

СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ МІКРОБНОЇ КОНТАМІНАЦІЇ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Г.С. Тихона

Інститут тваринництва УААН

Вивчено видовий склад мікроорганізмів слизу статевих шляхів корів та телиць. Встановлено, що умовно патогенна мікрофлора негативно впливає на приживлюваність ембріонів. Запропоновано спосіб профілактики мікробної контамінації по етапах вилучення і пересадки ембріонів великої рогатої худоби, що підвищує їх приживлення.

**велика рогата худоба, мікроорганізм, ембріон, приживлення,
трансплантація, санація**

Сучасні темпи розвитку тваринництва вимагають удосконалення існуючих методів селекційної роботи з метою створення і прискореного розмноження високопродуктивних тварин. Більш інтенсивне використання репродуктивного потенціалу високоцінних у племінному відношенні жіночих особин можливе при трансплантації ембріонів.

У теперішній час в області трансплантації ембріонів великої рогатої худоби досягнуто значних успіхів, однак вихід повноцінних ембріонів і їх приживлюваність не стабільні. Це залежить від багатьох причин, однією з яких є бактеріальна і вірусна контамінація [1-3].

Здоровий організм ссавців має цілу систему захисних пристосувань, тому діяльність мікроорганізмів-сапрофітів обмежується. Однак у визначених умовах резистентність організму значно слабшає і нормальний кількісний і якісний склад мікрофлори змінюється, а діяльність її активізується. Порушення цілісності слизових оболонок також приводить до активізації діяльності сапрофітів, які проникнув в глибину організму, викликають розвиток у ньому хвороботворного процесу і загибель пересаджених ембріонів.

Проблемними залишаються питання попередження занесення інфекції в матку при вилученні, пошуку і пересадці ембріонів. Інфікування і перенесення мікроорганізмів у матку реципієнта можна допустити при маніпулюванні з ембріонами поза організмом та при їх оцінці. Після нехірургічної трансплантації ембріонів, навіть у випадку негативної бактеріологічної проби інструмента, може відбутися мікробне зараження в ході її здійснення, що часто буває причиною наступних ускладнень, зокрема, ендометритів. У корів-донорів, хворих на ендометрит, спостерігали часткову або повну дегенерацію ембріонів на різних стадіях їх розвитку, при значній кількості незапліднених яйцеклітин [4].

З іншого боку, у деяких видів тварин існує визначена залежність чутливості до маткових інфекцій від рівня стероїдних гормонів крові.

Встановлено, що матка корови легко інфікується у лютеальній фазі статевого циклу і стійка до зараження в естральний період. Розвитку інфекції сприяє прогестерон, а естрогени підвищують резистентність матки до інфекцій. Крім цього, в захисному механізмі матки проти інфекції гальмуюча дія прогестерону має більшу роль, ніж стимулююча дія естрогенів [5].

Тому у технології трансплантації ембріонів важливе місце приділяється розробці методів, які попереджають можливість контамінації їх умовно патогенною мікрофлорою і появи гінекологічних хвороб, що забезпечать одержання здорових телят.

Метою наших досліджень була розробка способу профілактики мікробної контамінації на всіх етапах трансплантації ембріонів у великої рогатої худоби.

Матеріал і методика досліджень. Роботи проводилися у лабораторії трансплантації ембріонів та тканин і дослідних господарствах ІТ УААН на коровах-донорах, телицях–реципієнтах, а також ембріонах. Для досягнення поставленої мети нами була розроблена схема досліджень боротьби з мікробною контамінацією.

