**Содержание**

# Введение

# 1. Обзор литературы

# 1.1 Состояние и перспективы применения метода трансплантации эмбрионов

# 1.2 Чувствительность матки к инфекциям в разные периоды полового цикла

# 1.3 Предупреждение заноса инфекции в матку при извлечении и пересадке эмбрионов

# 1.4 Влияние микроорганизмов на спермии, яйцеклетки и эмбрионы

# 1.5 Влияние антибиотиков на спермии, яйцеклетки, эмбрионы

# 2. Собственные исследования

# 2.1 Цель и задачи

# 2.2 Материалы и методика исследований

# 2.2.1 Подготовка лаборатории, посуды и инструментов для манипулирования с эмбрионами

# 2.2.2 Подготовка доноров и реципиентов

# 2.2.3 Извлечение и подготовка эмбрионов к пересадке

# 2.2.4 Влияние микробного фактора на приживляемость эмбрионов

# 2.3 Анализ экономической деятельности предприятия

# 2.4 Характеристика предприятия

# 2.5 Результаты исследований

# 2.5.1 Разработка мер предупреждения микробной контаминации эмбрионов на технологических этапах их подготовки

# 2.5.2 Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий

# 2.6 Обсуждение результатов собственных исследований

# 3. Охрана труда

# 3.1 Организация охраны труда

# 3.2 Производственная санитария

# 3.3 Пожарная безопасность

# Выводы и предложения

# Выводы

# Предложения производству

# Список литературы

**Введение**

Современные темпы развития животноводства требуют совершенствования существующих методов селекционной работы с целью создания и ускоренного размножения высокопродуктивных животных (А.П. Студенцов и др. 2000). Более интенсивное использование репродуктивного потенциала ценных в племенном отношении женских особей возможно при трансплантации эмбрионов.

Одним из главных условий успешного применения метода трансплантации эмбрионов в животноводстве является асептичность проводимых операций (A. Brand et al., 1978; H. Kupferschmid; 1984 E. Singh, 1985; А. Овчинников, 1985; Ф.И. Осташко и соавт., 1986).

В технологии трансплантации эмбрионов важное место отводится разработке методов, предупреждающих возможность контаминации их патогенной микрофлорой, которые обеспечивают получение здоровых телят и профилактируют появление гинекологических болезней, в частности, эндометритов как у коров – доноров, так и у реципиентов.

При манипулировании с эмбрионами вне организма нельзя допускать их инфицирования и переноса микроорганизмов в матку реципиента (M. Tibier, 1985; I. Atwell, 1987). Бактериальному загрязнению эмбрионы подвергнуты и при их оценке. Многие авторы утверждают, что как яйцеклетка, так и эмбрион с интактной зоной пеллюцида надежно защищены от микробного фактора, тем не менее, некоторые из них рекомендуют многократное отмывание эмбрионов в стерильных буферных средах или в средах с добавлением ферментов (R.A. Bowen et al., 1983; E. Singh et al., 1982; 1983; W. Hare et al., 1984). Именно поэтому руководством международного общества по пересадке эмбрионов (Manual of the international embryo transfer, 1986) предусмотрен санитарный контроль их качества.

В нашей стране и за рубежом ведутся интенсивные работы по разработке оптимальных способов трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. Продолжаются исследования по совершенствованию гигиенических и технических приемов получения и пересадки эмбрионов.

Анализ литературных данных показал целесообразность исследований по совершенствованию гигиенических приемов при трансплантации эмбрионов. Это продиктовано недостаточным количеством противоречивых данных о влиянии микроорганизмов на приживлямость эмбрионов. Существует мнение, что внесение инфекции в матку с пистолетом Кассу не является причиной яловости, если в остальном соблюдена асептика (A. Brand, 1976; A. Trounson, 1978). Однако, в качестве дополнительной предосторожности от возможности внесения влагалищной инфекции в матку реципиента кембриджские сотрудники покрывали наконечник пистолета пластиковым чехлом. Другие исследования А. Бранда показали, что даже в случае отрицательной бактериологической пробы инструмента после нехирургической трансплантации эмбрионов может произойти вирусное заражение в ходе ее осуществления (A. Brand, 1978). Оно может быть причиной последующих осложнений, в частности, эндометритов. А у коров-доноров, больных эндометритом, наблюдали частичную или полную дегенерацию эмбрионов на разных стадиях их развития, при значительном числе неоплодотворенных яйцеклеток (А.Д. Бугров и соавт., 1988). Поэтому стало необходимым более детально изучить вопросы бактериальной контаминации половых путей коров и телок при манипуляциях извлечения и пересадки эмбрионов, влияние ее на их приживляемость, с одной стороны, и найти эффективные антимикробные средства, с другой стороны.

Целью нашей работы была разработка методов профилактики и санитарного контроля технологических процессов при трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота.

Для достижения этой цели нами поставлены на разрешение следующие задачи:

1. Изучить бактериальную контаминацию половых путей телок-реципиентов в фолликулярную и лютеальную фазы полового цикла.

2. Изучить влияние антибактериальных препаратов на микрофлору половых путей после их санации непосредственно перед извлечением и пересадкой эмбрионов.

3. Провести сравнительную оценку антибактериальных препаратов для санации половых путей.

4. Испытать антибиотики для санации промывных буферных сред и отмывки эмбрионов.

5. Изучить влияние испытанных нами антибактериальных препаратов на жизнеспособность и приживляемость эмбрионов.

**1. Обзор литературы**

## 

## 1.1 Состояние и перспективы применения метода трансплантации эмбрионов

Трансплантация эмбрионов женским особям сравнима по возможностям с техникой искусственного осеменения, позволяющей полнее использовать генотип выдающихся самцов. Однако широкое внедрение этой перспективной технологии сдерживается несовершенством методов получения большого числа зрелых, полноценных, способных к оплодотворению ооцитов (Y. Koinig., 1980), а также сравнительно высокой трудоемкостью и стоимостью работ (В.В. Мадисон, В.Л. Мадисон, 1988).

