

TADEUSZ STEFANIAK, JERZY MOLEND\*, JACEK KROLINSKI\*\*, ANNA CHEŁMOŃSKA

## Wstępne badania nad zakażeniem narządu rozrodczego buhajów, wywołanym pałeczką *Haemophilus somnus*

Katedra Fizjopatologii Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław,

\*Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Rodakowskiego 6, 50-966 Wrocław

\*\*Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Januszowicka 48, 50-983 Wrocław

Zakażenie pałeczką *Haemophilus somnus* i wywoływane przez nią schorzenia u cieląt zostały w kraju szczegółowo opisane (3, 4, 23). Ze względu na wielonarządowe powinowactwo tego drobnoustroju, skutki chorobowe przez niego powodowane zwykle się określać mianem zespołu *Haemophilus somnus* (3, 15). Zakażenie narządu rozrodczego buhaja pałeczką *Haemophilus somnus* zostało potwierdzone badaniami bakteriologicznymi w kilku krajach (7, 8, 13, 14, 16, 18, 22, 25). Zarazek izolowano zarówno z nie zmienionych narządów rozrodczych zwierząt rzeźnych (14), jak i z normalnego nasienia i wypłuczyn napletka buhajów (15, 16, 18, 25). Drobnoustrój izolowano także od buhajów—dawców nasienia o osłabionych parametrach nasienia oraz z próbek nasienia z domieszką ropy (7, 8, 13, 16). Stwierdzono (16), że w nasieniu, w którym występowały zmiany patologiczne, *Haemophilus somnus* był izolowany częściej niż z próbek nasienia normalnego.

Występowanie *H. somnus* u znacznej części badanych buhajów budzi niepokój, ze względu na prawdopodobieństwo szerzenia zakażenia drogą płciową w przypadku zwierząt używanych do reprodukcji.

Nasze dotychczasowe badania serologiczne buhajów w różnym wieku (28, 29) wykazały obecność przeciwciał anti-*H. somnus* w plazmie nasienia i wypłuczynach napletka.

Postanowiono więc przeprowadzić jednoczesne serologiczne i bakteriologiczne rozpoznanie występowania *H. somnus* w narządzie rozrodczym buhajów przeznaczonych do rozplodu i zestawień otrzymane wyniki z oceną seminologiczną, aby wyjaśnić pytanie, czy odchylenia w jakości nasienia występują częściej u buhajów, które miały kontakt z *H. somnus*.

### Materiał i metody

Badania bakteriologiczne, serologiczne i seminologiczne przeprowadzono na 52 buhajach przeznaczonych do rozplodu.

Wypłuczyny jamy napletka oraz nasienie pobierano według ogólnie przyjętych zasad, podczas kontroli buhajów aukcyjnych w dwóch wchowałniach A i B.

Badanie bakteriologiczne przeprowadzono na 82 próbkach, w tym z wchowałni A na 53 próbach nasienia oraz 15 próbach wypłuczyn napletka, natomiast z wchowałni B na 14 próbach nasienia. W 3—4 godziny po pobraniu, próbki nasienia i wypłuczyn napletka wysiewano w ilości 0,05 ml na dwa podłoża

agarowe z 10% dodatkiem krwi wołowej, z których jedno inkubowano w atmosferze mikroaerofilnej (10% CO<sub>2</sub>, cieplarka Termostat LP-141, Węgry), drugie natomiast w warunkach normalnych przez 48 godz. w temperaturze 37°C. Kolonie bakterii wyrastające jedynie w warunkach mikroaerofilnych, podobne do kolonii *H. somnus* namnażano i określano ich właściwości fizjologiczne i biochemiczne przy użyciu mikrotestów API 20 E (Francja). Ponadto w odczynie mikroaglutynacji płytowej oceniano zdolność wyrosłych bakterii do aglutynowania w referencyjnej surowicy diagnostycznej anti-*H. somnus* 6023.

Badanie serologiczne objęło 21 próbek plazmy nasienia i 15 próbek wypłuczyn jamy napletka buhajów z wchowałni A oraz 15 próbek plazmy nasienia z wchowałni B.

