

Możliwości transmisji zakażeń wirusowych i bakteryjnych u bydła poprzez zarodki hodowane *in vitro*

JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, JANUSZ ZBYLUT

Pracownia Biotechniki Rozrodu Zwierząt Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Oddział w Bydgoszczy,
Al. Powstańców Wilk. 10, 85-090 Bydgoszcz

Jaśkowski J. M., Zbylut J.

The probability of viruses being transmitted in cattle by transferring embryos fertilized *in vitro*

Summary

The paper describes the possibility of transmitting viruses and bacteria by transferring embryos of cows produced and fertilised *in vitro* (IVF/IVP). It presents the differences between *in vivo* and *in vitro* produced embryos in relation to their susceptibility to BVDV and BHV-1 viruses, foot-and-mouth disease virus and certain kinds of bacteria such as *Leptospira*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Ureoplasma* and others. It also discusses several methods of eliminating these pathogens.

Keywords: *in vitro* produced embryos, cattle, bacterial and viral transmission.

Szybki rozwój metod produkcji zarodków metodami *in vitro* u bydła coraz częściej stwarza konieczność szerszego rozważenia możliwości transmisji chorób zakaźnych oraz stworzenia odpowiednich zabezpieczeń sanitarnych dla uzyskiwanych zarodków.

Ryzyko przeniesienia chorób w odniesieniu do zarodków produkowanych *in vitro* zależne jest nie tylko od stanu zdrowotnego dawców materiału genetycznego (nasienie, oocyty) ale i warunków środowiskowych stwarzanych przez odpowiednie pożywki hodowlane, rozrzedzalniki do nasienia, media do konserwacji i przenoszenia zarodków itp., na których działanie ekspozowane są gamety lub zarodki.

Geruin i wsp. (8) podają, że źródłem zakażenia zarodków hodowanych *in vitro* mogą być patogeny zanieczyszczające genom, względnie znajdujące się na zewnątrz i wewnątrz oocytu. Pierwszej możliwości transmisji zanieczyszczeń jak dotąd nie dowiedziono. Więcej danych natomiast przedstawiano odnośnie do możliwości przeniesienia zakażeń wskutek wewnątrzkomórkowych zanieczyszczeń bakteryjnych i wirusowych.

Do tego rodzaju zakażeń może dochodzić podczas bezpośredniego kontaktu oocytu z płynami, tkankami lub komórkami pochodzącymi od naturalnie lub sztucznie zainfekowanych zwierząt. Przykładowo Biełański i wsp. (4, 5) podają, że drobnoustroje z rodzaju *Leptospira* u naturalnie zarażonych zwierząt – przeżywające w nerkach i układzie rozrodczym – mogą być także obecne w płynie pęcherzykowym oraz po-

zyskiwanych do hodowli oocytach. Aby ocenić prawdopodobieństwo transmisji zakażenia drobnoustrojami z rodzaju *Leptospira* pobierano oocyty od zdrowych jałowic i hodowano do stadium zarodka. W kolejnym etapie badań zarodki o nienaruszonej osłonce przejrzystej współhodowano w pożywkach nie zawierających antybiotyków z hodowlą *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* typ *hardjobovis*. Mimo zastosowania rutynowej procedury przemywania zarodków drobnoustrojów nie udało się wyeliminować. Ich obecność stwierdzono na osłonce przejrzystej, a także w przestrzeni periwitellarniej i komórkach blastomerów. Obecnie oceniana jest możliwość transmisji na biorczyźnie zarodków i ich potomstwo drobnoustrojów z rodzaju *Leptospira*, w odniesieniu do zarodków hodowanych, *in vitro* z oocytów pochodzących od samic naturalnie zakażonych tą chorobą (4). Wirus biegunki bydłowej (BVDV) nie przylega do osłonki przejrzystej zarodków uzyskiwanych *in vivo*, o ile przestrzegane są procedury sanitarne (przemywanie) rekomendowane przez IETS (Międzynarodowe Stowarzyszenie Embriotransferu). Wirus ten był jednak obecny w 13% próbek zdegenerowanych zarodków lub oocytów pozyskiwanych z hodowli *in vitro* (17).

