

Gibasiewicz W. A., Kamyszek P. — **The influence of *Haematopinus suis* (Linné, 1758) invasion on quality of swine skins**

Because of parasitic invasion of skin, especially those caused by lice are very common in pigs, the authors evaluated the influence of *Haematopinus suis* invasion on quality of swine skins. They examined 8787 skins derived from two regions of Wielkopolska (south — A, north — B). In the region A into

the 1st quality was qualified 10,2% of skins. The lowest skin impairment was noted in October-December, the highest one in April-June, 75,6%. As a whole 52% of skins were impaired. However, in the region B only 1,7% of skins were qualified into the 1st class of quality, and a relatively high percent of impaired skins was found in a whole year — 82%. A mean value of impaired skins in Wielkopolska is 66,5%.

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

ZDZISŁAW BORYCZKO, JAN UDAŁA, MARIA KA WĘCKA, BOGDAN LASOTA

### Właściwości biologiczne nasienia buhajów w procesie zamrażania i po rozmrożeniu\*)

Zakład Rozrodu Zwierząt Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej AR,  
ul. Judympa 6, 71-460 Szczecin

W ocenie zmian zachodzących w plemnikach w trakcie procesu zamrażania i po rozmrożeniu pomocne okazują się analizy aktywności enzymów komórkowych uwalnianych od osocza nasienia (2, 6). Potwierdzenie zmian można uzyskać badając strukturę plemników poddanych procesom konserwacji przez zamrażanie (1). Spośród struktur plemnika najbardziej czuły na niskie temperatury jest akrosom. Wykorzystane to zostało przez Saake i White (5) jako test do oceny stopnia uszkodzenia tej części plemnika, szczególnie przydatny w określeniu biologicznej wartości nasienia po rozmrożeniu.

Żywotność nasienia poddanego procesom zamrażania zależy od wielu czynników. Według Robbinsa i wsp. (4), zasadniczy wpływ na efekt mrożenia nasienia wywiera szybkość zamrażania, objętość dodanego glicerolu. Bardzo istotnym momentem jest też sposób rozmrażania. Dla nasienia mrożonego w słomkach najlepszą ruchliwość i najniższy odsetek uszkodzonych akrosomów wykazywały próby rozmrażane krótkotrwale w temperaturze 50, a nawet 65°C. Dla nasienia mrożonego w kulkach korzystne wskaźniki ruchliwości i przeżywania uzyskiwano przy rozmrażaniu w temp. 40°C (3). W praktyce sztucznego unasienniania plemniki podlegają jednak wpływom zróżnicowanych temperatur w związku ze stosowaniem różnych sposobów rozmrażania nasienia.

Nie rozwiązany jest, zdaniem Wierzbowskiego (9), problem, jak długo można używać nasienia po rozmrożeniu. Próby podjęte przez Tischnera i Aleksander-Benda (8) wskazują na możliwość doskonalenia rozcieńczalników stosowanych przy rozmrażaniu nasienia w ce-

lu zachowania większej jego wartości biologicznej niż przy powszechnie używanym izotonicznym roztworze NaCl lub 2,9% roztworze cytrynianu sodu.

Biorąc pod uwagę wyżej przedstawione zagadnienie, wydawało się celowe prześledzenie dynamiki zmian w żywotności nasienia, aktywności aminotransferazy asparaginianowej, oddychania plemników oraz struktury akrosomu w trakcie poszczególnych faz przygotowania nasienia do zamrażania, a następnie po rozmrożeniu. Szczególną uwagę przy tym poświęcono różnicom w biologicznej wartości nasienia rozmrażanego w różnych temperaturach.

#### Materiał i metody

Nasienie, które użyto do badań pochodziło od pięciu buhajów rasy cb. Ejakulatory po pobraniu do sztucznej pochwy oceniono wstępnie, wykonano rozmazy w celu określenia odsetka plemników żywych i martwych barwionych metodą różnicową oraz obliczono odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem wg klasyfikacji Saake i White (5). Oznaczono również aktywność aminotransferazy asparaginianowej wg metody Reitmana i Fränkela. Po ekwilibracji nasienie zamrożono w kulkach według standardowej techniki stosowanej w SHIUZ. Łącznie zamrożono 25 prób nasienia.