В странах СНГ работы по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота начаты в 1975 г. Первые телята были получены в начале 1977 г. (М.И. Прокофьев и соавт., 1977) во Всесоюзном НИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных, а первый теленок от пересадки замороженного эмбриона во Всесоюзном институте животноводства в 1980 г. С 1983 года организованы четыре центра трансплантации эмбрионов: ВИЖ, ВНИИРГЖ, НИИЖ Лесостепи и Полесья. УССР, Украинский НИИ разведения и искусственного, осеменения крупного рогатого скота (Н.З. Жильцов, В.В. Мадисон и соавт., 1986). Мировая практика пересадки эмбрионов успешно развивается. Применение метода трансплантации эмбрионов непрерывно растет. При этом технология технически совершенствуется, а эффективность метода возрастает (Ф.И. Осташко, 1995; Т.И. Шкиль, 1995; Ф.С. Мауссе, 1999; М.Л. Дибиров, 2000).

В настоящее время наиболее эффективен нехирургический метод трансплантации эмбрионов. В среднем на современном уровне биотехнологи получают с применением пересадки эмбрионов около 10 телят, а в отдельных случаях до 50 телят от одного донора в год, тогда как при обычном способе размножения (искусственном осеменении) корова за всю жизнь могла бы воспроизвести 7–8 телят. Поэтому идея получения максимального числа потомков от лучших по продуктивности самок издавна привлекала внимание исследователей. Решение этой проблемы стало возможным на основе применения метода трансплантации эмбрионов (Ю.Д. Клинский, 1978, 1980; Н.И. Сергеев, 1979,1984; М.И. Прокофьев, 1983).

В последние годы в ряде стран изучают вопрос о возможности переноса заразных болезней путем эмбриональной пересадки реципиентам от коров-доноров. Ряд зарубежных авторов считают, что методом трансплантации эмбрионов можно успешно вести борьбу со многими инфекционными болезнями. По некоторым опубликованным данным отдельные инфекции, например, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, блутанг, лейкемия крупного рогатого скота реципиентам с трансплантируемым зародышем от больного донора не передаются (R.A. Bowen et al., 1983; Е. Singh et al., 1983; Z. Pokorny et al., 1983; L. Elizabeth, 1984).

По данным французских исследователей, вирус лейкоза крупного рогатого скота и вирус катаральной лихорадки при эмбриотрансплантации не передаются через эмбрионы с интактной зоной пеллюцида, если их до пересадки промыть раствором трипсина (W.C. Наге, 1984).

Несмотря на достигнутые успехи в разработке приемов вызывания множественной овуляции у коров и телок-доноров эмбрионов, технике извлечения и пересадке зародышей, выход полноценных эмбрионов и их приживляемость не стабильна.

Многие вопросы теории и практики требуют дальнейшего изучения и совершенствования.

Проблемными остаются вопросы предупреждения заноса инфекции в матку при извлечении и пересадке эмбрионов.

## 3.2 Чувствительность матки к инфекциям в разные периоды полового цикла

Здоровый организм млекопитающих имеет целую систему защитных приспособлений, поэтому деятельность микроорганизмов-сапрофитов ограничивается и не является болезнетворной. В норме эта микрофлора отсутствует в глубоких отделах полового тракта самки, сообщающегося с брюшной полостью (В.П. Буркат, Г.Г. Харута та ін. 1995; Н.А. Мартыненко, 1971; Е.В. Козловский, П.А. Емельяненко, 1982), хотя во влагалище, помимо постоянно заселяющих его молочнокислых палочек, находят различные виды кокков и другие бактерии. Многочисленными исследованиями установлено, что в половых путях коров с нормальной и нарушенной воспроизводительной функцией часто присутствуют штаммы условно-патогенной микрофлоры: E.coli, Klebsiella, Serritia, Proteus, Pseudomonas (Е.М. Махиня, 1958; D.S. Sambijal et al., 1986; Д.А. Сайкиа и соавт., 1987), но у большинства животных во время течки и охоты микрофлора погибает и смывы, полученные со слизистой оболочки влагалища коров, свободны от микроорганизмов (А.А. Осетров и соавт., 1966). С другой стороны, условнопатогенная микрофлора часто попадает в половые пути самок со спермой производителей, используемой при искусственном осеменении (С.Л. Семенов, 1955; О.И. Пантюхова, 1961; В.А. Яблонский, 1963; Ф.М. Касумов, 1963; Д.Д. Логвинов, 1968).

Многие ученые занимались изучением микробной загрязненности спермы производителей (Качмар О.М.; Авдосьева I.К.; Урус Р.В.), применяемой для искусственного осеменения самок, на их репродуктивную функцию. Большинство из них признают отрицательное действие микробов, попадающих в половые пути коров и телок при искусственном осеменении, на их воспроизводительную деятельность. В.К. Милованов (1964) утверждает, что причиной эмбриональной смертности является неспецифическая микрофлора, попадающая в матку со спермой. Д.Д. Логвинов (1972) считает, что прямой причиной снижения качества и оплодотворяющей способности спермы, частых абортов, массовых задержаний последа, эндометритов, бесплодия, эмбриональной смертности и понижения жизнеспособности новорожденных является обильное микробное загрязнение спермы производителей, применяемой для искусственного осеменения самок. Д. Логвинов, В. Плугатырев, В. Кошевой (1972) в 47,9% случаев выделили различные бактерии из околоплодных вод искусственно осемененных коров и в 6% случаев выделили различные бактерии из околоплодных вод естественно осемененных нетелей.