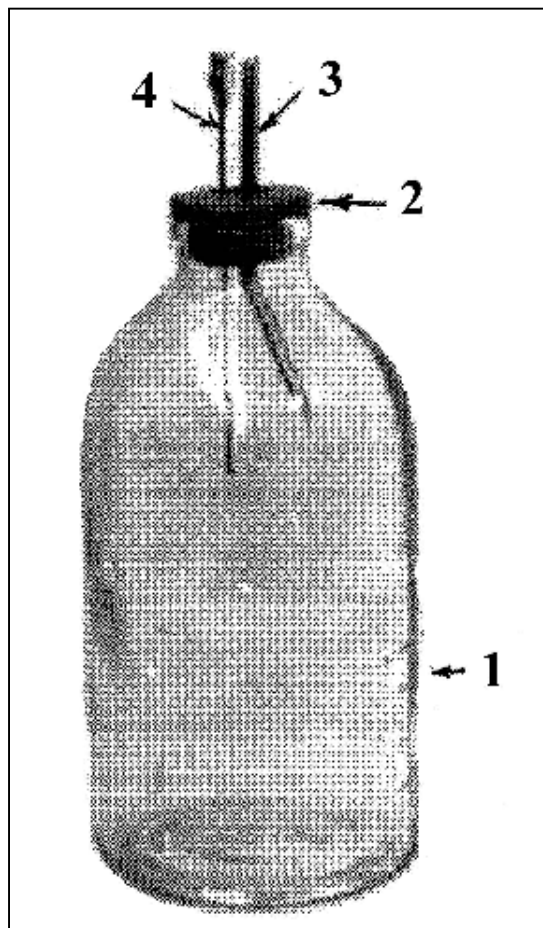
Схема заходів з профілактики мікробного забруднення при трансплантації ембріонів

Визначення мікробної контамінації	Підбір сануючих засобів	Деконтамінація на технологічних етапах трансплантації ембріонів
Повітря і устаткування приміщень пункту трансплантації	Для стерилізації повітря і устаткування приміщень пункту трансплантації	Стерилізації повітря і устаткування приміщень пункту трансплантації
Статевих шляхів корів-донорів і телиць-реципієнтів	Для обробки статевих шляхів корів-донорів і телиць-реципієнтів	Санація статевих шляхів корів-донорів і телиць-реципієнтів
Промивних буферних середовищ	Для промивних буферних середовищ	Введення антибіотиків в промивні буферні середовища
Середовищ для відмивання ембріонів	Для відмивання ембріонів	Відмивання ембріонів середовищами з антибіотиками
Катетерів для пересадки ембріонів	Обробка катетерів для пересадки ембріонів	Шліфування і полірування катетерів для пересадки ембріонів

Бактеріологічні дослідження цервікального слизу, який відбирали у фолікулярну та лютеальну фази статевого циклу, проводили за загально прийнятими методиками відповідно до Держстандартів 20909.1-75 і 20909.2-75. Для відбору проб слизу використовували одноразовий шприц, сполучений пластиковим перехідником із полістероловою піпеткою довжиною 400 мм. Санацію зовнішніх статевих органів проводили препаратами: “Септонекс” і розчином Люголя, які вприскували через розкрите піх-

вове дзеркало, з експозицією 15 хв., з подальшим відбором проб цервікального слизу. З приготованого розведення слизу робили посіви на живильні середовища. Облік колоній мікроорганізмів здійснювали через 24 і 48 годин інкубації в термостаті при 38 °С.

Вилучення ембріонів у корів-донорів проводили нехірургічним мето-



дом на 7-8-й день статевого циклу. Для цього використовували середовище Дюльбекко з додаванням 1% інактивованої фетальної сироватки великої рогатої худоби та комплексу антибіотиків пеніциліну зі стрептоміцином згідно з інструкцією по трансплантації ембріонів великої рогатої худоби, у досліді використовували інший комплекс антибіотиків - гентаміцин з ампіциліном у концентрації 12 мкг/мл і 100 Од/мл відповідно. Промивні середовища із рогів матки збирали до приймачів, закритих пробкою нашої конструкції (рис.1).

Рис. 1. Приймач для збору промивного маткового середовища:

- 1 – флакон; 2 – пробка;
- 3 – вигнута трубка для надходження рідини;
- 4 – трубка для витиснутого повітря.

Пошук і оцінку ембріонів проводили під стереоскопічним мікроскопом МБС-9 (10). Усі повноцінні ембріони відмивали середовищами з додаванням вищевказаних антибактеріальних засобів.

Для усунення шорсткостей на зовнішніх поверхнях промислових катетерів для пересадки ембріонів вітчизняного виробництва проводили додаткове шліфування і полірування до 8 класу чистоти.

