

# FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

STEFAN WIERZBOWSKI

## Założenia prewencji weterynaryjnej wynikające z ryzyka infekcji związanego z obrotem izolowanym materiałem genetycznym

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki,  
32-083 Balice k.Krakowa

Pod koniec lat pięćdziesiątych ciekły azot został wprowadzony do praktyki konserwacji nasienia. Od tego czasu stosowanie nasienia mrożonego w inseminacji bydła zaczęło gwałtownie wzrastać. Przyjmuje się, że około 150 mln krów rocznie jest unasienianych już tylko mrożonym nasieniem. Jak wiadomo, w Polsce również od kilku już lat stosuje się tylko ten sposób konserwacji nasienia. O praktycznej przydatności metody zdecydowała w pierwszym rzędzie możliwość uzyskiwania cielności na fizjologicznym poziomie. Następnie, niezmienną się wartość nasienia bez względu na czas przechowywania, warunkująca zarówno możliwość realizacji programów oceny buhajów, opartych na użytkowości potomstwa, jak i transport na dowolne odległości, zdecydowały o tak szerokim wykorzystaniu nasienia mrożonego w hodowli bydła. Równocześnie zdecydowało to także o niesłychanym rozwoju obrotu nasieniem w skali międzynarodowej. Stosunkowo tanio i bez ryzyka strat w czasie transportu — najlepszy materiał genetyczny stał się dostępny dla hodowców na całym świecie. W rezultacie kilka milionów porcji nasienia jest corocznie w obrocie międzynarodowym.

Ogromne możliwości rysują się w międzynarodowym obrocie zarodkami. W tym przypadku do dyspozycji hodowcy jest stawiany pełny skład genetyczny, a nie tylko jego połowa — jak to ma miejsce w przypadku nasienia. Aczkolwiek obrót zarodkami na niewielką skalę już się odbywa, jego szeroki rozwój jest uzależniony od postępu w zakresie metod produkcji zarodków oraz podniesienia wydajności możliwej do uzyskania po przeniesieniu mrożonych zarodków. Obecnie uzyskiwane wyniki na poziomie średnio 40—45% są niższe o 15—20% od uzyskiwanych po świeżych zarodkach, co w sposób oczywisty obniża atrakcyjność metody.

Obok obrotu materiałem genetycznym, którego celem jest zaspokajanie bieżących potrzeb, rozwija się również tworzenie tzw. rezerw materiału genetycznego zanikających ras. Stosownie do koncepcji, zamrażana jest odpowiednia liczba porcji nasienia i zarodków. W założeniu

leży możliwość odtworzenia określonej rasy, czy typu zwierzęcia, z tak zabezpieczonego materiału genetycznego. Ponieważ nie można przewidzieć czasu i miejsca wykorzystania tych zasobów, gromadząc je trzeba brać pod uwagę, że materiał ten może stać się przedmiotem obrotu międzynarodowego i stosować trzeba te same zasady, co w odniesieniu do materiału przeznaczanego do bieżącego użycia.

Metody stosowane przy mrożeniu nasienia i zarodków prowadzą do równie skutecznego zamrażania drobnoustrojów znajdujących się w nasieniu, na powierzchni zarodków, czy też w płynach używanych do konserwacji i hodowli. Niektóre składniki tych płynów są również pochodzenia zwierzęcego (jaja, mleko, albuminy, surowica krwi). Stosowany powszechnie dodatek antybiotyków do nasienia należy uważać za sposób redukujący tylko ryzyko przeniesienia infekcji za pośrednictwem nasienia i to jedynie w stosunku do zakażeń bakteryjnych. W stosunku do chorób wirusowych, stanowiących główne niebezpieczeństwo, dodatek antybiotyków nie stanowi żadnego zabezpieczenia. Nie ma jeszcze żadnego pewnego sposobu neutralizacji czynnika zakaźnego, jeżeli ten znajduje się w środowisku zamrażanego nasienia, czy zarodków. Być może w przyszłości „immunoekstensja” sygnalizowana kiedyś przez Bartletta (4), a obecnie zalecana już przez Schultza (17) będzie skutecznym sposobem eliminacji wirusów, które znajdują się w nasieniu. Będzie to może metoda właściwa dla warunków Północnej Ameryki, gdzie wszechobecność niektórych wirusów i szeroko stosowane szczepienia właściwie uniemożliwiają stosowanie metod już przyjętych w Europie.