Eksperymentalna infekcja krów BVDV typ II (szcep CD87) charakteryzująca się wysoką śmiertelnością i patogennością sprawiała, że wirus był izolowany z 55% próbek płynu pęcherzykowego, 10% płynu jajowodowego oraz w 10% płynu pozyskiwanego z macicy. Był on także obecny w 41% embrionów zapłodnionych i

wyhodowanych *in vitro*. W innym doświadczeniu badano wpływ ekspozycji na wirus niezakażonych oocytów. W trakcie procesu zapłodnienia dochodziło do zakażenia zarodków. Obecność wirusa wewnątrz zarodków nie wpływała ujemnie na ich rozwój, dowiodła jednak, że BVDV-II może przenosić się podczas zapłodnienia *in vitro* stwarzając potencjalne ryzyko transmisji (5). Z badań Trachte i wsp. (14) wynika, że po dwugodzinnej współhodowli z wirusem BVDV sztucznie wyhodowanych zarodków, przepłukiwanych następnie w pożywce zawierającej antybiotyki (penicylina, streptomycyna, fungizon (PSF) nie udaje się wyeliminować wirusa BVDV z powierzchni osłonki przejrzystej bydlęcych morul i blastocyst. Wirus pozostaje także mimo dwukrotnego przemywania 0,25% roztworem trypsyny.

Na podstawie badań przeprowadzonych z zastosowaniem oocytów izolowanych w rzeźni stwierdzono, że cytopatyczne formy BVDV są w stanie replikować się w zarodkach hodowanych do stadium moruli i blastocysty. Późniejsze badania wykazały, że infekcja niecytopatycznymi formami BVDV zależy od stadium rozwoju zarodka. W oocytach, zygotach i 8-mio blastomerowych embrionach nie stwierdzono replikacji wirusa BVDV. Dla zarodków w stadium moruli i ekspandującej blastocysty pozbawionych osłonki przejrzystej, maksymalne wewnątrzkomórkowe miano wirusa osiągało swoje apogeum po 72 godzinach (13, 16).

Przepłukiwanie zarodków pozyskiwanych *in vivo* jest powszechnie stosowaną metodą zapobiegania transmisji patogenów. W nielicznych eksperymentach próbowano określać, czy wirus BVDV może przylegać do embrionów po ich sztucznej ekspozycji na niecytopatyczne biotypy wirusa oraz po ich przepłukiwaniu. Badania wykazały, że przy nieuszkodzonej osłonce przejrzystej nie następuje infekcja komórek embrionów (6).

Także zakażenie krów bydlęcym herpes wirusem-1 (BHV-1) stwarza potencjalną możliwość transmisji choroby poprzez zarodki hodowane *in vitro*. Możliwość ta wynika z faktu, iż wirus przenika do komórek jajowodu oraz płynu pęcherzykowego oraz, że może być obecny w pożywkach hodowlanych. W tej sytuacji nie można wykluczać, iż może się on znajdować w dojrzałych postaciach zarodków hodowanych *in vitro* (3, 11). Celem badań Vanroose i wsp. (16) było określenie, czy wirus BHV-1 może się replikować w sztucznie uzyskiwanych zarodkach, posiadających nie naruszoną osłonkę przejrzystą lub pozbawionych tej osłonki. Badania jasno wykazały, że wirus BHV-1 jest wprawdzie zdolny do replikacji, jednak proces ten następuje wyłącznie w zarodkach pozbawionych osłonki przejrzystej.

W odniesieniu do zarodków produkowanych *in vitro* nie do końca jasna jest kwestia transmisji wirusa pryszczycy. Jak wiadomo w przypadku zarodków po-

zyskiwanych *in vivo* ryzyko jego przeniesienia, przy zachowaniu zaleceń IETS nie istnieje. Inna sytuacja może mieć miejsce w odniesieniu do zarodków hodowanych *in vitro*. Wcześniej wykazano, że cechuje je odmienna budowa strukturalna osłonki przejrzystej oocytu zawartego wewnątrz pęcherzyka jajnikowego jak również oocytu pochodzącego z pęcherzyka owulującego. Badania laboratoryjne, w których do hodowli zarodków dodawano pożywkę z wirusem pryszczycy i inkubowano go przez różny czas z embrionami wyprodukowanymi *in vitro* wykazały, że po drugiej kąpieli pożywka może zawierać wirus pryszczycy. Nie stwierdzano go natomiast po 8-10 przepłukiwaniu. Niezależnie jednak od czasu inkubacji wirus był izolowany z zawiesiny dojrzałych lub zdegenerowanych zarodków. Marquant-Le Guienne i wsp. (10) sugerują, że ich przywieranie do osłonki przejrzystej zarodków produkowanych *in vitro* jest przypuszczalnie mocniejsze niż w odniesieniu do zarodków wypłukiwanych *in vivo*.

W opisanych wyżej przykładach jedyną pewną formą zapobiegania transmisji zakażeń wirusowych jest pozyskiwanie materiału biologicznego od dawców nasienia lub oocytów całkowicie wolnych od chorób zaraźliwych, przebywających w wolnych od chorób zaraźliwych stacjach unasienniania lub certyfikowanych, wolnych od chorób stadach.

