DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-3-8
УДК 636.082.4

Микробиологические показатели элюированной жидкости после вымывания эмбрионов у коров-доноров и качество эмбрионов

Макаров А.В.
Makarov A.V.

Макаров А.В., к.б.н., andmak83@yandex.ru
Бригида А.В., заместитель директора по развитию и инновациям, ведущий научный сотрудник, brigida_86@mail.ru
Скачкова О.А., заведующий научно-организационным отделом, oaskachkova@mail.ru
Ковальчук С.Н., к.б.н., ВРИО директора, s.n.kovalchuk@mail.ru
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий", 127422, Москва, ул. Костякова, дом 12, стр. 4, e-mail: info-ceerb@mail.ru

Работа выполнена в рамках госзадания 075-01250-20-01

Ключевые слова: крупный рогатый скот, технология трансплантации эмбрионов, микрофлора, качество эмбрионов

Резюме. Одним из факторов, влияющих на результат приживляемости трансплантированных эмбрионов, существенными являются качество и жизнеспособность пересаживаемых эмбрионов. Целью исследования являлось изучение микробиологических показателей элюированной жидкости, полученной в процессе вымывания эмбрионов у телок и коров-доноров, и влияния внутриматочной микрофлоры доноров на качество извлеченных эмбрионов, являющееся одним из существенных факторов, влияющих на результат приживляемости трансплантированных эмбрионов. Исследование проведено на 100 животных (коровы – n = 69; телки – n = 31), которым провели индукцию полиовуляторной реакции яичников гипофизарным гонадотропным препаратом "Плюсет" (Испания) в дозе 1000 ИЕ из расчета на одно животное. Вымывание эмбрионов проводили нехирургическим способом из репродуктивных органов доноров на седьмой день индуцированного полового цикла. В качестве объекта исследования были использованы извлеченные эмбрионы крупного рогатого скота, в также образцы элюирующей жидкости с целью определения микробиологических показателей. У коров-доноров выявлены следующие группы микроорганизмов: кокки – у 37,93 % проб элюированной жидкости, энтеробактерии – у 68,97

Microbiological Indicators of Flushing Fluid and Embryos Quality After Embryos Recovery Procedures in Cattle

Makarov A.V.,
Brigida A.V.,
Skachkova O.A.,
Kovalchuk S.N.

FSBI Center of experimental embryology and reproductive biotechnologies, 127422, Moscow, ul. Kostyakova, 12, str. 4, e-mail: info-ceerb@mail.ru

Key words: cattle, embryo transfer technology, microflora, embryo quality

Abstract. Embryo transfer is a biotechnological method for the accelerated reproduction of highly productive animals. One of the factors effecting the embryo survival rate is the quality and viability of the transferred embryos. The aim of the study is research of microbiological parameters of flushing fluid after embryo recovery procedure in cow and heifer donors, as well as the effecting the donors' microbiota on the quality of the obtained embryos, what is one of the significant factors affecting the survival rate of transferred embryos. The study was conducted on 100 animals (n = 69 for cows; n = 31 for heifer), which were treated with Pluset (Spain) at a dose of 1000 IU per animal to induce polyovulatory reaction of ovaries. Embryo recovery procedures were performed non-surgically on the seventh day after estrus. The cattle embryos were used as an object of the study, as well as flushing fluid samples after embryo recovery procedures to estimate its 'microbiological indicators. The following groups of microorganisms were revealed in donor cows: 37.93% of flushing fluid samples with cocci, 68.97% with Escherichia coli, 10.34% with Candida. Cocci were found in heifer donors in 40% of flushing fluid samples, and E.coli - in 60.00%. The study found that there was a relationship between the presence of pathogenic microflora in reproductive organs of donors and the quality of the embryos obtained in the process of embryo recovery procedures. Small number of high-quality embryos was collected from donors for which pathogen microorganisms were detected in flashing fluid samples.

