

Rozrzedzalniki w produkcji nasienia na potrzeby inseminacji – aspekty sanitarne i nowe rozwiązania

Jarosław Wieczorek

*Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Inseminacja jest metodą biotechnologii rutynowo stosowaną w hodowli zwierząt. Przykładowo, tylko u bydła co roku wykonuje się w skali światowej około 100 milionów takich zabiegów (Thibier, 2005). Wymaga to produkcji dużej ilości dawek mrożonego nasienia, które muszą spełniać wysokie normy sanitarno-weterynaryjne i podlegać ochronie sanitarnej. Celem ochrony sanitarnej jest zapewnienie bezpieczeństwa epizootycznego, ograniczenie do minimum ryzyka przenoszenia chorób, w tym chorób odzwierzęcych, dbanie o odpowiednią jakość zakonserwowanego i przechowywanego materiału. Ochrona sanitarna materiału genetycznego, w tym także nasienia, odbywa się w bardzo szerokim zakresie i obejmuje następujące etapy: pozyskiwanie, przetwarzanie i obróbkę, konserwację, przechowywanie, wprowadzanie do obrotu, transport oraz wykorzystanie (Le Tallec i in., 2001). W pierwszej kolejności zwraca się uwagę na stan zdrowotny dawców, który bezpośrednio przekłada się na stan sanitarny pozyskiwanego materiału. Następnie bierze się pod uwagę zabezpieczenie sanitarne pomieszczeń, sprzętu i personelu, a także wprowadzanie i egzekwowanie systemów kontroli. Przedmiotem zainteresowania są także laboratoria, w których prowadzi się ocenę materiału genetycznego, rozrzedzanie, konfekcjonowanie i zamrażanie. Pod względem sanitarnym rozpatruje się stan higieniczny pomieszczeń, odpowiednią jakość sprzętu, programy sterylizacji i odkażania oraz kwalifikacje personelu.

W ujęciu sanitarnym istotna jest także odpowiednia jakość stosowanych rozrzedzalników i innych preparatów lub odczynników.

Zgodnie z obowiązującymi standardami sanitarno-weterynaryjnymi, określonymi w przepisach, dodatki stosowane w rozrzedzalnikach nie mogą stanowić zagrożenia dla zdrowia zwierząt (Rozporządzenie Ministra Rolnictwa, 2004 a, b, 2006). Zagrożenie takie wydaje się realne, bowiem rozrzedzalniki mogą być źródłem patogenów i są zarazem doskonałą pożywką dla czynników chorobotwórczych. Ma to istotne znaczenie w sytuacji, gdy większość dostępnych na rynku rozrzedzalników jest produkowana w oparciu o substytuty pochodzenia zwierzęcego, głównie mleko i żółtko jaj, a także w mniejszym stopniu krew, surowicę i osocze.

Czynniki patogenne przenoszone są z półproduktami zwierzęcymi w sposób bezpośredni od zwierząt zakażonych, będących w okresie inkubacji choroby, zwierząt chorych z objawami klinicznymi lub nosicieli. Według Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) czynniki specyficzne dostają się do pobieranego materiału, stanowiącego po odpowiedniej obróbce dodatek do nasienia, w wyniku wirerii, bakteriemii lub w momencie wystąpienia infekcji miejscowych (Thibier i Guerin, 2000). Najgroźniejszy wydaje się okres inkubacji (wylęgania) choroby, od momentu wnikięcia patogenów do wystąpienia objawów klinicznych (Alexandersen i in., 2003; Bauer, 1997; Jackson, 2003). W zależności od choroby może on trwać od kilku do nawet kilkudziesięciu godzin, a w sporadycznych przypadkach do kilkuset dni (Jackson, 2003; OIE Listed diseases, 2007). Szczególne zagrożenie niosą zakażenia pierwotne przy długich okresach inkubacji. W takich sytuacjach istnieje ryzyko długotrwałego siew-

