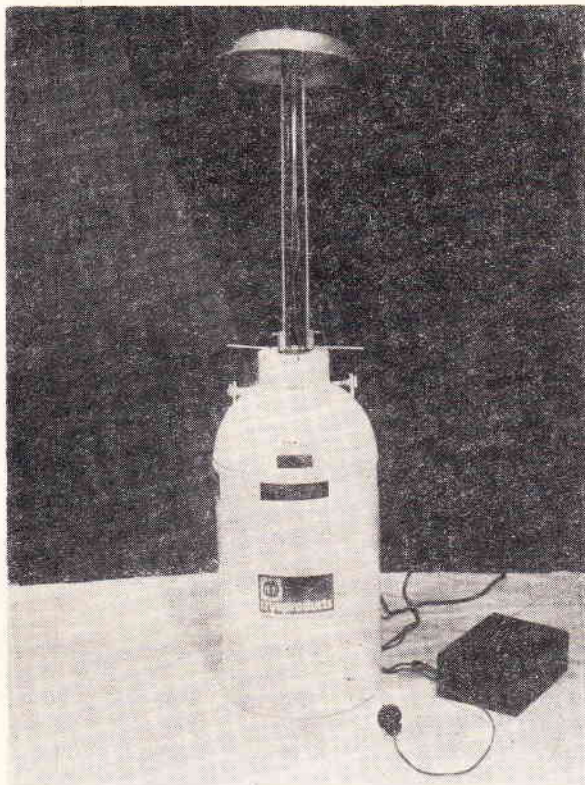
wany w lampowym wyjaławiaczu kontenerów wysyła promienie o długości ok. 2537 Å. Najsilniejsze działanie bakteriobójcze wywiera promieniowanie nadfioletowe o długości fali pomiędzy 2800 o 2500 Å ulegając maksymalnej absorpcji przez składniki nukleinowe bakterii. Kształt urządzenia stanowi jak gdyby pręt dający się wstawić w wąskie szyjki zbiorników np. o średnicy 5 cm (ryc. 2) i pozwala na umieszczenie 2—3 sztuk równocześnie we wnętrzu dużych kontenerów (np. o poj. 650 l) mających ruchome wyposażenie wnętrza podzielone przegrodami na segmenty (ryc. 4).

Wyjaławianie kontenerów przy użyciu lampowego wyjaławiacza

1. Wyjaławianie na sucho przy pomocy promieni nadfioletu.

Wyjaławianie na sucho można stosować dla kontenerów o niezabudowanym wnętrzu, np. CPV-5 i CPV-19 (prod. BOC Anglia), lub kontenerów mających wyposażenie wnętrza, które daje się podnosić lub ustawić tak, ażeby było możliwe dotarcie promieni nadfioletu do każdego punktu wyjaławianej powierzchni np. LR-185 (prod. Union Carbide Anglia), CPB-250 (prod. BOC Anglia). Postępowanie: po opróżnieniu kontenera z zawartości, po usunięciu i odparowaniu azotu, przeprowadza się wstępne wyjaławianie. We wnętrzu kontenera umieszcza się lampowy wyjaławiacz regulując głębokość jego ustawienia przy pomocy ruchomych zaczepów zależnie od wielkości kontenerów (ryc. 2). Część promiennika może wystawać

ponad szyjkę kontenera, gdyż dzięki tarczy odbłysowej będą równocześnie wyjaławiane zewnętrzne części szyjki oraz górna zewnętrzna powierzchnia kontenera (ryc. 2 i 4). Po założeniu osłony chroniącej otoczenie przed promieniowaniem wysyłanym przez górną wystającą część promiennika włącza się zasilacz do sieci na okres 28 godzin. Po wyjałowieniu wstępnym, oczyszcza się wnętrze kontenera przy pomocy



Ryc. 2. Wyjaławianie przy pomocy promieni nadfioletowych kontenerów

Fot. M. Pazdan

zmienianych tamponów zwilżonych wodą destylowaną, lub przy użyciu trójchloroetyleny co poleca firma Union Carbide (13), po czym powtarza się naświetlanie jak wyżej. Wyjaławianie w 2 etapach wskazane jest szczególnie dla kontenerów z wymiany w trakcie przechowywania nasienia w ciekłym azocie.

