

# FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

MONIKA PIASECKA-SERAFIN, JERZY BRANNY, STEFAN WIERZBOWSKI

## Badania nad możliwością zakażeń bakteryjnych nasienia przechowywanego bezpośrednio w ciekłym azocie

Instytut Zootechniki, Zakład Fizjologii Rozrodu  
i Sztucznego Unasieniania Zwierząt  
Kierownik: doc. dr S. WIERZBOWSKI

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

W praktyce sztucznego unasieniania była znaleziona zastosowanie trzy metody przechowywania nasienia zamrożonego. Nasienie może być przechowywane w ampulkach, w tzw. „słomkach” lub też w kulkach. W obu pierwszych metodach nasienie jest izolowane od azotu. Natomiast nasienie zamrożone w kulkach jest przechowywane bez osłony bezpośrednio w azocie (5). Nie wpływa to na jego jakość, gdyż wyniki inseminowania uzyskiwane nasieniem zamrożonym w kulkach są równie dobre, jak przechowywanym w „słomkach” czy ampulkach, a znaczne uproszczenia techniczne jakie wprowadza ta metoda sprawiły, że znajduje ona zastosowanie zarówno w Polsce jak i innych krajach.

Powstały jednak obawy, czy za pośrednictwem ciekłego azotu nie może dochodzić do zakażenia nieosłoniętych kulek nasienia chorobotwórczymi drobnoustrojami (2, 4, 6, 7). Wobec tego, że metoda zamrażania nasienia w kulkach weszła do praktyki Państwowych Zakładów Unasieniania Zwierząt, uważaliśmy za celowe przeprowadzenie badań nad tym zagadnieniem.

Celem przedstawionej pracy było zbadanie czy istnieje niebezpieczeństwo zakażenia bakteryjnego kulek zamrożonego nasienia za pośrednictwem ciekłego azotu. Za punkt wyjścia przyjęto ewentualność wprowadzenia do kontenera partii nasienia zakażonego, które stałoby się źródłem zakażenia innych porcji nasienia tam się znajdujących.

### Materiał i metody

Przeprowadzone zostały dwa doświadczenia różniące się od siebie koncentracją drobnoustrojów w kulkach traktowanych jako źródło zakażenia. W pierwszym układzie ilość drobnoustrojów w kulce była zbliżona do najczęściej spotykanej w nasieniu rozcieńczonym w stosunku 1:1 do 1:3 i zamrożonym, natomiast w drugim układzie kulki były sporządzane z 18-godzinnych nierozcieńczonych hodowli bakteryjnych.

1. Dla uzyskania jałowych kulek, użyto zamiast nasienia, jałowo przygotowanego rozcieńczalnika stosowanego w praktyce unasieniania zwierząt o składzie:

roztwór cytrynianowo-fruktozowy (cytrynian sodu 2,9 g, fruktoza — 1,25 g, woda dest. — 100 ml) .	72 ml
żółtko . . . . .	20 ml
glicerol . . . . .	8 ml

Kulki przygotowywano bez dodatku antybiotyków. Jako kontrolę 1/3 część jałowych kulek sporządzono z dodatkiem streptomycyny w ilości 0,1 g na 100 ml rozcieńczalnika.

Zamrażanie kulek przeprowadzano na płytach ze-

stalonego CO<sub>2</sub>, objętość kulek leżała w granicach od 0,07 do 0,12 ml. Płyty zestalonego CO<sub>2</sub> przygotowywano w sposób jałowy na bieżąco i używano jednorazowo.

Wszystkie czynności związane z przygotowaniem kulek wykonywano przy pomocy wyjałowionych narzędzi oraz w wyjałowionym boksie.

2. Kulki zakażone używane w doświadczeniu pierwszym przygotowano łącząc rozcieńczalnik nasienia z hodowlami trzech szczepów bakteryjnych oddzielnie. Ilość bakterii w 1 ml zakażonego rozcieńczalnika, obliczana metodą płytkową, wynosiła dla *E. coli* —  $5,1 \times 10^4$ ; *Pseudomonas aeruginosa* —  $5,4 \times 10^4$ ; *Staphylococcus aureus*  $6,3 \times 10^4$ .

3. Kulki użyte w doświadczeniu drugim sporządzono z nierozcieńczonych hodowli *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i pałeczki otoczkowej.

4. Szczepy bakteryjne *E. coli*, Nr I/nk/67, *Pseudomonas aeruginosa*, Nr II/nk/67 i *Staphylococcus aureus*, Nr III/nk/67 wyhodowano z nasienia mrożonego przechowywanego w ciekłym azocie przez okres około 6 miesięcy.