stwa bez widocznych oznak choroby. Możliwości zdiagnozowania dają wówczas badania laboratoryjne: wykrycie czynników patogennych lub badanie swoistych przeciwciał. Należy jednak pamiętać, że przeciwciała pojawiają się dopiero po upływie średnio kilku lub kilkunastu dni od momentu infekcji, a także po szczepieniach ochronnych. Mniejsze zagrożenie niesie okres kliniczny choroby lub nosicielstwa. W tych sytuacjach istnieje bowiem możliwość szybkiej eliminacji zwierząt po badaniu klinicznym i wykonaniu swoistych badań laboratoryjnych. Należy pamiętać, że wynikiem infekcji jest często proces nawrotowy, z okresową wysoką koncentracją patogenów, następnie niską koncentracją lub brakiem czynników chorobotwórczych (Alexandersen i in., 2003; Bauer, 1997; Jackson, 2003; Kitching i Taylor, 1985; Mammerickx i in., 1987; Muskens i in., 2001; Tyler, 1978). W ujęciu sanitarno-epizootologicznym źródłem czynników patogennych mogą być półprodukty pochodzenia zwierzęcego stosowane w produkcji rozrzedzalników, takie jak: krew, surowica,

osocze i mleko. Żółtko jaja w mniejszym stopniu może być źródłem zakażenia patogenami swoistymi ze względu na wysoką barierę międzygatunkową. W przypadku żółtka jaja istnieje jednak bardzo wysokie ryzyko przenoszenia chorób bakteryjnych, głównie salmonellozy i *E. coli*.

W tabeli 1 przedstawiono 13 głównych chorób umieszczonych przez OIE na Liście A, na które chorują ssaki. Wszystkie są chorobami wirusowymi, z wyjątkiem pleuropneumonii bydła, która jest powodowana przez *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC*. Udowodniono, że spośród tych 13 najgroźniejszych chorób w 9 źródłem zakażenia mogą być krew, mleko i nasienie (OIE Listed diseases, 2007). Według niektórych autorów, w związku z wirusową etiologią chorób z listy A należy spodziewać się ich w materiale genetycznym, w trakcie fazy wirerii, we wszystkich przypadkach z wyjątkiem zakaźnego pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej i gorączki doliny Rift (Hare, 1985; Philpott, 1993; Thibier i Guerin, 2000).

Tabela 1. Wykaz chorób umieszczonych na liście A OIE z uwzględnieniem etiologii, drogi przenoszenia, źródła zakażenia i liczby gatunków podatnych na chorobę (OIE Listed diseases, 2007)
 Table 1. Diseases notifiable to the OIE (List A) with regard to aetiology, transmission routes, sources of infection and number of susceptible species (OIE Listed diseases, 2007)

Choroba – Disease	Etiologia – Aetiology	Źródło zakażenia – Sources of virus
Pryszczyca <i>Foot and mouth disease</i>	wirus, rodzina <i>Picornaviridae</i> , rodzaj <i>Aphthovirus</i> <i>virus, family Picornaviridae,</i> <i>genus Aphthovirus</i>	wydychane powietrze, ślina, kał, mocz, krew, mleko, nasienie (na 4 dni przed wystąpieniem zmian klinicznych) <i>breath, saliva, faeces, urine, blood, milk, semen</i> <i>(up to 4 days before clinical signs)</i>
Zakaźne pęcherzykowe zapalenie jamy ustnej <i>Vesicular stomatitis</i>	wirus, rodzina <i>Rhabdoviridae</i> , rodzaj <i>Vesiculovirus</i> <i>virus, family Rhabdoviridae,</i> <i>genus Vesiculovirus</i>	ślina, płyn i nabłonek z otwartych pęcherzy, ziemia i rośliny <i>saliva, exudate or epithelium of open vesicles, soil and plants</i>
Choroba pęcherzykowa świń <i>Swine vesicular disease</i>	wirus, rodzina <i>Picornaviridae</i> , rodzaj <i>Enterovirus</i> <i>virus, family Picornaviridae,</i> <i>genus Enterovirus</i>	przewód pokarmowy, w początkowym okresie, wszystkie tkanki w okresie wirerii, w tym krew, mleko, nasienie <i>digestive tract initially, all tissues during the viraemic period, including blood, milk and semen</i>
Pomór bydła (księgosusz) <i>Rinderpest</i>	wirus, rodzina <i>Paramyxoviridae</i> , rodzaj <i>Morbillivirus</i> <i>virus, family Paramyxoviridae,</i> <i>genus Morbillivirus</i>	łzy, wydzielina z nosa, ślina, mocz, kał 1–2 dni przed objawami klinicznymi, wszystkie tkanki po wystąpieniu objawów, w tym krew, nasienie, mleko <i>tears, nasal secretions, saliva, urine, faeces 1 to 2</i>