W przypadku tworzenia rezerw materiału genetycznego trzeba też brać pod uwagę zmiany, jakie mogą zachodzić w środowisku, i że obojętne obecnie mikroorganizmy za lat kilkadziesiąt wprowadzone do zmienionego otoczenia, mogą stanowić potencjalne niebezpieczeństwo. Materiał biologiczny zamrożony i przechowywany w temperaturach poniżej  $-130^{\circ}\text{C}$  nie ulega zmianie i może być przechowywany bez

utrąty swych właściwości przez czas praktycznie nieograniczony. Reakcje chemiczne poniżej tej temperatury ustają, pozostaje tylko pytanie odnośnie wpływu zjawisk fizycznych — jak promieniowanie. Najwyższa dawka promieniowania zastosowana w doświadczeniu Lyon i wsp. (15) odpowiadająca napromieniowaniu, które może być akumulowane w ciągu 400—500 lat, powodowała tylko nieznaczny spadek przeżywalności zarodków. Według kalkulacji Ashwood-Smith i Grant (2), dla materiału biologicznego przechowywanego w ciekłym azocie dopiero po około 32 000 lat mogłoby dojść do zniszczeń i uszkodzeń chromosomów, odpowiadającym tym, jakie następują po niszczącym napromieniowaniu rentgenowskim w temperaturze 22°C. Praktycznie więc czas przechowywania materiału biologicznego w temperaturach poniżej -130°C wydaje się być nieograniczony. Sprawdzian biologiczny jest ograniczony jeszcze stosunkowo krótkim okresem przechowywania nasienia w stanie zamrożonym. W 1975 roku ukazała się notatka (9) o urodzeniu w Szwajcarii cielęcia po nasieniu przechowywanym blisko 20 lat.

Odtwarzanie określonych szczepów myszy z zamrożonych zarodków jest przyjętą metodą postępowania w Jackson Laboratory już od 1978 roku. W 1980 roku było w banku ponad 33 tysiące zarodków od 106 szczepów (16). Te same możliwości istnieją również w przypadku innych zwierząt i z czasem będzie przybierała informacja o urodzeniach po zarodkach przechowywanych latami.

Na podstawie przedstawionych materiałów nasuwają się trzy następujące stwierdzenia:

- podczas zamrażania nasienia i zarodków, zamraża się równocześnie wszystkie drobnoustroje, które w zamrażanym środowisku się znajdowały,
- nie ma metod dających całkowitą pewność neutralizacji mikroorganizmów, które mogą się znajdować w nasieniu,
- zamrożony materiał biologiczny zachowuje swoje właściwości na okres nieograniczony przewidywalnymi możliwościami wykorzystania.

Przedstawione warunki skłaniają do rozpatrzenia istniejącego obecnie ryzyka produkcji zakażonego nasienia i zarodków i wynikającego z tego niebezpieczeństwa roznieśienia infekcji przy okazji sztucznego unasienniania czy przeniesienia zarodków.

#### Nasienie

Główny problem stanowi ryzyko zakażenia za pośrednictwem nasienia. Wynika to zarówno ze stwierdzonej możliwości wydalania z nasieniem wszystkich wywoływczy wielu najważniejszych obecnie epizootologicznie chorób, jak i ogromnej skali obrotu tym materiałem, obejmującej cały świat.

Tab. 1. Rozpoznane ryzyko przenoszenia „wywoływaczy” chorób zakaźnych bydła wraz z izolowanym materiałem genetycznym

Jednostka chorobowa	Stwierdzone wydzielenie wywoływacza z nasieniem lub zarodkami	
	nasienie	zarodki
Brucelloza	+	—
Gruźlica	+	—
Paratuberkuloza	+	—
Zaraza rzęsistkowa	+	—
Zaraza mętlikowa	+	—
Leptospiroza	+	—
Erzootyczna białaczka bydła	+ x/	—
Otręt	+	—
Wirusowa biegunka bydła	+	—
Pryszczycyca	+	—
Choroba niebieskiego języka	+	—

Objaśnienie: x) — w przypadku obecności w nasieniu limfocytów zawierających wirus EBB.

Nie ma potrzeby rozważania ryzyka związanego z pryszczycą, zarazą bydła i dziczyzny oraz księgosuszem, gdyż z wyjątkiem pryszczycy wszystkie pozostałe nie występują już od lat w krajach o wysoko rozwiniętej hodowli bydła. Zresztą są to choroby zwalczane z urzędu, stwarzające tak ogromne niebezpieczeństwo, że nie można sobie nawet wyobrazić produkcji nasienia, czy zarodków podczas istniejącego zagrożenia którąkolwiek z tych chorób.

Metody kontroli i eliminacji gruźlicy, brucellozy, paratuberkulozy, leptospirozy, zarazy rzęsistkowej i zarazy mętlikowej, są dobrze znane i skuteczne. Konsekwentnie prowadzone zapobieganie i zwalczanie pozwala na utrzymywanie stad buhajów w stanie wolnym od tych chorób. Oczywiście wskazana byłaby standaryzacja metod rozpoznawczych i zasad prowadzenia badań kontrolnych.

