

# Zastosowanie preparatu EquiPure do pozyskiwania morfologicznie prawidłowych plemników ogiera oraz dekontaminacji spermy z zanieczyszczeń wirusem zapalenia tętnic koni

WITOLD GOLNIK, BARBARA SORDYL, WOJCIECH NIŻAŃSKI\*, MAŁGORZATA KLIMOWICZ\*

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, \*Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Golnik W., Sordyl B., Niżański W., Klimowicz M.

## Application of EquiPure to improve stallion sperm quality and its equine arteritis virus decontamination

### Summary

Equine Viral Arteritis (EVA) is one of most significant infectious diseases of horses. In many cases stallions that have recovered from EAV infection are the source of the virus for other horses. In spite of the fact that they do not show any clinical symptoms, they are chronically infected and they shed the virus. Quite often shedding is observed in very valuable stallions. Their elimination causes considerable economical losses. In the case of contamination of the human sperm with the Human Immunodeficiency Virus, one of the methods of preventing the infection of the mother and an offspring is the purification of the father's sperm from HIV virus. The purification is obtained by the centrifugation of the HIV- positive father's sperm in a density gradient. The purpose of the study was to purify stallions' sperm from persistent EAV infection. Material for the study consisted of 19 samples of fresh and frozen sperm collected from EAV natural shedders. The samples of the sperm were treated with EquiPure gradient of Nidacon Int. (Sweden). The results of the experiment indicated that only some of the EAV-infected semen samples were cleaned from the EAV infection. Centrifugation in gradient did not decrease the motility of spermatozoa. The percentage of morphologically normal spermatozoa was higher after purification in comparison to the raw semen. Generally, the quality of stallion semen after centrifugation was satisfactory and it could be used for artificial insemination of mares.

**Keywords:** equine viral arteritis, sperm

Wirusowe zapalenie tętnic koni (Equine Viral Arteritis – EVA) jest jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych koni, powodującą duże straty w hodowli i obrocie końmi rasowymi. W przebiegu zakażenia stwierdza się masowe ronienia i resorpcje płodów przez ciężarne klacze oraz zachorowania i przypadki śmiertelne u źrebiąt. Czynnikiem etiologicznym EVA jest otoczkowym RNA – wirusem, zaliczonym do rodziny *Arteriviridae*, rodzaju *Arterivirus* (28). Po raz pierwszy wyizolowano go w 1953 r., w czasie enzootii w stadninie koni rasowych w pobliżu miejscowości Bucyrus w stanie Ohio w Stanach Zjednoczonych (7). Wkrótce po tym okazało się, że choroba ta występuje na całym świecie (1, 4, 5, 10, 12, 15, 19, 22, 23, 26, 27, 29, 30).

Do zakażenia dojść może drogą kropelkową przez układ oddechowy (6) oraz drogą płciową. Badania eksperymentalne i szczegółowa analiza przebiegu enzootii EVA w stanie Kentucky (USA) w 1984 r. dowiodły, jak wielkie straty przynosi użycie do rozplodu ogiera ozdrowieńca – siewcy wirusa EA z nasieniem (9, 32, 33). Podczas krycia takim ogierem zakażonych zostaje 85-100% pełnowrażliwych klaczy (14, 31). Najbardziej istotną konsekwencją spontanicznych zakażeń jest utrwalenie się

stanu nosicielstwa i siewstwa wirusa EA z nasieniem u niektórych ogierów ozdrowieńców (11, 13). U ogierów takich wirusa EA izolowano z pęcherzyków nasieniowych, gruczołów opuszkowo-cewkowych, nasieniowodu oraz bańki nasieniowodu (25). Częstotliwość występowania ogierów siewców wirusa EA z nasieniem wynosi 35-60% (24, 31, 34). Ogiery te wydają się głównym ogniwem w łańcuchu epizootycznym wirusowego zapalenia tętnic koni, dlatego ich wykluczenie z rozrodu jest najważniejszą czynnością w postępowaniu zapobiegawczym chorobie.

