

Wirusy występujące w nasieniu buhajów

JERZY ROLA, MIROSŁAW P. POLAK

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Rola J., Polak M. P.

Viruses associated with bovine semen

Summary

Artificial insemination is widely used in cattle reproduction all over the world and enables rapid genetic improvement in cattle breeding. The extent and importance of artificial insemination has significantly increased since semen storage in liquid nitrogen was introduced into practice. Semen may be stored for years in this temperature with no negative impact on its quality. However, infectious agents such as viruses also survive for very long time at the temperature of liquid nitrogen. For this reason it is vital to ascertain that breeding bulls are free from viral infections before collecting semen otherwise they could cause a large scale spreading of infectious diseases in cattle populations. The aim of the article is to provide readers with information about the most important cattle viruses which can be transmitted by bull semen.

Keywords: bulls, semen, viruses, infectious diseases

Sztuczna inseminacja jest szeroko stosowana w rozrodzie bydła na całym świecie. W Polsce ma ona już ponad 50-letnią tradycję i jest powszechnie akceptowana przez hodowców. Metoda ta przyczyniła się do istotnego ograniczenia problemu chorób zakaźnych przenoszonych drogą płciową u bydła. Umożliwia także szybkie i łatwe uzyskiwanie postępu hodowlanego nie tylko w hodowli elitarnej, ale także w pogłowie masowym. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu w rozrodzie bydła nowych technologii. Stosując je, w ciągu roku od jednego buhaja można otrzymać nawet kilkadziesiąt tysięcy dawek inseminacyjnych nasienia. Zasięg i znaczenie sztucznej inseminacji istotnie wzrosły od czasu wprowadzenia do praktyki przechowywania nasienia w ciekłym azocie (-196°C). W temperaturze tej nasienie może być przechowywane latami i nie wpływa to negatywnie na jego jakość. Dzięki temu czas i odległość przestały stanowić w rozrodzie bydła barierę hamującą postęp hodowlany. Jednocześnie uzyskano możliwość wykorzystywania nasienia uznanych buhajów zagranicznych o najwyższym potencjale genetycznym i produkcyjnym do krycia bydła rodzimego. Z drugiej strony, w temperaturze ciekłego azotu czynniki zakaźne, np. wirusy, zachowują żywotność przez bardzo długi czas. Dlatego przy pozyskiwaniu nasienia należy mieć pewność, że buhaje zarodowe są wolne od zakażeń wirusowych oraz wad genetycznych, gdyż w przeciwnym wypadku groziłoby to rozprzestrzenieniem się chorób w pogłowie bydła na bardzo dużą skalę.

Celem tej publikacji jest przybliżenie czytelnikom informacji o najważniejszych wirusach bydłych, które mogą być przenoszone z nasieniem buhajów.

Herpeswirus bydła typ 1 (Bovine herpesvirus type 1, BHV1)

Jest to najczęściej izolowany wirus z nasienia buhajów (2, 23). Należy do rodziny *Herpesviridae*, rodzaju *Varicellovirus*. Na podstawie analizy restrykcyjnej wirusowego DNA wyróżniono następujące podtypy wirusa: BHV1.1, BHV1.2a i BHV1.2b (18). Podtyp BHV1.2b jest mniej zjadliwy niż dwa pozostałe. Po zakażeniu układu rozrodczego BHV1 wywołuje pęcherzykowe zapalenie błony śluzowej sromu i pochwy (IPV) u krów oraz napletka i prącia (IPB) u buhajów. Schorzenie to zwane jest także otrętem bydła. BHV1 może powodować również zapalenie macicy i jajników, zaburzenia w tworzeniu ciała żółtego, powtarzanie rui, poronienia (8). U buhajów z otrętem obserwuje się okresowe pogorszenie jakości nasienia objawiające się zmniejszoną ruchliwością plemników oraz zwiększonym odsetkiem plemników o nieprawidłowej budowie morfologicznej. Nie jest dokładnie ustalone, w których częściach układu płciowego buhaja wirus ten namnaża się. Po doświadczalnym zakażeniu buhajów drogą donosową oraz donapletkową, BHV1 był izolowany z nasienia, wyłuczyn z napletka oraz z cewki moczowej. Próby izolacji wirusa z dodatkowych gruczołów płciowych, najądrzy i jąder wypadły negatywnie. BHV1 podobnie jak inne herpeswirusy po-