Pałeczka otoczkowa Nr 4 Ot/nk/68 została wyhodowana z ciekłego azotu prod. fabrycznej. Pałeczka ta posiadała następujące cechy: nie rozkładała laktozy, mannitolu, dulcitolu, inozytolu, adonitolu, arabinozy, ksylozy, ramnozy, celobiozy i mocznika, nie wytwarzała indolu i siarkowodoru, dawała ujemny odczyn z czerwienią metylową, rosła na podłożu cytrynianowo-amonowym, nie rosła w podłożu z KCN, nie wytwarzała dekarboksylazy lizyny, dezaminowała fenylalaninę i wykorzystywała malonian sodu.

5. Podłoża bakteriologiczne: Bulion z dodatkiem 1% glukozy przygotowany na Bacto nutrient broth dehydrated (Difco), płytki agarowe zwykle i płytki agarowe z dodatkiem 5% odwiłkniętej krwi baraniej (Bacto agar, Bacto beef extract Difco), Bacto Levine EMB Agar Difco, *Staphylococcus medium*, Difco.

6. Kontenery: Typ LRN-25 prod. Union Carbide. Pojemność ciekłego azotu 28,8 litra. Zawierały po 6 pojemników zawieszanych przy pomocy uchwytych przez wlot kontenera. Każdy pojemnik mieścił 13 plastikowych pudełek o średnicy 50 mm i wysokości 17 mm. Dla umożliwienia swobodnego przepływu ciekłego azotu w dnie i przykrywcę pudełka znajdowały się po 4 otworki o średnicy 3 mm.

Do każdego pudełeczka wkładano po około 50 kulek jałowych lub oddzielnie zakażonych danym szczepem bakteryjnym. Każdy pojemnik zawierał po 9 pudełek z kulkami jałowymi (w tym 6 pudełek bez dodatku antybiotyków) oraz 3 pudełka zakażone różnymi szczepami, które umieszczono na różnych wysokościach pojemnika. Kontenery służące w doświadczeniu pierwszym oznaczono literami A i B.

7. Azot ciekły, fabrycznie czysty, był dostarczany z odległości około 100 km, lub uzyskiwany przy pomocy skraplarki PLN-106 prod. Philips'a na miejscu.

8. Tok postępowania.

### Doświadczenie pierwsze

Do kontenera A oprócz kulek jałowych wprowadzono kulki zakażone rozcieńczoną hodowlą *Pseudomonas aeruginosa* zachowując proporcję pudełek jak 3:1

(w pojemniku było 9 pudełek jałowych w tym 6 bez dodatku antybiotyków) oraz 3 pudełka zawierające kulki zakażone.

Do kontenera B oprócz kulek jałowych wprowadzono zakażone rozcieńczonymi hodowlami szczepu *E. coli*, *Styphalococcus aureus* i pałeczkę otoczkową zachowując proporcje jak w kontenerze A.

Doświadczenie drugie

W kontenerze oprócz kulek jałowych umieszczano kulki wykonane z nierozcieńczonych hodowli bakteryjnych szczepów *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Styphalococcus aureus*, pałeczka otoczkowa.

W poszczególnych pojemnikach stosowano różne kombinacje użytych szczepów przy zachowaniu proporcji pudełek zakażonych do jałowych jak w doświadczeniu pierwszym.

Dla uzyskania warunków zbliżonych do naturalnych, gdy na skutek wstrząsów w czasie transportu występują ruchy cieczy, które mogą wpływać na przemieszczanie się cząsteczek nasienia i ewentualnie drobnoustrojów, w obu doświadczeniach kontenery z zawartością wysyiano na odległość 100, 400, 1700 km, w odstępach kilkudniowych i kilkutgodniowych i po każdej podróży wykonywano badania bakteriologiczne kulek ze wszystkich pudełek. Badania te były powtarzane w odstępach 24 godz. (1), 72 godz. (2), 5 tygodni (3) oraz 3 miesięcy (4).

Przy pomocy jałowej ezy przenoszono z pudełeczka po jednej zamrożonej kulce na płytki z podłożem stałym odpowiednim dla szczepu względnie szczepów wprowadzonych do danego kontenera i po rozmrożeniu się kulki, rozsiewano ją po powierzchni płytki. Jedną kulkę przenoszono również do podłoża namnażającego. W jednym posiewie pobierano 4-6 kulek z każdego jałowego pudełeczka. W drugim doświadczeniu oprócz posiewów bezpośrednich posiewano kulki po uprzednim rozmrożeniu ich w fizjologicznym roztworze soli o temperaturze 37°C. Do 1 ml roztworu przenoszono 1 kulkę i z tej zawiesiny pobierano 0,1 ml i wysiewano na podłoża stałe w różnych odstępach czasu (45; 1,5h; 3h; 6h; i 24h).