Warunkowo-patogenne drobnoustroje przenoszone z nasieniem, aczkolwiek stwarzają mniejsze zagrożenie, również muszą znajdować się pod kontrolą. Do tej grupy trzeba też zaliczyć wszechobecne, zanieczyszczające nasienie bakterie. Panowanie nad sytuacją musi się tu opierać na przemyślanej i konsekwentnie przestrzeganej higienie utrzymania reproduktorów, higienie produkcji nasienia, regularnej kontroli bakteriologicznej nasienia i wreszcie na dodawaniu do rozcieńczalnika skutecznie działających antybiotyków. W tej grupie znajdują się mykoplazmy, ureaplazmy, chlamydie, gronkowce, paciorkowce, pałeczki ropy błękitnej, pałeczki odmienia, coraz głośniejszy w ostatnich latach *H. somnus* i wreszcie grzyby i pleśnie, które też czasem posądza się o „wyrządzenie szkód” w obrębie narządu rodnego.

Największe znaczenie i zagrożenie stanowi grupa chorób wirusowych, w odniesieniu do których dopiero formuje się pogląd odnośnie zabezpieczenia buhajów przed zakażeniem oraz wykluczania niebezpieczeństwa szerzenia infekcji za pośrednictwem zakażonego nasienia.

Enzootyczna białaczka bydła. Nie wykazano występowania wirusa EBB w nasieniu, natomiast wiadomo, że wirus ten jest replikowany w obrębie limfocytów. Regularna kontrola nasienia pochodzącego w 11% od buhajów serologicznie dodatnich na EBB, którą objęto w ciągu 4 lat 40 000 ejakulatów, nie wykazała w ani jednym ejakulacie obecności tego wirusa (18)

Próby przeniesienia białaczki za pośrednictwem nasienia pochodzącego od zakażonych buhajów dały ujemny wynik (3, 12). Do tej pory wynik dodatni takiego eksperymentu opisali tylko Lucas i wsp. (14). Jednak nasienie w tym doświadczeniu było uzyskane w drodze masażu gruczołów pęcherzykowych i nie było kontrolowane na obecność limfocytów. Stąd też nie można wykluczyć obecności w tak uzyskanym nasieniu zakażonych limfocytów, które tam mogły przeniknąć z uszkodzonych masażem gruczołów pęcherzykowych. Jednak regularna kontrola każdego ejakulatu na obecność limfocytów byłaby zajęciem żmudnym, kosztownym i nie dającym 100% pewności. Równocześnie obecność w stadzie zakażonych buhajów stwarza ryzyko rozniesienia infekcji na pozostałe zwierzęta. Biorąc więc to wszystko pod uwagę, jedynie właściwym kierunkiem jest dążenie do dysponowania buhajami wolnymi od EBB.

Otręt (IBR IPV IBP). Grupa wirusów odpowiedzialnych za wywoływanie schorzeń zarówno dróg oddechowych, jak i moczopłciowych u bydła stwarza szczególnie dużo kłopotów. Wydaje się, że są to wirusy wykazujące zmieniającą się skłonność w kierunku błon śluzowych określonych narządów, a także do środowiskowych uwarunkowań. Taką hipotezę można wysunąć zarówno na podstawie opinii Kharsa i wsp. (11), jak i obserwacji utrzymującej się u nas już od przeszło 10 lat enzootii otrętu w zakładach unasienniania. Khars pisze w ten sposób o stwierdzaniu wirusa IBR w nasieniu buhajów: „Nieizolowanie wirusa IBR z nasienia w badaniach prowadzonych w Północnej Ameryce, kontrastuje z częstym stwierdzeniem go w badaniach prowadzonych w Australii, Afryce i Europie. Aż do 1977 roku nie udawało się izolować wirusa z nasienia w Ameryce Północnej z wyjątkiem tych przypadków, kiedy go dodawano w celach doświadczalnych lub też buhaje były inokulowane wirusem IBR. Na innych kontynentach stwierdzano wirusa IBR w nasieniu buhajów z kliniczną formą *balanopostitis* u buhajów z latentną infekcją reaktywowaną w wyniku podania kortikosteroidów i u buhajów z latentną infekcją, która uaktywniała się spontanicznie. Istnieje domniemanie, że północno-amerykańskie szczepy IBRV mnożą się głów-

nie w błonie śluzowej dróg oddechowych przy minimalnym zajęciu narządów rozrodczych, natomiast odwrotna sytuacja może przeważać gdzie indziej. Jeżeli ta hipoteza jest słuszna, nowo zakażone buhaje szczepami IBRV o skłonności do dróg oddechowych, rzadko kiedy będą wydzielają z nasieniem wystarczającą dla wykrycia ilość wirusów. Jest to hipoteza możliwa do przyjęcia, ale trudna do udowodnienia. Natomiast ewentualny pogląd o niskiej wrażliwości stosowanego testu musi być sprawdzony”.