Rozmrażanie przeprowadzono w izotonicznym roztworze NaCl w temperaturze +4°C, +20°C +40°C. Wariant rozmrażania w temp. +4°C przyjęto jako negatywny. Nasienie po rozmrożeniu inkubowano w temp. +37°C przez 300 minut, kontrolując w trakcie inkubacji następujące parametry: odsetek plemników o ruchu postępowym, odsetek plemników żywych i martwych, odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem oraz aktywność aminotransferazy asparaginianowej. Parametry te badano natychmiast po rozmrożeniu nasienia, następnie w 30, 60, 90, 120, 180, 240 i 300 minucie od chwili rozpoczęcia inkubacji.

Z prób nasienia przed zamrożeniem i tuż po rozmrożeniu oraz po 30 i 60 minutach inkubacji pobrano próbki do badań morfologicznych w mikroskopie elek-

\*) Praca wykonana w ramach problemu MR.II.10.

tronowym, utrwalając je według standardowych metod stosowanych w mikroskopii elektronowej; nano-szono w postaci suspencji na błonki form warowe i analizowano ich cienie (metoda całościowa).

W próbach mrożonego nasienia przy pomocy aparatu Warburga wykonano pomiary zużycia tlenu badając różnice spowodowane rozmrażaniem w trzech przyjętych wariantach temperaturowych.

### Wyniki i omówienie

Parametry jakościowe 25 prób nasienia, które następnie poddano procesowi zamrażania ilustruje tab. 1. Porównując wyjściowe wskaźniki oceny jakości nasienia po pobraniu z wynikami dla prób po rozcieńczeniu i po ekwilibracji, zauważalne były różnice w procencie plemników o ruchu postępowym, procencie plemników z nie uszkodzonym akrosomem. Najbardziej widoczny był jednak wzrost aktywności aminotransferazy asparaginianowej w momencie rozcieńczenia nasienia. Tak znacznych zmian w aktywności tego enzymu nie zanotowano nawet w trakcie późniejszego stadium zamrażania.

W tab. 2 przedstawiono przeciętny odsetek plemników o ruchu postępowym przy różnych temperaturach rozmrażania. Z danych tych wynika, że już w momencie rozmrożenia zary-

sowały się różnice w wielkości tego parametru na korzyść temperatury rozmrażania  $+40^{\circ}\text{C}$ . Odsetek plemników o ruchu postępowym w próbach rozmrażanych w tej temperaturze był również najwyższy przez cały okres inkubacji. Spostrzeżenie takie poczynił także Pilch (3).

Podobnie jak procent plemników o ruchu postępowym, przedstawiały się wyniki badań odsetka plemników żywych, który był najwyższy w preparatach sporządzonych z nasienia rozmrażanego w temperaturze  $+40^{\circ}\text{C}$  (tab. 3).

Interesujących danych dostarczyły badania, w których oceniono stan akrosomu plemników (tab. 4). Ogólnie odsetek plemników, w których stwierdzono nie uszkodzony akrosom był niski. W próbach rozmrażanych w temp.  $+40^{\circ}\text{C}$  — tuż po rozmrożeniu — wyniósł nieco powyżej 18%. Wyraźnie niższe wartości odnotowano w próbach rozmrażanych w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$  i  $+20^{\circ}\text{C}$  (7,6% i 10,76%). Już po 30 min. inkubacji w próbach rozmrażanych w temp.  $+20^{\circ}\text{C}$  i  $+40^{\circ}\text{C}$  stwierdzono o połowę niższy odsetek plemników z nie uszkodzonym akrosomem niż przy danych wyjściowych, a jeszcze mniej korzystnie kształtowało się to w próbach rozmrażanych w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$ . Potwier-