Wyniki

W obu doświadczeniach posiewy kontrolne rozcieńczalnika oraz kulek jałowo przygotowanych po ich zamrożeniu nie wykazały zanieczyszczeń bakteryjnych.

W doświadczeniu pierwszym posiewy bezpośrednie, jałowo przygotowanych kulek z kontenera A i z kontenera B każdorazowo wypadły ujemnie. Równocześnie kulki zakażone znanymi szczepami bakteryjnymi wykazywały ich odpowiedni wzrost (tab. 1 i 2). W badaniu

Tab. 1. Obraz posiewów przy wprowadzeniu do kontenera kulek zakażonych rozcieńczoną hodowlą bakteryjną. Doświadczenie I, Kontener A.

Pojemniki	Kulki	Kolejne badania bakteriologiczne				Szczep bakt. *)
		po 24 h	po 72 h	po 5 tyg	po 3 mies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1	jałowe	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+
2	jałowe	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+
3	jałowe	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+
4	jałowe	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+
5	jałowe	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+
6	jałowe	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+
Azot		-	±	-	-	+

+ = izolacje dodatnie  
- = brak wyhodowań

\*) wyhodowania szczepów wprowadzonych do kontenera

Tab. 2. Obraz posiewów przy wprowadzeniu do kontenera kulek zakażonych trzema szczepami rozcieńczonych hodowli bakteryjnych.

Doświadczenie I, Kontener B.

Pojemniki	Kulki	Kolejne badania bakteriologiczne					Szczepy *) bakteryjne		
		po 24 h	po 72 h	po 5 tyg	po 3 mies. bezp.	z namn.	<i>E. coli</i>	<i>Staph. aur.</i>	<i>Ot</i>
1	jałowe	-	-	-	-	+	+	-	-
	zak.	+	+	+	-	+	+	+	+
2	jałowe	-	-	-	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+	+	+	+
3	jałowe	-	-	-	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+	+	+	+
4	jałowe	-	-	-	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+	+	+	+
5	jałowe	-	-	-	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+	+	+	+
6	jałowe	-	-	-	-	-	-	-	-
	zak.	+	+	+	+	+	+	+	+
Azot		-	+	-	+	+	+	-	-

+ = izolacje dodatnie

- = brak wyhodowań

\*) wyhodowania szczepów wprowadzonych do kontenera

czwartym z kontenera B wyhodowano w podłożu płynnym (tab. 2) *E. coli* w dwu próbkach co odpowiadało dwom kulkom pochodzącym z dwu różnych pudełek. Pozostałe posiewy namnażające wypadły ujemnie.

W drugim badaniu azotu z kontenera A, w jednej z trzech równocześnie pobranych prób wyhodowano *Pseudomonas aeruginosa* w posiewie namnażającym. Badania 1, 3 i 4 wypadły ujemnie. Posiewy azotu z kontenera B w badaniach 2 i 4 wykazały wzrost *E. coli* w podłożach namnażających, czego nie stwierdzono w badaniach 1 i 3. Wyosobniony szczep odpowiadał w obrazie biochemicznym na szeregu izolacyjnym i różnicującym, szczepowi *E. coli* użytemu do zakażenia kulek.

W badaniach kontrolnych azotu fabrycznie czystego spośród 12 pobranych prób w jednym wypadku izolowano *E. coli*. Pałeczka ta różniła się jednakże od szczepu *E. coli* użytego w doświadczeniu, późnym rozkładaniem laktozy.

W doświadczeniu drugim posiewy kulek jałowo przygotowanych wykazały dodatnie izolacje z przeważającej ilości bulionów cukrowych. Również w posiewach bezpośrednich na podłoża stałe uzyskano wzrost pojedynczych kolonii bakteryjnych *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Styphalococcus aureus* i pałeczki otoczkowej (tab. 3). Na płytkach krwawych oprócz kolonii tylko jednego szczepu stwierdzano w badaniu 3 i 4 również hodowle mieszane składające się z kolonii dwu rzadziej trzech szczepów pochodzących z tej samej kulki.