Innym źródłem zakażenia mogą być stosowane do hodowli zarodków pożywki. Jak wykazano, w warunkach komercyjnych materiał do produkcji pożywek np. komórki jajowodu lub płynu pęcherzykowego, może zawierać niektóre wirusy (BHV-1, BVDV). Także embriony produkowane *in vitro* w pożywkach zawierających materiał zainfekowany BVH-1 lub BVDV były zakażone tym pierwszym wirusem (1). Prawdopodobieństwo zanieczyszczenia drobnoustrojami i wirusami pożywek stosowanych do hodowli zarodków jest eliminowane w praktyce poprzez ich naświetlanie promieniami gamma. Jednak niektóre wirusy np. BVDV są w stanie przeżywać tę procedurę, stwarzając ryzyko infekcji zarodka. Równocześnie mimo zalecanej przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Embriotransferu 10-cio krotnej kąpieli zarodka nie udaje się wyeliminować wirusa z powierzchni osłonki przejrzystej. Z badań Tsuboi (15) wynika, że współhodowla komórek pęcherzykowo-nabłonkowych wzgórka jajonośnego (cumulus) pochodząca od samic przewlekle zainfekowanych BVDV wraz z analogicznymi komórkami pochodzącymi od samic zdrowych może być skuteczną formą zapobiegania transmisji BVDV.

Inną drogą transmisji zanieczyszczeń bakteryjnych i wirusowych może być zastosowanie do inseminacji oocytów zakażonego nasienia buhaja. O możliwości infekcji *Pseudomonas* kultur zygot hodowanych *in vitro* donosił Stringfellow i wsp. (12). Z kolei Lee i wsp. (9) podają, że z pożywek stosowanych do hodowli

zarodków izolowali drobnoustroje z rodzaju *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacter calcoaceticus* oraz *Flavobacterium spp.* Te same drobnoustroje stwierdzano w nasieniu buhajów używanych do unasiwienia oocytów *in vitro*. Równocześnie wykazano, że obecność tych drobnoustrojów w płynach kulturowych zatrzymuje rozwój zygot hodowanych do stadium moruli i blastocysty. Z tego powodu autorzy sugerują, że zapobieganie bakteryjnym zanieczyszczeniom powinno następować już podczas preparowania nasienia. Wysokie ryzyko zakażenia niesie także zastosowanie do zapłodnienia *in vitro* nasienia pobieranego od buhajów podczas przewlekłej infekcji BVDV. Jednak prawdopodobieństwo transmisji wirusa na dawczynię poprzez tą drogą zakażony zarodek jest niskie z powodu wysokiej zamieralności zarodków (7). W innych badaniach oceniano wpływ infekcji *Campylobacter fetus* na proces zapłodnienia *in vitro* oraz dalszy rozwój zarodków. Mętwnika izolowano z używanego do inseminacji oocytów nasienia. Izolacja drobnoustroju z homogenatu zarodków potwierdziła możliwość jego transmisji poprzez zarodki hodowane w warunkach *in vitro* (2).

Antybiotyki o szerokim spektrum działania dodawane do nasienia w dużym stopniu eliminują możliwość przypadkowego zanieczyszczenia kultur *in vitro* patogennymi drobnoustrojami. Są jednak nieskuteczne w odniesieniu do zakażeń wirusowych. Z drugiej strony – stosując niesprawdzone nasienie buhajów do zapłodnienia oocytów *in vitro* – należy także pamiętać, że antybiotyki zawarte w mediach stosowanych

podczas hodowli oocytów (gentamycyna, penicylina G, streptomycyna) podczas ich zapłodnienia oraz hodowli do stadium moruli lub blastocysty mogą nie eliminować wszystkich drobnoustrojów patogennych. Przykładem są bakterie z rodzaju *Pseudomonas*.