Tab. 1. Parametry jakościowe nasienia w fazie wstępnego przygotowania prób do zamrażania (n=25)

Grupa	Faza przygotowania nasienia do konserwacji	% plemników o ruchu postępowym	% plemników żywych	% plemników z nieuszkodzonym akrosomem	Aktywność aminotransferazy asparaginianowej
I	po pobraniu	79 ± 8,1 A	80 ± 7,8 A	74 ± 10,5 aA	150 ± 62 aA
II	po rozcieńczeniu	72 ± 9,7 B	74 ± 7,6 B	67 ± 9,0 bB	268 ± 62 bB
III	po ekwilibracji	68 ± 10,2 BC	72 ± 7,3 BC	61 ± 11,1 B	295 ± 61 B

Objaśnienie: Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w kierunku pionowym przy  $p \leq 0,05$  (a, b, c) i  $p \leq 0,01$  (A, B, C).

Tab. 2. Procent plemników o ruchu postępowym w próbach nasienia rozmrażanych w różnych temperaturach poddanych inkubacji w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  (n=21)

Grupa	Temp. rozmrażania	Czas inkubacji prób w minutach							
		0	30	60	90	120	180	240	300
I	$+4^{\circ}\text{C}$	28 ± 5,2 A	22 ± 8,1 A	15 ± 7,8 aA	9 ± 6,8 A	4 ± 5,3 A	1 ± 2,6 A	brak	—
II	$+20^{\circ}\text{C}$	32 ± 5,4 AB	27 ± 7,3 B	20 ± 7,7 bB	14 ± 9,0 AB	8 ± 8,0 a	2 ± 4,3 a	brak	—
III	$+40^{\circ}\text{C}$	35 ± 5,5 C	33 ± 4,8 C	27 ± 8,0 C	21 ± 9,4 C	14 ± 8,8 bC	6 ± 6,1 bC	3 ± 4,7	1 ± 3,9

Objaśnienie: Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w kierunku pionowym przy  $p \leq 0,05$  (a, b, c) i  $p \leq 0,01$  (A, B, C).

Tab. 3. Procent plemników żywych w próbach nasienia rozmrożonych w różnych temperaturach, a następnie inkubowanych w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  (n=17)

Grupa	Temp. rozmrażania	Czas inkubacji prób w minutach							
		0	30	60	90	120	180	240	
I	$+4^{\circ}\text{C}$	34 ± 6,6 a	29 ± 6,3 aA	24 ± 7,0 aA	21 ± 6,1 aA	17 ± 5,4 aA	13 ± 4,5 A	10 ± 4,5 A	
II	$+20^{\circ}\text{C}$	38 ± 6,7 ab	34 ± 6,2 b	30 ± 8,0 b	26 ± 7,7 b	22 ± 6,5 b	16 ± 6,5 AB	13 ± 7,2 a	
III	$+40^{\circ}\text{C}$	40 ± 5,8 b	37 ± 6,2 C	33 ± 6,8 C	30 ± 6,5 C	26 ± 6,9 C	21 ± 6,8 C	17 ± 8,6 bC	

Objaśnienie: Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w kierunku pionowym przy  $p \leq 0,05$  (a, b, c) i  $p \leq 0,01$  (A, B, C).

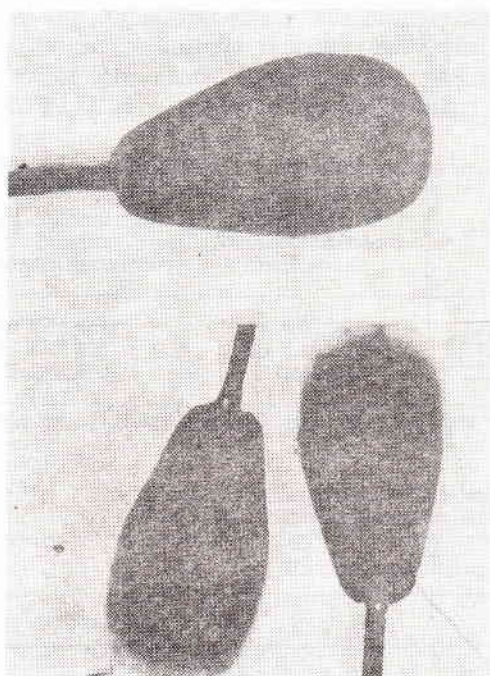
Tab. 4. Procent plemników z nieuszkodzonym akrosomem w próbach nasienia rozmrażanego w różnych temperaturach, a następnie poddanych inkubacji w temp. 37°C (n=21)

