

IZABELLA ZGÓRNIAK-NOWOSIELSKA, JERZY BRANNY

## Mykoplazmy w nasieniu buhajów

### I. Izolacja i niektóre właściwości mykoplazm występujących w nasieniu buhajów

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM w Krakowie  
Kierownik: prof. dr Z. PRZYBYŁKIEWICZ

Znaczenie i rolę patogenną drobnoustrojów z rodzaju *Mycoplasma* odkryto dużo wcześniej w medycynie weterynaryjnej aniżeli w medycynie ludzkiej (5).

Szczepy zwierzęce izolowano prawie od wszystkich zwierząt domowych i laboratoryjnych, a wśród nich wiele szczepów patogennych. U przeżuwaczy wg systematyki Bergey'a (11), występują 3 gatunki mykoplazm: *M. mycoides var. mycoides* i *var. capri*, *M. agalactiae* i *M. bovinegenitalium*. Rola chorobotwórcza dwóch pierwszych jest bezsporna; *M. mycoides* najwcześniej izolowany szczep bydłocy z przypadków pleuropneumonii wywoływał groźne epizootie szerzące się na wszystkich kontynentach świata, zwłaszcza w krajach o rozwiniętej hodowli bydła. Morfologię i cykl rozwojowy tego drobnoustroju opisał Nowak (14). *M. agalactiae* wywołuje *mastitis* i związaną z nim zakaźną bezmleczność kóz i owiec, zaś u ok. 20% zwierząt zakażonych w warunkach doświadczalnych również *arthritis*. Ostatnio wykryto odmianę tego gatunku występującą u bydła i wywołującą *mastitis* u krów, a Hale i wsp. (12) w 1962 r. zaproponowali nazwę *M. agalactiae var. bovis*.

Pogląd na rolę chorobotwórczą trzeciego gatunku *M. bovinegenitalium* zmieniał się w ciągu ostatnich lat i znaczenie występowania mykoplazm w drogach rodnych bydła jest nadal sprawą otwartą. Kiedy po raz pierwszy izolowano ten drobnoustrój z dróg rodnych krów podejrzewano, że może on być przyczyną bezpłodności bydła (6, 8), jednakże późniejsze badania nie potwierdziły tego poglądu (2, 7). W latach sześćdziesiątych ukazały się doniesienia o izolacji *M. bovinegenitalium* z przypadków naturalnych zakażeń u bydła. I tak Stuart i wsp. (16) w 1963 r. izolowali ten drobnoustrój z przypadków *mastitis*, a Afshar (1) wiązał obecność szczepu *M. bovinegenitalium* z obserwowanym przez niego *vulvovaginitis* u bydła. W związku ze stosowaniem na coraz szerszą skalę sztucznego unasieniania bydła zwłaszcza w warunkach długotrwałego przechowywania nasienia w stanie zamrożonym, nowego znaczenia nabiera sprawa kontroli jałowości nasienia, w tym również kontrola na obecność mykoplazm.

#### Materiał i metody

W okresie od stycznia 1968 r. do lutego 1969 r. przebadano 141 próbek nasienia pochodzącego od 115

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania  
Zwierząt Instytutu Zootechniki Balice k/Krakowa  
Kierownik: doc. dr S. WIERZBOWSKI

buhajów z 4 Państwowych Zakładów Unasieniania Zwierząt (PZUZ)\*. Próbkę nasienia pobierano do jałowych próbek i przechowywano w płynnym azocie do momentu ich badania.

#### Podłoża

Do izolacji mykoplazm stosowano PPLO-Agar (Difco), oraz podłoże bulionowe, przygotowywane z Beef Heart for Infusion (Difco). Podłoża wzbogacano surowicą końską (20%), oraz wyciągiem drożdżowym (10%) (Fleischmann Active Dry Yeast) przygotowywanym wg instrukcji Armstronga (3). Do bulionu dodawano ponadto 0,5% glikozy i 0,002% czerwieni fenolowej, pH ustalano na 7,0, 7,4 względnie 7,6. Przy posiewie materiału wyjściowego dodawano również dla zahamowania wzrostu innych drobnoustrojów 500 j/ml penicyliny oraz octan talu w stężeniu końcowym 1:2000.

#### Technika izolacji

Badane materiały posiewano bezpośrednio na podłoża stałe oraz bulion i hodowano w 37°C. Hodowle bulionowe przesiewano na podłoża agarowe po 2, 3 lub 4 dniach inkubacji. Ponadto w jednej partii badanego nasienia (35 próbek z zakładu B) wykonano dodatkowo pasaż 4 dniowej hodowli bulionowej na świeże podłoże bulionowe, a następnie po 3 dniach inkubacji hodowle tę posiewano na płytki agarowe. Wszystkie płytki agarowe zakażone albo bezpośrednio badanym materiałem albo hodowlą bulionową były hodowane w warunkach tlenowych, niektóre z nich (próbki z zakładu C-29 materiałów) także w środowisku 10% CO<sub>2</sub>. Płytki zakażone obserwowano w ciągu 3 tygodni pod małym powiększeniem mikroskopu. Izolowane szczepy pasażowano trzykrotnie metodą bloczków agarowych oraz w podłożach bulionowych. Hodowle płynne oraz bloczki agarowe przechowywano do dalszego badania w temp. ok. -20° i w płynnym azocie.