Wydaje się, że na podstawie dotychczasowego przebiegu enzootii w naszych stacjach buhajów, można nawet mówić o predyspozycji tego szczepu wirusa (a więc IBPV) do męskich narządów płciowych. Przemawiają za tym sporadycznie tylko rozpoznawane przypadki otrętu u krów.

Niezależnie jednak od rozważań dotyczących etiologii i uwarunkowań infekcji IBR/IPV/IBP konieczne jest stosowanie radykalnych poczynań prowadzących do eliminacji tej choroby, która nabiera już charakteru endemicznego, z naszych SHiUZ.

Wprowadzanie tylko zwierząt serologicznie ujemnych do wychowywalni buhajów i zakładów unasienniania, późniejsze regularne badania kontrolne oraz właściwa izolacja tych obiektów — tak jak to jest praktykowane z dobrym skutkiem w wielu krajach europejskich i u nas w Wielkopolsce — stanowią jedyną drogę do dysponowania buhajami wolnymi od zakażenia, a w efekcie do produkcji nasienia nie stwarzającego ryzyka przeniesienia IBR/IPV/IBP. Przypadek przeniesienia z nasieniem importowanym do Szwajcarii wirusa IBR/IPV i stwierdzenie serokonwersji u części z ponad 700 inseminowanych krów, chociaż bez objawów klinicznych, skłonił władze tego kraju do zmiany obowiązujących przepisów. Obecnie wymaga się, żeby buhaje były serologicznie ujemne nie tylko przed rozpoczęciem pobierania serii ejakulatów przeznaczonych na eksport do Szwajcarii, ale żeby wynik ujemny badania był powtórzony również po zakończeniu pobierań. Wynika to z rozpoznania, że buhaj dający początek tej sprawie, uległ zakażeniu IBR/IPV w okresie pobierania od niego nasienia, które zostało następnie wyeksportowane do Szwajcarii (13).

Wirusowa biegunka bydła (BVD). Podobnie, chociaż może nie w tym nasileniu co IBR, wirusowa biegunka bydła jest dosyć często spotykana na kontynencie amerykańskim. Szczepienia są prowadzone rutynowo w wielu oborach i to wpływa na częstotliwość występowania zwierząt z dodatnim mianem surowicy. Sytuacja w Europie nie jest jeszcze całkiem jasna, chociaż wiadomo już, że infekcja BVD była stwierdzana w kilku krajach, przy czym również w zakładach unasienniania.

Obecność wirusa BVD była stwierdzana w nasieniu naturalnie zakażonych buhajów (6), również po doświadczalnym zakażeniu (23), a także w rutynowej kontroli wirusologicznej na-

sienia produkowanego do inseminacji (18). Powstaje więc potrzeba stosowania podobnych pościągnięć prewencyjnych prowadzących do eliminacji ryzyka produkcji nasienia zakażonego wirusem BVD, jakie muszą mieć miejsce w stosunku do białaczki i otrętu.

Niebezpieczeństwo roznieśnięcia choroby zakaźnej jest znacznie większe w przypadku nasienia niż zarodków i musi być brane pod uwagę przy formaniu wymagań sanitarno-weterynaryjnych obowiązujących w obrocie materiałem genetycznym. Wszystkie\*) „wywoływacze” chorób zakaźnych mogą być wydalane z nasieniem, natomiast zarodek jest otoczony błoną, która go skutecznie chroni przed wniknięciem drobnoustrojów (tab. 1). Stwarza to podstawę do odmiennego formowania przepisów dotyczących eliminacji ryzyka związanego z użyciem nasienia lub zarodków. A nawet stwarza dobrze już znaną możliwość uzyskiwania zdrowego potomstwa od krów dotkniętych chorobami infekcyjnymi.

Obrót nasieniem nie stwarzającym ryzyka roznieśnięcia choroby zakaźnej winien się opierać na założeniu, że do produkcji nasienia używa się wyłącznie buhajów wolnych od chorób zakaźnych. Pod uwagę należy brać: gruźlicę, brucelozę, paratuberkulozę, zarazę rzęsistkową, zarazę mętlikową, leptospirozę, białaczkę, otręt, wirusową biegunkę bydła.

Koncepcja utrzymania stad buhajów w stanie wolnym od wym. chorób wymaga z kolei spełnienia następujących warunków:

- buhajki zakupywane do wychowalni winny być wolne i pochodzić od matek wolnych od wym. chorób;
- wychowalnie buhajów, stacje testowania buhajów i stada buhajów należące do SHiUZ winny być objęte jednym systemem kontroli oraz izolacji.