Rozrzedzalniki w produkcji nasienia na potrzeby inseminacji

		<i>days before clinical signs, all tissues after the appearance of clinical signs, including blood, semen and milk</i>
Pomór małych przeżuwaczy <i>Peste des petits ruminants</i>	wirus, rodzina <i>Paramyxoviridae</i> , rodzaj <i>Morbillivirus</i> <i>virus, family Paramyxoviridae, genus Morbillivirus</i>	łzy, wydzielina z nosa, ślina, mocza, kał, mleko, krew, nasienie <i>tears, nasal discharge, saliva, urine, faeces, milk, blood and semen</i>
Zaraza płucna bydła <i>Contagious bovine pleuropneumonia</i>	<i>Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC</i> (biotyp bydłęcy – <i>bovine biotype</i>)	płuca, limfa, mózg, wątroba, nerki, węzły chłonne, macica, płody <i>lungs, lymph, brain, liver, kidneys, lymph nodes, uterus, fetus</i>
Choroba guzowatej skóry bydła <i>Dematitis nodularis bovum</i>	wirus, rodzina <i>Poxviridae</i> , rodzaj <i>Capripoxvirus</i> <i>virus, family Poxviridae, genus Capripoxvirus</i>	skóra (wirus przeżywa do 40 dni w ubytkach i strupach), ślina, wydzielina z nosa, mleko, nasienie , mięśnie, śledziona, węzły chłonne <i>skin (virus may survive 40 days in lesions and crusts, saliva, nasal discharge, milk, semen, muscles, spleen, lymph nodes</i>
Gorączka doliny Rift <i>Rift Valley fever</i>	wirus, rodzina <i>Bunyaviridae</i> , rodzaj <i>Phlebovirus</i> <i>virus, family Bunyaviridae, genus Phlebovirus</i>	komary – <i>mosquitoes</i>
Choroba niebieskiego języka <i>Bluetongue</i>	wirus, rodzina <i>Reoviridae</i> , rodzaj <i>Orbivirus</i> <i>virus, family Reoviridae, genus Orbivirus</i>	komary, krew, nasienie <i>mosquitoes, blood, semen</i>
Ospa owiec i ospa kóz <i>Sheep pox and goat pox</i>	wirus, rodzina <i>Poxviridae</i> , rodzaj <i>Capripoxvirus</i> <i>virus, family Poxviridae, genus Capripoxvirus</i>	skóra, ślina, wydzielina z nosa, kał <i>skin, saliva, nasal secretions, faeces</i>
Afrykański pomór koni <i>African horse sickness</i>	<i>viscerotropic virus</i> , rodzina <i>Reoviridae</i> , rodzaj <i>Orbivirus</i> <i>viscerotropic virus, family Reoviridae, genus Orbivirus</i>	wszystkie tkanki, w tym krew, nasienie, mleko <i>all tissues including blood, semen and milk</i>
Afrykański pomór świń <i>African swine fever</i>	wirus nieklasyfikowany (prawdopodobnie <i>Iridovirus</i> i <i>Poxvirus</i>) <i>virus not classified (has characteristics of an Iridovirus and a Poxvirus)</i>	wszystkie tkanki, w tym krew, nasienie, mleko , wydzieliny chorych i padłych zwierząt, obrzeżek ptasi <i>all tissues including blood, semen and milk, secretions and excretions of sick and dead animals, Argas reflexus</i>
Klasyczny pomór świń <i>Classical swine fever</i>	wirus, rodzina <i>Flaviviridae</i> , rodzaj <i>Pestivirus</i> <i>virus, family Flaviviridae, genus Pestivirus</i>	wszystkie tkanki, w tym krew, nasienie, mleko , wydzieliny chorych i padłych zwierząt (ozdrowienie do miesiąca) <i>all tissues, including blood, semen and milk, secretions and excretions of sick and dead animals (convalescents up to one month)</i>

