

# PROBLÉM fertility býkov vplyvom baktérií z triedy Mollicutes...

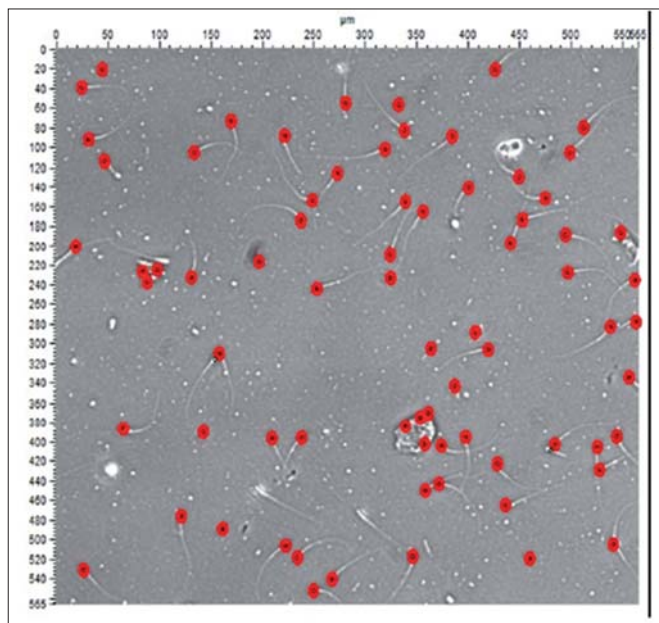
Jaroslav Pokorádí<sup>1</sup> – Soňa Peková<sup>2</sup> – Aleš Jurovič<sup>3</sup> –  
Zuzana Krchníková<sup>1</sup> – Miroslav Pek<sup>2</sup>

1 – ANIMAL REPRODUCTION CENTRE, Budmerice 753,  
900 86 Budmerice, Slovensko

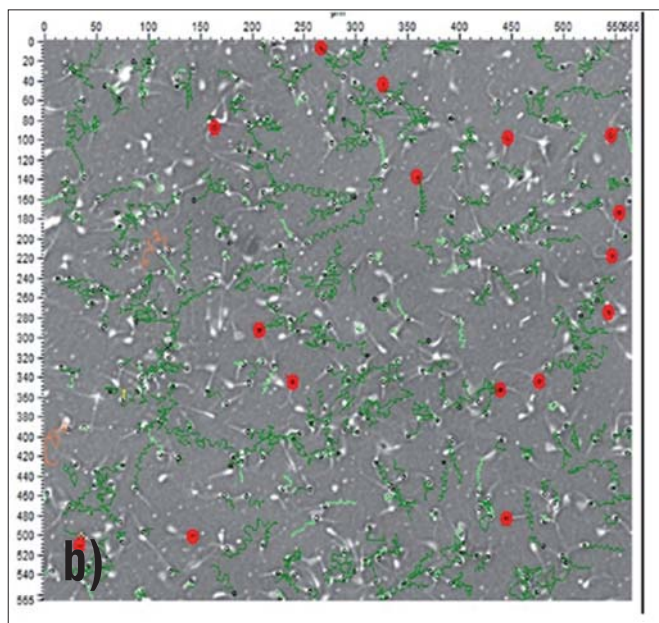
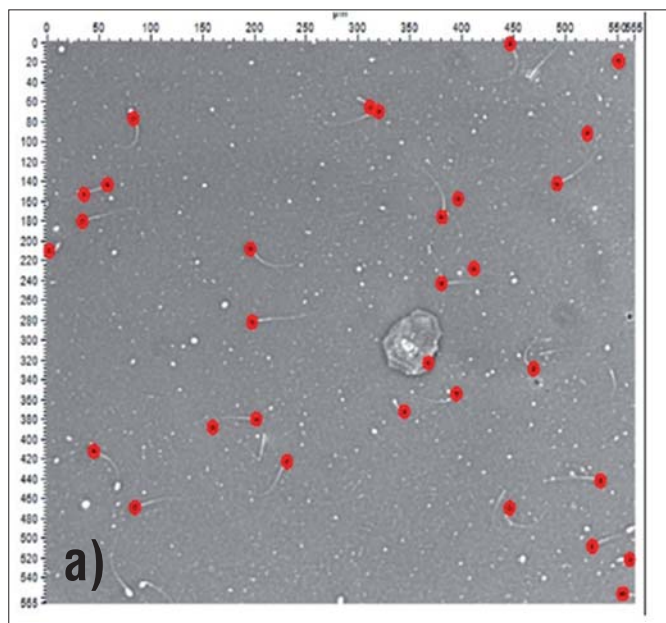
2 – TILIA LABORATORIES, s. r. o., 5. května 44, 273 08  
Pchery, Česká Republika

