

# FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JACEK KRÓLIŃSKI

## Czystość nasienia a skuteczność zabiegów unasieniania krów

Z Kliniki Położniczej Instytutu Patologii i Terapii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Problem zanieczyszczeń bakteryjnych nasienia jest ciągle aktualny, o czym świadczą liczne publikacje autorów zajmujących się tym zagadnieniem (1, 2, 3, 6, 7, 9, 11, 12). Ich poglądy odnośnie wpływu drobnoustrojów spotykanych w ejakulatach na przeżywalność plemników i stan czynnościowy układu rozrodczego unasienianych samic, różnią się znacznie między sobą. Świadczy to o złożoności problemu, na który wpływ mają takie czynniki jak rodzaj i ilość bakterii oraz wrażliwość na zakażenie narządu rodnego inseminowanych krów. Ilość i jakość zarazków zależą w dużym stopniu od higieny uzyskiwania poszczególnych ejakulatów, jak również od warunków zoohigienicznych, panujących w pomieszczeniach inwentarskich Stacji Unasieniania Zwierząt. Zapewnienie optymalnych warunków nie zawsze jest możliwe, mimo starań ze strony personelu tych stacji. Dotychczasowe wymagania dotyczące stopnia zanieczyszczenia bakteryjnego ejakulatów konserwowanych w stanie płynnym, zostały jeszcze bardziej zaostrzone z chwilą wprowadzenia na szeroką skalę do praktyki inseminacyjnej metody konserwacji nasienia w niskich temperaturach. Wiąże się to między innymi z wymaganiami innych krajów, do których eksportuje się zamrożone nasienie. Jak wykazały badania (8), temperatura ciekłego azotu równa  $-196^{\circ}\text{C}$ , nie działa zabójczo na drobnoustroje w nasieniu, lecz hamuje jedynie ich namnażanie. Stąd też obniżenie do minimum ilości bakterii w nasieniu świeżym, zmniejsza niebezpieczeństwo gwałtownego ich namnażania po rozmrożeniu.

Dodatek antybiotyków nie zawsze daje oczekiwane efekty. Niska temperatura ogranicza ich działanie przeciwbakteryjne, a wiele spośród izolowanych szczepów wykazuje cechy oporności na preparaty antybiotykowe (5). Stwierdzono również niekorzystny wpływ nadmiaru oraz niektórych serii antybiotyków na żywotność plemników (10).

Na podstawie obserwacji niektórych autorów można przyjąć, że nie tyle jakość, co ilość bakterii decyduje o ujemnym wpływie na plemniki i układ rozrodczy unasienianych krów (7). Biorąc pod uwagę powyższe dane, w niniejszej pracy przedstawiono wpływ różnych ilości drobnoustrojów znajdujących się w ejakulatach na efektywność zabiegów unasieniania krów.

### Materiał i metody

Do doświadczeń użyto 92 próby nasienia pochodzącego od 31 buhajów rasy ncb i charolaise, będących w różnym wieku, zgrupowanych w jednej ze Stacji Unasieniania Zwierząt. Ejakulaty uzyskiwano przy użyciu sztucznych pochew, według ogólnie przyjętych zasad. Po ocenie makroskopowej i mikroskopowej, pobierano próbki nasienia do badania bakteriologicznego, a pozostałą część rozrzedzano rozrzedzalnikiem mlekowo-żółtkowym bez dodatku antybiotyków i używano do unasieniania krów. W skład jednej próby wchodził materiał uzyskany z jednego, dwóch lub trzech ejakulatów, pochodzących od tego samego osobnika, pobranych w odstępach około 15 minutowych. Przy określaniu jakościowym mikroflory ograniczono się do stwierdzenia rodzajów bakterii nie uwzględniając przynależności gatunkowej wyosobnionych szczepów. Materiał wysiewano na podłoża stałe (agar zwykły, wzbogacony dodatkiem 5% krwi baraniej oraz pożywkę Mc Conkeya), a następnie inkubowano w tempera-