Na liście B OIE umieszczono około 80 chorób zakaźnych, wywoływanych przez wirusy, bakterie, mykoplazmy i pierwotniaki. Najgroźniejsze z nich są objęte rządowymi programami zwalczania chorób zakaźnych (m.in. wścieklizna, wąglik, gruźlica bydła, bruceloza bydła, owiec i kóz, enzootyczna białaczka bydła i trzęsawka owiec. We wszystkich tych chorobach, z wyjątkiem wąglika i trzęsawki owiec, stwierdzono możliwość przenoszenia czynników infekcyjnych

z krwią, mlekiem i nasieniem, a w przypadku wąglika z krwią.

Z drugiej strony, dodatki pochodzenia zwierzęcego stanowią także doskonałe pożywki dla bakterii, pierwotniaków i grzybów, stanowiących w większości tzw. niespecyficzne czynniki infekcyjne. Do niespecyficznych czynników patologicznych zalicza się gatunki bakterii saprofitycznych i oportunistycznych, z których szereg ma charakter warunkowo chorobotwórczy (tab. 2).

Tabela 2. Gatunki bakterii najczęściej występujące w nasieniu zwierząt gospodarskich
 Table 2. Most common species of bacteria found in the semen of farm animals

Gatunek – Species		
konie - horses (42)	bydło – cattle (20)	świnie – pigs (4)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
<i>Streptococci spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Salmonella maltophilia</i>
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Micrococcus spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
	<i>Staph. epidermidis</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
	<i>B. subtilis</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
		<i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>Corynebacterium spp.</i>
		<i>Pasteurella multocida</i>
		<i>Proteus mirabilis</i>
		<i>Streptococcus suis</i>



fot. B. Borys

W trakcie zmiany warunków środowiska niektóre z bakterii wymienionych w tabeli 2 mogą stać się patogenami zjadliwymi. Źródłem zanieczyszczeń są najczęściej wydaliny zwierząt, wydzielina jamy napletka, skóra, włosy, a także wydzielina układu oddechowego (Varner, 1998).

Do zanieczyszczeń florą saprofityczną może dochodzić także wtórnie, w trakcie pobierania, obróbki i przechowywania materiału, a ich

źródłem mogą być wówczas: personel, woda i substancje (szczególnie pochodzenia organicznego) dodawane do rozcieńczalników, płynów konserwujących oraz mediów.

Dodatkowo, źródłem zanieczyszczeń mogą być: sprzęt i wyposażenie wykorzystywane w kontakcie z materiałem genetycznym, a także systemy wentylacji (Althouse i in., 2000) oraz ciekły azot (Mazurova i Krpatova, 1990; Bielański i in., 2003).