Obecność przeciwciał anti-*H. somnus* w klasach IgG, IgM i SIgA, oznaczano immunologicznym testem enzymatycznym ELISA, prowadzonym w modyfikacji metody Lamb i wsp. (19).

Bydłące immunoglobuliny G i M izolowano z surowicy, natomiast SIgA ze śliny (9, 11, 20). Antysurowicę uzyskano na kozach. Kozie IgG o swoistości anti-IgG, anti-IgM i anti-SIgA bydłącym oczyszczano przez absorpcję używając surowicy cielęcia noworodka spolimeryzowanej glutałdehydem (2) i IgG bydłęcej związanej z Sepharose 4B (21). Monoswoiste IgG kozie koniugowano z peroksydazą chrzanową (RZ powyżej 3,0) wg metody Farr i Nakane (10). Do kontroli swoistości uzyskanych preparatów immunologicznych wykorzystano techniki immunodyszufji podwójnej (24), immunoelektroforezy (26), bezpośredniego testu ELISA (27).

Jako antygeny fazy stałej użyto sonikat *H. somnus* (6). Probówki polistyrenowe (Sp-nia Rzem. Met. i El. Wrocław) opłaszczano w buforze węglanowym pH 9,5 przez 3 godz. w 37°C, następnie przez noc w 4°C. Plazmę nasienia rozcieńczano w proporcji 1:10 i 1:100, wypłuczyny napletka badano w stanie nierozcieńczonym i w rozcieńczeniu 1:4. Do rozcieńczeń używano PBS-Tween 20 (0,05%). Etap pierwszego i drugiego przeciwciała prowadzono za każdym razem przez 3 godz. w temperaturze pokojowej. Po kolejnych etapach testu, probówki płukano 3×5 min. w PBS-Tween 20 (0,05%). Za substrat służyła o-phenylenediamine (Reachim) w buforze cytrynianowym o pH 5,0 w obecności 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po 30 min. inkubacji w temperaturze 20°C reakcję enzymatyczną blokowano 0,6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Wyniki odczytywano kolorymetrycznie przy długości fali 492 nm (Spekol).

Do badania seminologicznego pobierano po 2—6 ejakulatów pochodzących od 52 zwierząt. Nasienie poddawano ocenie wstępnej i badaniem uzupełniającym. Bezpośrednio po pobraniu przeprowadzano ocenę makroskopową ustalając objętość, barwę, zapach, konsystencję i ziarnistość ejakulatu. Podczas oceny makroskopowej określano falowanie masy nasienia, ustalano odsetek plemników poruszających się prawidłowo oraz zwracano uwagę na ich aglutynację.

Metodą cytometryczną określano koncentrację plemników. Rozmazy nasienia do badania morfologicznego barwiono metodą bydgoską (17) i oglądano pod imersją, określając odsetek plemników z nieprawidłowościami głównymi i podrzędnymi.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań bakteriologicznych zestawiono w tab. 1. Izolacje pałeczki *H. somnus* dokonano zarówno z wypluczyn napletka, jak i próbek nasienia tylko w materiale pochodzącym z wychowalni A. U buhajów, u których wykryto obecność *H. somnus* w narządzie rozrodczym, izolacja dała wynik pozytywny tylko w jednej na kilka badanych próbek.

Wcześniejsze badania bakteriologiczne prowadzone w kierunku *H. somnus* na buhajach, wykazywały od 7,5% do 76% nosicieli (8, 13, 14, 16, 18, 25). Istotnym czynnikiem ograniczającym możliwości izolacji jest często wzrost *Proteus vulgaris*, uniemożliwiający ocenę 25,6% prób w badaniach autorów, a od 24,6% do 33,3% w badaniach innych zespołów (16, 18, 25).