Бактериологический метод выделения кампилобактерий из спермы производителей трудоемок, длителен и неэффективен из-за частой контаминации спермы посторонней микрофлорой. Отсутствие антител в сперме животных не всегда позволяет сделать заключение о том, что сперма свободна от возбудителей кампилобактериоза (Родина В.Н., Бондаренко В.З.; Козло В.Н.; Скляров О.Д.; Советкин С.В.).

Другие авторы отмечают отсутствие отрицательного влияния естественной контаминации половых путей условно патогенной микрофлорой на воспроизводительную функцию коров и связывают это с тем, что:

1. Число микробных тел этих бактерий, попадающих вместе со спермой в матку невелико, оно колеблется от 0 до 10 млн./мл (Б.Д. Кондратов и соавт., 1976).

2. В процессе эволюции у животных сложились мощные иммунные барьеры, препятствующие инфицированию половых путей микрофлорой.

Основными факторами, обеспечивающими защиту половых путей коров и телок от условно патогенной микрофлоры, являются: а) Барьерные функции слизистых оболочек. Так, слизистая оболочка шейки матки функционирует как железа, выделяющая цервикальную слизь, содержащую муцины, обладающие биологически важными свойствами: абсорбции, бактерицидности, бактериостатичности (Н.А. Мартыненко, 1971; А.И. Варганов, 1979; В.П. Полищук, 1984; В.С. Шипилов, 1988). Р. Рафаван и соавт. установили, что во время течки отмечается сдвиг РН в кислую сторону, что в значительной степени предотвращает проникновение в полость матки через раскрытую шейку матки различных микробов (R. Raghavan et al., 1971, І.Г. Мороз та ін., 2000). Количество шеечного секрета у небеременных коров незначительное, но во время беременности обнаруживается большое скопление его в устье шейки матки в виде слизистой пробки, во время охоты слизь маловязкая, прозрачная и выделяется в большом количестве (В.С. Шипилов и соавт., 1987; 1988).

б) Активная деятельность поли- и мононуклеарных фагоцитов (И.И. Соколовская, 1973; С.Д. Ватсон, 1985).

в) Наличие системы естественных опсонинов и иммуноглобулинов (И.И. Соколовская, 1973; О.Д. Ватсон, 1985).

В период течки под воздействием эстрогенов происходит активация как специфических, так и неспецифических факторов резистентности (В. Вэйнштейн, 1984; С. Ватсон, 1987; С.С. Волков, 1999). При угнетении иммунной реактивности самок микрофлора способна вызвать нарушение пренатального развития зародышей (Н.Н. Михайлов, 1972).

Кроме того, при естественном осеменении коров спермии попадают в каудальный отдел шейки матки (А.Г. Нежданов, П.М. Торгун, 1993). Небольшая их часть (около 0,5%), преодолевая барьер из слизистого секрета, проникает в краниальный отдел цервикального канала, откуда быстро транспортируется к верхушкам рогов матки за счет антиперистальтической моторики полового тракта. Описанный механизм способствует продвижению спермиев по половым путям, одновременно препятствуя проникновению микробов (Ф.И. Осташко и соавт., 1972, 1977). При искусственном осеменении сперма впрыскивается в краниальную часть шейки матки или непосредственно в матку, минуя биологический барьер из цервикального секрета. Если при этом сперма содержит микробы, то создаются условия для быстрого обсеменения ими эндометрия, а, возможно, и полости яйцевода. По мере увеличения степени микробной контаминации спермы процент плодотворных осеменений уменьшается (В.К. Милованов, 1940, E.L. Willet, 1951; П.А. Волосков, 1965; Ф.И. Осташко, 1977).

Если в период течки, матка коровы устойчива к микробному фактору, то в лютеальную фазу полового цикла матка коровы чувствительна к нему. Это доказали Л. Роусон с сотрудниками (L.E. Rowson et al., 1953). Они одну группу коров осеменяли в лютеальную фазу цикла, другую – в эстральную, затем проводили бактериальную проверку спермы и смывов с шейки матки. Из 11 коров, осемененных в лютеальную фазу цикла, у 8 был пиометрит, у одной – стерильный метрит, у одной, осемененной в первый день после охоты, метрита не было, и еще у одной, осемененной на третий день после охоты, была пиометра. В сперме были обнаружены стафилококки в небольшом количестве. У других 6 коров, осемененных во время охоты, метриты не наблюдались, несмотря на то, что используемая сперма содержала C. Pyogenes.

А.В. Квасницкий (1988) в своей книге цитирует результаты эксперимента У. Такнасни, где было показано, что введение осеменительного инструмента в матку эстральной коровы не влияет на ее плодовитость, но аналогичная манипуляция в лютеальной фазе цикла снижает стельность реципиента до 33%, а при введении инструмента в защитном футляре в момент прохождения влагалища, результативность увеличивается до 59% (Y. Taknasni, 1981).

М. Кришна и соавторы провели исследования 106 коров, у которых брали пробы слизи из шейки матки в период половой охоты, от 86 были выделены различные бактерии. Другие авторы отмечают, что даже искусственно введенная в половые пути самок сельскохозяйственных животных условно патогенная микрофлора лизируется в течение нескольких суток (M. Krishna et al., 1974, цитата по книге Н. Михайлова, 1976).

С.А. Фолькель и соавт. внутриматочно вводили Вг.abortus. Смывы из матки и полученные эмбрионы при исследовании оказались свободными от вводимого штамма Вг. abortus. У одного животного, не проявившего охоту после суперовуляции в смыве из матки, обнаружили вводимый штамм Вг. Abortus (Voelkel S.A., et al., 1983).

У 16 искусственно зараженных бруцеллезом коров в университете штата Луизиана Вг. abortus отсутствовала в промывной жидкости и гомогенизированных эмбрионах (R. Bowen et al., 1983; Е. Singh et al., 1983). Таким образом, было подтверждено, что здоровая небеременная матка циклирующих коров подавляет размножение микроорганизмов.