Tab. 1. Wpływ czystości nasienia na skuteczność zabiegów unasieniania

Grupa	Ilość bakterii w 1 ml nasienia (w tys.)	Ilość i odsetek badanych prób nasienia		Wyniki zabiegów unasieniania			
		ilość	%	Unasieniono krów po raz I-szy	Krowy nie powta- rzające do 60 dni		
					ilość	%	
I	do 50	30	32,6	878	623	72,7	
II	do 200	16	17,3	564	420	76,2	
III	do 400	13	14,1	351	265	72,3	
IV	do 1000	12	13,0	268	180	69,6	
V	ponad 1000	21	22,8	496	338	68,3	
Razem		92		2557	1826		

turze 37° w ciągu 24—48 godzin. Wyhodowane drobnoustroje identyfikowano na podstawie wyglądu wyrosniętych kolonii, zabarwienia, zdolności produkowania barwników dyfundujących do podłoża, właściwości hemolitycznych, zapachu oraz badania mikroskopowego preparatów barwionych metodą Grama.

Celem określenia ilości drobnoustrojów znajdujących się w 1 ml nasienia, materiał rozrzedzano jałowym płynem fizjologicznym w stosunku 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000, pobierano dwukrotnie po 1 ml z każdego rozcieńczenia na dwie płytki Petriego i zalewano 2% ostudzonym agarem. Po zestaleniu agaru, próby inkubowano w temperaturze 37° w ciągu 48—72 godzin, po czym przetrzymywano 24 godziny w temperaturze pokojowej. Wyrosnięte kolonie liczono przy użyciu „Mikroaditora”, a znaną ilość mnożono przez rozcieńczenie. Określano liczbę bakterii znajdujących się w jednym mililitrze badanego ejakulatu, dzieląc uzyskaną sumę z dwóch płytek Petriego przez dwa.

Rozrzedzone nasienie wysyłało w termosach z lodem do punktów unasiwienia. Jak wynika z przedstawionej tabeli, po raz pierwszy unasiwiono 2557 krów. Efektywność unasiwienia stwierdzano po 60 dniach od zabiegu. Uzyskane wyniki doświadczeń poddano analizie statystycznej za pomocą testu T-Studenta.

### Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania bakteriologiczne wykazały, że do najczęściej występujących w nasieniu drobnoustrojów należą rodzaje *Staphylococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* oraz *E. coli*. Rzadziej natomiast obserwowano obecność bakterii z rodzaju *Streptococcus*, *Bacillus* i *Corynebacterium*. Nie stwierdzono ejakulatów jałowych. Większość prób była zanieczyszczona mieszaną florą bakteryjną.

Uzyskane wyniki badania ilościowego świadczą o stosunkowo dużym zanieczyszczeniu badanego materiału mikroflorą. Ilość drobnoustrojów w 1 ml nasienia, czyli tzw. stopień zanieczyszczenia bakteryjnego poszczególnych prób był różny, co przedstawiono w załączonej tabeli. Zaobserwowano zależność między ilością drobnoustrojów znajdujących się w produkowanym nasieniu, a efektywnością zabiegów unasiwienia. Spostrzeżenie to stanowi potwierdzenie wcześniejszych wyników badań, otrzymanych przez Kremlewa (4). Obniżenie skuteczności unasiwienia stwierdzano zarówno w przypadku wzrostu ilości komórek bakteryjnych w nasieniu, jak również wówczas, gdy ilość zarazków nie przekraczała 50 tys. w 1 ml. Jak wynika z załączonej tabeli, najlepsze wyniki uzyskano po zabiegach z użyciem nasienia, w którym przed rozrzedzeniem ilość bakterii kształtowała się w granicach 51—200 tys. w 1 ml, natomiast najsłabsze po użyciu ejakulatów zawierających ponad 1 mln drobnoustrojów w 1 ml. Jakkolwiek zaznacza się spadek skuteczności zabiegów unasiwienia po użyciu nasienia znacznie zanieczyszczonego mikroflorą, to z analizy statystycznej wynika, że uzyskane wyniki nie są statystycznie istotne. Jaśkowski powołując się na wyniki badań z udziałem różnych autorów podaje, że minimalne krytyczne namnożenie drobnoustrojów w nasieniu, mieści się

w granicach 1—10 mln w 1 ml. W ejakulatach, w których koncentracja bakterii przekroczyła tę granicę obserwowano niższą ruchliwość, skłonność do aglutynacji plemników oraz ich obumieranie. Można przyjąć, że do takiego namnożenia dochodzi jedynie w złych warunkach konserwacji wskutek przełamania osłony antybiotykowej. Niekorzystny wpływ na przeżywalność plemników, a tym samym na efekty unasiwienia wywierają wówczas zarówno żywe bakterie, jak również produkty powstałe w wyniku ich rozpadu (7).