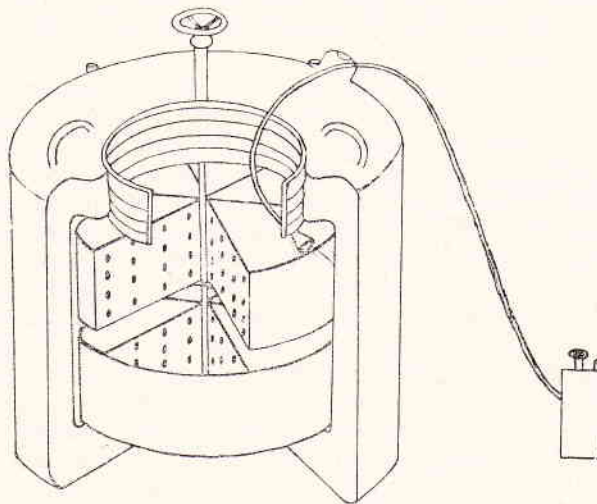
II. Wyjaławianie systemem kombinowanym.

Ten sposób wyjaławiania dotyczy kontenerów, które posiadają odstępniki (spider) trwale przymocowane do dna np. LR-25, LR-31, LR-185 (produkcji Union Carbide USA), CPV-35 (prod. BOC, Anglia) lub kontenerów z obrotowym, piętrowym wyposażeniem wnętrza np. LR-640 C (prod. Union Carbide USA).

Wyjaławianie systemem kombinowanym przeprowadza się przez odkażanie przy pomocy Sterinolu powierzchni zasłoniętych i nie dostępnych dla promieniowania nadfioletu, po czym do wnętrza kontenera wprowadza się lampowy wyjaławiacz.

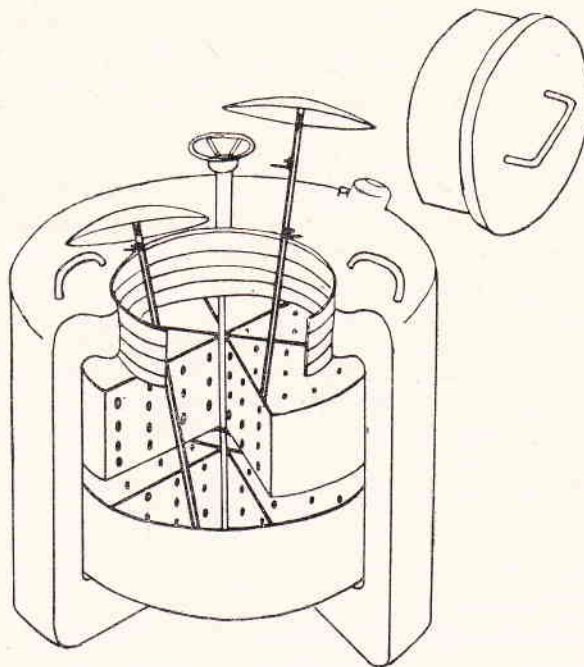
Do wyjaławiania powierzchni zasłoniętych odstępnikami w kontenerach LR-25, CPV-35, LR-31, wystarcza od 150—250 ml 2,5% Sterinolu zamiast 25 do 35 litrów przy wyjaławianiu wg metody tradycyjnej a w kontenerze LR-185 około 4 litrów zamiast 185 l. Roztwór Sterinolu wprowadza się przy pomocy długiej pipety osadzonej na przewodzie gumowym na dno pod odstępnik do całkowitego wypełnienia zamkniętej tam przestrzeni. Po 30 minutach Sterinol usuwa się najlepiej przez zassanie do długiej pipety przy pomocy dużej gruszki gumowej (kontenery małe) lub przy zastosowaniu pompy wodnej (kontenery duże). W podobny sposób przepłukuje się kilkakrotnie jałową wodą destylowaną miejsca uprzednio wypełnione Sterinolem.