Piśmiennictwo

1. Bielański A., Loewen K. S., Del Campo M. R., Sirard M. A., Willadsen S.: *Theriogenology*, 40, 531, 1993.
2. Bielański A.: *Theriogenology*, 41, 163, 1994.
3. Bielański A., Dubuc C.: *Theriogenology*, 41, 1211, 1994.
4. Bielański A., Surujballi O.: *Theriogenology*, 49, 250, 1998.
5. Bielański A., Sapp T., Lutze-Wallace C.: *Theriogenology* 49, 1231, 1998.
6. Givens M. D., Galik P. K., Riddell K. P., Stringfellow D. A.: *Theriogenology*, 49, 252, 1998.
7. Guerin B., Chaffaux St., Marquant Le Guienne B., Allietta M., Thibier M.: *Theriogenology*, 37, 217, 1992.
8. Guerin B., Nibart M., Marquant-Le Guienne B., Hublot P.: *Theriogenology*, 47, 33, 1997.
9. Lee K. W., Kim I. H., Son D. S., Lee H. J., Lee D. W., Seo G. H., Choi S. H., Yang B. C., Kim K. N., Jung S. C.: *Theriogenology*, 47, 375, 1997.
10. Marquant-Le Guienne B., Remond M., Cosquer R., Humblot P., Kaiser C., Lebreton F., Cruciere C., Guerin B., Laporte J., Thiebier M.: *Theriogenology*, 50, 109, 1998.
11. Stringfellow D. A., Luerman L. H., Nasti K. B., Galik P. K.: *Theriogenology*, 34, 427, 1990.
12. Stringfellow D. A., Riddell K. P., Brock K. V., Riddell M. G., Galik P. K., Wright J. C., Hasler J. F.: *Theriogenology*, 48, 171, 1997.
13. Stringfellow J. S., Hathcock T. L., Riddell K. P., Stringfellow D. A., Galik P. K., Riddell Jr M. G., Carson R. L.: *Theriogenology* 47, 382, 1997.
14. Trachte E. A., Stringfellow D. A., Riddell K. P., Galik P. K., Riddell M. G., Wright J. C.: *Theriogenology*, 47, 383, 1997.
15. Tsuboi T., Imada T., Katsuda K., Eguchi M.: *Theriogenology*, 49, 253, 1998.
16. Vanroose G., Nauwynck H., Van Soom A., Vanophenbosch E., de Kruif A.: *Theriogenology* 47, 1389, 1997.
17. Zurovac O. V., Stringfellow D. A., Brock K. V., Riddell M. G., Wright J. C.: *Theriogenology*, 41, 841, 1994.

Adres autora: doc. dr hab. Jędrzej M. Jaśkowski, ul. Św. Trójcy 35/50, 85-224 Bydgoszcz, e-mail: piwetby@webmedia.pl

SEGALES J., PIELLA J., MAREO E., MATEU-DE-ANTONIO E. M., ESPUNA E., DOMINGO M.: Zapalenie skóry i syndrom nefropatii u prosiąt w Hiszpanii. (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain). Vet. Rec. 142, 483-486, 1998 (18)

W 1993 r. opisano nowy zespół chorobowy u prosiąt pod nazwą syndrom zapalenia skóry/zwyrodnienia nerek (PDNS – porcine dermatitis nephropathy syndrome). W sierpniu 1995 r. zdiagnozowano pierwsze przypadki PDNS w północno-wschodniej Hiszpanii. U prosiąt w wieku 1,5-4,0 miesięcy wystąpiły charakterystyczne objawy i zmiany dla PDNS. W tych fermach gdzie występował PDNS stwierdzano też chorobę Glassera, biegunki, zapalenia spojówek, owrzodzenia żołądka. Chroniczne śródmiąższowe zwyrodnienie nerek, zmiany patologiczne w kłębuszkach nerkowych i zmiany skórne są typowe dla chronicznego przebiegu syndromu. Zarówno w ostrej jak i przewlekłej postaci choroby ma miejsce obniżenie ilości limfocytów w węzłach chłonnych infiltrowanych przez komórki syncytialne oraz śródmiąższowe zapalenie płuc. Chore zwierzęta reagowały dodatnio w testach na PRRSV, izolowano od nich też wirus PRRSV. Charakter zmian patologicznych wskazuje na udział alergii typu III w patogenezie choroby.

HUDSON W.R., MEAD G.C., HINTON M.H.: Ocena higieny rzeźni przy użyciu drobnoustroju markerowego. (Assessing abattoir hygiene with a marker organism). Vet. Rec. 142, 545-547, 1998 (20)

Warunki higieniczne panujące w ubojniach zwierząt domowych minimalizują możliwość zanieczyszczenia bakteryjnego i rozmnażania się drobnoustrojów, czego ostatecznym efektem jest mniejszy stopień skażenia bakteryjnego tuszy. Oceniono warunki higieniczne w rzeźni bydła oraz w rzeźni gdzie ubijano świnię, owce i bydło. Jako drobnoustroj markerowy zastosowano niepatogeny szczep *Escherichia coli* K12 oporny na kwas nalidyksowy. Ciało owiec skażono tym drobnoustrojem w ilości 106 jtk/cm² na powierzchni 250 cm², bydła 500 cm² w okolicy odbytu przed oskórowaniem. W każdym teście wykorzystano zwierzęta, których odbyty był zamknięty w plastikowym worku i 10 bez tego postępowania. Włożenie wyciętego odbytu do worka redukowało stopień skażenia tuszy *E. coli*. Skażenie tuszy obniżało się znacznie gdy personel zdejmujący skóry miał czyste ręce, czyste okrycie i używał świeżo pasteryzowanego noża. Następowe mycie tuszy nie wpływało zupełnie względnie wpływało tylko w niewielkim stopniu na ilość markerowych drobnoustrojów zanieczyszczających tuszę.