П. Шпалюнг сообщает, что присутствие Вг. abortus в небеременных матках носит переходной характер и связано с бактеремической фазой. Она ограничивается или отсутствует из-за воздействия эструса (P. Sparling, 1986).

Пейн И.М. и соавт. получили Вг. abortus шт. 544 в небольших количествах из шейки матки 6/6 зараженных небеременных телок в течение 4 мес. после заражения. Это противоречит тезису о том, что микроорганизмы быстро выходят из небеременной матки животных с нормальным эстральным циклом (I. Payne et al., 1960).

Однако, в определенных условиях резистентность организма значительно ослабевает и нормальный количественный и качественный состав микрофлоры изменяется, а деятельность ее активизируется. Нарушение целостности защитных покровов кожи и слизистых оболочек также приводит к активизации деятельности сапрофитов, которые проникнув в глубь организма, вызывают развитие в нем болезнетворного процесса (Н.А. Мартыненко, 1971; Г.В. Зверева и соавт., 1987).

С другой стороны, у некоторых видов животных существует определенная зависимость чувствительности к маточным инфекциям от уровня стероидных гормонов крови. В частности, доказано, что матка коровы и кролика легко инфицируется в лютеальной фазе цикла и устойчива к заражению в эстральный период (Е. Виллет и соавт., 1951; В. Блэк и соавт., 1953; Л. Роусон и соавт., 1953; А.В. Квасницкий и соавт., 1988; Л.К. Эрнст и соавт., 1989). Своими опытами Блэк, Саймен и соавт. (1953) цит. по кн. Н.А. Мартыненко, 1971; James W. (1971), подтвердили наличие в эстральной матке высокоэффективного защитного механизма против инфекции. Они установили, что прогестерон способствует развитию инфекции, а эстрогены повышают резистентность матки к инфекциям.

Исследования Хока с сотрудниками (H. Hawk et al., 1959) показали, что в защитном механизме матки против инфекции тормозящее действие прогестерона играет большую роль, нежели стимулирующее действие эстрогенов.

Результаты обследования 19 коров-доноров Львовского центра трансплантации эмбрионов показали, что у всех коров-доноров на 7-ой день после оплодотворения в матке присутствуют живые микроорганизмы, которые заносятся в полость матки во время осеменения. В матке присутствуют ассоциации микроорганизмов 3–6 видов: протей, кишечная палочка, стрептококки, стафилококки, диплококки, синегнойная палочка.

Процесс вымывания эмбрионов, как всякое механическое раздражение, способствует размножению микроорганизмов и при этом создаются условия для развития в половых органах инфекционного воспалительного процесса. После проведения нескольких вымываний эмбрионов у коров-доноров развивается эндометрит (В.И. Завирюха, С.П. Хомин, С.Г. Шаловило, А.А. Гамота, 1987). Известно, что матка коровы в лютеальную фазу полового цикла очень чувствительна к инфекции и внешним раздражителям. При неосторожном введении инструментов во время пересадки возникают травмы, сопровождающиеся воспалительными процессами слизистой оболочки шейки матки и эндометрия (Л.К. Эрнст, Н.И. Сергеев, 1989).

Литературные данные свидетельствуют о том, что матка коровы чувствительна к микробному фактору в лютеальную фазу и устойчива к нему в эстральную фазу. Извлечение и пересадка эмбрионов осуществляются в лютеальную фазу, поэтому на всех этапах трансплантации эмбрионов необходимо соблюдение правил асептики и осуществление профилактических мероприятий.

## 3.3 Предупреждение заноса инфекции в матку при извлечении и пересадке эмбрионов

В настоящее время во многих странах ведутся интенсивные работы по разработке оптимальных способов получения и пересадке эмбрионов крупного рогатого скота. Основной задачей этих исследований является повышение приживляемости эмбрионов, которая зависит от многих факторов. Одним из главных условий успешного применения метода трансплантации в животноводстве является асептичность всех проводимых операций. Необходимо точно соблюдать санитарные правила при манипулировании с эмбрионами вне организма, чтобы не допустить их инфицирования и переноса инфекции реципиентам при эмбриотрансплантации (H. Kupferschmid, 1984; E. Singh et al.,1985; А. Овчинников, 1985; Ф. Осташко, 1986; М. Тибье, 1986).Известно, что матка коровы легко инфицируется в лютеальной фазе полового цикла и устойчива к заражению в эстральный период (Л. Роусон, 1953; А.В. Квасницкий, 1988; Л.К. Эрнст, Н.И. Сергеев, 1989).

Поскольку нехирургическая пересадка эмбрионов у крупного рогатого скота осуществляется в период диэструса, когда резистентность матки резко понижена к микробному фактору, то даже при отрицательной бактериологической оценке инструментов вирусный контакт не исключается.

Субклиническая инфекция у реципиентов после нехирургической пересадки приводит к частым абортам (А.В. Овчинников, 1985).

Манипуляция вымывания эмбрионов и подготовка их к пересадке, как было сказано выше, требует тщательных асептических условий. Но даже. при соблюдении их, возможность попадания различной микрофлоры в матку не исключена (Ф.И. Осташко и соавт., 1986; А. Гордон, 1988; А.И. Сергиенко и соавт., 1988).

Одной из причин низкой результативности нехирургических пересадок, очевидно, является чувствительность матки к инфекции в лютеальную фазу (Н.И. Сергеев, В.И. Горбунов, 1979).