Wyniki testu ELISA wykonanego na próbach plazmy nasienia i wypluczyn napletka pobranych w obu wychowalniach przedstawiono w tab. 2. W wychowalni A wykryto przeciwciała anty-*H. somnus* w 66,7% prób plazmy nasienia, a w wychowalni B w 46,67% prób. Również w próbach wypluczyn napletka w stadzie A

stwierdzono w większości prób obecność przeciwciał. Przeciwciała identyfikowano najczęściej w klasie SIgA (52,94%) oraz IgG i SIgA jednocześnie (11,76%). Nie stwierdzono przeciwciał w klasie IgM, co jest zgodne z danymi piśmiennictwa nt. immunoglobulin w narządzie rozrodczym buhaja (1, 5, 12, 28, 29, 30). Ponieważ obecność swoistych przeciwciał jest następstwem kontaktu narządu rozrodczego z omawianym drobnoustrojem, wyniki te świadczą o wysokiej ekstensywności zakażenia.

U 33 buhajów (18 z wychowalni A i 15 z wychowalni B) zestawiono wyniki oceny parametrów nasienia i poszukiwania przeciwciał anty-*H. somnus* w plazmie nasienia (tab. 3).

Pojawienie się przeciwciał anty-*H. somnus* w plazmie nasienia jest wywołane infekcją wyższych odcinków dróg wyprowadzających nasienie i/lub dodatkowych gruczołów płciowych. Obecność przeciwciał może być oznaką przebytej lub utrzymującej się infekcji. Przeciwciała anty-*H. somnus* w plazmie nasienia najczęściej stwierdzano u buhajów dyskwalifikowanych, z odroczone terminem oceny\*), bądź kwalifikowanych do punktów kopulacyj-

Tab. 1. Wyniki badań bakteriologicznych nasienia i wypluczyn napletka buhajów z wychowalni A i B

Chciet	Liczba zwierząt		Materiał badany	Liczba prób	Liczba prób w których stwierdzono			
	bada-nych	nosicieli <i>H. somnus</i>			<i>H. somnus</i>	C. pyo-genes	<i>P. vul-garis</i>	Flora sapr. ujemna
A	26	5 (19,2%)	nasienie	53	4 (7,5%)	0	15 (28,5%)	34 (64,2%)
			wypl. napletka	15	1 (6,7%)	2 (13,3%)	5 (33,3%)	7 (46,7%)
B	12	0	nasienie	14	0	0	1 (7,1%)	13 (92,9%)
Razem	38	5 (13,1%)		82	5 (6,0%)	2 (2,4%)	21 (25,6%)	54 (66,0%)

Tab. 2. Wyniki poszukiwania testem ELISA przeciwciał anty-*H. somnus* w plazmie nasienia i wypluczynach napletka buhajów z wychowalni A i B

Wychowalnia	Materiał badany	Liczba zwierząt	Liczba prób	Wykryte przeciwciała anty- <i>H. somnus</i>		
				w klasie IgG+SIgA	tylko SIgA	brak
A	plazma nasienia	26	21	—	14 (66,7%)	7 (33,3%)
	wypluczyny napletka	26	15	5 (33,3%)	7 (46,7%)	3 (20%)
B	plazma nasienia	15	15	1 (6,7%)	6 (40%)	8 (53,3%)
Razem		41	51	6 (11,76%)	27 (52,94%)	18 (35,29%)

Tab. 3. Porównanie wyników oceny aukcyjnej z obecnością przeciwciał anty-*H. somnus* w plazmie nasienia buhajów w wychowalni A i B

Ocena aukcyjna	Wychowalnia A		Wychowalnia B	
	Liczba zwierząt badanych	Obecność przeciwciał	Liczba zwierząt badanych	Obecność przeciwciał
Zakwalifikowane do SHI/IZ	6	3	5	3
Zakwalifikowane do punktów kopulacyjnych	4	2	6	1
Zdyskwalifikowane lub odroczone*	8	7	4	3
Razem	18	12	15	7

Objaśnienie: \* — z odroczone terminem oceny.