Jako źródło wirusa EA groźne jest nie tylko nasienie świeże. Nasienie schłodzone lub mrożone, użyte do inseminacji pełnowrażliwych klaczy, może stać się przyczyną wybuchu wirusowego zapalenia tętnic koni (35). Duże nadzieje wiązano z możliwością oczyszczenia nasienia ogierów siewców z wirusa EA. Podobne doświadczenia dały bardzo dobre efekty przy dekontaminacji ludzkiego nasienia z wirusa HIV (8, 21). Równie obiecujące wyniki uzyskano przy dekontaminacji nasienia mężczyzn, nosicieli wirusa zapalenia wątroby typu C – HCV (20).

Celem badań było podjęcie próby użycia preparatu EquiPure do oczyszczenia z wirusa spermy ogierów, no-

sicieli wirusa zapalenia tętnic koni. Zakładano, iż oczyszczone w gradiencie stężeń nasienie będzie mieć zastosowanie zwłaszcza w przypadku wartościowych pod względem hodowlanym ogierów.

### Materiał i metody

Próby dekontaminacji nasienia z zanieczyszczeń wirusem zapalenia tętnic koni przeprowadzono eksperymentalnie przy współpracy ze szwedzką firmą Nidacon Int. Do doświadczenia użyto 13 próbek spermy mrożonej i 6 świeżej pochodzącej od różnych ogierów siewców wirusa z nasieniem. Oczyszczano 13 prób nasienia mrożonego oraz 6 prób nasienia świeżego. Po odwirowaniu zakażonej spermy w gradiencie stężeń przeprowadzono próby izolacji wirusa z frakcji J (EquiSperm™ Wash) oraz frakcji S (plemnik) w hodowli komórek RK-13 i Vero. Każdą partię nasienia badano w kilku powtórzeniach (od 8 do 16).

**Oczyszczanie nasienia świeżego.** Nasienie pobierano od ogierów na sztuczną pochwę typu otwartego, w obecności grzejącej się klaczy, wg powszechnie przyjętych zasad (2) i na miejscu poddawano wstępnej ocenie seminologicznej. Następnie, do stożkowych plastikowych probówek do wirowania (Nunc, Dania) o pojemności 10 ml наносzono 2 ml odczynnika EquiPure Bottom Layer. Używając nowej, sterylnej pipety pasteurowskiej nawarstwiano 2 ml odczynnika EquiPure Top Layer tak, aby obie warstwy nie uległy wymieszanemu. Na tak umieszczone w probówce odczynniki nakładano 1,5 ml nasienia, tworząc trzecią, wyraźnie oddzieloną warstwę. Probówki wirowano następnie w temperaturze pokojowej przez 20 min., przy 1300 obr./min., uzyskując supernatant złożony z warstw plazmy nasienia i odczynników (E), a na dnie stożka – peletkę złożoną z plemników. Po usunięciu supernatantu, peletkę przenoszono sterylną pipetą do nowej probówki i zawieszano w 5 ml odczynnika EquiSperm™ Wash, po czym ponownie wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 min. przy 2000 obr./min. Po odwirowaniu uzyskiwano peletkę plemników (S) oraz warstwę EquiSperm™ Wash (J), którą usuwano. Plemniki zawieszano w 2 ml MEM Eagle'a i ponownie poddawano badaniom seminologicznym w celu określenia wpływu działania odczynników i wirowania na jakość spermy. Próby nasienia świeżego oznaczono numerami od 14 do 19.

**Oczyszczanie nasienia mrożonego.** Różnice w sposobie oczyszczania nasienia mrożonego polegały na użyciu mniejszych objętości poszczególnych warstw preparatu i nasienia: 1 ml EquiPure Bottom Layer, 1 ml EquiPure Top Layer i 0,5 ml nasienia mrożonego. Dalszy tok postępowania był taki sam, jak opisany poprzednio. Probki oznaczono numerami od 1 do 13.

**Badanie wirusologiczne nasienia po dekontaminacji.** Zastosowano próbę izolacji wirusów w hodowlach komórkowych. Do badania frakcji J i S przygotowywano jednowarstwowe hodowle komórek nerki królika (RK-13) i nerki małpy (Vero) w 24-dołkowych płytkach polistyrenowych (Nunc, Dania). Do dołków inokulowano po 0,025 ml badanego materiału. Dwa pierwsze pionowe rzędy (8 dołków) przeznaczano do badania frakcji J, dwa następne (8 dołków) dla frakcji S, kolejny pionowy rząd (4 dołki) stanowiła kontrola hodowli, a rząd ostatni (4 dołki) – kontrola badanego nasienia, rozcieńczonego w płynie MEM Eagle'a w stosunku 1 : 20. Płytki inkubowano w termostacie w temperaturze 37°C przy dopływie 5% CO<sub>2</sub>. W celu wykrycia efektu cytopatycznego (CPE – Cytopathic Effect) hodowle oglądano codziennie w mikroskopie odwróconym. Za wynik dodatni uznawano zmiany cytopatyczne polegające na zaokrągleniu się komórek i układaniu ich w różnej wielkości gronka, po czym na-