Для предотвращения возможного заноса микрофлоры в полость матки применялись различные устройства. И. Перрин и соавт. использовали приспособление, позволяющее в условиях ферм производить цервикальную трансплантацию не соприкасаясь со средой слизистой влагалища. При этом приживляемость эмбрионов повысилась на 21% (I. Perrin et al., 1982). А. Овчинников (1985) для зачехления инструмента при пересадке эмбрионов использовал специальную защитную оболочку из парафинированной стерильной бумаги.

В качестве дополнительной предосторожности от возможной влагалищной инфекции у реципиента сотрудники Кембриджского института покрывали наконечник пистолета Кассу пластиковым чехлом (A. Brand et al., 1978).Большинство практиков в странах СНГ катетер для пересадки эмбрионов покрывают защитной полиэтиленовой оболочкой, которая предназначена для предупреждения контаминации прибора микрофлорой при введении его во влагалище до наружного отверстия шейки матки (В.С. Шипилов и соавт., 1988).

Ф.И. Осташко и соавт. (1986) для асептического получения эмбрионов сельскохозяйственных животных, их поиска, оценки и хранения создали специальное устройство.

Сыворотка и другие компоненты среды, используемые для сбора, отмывания и культивирования эмбрионов могут быть специальными источниками инфекции, поэтому качество их приготовления должно систематически контролироваться. Кроме того, после извлечения эмбрионов из матки инфицированных и неинфицированных коров-доноров в промывных средах многие исследователи обнаружили бактерии и вирусы (L. Archbald et al., 1981; A. Bouillant et al., 1981;F. Thovas et al., 1975; E. Singh et al., 1983; А.Д. Бугров, И.М. Величко, 1986; А.И. Сергиенко, 1987), что послужило основанием для санирования промывных буферных сред антимикробными препаратами (А.Д. Бугров и И.М. Величко, 1986). В.И. Завирюха, С.П. Хомин, А.А. Гамота, С.Г. Шаловило(1987) отметили, что после проведения нескольких вымываний у коров-доноров развивается гнойный эндометрит.

Другим важным моментом при трансплантации является подготовка эмбрионов к пересадке.

Ряд зарубежных авторов считают, что уязвимость эмбриона патогенами маловероятна из-за основной резистентности, которая обеспечивается зоной пеллюцида, и факторов вторичной резистентности таких, как ранний возраст, малые размеры и ограниченная подвижность, что уменьшает потенциальную возможность воздействия патогенов на эмбрион. То, что многие бактериальные и вирусные патогены, как было доказано, слишком велики, чтобы проникнуть сквозь прозрачную оболочку и что некоторые не выживают в питательной среде эмбриона, объясняет дальнейшее уменьшение возможности передачи инфицирующего агента во время пересадки эмбриона.

Зона пеллюцида (толщина 5–15 мкм) является эффективным барьером для микроорганизмов. Исследования показали, что это касается большинства микробов, вызывающих заболевания у крупного рогатого скота. При тщательном промывании эмбриона, с интактной прозрачной оболочкой, исчезали все признаки патогенных агентов (E. Singh et al., 1982; R.A. Bowen et al., 1983; D. Stringfellow et al., 1984; Z. Mallek et al., 1984; W. Hare et al., 1985).

Микробиологические исследования in vitro показали, что отмывка эмбрионов в нескольких стерильных средах снижает концентрацию вирусов и бактерий в среде до неопасного субинфекционного уровня уже после третьего разбавления. Технически отмывка эмбрионов выполняется путем последовательного переноса микропипеткой эмбриона с минимальным количеством жидкости (около 0.01 мл) из одной стерильной чашки с 1 мл среды в другую. Разбавление концентрации исходного раствора среды при этом таково, что уже в третьей чашке она превышает в 1000 раз, а в девятой чашке даже тонкий анализ не выявляет следов инфекции. Дополнительную гарантию полного блокирования случайной инфекции дает добавление антибиотика в стерильную среду. Эффективность такого способа подтверждена в опытах с использованием вирусов блутанга, акабаны, инфекционной диареи (E. Singh et al., 1982), бруцеллы абортус (D. String fellow et al., 1984).

В настоящее время известно, что только вирусы инфекционного ринотрахеита (E. Singh et al., 1982) и везикулярного стоматита (L. Laurman et al., 1985) взаимодействуют с оболочкой эмбриона и остаются на ней даже после многократных отмываний. Результаты исследований А.И. Сергиенко и соавт. (1988) показывают, что даже десятикратная промывка не обеспечивает освобождение эмбрионов от вируса ИРТ. Только обработка эмбрионов ферментами (трипсином) или антисывороткой эффективно удаляет вирусы с оболочки (E. Singh et al., 1983). В результате обработки эмбрионов ферментом растворяется верхний слой оболочки и полностью удаляются (инактивируются) налипшие на ней вирусные частицы.

С другой стороны, культивирование зародышей in vitro осуществляли при высокой концентрации микроорганизмов и вирусов в среде, которая в естественных условиях in vivo менее вероятна. После использования трипсина вирусы ринотрахеита и везикулярного стоматита на оболочке не обнаруживали. Повреждение оболочки или ее отсутствие приводило к инфицированию зародыша и его гибели при блутанге, ящуре, ринотрахеите.

Освободившаяся от прозрачной оболочки бластоциста представляет собой полый внутри шар, наружная стенка которого состоит из одного слоя питающих клеток (трофобласт), а внутри на одном из полюсов бластоцисты, располагается скопление собственно зародышевых клеток (эмбриобласт). В просвете матки бластоциста остается свободной и перемещается до 13–14 дня (K.M. Shelesnyak, 1960; C. Lutwak – Mann, 1959). В конце этого периода бластоциста прикрепляется трофобластом. к слизистой оболочки стенки матки имплантируется. В этот период отмечена высокая повреждаемость и смертность зародышей. Разного рода неблагоприятные факторы извне могут, не повреждая самого зародыша, нарушить ход становления его связи с материнским организмом. К числу таких факторов относится патогенная и условно патогенная микрофлора.