%, Candida – у 10,34 %. У телок-доноров были обнаружены кокки – у 40 % проб элюированной жидкости и энтеробактерии – в 60,00 %. В процессе исследования установлено, что существует взаимосвязь между наличием патогенной микрофлоры репродуктивных органов доноров и качеством эмбрионов, получаемых в процессе извлечения из матки самок крупного рогатого скота. У доноров, в образцах элюированной жидкости которых была выявлена патогенная микрофлора, наблюдалось низкое количество качественных извлеченных эмбрионов.

Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота является биотехнологическим методом ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных. Она включает в себя ряд последовательно проводимых этапов, таких как отбор, индукция полиовуляции и извлечение эмбрионов у коров-доноров, морфологическая оценка эмбрионов и их пересадка реципиентам. Эффективность данной технологии заключается в получении от коров-доноров максимального числа качественных эмбрионов, а после их пере-

Для цитирования / For citation

Макаров, А.В. Микробиологические показатели элюированной жидкости после вымывания эмбрионов у коров-доноров и качество эмбрионов / А.В. Макаров, А.В. Бригида, О.А. Скачкова, С.Н. Ковальчук // Ветеринария и кормление. - 2020. - № - С.28-30.

Makarov, A.V. Microbiological Indicators of Flushing Fluid and Embryos Quality After Embryos Recovery Procedures in Cattle / A.V. Makarov, A.V. Brigida, O.A. Skachkova, S.N. Kovalchuk // Veterinaria i kormlenie. - 2020. - № - P. 28-30.

садки – в наличии стельности у реципиента и рождении теленка [4]. Как известно, на современном уровне развития технологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, до сих пор остается нерешенной проблема низкой приживляемости трансплантированных эмбрионов у реципиентов (около 50 % от общего числа использованных реципиентов) [2].

Как показывает практика, среди множества факторов, влияющих на результат приживляемости трансплантированных эмбрионов, существенными являются качество и жизнеспособность пересаживаемого эмбриона [1, 3]. Также предполагается, что фактором, который может значительно влиять на качество и жизнеспособность эмбрионов крупного рогатого скота, является состав микрофлоры репродуктивных органов коровы-донора. В связи с этим, актуальным является вопрос изучения влияния патогенной микрофлоры на раннее развитие и жизнеспособность эмбрионов, в процессе технологии эмбриотрансфера.

Исходя из вышеизложенного, нами была поставлена цель – изучить микробиологические показатели элюированной жидкости, полученной в процессе вымывания эмбрионов у телок и коров-доноров.

Материалы и методы исследований

Настоящие исследования выполнены на 100 животных (коровы – n = 69; телки – n = 31). Индукция полиовуляторной реакции яичников коров-доноров эмбрионов проводили с использованием препарата "Плюсет" (Испания) в дозе 1000 ИЕ (50 Арморовских единиц) из расчета на одно животное. Осуществляли восьмикратное введение препарата с интервалом 12 ч (утро-вечер) на 9 - 12 день полового цикла в убывающих дозах (50 АЕ, 3; 3; 2,5; 2,5; 2; 2; 1,5; 1,5 мл/гол.). Извлечение эмбрионов проводили нехирургическим способом на седьмой день индуцированного полового цикла. Морфологическую оценку эмбрионов проводили с использованием стереомикроскопов Nikon SMZ1270, SMZ745.

В соответствии с поставленной нами целью, объектом исследований служила элюированная жидкость из полости матки, а также эмбрионы крупного рогатого скота. Элюированную жидкость отбирали в стерильную емкость во время вымывания и пропуска через фильтр для сбора эмбрионов. После забора материал доставлялся в лабораторию, в течение двух часов. После того, как материал был доставлен, из него делались посевы поверхностным способом на среды Плоскирева, Эндо, на 5%-й кровяной и желточно-солевой агар (ЖСА) в количестве 0,05 мл с последующим растиранием шпателем. Для определения анаэробной и факультативно-анаэробной микрофлоры проводили глубокий посев 1 мл элюированной жидкости на лактоагар и гидролизатно-молочную среду.

Все посевы подвергали инкубации при температуре 37°C, так на средах Плоскирева, ЖСА, Левина, Эндо - 24 часа, на 5%-ом кровяном агаре – 48 часов, на лактоагаре и гидролизатно-молочной среде – 5 суток.