stępowała liza hodowli i odpadanie jej od dna naczynia. W przypadku braku CPE próbki pasażowano, przenosząc po 0,2 ml płynu z dna hodowli na nowe płytki z hodowlami komórkowymi jak poprzednio. Wykonywano do 4 pasażów w odstępach 4-dniowych.

**Ocena seminologiczna nasienia.** Bezpośrednio po pobraniu, nasienie poddawano wstępnej ocenie makro- i mikroskopowej oraz sporządzano preparaty do badań uzupełniających. Badano wyłącznie frakcję bogatą w plemniki. Określano jej objętość, barwę, konsystencję, odsetek plemników o ruchu prawidłowym, koncentrację plemników w jednostce objętości i ich morfologię. Oceny odsetka plemników o ruchu prawidłowym dokonywano w mikroskopie kontrastowo-fazowym przy powiększeniu 400×. Szkiełko podstawowe, na które наносzono kroplę nasienia, ogrzewane było do 39°C przez termostabilną płytkę. Odsetek plemników wykazujących ruch prawidłowy liczono w 5 miejscach: centralnie i w okolicach rogów szkiełka nakrywkowego, a następnie wyliczano średnią z tych pomiarów. Koncentrację plemników (10<sup>6</sup>/ml) określano przy użyciu komory Thoma. Preparaty do badań morfologicznych plemników utrwalano i barwiono wg metodyki opisaną przez Watsona (36) barwnikiem Giemsa.

Zastosowano klasyfikację morfologiczną plemników, uwzględniającą podział na wady główne i podrzędne męskich komórek rozrodczych (3, 16). Badaniom poddano wyłącznie ejakulatory, w których ruchliwość i odsetek plemników o prawidłowej morfologii przewyższały 70%. Nasienie to, po pobraniu i ocenie wstępnej, rozrzedzano za pomocą rozrzedzalnika Kenneya (18) w stosunku 1 : 3, w temp. 33°C, a następnie schładzano przez okres 90 min. do 5°C. W tej temperaturze, w ciągu 6 godzin, transportowano je do pracowni wirusologicznej.

W trakcie oczyszczania nasienia, w celu oceny jego jakości, po każdym wirowaniu osad poddawano resuspensji w 1 ml rozrzedzalnika Kenneya w temperaturze pokojowej. Po 6-godzinnej inkubacji ejakulatu w 5°C (transport) oraz po kolejnych wirowaniach oceniano: odsetek plemników o ruchu prawidłowym, odsetek plemników z wadami głównymi morfologii i odsetek plemników z wadami podrzędnymi.

Wyniki uzyskane po dekontaminacji zakażonego nasienia poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu dwuczynnikowej wariancji z powtórzeniami typu: 4 × 2, 2 × 2 oraz test pojedynczy, przy p ≤ 0,05 i df = 1. Analizę statystyczną oceny andrologicznej nasienia przeprowadzono testem t-Studenta.

### Wyniki i omówienie

W jednym przypadku dzięki preparatowi EquiPure nasienie oczyszczono w 100%, w 9 przypadkach nasienie pozostało całkowicie zakażone, z pozostałych próbek nasienia, wirus usunięto jedynie częściowo (tab. 1 i 2). Zdolność preparatu do całkowitego oczyszczenia spermy z wirusa zapalenia tętnic koni w przypadku nasienia mrożonego wynosiła 6,67%, ale wynik ten nie był statystycznie istotny. Żadnej z próbek nasienia świeżego nie oczyszczono w 100%. Wirus zapalenia tętnic koni izolowano także z preparatu (frakcja J) używanego do ostatniego wirowania.