Grupa	Temp. rozmrażania	Czas inkubacji prób w minutach						
		0	30	60	90	120	180	240
I	+4°C	8 ± 6,2 A	3 ± 3,2 A	2 ± 2,4 A	1 ± 1,9 A	1 ± 1,8 A	1 ± 1,5	0,5 ± 1,1
II	+20°C	11 ± 7,0 AB	6 ± 4,2 a	4 ± 3,2 AB	2 ± 2,9 a	2 ± 2,8 a	2 ± 2,7	1 ± 2,0
III	+40°C	18 ± 12,0 C	9 ± 5,8 bC	8 ± 5,8 C	5 ± 5,5 C	4 ± 4,5 bC	3 ± 4,3	2 ± 3,3

Objaśnienie: Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w kierunku pionowym przy  $p \leq 0,05$  (a, b, c) i  $p \leq 0,01$  (A, B, C). (od 180 minuty inkubacji z uwagi na małą liczbę prób nie wykonano obliczeń statystycznych).

Tab. 5. Aktywność aminotransferazy asparaginianowej w  $\mu$ U/ml osocza nasienia prób rozmrażanych w różnych temperaturach, a następnie poddanych inkubacji

Temp. rozmrażania	n	Czas inkubacji prób w temperaturze 37°C						
		0'	30'	60'	90'	120'	180'	240'
+4°C	17	310 ± 60	315 ± 61	322 ± 67	326 ± 69	334 ± 64	343 ± 77	353 ± 86
+20°C	17	308 ± 62	310 ± 61	314 ± 64	316 ± 66	327 ± 66	338 ± 79	345 ± 86
+40°C	17	300 ± 67	303 ± 65	305 ± 65	311 ± 63	316 ± 69	325 ± 76	327 ± 76



Ryc. 1. Główka plemnika z próby kontrolnej nasienia przed mrożeniem z widoczną zwartą ciemną obwódką w części akrosomalnej. (zdjęcie górne). Wyraźne rozpulchnienie plazmolemy i części akrosomalnej zaznaczone w główkach plemników z próby poddanej procesowi zamrażania, a następnie rozmrożonej w temp. +40°C. Pow 10 000X

dzenie takiego stanu uzyskano analizując obraz plemników w mikroskopie elektronowym. W sporządzonych preparatach stwierdzono wyraźne przejaśnienie i rozpulchnienie części szczytowej plemnika (ryc. 1).

Wyniki tych badań mogą świadczyć o niedoskonałości obecnie stosowanej metody mrożenia, używanego rozrzedzalnika, a także stosowanego do rozmrażania nasienia izotoniczne-

Tab. 6. Objętość zużytego tlenu w mikrolitrach w przeliczeniu na  $10^6$  plemników w próbach nasienia rozmrażanych w różnych temperaturach w trakcie godzinnej inkubacji w aparacie Warburga w temperaturze 37°C

Temperatura rozmrażania	n	Czas inkubacji i objętość zużywanego tlenu			
		15'	30'	45'	60'
+ 4°C	6	8,05	15,30	20,75	23,38
+ 20°C	6	8,10	16,05	18,23	22,13
+ 40°C	6	15,70	23,26	27,76	31,95

go NaCl i wskazują również na konieczność wykonywania zabiegu sztucznego unasienniania natychmiast po rozmrożeniu nasienia. Wyższy procent plemników z nie uszkodzonym akrosomem odnotowali Robbins i wsp. (4) oraz Saake i White (5), przy mrożeniu i rozmrażaniu nasienia metodą słomek. W badaniach tych zauważono, że odsetek plemników z uszkodzonym akrosomem był wyższy im niższa była płodność badanych grup buhajów.