Результати досліджень. Усі роботи з трансплантації ембріонів починали з підготовки приміщень, обладнання, лабораторних меблів, повітря та тварин за загальноприйнятими методиками. Попередні бактеріологічні дослідження показали, що навіть ретельна підготовка тварин, яка включає чищення і миття шкірного покриву і кінцівок, миття водою з милом і осушування стерильною серветкою зовнішніх статевих органів і перинеальної області, не завжди дають позитивні результати. Трансплантацію ембріонів проводять у лютеальну фазу статевого циклу, коли матка особливо чутлива до мікрофлори. Крім цього, нашими дослідженнями встановлено, що бактеріальна забрудненість статевих шляхів донорів і реципієнтів збіль-

шується до моменту трансплантації ембріонів: у більшості телиць у пробах, що отримані зі слизової оболонки цервікальної частини піхви у лютеальну фазу статевих циклу, мікроорганізми присутні у 9-ти телиць з 10-ти (90%) у порівнянні з 6-ти телицями з 10-ти (60%) під час статевої охоти. Трохи інші результати були отримані в дослідях, що проводили на коровах. Наявність умовно-патогенної мікрофлори в змивах зі слизової оболонки цервікальної частини піхви спостерігали під час тічки і статевої охоти у 17 корів з 21, що становить 80,95%, а у лютеальну фазу – ріст мікроорганізмів спостерігали у 100% випадків.

1. Бактеріальна контамінація цервікального слизу корів-донорів і телиць-реципієнтів по стадіях статевого циклу

Фаза статевого циклу	Група тварин	Кількість тварин, гол.	Ріст мікроорганізмів на МПБ, %
Фолікулярна	телиці-реципієнти	10	60,0
	корови-донори	21	80,95
Лютеальна	телиці-реципієнти	10	90,0
	корови-донори	7	100,0

Якісний аналіз колоній мікроорганізмів, що вирости на живильних середовищах показав, що вони відносяться до груп коменсалів, що розміщуються звичайно в кишечнику чи на шкірному покриві (кишкова паличка, стафілококи і стрептококи). При ідентифікації мікробів була встановлена їх видова належність: *E.coli*, *St.aureus*, *St.album*, *Proteus vulgaris*, *Bac.subtilis*, *Ps.aerug*. Умовно-патогенні мікроорганізми, що зустрічаються у статевих шляхах корів і телиць, можуть бути причиною несприятливих умов імплантації ембріонів.

У зв'язку з вищевикладеним необхідно проводити додаткові заходи для зниження бактеріального забруднення зовнішніх статевих органів.

Подальші наші дослідження були спрямовані на пошук препаратів, що зможуть максимально знизити бактеріальне забруднення статевих шляхів тварин перед трансплантацією ембріонів. Для цього були випробувані аерозоль “Септонекс” і розчин Люголя. Результати досліджень показали, що при санації статевих шляхів у корів-донорів та телиць-реципієнтів відбувається значне зниження росту мікрофлори. Кращі результати в наших дослідях були отримані при обробці слизових оболонок піхви корів-донорів розчином Люголя з експозицією 15 хвилин. При цьому відбувалося зниження росту мікрофлори в пробах, відібраних з цервікальної частини піхви з $868,1 \pm 37,82$ до $20,7 \pm 1,12$ м.т./мл, у 41,9 раза. Використання “Септонексу” знижувало бактеріальну контамінацію в 5,4 раза.

Бактеріальні дослідження промивних буферних середовищ показали наявність у них мікрофлори. Використання антибіотиків пеніциліну зі стрептоміцином згідно з інструкцією також виявилось не ефективним проти досліджених штамів мікробів. Тому нами було випробувано такі комплекси антибіотиків: ампіцилін і гентаміцин, пеніцилін і гентаміцин, пеніцилін і стрептоміцин. Ці препарати найбільш часто використовуються у