W przypadku kontenerów LR-640 C wyjaławianie wstępne proponuje się przeprowadzać w sposób następujący: do zbiornika (połączonego z pompą) zawierającego środek dezynfekcyjny (np. 2,5% Sterinol) podłącza się wąż zakończony sitkiem rozpylającym i prowadzi pod kontrolą ręki dookoła nad górnym piętrem wzdłuż przestrzeni znajdującej się pomiędzy ścianą kontenera a obudową półek. Preparat ścieka wzdłuż przeciwnych ścian i nawilża dolne partie kontenera i jego dno. Nawilżanie przez ciągłe powolne powtarzanie okrążeń powinno trwać około 30 minut.



Ryc. 3. Wyjaławianie powierzchni niedostępnych dla promieni nadfioletowych przez natryskiwanie środkiem odkażającym

Po odpompowaniu Sterinolu i oplukaniu odkażonych powierzchni jak podano wyżej, do kontenera włącza się lampowy wyjaławiacz. Można włączyć równocześnie 2—3 wyjaławiacze każdy do innego sektora. W przypadku kontenerów dostarczonych z zewnątrz (z terenu) wskazane jest odkażanie dna od spodu, w tym celu kontener na okres naświetlania stawiamy w boksie kwarantannowym na gąbce nasyconej środkiem odkażającym.



Ryc. 4. Wyjaławianie przy pomocy lamp kontenerów z obrotowym wyposażeniem wnętrza

Omówienie

Badania własne wykazały, że w środowisku ciekłego azotu -196°C zachowują swoją zjadliwość i właściwości enzymatyczne również komórki bakteryjne nie osłonięte substancjami ochronnymi, tkankami, nasieniem lub pożywką (8, 9, 14). Z uwagi na zachowanie niezmiennych cech patogennych przeżywającej populacji bakteryjnej po zakażeniu ciekłego azotu (14), konieczność wyjaławiania kontenerów wydaje się oczywista.

Wyjaławianie kontenerów można przeprowadzić wg metod tradycyjnych przy użyciu wodnych roztworów dostępnych środków odkażających np. chloramina, Laurosept, Sterinol i inne, można również wykorzystać bakteriobójcze działanie par formaliny. Niedogodności wymienionych sposobów są następujące: 1) pracochłonność — przygotowywanie każdorazowo na świeżo wodnych roztworów środków odkażających napełnianie nimi i opróżnianie z nich kontenerów często kilkudziesięciu lub kilkusetlitrowych, kilkakrotne przepłukiwanie wyjałowioną wodą destylowaną następnie osuszanie. Z tym prawdopodobnie wiąże się ogólne nieprzestrzeganie wyjaławiania kontenerów, 2) działanie korodujące na aluminium np. przy częstym stosowaniu chloraminy (15). 3) szkodliwe działanie na organizm ludzki np. par formaliny, 4) znaczny koszt przy częstym stosowaniu np. Sterinolu do wyjaławiania w całości dużych kontenerów (kilkadziesięć lub kilkuset litrowych), 5) możliwość ewentualnego stosowania roztworu lub substancji zwiędzłych co prowadzi do małej efektywności zabiegu.

Przedstawione sposoby wyjaławiania przy pomocy lampowego wyjaławiacza kontenerów omijają jak np. w metodzie wyjaławiania na sucho lub sprowadzają do minimum np. w metodzie kombinowanej wymienione niedogodności i mogące stąd wynikać niedokładności zabiegu.

Projekt przedstawionego lampowego wyjaławiacza kontenerów został przyjęty przez Urząd Patentowy PRL oraz zostały podjęte starania o rozpoczęcie produkcji handlowej.

Badania prototypu lampowego wyjaławiacza kontenerów wykonane przy użyciu szczepów *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* przedstawia tab. 1. Wyniki upoważniają do stwierdzenia przydatności proponowanego urządzenia do celów wyjaławiania konte-

nerów w PZUZ i w bankach nasienia a także do wyjaławiania innych pojemników o gładkiej wewnętrznej powierzchni.