3 – Veterinární služby Bruntál, s. r. o., Nám. 1. máje  
1420/2, 792 01 Bruntál, Česká Republika

Hlavným cieľom tejto práce bolo odhaliť majoritné príčiny neplodnosti býkov, zhoršenej spermatogenézy a následne diagnostikovať aj problémy indikované u kráv, ako je embryonálna mortalita, neplodnosť kráv, popôrodné sepsy teliat a iné reprodukčné problémy súvisiace s urogenitálnym traktom. Vplyv zníženej fertility býkov na plodnosť kráv je všeobecne známy, ale potvrdiť priamu príčinu zníženia plodnosti kráv, ako dôvod infekčných a infertilných býkov je zámer tejto práce. Ekonomika chovu je priamo úmerná od indexu plodnosti stáda a tá sa môže radikálne ovplyvniť, pokiaľ nájdete príčinu nízkej plodnosti stáda. V tejto práci tiež bol stanovený cieľ deklarovať fakt, že inseminačné dávky vyrábané pod smernicou EC 88/407, nie sú bezpečné a spektrum antibiotík je neúčinné a nezabraňuje rozširovaniu bakteriál-



**Obrázok č.1:** Nekrozoospermia (všetky spermie sú avitálne) – na pozadí malé biele bodky znázorňujúce bakteriálnu kontamináciu, ktorú potvrdíme molekulárno – genetickou detekciou mikroorganizmov na úrovni DNA. Červenou farbou sú označené mŕtve spermie, resp. ich časti.



**Obrázok č.2:**

a) prítomnosť epitelových buniek a bakteriálnej mikrofóry neplodného býka s potvrdenou *Mycoplasma* a *Ureaplasma* sekvenačne na úrovni DNA; b) vyliečený pacient po 6 týždňoch od ukončenia terapie a to Alamyacin LA 300 (Oxytetracyklín dihydricum 300 mg/ml) v dávke 1 ml = 10 kg živej váhy/každých 6 dní/minimálne 7 aplikácií – pacient s progresom a vyliečený (zelená farba je progresívny pohyb; červená farba symbolizuje nepohyblivé spermie) – koncentrácia 860 mil./ml; progresívna pohyblivosť 91% a priemerná dráhová rýchlosť 98  $\mu\text{m/s}$ .