Należy pamiętać, że przepisy wprowadzane teraz, nabierają pełnej wartości dopiero za około 7 lat. Tyle bowiem trwa wycena buhaja na podstawie użyteczności potomstwa, a dochodzimy obecnie do stanu, w którym 50% pogłowia inseminuje się nasieniem buhajów sprawdzonych. Również ewentualny eksport może dotyczyć jedynie nasienia buhajów o sprawdzonej wartości użytkowej. Już teraz obowiązujące wymagania w międzynarodowym obrocie nasieniem zakładają jako podstawę pochodzenie tego nasienia od zwierząt wolnych od chorób zakaźnych. Można oczekiwać, że z czasem te przepisy będą ulegały dalszym zaostrzeniom, jak to miało miejsce po przeniesieniu wirusa IBR z nasieniem importowanym do Szwajcarii w 1982 roku.

### Zarodki

Transplantacja zarodków stwarza zgoła odmienną sytuację dotyczącą ryzyka przeniesienia

czynnika wywołującego chorobę zakaźną, niż ta, z jaką mamy do czynienia w przypadku nasienia.

Zarodek bydłecy jest do 8—9 dnia otoczony błoną przejrzystą (*zona pellucida*). Jest to stosunkowo gruba, bezkomórkowa formacja zbudowana z glikoprotein. Jak można wnioskować z dotychczas przeprowadzonych doświadczeń, w przypadku zarodków bydłecy jest to zaporą nie do sforsowania dla wszystkich „wywoływaczy” chorób wirusowych. Tych możliwości nie mają oczywiście też bakterie oraz grzyby, pleśnie i pierwotniaki. Można więc wnioskować, że zarodki w najwcześniejszym okresie rozwoju, to jest do wylęgnięcia, są chronione w sposób szczególny przed infekcją. Biorąc pod uwagę, że do przenoszenia pobiera się zarodki 7-dniowe, są to więc zarodki jeszcze całkowicie osłonięte nieprzenikliwą dla drobnoustrojów błoną. Należy tu dodać, że jedynym do tej pory rozpoznanym wyjątkiem jest wirus *Mengo*, który wydaje się mieć zdolność przenikania błony przejrzystej zarodka myszy (5, 7). Ze względu na oporność błony przejrzystej na przenikanie wirusów wymaga się, żeby zarodki pochodzące od zakażonych dawczyń miały nieuszkodzoną błonę przejrzystą. Wykazano jednak, że wirusy odpowiedzialne za wywoływanie niektórych schorzeń zakaźnych mogą się przyklejać do powierzchni błony przejrzystej. Rozpoznano to w odniesieniu do wirusa IBR (20). Zostało to jednak stwierdzone w warunkach eksperymentalnych, w których użyta koncentracja wirusa przewyższała prawdopodobnie bardzo znacznie koncentrację wirusów spotykaną w warunkach naturalnych. Jednakże z uwagi na stwierdzone przypadki wypłukiwania wraz z zarodkami pozyskiwanymi od zakażonych dawczyń również i wirusów wywołujących dane schorzenie, nie można wykluczyć ewentualności przyklejania się wirusów do błony przejrzystej zarodków, również i w warunkach naturalnych. Stąd też wynika zalecenie płukania zarodków pozyskiwanych od zakażonych dawczyń.

Rozpoznana sytuacja dotycząca ewentualnego ryzyka wywoływania infekcji przy okazji przenoszenia zarodków

— **Enzootyczna białaczka bydła.** Nie stwierdzono przypadków przenikania wirusa EBB ani do oocytów, ani dla zarodków, ani też przyklejania się do powierzchni *zona pellucida*. Jest to wszystko oczywiste, jeżeli opierać się na obowiązującym poglądzie, że wirus EBB występuje tylko w obrębie limfocytów.

Zbierając wyniki doświadczeń przeprowadzonych do 1984 roku Singh (20) podaje, że w wyniku przeniesienia 407 zarodków pochodzących od dawczyń reagujących serologicznie dodatnio na EBB, wszystkie urodzone cielęta i wszystkie biorczynie zarodków pozostały serologicznie ujemne na EBB. Rozpoznanie to stwarza podstawę stosowania metody przenoszenia zarodków dla ratowania genetycznych wartości krów, czy stad dotkniętych EBB (8).

\*) Wirus EBB może być wydalany w nasieniu tylko w obrębie limfocytów, które mogą się tam znajdować w przypadkach stanów zapalnych dróg wyprowadzających nasienie.

