

JACEK KRÓLIŃSKI, [KAROL MARCHINKOWSKI*], ZBIGNIEW ŁUKASZEWSKI,
JOANNA OTACHEL-HAWRANEK

Wykorzystanie transferu zarodków bydłych do uzyskiwania zdrowego potomstwa od białaczkowych matek*)

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Rodakowskiego 6, 50-966 Wrocław
* Katedra Patologii Rozrodu Zwierząt i Klinika Położnicza, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Summary

Bovine embryo transfer as a method to get healthy offspring derived from cows infected with enzootic bovine leukaemia virus (EBLV)

The purpose of the work was to confirm the possibility of embryo transfer to protect offspring of leukaemic cows of high breeding value from infection with EBLV. The studies were carried out on 229 donors of embryos infected with the EBLV. Heifers free from enzootic leukaemia were receivers of the embryos. The disease was diagnosed both in the donors, receivers and new-born calves by the gel precipitation test or ELISA. From 152 donors 1390 embryos were obtained and only 676 (48.6%) were qualified as suitable. There were transferred 585 embryos resulting in 278 pregnant cows (the efficacy of the transfer was 47.5%). There were born 274 calves free from leukaemia and 4 died during parturition. The transfers and new-born calves were housed in isolation under conditions which protected them against EBLV. The studies showed that the transfer of embryos was an effective method allowing to get healthy offspring from leukaemic cows on condition that strict prophylactic measures during the operation and pregnancy and after calving were applied.

Szerokie rozpowszechnienie w kraju enzootycznej białaczki bydła sprawia, że zaistniała potrzeba opracowania skutecznych, nowoczesnych programów walki z tą chorobą. Dotychczasowe metody zwalczania chorób zakaźnych opierały się w głównej mierze na likwidacji nosicieli zaradków. Pożądane efekty osiągnąć kosztem poważnych strat, powstałych w następstwie konieczności eliminowania z hodowli zwierząt o wysokiej wartości genetycznej, warunkującej odpowiedni poziom produkcji. Odtworzenie tego cennego materiału nie było sprawą łatwą i wymagało wieloletniej pracy hodowlanej.

Wydaje się, że istotną rolę w zapewnieniu ciągłości produkcji zdrowego oraz wartościowego materiału hodowlanego może w najbliższym okresie oraz w latach następnych odegrać transfer zarodków. W warunkach niekontrolowanych, przenoszenie zarodków może jednak stanowić poważne niebezpieczeństwo szerzenia się chorób zakaźnych (1). Do zakażenia zarodków może dojść bądź poprzez same komórki rozrodcze (1), bądź też przez zakażone środowisko (1), w którym zarodki się znajdują. Dotychczasowe obserwacje wykazały, że tylko nieliczne mikroorganizmy stwierdza się w oocytach (1). Można sądzić, że największą rolę w zakażeniu zarodka odgrywa jego bezpośredni kontakt z zakażonym środowiskiem (1). Zagrożenie biocyrni i rozwijającego się zarodka będzie zależało od koncentracji i zjadliwości drobnoustrojów. Istotną barierą chroniącą zarodek przed zakażeniem jest przede wszystkim osłonka przejrzysta (8). Dotychczasowe badania wykazały, że przy nieuszkodzonej osłonce przejrzystej, żaden z przebadanych patogennych wirusów nie podlega replikacji w komórkach zarodka (1). Zdarza się to jedynie przy uszkodzonej

osłonce lub po jej wcześniejszym usunięciu (1). Ponieważ część z nich podlega inaktywacji pod wpływem trypsyny, zarodki przed przeniesieniem powinny być inkubowane w pożywkach zawierających ten enzym (1, 8).