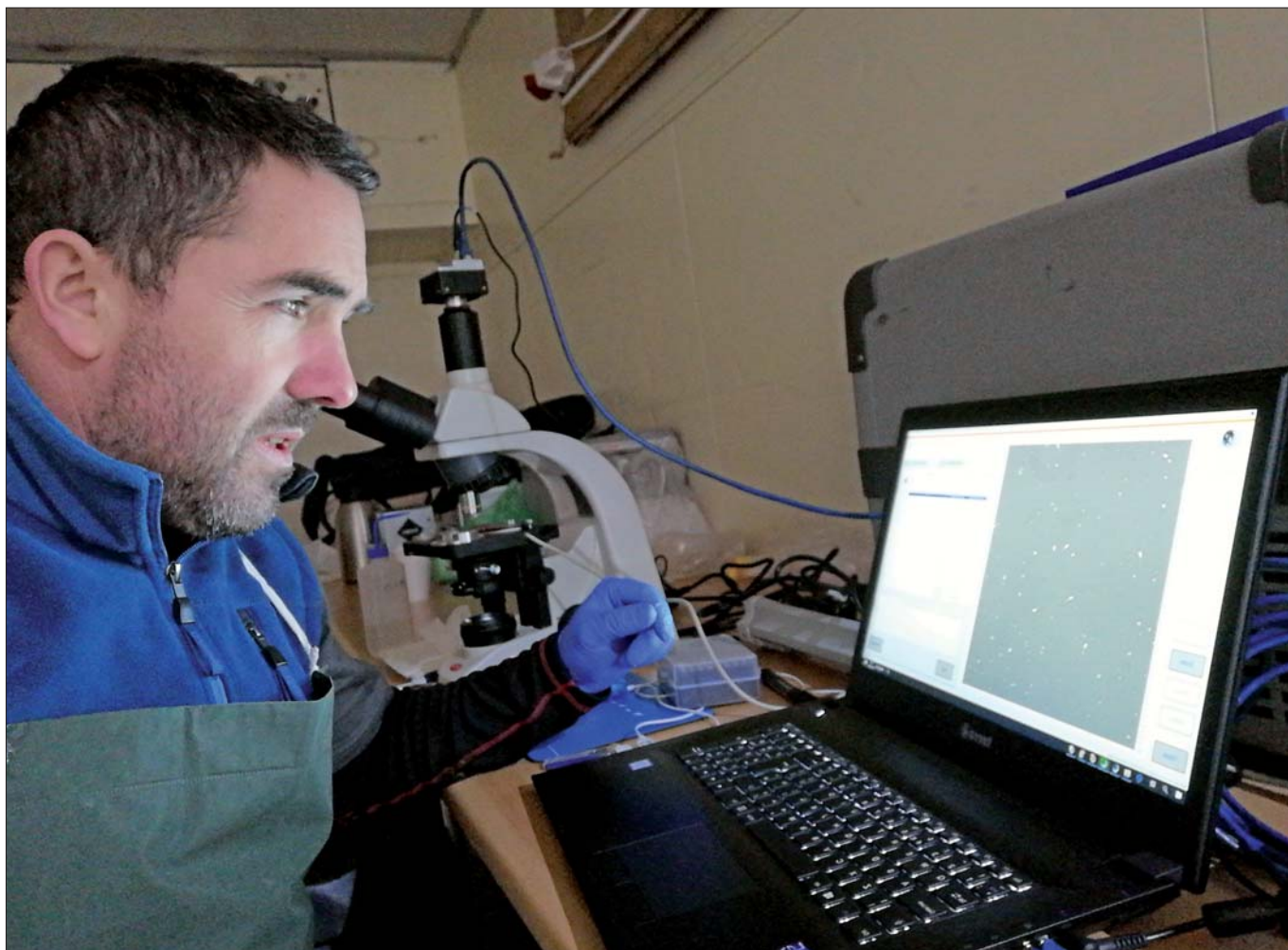
nej infekcie, ktorá má zásadný vplyv na plodnosť stáda. Je potrebné stanoviť prísny zdravotný protokol pre vyšetrenie (diagnostikovanie) donorov inseminačných dávok na inseminačných stanicích s následnou liečbou, ktorý bude rovnaký pre všetky IS po celom svete, aby sa začali produkovať bezpečné inseminačné dávky.

V tejto práci bolo vyšetrených 40 býkov v prirodzenej plemeniťbe a 21 inseminačných dávok. Primárne boli diagnostikované vzorky ejakulátu, resp. inseminačné dávky na andrologický rozbor kvality spermií a to hlavne na dôraz kvalitatívnych faktorov ovplyvňujúcich fertilitu donora. Ide hlavne o stanovenie koncentrácie spermií, motility, progresívnej motility, stanovenia celkového počtu životaschopných spermií a dráhovej rýchlosti spermií. Využitý bol systém CASA (computer assisted sperm analysis) s použitím softvérovej analýzy AndroVision® (MiniTüb, Tiefenbach, Nemecko). AndroVision® je vysoko presný systém CASA pre štandardizovanú interaktívnu analýzu spermií. AndroVision® poskytuje nielen klasické analýzy pohyblivosti, koncentrácie a morfológie, ale tiež rôzne hodnotenia funkčnosti spermií založené na fluorescencii. Sekundárne boli detekované baktérie triedy Mollicutes a to molekulárno-genetickou analýzou pomocou kvantitatívnej Real-Time PCR a sekvenačne dourčená druhová príslušnosť.