— Otret (IBR/IPV/IBP). Znowu opierając się na wynikach badań Singh (21, 22) oraz opracowaniach przeglądowych z tego zakresu (20, 24) można zakładać, że w warunkach naturalnych wirus IBR nie zakaża nie zapłodnionych jaj oraz zarodków, a także nie stwierdzono przyklejania się go do powierzchni zarodków pochodzących od dawczyń serologicznie dodatnich na IBR. Natomiast przetrzymywanie zarodków *in vitro* w zawieszynie zawierającej  $10^3$ — $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml wirus IBR doprowadziło do przyklejania się wirusa do błony przejrzystej 64% zarodków. Rozwój zarodków przebiegał jednak bez zakłóceń, a płukanie przy użyciu zarówno surowicy anty-IBR, jak i trypsyny prowadziło do usunięcia wirusów, co pozwalało na wnioskowanie, że były one tylko przyklejone do powierzchni błony przejrzystej (20).

Przeniesienie 62 zarodków pochodzących od dawczyń wydzielających wirusa IBR stwierdzonego u nich w macicy lub w jajowodach, nie spowodowało serokonwersji u biornych, ani też żadne z urodzonych cieląt nie było serologicznie dodatnie. Dalsze 63 zarodki i nie zapłodnione jaja pochodzące od tych samych dawczyń, poddane kontroli na obecność wirusa dały wynik ujemny. Wszystkie te zarodki były po pobraniu płukane w roztworze trypsyny. Nie wykazano, czy w warunkach naturalnych wirus przykleja się do błony przejrzystej. Jednak u 10 z 22 dawczyń w popłuczynach z macicy stwierdzono  $10^8$  pfu/ml wirusa IBR. Stanowiło to wystarczająco wysoką koncentrację, aby mogło nastąpić przyklejanie się wirusów w czasie prób prowadzonych *in vitro*. Wyciągnięty został z tego wniosek, że płukanie zarodków w roztworze trypsyny skutecznie usuwa wirusy IBR przyklejone do powierzchni błony przejrzystej i że winno być stosowane przy pobieraniu zarodków od krów zakażonych IBR (20).

— Wirusowa biegunka bydła (BVD). Umieszczenie 96 zarodków w zawieszynie wirusów BVD, w ani jednym wypadku nie doprowadziło do przyklejania się wirusów do błony przejrzystej. Również jaja i zarodki pobrane od dawczyń serologicznie dodatnich na BVD nie miały wirusów przyklejonych do powierzchni błony przejrzystej (20). Co prawda w innym doświadczeniu (1) wykazano ujemny wpływ domacicznej inokulacji zawiesiny wirusa BVD na rozwój zarodków, ale mogło to być równie dobrze następstwem zmienionego zapalnie środowiska macicy, jak i terminu inokulacji, który mógł już przypadać na okres wylęgania się części zarodków.

W dotychczas przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że również wirusy pryszczycy, choroby niebieskiego języka i akabana, ani nie przenikały, ani nie przyklejały się do powierzchni błony przejrzystej zarodków bydłych (20).

Jest oczywiste, że we wszystkich przypadkach, kiedy dawczyni są wolne od chorób zakaźnych, a tego trzeba wymagać w standardo-

wym wykorzystaniu metody dla celów hodowlanych, ryzyko przeniesienia infekcji wraz z zarodkami sprowadza się do zera. Należy przy tym zakładać, że wszystkie składniki pochodzenia zwierzęcego używane w płynach służących do wypłukiwania, czy przechowywania zarodków, muszą być wolne od mikroorganizmów mogących wywoływać choroby zakaźne. Uwzględniając te zastrzeżenia, przenoszenie zarodków jest najbezpieczniejszą epizootologicznie metodą obrotu materiałem genetycznym. Stosowany w skali międzynarodowej obrót zarodkami będzie również najtańszą metodą przenoszenia pełnej informacji genetycznej. Obrót żywymi zwierzętami jest bowiem kosztowny ze względu na drogi transport i konieczność przetrzymywania zwierząt w kwarantannie, a przy tym zawsze jednak związany z ryzykiem przeniesienia chorób infekcyjnych oraz inwazyjnych.

Nieprzenikliwość błony otaczającej zarodek dla drobnoustrójw otwiera możliwość wykorzystania metody przenoszenia zarodków dla uzyskiwania zdrowego potomstwa od matek dotkniętych chorobami zakaźnymi. Jest to szczególnie warta metody o sprawdzonej, czy sprawdzanej jeszcze przydatności w praktyce. O ratowaniu na tej drodze szczególnie cennych wartości genetycznych obory dotkniętej białaczką pisze Hare (8), a w odniesieniu do chlewni zakażonej chorobą Aujeszky skuteczność takiego postępowania wykazał James (10).

W odniesieniu do metody przenoszenia zarodków można więc określić dwie wyraźne linie postępowania w zakresie ustalania przepisów sanitarno-weterynaryjnych. Jedną będzie dotyczyła obowiązujących w odniesieniu do zdrowych dawczyń zarodków, a druga — sytuacji szczególnych, kiedy zakłada się wykorzystanie metody dla uzyskiwania zdrowego potomstwa od krów dotkniętych chorobami zakaźnymi.