siada zdolność wywoływania zakażenia latentnego, które utrzymuje się do końca życia zwierzęcia. Dlatego zakażonego buhaja należy uważać za nosiciela wirusa i potencjalnego siewcę przez cały okres ewentualnego użytkowania. Po wnikięciu wirusa drogą płciową zakażenie latentne lokalizuje się w zwoju krzyżowym (1). W okresie latencji, w komórkach nerwowych zwoju wykrywana jest jedynie obecność wirusowego DNA. Nie są natomiast wytwarzane potomne cząstki wirusowe. Pod wpływem czynników stresowych, takich jak: transport, zimno, nadmierne zagęszczenie zwierząt, dochodzi do reaktywacji zakażenia latentnego oraz wznowienia replikacji i siewstwa wirusa. Obraz siewstwa może znacząco różnić się u poszczególnych osobników. U buhajów po zakażeniu pierwotnym obserwowano siewstwo wirusa z nasieniem trwające od kilku dni do kilku tygodni. Nawroty siewstwa u buhajów, które przebyły zakażenie następowały po krótszych lub dłuższych przerwach w wydalaniu wirusa. Snowdon (29) w okresie 361-dniowej obserwacji stwierdził u zakażonego buhaja 6 okresów siewstwa wirusa z nasieniem. Podobne obserwacje przeprowadzili Kohler i Kubin (15) oraz Bitsch (3). Autorzy ci zaobserwowali, że siewstwo wirusa pojawiało się okresowo i nieregularnie w czasie. Malewski (16) w czasie infekcji otrętu u buhajów w jednej ze stacji hodowli i unasienniania zwierząt (SHiUZ) stwierdzał siewstwo BHV1 z nasieniem od 1. do 6. miesiąca po wystąpieniu zachorowań. Stwierdzono również, że w okresach siewstwa po reaktywacji zakażenia latentnego ilość wirusa w nasieniu była zdecydowanie mniejsza niż w fazie ostrej zakażenia. Bitsch (3) wykazał, że w okresie gorączkowym miano wirusa BHV1 w nasieniu wahało się od 10^5 do $10^{8.5}$ TCID₅₀, natomiast w okresach nawrotu siewstwa wynosiło ono od 10^1 do $10^{5.6}$ TCID₅₀. Żmudziński (30) w badaniach wykonanych na buhajach w SHiUZ stwierdził, że średnie miano infekcyjne wirusa BHV1 w nasieniu wynosiło $10^{2.16}$ TCID₅₀. Zaobserwowano również, że miano wirusa w popłuczynach z worka napletkowego zakażonych buhajów było ponad 10 razy wyższe niż w nasieniu i wynosiło $10^{3.27}$ TCID₅₀. Jeszcze wyższe miano zakaźne wirusa BHV1 w popłuczynach stwierdził Salwa (25). Jak podaje autor, miano to wynosiło $10^{5.4}$ TCID₅₀.

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych (Bovine viral diarrhoea – mucosal disease virus, BVD-MDV)

Wirus ten należy do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Pestivirus* (5). Wyróżnia się dwa biotypy wirusa: biotyp cytopatyczny powodujący zmiany degeneracyjne w hodowli komórek *in vitro* i biotyp niecytopatyczny, który namnażając się w hodowli komórek, nie powoduje widocznych zmian. Szczepy obu biotypów mają zdolność zakażenia bydła i wywoływania choroby, jednak tylko szczepy należące do biotypu niecytopatycznego wywołują zakażenie trwałe. Stosując sekwencjo-

nowanie oraz test krzyżowej neutralizacji szczepy BVD-MDV podzielono na dwa genotypy (22, 24). Genotyp 1 obejmuje klasyczne izolaty wirusa, do których należą znane laboratoryjne szczepy referencyjne (NADL, Oregon, Singer). Genotyp 2 obejmuje szczepy odpowiedzialne za zakażenia ostre przebiegające z objawami zespołu krwotocznego, który charakteryzuje się wysokim współczynnikiem śmiertelności. W obrębie obydwu genotypów występują zarówno szczepy cytopatyczne, jak i niecytopatyczne. Oddziaływanie wirusa BVD-MD na układ rozrodczy jest wielorakie. Opiszano przypadki obniżenia wskaźnika zacielen, zaburzenia w przebiegu ciąży (poronienia, mumifikacja płodów, potworkowość) oraz rodzenie się słabych cieląt, podatnych na infekcje wtórne. Zakażenie płodu drogą łożyskową może prowadzić do rodzenia się zwierząt trwale zakażonych wirusem BVD-MD. Zwierzęta takie stanowią główne źródło zakażenia w stadzie, gdyż wydalają wirus we wszystkich wydalinach i wydzielinach przez całe życie. Dotyczy to również buhajów, które wydalają wirus także z nasieniem. Wykazano, że buhaje trwale zakażone wydalają dużo większe ilości wirusa niż buhaje z ostrą postacią choroby, u których stwierdza się jedynie przemijającą wiramię. Miano wirusa w nasieniu buhajów trwale zakażonych może dochodzić do $10^{7.6}$ CCID₅₀/ml (14).