Wykrywalność wirusa EA w ejakulatach świeżych i mrożonych poddanych oczyszczaniu była istotnie statystycznie różna i wynosiła 59,37% dla nasienia świeżego i 78,33% dla mrożonego. Poziom ten był znacznie niższy od poziomu wykrywalności wirusa w nasieniu (zarówno mrożonym, jak i świeżym), którego nie poddano

Tab. 1. Odsetek zakażeń wirusem EA w badanych frakcjach gradientu nasienia mrożonego

Nr	Pasaż	Frakcja J	Frakcja S
1.	I	0%	0%
	II	100%	100%
2.	I	50%	0%
	II	100%	100%
3.	I	0%	0%
	II	100%	100%
4.	I	0%	0%
	II	100%	100%
5.	I	50%	0%
	II	100%	100%
6.	I	75%	0%
	II	100%	100%
7.	I	0%	0%
	II	12,5%	37,5%
	III	12,5%	37,5%
	IV	12,5%	37,5%
8.	I	0%	0%
	II	0%	0%
	III	0%	0%
	IV	0%	0%
9.	I	0%	0%
	II	0%	12,5%
	III	0%	12,5%
	IV	0%	12,5%
10.	I	12,5%	12,5%
	II	25,0%	12,5%
	III	37,5%	25,0%
	IV	50,0%	25,0%
11.	I	75%	0%
	II	100%	100%
12.	I	0%	0%
	II	100%	100%
13.	I	0%	0%
	II	100%	100%

wirowaniu w gradiencie stężeń, co wskazuje, że zastosowanie preparatu nie pozostaje bez wpływu na wirusa. Wykrywalność wirusa EA w oczyszczonej spermie różniła się statystycznie istotnie w kolejnych pasażach i wzrastała w przypadku nasienia świeżego z 12,5% w I pasażu do 50% w pasażu II i na podobnym poziomie utrzymywała się w pasażu III. W pasażu IV średnia wykrywalność wirusa wzrastała do 59,38%. Przy izolacji wirusa EA z nasienia mrożonego poddanego oczyszczaniu preparatem EquiPure, największe różnice obserwowano między I a II pasażem. W dalszych poziomach wykrywalności wirusa był podobny.

Po eksperymentalnym zakażeniu ogierów Neu i wsp. (25) odnotowali okresowo obniżoną płodność, wynikającą ze spadku w produkcji morfologicznie prawidłowych plemników, trwającą przez okres 3-4 miesięcy. Spadek jakości męskich gamet i ich koncentracji jest prawdopodobnie spowodowany hipertermią moszny, wynikającą z gorączki. Po zakażeniach naturalnych nie obserwowano u siewców długotrwałych negatywnych skutków w jakości spermy (35). Przejściowy spadek liczby plemników odnotowano w 2 tygodnie po zakażeniu, a w ciągu następnych 6 tygodni ich liczba dochodziła do prawidłowej (24). Obserwacje te potwierdzają badania własne, w których ejakulatory pobrane od ogierów siewców nie odbiegają pod względem jakości od ejakulatów pobranych od koni nie zakażonych. Timoney (33) stwierdził, co również potwierdziły badania własne, że u siewców długoterminowych wirus występuje w nasieniu stale.

W badaniach własnych średni odsetek plemników o ruchu prawidłowym w nasieniu świeżym wynosił 72,3% (tab. 3). Średnia objętość II frakcji nasienia i koncentracja plemników w jednostce objętości wynosiły odpowiednio 32,3 ml i  $320,2 \times 10^6/\text{ml}$ . Frakcja bogata w plemniki

miała barwę wodnistobiałą lub mlecznobiałą, a konsystencję od wodnistośluzowej do wodnisto-mlecznej. Odsetek plemników ze zmianami głównymi sięgał 11,4%, natomiast z podrzędnymi – 16,6%. Po 6-godzinnej inkubacji rozrzedzonego nasienia w temp. 5°C odsetek plemników wykazujących ruch prawidłowy uległ istotnemu zmniejszeniu do 65,7%. Stwierdzono również istotny wzrost odsetka męskich komórek rozrodczych, wykazujących podrzędne wady morfologiczne do 23,6%. Odsetek plemników ze zmianami głównymi nie uległ istotnej statystycznie zmianie i wynosił 12,1%. Po pierwszym wirowaniu i re-suspensji próbki w rozrzedzalniku Kenneya odsetek męskich gamet o ruchu prawidłowym nie zmienił się znacznie (70,2%), doszło natomiast do istotnego statystycznie spadku odsetka plemników wykazujących podrzędne wady morfologii (10,3%). Odnotowano również niewielki, nieistotny statystycznie spadek odsetka komórek wykazujących wady główne (9,4%).