тваринництві, а їх комбінації збільшують спектр антимікробної дії. Бактерицидні дози антибіотиків були визначені в модельних бактеріологічних дослідах, у яких використовували польові культури умовно-патогенних мікроорганізмів (*E.coli*, *St.aureus*, *Ps.aerug.*, *Bac.subtilis*) у розведенні 1:1000 і комплекси антибіотиків різних концентрацій: пеніцилін (100 Од/мл) з гентаміцином (4, 6, 10, 12, 25, 50 і 100 мкг/мл середовища); ампіцилін (100 Од/мл) з гентаміцином у тих же концентраціях; пеніцилін (100 Од/мл) зі стрептоміцином (50 Од/мл). Установлено, що 100 Од/мл ампіциліну з 12 мкг/мл гентаміцину є бактерицидною концентрацією антибіотиків для мікроорганізмів. Концентрація гентаміцину 4, 6, 10 мкг/мл в комбінації з ампіциліном (100 Од/мл) хоча і пригнічувала ріст досліджуваних мікробів, але повної бактерицидної активності не спостерігалось. Ці результати були підтверджені дослідженнями із санації промивних буферних середовищ, які показали, що комплекс антибіотиків ампіциліну (100 Од/мл) і гентаміцину (12 мкг/мл) є надійним засобом для санації. Так, з 147 санованих змивів 116 були вільні від мікрофлори (78,9%) у порівнянні з контролем, де з 144 змивів без додавання антибіотиків тільки 65 були вільні від мікроорганізмів (45,2%). Санація промивних буферних середовищ дала можливість одержати більшу кількість ембріонів, які були вільні від мікрофлори, а також попереджала запальні процеси в матці і дала змогу багаторазово (до 8-13-ти раз за рік) використовувати високопродуктивних корів-донорів.

Надалі ембріони з промивного буферного середовища повинні проходити ще багаторазове відмивання стерильним буферним середовищем. Але мікробіологічні дослідження показали, що навіть п'ятикратне відмивання ембріонів стерильним буферним середовищем не завжди дає позитивний антимікробний ефект. З 25 досліджених проб у трьох спостерігався ріст мікрофлори, а при відмиванні ембріонів з додаванням антибіотиків ампіциліну з гентаміцином (100 Од/мл і 12 мкг/мл) усі проби були стерильними.

З огляду на вище отримані результати, були проведені дослідження з визначення впливу комплексу антибіотиків гентаміцину з ампіциліном (12 мкг/мл і 100 Од/мл) на приживлюваність ембріонів при пересадці їх реципієнтам.

Ембріони, які були відмиті середовищем Дюльбекко з комплексом антибіотиків гентаміцину 12 мкг/мл і ампіциліну 100 Од/мл, пересаджували телицям-реципієнтам. Приживлюваність ембріонів визначали за результатами тільності (табл. 2).

2. Вплив антибіотиків на приживлюваність ембріонів

Середовище для відмивання ембріонів	Усього реципієнтів, гол.	З них тільки	
		кількість	%
Ампіцилін з гентаміцином (12 мкг/мл і 100 Од/мл)	38	28	73,6±7,14
<u>Контроль</u> Без антибіотиків	36	18	50,0±8,33

Встановлено, що з 38 телиць-реципієнтів, яким були пересаджені ембріони, відмиті середовищем з комплексом антибіотиків гентаміцин з ампіциліном (12 мкг/мл і 100 Од/мл), тільними стали 28 голів, що становить 73,6 %. У контролі - з 36 реципієнтів тільки 18 голів були тільними, що становить 50 % ($P < 0,05$).

Дослідження свідчать, що комплекс антибіотиків ампіцилін з гентаміцином має широкий спектр антимікробної дії й у дозі 100 Од/мл і 12 мкг/мл і підвищує приживлюваність ембріонів. На нашу думку, це відбувається за рахунок того, що в матку реципієнта разом з пересадочним матеріалом (ембріонами) вводиться невелика кількість середовища Дюльбекко з антибіотиками, які створювали оптимальні умови для імплантації.