Tabela 3. Sposoby monitorowania zanieczyszczeń biologicznych nasienia według Bielańskiego (2007)
Table 3. Methods for monitoring biological contamination of semen according to Bielański (2007)

Sposoby monitorowania zanieczyszczeń biologicznych nasienia <i>Methods for monitoring biological contamination of semen</i>	
Płukanie <i>Flushing</i>	<ul style="list-style-type: none"> – wirowanie – <i>centrifugation</i> – flotacja – <i>flotation</i> – powolne wirowanie – <i>slow centrifugation</i> – gradient prekołu – <i>percoll gradient</i> – gradient albumin – <i>albumin gradient</i> – szklane kulki – <i>glass balls</i> – filtracja przez wełnę szklaną – <i>filtration through glass wool</i> <p>(dostępne metody przygotowujące nasienie do IVF – <i>methods available for semen preparation for IVF</i>)</p>
Antybiotyki <i>Antibiotics</i>	<ul style="list-style-type: none"> – penicylina – <i>penicillin</i> – amoksycylina – <i>amoxycilin</i> – streptomycyna – <i>streptomycin</i> – gentamycyna – <i>gentamycin</i> – amikacyna – <i>amicacin</i> – linkomycyna – <i>linkomycin</i> – spektynomycyna – <i>spectinomycin</i> – tylozyna – <i>tylosine</i> – inne – <i>others</i> <p>lub ich mieszaniny o szerokim spectrum – <i>or broad-spectrum mixtures of these</i></p>
Zakwaszenie środowiska <i>Acidity (pH)</i>	<ul style="list-style-type: none"> – 1N HCl 1:1 z nasieniem, pH 5,0, przez 2–5 min – <i>1N HCl 1:1 with semen, pH 5.0, for 2–5 min</i>
Trypsyna i inne enzymy <i>Trypsin and other enzymes</i>	<ul style="list-style-type: none"> – Trypsyna – <i>Trypsin</i> (0,3% – 5–0 min) – amylaza – <i>amylase</i> – beta-glukuronidaza – <i>beta-glucuronidase</i> – katalaza – <i>catalase</i>
Związki światłoczułe i barwniki – <i>Sensitizers and dyes</i>	<ul style="list-style-type: none"> – hematoporfiryna – <i>hematoporphyrin</i> (HP) – pochodne hematoporfiryny – <i>hematoporphyrin derivatives</i> (HPD) – thiopyronina – <i>thiopyronine</i> (TP)
Immunorozrzedzalniki <i>Immunoextenders</i>	<ul style="list-style-type: none"> – swoiste immunoglobuliny IgG – <i>IgG specific immunoglobulins</i>
Ozon – <i>Ozone</i>	<ul style="list-style-type: none"> – ozon – <i>ozone</i> (O₃)

Dostępными metodami pozwalającymi na eliminację wtórnych zanieczyszczeń biologicznych z nasienia i rozrzedzalników są: płukanie, dodatki antybiotykowe, zakwaszenie środowiska (pH), trypsyna lub inne enzymy, czynniki światłoczułe, barwniki, preparaty immunologiczne i ozon (tab. 3) (Bielański, 2007). W praktyce powszechnie stosowane są dodatki antybiotyków i ich mieszaniny, w mniejszym stopniu pozostałe sposoby.

Standardowe procedury sanitarne stosowane w trakcie przygotowania nasienia do potrzeb inseminacji obejmują działania mające prowadzić do eliminacji czynników patogennych przy zachowanej żywotności plemników. W tym celu powszechnie stosowane są dodatki antybiotyków, a o ich wyborze jako stabilizatorów flory bakteryjnej decyduje w znacznej mierze własne doświadczenie. Badania laboratoryjne obejmujące identyfikację drobnoustrojów i testy lekooporności mogą być jedynie pomocne w doborze chemioterapeutyków. W warunkach terenowych zasada postępowania celowanego i stosowania określonych leków przeciwko patogenom ustępuje miejsca chemioterapii skojarzonej, o jak najszerszym spektrum działania. Wskazania do stosowania dwóch lub więcej preparatów obejmują: leczenie przypadków trudnych do rozpoznania, zapobieganie rozwojowi oporności na dany antybiotyk, uzyskanie synergicznego działania leków i leczenie zakażeń mieszanych (Roliński, 1990). Wszystkie te warunki są spełnione w praktyce terenowej. Rutynowo stosuje się mieszaninę streptomycyny z penicyliną oraz linkomycyny ze spektynomycyną.