\* Są to osobniki zdyskwalifikowane w danej aukcji ze względu na słabą jakość nasienia, które jednak rokuja poprawę i będą oceniane w aukcji kolejnej.

nych (tab. 3). Ta tendencja była wyraźniejsza w wychowalni A (miejsce izolacji *H. somnus*), gdzie zarówno ilość zwierząt dyskwalifikowanych lub z odroczonym terminem oceny była wyższa, jak i częściej stwierdzano przeciwciała anty-*H. somnus* w narządzie rozrodczym (tab. 2 i 3). Ponieważ część buhajów z odroczonym terminem oceny zostaje jednak w następnej aukcji zakwalifikowana do punktów kopulacyjnych, to nasuwa się pytanie, czy buhaje kierowane do krycia naturalnego nie są nosicielami pałeczki *H. somnus*?

Pewnych sugestii dostarcza obserwacja wykrytych badaniem bakteriologicznym nosicieli tego drobnoustroju. Na pięć zwierząt, u czterech wykazujących w badaniach seminologicznych odchylenia od normy (dotyczące ruchu plemników i ich koncentracji), bądź osłabienie parametrów nasienia, jednocześnie zidentyfikowano swoiste przeciwciała anty-*H. somnus* w plazmie nasienia. U jednego buhaja z korzystną oceną seminologiczną, mimo izolacji *H. somnus* z nasienia, nie stwierdzono w jego plazmie swoistych przeciwciał. Były one jednak obecne w wypluczynach napletka pobranych od tego buhaja. Można przypuszczać, że ten buhaj był nosicielem zarazka w jamie napletka, a drobnoustroj dostał się do nasienia w trakcie pobierania ejakulatu do sztucznej pochwy.

Być może dalsze badania pozwolą ustalić, czy pewne cechy odpowiedzi immunologicznej (np. sekwencja klas przeciwciał, czy natężenie reakcji) pełniej odzwierciedlają stan zagrożenia narządu rozrodczego infekcją *H. somnus*.

### Wnioski

1. Jednokrotny negatywny wynik badania bakteriologicznego nie może decydować o uznaniu zwierzęcia za wolne od infekcji *H. somnus*.

2. Oznaczenie przeciwciał anty-*H. somnus* w narządzie rozrodczym buhajów może służyć wykrywaniu infekcji.

3. Decyzja, czy w badanych obiektach istnieje dodatnia korelacja między obecnością przeciwciał anty-*H. somnus* w plazmie nasienia a pogorszeniem jakości nasienia, wymaga zbadania większej grupy zwierząt i statystycznej oceny wyników.

### Piśmiennictwo

1. Aert A. van, Keyser P. de, Brone E., Bouters P., Plassche M. van der: Br. vet. J. 132, 615, 1976.
2. Avrameas S., Ternynck T.: Immunochemistry 6, 53, 1969.
3. Balbierz H., Nikolajczuk M.: Medycyna Wet. 36, 595, 1980.
4. Balbierz H., Nikolajczuk M., Nowacki W., Molenda J., Klinik L.: Medycyna Wet. 41, 392, 1985.
5. Bier P. J., Hall C. E., Duncan J. R., Winter A. J.: Vet. Microbiol. 2, 1, 1977.
6. Canto J., Biberstein E. L., Schulte T. A., Behymer D.: J. clin. Microbiol. 17, 500, 1983.
7. Corboz L., Nicolet J.: Schweiz. Arch. Tierheilk. 117, 493, 1975.
8. Corboz L., Wild P.: Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 79, 1981.
9. Duncan J. R., Wilkie B. N., Hiestand F., Winter A. J.: J. Immunol. 108, 965, 1972.
10. Farr A. G., Nakane P. K.: J. Immunol. Meth. 47, 129, 1981.