Отбирали 3 – 5 колоний с общими культуральными свойствами и производили пересев на скошенный мясо-пептонный агар (МПА), который подвергался инкубации при температуре 37°C 24 часа.

С культур, выросших на лактоагаре и гидролизатно-молочной среде, делались мазки со всех колоний и окрашивались по Граму, которые подвергались микроскопии.

Для определения подвижности микроорганизмов, со скошенного МПА делался посев на полужидкий МПА. Для определения культуральных свойств в жидких средах проводили посев на мясо-пептонный бульон. Для исключения оксидазоположительной флоры проводили окси-тест.

С целью изучения биохимической активности, проводили тесты с использованием систем индикаторных бумажных для идентификации микроорганизмов (набор №2 для межродовой и видовой дифференциации энтеробактерий), а также посевы на фенилаланин агар, среду Олькеницкого и МПБ с добавлением трептофана. Индолообразование определяли с реактивом Ковача. При обнаружении культурально соответствующих колоний кокковой флоре проводили биохимические тесты с использованием наборов для кокковых форм и ставили реакцию на коагулазу с плазмой кролика и реакцию Фогеса - Проскауэра.

Результаты исследований

При проведении бактериологического исследования элюированной жидкости были выделены следующие группы микроорганизмов. У коров: кокки – у 37,93% проб элюированной жидкости, энтеробактерии – у 68,97%, Candida – у 10,34%. У телок: кокки – у 40 % проб элюированной жидкости и энтеробактерии – в 60,00%.

Рост микроорганизмов наблюдали в 29 пробах из 69 (42,03%), взятых у коров, 57,97% проб были стерильными. У телок микроорганизмы обнаружены в 32,26% (10 проб) случаев и в 67,74 % пробы были стерильными, что на 9,77 % больше чем у коров. Результаты распространения микроорганизмов в элюированной жидкости представлены в таблице 1.

Для большинства проб, отобранных у коров, было характерно наличие микроорганизмов в разных сочетаниях. Так, E. coli в монокультуре наблюдалась только у 6,90% проб. В 41,38 % случаях была обнаружена ассоциация E. coli с Providencia sp. в (10,34 % случаев), с Klebsiella sp. (10,34 %, в том числе 6,90 % с K. ozaenae и 3,45 % с K. pneumoniae), с Serratia sp – в одном случае, как и с Proteus vulgaris. Кроме того, наблюдали сочетание E. coli с кокковыми формами микроорганизмов – со стафилококком в 3 случаях (10,34 %), в том числе с S. aureus – 6,90 % и S. epidermidis в 3,45% случаев.

Кроме двойных ассоциаций с E. coli, у одного животного было выявлено несколько видов микроорганизмов – Pseudomonas aeruginosa, S. aureus и S. epidermidis.

Проанализировав количественно-качественный состав эмбриосборов, полученных от коров-доноров, нами было отмечено, что качество эмбрионов, полученных от животных с обнаруженной E. coli в монокультуре, варьировало от отличного до условно годного, что свидетельствует о заносе данного микроорганизма во время вымывания эмбрионов, тогда как во всех остальных случаях (с сочетанной инфекцией) находили лишь эмбрионы условно-годные или удовлетворительного качества. У одной коровы-донора была обнаружена Klebsiella sp. двух видов K. ozaenae и K. pneumoniae, при этом, полученный единичный эмбрион был удовлетворительного качества.