W jednym z zakładów (B) nasienie pobierano od tych samych buhajów 2 lub 3 krotnie w różnych odstępach czasu, w celu stwierdzenia utrzymywania się mykoplazm w nasieniu.

#### Badanie biochemiczne szczepów

Izolowane szczepy mykoplazm, które utrzymywały się w dalszych kolejnych pasażach zbadano w kierunku zdolności fermentowania cukrów, rozkładu mocznika i argininy (17) oraz wytwarzania hemolizyn (15).

Wzrost w obecności różnych stężeń surowicy końskiej.

Wymagania odżywcze izolowanych szczepów w stosunku do surowicy zawartej w podłożu badano posiewając hodowle na podłoża o różnych stężeniach surowicy końskiej, a mianowicie 5, 10 i 15% oraz na podłoża agarowe bez surowicy.

#### Test zahamowania wzrostu

Izolowane szczepy zbadano w odczynie zahamowania wzrostu używając surowic odpornościowych dla szczepu *M. bovinegenitalium* i *M. laidlawii* B oraz szcze-

\* Zakłady oznaczono umownie A, B, C i D.

pu T-11. Surowicę odpornościową dla szczepu T-11 uzyskano poprzednio w Instytucie Wistar w Filadelfii (18). Test wykonano na płytkach agarowych stosując metodę opisaną przez Clyde'a (4).

#### Analiza cielności krów

Dla określenia ewentualnego wpływu obecności mykoplazm w nasieniu buhajów na płodność inseminowanych krów przeprowadzono analizę „niepowtarzalności” (N. R. — non returne — test) w 60—90 dni po pierwszym unasienianiu. Obserwację prowadzono w oparciu o dane uzyskane z PZUZ w okresie 6 miesięcy. Czas obserwacji obejmował okres 2 miesięcy przed pobraniem nasienia do badania, oraz 4 miesiące po stwierdzeniu obecności mykoplazm w nasieniu. Analiza dotyczyła zarówno buhajów, których nasienie badano w kierunku obecności mykoplazm, jak i pozostałych (kontrolne).

#### Wyniki

Wynik obserwacji nad występowaniem mykoplazm w nasieniu buhajów hodowlanych w 4 PZUZ przedstawiano w tab. 1.

Tab. 1

PZUZ	Liczba badanych próbek nasienia	Liczba badanych buhajów	Liczba buhajów od których izolowano mykoplazmy
A	40	40	5
B	64*)	38	18
C	29	29	2
D	8	8	6
Razem	141	115	31

\*) Z 64 próbek nasienia (badanie kilkakrotne tych samych buhajów) w 26 próbkach stwierdzono obecność mykoplazm.

Ogółem zbadano 141 próbek nasienia pochodzącego od 115 buhajów. Obecność mykoplazm stwierdzono w nasieniu 31 buhajów (26,9%).

W zakładzie A, C i D nasienie do badania pobrano jednorazowo, natomiast w zakładzie B kilkanaście buhajów przebadano 2 i 3-krotnie. Nasienie pobierano tam w odstępach 8 i 11 miesięcy i stwierdzono, że w tym okresie czasu mykoplazmy utrzymywały się u niektórych buhajów. Spośród 4 buhajów badanych trzykrotnie u jednego (nr 637) mykoplazmy izolowano za każdym razem, u dwóch (542 i 632) szczepy izolowano dwukrotnie po 11 miesiącach, natomiast u jednego buhaja (nr 544) izolowano mykoplazmy tylko jednorazowo. Spośród 11 zwierząt badanych dwukrotnie w odstępie 8 miesięcy uzyskano dodatnie izolacje u 2 buhajów (nr 507 i nr 534), natomiast u pozostałych izolowano szczepy tylko jednorazowo. W tym samym czasie kontrolowano również 4 buhaje, u których w pierwszym badaniu nie stwierdzono w nasieniu mykoplazm. Dwa z nich (nr 530 i nr 555) zbadano trzykrotnie, a 2 sztuki (nr 503 i nr 520) dwukrotnie i u żadnego nie stwierdzono obecności tych drobnoustrojów.