Z obserwacji różnych autorów (2, 3, 4, 7, 9) wynika, że osłonka przejrzysta jest nieprzepuszczalna dla wirusa BL. Istnieje jednak potencjalne niebezpieczeństwo adhezji kruszywa komórkowego, a w szczególności zakażonych BLV limfocytów, znajdujących się w wypłuczynach z macicy, pobranych od zakażonych tym wirusem dawczyń zarodków, w stosunku do osłonki przejrzystej. Można go uniknąć poddając wypłukane z macicy zarodki przed ich przeniesieniem lub dzieleniem wielokrotnym kąpielom w jałowych pożywkach, uwalniającym je od zanieczyszczeń komórkowych.

Celem badań było potwierdzenie możliwości wykorzystania metody transferu zarodków do zabezpieczenia potomstwa krów białaczkowych o wysokiej wartości hodowlanej przed zakażeniem BLV.

Materiał i metody

Zarówno dawczyni, jak i biocyrni zarodków użyte do badań, pochodziły ze stad zlokalizowanych na terenie Dolnego Śląska, wolnych od gruźlicy i brucelozy. Enzootyczną białaczkę bydła u dawczyń i biocyrni zarodków oraz urodzonych cieląt diagnozowano testem immunodiffuzji w żelu agarowym oraz przy użyciu antygenu glikoproteinowego firmy Hoechst albo Rhône-Merieux lub testem ELISA, wykorzystując gotowe zestawy Enzygnost Rinderleukose firmy Behringwerke. Badanie dawczyń i biocyrni przeprowadzano w okresie przygotowania do transferu, zaś urodzonych cieląt przed napojeniem siarą pochodzącą od ich matek-biocyrni zarodków.

Superowulację wywoływano u 229 potencjalnych dawczyń, którymi były wyselekcjonowane wcześniej wartościowe krowy rasy cb, czb oraz charolaise w wieku 4–12 lat, zakażone wirusem BL. Zwierzęta znajdowały się w trzeciej lub późniejszej laktacji. Ostatni poród przebiegał u nich fizjologicznie, a błony płodowe zostały wydalone we właściwym terminie. W okresie poporodowym nie obserwowano u nich powikłań w postaci nieżyłtów macicy i torbieli jajnikowych, a ruja pojawiała się w regularnych odstępach czasu. Użyte do doświadczeń jałówki, biocyrni zarodków w liczbie 585, w wieku około 18 miesięcy, były wolne od białaczki, a stan ich narządu rodowego i przebieg cyklu jajnikowego nie odbiegały od normy. Dla potrzeb transferu ruje były u nich synchronizowane przy użyciu preparatu Oestrophan firmy Spofa, podawanego dwukrotnie w odstępach 12 dni, w dawce 0,5 mg analogu PGF₂ alfa.

Wywoływanie superowulacji u dawczyń zarodków rozpoczęto około 60 dnia po porodzie, podając między 8 a 14 dniem, najczęściej jednak w 9 dniu po wystąpieniu spontanicznej lub synchronizowanej ruji, gonadotropinę przysadkową FSH P firmy Burns, w ilościach 32–38 mg na krowę oraz Folliculotropin firmy Spofa w ilościach 480 j.m. na sztukę lub gonadotropinę pozaprzysadkową zawartą w preparacie Foligon PMSG w ilości 2500–3500 j.m. na jedną dawczynię. Gonadotropinę przysadkową FSH podawano domięśniowo w 8 podzielonych dawkach przez 4 kolejne doby, w odstępach 12-godzinnych, według ustalonej sekwencji, zaś gonadotropinę pozaprzysadkową PMSG stosowano jednorazowo. Po upływie 48 godzin od pierwszej iniekcji jednej z gonadotropin, podawano domięśniowo Oestrophan w dawce

*) Praca wykonana w ramach CPBP 05.06.2.1.1.