W aktywności aminotransferazy asparaginianowej, uwalnianej od osocza nasienia po rozmrożeniu badanych prób, najwyższe wartości wykazywały próby rozmrażane w temp. +4°C (tab. 5). Jest to dowodem, że temperatura ta najmniej korzystnie wpływa na strukturę komórkową plemników w trakcie rozmrażania. Mimo braku stwierdzonych zależności statystycznych można było zauważyć prawidłowość polegającą na tym, że najmniej tego enzymu uwalniane było do osocza nasienia w próbach w temp. +40°C. Zależność ta utrzymywała się później w trakcie całego okresu inkubacji.

Poziom zużywanego tlenu w próbach rozmrażanych w temp. +40°C był wyraźnie większy niż przy temperaturach rozmrażania +4°C

i +20°C (tab. 6). Wytłumaczeniem tego faktu jest stwierdzona lepsza żywotność nasienia, którą cechowały się próby rozmrażane w tym wariacie temperaturowym.

Reasumując uzyskane rezultaty należy stwierdzić, że w przypadku nasienia mrożonego w kulkach najkorzystniejsze parametry jakościowe uzyskano rozmrażając nasienie w temp. +40°C. Celowe dlatego wydaje się stosowanie produkowanych ostatnio termostatów do ogrzewania ampulek z płynem fizjologicznym. W ocenie efektywności mrożenia nasienia szczególnie przydatny okazał się test, w którym badano stopień uszkodzenia akrosomu. Badania te, jako nie wymagające skomplikowanej aparatury, mogą być zalecane w praktyce inseminacyjnej. Ogólnie stwierdzony niski odsetek plemników z nie uszkodzonym akrosomem w próbach, w których zastosowano optymalny wariant rozmrażania, wskazuje na niedoskonałość obecnie stosowanej metodyki mrożenia, jak również używanego rozrzedzalnika i rozcieńczalnika.

#### Piśmiennictwo

1. Morstin J.: Zmiany ultrastruktury plemnika buhaja w wyniku zamrażania nasienia w niskich temperaturach. Praca hab., Jastrzębiec, 1979.
  2. Pace M. M., Graham E. F.: Biol. Reprod. 3, 140, 1970.
  3. Pilch J.: Medycyna Wet. 29, 299, 1973.
  4. Robbins R. K., Saake R. G., Chandler P. T.: Animal Sci. 42, 145, 1976.
  5. Saake R. G., White J. M.: Semen quality tests and their relationship to fertility. Proc. Fourth Techn. Conf. Animal Reprod. and Artif. Insem. 2, 1972.
  6. Strzeżek J., Smitgalska J., Taha Jassim Al Taha: Medycyna Wet. 35, 353, 1979.
  7. Tischner M., Aleksander-Benda A.: Medycyna Wet. 37, 626, 1981.
  8. Wierzbowski S.: Przegl. Hod. 49, 11, 1981.
- Adres autora: doc. dr hab. Zdzisław Boryczko, ul. Częstochowska 6/11, 70-121 Szczecin

Борычко З., Удала Я., Кавенцкая М., Лясота В. — Биологические свойства бычьего семени в процессе замораживания и после разморозения

Цель работы состояла в определении качественных свойств бычьего семени, подвергнутого про-

цессу замораживания, а затем размороженного в 3 разных температурах: +40, +20, +4°C.

Полученные результаты во время размораживания семени в 3 принятых температурных вариантах позволяют отметить, что размораживание должно последовать в темп. +40°C. В этой температуре наиболее полезно формировались величины исследуемых свойств семени. Изменения по отношению к пробам, размораживаемым в темп. +20°C, а особенно в +4°C, документировал пониженный процент живчиков с поступательным движением, живых и с неповрежденным акросомом. Низшие температуры размораживания, т.е. +20°C и +4°C, вызывали также увеличенное освобождение глутамат аспартаттрансаминазы в плазме семени. Исследуемая динамика изменений во время инкубации размороженных проб семени указывает на необходимость выполнения инсеминации сразу же после разморозения. Низкий процент живчиков с неповрежденным акросомом указывает на недостатки методики замораживания как и применяемого разбавителя.