А.И. Сергиенко и соавт. (1988) обнаружили в среде Дюльбекко после вымывания эмбрионов 6 видов бактерий: St.albus, St.citreus, B.subtilis, E.coli, Pr.vulgaris, грибы.

Анализируя литературные данные Н.А. Мартыненко (1971) пишет, что обычно эмбриональная смертность на почве инфекции завершается изгнанием плода. В абортированном материале чаще всего обнаруживаются стрептококки и стафилококки. Проникнув в матку, они находят там подходящую для себя среду и быстро размножаются, вызывая некроз котиледонов и нарушая таким образом связь плода с маткой, кроме того они проникают в ткани плода и отравляют его своими токсинами или вызывают внутриутробную инфекцию (Д.Д. Логвинов, В.П. Плугатырев, Г.Г. Хатура, А.Г. Миллер, 1988).

Установлено, что матка коровы наиболее чувствительна к инфекциям в лютеальную фазу полового цикла, вначале которой трансплантируются эмбрионы. Большинство авторов отмечают, что при нехирургической трансплантации катетер проходя через влагалище в шейку матки, неизбежно захватывает огромное количество микробов. Проблема микробной деконтаминации решается за счет антибиотиков или же надежной асептики. Последнее обеспечивается помещением трансплантационного инструмента в защитный чехол для проведения его через влагалище.

В литературе имеется достаточное количество сведений о наличии микрофлоры в матке коровы в разные периоды полового цикла и влияние ее в период беременности на материнский организм и зародыш. Однако, остается неясным вопрос о микробной контаминации отдельных участков половых путей на 7–8 день полового цикла, т.е. оптимального времени трансплантации эмбрионов. А также не разработаны методы профилактики и санитарного контроля на всех этапах извлечения и пересадки эмбрионов.

## 3.4 Влияние микроорганизмов на спермии, яйцеклетки и эмбрионы

Многочисленные исследования были проведены учеными по определению влияния микроорганизмов на различные биологические объекты такие, как спермии, яйцеклетки и эмбрионы.

Несмотря на противоречивость данных о влиянии микроорганизмов на переживаемость спермиев (Беликов А.А.), большинство исследователей придерживаются мнения, что микрофлора губительно действует на них, снижая переживаемость спермиев, их оплодотворяющую способность и даже на развитие плода (С.Л. Семенов, 1955; И. Пантюхова, 1962, В.А. Яблонский, 1963; Г.В. Зверева, 1963, 1968, 1974; Н.Г. Балашов, 1965; J. Krolinski, 1977). Часто из спермы быков выделяли большое количество микробов. Д. Голубева (1965) выделила 16 видов микроорганизмов, М. Касумов (1963) – 16 видов, Е.П. Кремнев, А. Банакова(1974) – 23 вида, Т.Е. Яковлев(1968) -27 видов, Д.Е. Дорожилов и соавт. (1974) – 32 вида микробов и 13 видов плесени. При идентификации микроорганизмов, выделенных из спермы быков, установили их видовую принадлежность. Это были чаще всего E.coli, Ps. aeruginosa, Bac. subtilis, Proteus vulgaris и различные кокковые формы (А. Железнов, 1966; Н.Г. Балашов, 1989).

Об отсутствии отрицательных действий бактерий, в том числе и синегнойной палочки, на жизнеспособность спермиев сообщено в публикациях авторов (Edmonson et al., 1949; E. Hakkesteedt, 1949; W.P. Scheser, 1951; Baier et al., 1971).

Одни исследователи утверждают, что микробы, находящиеся в сперме, располагаются около спермиев или оседают на них в один или 2–3 ряда. В местах оседания микробов оболочка спермиев как бы вдавливается, прогибается, а при длительном контакте ферменты бактерий вызывают распад спермия, а затем его гибель (Г.В. Зверева, 1963). В литературе есть данные по отрицательному влиянию микробов на яйцеклетки. П.А. Волосков и соавт. (1971) сообщили, что микробы, абсорбированные спермиями, могут проникнуть и в яйцеклетку. Дальнейшая судьба инфицированного эмбриона зависит от вида и количества микробов и бактерицидных свойств жидкости бластоцисты.

Другие исследователи отрицают негативное влияние микробов на яйцеклетки. В 184 опытах Б.П. Токина, А.Г. Филатова (1953), в которых яйцеклетки кролика помещались в зараженную среду, показали высокую бактерицидность. Они утверждают, что бактерицидные свойства яйцеклетки сохраняются ею и после оплодотворения (Б.П. Токин и соавт., 1956). Однако, следует отметить, что в вышеописанных опытах Б.П. Токина и А.Г. Филатова в качестве среды служила капля физиологического раствора, зараженного одним из следующих видов микробов: Microkoccus lysodeicticus, Bact. megatherium, Bact. speciens и соавт. Во всех случаях вокруг яйцеклетки наблюдалось значительное угнетение роста и размножения бактерий (Цитата по книге Н.А. Мартыненко, 1971).

Однако следует отметить, что в опытах Б.П. Токина и А.Г. Филатова с яйцеклетками и бластоцистами самой устойчивой оказалась культура золотистого стафилококка. Действие специфической половой инфекции ими не испытывалось.

Насколько можно судить по результатам эксперимента Р. Гваткина (R. Gwatkin, 1967) перед вирусной инфекцией яйцеклетка беззащитна. Проникновение вирусов обычно происходит через и каналы прозрачной оболочки. Вирус Mengoencephalitis обнаруживали в перевителиновом пространстве мышиной морулы уже через 10 минут после помещения ее в среду, содержащую вирусы. Поражалось от 93 до 100% морул.