Podstawowe wymogi sanitarno-weterynaryjne dotyczące pracy Stacji Przenoszenia Zarodków

1. Ocena zdrowia krów typowanych na dawczyni zarodków:

- Ocena epizootologiczna na podstawie właściwych testów celem wyeliminowania krów dotkniętych chorobami zakaźnymi.
- ocena kliniczna ze szczególnym uwzględnieniem historii kariery rozrodczej oraz stanu narządu rozrodczego krowy. Zwierzęta nie rokujące przydatności jako dawczynie zarodków muszą być dyskwalifikowane.

2. Ocena zdrowia zwierząt przewidywanych jako biornych zarodków prowadzone jest wg tych samych zasad. Posługiwanie się jałowkami znacznie upraszcza zakres wymagań dotyczących punktu b.

3. Jałowość sprzętu i wszystkich materiałów używanych do pozyskiwania, przechowywania i przenoszenia zarodków musi być po-

stawiona na poziomie wymagań obowiązujących w chirurgii.

Wymogi specjalne obowiązujące przy stosowaniu metody przenoszenia zarodków w odniesieniu do krów-dawczyń dotkniętych chorobą zakaźną\*\*)

1. Zarodki muszą być otoczone nieuszkodzoną błoną przejrzystą, do której nie mogą też przylegać obce komórki lub tkanki.

2. Zarodki muszą być poddane płukaniu celem usunięcia wirusów, ewentualnie przyklejonych do powierzchni błony przejrzystej. W przypadku krów-dawczyń dotkniętych infekcją IBR oraz *vesicular stomatitis* (pęcherzykowe zapalenie żołądka) należy stosować dodatek trypsyny do płynu, gdyż ze względu na przyklejanie się wirusów do powierzchni błony przejrzystej, działanie mechaniczne nie wystarcza dla ich usunięcia.

Szczegóły postępowania obejmujące wszystkie etapy metody przenoszenia zarodków winny być wykonywane wg instrukcji, która w sposób wyczerpujący musi przedstawiać tryb postępowania, kładąc odpowiedni nacisk na stronę sanitarno-weterynaryjną metody. Konieczne są również odpowiednie przepisy weterynaryjne regulujące zasady pracy Stacji Przenoszenia Zarodków od strony specjalistycznego przygotowania lekarzy wet. oraz zabezpieczeń epizootologicznych. Właściwą formą wydaje się tu być wprowadzenie licencjonowania tych SPZ, które będą mogły spełnić stawiane wymagania. W początkowym okresie stosowania metody, wydawanie albo cofanie licencji winno należeć do Departamentu Weterynarii. Z czasem, gdy zna-

jomość przepisów i obligatoryjność ich stosowania stanie się oczywista, można szukać prostszych form regulowania działalności sanitarno-weterynaryjnej SPZ.

#### Piśmiennictwo

1. Archbald L. F., Fulton R. W., Segar C. L., Al-Bagdadi F., Godke R. A.: *Theriogenology*. 11, 81, 1979.
2. Ashwood-Smith M. J., Grant E.: Genetic stability in cellular stored in the frozen state. w: *The freezing of mammalian embryos*. Ciba Foundation Symp. 52. Elsevier Excerpta Medica. North Holland. 1977, s. 251.
3. Baumgartner L. E., Crowley J., Entine S., Olson C., Hugoson G., Hansen H. J., Dreher W. H.: *Zbl. Vet. Med.* B 25, 202, 1973.
4. Bartlett D. E.: *FAO Animal Prod. Health Paper* 23, 29, 1981.
5. Bowen R. A.: *Theriogenology*. 11, 5, 1979.
6. Coria M. F., Mc Clurkin A. W.: *J. Am. vet. med. ASS.* 172, 449, 1978.
7. Hare W. C. D.: *Proc. 10th ICARAI*, 4 (IX), 1, 1984.
8. Hare W. C. D.: *Proc 87th An. Meet. US Animal Health Ass.* 1983, s. 303.
9. H. L. (anon.): *K. B. Mitteilungen des Schweiz. Verbandes für K. B.* 13, 105, 1975.
10. James J. E., James D. M., Martin P. A., Reed D. E., Davis D. L.: *J. Am. vet. med. ASS.* 183, 525, 1983.
11. Kahrs R. F., Gibbs E. P. J., Larsen R. E.: *Theriogenology*. 14, 151, 1980.
12. Kaja R. W., Olson C.: *Theriogenology*. 18, 107, 1982.
13. Kupferschmid H., Kihm U., Bachmann Ph.: *Zuchthygiene* 20, 112, 1985.
14. Lucas M. H., Dawson M., Chasey D., Wibberley G., Roberts D. H., Saunders R.: *Vet. Rec.* 106, 128, 1980.
15. Lyon M. F., Glenister P. H., Wittingham D. G.: Long-term viability of embryos stored under irradiation. w: *Frozen storage of laboratory animals*, red. G. H. Zeilmaker, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, New York. 1981, s. 139.
16. Mobraaten L. E.: *The Jackson Laboratory Genetics stocks resource repository*. w: *Frozen storage of laboratory animals* red. G. H. Zeilmaker, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. 1981, s. 165.
17. Schultz R. D.: *Immunoextension: A method to eliminate or reduce viral contaminants from semen.* (Złożono do druku w *Theriogenology*, 1986).
18. Schultz R. D., Adams L. S., Letchworth G., Sheffy B. E., Manning T. L., Bean B.: *Theriogenology*. 17, 115, 1982.
19. Singh E. L.: *Manual Int. Embryo Transfer Soc.* 4, 9, 1986.
20. Singh E. L.: *Proc. 10th ICARAI*, 4 (IX), 17, 1984.
21. Singh E. L., Thomas F. C. D., Hare W. C. D., Mitchell D., Eaglesome M. D., Randall G. C. B., Betteridge K. J., Dulac G. C., Samagh B. C., Papp-Vid G.: *Theriogenology*. 17, 108, 1982.
22. Singh E. L., Thomas F. C., Papp-Vid G., Eaglesome M. D., Hare W. C. D.: *Theriogenology*. 18, 133, 1982.
23. Whitmore H. L., Gustafson B. K., Havareshi P., Duchateau A. B., Mather E. C.: *Theriogenology*. 9, 153, 1978.
24. Wierzbowski S.: *FAO Animal Prod. Health Paper* Nr 44/2, 49, 1984.