W ogólnym obrazie wysianych kulek w doświadczeniu drugim, około 80% wykazało obecność drobnoustrojów pochodzących ze szczepów wprowadzonych do kontenera, pozostała ilość badanych kulek wypadła ujemnie.

Około 60% posiewów azotu z kontenera w doświadczeniu drugim wykazała obecność 1, 2, lub też 3 szczepów równocześnie, przy czym

Tab. 3. Występowanie zakażeń bakteryjnych przy wprowadzeniu do kontenera kulek sporządzonych z nierozcieńczonych hodowli bakteryjnych.

Doświadczenie II.

Pojemniki	Kulki	Kolejne badania bakteriologiczne				Szczepy bakteryjne *)			
		po 24 h	po 72 h	po 5 tyg	po 3 mies	<i>E. coli</i>	<i>Pseud</i>	<i>Staph</i>	<i>Ot</i>
1	jałowe	+	+	+	##	##	+	±	+
	zak.	###	###	##	###	###	###	###	##
2	jałowe	±	+	±	##	##	+	±	##
	zak.	###	###	##	###	###	###	###	###
3	jałowe	±	±	+	##	##	+	+	+
	zak.	###	###	##	###	###	##	##	##
4	jałowe	±	+	±	##	##	+	±	+
	zak.	###	###	###	##	###	###	##	##
5	jałowe	±	±	+	##	##	+	+	##
	zak.	###	###	##	###	###	##	##	##
6	jałowe	±	+	+	##	##	+	-	+
	zak.	###	###	###	###	###	###	##	##
Azot		±	±	+	##	##	+	±	+

+ = brak wyhodowań  
 ± do +++ = nasilenie wzrostu  
 \*) wyhodowania szczepów wprowadzanych do kontenera

wyniki te uzyskiwano na podłożach namnażających.

Posiewy kulek jałowych po rozmrożeniu ich w roztworze fizjologicznym soli o temp 37°C i pozostawieniu w temp. pokojowej przez okres 45 i 90 minut wypadły ujemnie, natomiast w kilku posiewach po trzech godzinach stwierdzono pojedyncze kolonie. W miarę przetrzymywania zawiesin w temp. pokojowej, ilość wyhodowanych kolonii z tej samej objętości wzrastała a przy tym stwierdzano obecność nawet dwu lub trzech różnych szczepów w jednej kulce.

Omówienie

Mimo szerokiego stosowania w praktyce metody przechowywania nasienia w ciekłym azocie (-196°C), dopiero w ostatnim czasie zaczęto zwracać uwagę na higienę sprzętu i postępowania z nasieniem przeznaczonym do mrożenia. Lormann (2) i Steeg (7) badając bakteriologicznie kontenery używane do przechowywania nasienia, kontenery do transportu ciekłego azotu oraz płyty zestalonego CO<sub>2</sub> stwierdzali różnorodną i obficie występującą florę bakteryjną. Obserwowano również wypadki przeniesienia niektórych chorób zakaźnych jak np. brucelozę, w których ogniwą w łańcuchu zakaźnym stanowiły ręce obsługi i kontenery służące do transportu nasienia (6).

Wymienionych zakażeń można jednak uniknąć, przy przestrzeganiu odpowiedniego poziomu profilaktyki i higieny. Groźniejsze wydaje się niebezpieczeństwo zakażenia nasienia wewnątrz kontenera, nawet przy zachowaniu odpowiedniej higieny sprzętu, w przypadku wprowadzenia do kontenera porcji nasienia zanieczyszczonych chorobotwórczymi zarazkami.

Wyniki naszego doświadczenia mogą wskazywać, że mimo obecności źródła zakażenia w

kontenerze, nie zawsze dochodzi do zakażenia pozostałych porcji nasienia.

W doświadczeniu pierwszym posiewy jałowo przygotowanych kulek nie wykazały dodatnich izolacji, przy równoczesnym prawidłowym wzroście wszystkich włączonych szczepów. Mogłoby to wskazywać, że drobnoustroje z zakażonych kulek nie zostały przeniesione na kulki jałowe, lub tylko w ilościach nie uchwytanych na drodze posiewów bakteriologicznych w przebadanym materiale. Otrzymał wyniki były takie same dla kulek z dodatkiem jak i bez dodatku antybiotyków. Dla zachowania naturalnych warunków, kulki zakażone zawierały ilości drobnoustrojów zbliżone do spotykanych przez nas zanieczyszczeń nasienia mrożonego. Wydaje się jednak, że takie zagęszczenie zarazków było niewystarczające dla wywołania zakażenia kulek jałowych.