Boryczko Z., Udała J., Kawęcka M., Lasota B. — Biological properties of bull's semen in the process of freezing and after thawing

The purpose of the studies was to determine qualitative properties of bull's semen freezed and then thawed at three various temperatures: 40, 20 and 4°C. The obtained results during thawing of semen in three various temperatures show that thawing should be performed at 40°C. At this temperature the values of the examined parameters were optimal. The changes in relation to samples of semen thawed at 20°C, and especially at 4°C documented a decreased percent of spermatozoons revealing a progress movement, live and with undamaged acrosome. Lower temperatures of thawing (20 and 4°C) increased also liberation of aspartic aminotransferase into the plasma of semen. The examined dynamic of changes in the process of incubation of thawed samples of semen point to necessity of performing insemination just after thawing. Low percent of spermatozoons with undamaged acrosome points to unexcellent freezing method and the applied diluent.

SHERWOOD D., SNODGRASS R. D., LAWSON G. H. K.: Częstość występowania enterotoksynogennych szczepów *Escherichia coli* u cieląt w Szkocji i Północnej Anglii. (Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves in Scotland and northern England). Vet. Rec. 113, 203—212, 1983 (10).

Osiemdziesiąt osiem (5,7%) z 1529 szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych od cieląt zdrowych oraz od cieląt z objawami biegunki na terenie Szkocji i Północnej Anglii posiadało antygen rzęskowy K99±. Występuje przy tym bardzo ścisła zależność między obecnością tego antygeny i wytwarzaniem ciepłopornej enterotoksyny oraz rozszerzaniem izolowanej pętli jelitowej. Rozpoznanie zakażeń cieląt wywołanych przez enterotoksynogenne szczepy *E. coli* można oprzeć wyłącznie na wykazaniu obecności antygeny K99. Enterotoksynogenne szczepy *E. coli* wyosobniono z 7,5% cieląt z objawami biegunki, nie izolowano ich zupełnie od cieląt zdrowych. Badania w odczynie ELISA wykazały przy tym, że swoiste przeciwciała dla antygeny K99 występują w surowicach 3% krów i 3,9% cieląt. Enterotoksynogenne szczepy *E. coli* były odporne na streptomycynę, wrażliwe na gentamycynę i polimiksynę B, zaś 3,7% szczepów było opornych na chloramfenikol.

G.

TOO H. L., SEAMAN J. T., LITTEJOHNSON I. R., LOVC R. J.: Ocena przydatności odczynu precipitacji dyfuzyjnej do wykrywania zakażeń parwovirusowych u prosiąt. (Evaluation of a gel diffusion precipitin test for porcine parvovirus). Aust. vet. J. vet. J. 60, 161—165, 1983 (6).

W odczynie precipitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym (1%) jako antygen stosowano homogenat trzewi zmumifikowanych płodów prosiąt padłych na parwovirozę. Wyniki odczynu precipitacji dyfuzyjnej były bardzo ściśle skorelowane z wynikami odczynu zahamowanie hemaglutynacji. Po odpowiedniej standaryzacji odczyn precipitacji dyfuzyjnej może być stosowany jako tani, czuły i mało pracochłonny odczyn w rozpoznawaniu zakażeń prosiąt wywołanych przez parwovirusy. Swoiste przeciwciała dla parwovirusów utrzymują się w surowicy prosiąt przez okres 41 tygodni po zakażeniu i można je wykryć odczynem precipitacji dyfuzyjnej. W stadach, gdzie zakażenia parwovirusami występują endemicznie w oparciu o ten odczyn i odczyn HI można wykazać obniżanie się odporności biernej i narastanie odporności czynnej.

G.