Możliwe jest także stosowanie innych antybiotyków lub ich połączeń, jeśli działają one zarazem przeciw mętwikowi, leptospirom i mykoplazmom. Najczęściej stosowane są: amikacyna, gentamycyna, neomycyna, polimyksyna czy tylozyna lub ich mieszaniny (Chohan i Hunter, 2004; Eaglesome i Garcia, 1995; Gliedt i in., 1996; Kim, 2000; Kohler-Samouilidis, 1884).

Ze względu na możliwość bezpośredniego przenoszenia chorób zakaźnych z produktami pochodzenia zwierzęcego poszukuje się ich zamienników. Substancje pochodzenia roślinnego lub syntetycznego są obecnie dodatkiem do szeregu rozrzedzalników nasienia

produkowanych komercyjnie. W przypadku półproduktów pochodzenia roślinnego istnieje jednak możliwość wtórnego przenoszenia czynników patogennych. Możliwość taką wykazano zaledwie w dwóch chorobach z listy A OIE, tj. pryszczycy (Dus Santos i Wigdorovitz, 2005; OIE Listed diseases, 2007; Sanson, 1994) i pęcherzykowym zapaleniu jamy ustnej (Hansen i in., 1985; OIE Listed diseases, 2007; Vesicular Stomatitis, 2007). Opisano możliwość wtórnego przenoszenia także innych chorób, m.in. kolibakteriozy, salmonellozy (Erickson i Doyle, 2007; Fett i Cooke, 2003; Nabbut i in., 1982; Rangel i in., 2005) i zakażeń *Clostridium spp.* (Greenham i in., 1987). Należy podkreślić, że zanieczyszczenia bakteryjne nie powinny stanowić problemu, bowiem w procesie technologicznym przygotowania dodatków dąży się do eliminacji obcych czynników biologicznych. Problem mogą stanowić wspomniane wirusy ze względu na znaczną oporność na czynniki środowiska i środki odkażające (Wachnik, 1983). Istnieje jedynie hipotetyczna możliwość przenoszenia pryszczycy i pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej pod warunkiem, że stosowane półprodukty roślinne pochodzą z tak zwanych miejsc zapowietrzonych, czyli objętych chorobą. Należy jednak pamiętać, że proponowane zamienniki, m.in. białko soi, mleko kokosowe, cukry złożone i inne, w podobnym stopniu jak substancje pochodzenia zwierzęcego będą doskonałą pożywką dla bakterii i innych drobnoustrojów (Aires i in., 2003). W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem dodatków pochodzenia niezwierzęcego nie wykazano, by ich zastosowanie prowadziło do obniżenia ryzyka wtórnych zanieczyszczeń bakteryjnych i zahamowania rozwoju drobnoustrojów (Ahmad i Foote, 1986; Bousseau i in., 1998; Thun i in., 2002; Vishwanath i Shannon, 2000; Wagtendonk-de Leeuw i in., 2000). Jedynym korzystnym aspektem sanitarnym ich stosowania jest eliminacja drobnoustrojów występujących we krwi, mleku i żółtku jaja (Aires i in., 2003; Bousseau i in., 1998; Thun i in., 2002).

W aspekcie sanitarno-weterynaryjnym zastąpienie produktów pochodzenia zwierzęcego substytutami roślinnymi lub syntetycznymi może wpłynąć na podniesienie poziomu

bezpieczeństwa epizootycznego przez ograniczenie możliwości bezpośredniego przenoszenia czynników patologicznych, głównie cho-

rób wirusowych. W mniejszym stopniu przyczyni się do ograniczenia wtórnych zanieczyszczeń biologicznych.