Skuteczność transmisji zakażenia wirusem BVD-MD w przypadku użycia do inseminacji nasienia od takich buhajów wynosi prawie 100%. Różne są natomiast opinie badaczy odnośnie do jakości nasienia pozyskiwanego od buhajów zakażonych BVD-MD. Guerin i wsp. (9) uzyskali wyraźnie niższy współczynnik zapłodnienia i rozwoju blastocyst, gdy do zapłodnienia *in vitro* użyli nasienia pochodzącego od buhaja trwale zakażonego BVD-MD. Z kolei Meyling i Jensen (19) stwierdzili ciążę u każdej z 12 jałówek inseminowanych nasieniem buhaja trwale zakażonego (miano wirusa 10^5 - 10^7 CCID₅₀/ml) i to już po pierwszej inseminacji. U wszystkich inseminowanych jałówek, 2 tygodnie po inseminacji wystąpiła serokonwersja. Również Kirkland (11) stwierdził, że u wszystkich krów inseminowanych nasieniem buhaja trwale zakażonego doszło do serokonwersji. Koncentracja, ruchliwość oraz morfologia plemników w nasieniu od tego buhaja były w normie. Z kolei miano wirusa w nasieniu od buhajów z ostrą postacią choroby wynosi od 5 do 75 CCID₅₀/ml (14). Wirus może być izolowany z nasienia od momentu wystąpienia wirerii do czasu pojawienia się swoistych przeciwciał, później próby izolacji wirusa wypadają negatywnie. Po inseminacji nasieniem pochodzącym od buhaja z ostrą postacią choroby, które pobrano 12 dni po zakażeniu, serokonwersję stwierdzono u 5% inseminowanych jałówek (12).

Wirus białaczki bydła (Bovine leukaemia virus, BLV)

Wirus ten jest czynnikiem etiologicznym enzootycznej białaczki bydła, nowotworowej choroby o prze-

wlekłym przebiegu, którą cechuje rozwój zmian proliferacyjnych układu limforetikularnego prowadzący do przewlekłej limfocytozy (forma leukemiczna) i do zmian guzowatych w węzłach chłonnych i narządach wewnętrznych (forma guzowata). Wirus ten zaliczany jest do rodziny *Retroviridae*, rodzaju *Deltaretrovirus*. W warunkach naturalnych BLV zakaża tylko bydło, natomiast doświadczalnie można zakażać owce i kozy (10, 17). U zakażonych zwierząt, za wyjątkiem krótkiego okresu po zakażeniu, nie obserwuje się wirerii, a wirusowy DNA występuje w postaci prowirusa. Zwierzę raz zakażone staje się nosicielem wirusa przez całe życie. BLV może zakażać różne typy komórek, jednak głównymi komórkami docelowymi są limfocyty B. Przeniesienie wirusa z zakażonego zwierzęcia następuje właśnie za pośrednictwem zakażonych komórek krwi, głównie limfocytów. Materiałem zakaźnym może być krew, mocz, kał i ślina. Nasienie, o ile zawiera zakażone limfocyty, potencjalnie też może być źródłem zakażenia. Jednakże w praktyce z sytuacją taką spotykano się bardzo rzadko. Obecności BLV nie wykryto w nasieniu mimo zbadania 40 000 ejakulatów pobranych od buhajów ze stacji unasienniania, w której 11% buhajów było BLV-pozytywnych (26). Owce, którym doświadczalnie podano nasienie pochodzące od latentnie zakażonego buhaja nie uległy zakażeniu i nie produkowały swoistych przeciwciał (21). Monke (20) wykazał, że zamknięte stado bydła rasy jersey pozostało serologicznie negatywne przez okres 5 lat badań, pomimo stosowania do inseminacji krów nasienia od BLV-pozytywnych buhajów. Dlatego wśród badaczy przeważa pogląd, że transmisja zakażenia BLV poprzez nasienie pochodzące od serologicznie dodatnich buhajów jest mało prawdopodobna.