0,5 mg. Dawczyni inseminowano pierwszy raz między 10 a 12 godziną od początku rui podwójną dawką nasienia buhajów wolnych od białaczki, deponując jedną porcję do jednego, a drugą do drugiego rogu macicy, po czym po upływie 5—6 godzin u krów, u których superowulację wywoływano gonadotropiną pozaprzysadkową, podawano preparat Neutral PMSG firmy Intervet. Dwukrotną reinseminację przeprowadzano w odstępach 8-godzinnych, wprowadzając każdorazowo, doszykowo jedną porcję nasienia.

Zarodki pozyskiwano metodą niechirurgiczną w 7 dniu po inseminacji. Przed zabiegiem samicom podawano i.m. preparat Uterusrelaxans (Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG Hannover) w dawce 20 ml, względnie wykonywano znieczulenie nadoponowe przy użyciu 5 ml 2% roztworu Polocainy firmy Polfa. Do każdego rogu macicy wprowadzano przy pomocy kateteru do wypłukiwania zarodków (typ 18) po 500 ml ogrzanego do temperatury 34°C PBS firmy Biovet z dodatkiem 2% surowicy płodowej. Odzyskane wypłuczyny wraz z wypłukanymi zarodkami zlewano do jałowej butelki o pojemności jednego litra, po czym po 30 min. sedimentacji zlewano płyn z nad osadu, pozostawiając w butelce około 70 ml zawartości, którą przenoszono na jałowe płytki Petriego. Zarodki wyszukiwano w mikroskopie stereoskopowym, po czym przenoszono je do wypukłych naczynek, zawierających 5 ml ogrzanego do temp. 34°C jałowego płynu PBS z dodatkiem 2% surowicy płodowej. Po ocenie morfologicznej uwzględniającej również stan osłonki przejrzystej i zakwalifikowaniu zarodków do transferu, poddawano je 4-krotnym kąpielom w PBS z dodatkiem 2% surowicy płodowej, zmierzającym do uwolnienia ich od limfocytów znajdujących się w pobranych wypłuczynach, mogących ulec adhezji w stosunku do osłonki przejrzystej, będących potencjalnym źródłem wirusa BL. Tak przygotowane zarodki świeże umieszczano w słomkach typu Casseu i wprowadzano pistoletem typu Wörlein, przygotowanym do transferu, wolnym od białaczki jałowkom-biorczyniom, w przeciągu 2—4 godzin od pobrania, względnie poddawano mrożeniu lub dzieleniu. Pistolet wprowadzano do rogu, do którego przylegał jajnik z wyraźnie wykształconym ciałkiem żółtym, na głębokość około 5—8 cm od zakończenia rogu. Rezygnowano z tych biorczyń, u których na jednym z jajników stwierdzano wyraźnie wykształcone ciałko żółte, zaś na drugim obecność pęcherzyka.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych różnic w oddziaływaniu na jajniki amerykańskiej oraz

Tab. 1. Wyniki superowulacji u dawczyń zarodków — liczba (%)

| Liczba krów poddanych superowulacji | Krowy, u których stwierdzono na obu jajnikach | | |
|-------------------------------------|---|--------------------|--------------------|
| | powyżej 5 ciałek żółtych | 3—5 ciałek żółtych | 0—2 ciałek żółtych |
| 229 | 145 (63,3) | 24 (10,5) | 60 (26,2) |

Tab. 2. Wyniki oceny morfologicznej zarodków — liczba (%)

| Liczba dawczyń zarodków | Liczba uzyskanych zarodków | Liczba zarodków z jednego pozyskiwania | Zarodki zakwalifikowane do transferu | Zarodki nie zakwalifikowane do transferu |
|-------------------------|----------------------------|--|--------------------------------------|--|
| 152 | 1390 | 9,1 | 676 (48,6) | 714 (51,4) |