Як було сказано вище, трансплантація ембріонів відбувається у лютеальну фазу статевих циклу, тобто при закритій шийці матки. Тому особливо важливу роль у виключенні мікротравматизму відіграє якість зовнішньої поверхні інструмента для пересадки ембріонів. Мікроскопічний аналіз показав, що зовнішня поверхня катетерів Одеського заводу "Вет-прибор" шорсткувата, з безліччю рисок, гострих виступів, які співмірні з клітинами епітелію і величиною мікроорганізмів (від 5 - 6 мкм до 0,4 мм). Додаткове шліфування і полірування зовнішньої поверхні інструментів для пересадження ембріонів поліпшили якість їх поверхні, знизили можливість травмування епітелію шийки матки і зменшили їх контамінацію, що було встановлено в досліді з інокулювання шприц-катетерів польовими культурами *Staph. aur.* і *Ps. aerug.* з наступним відмиванням їх стерильним фізіологічним розчином. Полірована поверхня легше "очищалася" від мікробів і утримувала меншу кількість їх за рахунок адгезії. Після додаткової механічної обробки (до 8 класу чистоти) поверхня заводських катетерів стала більш гладкою, менш травматичною, легко піддавалася простим способам стерилізації (обробка спиртом), що давало змогу використовувати їх багаторазово у виробничих умовах. Використання таких катетерів підвищувало приживлюваність ембріонів до 24 %.

Висновок. Розроблено комплексний спосіб профілактики мікробної контамінації при трансплантації ембріонів великої рогатої худоби, що включає:

1. Обробку слизових оболонок зовнішніх статевих органів корів-донорів розчином Люголя з експозицією 15 хв., яка достовірно знижує їх мікробну контамінацію та дає змогу отримати більш чистий у мікробному відношенні ембріональний матеріал і багаторазово використовувати корів-донорів ембріонів.

2. Санацію статевих шляхів телиць-реципієнтів, що попереджує занесення інфекції в матку.

3. Додавання гентаміцину 12 мкг/мл з ампіциліном 100 Од/мл у промивні буферні середовища, що попереджує контамінацію ембріонів, профілактує захворювання на ендометрити корів-донорів, а додавання його у середовища для відмивання ембріонів – забезпечує повну деконтамінацію ембріонів.

4. Додаткове шліфування та полірування до 8 класу чистоти зовнішньої поверхні інструмента для пересадки ембріонів, що запобігає мікротравматизму шийки матки у телиць-реципієнтів.

Бібліографічний список

1. Советкин С.В. Препараты и методы, обеспечивающие эффективную трансплантацию эмбрионов крупного рогатого скота: Дисс...д-ра биол.наук. /в форме научного доклада. – Дубровицы, 1994.
2. Зверева Г.С. Влияние микробного фактора на приживляемость эмбрионов //Тез.докл. Всесоюз. совещ. по трансплантации эмбрионов с.-х. жив. – Алма-Ата. – 1989. – С.15.
3. Sing et al. Embryo transfer as a means of controlling viral infections //Theriogenology, 1983. – V.20. – N2. – P.169-176.
4. Бугров А.Д., Коркин В.А. Многократное использование коров-доноров при трансплантации эмбрионов:Сб.научн.тр. ГСГЦ //Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных- М.-1988.- С.45-51.
5. Квасницкий А.В., Мартыненко Н.А., Близнюченко А.Г. Трансплантация эмбрионов и генная инженерия в животноводстве.– К.:Урожай, 1988.

СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Г.С.Тихона

Институт животноводства УААН

В работе изучен видовой состав микроорганизмов половых путей коров и телок. Установлено, что условно-патогенная микрофлора отрицательно влияет на приживляемость эмбрионов. Предложены способы предупреждения микробной контаминации на этапах извлечения и пересадки эмбрионов крупного рогатого скота, повышающие их приживляемость.

MICROBIC CONTAMINATION PROPHYLAXIS TECHNIQUE BY THE CATTLE EMBRYOS TRANS-PLANTATION

G.S. Tichona

The institute of animal science UAAS

The specific composition of microbes in the mucus of reproductive tracts of the cows and heifers was studied. It was proved that pathogenic microflora affects negatively the acclimatization of embryos under certain conditions. Microbes contamination prophylaxis technique on the cattle embryos extraction and transplantation stages was elaborated. The application of this method accelerates acclimatization of embryos.