Wyniki częstości izolacji mykoplazm na podłożach płynnych i stałych przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2. Częstość izolacji szczepów na podłożu agarowym i bulionie

Liczba badanych buhajów	Izolacje dodatnie			Razem
	tylko na podł. agarowym	na podł. agar. oraz w hod. bulionowej	tylko w hod. bulionowej	
115	21	8	2	31

Analizując częstość izolacji mykoplazm na podłożach agarowych zakażonych bezpośrednio nasieniem oraz zakażonych hodowlą bulionową stwierdzono, że zdecydowanie więcej wyników dodatnich (29 z 31) uzyskano na pytkach agarowych zakażonych bezpośrednio nasieniem. Wśród tych szczepów tylko 8 rosło także na płytkach zakażonych hodowlą bulionową. Pasażując próbki nasienia w podłożu bulionowym uzyskano natomiast wzrost 2 szczepów, które nie rosły na płytkach agarowych zakażonych bezpośrednio nasieniem. Hodowanie zakażonych płytek w atmosferze 10% CO<sub>2</sub> oraz ślepy pasaż hodowli bulionowej na świeże podłoże płynne nie zwiększyło częstości dodatnich wyników. Pojawienie się kolonii na płytkach agarowych obserwowano po 3—7 dniach inkubacji, kilka szczepów rosło wolniej tj. 10—14 dni. Na płytkach agarowych zakażonych bezpośrednio badaniem nasieniem rzadko obserwowano dużą liczbę kolonii. Zwykle izolowano jedną lub kilka kolonii a tylko w nielicznych przypadkach wzrost był obfity.

Spośród szczepów izolowanych od różnych buhajów 26 utrzymywano w ciągłych pasażach. Przed określeniem ich niektórych własności biochemicznych szczepy te były dwukrotnie klonowane.

Własności biochemiczne. Spośród badanych szczepów żaden nie rozkładał argininy ani mocznika. Jeden szczep nr 539 fermentował glikozę i maltozę, pozostałe natomiast nie zmieniały lub słabo zakwaszały podłoże z glikozą. Szczepy laboratoryjne\*) użyte do kontroli tych prób biochemicznych dawały reakcje dodatnie: *M. loidlawii* A i *M. laidlawii* B fermentowały glikozę i maltozę, *M. hominis* rozkładał argininę a szczep T-60 — mocznik. Wszystkie izolowane szczepy wywoływały wyraźną hemolizę krwinek świnki morskiej oraz nieco słabszą hemolizę krwinek króliczych i baranich. Zbyt duże zagęszczenie kolonii mykoplazm na płytkach agarowych pokrytych warstwą agaru z krwinkami powodowało zahamowanie wystąpienia hemolizy a optymalne *inoculum* uzyskano rozcieńczając 48-godz. hodowle bulionowe 10<sup>-4</sup> lub 10<sup>-5</sup>. Wszystkie badane szczepy rosły nawet przy najniższym stężeniu surowicy w podłożu, jed-

\*) Szczepy laboratoryjne *M. bovigenitalium* oraz *M. laidlawii* uzyskano dzięki uprzejmości dr Freundta z Danii, szczep *M. hominis* od dr Hayflicka z Filadelfii, szczep T-60 od dr Porębskiej z Krakowa.



nakże morfologia kolonii ulegała wyraźnym zmianom przy stężeniu 5% w porównaniu z hodowlą na podłożu standardowym. Tylko jeden szczep nr 539 rósł także na podłożu bez surowicy.

Badania serologiczne izolowanych szczepów przeprowadzono w odczynie zahamowania wzrostu z surowicami odpornościowymi dla szczepów: *M. boviris*, *M. laidlawii* B oraz szczepu T-11 pokrewnego do *M. hyorhinis*. Stwierdzono zahamowanie wzrostu szczepu nr 539 z surowicą odpornościową dla *M. laidlawii* B. Pozostałe szczepy nie wykazywały reakcji dodatniej z wymienionymi powyżej surowicami.

Na podstawie analizy cielności krów inseminowanych nasieniem buhajów, w którym stwierdzono obecność mykoplazm, wykazano, że w badanym okresie nie nastąpiło obniżenie płodności u obserwowanych sztuk. Procent krów nie powtarzających po pierwszym unasiennianiu (60—90 dni) nie odbiegał od wartości uznawanych za normalne.