Таблица 1. Состав микроорганизмов в элюированной жидкости после вымывания эмбрионов у коров-доноров
Table 1. The species composition of microorganisms in the flushing fluid after the embryos recovery procedure in donor cows

№ п/п	Микроорганизмы	Коровы		Телки	
		Кол-во проб	%	Кол-во проб	%
1	Klebsiella sp, в т.ч.:	5	17,24	0	0,00
	K. ozaenae	3	10,34	0	0,00
	K. pneumoniae	2	6,90	0	0,00
2	E. coli	14	48,28	6	60,00
3	Providencia sp.	3	10,34	0	0,00
4	Pseudomonas aeruginosa	3	10,34	0	0,00
5	Corynebacterium renale	2	6,90	0	0,00
6	Candida albicus	3	10,34	0	0,00
7	Proteus vulgaris	3	10,34	0	0,00
8	Citrobacter sp	2	6,90	0	0,00
9	Serratia sp	2	6,90	0	0,00
10	Staphylococcus sp, в т.ч.	13	44,83	2	20,00
	S. aureus	9	31,03	2	20,00
	S. epidermidis	4	13,79	0	0,00

Таблица 2. Состав микроорганизмов в элюированной жидкости и качество эмбрионов			
Table 2. The species composition of microorganisms in the flushing fluid and embryos qualit			
Виды микроорганизмов	Количество животных	Количество эмбрионов	Качество эмбрионов
Коровы			
<i>E. coli</i>	2	13	от отличного до условно годного
<i>S. aureus</i>	4	8	условно-годные
<i>Candida albicus</i> ,	3	0	
<i>E. coli в сочетании с:</i>			
<i>Providencia sp.</i>	3	10	От хороших до условно-годных, либо отсутствие
<i>Serratia sp.</i>	1	8	условно-годных
<i>S. aureus</i>	2	6	условно-годных
<i>P. vulgaris</i>	1	4	От хороших до условно-годных
<i>K. ozaenae</i>	2	7	условно-годные
<i>K. pneumoniae</i>	1	8	условно-годные
<i>P. aeruginosa</i>	1	15	условно-годные (14) или удовлетворительный (1)
<i>S. aureus</i>			
<i>S. epidermidis</i>			
<i>S. epidermidis</i>	1	2	условно-годные
Другие сочетания			
<i>K. ozaenae</i>	1	1	удовлетворительное
<i>K. pneumoniae</i>			
<i>S. aureus</i>	1	2	условно-годные
<i>Streptococcus sp.</i>			
<i>P. vulgaris</i> ,	1	4	удовлетворительные или условно-годные
<i>Citrobacter sp.</i>			
<i>P. vulgaris</i> ,	1	2	удовлетворительные или условно-годные
<i>C. renale</i>			
<i>C. renale</i>	1	6	удовлетворительные или условно-годные
<i>P. aeruginosa</i> .			
<i>P. aeruginosa</i>	1	15	удовлетворительного и условно-годное
<i>S. epidermidis</i>	1	7	условно-годные (6)
<i>Citrobacter sp.</i>			удовлетворительный (1)
<i>Serratia sp</i>			
<i>S. aureus</i>	1	3	условно-годные
<i>S. epidermidis</i>			
Телки			
<i>E. coli</i>	6	46	от отличного до условно-годного
<i>S. aureus</i>	2	22	условно-годные
<i>Streptococcus sp.</i>	2	10	условно-годные

Также в исследовании у одного животного отмечалось наличие *P. vulgaris* в сочетании с *Citrobacter sp*3 и *Corynebacterium renale* и у еще одной коровы – комбинация *C. renale* с *P. aeruginosa*. При всех этих сочетаниях полученные эмбрионы были классифицированы как удовлетворительные или условно-годные.

В одном из случаев была обнаружена *P. aeruginosa* в монокультуре, при этом качество всех 15 полученных эмбрионов было на низком уровне (удовлетворительного и условно-годного). Среди коров в 10,34 % случаев наблюдали рост дрожжеподобных грибов *Candida albicus*, что, вероятно, связано с проведением у животного длительной антибиотикотерапии до начала процедур индукции полиовуляции. При этом, у всех трех коров после проведения процедуры вымывания, эмбрионы отсутствовали.

Стафилококки были обнаружены в 13 (44,83 %) пробах, в 10,34 % случаев они были в сочетании с другими микроорганизмами: *S. aureus* с *Streptococcus sp* в 3,45 %, *S. aureus* с *S. epidermidis* в 3,45 %. В этих случаях эмбрионы классифицированы как условно-годные. Из семи эмбрионов, полученных от коровы с выявленными *S. epidermidis* с *Citrobacter sp.* и *Serratia sp.*, один эмбрион был удовлетворительного качества, остальные – условно-годными. В 13,79 % случаев с выявленным *S. aureus* в монокультуре из восьми полученных эмбрионов все были классифицированы как условно-годные.