11. Fey H., Pfister H., Messerli J., Sturzenegger N., Grolimund F.: Zbl. Vet. Med. B 23, 269, 1976.
12. Flower P. J., Ladds P. W., Thomas A. D., Watson D. L.: Vet. Pathol. 20, 189, 1982.
13. Humphrey J. D., Little P. B., Barnum D. A., Doig P. A., Stephens L. R., Thorsen J.: Can. J. comp. Med. 46, 215, 1982.
14. Humphrey J. D., Little P. B., Stephens L. R., Barnum D. A., Doig P. A., Thorsen J.: Am. J. vet. Res. 43, 791, 1982.
15. Humphrey J. D., Stephens L. R.: Vet. Bull. 53, 987, 1983.
16. Janzen E. D., Cates W. F., Barth A., Nechala L., Pawlyshyn V., Saunders J. R., Osborne A. D.: Can. Vet. J. 22, 361, 1981.
17. Jaškowski L.: Medycyna Wet. 5, 908, 1949.
18. Krogh H. V., Pedersen K. B., Blom E.: Vet. Rec. 112, 460, 1983.
19. Lamb V. L., Jones L. M., Schurig G. G., Berman D. T.: Infect. Immun. 26, 240, 1979.
20. Mach J. P., Pahud J. J.: J. Immunol. 106, 552, 1971.
21. March S. C., Parikh I., Cuatrecasas P.: Anal. Biochem. 60, 149, 1974.
22. Miller R. B., Lein D. H., McEntee K. E., Hall C. E., Shin S.: JAVMA 182, 1390, 1983.
23. Molenda J., Kozyrzak J.: Medycyna Wet.: 36, 200, 1980.
24. Ouchterlony O.: Progr. Allerg. 5, 1, 1958.
25. Rauth S., Bisping W., Kirpal G.: Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 99, 405, 1986.
26. Scheidegger J. J.: Intern. Arch. Allergy 7, 103, 1955.
27. Schilow W. F., Meyer V.: Biol. Rdsch. 21, 177, 1983.
28. Stefaniak T., Susajew R., Molenda J., Nowacki W., Króliński J.: 9-th Intern. Symp. WAVMI, Perugia 8-11 Oct. 1986.
29. Stefaniak T., Króliński J.: VIII Kongres PTNW, Warszawa 1987 (w druku).
30. Winter A. J., Clark B. L., Parsonson I. M., Duncan J. R., Bier P. J.: Adv. exp. Med. Biol. 137, 745, 1981.

Adres autora: lek. wet. Tadeusz Stefaniak, ul. Wróblewskiego 25/411, 51-627 Wrocław

Стефаниак Т., Моленда Е., Крулиньский Я., Хелмоньская А. — Вступительное исследование инфекции генеративного органа быков, вызванной палочкой *Haemophilus somnus*

Выполненные бактериологические и серологические исследования относительно *Haemophilus somnus* проб семени и вымывок препуция, взятых на 2 фермах для выращивания молодняка при контроле аукционных быков. Результаты сопоставили с семинологической оценкой.

Показали наличие *H. somnus* в 6% исследуемых проб (что соответствует 13,1% исследуемых животных). Изоляцию провели как из семени, так и вымывок препуция.

Критерием ELISA показали специфические противотела анти-*H. somnus* в 64,7% исследуемых проб. Они отмечались чаще всего в классе SIgA (52,94%), а также IgG и SIgA одновременно (11,76%). Чаще наблюдали их в стаде с более плохими результатами семинологической оценки.

Результаты внушают, что в случае наличия противотел анты-*H. somnus* в плазме семени чаще наблюдаются также отклонения в семинологической оценке.

Stefaniak T., Molenda J., Króliński J., Chelmońska A. — Preliminary studies on the reproductive organ infection of bulls caused by *Haemophilus somnus*

Bacteriological and serological examinations of the semen and rinsings from the prepuce of bulls were carried out. It was found the presence of *H. somnus* in 6 per cent of the samples, i.e. in 13.1 per cent of animals. The bacterium was isolated both from the semen and rinsings. The specific antibodies against *H. somnus* were revealed by the ELISA test in 64.7% of samples. They usually belonged to SIgA (52.94%), and to IgG and SIgA (11.76%) simultaneously. They were observed more often in the herd characterized by worse effects of artificial insemination. The results suggest that in case of the presence of antibodies against *H. somnus* in the semen plasma, more often some changes were found at the semen appraisal.