С начала 80-х годов стали поступать новые научные данные о надежной барьерной функции неповрежденной зоны пеллюцида, окружающей эмбрион до 8–9 дня развития. До выхода из оболочки эмбрион не может быть инфицирован микробным или вирусным агентом, даже если донор был искусственно заражен возбудителем бруцеллеза, лейкоза, вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, везикулярного стоматита, ящура, блутанга и акабаны (W. Hare, 1986; С. Z1 Ecuger, 1986; H. Niemann, 1986; Е. Singh, 1987; M. Thibier, 1987).

Известно, что у крупного рогатого скота эмбрионы первые 13 дней свободно перемещается в просвете матки, а на 9–10 день она теряет зону пеллюцида. Влияние в это время какого-нибудь неблагоприятного фактора, например, микроорганизмов или вирусов, может привести к гибели зародыша (A.M. Scofield et al., 1974; Н.П. Чечеткина, П.П. Фукс и соавт., 1987). Эти авторы подвергали бактериологическому исследованию матки 39 свиней, убитых через 9 или 13 дней после случки. При этом у 22 свиноматок матка не была инфицирована, у 12 – инфицирована и у 4 – частично инфицирована. Авторы установили статистически значимое различие в количестве погибших яйцеклеток или эмбрионов в инфицированных и неинфицированных матках, и считают, что основной причиной гибели эмбрионов в ранний период супоросности является микробная загрязненность матки.

И. Сакала и соавт., И. Линн и соавт. установили, что введение в половые пути коров микробов, принадлежащих к группе коменсалов, населяющих обычно кишечник или кожный покров, приводит к нарушению полового цикла, патологическим явлениям и резкому снижению оплодотворения животных (I. Sakala et al., 1961; I.E. Lynn et al., 1966).

Несмотря на противоречивость литературных данных, большинство авторов склонны к тому, что микроорганизмы отрицательно влияют не только на переживаемость и оплодотворяющую способность спермиев, оплодотворение яйцеклетки, но и на выживаемость эмбрионов.

Если для искусственного осеменения крупного рогатого скота приняты санитарные нормы для неразбавленной спермы быков, которыми допускается содержание не более 5 тыс. непатогенных микробов в 1 куб. см (Н.Г. Балашов, 1989), то при трансплантации эмбрионов этот фактор не учитывается, хотя предусмотрен санитарный контроль их качества.

В связи с этим перед нами возникла необходимость проведения исследований по влиянию количества и качества микроорганизмов на жизнеспособность и приживляемость эмбрионов у крупного рогатого скота.

## 3.5 Влияние антибиотиков на спермии, яйцеклетки, эмбрионы

Многие исследователи установили, что одной из причин снижения биологического качества спермы, возникновения гинекологических заболеваний, абортов и бесплодия самок может быть контамированная сперма (Г.В. Зверева, 1971; В.С. Шипилов, 1977; Н.Г. Балашов, 1980; Ф.И. Осташко, 1977; С.И. Сердюк, 1979). Поэтому учеными были проведены многочисленные исследования по санированию спермы. В качестве санирующих средств испытали такие антимикробные препараты, как антибиотики и сульфаниламиды. Механизм действия большинства антимикробных средств был известен, при этом необходимо было подобрать вещества с избирательным действием на микроорганизмы так, чтобы они не оказывали токсичного действия на биологические объекты: спермии, I яйцеклетки, эмбрионы и т.д. (Н.Г. Балашов, 1980,1981).

Многие исследователи доказали эффективность большинства антибиотиков и сульфаниламидов при использовании их для санации спермы (R.H. Foote et al., 1948; N. Yoshida et al., 1951; И.И. Соколовская и соавт., 1956). А также установили, что не все антибиотики можно использовать для деконтаминации спермы из-за их токсичности, устойчивости разных видов микробов к ним (И.И. Соколовская, 1960; А.П. Волосевич, 1963; С.И. Сердюк и соавт., 1970).

Примером является токсичность многих серий стрептомицина и резистентность микроорганизмов к пенициллину и стрептомицину. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на поиск комплексов антибиотиков широкого спектра действия и нетоксичных для спермиев (Косарев С.Р.).

С.Р. Косарев с сотрудниками (1984) испытали 15 антимикробных препаратов на их безвредность и влияние на микроорганизмы. Ими установлено, что лучшими из них являются комплекс пенициллин + канамицин по 250 тыс. Ед и гентамицина 150 тыс. Ед на 100 мл среды для разбавления спермы.

Т. Стоянов (1987) в своих опытах показал, что гентамицин, амоксициллин, канамицин и полимиксин сохраняют переживаемость сперматозоидов на том же уровне, что и контрольная среда без антибиотиков не убивает микробы, а лишь задерживает их рост и размножение, в дальнейшем они подавляются защитными силами макроорганизма (Д.К. Червяков, А.Н. Терезова, 1980).

П.А. Чахмахчев (1989) изучил эффективность применения полимиксина- М сульфата, спермосана-3 и спермосана-ППК в средах при разбавлении спермы быков и установил, что лучшим препаратом является спермосан-ППК.

В последние годы в ветеринарной практике широко используется антибиотик гентамицин, который обладает широким антимикробным спектром. Он действует бактерицидно, подавляя синтез белка, ингибируя процессы трансляции и активен по отношению к стафилококкам, эшерихиям и псевдомонадам (А.С. Новохатский и соавт., 1975; Д.Ф. Осидзе, 1981; С.М. Кузнецова, 1983; В.Ф. Ковалев и соавт., 1988).

Несмотря на неодобрение многих авторитетов, применение комплекса антибиотиков стало обычным делом в клинической практике. Наиболее хорошо известным примером синергизма между антибиотиками является взаимодействие пенициллинов саминогликозидами. Этот комплекс проявляет синергизм в отношении зеленящих стрептококков, энтерококков, золотистых стафилококков, листерий и грамотрицательных палочек (С.М. Кузнецова, 1983).