### Dyskusja

Przedmiotem badań (9, 10, 13), było występowanie mykoplazm w drogach rodnych bydła, jednakże rola ich w schorzeniach tego układu oraz wpływ na bezpłodność krów nadal jest sprawą otwartą. Stwierdzenie obecności mykoplazm w nasieniu buhajów w tak wysokim odsetku może mieć znaczenie, zwłaszcza w związku ze stosowaniem sztucznej inseminacji. Użycie bowiem niepełnowartościowego nasienia pochodzącego nawet od jednego buhaja w tych warunkach zapłodnienia może wywołać masowe zakażenie zacielenych krów i w następstwie dalsze tego epizootologiczne konsekwencje. Częstość izolowania mykoplazm od buhajów w poszczególnych zakładach była różna. Dobór badanych buhajów w zakładzie A, B i C był dowolny. Odsetek buhajów u których w nasieniu stwierdzono obecność mykoplazm wynosił odpowiednio 12,5%, 47,3% i 6,8%. Bardzo wysoka liczba buhajów zakażonych mykoplazmami w zakładzie D (6 spośród 8 badanych) wynikać może z faktu, że sztuki z tego ośrodka były specjalnie wybrane do badania i poprzednio wykazano u nich zmiany w nasieniu (słaba ruchliwość plemników), oraz objawy kliniczne w postaci stanów zapalnych jąder i najądrzy. Na uwagę zasługuje fakt wielokrotnego izolowania mykoplazm od niektórych buhajów w ciągu dosyć długiego okresu obserwacji, bo 8 i 11 miesięcy. W chwili obecnej nie można przesądzić czy za każdym razem izolowano te same szczepy, jednakże wydaje się celowe dalsze kontrolowanie nasienia tych buhajów w kierunku obecności mykoplazm oraz śledzenie wyników zacielen.

Pod względem morfologii kolonii izolowane szczepy nie różniły się zasadniczo, obserwowano bardzo charakterystyczne ciemniejsze

centrum kolonii z jaśniejszą strefą otaczającą (ryc. 1). Morfologia ta zmieniała się nie tyle w zależności od szczepu ale zależała od gęstości posiewu, wieku hodowli i partii użytej do podłoża surowicy.



Ryc. 1. Typowa kolonia szczepu *Mycoplasma* izolowanego na podłożu agarowym bezpośrednio z nasienia. Hodowla 4-dniowa w 37°C. Pow. ok. 300 X.

Badania nasze wykazały, że odsetek buhajów, u których z nasienia izolowano mykoplazmy jest wysoki i różny w poszczególnych zakładach. Czy różnice czystości izolacji w czterech badanych zakładach są przypadkowe czy czynniki epizootologiczne odgrywają tutaj pewną rolę trudno na to w obecnym stanie badań odpowiedzieć.

Nie przesądzając sprawy identyfikacji izolowanych przez nas szczepów, sam fakt częstego ich występowania w nasieniu badanych buhajów, ich przynależność do szczepów patogennych, wreszcie przeżywanie przez wiele miesięcy w nasieniu konserwowanym w azocie powinien być sygnałem ostrzegawczym przed grożącym niebezpieczeństwem i możliwością wywołania zakażenia w drogach rodnych krów inseminowanych nasieniem, w którym stwierdza się mykoplazmy.

Autorzy wyrażają podziękowanie za doskonałą pomoc techniczną J. Pastuszek.

Pomoc finansową przy wykonaniu niniejszej pracy udzieliła Światowa Organizacja Zdrowia (FAO/WHO).

### Piśmiennictwo

1. Afshar A., Stuart P., Huck R. A.: Vet. Rec. 78, 512, 1966.
2. Albertsen B. E.: Nord. Vet. Med., 7, 169, 1955.
3. Armstrong D.: Informacja ustna.
4. Clyde W. A.: J. Immunol., 92, 958, 1964.
5. Dienes L., Edsall J.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 36, 740, 1937.
6. Edward D. G.: J. Gen. Microbiol. 4, 4, 1950.
7. Edward D. G.: J. Gen. Microbiol. 10, 27, 1954.
8. Edward D. G., Hancock J. L., Hignett S. L.: Vet. Rec., 59, 329, 1947.
9. Erno H.: Acta Vet. Scand. 8, 184, 1967.
10. Erno H., Plastringe W. N., Tourtelotte M. E.: Acta Vet. Scand. 8, 123, 1967.
11. Freundt E. A.: Mycoplasmales v: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 914, 1957.
12. Hale H. H., Helmboldt C. F.: Cornell Vet. 52, 582, 1962.
13. Hirth R. S., Plastringe W. N., Tourtelotte M. E., Nielsen S. W.: JAVMA 148, 277, 1966.
14. Nowak J.: Ann. Inst. Pasteur 43, 1330, 1929.
15. Somerson N. L., Purcell R. H., Taylor-Robinson D., Chanock R. M.: J. Bact. 89, 813, 1965.
16. Stuart P., Davidson I., Slavin G., Edgson F. A., Howell D.: Vet. Rec. 75, 59, 1963.
17. Taylor-Robinson D., Williams M. H., Haig D. A.: J. Gen. Microbiol. 54, 33, 1968.
18. Zgórnjak-Nowosielska I., Sedwick D. W., Hummeler K., Koprowski H.: J. Virol. 1, 1227, 1967.

Adres autora: doc. dr med. Izabella Zgórnjak-Nowosielska, Kraków, ul. Czysa 18, Zakład Mikrobiologii Lek. AM.