Wyniki doświadczenia drugiego potwierdzają możliwość przenoszenia się drobnoustrojów drogą ciekłego azotu, co jest zgodne z wynikami Lormanna (2) oraz Müllera i wsp. (4). Należy jednak podkreślić, że *inoculum* użyte w doświadczeniu drugim, a także przez wyżej wymienionych autorów było bardzo duże bowiem były to hodowle bakteryjne o koncentracji zarazków nie spotykanej w zakażeniach naturalnych. Mimo tak dużego zagęszczenia bakterie przenosiły się, jak wskazuje doświadczenie drugie, na kulki jałowe tylko w niewielkich ilościach. Stwierdzano jedną lub kilka kolonii z posiewu bezpośredniego całej kulki na podłoża stałe, a kilkakrotnie tylko przy zakażeniach *E. coli* stwierdzano kilkanaście kolonii.

Wyniki te na przestrzeni kilkumiesięcznych obserwacji nie ulegały zasadniczym zmianom.

Skoro kulki przygotowane jałowo rozmrażano w roztworze fizjologicznym soli o temp. 37°C, jak to się robi w praktyce unasienniania i dopiero później wysiewano na płytki, to po 45 i 90 minutach nie uzyskano wzrostu z wysianej 1/10 części rozpuszczonej kulki. Pierwsze pojedyncze kolonie obserwowano w niektórych posiewach wykonanych po 3 godzinach. Dopiero w miarę dalszego przetrzymywania zawiesiny w temp. pokojowej izolowano z niektórych kulek po 2 lub 3 szczepy. Świadczy to o obecności zarazków bezpośrednio po wyjęciu materiału z kontenera jednak w ilościach nieuchwytnych w wysianej objętości. Można to również świadczyć o wydłużeniu się fazy zahamowania wstępnego.

Różnice w wynikach obu doświadczeń pozostają więc w związku z ilością wyjściową drobnoustrojów wprowadzonych do kontenera. O ile wyhodowanie zarazków z materiału przechowywanego bezpośrednio w ciekłym azocie jest naturalnym następstwem możliwości ich przeżywania w środowisku ciekłego azotu (1), co jest możliwe nawet bez osłony glicerołowej lub innej przez długi okres czasu (Pia-

secka-Serafin, badania w toku), to zakażenie kulek nasienia może być uzależnione od wielkości *inoculum* wprowadzonego do kontenera.

Przemieszczanie się zarazków prawdopodobnie polega na mechanicznym przeniesieniu przez będący w ruchu ciekły azot, cząstek zmytych z powierzchni jednej kulki na drugą. Nie jest to jednak jeszcze zakażenie, gdyż zarazek naniesiony na powierzchnię jakiejś kulki może zostać z niej z powrotem zmyty, a więc „zakażenie” kulek wewnątrz kontenera może w pewnych warunkach stanowić proces odwracalny. Właściwe zakażenie kulki następuje dopiero po wyjęciu jej z kontenera i rozmrożeniu kiedy naniesiony na jej powierzchnię zarazek zaczyna się mnożyć. Drobnoustroje nie znajdują warunków do rozmrażania się w środowisku ciekłego azotu i im mniej dostanie się ich do kontenera, tym jest mniejsza możliwość trwałego osadzenia się ich na powierzchni kulek.

Na podstawie dotychczasowych badań trudno określić jaka ilość komórek bakteryjnych jest potrzebna, aby powstało realne niebezpieczeństwo zakażenia kulek nasienia, wydaje się jednak, że w przypadku drobnoustrojów względnie chorobotwórczych *inoculum* w kontenerze zbliżone do zakażeń naturalnych może nie stanowić szczególnego zagrożenia. Jednakże sam fakt przenoszenia się zarazków drogą ciekłego azotu każe zwracać baczną uwagę na profilaktykę oraz przestrzeganie zasad higieny sprzętu oraz higieny pobierania i przygotowania nasienia do mrożenia. Konieczne wydaje się systematyczne badanie bakteriologiczne dawców nasienia. W wypadku bowiem dostania się do kontenera zarazków o szczególnej zjadliwości, patogennych dla unasienianych zwierząt, nawet niewielka ich ilość mogłaby się okazać niebezpieczna w rozumieniu zagrożenia epizootycznego.

### Wnioski

1) Istnieje możliwość przenoszenia zarazków drogą ciekłego azotu.

2) Możliwość zakażenia nasienia pozostaje w związku z ilością bakterii wprowadzonych do kontenera.