W przedstawionym doświadczeniu uwzględniono nasienie konserwowane w stanie płynnym. Wydaje się, że celowe byłoby podjęcie dalszych badań zmierzających do określenia wpływu zanieczyszczenia bakteryjnego nasienia, konserwowanego w stanie zamrożonym, na skuteczność zabiegów unasiwienia krów w warunkach produkcyjnych.

### Piśmiennictwo

1. Flis J., Flis I.: *Medycyna Wet.* 26, 427, 1972.
2. Jaśkowski L., Różankiewicz E., Różankiewicz L., Szulc L., Kozłowska L.: *Nowości Wet.* 2, 107, 1972.
3. Kozłowska L.: *Zeszyty Probl. Post. Nauk Roln.* 124, 199, 1971.
4. Kremlev E. P., Banakova L. A.: *Životnovodstvo* 6, 60, 1974.
5. Króliński J.: *Medycyna Wet.* 31, 82, 1975.
6. Króliński J., Obuchowska-Duś B.: *Medycyna Wet.* 31, 169, 1975.
7. Króliński J.: Wpływ *Pseudomonas aeruginosa* na przeżywalność plemników w nasieniu buhajów. *Medycyna Wet. Praca w druku.*
8. Piasecka-Serafin M.: *Medycyna Wet.* 26, 496, 1972.
9. Piasecka-Serafin M.: *Medycyna Wet.* 29, 361, 1973.
10. Rostanowski K.: *Medycyna Wet.* 14, 421, 1958.
11. Wierzbowski S., Schmyd D.: *Medycyna Wet.* 32, 339, 1976.
12. Zawila Z.: *Prz. hod.* 42, 17, 1973.

Adres autora: lek. wet. Jacek Króliński, ul. Komuny Paryskiej 63a/C, 50-452 Wrocław.

**KEEMAN K. P., BUHLES W. C., HUXSOLL D. L., WILLIAMS R. G., HILDEBRANDT P. K.: Badania nad patogenizacją *Rickettsia rickettsii* u psa: objawy kliniczne i zmiany sekcyjne po zakażeniu doświadczalnym. (Studies on the pathogenesis of *Rickettsia rickettsii* in the dog: clinical and anatomopathological changes of experimental infection). *Amer. J. vet. Res.* 38, 351—356, 1977 (6).**

Autorzy przedstawili wyniki obserwacji klinicznych oraz badań hematologicznych, biochemicznych i sekcyjnych u psów zakażonych w wieku 10—24 miesięcy *Rickettsia rickettsii* w dawce  $10^{2.0}$ — $10^{7.25}$  GPIPID<sub>50</sub>. U zakażonych psów rozwijał się syndrom chorobowy, w którym natężenie objawów i zmian zależało od wielkości dawki zakaźnej. Chore psy traciły łaknienie, były ospałe. Na skórze pojawiały się punkcikowate wybroczyny, wylewy krwawe, obrzęki i martwica. We krwi występowała niedokrwistość i leukopenia, później leukocytoza i trombocytopenia. Ponadto obserwowano wzrost poziomu fosfatazy zasadowej i cholesterolu, hyponatremię i hypochloremię. Na czole zmian histopatologicznych u padłych psów wysuwało się zmartwiające zapalenie drobnych naczyń krwionośnych we wszystkich narządach oraz wokółnaczyńowe nacieki wielojądrowych leukocytów. Ostre vasculitis i perivasculitis było najsilniej zaznaczone w naczyniach krwionośnych skóry, jądrach, przewodzie pokarmowym, płucach, wątrobie, nerkach, pęcherzu moczowym, trzustce, sercu. Ponadto występowało zapalenie opon mózgowych i mózgu. W półkulach mózgowych występowały drobne ogniska gliozy.

G.