Tab. 3. Skuteczność przeprowadzonych transferów zarodków

| Przeniesione zarodki | | | | | | | | | | | |
|----------------------|--------------------------------------|---------------|---------|--------------------------------------|---------------|----------|--------------------------------------|---------------|--------|--------------------------------------|---------------|
| świeże | | | mrożone | | | dzielone | | | ogółem | | |
| liczba | liczba uzyskanych cięż po transferze | skuteczność % | liczba | liczba uzyskanych cięż po transferze | skuteczność % | liczba | liczba uzyskanych cięż po transferze | skuteczność % | liczba | liczba uzyskanych cięż po transferze | skuteczność % |
| 493 | 241 | 48,9 | 73 | 29 | 39,7 | 19 | 8 | 42,0 | 585 | 278 | 47,5 |

czeskiej gonadotropiny przysadkowej FSH. Po zastosowaniu gonadotropiny pozaprzysadkowej PMSG, na jajnikach obok ciałek żółtych stwierdzano również obecność pojedynczych lub mnogich tworów torbielowatych. Negatywne odpowiedzi superowulacyjne zdarzały się zarówno po zastosowaniu FSH, jak i PMSG. Wydaje się, że wyniki wywoływania superowulacji oraz samego transferu były skorelowane z poziomem żywienia zwierząt. Lerner (5) wykazał, że z wiekiem krów obniża się liczba pozyskiwanych zarodków i zmniejsza się wskaźnik zapłodnienia. U krów starszych zwiększenie dawki FSH powoduje wzrost liczby pozyskanych zarodków. U krów młodszych zwiększenie dawki FSH ma niekorzystne skutki. Przy podawaniu FSH w 10 i 11 dniu cyklu uzyskiwano więcej zarodków niż przy podawaniu FSH w 7—9 i 12—14 dniu cyklu. W badaniach własnych w wyniku superowulacji 229 potencjalnych dawczyń zarodków, będących nosicielami wirusa BL, uzyskano 145 (63,3%) odpowiedzi dobrych, przy których stwierdzano powyżej 5 ciałek żółtych na obu jajnikach, 24 (10,5%) odpowiedzi mierne (3—5 c.ż.) oraz 60 (26,2%) niedostatecznych, wyrażających się brakiem ciałek żółtych lub obecnością 1—2 punktów owulacyjnych na jajnikach (tab. 1). Ogółem od 152 dawczyń uzyskano 1390 zarodków o zróżnicowanej jakości, co dawało średnio 9,1 od jednej samicy (tab. 2). Rutynowa ocena morfologiczna przeprowadzana przy użyciu mikroskopu stereoskopowego przed transferem nie zawsze zapewniała uchwycenie wszystkich anomalii rozwojowych. Pełniejszy obraz morfologicznej jakości zygot dają badania ultrastrukturalne (6). Z ogólnej liczby 1390 ocenianych zarodków do transferu zakwalifikowano jedynie 676, co stanowiło 48,6%. Pozostałych 714 czyli 51,4% nie zakwalifikowano do przeniesienia. Były to zarodki opóźnione w rozwoju lub zdegenerowane (tab. 2). Ogółem przeniesiono 583 zarodków, uzyskując 278 cięż, co dawało skuteczność zabiegu na poziomie 47,5% (tab. 3). Najlepsze efekty uzyskano po przeniesieniu całych zarodków świeżych, nieco gorsze po transferze zarodków dzielonych i najgorsze po wykorzystaniu zarodków mrożonych. Urodziły się 274 żywe, wolne od białaczki cielęta, zaś 4 padły podczas porodu. Zarówno biorczynie zarodków, jak i urodzone cielęta utrzymywane były w izolacji w oddzielnych pomieszczeniach, w warunkach zabezpieczających je przed zakażeniem wirusem białaczki.

Ujemne wyniki badań serologicznych w kierunku EBB biorczyń oraz cieląt dowodzą, że transfer zarodków okazał się skutecznym sposobem uzyskiwania zdrowego potomstwa od białczkowych matek, pod warunkiem przestrzegania określonych rygorów podczas samego zabiegu, jak również zapewnienia odpowiednich warunków izolacji i utrzymania zwierząt w czasie ciąży i po urodzeniu.