Zastrzeżenie

Wprowadzenie do praktyki przedstawionego urządzenia, po uprzednim porozumieniu się z Autorem.

Piśmiennictwo

- Lorrmann W.: Versuche zur Keimübertragung bei der Tiefgefrierkonservierung von Samen in Pelletforme. Dys. dokt., Hannover 1967.
- Muller W., Leipnitz Chr., Strauch D.: Berl. München. tierärztl. Wschr. 81. 64, 1968.
- Nagase H., Niva T.: Rep. 5th Int. Congr. Animal Reprod. and A. I. 4. 410, 1964.
- Oberfeld H.: Odkazanie w praktyce weterynaryjnej. PWRiL. 1952.
- Piasecka-Serafin M.: Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 108. 207, 497, 1970.
- Piasecka-Serafin M., Branny J., Wierzbowski S.: Medycyna Wet. 23. 497, 1969.
- Piasecka-Serafin M., Wierzbowski S.: Fortpfl. Besam. Haustiere 6, 365, 1970.
- Piasecka-Serafin M.: XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. 397, 1970.
- Piasecka-Serafin M.: Ibid. 398.
- Piasecka-Serafin M.: Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. biol. 4, 263, 1972.
- Piasecka-Serafin M.: Medycyna Wet. 23. 496, 1972.
- Piasecka-Serafin M.: Zakażenie napletka i nasienia buhajów w czasie fałszywych skoków przy pobieraniu nasienia do sztucznej pochwy. Medycyna Wet. (w druku).
- Steeg L.: 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A. I. Resumes, 206, 1968.
- Wierzbowski S., Pilch J.: Nasienie mrożone w inseminacji bydła. PWRiL, 1970.
- Wojtatowicz Z.: Nowości Wet. 1, 73, 1971.

Adres autora: dr Monika Piasecka-Serafin, Kraków, ul. Brodowicza 13a m. 1.

Пясэцка-Сэрафин М. — Стерилизация при помощи ультрафиолетовых лучей биологических контейнеров применяемых для хранения в жидком азоте (-196°) семени самцев.

Приготовили прототипное оборудование которое можно ввести внутрь контейнеров с узкой шейкой (диаметром ок. 5 см) а также больших контейнеров с врагцающимися сегментами располагая в них одновременно 2—3 такие аппараты.

Исследования проведенные с применением разных штаммов бактерий установили пригодность аппарата для стерилизации контейнеров употребляемых в Государственных Станциях Инсеминации Животных и в банках семени. Установка патентована в Бюро по Выдаче Патентов Польской Народной Республики.

Для контейнеров, которых внутреннее устройство препятствует иррадиации некоторых мест в контейнере запроектирована комбинированная система которая сочетает действие ультрафиолетовых лучей и химических средств.

Piasecka-Serafin M. — Ultraviolet sterilization of biological containers for semen preservation in liquid nitrogen.

In order to improve the prophylaxis of frozen semen preservation there was designed an easy to handle equipment for sterilization of containers by means of ultraviolet rays. The equipment may be inserted either into the container with a narrow neck (e.g. inside diameter 5.0 cm) or into each sector of tray of the rotative inner vessel of the large containers. An examination of the presented prototype, carried out by the use of different bacterial strains, showed its fitness for the sterilization of containers in A. I. Stations and the banks of semen. The equipment has been accepted by the patent office. For the containers equiped in such a way that the ultraviolet rays can not reach every point of their inner surface a method of combined sterilization (using chemical and ultraviolet rays) has been presented.

Tab. 1. Badania bakteriologiczne kontenerów po zakażeniu zawiesiną bakteryjną i naświetleniu promieniami nadfioletowymi.

Zwierzę	Liczba zwierząt	Stan po zakażeniu promieniami nadfioletowymi							
		Śmierć				Życie			
		bez nasienia		z nasieniem		bez nasienia		z nasieniem	
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	14	1	15	0	0	15	1	14
<i>E. coli</i>	15	14	1	15	0	0	15	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	13	2	15	0	0	15	1	14