Literatura

Ahmad K., Foote R.H. (1986). Post thaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent. *J. Dairy Sci.*, 69: 535–541.

Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E. (2003). *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60 (2): 269–279.

Alexandersen S., Quan M., Murphy C., Knight J., Zhang Z. (2003). Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Pathol.*, 129 (4): 268–282.

Althouse G.C., Kuster C.E., Clark S.G., Weisiger R.M. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 15; 53 (5): 1167–1176.

Bauer K. (1997). Foot-and-mouth disease as zoonosis. *Arch. Virol. Suppl.*, 13: 95–97.

Bieleński A. (2007). Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, 68: 1–22.

Bieleński A., Bergeron H., Lau P.C., Devenish J. (2003). Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 46 (2): 146–152.

Bousseau S., Brillard J.P., Marquant-Le Guienne B., Guerin B., Camus A., Lechat M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50: 699–706.

Braun U. (2006). Botulism in cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 148 (7): 331–339.

Chohan K.R., Hunter A.G. (2004). *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology*, 61 (2–3): 373–380.

Dus Santos M.J., Wigdorovitz A. (2005). Expression of foot and mouth disease virus antigens in transgenic

plants. *Rev. Sci. Tech.*, 24 (1): 175–187.

Eaglesome M.D., Garcia M.M. (1995). Comparisons of antibiotic combinations to control *Pseudomonas aeruginosa* in bovine semen. *Can. J. Vet. Res.*, 59 (1): 73–75.

Erickson M.C., Doyle M.P. (2007). Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 70 (10): 2426–2449.

Fett W.F., Cooke P.H. (2003). Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and Salmonella on laboratory-inoculated alfalfa seed with commercial citrus-related products. *J. Food Prot.*, 66 (7): 1158–1165.

Gliedt D.W., Rosenkrans C.F. Jr., Rorie R.W., Munyon A.L., Pierson J.N., Miller G.F., Rakes J.M. (1996). Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 79 (4): 536–542.

Greenham L.W., Harber C., Lewis E., Scullion F.T. (1987). *Clostridium perfringens* in pelleted feed. *Vet. Rec.*, 120 (23): p. 557.

Hansen D.E., Thurmond M.C., Thorburn M. (1985). Factors associated with the spread of clinical vesicular stomatitis in California dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 46 (4): 789–795.

Hare W.C.D. (1985). Diseases transmissible by semen and embryo techniques. Office International des Epizooties, Paris, Technical series, 4.

Jackson A.C. (2003). Rabies virus infection: an update. *J. Neurovirol.*, 9 (2): 253–258.

Kendrick J.W., Harlan G.P., Bushnell R.B., Kronlund N. (1975). Microbiologic contamination of bovine semen. *Theriogenology*, 4 (4): 125–129.

Kim S. (2000). Failure of antibiotics gentamicin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Theriogenology*, 54 (1): 173–175; author reply: 177–179.

Kitching R.P., Taylor W.P. (1985). Transmission of capripoxvirus. *Res. Vet. Sci.*, 39 (2): 196–199.