Vyšetrených bolo 7 plemien hovädzieho dobytká



Charolais, Limousine, Holštajnský dobytok, Simental, Angus, Belgické modré a Jersey. Býci, používaní v prirodzenej plemeniťbe majú pôsobenie v SR, ČR a Maďarsku, ale ich pôvod je okrem uvedených troch krajín z Nemecka, Francúzska, Dánska a Veľkej Británie. Pôvod inseminačných dávok je celosvetový a pochádzajú



od Nového Zélandu, Nemecka, Francúzska až po krajiny strednej Európy. Výsledky dokázali prítomnosť *Mycoplasma* spp. pri 39 vyšetovaných býkov a *Ureaplasma* spp. pri 32 jedincoch. Jeden býk plemena Limousine bol negatívny na Mollicutes. Prítomnosť *Mycoplasma* spp. bola potvrdená pri 12 inseminačných dávkach z 21, pričom *Ureaplasma* spp. bola detekovaná pri 9 ID z 21. Úplne negatívne na prítomnosť *Mycoplasma* spp. a *Ureaplasma* spp. bolo 5 inseminačných dávok z 21 vyšetovaných. Podstatná informácia z daného výskumu je tiež fakt, že iba 3 inseminačné dávky boli bakteriálne bezpečné bez prítomnosti druhov, ktoré môžu zásadne ovplyvňovať reprodukčné schopnosti býkov a následne aj kráv. Z *Mycoplasma* spp. boli detekované *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma arginini* a *Spiroplasma ixodetis*. Z ureaplazmy bol detekovaný len jeden druh a to *Ureaplasma diversum*.

Mollicutes je trieda baktérií z kmeňa Firmicutes. Mollicutes sú veľmi malé baktérie, ktorým chýbajú bunkové steny. Majú predilekciu na slizničné a serózne povrchy a najčastejšie spôsobujú choroby močovo-pohlavných a dýchacích ciest. *Mycoplasma* spp. a *Ureaplasma* spp. predstavujú infekcie hovädzieho dobytku spojené s neplodnosťou samíc, vulvovaginitídou, potratmi, narodením slabých teliat, semennou vezikulitídou, poškodenou spermatogenezou a tým zníženou fertilitou samcov.

Z andrologického pohľadu boli vyšetované býky v prirodzenej plemenitbe a následne geneticky potvrdzované / nepotvrdzované prítomnosti Mykoplazmiem a Ureaplazmiem. Pri inseminačných dávkach nás zaujímal iba prítomnosť bakteriálnej mikroflóry. Všetky býky v prirodzenej plemenitbe vykazovali neplodnosť alebo zníženú plodnosť na základe kvalitatívnych ukazovateľov. Do pokusu neboli zaradené vzorky s hodnotením ejakulátu ako azoospermia. Vyšetované a detekované boli vzorky ejakulátov so zmiešanými poruchami ako oligoastenoteratozoospermia – zmiešaná porucha všetkých troch parametrov (koncentrácia, pohyblivosť, morfológia), alebo ako samostatné poruchy oligozoospermia – astenozoospermia – teratozoospermia. Ďalej bola pozorovaná a identifikovaná aj extrémne nízka koncentrácia spermíí – kryptozoospermia a nekrozoospermia – všetky spermie sú vo vzorke avitálne. Z kvalitatívnych ukazovateľov uvedených v tejto práci sme merali koncentráciu spermíí, progresívnu pohyblivosť a priemernú dráhovú rýchlosť. Priemerná koncentrácia vyšetovaných vzoriek ejakulátov bola 322 mil./ml, pričom najmenšia koncentrácia bola 3,13 mil./ml a najvyššia 2070,84 mil./ml. Referenčná hodnota zdravých býkov sa pohybuje od 700 mil./ml. Priemerná progresívna motilita spermíí vo vyšetovaných býkov je 14,75 %, pričom za zdravý ejakulát býkov môžeme považovať progresívnu pohyblivosť nad 60%. Priemerná dráhová rýchlosť vyšetovaných býkov bola stanovená na 18,78  $\mu\text{m/s}$ , pričom za spermie, ktoré majú fyziologickú rýchlosť považujeme dráhovú rýchlosť nad 50  $\mu\text{m/s}$ . Všetky vyšetované býky mali zníženú alebo žiadnu fertilitu, schopnosť