Po drugim wirowaniu, ruchliwość plemników również nie uległa znacznej zmianie, jednakże odsetek plemników wykazujących główne i podrzędne wady morfologii uległ dalszemu obniżeniu do wartości wynoszących kolejno 6,7% i 4,1%.

Mimo że preparat okazał się nieskuteczny przy oczyszczaniu nasienia z wirusa, to może być przydatny do pozyskiwania morfologicznie prawidłowych plemników od niezakażonych ogierów. Proces wirowania plemników nie przyczynił się bowiem do obniżenia ich aktywności ruchowej, doprowadził natomiast do oddzielenia morfologicznie prawidłowych męskich komórek rozrodczych. Po zastosowaniu tej metody doszło do swoistej selekcji męskich gamet, polegającej na tym, że do osadu migrowały niemal wyłącznie plemniki cechujące się prawidłową morfologią, toteż nasienie odwirowane zawierało istotnie mniej plemników o wadach morfologicznych. Można wyrazić przypuszczenie, że głównie komórki o prawidłowej budowie strukturalnej wykazują aktywność ruchową, umożliwiającą przejście do osadu przez warstwy preparatu o różnej gęstości. Warto ponadto wspomnieć, że odwirowane nasienie zawierało niemal wyłącznie komórki rozrodcze bez jakichkolwiek obcych domie-

Tab. 2. Odsetek zakażeń wirusem EA w badanych frakcjach nasienia świeżego

Nr	Pasaż	Frakcja J	Frakcja S
14.	I	12,5%	37,5%
	II	12,5%	37,5%
	III	12,5%	37,5%
	IV	12,5%	50,0%
15.	I	0,0%	0,0%
	II	25,0%	37,5%
	III	25,0%	37,5%
	IV	75,0%	37,5%
16.	I	12,5%	0,0%
	II	37,0%	50,0%
	III	50,0%	50,0%
	IV	62,5%	50,0%
17.	I	37,5%	37,5%
	II	37,5%	37,5%
	III	37,5%	37,5%
	IV	62,5%	75,0%
18.	I	nie badano	0,0%
	II	nie badano	68,75%
	III	nie badano	68,75%
	IV	nie badano	68,75%
19.	I	nie badano	0,0%
	II	nie badano	56,25%
	III	nie badano	56,25%
	IV	nie badano	56,25%

nieistotny statystycznie spadek odsetka komórek wykazujących wady główne (9,4%). Po drugim wirowaniu, ruchliwość plemników również nie uległa znacznej zmianie, jednakże odsetek plemników wykazujących główne i podrzędne wady morfologii uległ dalszemu obniżeniu do wartości wynoszących kolejno 6,7% i 4,1%.

szek (elementy morfotyczne krwi, nabłonki). Pytanie, dlaczego w warstwie osadu nie zanotowano progresywnie zwiększającego się po wirowaniach odsetka plemników o ruchu prawidłowym, pozostaje otwarte. Być może należy brać pod uwagę „straty” w ruchliwości, wynikające z gwałtownego procesu resuspensji osadu plemników. Problem ten wymaga dalszych badań.

Pełnowartościowa sperma poddana dwukrotnemu wirowaniu cechuje się zadowalającą (wysoką) jakością *in vitro*, co przemawia za jej przydatnością do celów sztucznej inseminacji. Potencjalnie istnieje więc możliwość zastosowania opisanej procedury w celu usunięcia z nasienia plemników o nieprawidłowej morfologii, pozyskanych od cennych genetycznie ogierów. Badania niniejsze wykazały, że wirowanie w gradiencie pozwala na rozdział plemników o prawidłowej budowie morfologicznej od komórek wykazujących nieprawidłowości w morfologii. Dotyczy to zwłaszcza wad podrzędnych plemników. Warto również wspomnieć, że wirowanie plemników pozwala uzyskać ich żądaną koncentrację w określonej objętości nasienia. Postępowanie takie, stosowane być może w odniesieniu do ejakulatów, gdzie koncentracja plemników w jednostce objętości jest niska (oligospermia). Możliwość uzyskania w dawce inseminacyjnej nasienia o wysokim odsetku plemników morfologicznie prawidłowych uzasadnia dodatkowo celowość takiego postępowania.