Wirus pryszczycy (Foot and mouth disease virus, FMDV)

Wirus ten jest czynnikiem etiologicznym pryszczycy, zakaźnej i wysoce zaraźliwej choroby zwierząt parzystokopytnych. Należy on do rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Aphthovirus*. Obecnie znanych jest 7 serotypów wirusa pryszczycy: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 i Asia 1. Na zakażenie wirusem wrażliwe są zarówno zwierzęta hodowlane (bydło, świnie, owce, kozy), jak i wolno żyjące (jelenie, sarny, antylopy, bawoły). U zakażonych zwierząt obserwuje się gorączkę, obfite ślinienie oraz charakterystyczne pęcherzyki i nadżerki występujące na błonie śluzowej jamy gębowej, w szparze międzyracicznej, koronce racic oraz na słabo owłosionych miejscach skóry, np. na napletku. Chore zwierzęta wydalaają do środowiska ogromne ilości wirusa z płynem i nabłonkiem pęcherzy, śliną, moczem, mlekiem, kałem, nasieniem. Większość prac dotycząca występowania wirusa pryszczycy w nasieniu buhajów pochodzi z lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia. Zakażone buhaje wykazują niechęć do krycia. W nasieniu buhajów wirus może być obecny na 4 dni przed wystąpieniem objawów klinicznych,

a siewstwo może utrzymywać się przez okres kilkunastu dni. Miano wirusa w nasieniu może dochodzić do $10^{6.2}$ ID₅₀/ml (27, 28). W okresie utrzymywania się gorączki jakość nasienia ulega pogorszeniu (6). Szczepionki konwencjonalne z reguły chronią buhaje przed kliniczną postacią pryszczycy, jednak nie zapobiegają siewstwu wirusa z nasieniem, zwłaszcza gdy buhaje posiadają niski poziom odporności lub gdy doszło do nadkażenia innym typem wirusa. Po przechorowaniu zwierzęta mogą być bezobjawowymi nosicielami wirusa. Stan nosicielstwa u bydła może trwać nawet 2,5 roku. Zwierzęta te stwarzają szczególne zagrożenie, gdyż jako pozornie zdrowe, nie budzące żadnych podejrzeń klinicznych, są potencjalnym źródłem zakażenia dla zwierząt wrażliwych.

Wirus choroby niebieskiego języka (Bluetongue virus, BTV)

Wirus ten jest czynnikiem etiologicznym choroby niebieskiego języka. Jest to zakaźna, niezaraźliwa choroba przeżuwaczy domowych i wolno żyjących, przenoszona przez muchówki z rodzaju *Culicoides*. BTV należy do rodziny *Reoviridae*, rodzaju *Orbivirus*. Dotychczas zidentyfikowano 24 serotypy wirusa. Na zakażenie najbardziej wrażliwe są owce, u których choroba przebiega wśród objawów wrzodziejącego zapalenia błon śluzowych jamy ustnej i nosa oraz skóry szpary międzyracicznej. U bydła choroba występuje w postaci subklinicznej. Wśród badaczy istnieją pewne kontrowersje co do siewstwa BTV z nasieniem buhajów. Bowen i wsp. (4) izolowali z nasienia szczepy użyte do doświadczalnego zakażenia buhajów. Autorzy ci zasugerowali, że siewstwo wirusa może być związane z wiekiem buhajów. Z kolei Gard i wsp. (7) nie stwierdzili obecności BTV w nasieniu buhajów naturalnie zakażonych, nawet w okresie wirerii. Kirkland i wsp. (13) wyrazili opinię, że siewstwo wirusa z nasieniem zależy najprawdopodobniej od wieku buhaja i szczepu wywołującego zakażenie. Autorzy nie wykazali obecności wirusa w nasieniu pochodzącym od naturalnie zakażonych buhajów oraz od młodych buhajów (2-3 lata) zakażonych doświadczalnie zarówno terenowymi, jak i laboratoryjnymi szczepami. Z kolei większość dorosłych buhajów (6-12 lat) doświadczalnie zakażonych szczepami laboratoryjnymi wydalala wirus z nasieniem. Wirus był wykrywany w nasieniu w trakcie lub bezpośrednio po okresie wirerii.

Przedstawione dane jednoznacznie wskazują, że nasienie buhajów może być źródłem zakażenia dla innych zwierząt. Wiele zakażeń wirusowych przebiega u buhajów w postaci subklinicznej, dlatego trudnione, a niekiedy wręcz niemożliwe jest postawienie właściwego rozpoznania. Z tego względu buhaje, od których pozyskuje się nasienie, muszą pozostawać pod stałą opieką weterynaryjną i spełniać określone wymagania zdrowotne zawarte w przepisach prawnych dotyczących rozrodu bydła.