oplodniť samicu. Popri kvalitatívnych ukazovateľoch sú sekundárne pozorované % patologických spermíí, typ poškodenia spermíí a ich časti, prítomnosť epitelových buniek, aglutinácia spermíí. Na zobrazení spermioqramu je rovnako vidieť prítomnosť/nepřítomnosť bakteriálneho pozadia v ejakuláte.

#### Záver a odporúčania:

Z uvedenej práce vyplýva fakt, že býci v prirodzenej plemenitbe sú infekční a prenášajú pohlavnou aktivitou *Mycoplasma* spp. a *Ureaplasma* spp., ktoré zásadne ovplyvňujú tvorbu spermíí – spermatogenezu, poškodením epitelu v semenotvorných kanálikoch, čím sa znižuje kvalita ejakulátu, znižuje sa koncentrácia, pohyblivosť a rýchlosť spermíí až pri chronických stavoch môže vzniknúť stav nekrozoospermia – všetky spermie sú avitálne. Zároveň sa baktérie z triedy Mollicutes rozširujú intravaginálne aj na samice, pri ktorých môžu spôsobovať problémy s plodnosťou, nidáciou embryí v maternici, embryonálnou mortalitou, popôrodnou sepsou a úhynom teliat a sekundárne infekciou urogenitálneho traktu samíc. Tento problém infikovania Mollicutes bol spôsobený nedokonalou bakteriálnou diagnostikou a unikál pozornosťou odbornej verejnosti, pretože Mollicutes nerastú na bežných médiách, ako bežné bakteriálne druhy. Až aplikovaním molekulárno-genetickej diagnostiky v mikrobiológii sa zistila ich prítomnosť a potvrdené boli sekve-

načnou analýzou, čím je tento fakt potvrdený na úrovni DNA. Sme toho názoru, že prítomnosť *Mycoplasma* spp. a *Ureaplasma* spp. je problémom od začiatku využívania inseminačných dávok a nekontrolovaným rozširovaním Mollicutes vyše 50 rokov. Nekontrolované rozširovanie mykoplazmiem a ureaplazmiem podporilo aj 30 rokov nevyšetovania plemenných zvierat, kde sa od začiatku 90 tých rokov prestali andrologicky vyšetrovať plemenné samce z radov býkov, capov a baranov.

Pri chove hovädzieho dobytku v Európe si dovoľme tvrdiť, že ide o pandémiu.