3) Przedstawione wyniki badań wskazują na konieczność szczególnego przestrzegania zasad profilaktyki oraz higieny postępowania przy konserwacji nasienia w niskich temperaturach.

### Piśmiennictwo

1. Jahnelt F.: Klin. Wschr. 16, 1304—1305, 1937.
2. Lorrmann W.: Versuche zur Keimübertragung bei der Tiefgefrierkonservierung von Samen in Pelletform. Vet. Med. Diss., Hannover, 1967.
3. McFadyen A., Rowland S.: Proc. Roy. Soc., Biol. Sci., 66, 482—489, 1900. London.
4. Müller W., Leipnitz Chr., Strauch D.: Berl. und Münch. Tierärztl. Wschr., 4, 64—66, 1968.
5. Nagase H., Niwa T.: Rep. 5th Int. Congr. Animal. Reprod. and A. I., 4, 410, 1964.
6. Perez M.: Informacja ustna, 1968.
7. Steeg L.: 6th Int. Congr. Animal. Reprod. and A. I. Resumé: 206, 1963.

Adres autora: dr Monika Piasecka-Serafin, Kraków, ul. Brodowicza 13a m. 1.

Пясецка-Сэрафин М., Бранны Е., Вежбовски С. — Исследования по возможности бактериальных заражений семени, сохраняемого непосредственно в жидком азоте.

Исследовали возможность заражения семени посредством жидкого азота. В контейнеры, содержащие стерильно приготовленные шарики разбавителя семени, вводили шарики зараженные определенным количеством бактерий. Для заражения применяли штаммы *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* изолированные из семени, хранимого в жидком азоте, а оболочную палочку выделенную из азота. При концентрации микроорганизмов близкой к выступающей в семени в естественных условиях переноса бактерий путем жидкого азота не обнаружили. Помещение в контейнер неразбавленных бактериальных культур приводило, однако, к заражению стерильного материала. Авторы приходят к выводу, что возможность переноса микроорганизмов посредством жидкого азота существует по опасности заражения замороженного семени внутри контейнера зависит от концентрации бактерий в введенном материале. Количества бактерий требуемого для заражения семени в среде жидкого азота не установили.

Piasecka-Serafin M., Branny J., Wierzbowski S. — Studies on the possibilities of bacteria infection of semen stored directly in liquid Nitrogen.

Studies were carried out on the possibilities of transferring bacteria by liquid Nitrogen. Pellets infected with definite numbers of bacteria were introduced into the containers containing sterile prepared, pelleted semen diluent. The strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* were isolated from semen stored in liquid Nitrogen, and capsulated rods from the liquid Nitrogen. When bacteria concentration in the infected pellets was similar to that in natural infection no translocation of bacteria to sterile prepared pellets there was observed. When undiluted pelleted broth cultures were placed in the container, the infection of sterile prepared materials was evident. Our studies indicated to the possibility of transferring bacteria by liquid Nitrogen. It seems, however, that the infection of the semen inside the container may depend upon the concentration of bacteria in the infected material introduced. On the basis of the results obtained up to now, there is not possible to determine the number of bacteria necessary to induce the infection of semen in liquid Nitrogen.

NAUMOW W. A., CHRUSTALEW A. S., KRIWOSZEINA G. A.: Zapalenie opon mózgowych i mózgu cieląt o nieznannej etiologii. (Meningoencefalit cieląt niezwiastnej etiologii). Wietierinaria (Moskwa) 46, 2, 65, (1969).

Choroba pojawiła się w 1965 r. w 2 rejonach, a w 1968 r. notowano ją już w szeregu kołchozów 6 rejonów obwodu kirowskiego. Chorowały głównie cielęta 3—5-miesięczne, rzadko 1-miesięczne i 6-miesięczne.

Choroba trwała 5—7 niekiedy 12 dni i kończyła się śmiercią. Podstawową cechą kliniczną były objawy ślepoty, a patomorfologiczną — proliferacja histiocytarnych komórek. Nacieki dużych komórek występowały w korze mózgowej i w miękkich oponach mózgu. Do badania histologicznego należy brać przede wszystkim wycinki z okolicy ciemieniowej i potylicznej mózgu. Próby stosowania antybiotyków (penicyliny i stertptomycyny), urotropiny, glukozy, bromku sodu, siarczanu magnezu, witamin itp. nie dały żadnego wyniku. Przypadków wyzdrowienia nie obserwowano. Autorzy podejrzewają możliwość etiologii wirusowej.

T. J.