При анализе микробиологического состава элюированной жидкости у телок было выявлено, что микрофлора представлена *E. coli* в 60,00 % случаев, и кокковыми формами – в 40,00 %. При этом необходимо отметить, что все микроорганизмы наблюдались в монокультуре. При обна-

ружении *E. coli* лишь в половине случаев эмбрионы были классифицированы как условно-годные и удовлетворительные, а в остальных случаях имели разную оценку, от отличного, так и до условно-годного, что говорит об занесении *E. coli* во время процедуры вымывания, и лишь в половине случаев о наличии данного микроорганизма в полости матки.

S. aureus наблюдали у двух (20,00 %) животных, и в обоих случаях из 22 эмбрионов все находились в группе условно-годных. Кроме *S. aureus*, мы также обнаруживали *Streptococcus sp.* в 20 % проб с тем же результатом по качеству эмбрионов. Таким образом, в процессе исследования выявлено, что у доноров, в образцах элюированной жидкости которых была выявлена патогенная микрофлора, наблюдалось низкое количество качественных эмбрионов, извлеченных из репродуктивных органов. Необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на определение воздействия

патогенной микрофлоры на развитие и жизнеспособность эмбрионов при использовании технологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота.

Литература

1. Бригида, А.В. Факторы, влияющие на реакционный ответ яйчинок коров-доноров эмбрионов при введении экзогенных гонадотропинов (ОБЗОР)/ А.В. Бригида, С.А. Бурсаков, О.А. Скачкова, В.И. Сорокин, С.Н. Ковальчук// Достижения науки и техники АПК, 2018. - Т36. №6. - С 56-63.

2. Ковальчук, С.Н. Усовершенствование технологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота в ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий"/ С.Н. Ковальчук, О.А. Скачкова, А.В. Бригида// Ветеринария и кормление, 2018. - №2. - С. - 51-54.

3. Попов, Д.В. Сравнительная характеристика эмбриосборов, полученных от коров-доноров при различных методах индукции суперовуляции /Д.В. Попов, А.В. Бригида, С.Ф. Назимкина, Г.Ю. Косовский // Ветеринария и кормление, 2016. -№6. - С. 20-23.

4. Bekele, T. Bovine Embryo Transfer and Its Application: Anreview. / T. Bekele, E. Mekuriaw, B. Walelegn.// Journal of Health, Medicine and Nursing, 2016. - Vol. 26. - P. 48-60.

References

1. Brigida, A.V. Faktory, vliyayushchie na reakcionnyy otvet yaichnikov korov-donorov embrionov pri vvedenii ekzogennyh gonadotropinov (OBZOR)/ A.V. Brigida, S.A. Bursakov, O.A. Skachkova, V.I. Sorokin, S.N. Koval'chuk// Dostizheniya nauki i tekhniki APK, 2018. - T36. №6. - S 56-63.

2.Koval'chuk, S.N. Usovershenstvovanie tekhnologii transplantacii embrionov krupnogo rogatogo skota v FGBNU "Centr eksperimental'noj embriologii i reproduktivnyh biotekhnologii"/ S.N. Koval'chuk, O.A. Skachkova, A.V. Brigida// Veterinariya i kormlenie, 2018. - №2. - S. - 51-54.

3. Popov, D.V. Sravnitel'naya harakteristika embrioborov, poluchennyh ot korov-donorov pri razlichnyh metodah indukcii superovulyacii /D.V. Popov, A.V. Brigida, S.F. Nazimkina, G.YU. Kosovskij // Veterinariya i kormlenie, 2016. -№6. - S. 20-23.

4. Bekele, T. Bovine Embryo Transfer and Its Application: Anreview. / T. Bekele, E. Mekuriaw, B. Walelegn.// Journal of Health, Medicine and Nursing, 2016. - Vol. 26. - P. 48-60.