## Piśmiennictwo

1. Akashi H., Konishi S., Ogata M.: Studies on equine viral arteritis. II. A serological survey of equine viral arteritis in horses imported in 1973/74. Jap. J. Vet. Sci. 1975, 38, 71-73.
2. Bielański W.: Rozród zwierząt, PWRiL, Warszawa 1977, 291.
3. Blom E.: Ocena morfologiczna wad plemników buhaja. II. Propozycja nowej klasyfikacji wad plemników. Medycyna Wet. 1981, 37, 239-242.
4. Bürki F.: Further properties of equine arteritis virus. Arch. Gesamte Virusforsch. 1966, 19, 123-129.
5. Cecarelli A., Agrimi P., Piragino S.: Recherches serologiques sur arterite virale en Italie. Zooprofilassi 1972, 78, 245-256.
6. Cole J. R., Hall R. F., Gosser H. S., Hendricks J. B., Purselley A. R., Senne D. A., Pearson J. A., Gibson C. A.: Transmissibility and abortogenic effect of equine viral arteritis in mares. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1986, 189, 769-771.
7. Doll E. R., Bryans J. T., McCollum W. H., Crowe M.: Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. Cornell Vet. 1957, 47, 3-41.
8. Englert Y., van Vooren J. P., Place I., Liesnard C., Laruelle Ch., Delbaere A.: ART in HIV - infected couples. Has the time come for a change of attitude? Human Reprod. 2001, 16, 1309-1315.
9. Fukunaga Y., Wada R., Tabuchi E., Akiyama Y.: Clinical and virological findings on experimental equine viral arteritis in horses. Bull. Equine Res. Inst. 1981, 18, 110-118.
10. Gerber H., Steck F., Hofer B., Walther L., Friedli U.: Serological investigations on equine viral arteritis. Proc. 4th Int. Conf. on Equine Infectious Diseases. Lyon 1976, 1978, s. 461-465.
11. Golnik W.: Wirusowe zapalenie tętnic koni. Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Aktualne choroby wirusowe i pasożyty koni. Wrocław 1998, s. 46-53.
12. Golnik W., Michalak T.: Przypadki wirusowego zapalenia tętnic koni (arteritis equorum) w Polsce. Medycyna Wet. 1979, 35, 605-606.
13. Golnik W., Paweńska J., Dzik W.: Ogier potencjalnym źródłem zakażenia wirusem zapalenia tętnic koni. Medycyna Wet. 1991, 47, 459-461.
14. Golnik W., Cierpisz J.: Próby użytkowania ogierów czolowych zakażonych spontanicznie wirusem zapalenia tętnic koni. Medycyna Wet. 1994, 50, 482-483.
15. Herbert K.: Controlling arteritis. The Blood - Horse, 1984, June 9th, s. 3972-3973.
16. Jasko D. J., Lein D. H., Foote R. H.: Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). JAVMA 1990, 197, 389-394.

Tab. 3. Wyniki badania seminologicznego

Oceniane mikro- i makroskopowe właściwości nasienia	Nasienie świeże – frakcja plemnikowa	Nasienie po inkubacji (6 godz. 5°C)	Nasienie po I wirowaniu	Nasienie po II wirowaniu
Odsetek plemników o ruchu postępowym (%)	72,3 <sup>a</sup>	65,7 <sup>b</sup>	70,2 <sup>ab</sup>	66,9 <sup>ab</sup>
Odsetek plemników z wadami głównymi (%)	11,4 <sup>a</sup>	12,1 <sup>a</sup>	9,4 <sup>a</sup>	6,7 <sup>b</sup>
Odsetek plemników z wadami podrzędnymi (%)	16,6 <sup>a</sup>	23,6 <sup>b</sup>	10,3 <sup>c</sup>	4,1 <sup>d</sup>
Objętość nasienia (ml)	32,3	-	-	-
Koncentracja plemników (10 <sup>6</sup> /ml)	320,2	-	-	-
Konsystencja nasienia	wodnisto-słuzowa do wodnisto-mlecznej	-	-	-
Barwa nasienia	wodnistobiała do mlecznobiałej	-	-	-