Adres autora: prof. dr hab. Stefan Wierzbowski, 32-083 Bałce k/Krakowa 1/5

\*\*\*) Główne punkty opracowania E. L. Singh dla Int. Embryo Transfer Society, 1986 (19).

**COLLINS G. H., POPE S. E., GRIFFIN D. L., WALKER J., CONNOR G.:** Rozpoznawanie i częstotliwość występowania *Giardia* spp. u psów i kotów. (Diagnosis and prevalence of *Giardia* spp. in dogs and cats). *Aust. vet. J.* 64, 89—90, 1987 (3)

Rozpoznawanie zakażeń wywołanych przez *Giardia* zarówno u człowieka, jak i u zwierząt opiera się na wykazaniu obecności pasożyta w kale, przy czym rzadko można wykazać obecność trofozoitów w świeżych rozmazach. Badania w kierunku zakażeń *Giardia* przeprowadzono w dwóch laboratoriach, poddając badaniom psy i koty z okolic Sydney. W pierwszej serii eksperymentów przeprowadzonych na 100 psach pobierano pośmiertnie kał z prostnicy i płynną treść ze światła dwunastnicy. Obecność pasożytów wykryto u 21 psów. W drugiej serii badań, w której poddano badaniom parazytologicznym 50 psów i 50 kotów, pasożyta wykryto u 50% psów i u 16% kotów. Godnym uwagi jest fakt, że jedynie u 16 z 25% zarażonych psów i 5 z 8 zarażonych kotów wykazano obecność cyst pasożyta w kale. Ponadto u 20% zarażonych psów, u których zarażenie zdiagnozowano na podstawie występowania cyst *Giardia* w kale, nie wykazano obecności trofozoitów w treści dwunastnicy.

G.

**HOBLET K. H., KOHLER E. M., SAIF L. J., THEIL K. W., INGALLS W. Z.** — Badanie nad biegunką u prosiąt po odsadzeniu na tle zakażenia hemolitycznym szczepem *Escherichia coli* K88(−). (Study of porcine postweaning diarrhoea involving (K88(−) hemolytic *Escherichia coli*). *Am. J. vet. Res.* 47, 1910—1912, 1986 (9)

Określono okres wydalania z kałem oraz przynależność do grupy serologicznej hemolitycznych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od prosiąt z syndromem biegunki po odsadzeniu. Stosując odczyn aglutynacji szkiełkowej stwierdzono wśród badanych szczepów jedynie antygen O157, nie wykazano natomiast obecności antygeny K. Wszystkie szczepy z grupy serologicznej O157 hemolizowały krwinki czerwone. 89% szczepów wytwarzała przy tym enterotoksynę (dodatni wynik testu LILT). Spośród szczepów o właściwościach hemolitycznych 59% reagowało dodatnio w teście LILT, zaś spośród szczepów niehemolitycznych 45% szczepów reagowało dodatnio w tym teście. Prosięta z syndromem biegunki wydalaly *E. coli* hemolityczne z kałem 7 dnia po odsadzeniu.

G.