### Možné riešenia:

Je nevyhnutné nastaviť prísnu zdravotnú kontrolu – protokol mikrobiologickej diagnostiky ejakulátu (ukazuje sa mimoriadna výhoda molekulárnej mikrobiológie v porovnaní s klasickou kultivačnou mikrobiológiou) a cieľenej liečby všetkých donorov na inseminačných staniaciach a v chovoch, kde sa býk používa v prirodzenej plemenitbe. To je primárna úloha všetkých inseminačných staníc a producentov plemenných býkov, ktorí by nemali byť zaradení do plemenitby bez overenia kvality ejakulátu (spermigramu) a dôkladného (molekulárne) – mikrobiologického vyšetrenia. Liečba pozitívnych jedincov je efektívna pomocou dvoch skupín ATB, ktorými sú tetracyklíny alebo flourochinolóny. Veľmi podstatná je dĺžka liečby, ktorú odporúčame minimálne na 4–6 týždňov, a to z dôvodu potreby precíznej farmakokinetickej prístupnosti do epitelu semenotvorných kanálikov. Vďaka obranným mechanizmom semenníkov, ktoré preto, že sú imunitne privilegovaný orgán s krvnou bariérou, tak eliminácia bakteriálnej infekcie zo semenníkov predstavuje zásadný problém, pri kratšom čase liečby, ako pri iných orgánových sústavách. Terapia samíc je komplikovanejšia a je ekonomicky nepravdepodobné, že by sme dokázali preliečiť pomocou vhodných ATB všetky kravy. Jedným z riešení, ktoré ale má zásadný dopad na živočíšnu výrobu v Európe je eliminácia kráv, ktoré sú pozitívne na Mollicutes a zvýšenie produkcie jalovic, ktoré sú negatívne na uvedenú triedu baktérií. K dnešnému dňu neexistuje vakcína, resp. iný model celoplošnej eliminácie *Mycoplasma* spp. a *Ureaplasma* spp. Používanie zdravotne nezávadných inseminačných dávok, pravidelná zdravotná a andrologická kontrola býkov v prirodzenej plemenitbe môže obmedziť ďalšie rozširovanie *Mycoplasma* spp. a *Ureaplasma* spp. v Európe. Zároveň je to výzva pre komisiu EU pre poľnohospodárstvo, aby flexibilne reagovala na zmenu smerníc pre zdravotnú nezávadnosť inseminačných dávok a kontrolu donorov, ktorých ID sú distribuované po celom svete.

Systémovým riešením je pravidelná mikrobiologická kontrola plemenných býkov na inseminačných staniaciach pred zahájením výroby ID, preferenčne pomocou moderných molekulárne–mikrobiologických technológií (kvantitatívna Real–Time PCR, Sangerovo sekvenovanie, analýza mikrobiomov pomocou sekvenovania novej generácie – NGS), ktoré sú nezávislé na kultivačných vlastnostiach mikroorganizmov a k presnej identifikácii



používajú unikátne DNA profily mikroorganizmov. Produkciou zdravotne nezávadných inseminačných dávok bez prítomnosti patogénnej bakteriálnej mikroflóry vieme začať ozdravný proces v chovoch s produkciou mlieka. Pri plemenných býkoch v prirodzenej plemenitbe je potrebné pravidelné andrologické vyšetrenie pred sezónou a po sezóne pripúšťania. Po sezóne znamená, keď býk ukončil pripúšťanie a bol oddelený od kráv. Následná diagnostika a nastavenie ATB liečby je potrebná každoročne, pretože je vysoký predpoklad, že počas sezóny sa mohol opäť infikovať od kráv. Takáto spätná reinfikácia s Mollicutes bude trvať minimálne 5–8 rokov, pokiaľ sa negatívnou selekciou neozdravia chovy samičej populácie. Súbežne by sa radikálne vyradovali kravy/jalovice, ktoré majú reprodukčné problémy. Toto platí aj v mliečnych chovoch, kde pri insemináciách s overenými ID vyradujeme kravy/jalovice, ktoré majú reprodukčné problémy. Systém ozdravenia samičej populácie a selekcia samičej je jediná cesta, ako ozdraviť postupne chovy od mykoplazmiem a ureaplazmiem bez zásadného negatívneho vplyvu na ekonomiku chovu.

Záverom môžeme konštatovať fakt, že za primárnymi problémami s plodnosťou stáda stoja infekcie z rodov *Mycoplasma* a *Ureaplasma*. Sme presvedčení, že aj ekonomika stáda, percento teľnosti, zdravo narodených a odchovaných teliat a všetky ostatné reprodukčné ukazovatele, môžu byť nadpriemerné, ak sa podarí eliminovať rozširovanie Mollicutes. Riešenie tohto problému je základom pre vzostup ekonomiky chovu mliečnych plemien, ako aj plemien mäsových.