Objaśnienia: a, b, c, d – różne litery w wierszach oznaczają różnice istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) pomiędzy średnimi

17. Jones T. C.: Clinical and pathologic features of equine viral arteritis. JAVMA 1969, 155, 315-317.
18. Kenney R. M., Bergman R. V., Cooper W. L., Morse G. W.: Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. Proc. Ann. Assoc. Am. Equine Pract. 1975, 21, 327-336.
19. Lang G., Mitchel W. R.: A serosurvey by ELISA for antibodies to EAV in Ontario racehorses. J. Equine Vet. Sci. 1984, 4, 153-157.
20. Levy R., Bourlet T., Maertens A., Salle B., Lornage J., Laurent J. T., Pozetto B., Guerin J. F.: Pregnancy after safe IVF with hepatitis C virus RNA-positive sperm. Human Reprod. 2002, 17, 2650-2653.
21. Marina S., Marina F., Alcolea R., Nadal J., Exposito R., Huguet J.: Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1 seropositive man. Human Reprod. 1998, 13, 3247-3249.
22. McCollum W. H., Bryans J. T.: Serological identification of infection by equine arteritis virus in horses of several countries. Proc. 3rd Int. Conf. on Equine Infectious Diseases, Paris 1972, 1973, s. 256-263.
23. McKenzie J.: Equine viral arteritis and trade in horses from the USA. Surveillance 1988, 15, 6-7.
24. Neit S. M., Timoney P. J., McCollum W. H.: Persistent infection of the reproductive tract in stallions persistently infected with equine arteritis virus. Proc. 5th Int. Conf. on Equine Infectious Diseases, Lexington 1987, 1988, s. 149-154.
25. Neit S. M., Timoney P. J., Lowry S. B.: Changes in semen quality in the stallion following experimental infection with equine arteritis virus. Theriogenology 1992, 37, 407-431.
26. Nowotny N.: First isolation of equine arteritis virus (EAV) from three abortifacient foetuses from three different premises in Austria. Proc. 6th Int. Conf. on Equine Infectious Diseases, Cambridge 1991, 1992, s. 328.
27. Redaelli G., Codazza D., Finazzi M., Agrimi P., Fanchini G., Proverbio E.: Epizootic, clinical and anatomo- histo- pathological notes on the first outbreak of equine arteritis in Italy. Clin. Vet. 1980, 103, 566-571.
28. Reggenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Carstens E. B., Estes M. K., Lemon S. M., Maniloff J., Mayo M. A., McGeoch D. J., Pringle C. R., Wichner R. B.: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press. San Diego 2000, s. 851-857.
29. Timoney P. J.: Clinical, virological and epidemiological features of the 1984 outbreak of equine viral arteritis in the Thoroughbred population in Kentucky, USA. Proc. Grayson Foundation Int. Conf. of Thoroughbred Breeders Organizations, Dromoland Castle, Ireland 1984, s. 24-33.
30. Timoney P. J., McCollum W. H.: The epidemiology of equine viral arteritis. Proc. Am. Assoc. Equine Pract. 1985, 31, 545-551.
31. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: Detection of the carrier state in stallions persistently infected with equine arteritis virus. Proc. Am. Ass. Equine Pract. 1986, 32, 57-65.
32. Timoney P. J., McCollum W. H.: Equine viral arteritis. Can. Vet. J. 1987, 28, 693-695.
33. Timoney P. J., McCollum W. H., Murphy T. W., Roberts A. W., Willard A. W., Carswell J. G.: The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of transmission. J. Reprod. Fert. Suppl. 1987, 35, 95-102.
34. Timoney P. J., McCollum W. H., Murphy T. W.: A longitudinal study of equine arteritis virus infection in Standardbred stallions with special reference to occurrence of the carrier state. Proc. 6th Int. Conf. Equine Infectious Diseases, Cambridge 1991, 1992, s. 231.
35. Timoney P. J., McCollum W. H.: Equine viral arteritis. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 1993, 9, 295-309.
36. Watson P. F.: Use of the Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. Vet. Rec. 1975, 97, 12-15.

Adres autora: prof. dr hab. Witold Golnik, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: golnik@ozi.ar.wroc.pl