Piśmiennictwo

1. *Ackermann M., Wyler R.*: The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 1984, 9, 53-63.
2. *Afshar A., Eaglesome M. D.*: Viruses associated with bovine semen. *Vet. Bull.* 1990, 60, 93-109.
3. *Bitsch V.*: Infectious bovine rhinotracheitis virus infection in bulls, with special reference to preputial infection. *Appl. Microbiol.* 1973, 26, 337-343.
4. *Bowen R. A., Howard T. H., Entwistle K. W., Pickett B. W.*: Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected mature bulls. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 44, 2268-2270.
5. *Collett M. S., Anderson D. K., Retzel E.*: Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 1988, 69, 2637-2643.
6. *Cottral G. E., Gailunas P., Cox B. F.*: Foot-and-mouth disease virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1968, 23, 362-377.
7. *Gard G. P., Melville L. F., Shorthose J. E.*: Investigations of bluetongue and other arboviruses in the blood and semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.* 1989, 20, 315-332.
8. *Gibbs E. P. J., Rweyemamu M. M.*: Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.* 1977, 47, 317-343.
9. *Guerin B., Chaffaux S., Marquant Le Guienne B., Allietta M., Thibier M.*: IVF and IV culture of bovine embryos using semen from a bull persistently infected with BVD. *Theriogenology* 1992, 37, 217.
10. *Hoss H., Olson C.*: Infectivity of bovine C-type (Leukemia) virus for sheep and goats. *Am. J. Vet. Res.* 1974, 35, 633-637.
11. *Kirkland P. D., Mackintosh S. G., Moyle A.*: The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet. Rec.* 1994, 135, 527-529.
12. *Kirkland P. D., McGowan M. R., Mackintosh S. G., Moyle A.*: Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet. Rec.* 1997, 140, 124-127.
13. *Kirkland P. D., Melville L. F., Hunt N. T., Williams C. F., Davis R. J.*: Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adapted virus. *Vet. Ital.* 2004, 40, 497-501.
14. *Kirkland P. D., Richards S. G., Rothwell J. T., Stanley D. F.*: Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 1991, 128, 587-590.
15. *Kohler H., Kubin G.*: Zur Virologie, Serologie und Pathomorphologie des männlichen Genitale nach natürlicher und experimenteller Infektion mit dem IBR/IPV Virus. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 1972, 79, 121-144.
16. *Malewski A.*: Badania kliniczne i wirusologiczne nad otrętem buhajów w przebiegu infekcji naturalnej. Praca doktorska, Inst. Wet. Puławy 1978.
17. *Mammerickx M., Portetelle D., Burny A.*: Experimental cross-transmission of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species. *Zbl. Vet. Med. B.* 1981, 28, 69-81.
18. *Metzler A. E., Matile H., Gassmann U., Engels M., Wyler R.*: European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 1985, 85, 57-69.
19. *Meyling A., Jensen A. M.*: Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently infected bull. *Vet. Microbiol.* 1988, 17, 97-105.
20. *Monke D. R.*: Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1986, 188, 823-826.
21. *Olson C., Miller L. D., Miller J. M., Hoss H. E.*: Transmission of lymphosarcoma from cattle to sheep. *J. Nat. Cancer Inst.* 1972, 49, 1463-1467.
22. *Pellerin C., Van Den Hurk J., Lecomte J., Tijssen P.*: Identification of a new group of BVDV strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 1994, 203, 260-268.
23. *Philpott M.*: The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.* 1993, 149, 339-370.
24. *Ridpath J. F., Bolin S. R., Dubovi E. J.*: Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 1994, 205, 66-74.
25. *Salwa A.*: Charakterystyka zakażeń herpeswirusem bydłowym typu 1 (BHV1) w stadach krów mlecznych z uwzględnieniem aspektów epizootologii molekularnej. Praca hab., SGGW Warszawa 1997.
26. *Schultz R. D., Adams L. S., Letchworth G., Sheffy B. E., Manning T., Bean B.*: A method to test large numbers of bovine semen samples for viral contamination and results of a study using this method. *Theriogenology* 1982, 17, 115-123.
27. *Sellers R. F.*: Quantitative aspects of the spread of foot and mouth disease. *Vet. Bull.* 1971, 41, 431-439.
28. *Sellers R. F., Burrows R., Mann J. A., Dawe P. S.*: Recovery of virus from bulls affected with foot-and-mouth disease. *Vet. Rec.* 1968, 83, 303.
29. *Snowdon W. A.*: The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.* 1965, 41, 135-142.
30. *Żmudziński J. F.*: Charakterystyka i podstawy zwalczania zakażeń wirusem otrętu u buhajów. Praca hab., Inst. Wet. Puławy 1987.

Adres autora: doc. dr hab. Jerzy Rola, ul. Kaniowczyków 11/2, 24-100 Puławy; e-mail: jrola@piwet.pulawy.pl