1. Bielanski A., Tischner M.: Przeszczepianie zarodków u zwierząt gospodarskich. AR, Kraków 1988.
2. Boutilant A. M. P., Ruckerbauer G. M., Eaglesome M. D., Samagh B. S., Singh E. L., Hare W. C. D., Randall G. C. B.: Ann. Rech. Vet. 12, 385, 1981.
3. Eaglesome M. D., Mitchell D., Betteridge K. J., Randall G. C. B., Singh E. L., Samagh B. S., Hare W. C. D.: Vet. Rec. 111, 122, 1982.
4. Kaaden O. R.: Rinderproduktion 33, 14, 1987.
5. Lerner S. P.: Anim. Sci. 36, 176, 1986.
6. Marcinkowski K., Kassner J.: Weterynaria, Wrocław 44, 53, 1988.
7. Olson C., Rowe R. F., Kaja R.: Proc. 4th Int. Symposium on Bovine Leukosis Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London, 1982, s. 361.
8. Thibier M.: Proc. 13th Conf. OIE Regional Comm. Europe, Madrid, 27-30 September 1988, s. 3.
9. Wierzbowski S., Smorąg Z., Wierżchoś E.: Przenoszenie zarodków u bydła. Balice-Przysiek 1985, s. 10.

Adres autora: dr Jacek Króliński, ul. Gwarecka 7/5, 54-143 Wrocław

JÓZEF PILASZEK, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

Rola środowiska w szerzeniu się infekcji narządu rodowego u bydła drobnoustrojami *Ureaplasma*

Zakład Mikrobiologii, Instytut Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

The role of environment on the distribution of infections of the reproductive tract caused by *Ureaplasma* microorganisms in cattle

The purpose of the work was to determine the role of contaminated environment by *U. diversum* as a source of infections of the reproductive tract in cattle. It has been found that the period of *Ureaplasma* microorganisms survival outside the animals is relatively short, i.e. within 24 hours limits. However, it is long enough to make possible infection of the preputial mucosa of bulls. In contrast, heifers are rarely infected under those conditions. Carriers of *U. diversum* play an important role in the infection: their faeces sustain a permanent infection of environment. It constitutes a source of infection for animals free from infection. For prophylactic purposes one should take into account the need of carries removal by use of chemotherapeutics. Besides, an important role plays hygiene of cowsheds.

każone przez *U. diversum* środowisko bytowania bydła może być uznane za potencjalne źródło infekcji u tych zwierząt.

Materiał i metody

Szczepy. W badaniach użyto szczepu laboratoryjnego *U. diversum* nr 368K. Był on wyosobniony od krowy z objawami grudkowego zapalenia sromu i pochwy (*vulvovaginitis granulatis* — VVG).

Podłoża. Do izolacji i namnażania *U. diversum* użyto płynnego i stałego podłoża TP, opisanego uprzednio (8). Zwierzęta doświadczalne. Do badań użyto 2 buhajów i 2 jałówek w wieku około 18 miesięcy. Celem zlikwidowania ewentualnej wcześniej występującej infekcji wywołanej przez *U. diversum*, zwierzętom doświadczalnym podano domięśniowo Biotyl-200 w ilości 5 ml na 100 kg c.c. przez 6 kolejnych dni. Okres od podania ostatniej dawki preparatu do dnia, w którym przystąpiono do doświadczenia wynosił 14 dni lub więcej.