- Kohler-Samouilidis G. (1984). Antibiotic sensitivity of bacterial flora of ram semen. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 91 (3): 106, p. 111.
- Le Tallec B., Ponsart C., Marquant-Le Guienne B., Guerin B. (2001). Risks of transmissible diseases in relation to embryo transfer. *Reprod. Nutr. Dev.*, 41 (5): 439–450.
- Mammerickx M., Portetelle D., Clercq K. de, Burny A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk. Res.*, 11 (4): 353–358.
- Mazurova J., Krpatova J. (1990). The risks of the cryopreservation of bull semen. *Veterinarstvi*, 40: 402–404.
- Muskens J., Bakker D., Boer J. de, Keulen L van (2001). Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. *Vet. Microbiol.*, 78 (2): 101–109.
- Nabbut N.H., Barbour E.K., Al-Nakhli H.M. (1982). Salmonella species and serotypes isolated from farm animals, animal feed, sewage, and sludge in Saudi Arabia. *Bull World Health Organ*, 60 (5): 803–807.
- OIE Listed diseases. Dokument dostępny na: http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification.htm
- Philpott M. (1993). The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.*, 149: 339–369.
- Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Griffin P.M., Swerdlow D.L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Infect. Dis.*, 11 (4): 603–609.
- Roliński Z. (1990). *Zarys farmakoterapii weterynaryjnej*. PWRIL, Warszawa, s. 65.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 kwietnia 2004 r. w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych mających zastosowanie do nasienia świń (2004 a) Dz.U. nr 100, poz. 1017 z 1 maja 2004 r.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 kwietnia 2004 r. w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych mających zastosowanie do nasienia, komórek jajowych i zarodków owiec, kóz i koni (2004 b). Dz.U. nr 100, poz. 1016 z 1 maja 2004 r.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 17 stycznia 2006 r. w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych mających zastosowanie do nasienia bydła (2006). Dz.U. nr 21, poz. 159 z 9 lutego 2006 r.
- Sanson R.L. (1994). The epidemiology of foot-and-mouth disease: implications for New Zealand. *N.Z. Vet. J.*, 42 (2): 41–53.
- Thibier M. (2005). The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45 (3): 235–242.
- Thibier M., Guerin B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 233–251.
- Thun R., Hurtado M., Janett F. (2002). Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57 (3): 1087–1094.
- Tyler L. (1978). Enzootic bovine leucosis. *Vet. Rec.*, 103 (10): 194–198.
- Varner D.D., Scanlan C.M., Thompson J.A., Brumbaugh G.W., Blanchard T.L., Carlton C.M., Johnson L. (1998). Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, 50 (4): 559–573.
- Vesicular Stomatitis. The Center for food security and public health (2007). 1-4. Dokument dostępny na http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/vesicular_stomatitis.pdf
- Vishwanath R., Shannon P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, 62 (issues 1–3): 23–53.
- Wachnik Z. (1983). *Zarys Chorób Zakaźnych Zwierząt*. PWN, Warszawa.
- Wagtendonk-de Leeuw A.M., Haring R.M., Kaal-Lansbergen L.M., Daas J.H. den (2000). Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*, 54 (1): 57–67.

EXTENDERS IN PRODUCTION OF SEMEN FOR ARTIFICIAL INSEMINATION – SANITARY ASPECTS AND NEW SOLUTIONS

Summary

The experimental biotechnological techniques, introduced 40 years ago in animal reproduction, are now routine and common procedures used in breeding. Artificial insemination occupies the most important place, requiring the production of huge amounts of frozen semen doses that meet strict sanitary and veterinary standards. The quality of extenders and other preparations or reagents used for semen treatment, extension and cryopreservation is also important. In accordance with current sanitary and veterinary standards, the additives used in extenders must be safe for animal health. In fact, they can be a direct source of pathogens as well as providing an excellent medium for bacteria. In the former case, pathogens are transferred directly with the material collected from infected animals, from animals in the incubation phase of a disease, from sick animals with clinical symptoms or from the carriers. Animal additives also provide an excellent medium for bacteria, protozoa and fungi, which are mostly non-specific infectious agents. The fact that infectious diseases can be spread through media containing animal-origin additives seems the main reason for a search for replacements that are safer from the sanitary standpoint. In sanitary and veterinary terms, the replacement of animal materials with plant or synthetic substitutes can help to increase epizootic safety by limiting the possibility of pathological agents, mainly viral diseases, being transferred directly. To a lesser degree, this will contribute to limiting secondary biological contamination.



fot. B. Borys