Materiał do badań laboratoryjnych. Od zwierząt doświadczalnych pobierano wymazy z błony śluzowej worka napletkowego lub pochwy za pomocą wacika. Również wacikiem pobierano materiał z podłogi stanowisk, w których przebywały zwierzęta doświadczalne. Do badań zmierzających do izolacji ureaplazm, użyto również trzech próbek, zawierających kał zmieszany z moczem. Pobrano je w odstępach kilkudniowych ze stanowiska buhaja zakażonego doświadczalnie *U. diversum*. Każdą z pobranych próbek, po dokładnym wymieszaniu, podzielono na trzy części. Jedną część przechowywano w temperaturze pokojowej, drugą w temperaturze lodówki, a trzecią wysuszono. Z dwóch pierwszych próbek materiał do badań pobierano przy pomocy wacików, a z części wysuszonej brano 100 mg materiału. W podobny sposób, lecz bez suszenia, postępowano z trzema próbkami gnojowicy pobranej z kanału ściekowego. Izolację ureaplazm przeprowadzono w dniu pobrania materiału, po 24 i 48 godzinach.

Doświadczalne zakażenia zwierząt. Dwa buhaje wolne od infekcji *U. diversum* w worku napletkowym oraz dwie jałowki nie posiadające tych zarodków w pochwie, umieszczono w stanowiskach bezściółkowych na 3 dni przed doświadczeniem. W tym czasie codziennie wykonywano badania w kierunku izolacji ureaplazm z napletka lub pochwy tych zwierząt oraz z podłogi ich stanowisk. Następnie na podłogę każdego z tych stanowisk rozpylono po około 20 ml hodowli szczepu 368K otrzymanej na płynnym podłożu TP. Z hodowli płynnej przeznaczonej do rozpylania wykonano posiewy na płynne i stałe podłoża służące do izolacji ureaplazm w celu sprawdzenia czy użyta do rozpylania hodowla zawierała żywe zarazki. Po 4 tygodniach od rozpylenia hodowli pobrano wymazy z podłogi stanowisk w celu sprawdzenia, czy po rozpyleniu na podłożu znajdują się żywe zarazki. Rozpylenie żywej hodowli tego samego szczepu powtórzono po 3 dniach w przypadku stanowisk jałówek nr 1 i 2, a po następnych 3 dniach w przypadku stanowiska jałowki nr 2. W trakcie trwania doświadczenia, przez 10 dni pobierano wymazy z napletka lub pochwy oraz z podłogi stanowisk do badań w kierunku izolacji drobnoustrojów *Ureaplasma*.

Z wykonanych dotąd badań własnych (10, 11) wynika, że hodowlą szczepów *U. diversum*, wyizolowanych od zwierząt tej samej płci, jak też szczepów wyosobnionych od zwierząt płci odmiernej, udaje się zakażać błonę śluzową napletka lub pochwy u bydła. Infekcję tymi zarazkami można też przenieść ze zwierzęcia zakażonego na zwierzę wolne od tych zakażeń za pomocą śluzu pobranego z zewnętrznych narządów płciowych. Potwierdzono również (9) pogląd innych autorów (1, 3, 6), iż infekcja *U. diversum* przenosi się w czasie aktu krycia z udziałem zwierzęcia zakażonego, a u krów szerzy się drogą inseminacji, jeżeli od tego zabiegu używa się nasienia zawierającego ureaplazmy. Zauważono też (9), że kontakt płciowy lub inseminacja nie są jedynymi sposobami zakażenia układu rozrodczego.

Występowanie *U. diversum* w miedniczkach nerkowych (10, 11), pęcherzu moczowym (2, 10, 11, 13), cewce moczowej (2, 4, 10, 11, 13) i w moczu (7) wskazuje na to, że zarazki te mogą być wydzielane wraz z moczem do środowiska. Przypuszczenia te potwierdzają udane próby izolacji ureaplazm z podłogi stanowiska, gnojowicy i skóry zwierząt zakażonych oraz pojawienie się infekcji narządów rozrodczych u buhajów i jałówek nie zakażonych w żaden przyjęty dotąd sposób (9). Można więc przypuszczać, że zanieczyszczone *U. diversum* środowisko odgrywa również rolę w przenoszeniu infekcji tymi zarazkami. Z tego też względu wykonano dalsze badania, których celem było określenie, czy za-