Механизм синергизма между пенициллинами и аминогликозидами не известен. Он может состоять в увеличении проникновения аминогликозидов в бактериальную клетку в присутствии пенициллина, который ингибирует синтез клеточной стенки, как это было предложено при объяснении действия комбинации пенициллин + аминогликозиды на энтерококки. Однако, независимо от возможного механизма имеющиеся данные показывают, что комбинированное лечение может значительно повысить эффективность антибиотикотерапии инфекций, вызванных Ps. aeruginosa (И.С. Чекман и соавт., 1986; В.Ф. Ковалев и соавт., 1988).

Санирующий эффект препарата зависит от дозы: чем больше доза препарата, тем отчетливее выявляется санирующий эффект. Однако увеличение дозы приводит не только к усилению действия препарата, но и к повышению его токсичности (Н.Г. Балашов, 1980).

А.С. Новохатский, С.С. Герасимова (1975) изучали цитотоксические свойства гентамицина. Они установили, что гентамицин в концентрации 10, 20 и даже 30 мкг/мл не вызывал нарушений целостности клеточного пласта после 24 часовой инкубации при температуре 37°С. Концентрация 50 мкг/мл и больше приводила к цитотоксическому изменению клеток. А.П. Простяков и С.П. Сергеева (1980) отметили высокую стабильность гентамицина в культуральной среде (6 дней период полураспада), а также цитотоксическую (3000 мкг/мл) и рекомендуемую концентрацию (200 мкг/мл).

В опытах Х.Г. Михаеляна (1988) в культуральной среде с концентрацией гентамицина 50 мкг/мл созревание ооцитов достигло 100%, из них 84% клеток созрело до стадии метофазы II, в контроле (без антибиотиков) до этой же стадии созревало только 70%.

Для подавления же большинства микроорганизмов достаточна концентрация гентамицина 4 мкг/мл (Д.Ф. Осидзе, В.Ф. Ковалев, К.С. Масловский, 1981).

В 1986 г. для санации вымывных буферных сред в лаборатории трансплантации А.Д. Бугровым, И.М. Величко и соавт. предложен и испытан комплекс антибиотиков гентамицин + пенициллин (ампициллин) в концентрациях 12 мкг/мл и 100 Ед/мл, соответственно. Эта комбинация дала хороший антимикробный эффект по отношению к микроорганизмам, встречающимся в половых путях доноров (E.coli, Staph. aureus, Bac.subtilis, Pseudomonas aeruginosa). По данным И.С. Чекмана (1986) гентамицин не совместим с антибиотиками из группы бензилпенициллин, совместим с изотоническим раствором хлористого натрия. При совместном применении гентамицина с ампициллинонатриевой солью, карбенициллином или линкомицином усиливается их антибактериальный эффект.

Т.А. Зацепилова и А.Н. Кудрин (1983) установили, что переход лекарственных веществ из жидкости матки через оболочку морулы и бластоцисты зависит от его молекулярной массы.

Многие авторы независимо друг от друга определяли влияние антибиотиков на яйцеклетку. Так, М.Ф. Карашаев (1987) установил отрицательное влияние комплекса антибиотиков пенициллин + стрептомицин (100 Ед/мл и 50 мкг/мл) на созревание ооцитов.

Таким образом, можно сделать вывод, что применением антибиотиков, как компонентов сред, можно контролировать развитие микрофлоры. Однако не все антибиотики, которые обладают широким спектром антимикробного действия, можно использовать для санации спермы, промывных буферных сред, эмбрионов. Лучшими комплексами антибиотиков для них являются аминогликозиды в сочетании с пенициллинами, примером которых, является гентамицин. Из пенициллинов в комбинации с гентамицином лучше всего сочетается ампициллин.

Анализ литературных данных показал, что несмотря на достигнутые успехи в эмбриотрансплантации, проблемными остаются вопросы по приживляемости эмбрионов. Известно много причин, влияющих на приживляемость эмбрионов, одной из которых является микробный фактор. Хотя многие известные ученые не учитывают влияние микрофлоры на жизнеспособность и приживляемость эмбрионов считая, что эмбрионы с интактной зоной пеллюцида надежно защищены от микробов и вирусов. Однако в литературе есть данные о том, что некоторые вирусы и прилипают к прозрачной оболочке и заносятся вместе с эмбрионом в матку реципиента, оказывая негативное влияние на него. Недостаточное количество противоречивых данных о влиянии микроорганизмов на приживляемость эмбрионов стало основанием для проведения исследований по данной проблеме.

С целью предупреждения заноса инфекции при трансплантации отечественными и зарубежными учеными разработаны различные технологии, приемлемые в хорошо оборудованных центрах трансплантации эмбрионов. В производственных условиях необходимы дополнительные меры профилактики микробной загрязненности. Известно, что лучшими антимикробными средствами являются антибиотики. Тем не менее, в доступной для нас литературе мало данных о влиянии антибиотиков на эмбрионы. Поэтому перед нами встала задача изучить влияние различных антибиотиков и их доз для профилактики микробной контаминации на всех этапах эмбриотрансплантации.

**2. Собственные исследования**

## 

## 2.1 Цель и задачи

Целью нашей работы была разработка методов профилактики и санитарного контроля технологических процессов при трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота.

Для достижения этой цели нами поставлены на разрешение следующие задачи:

1. Изучить бактериальную контаминацию половых путей телок-реципиентов в фолликулярную и лютеальную фазы полового цикла.

2. Изучить влияние антибактериальных препаратов на микрофлору половых путей после их санации непосредственно перед извлечением и пересадкой эмбрионов.

3. Провести сравнительную оценку антибактериальных препаратов для санации половых путей.

4. Испытать антибиотики для санации промывных буферных сред и отмывки эмбрионов.

5. Изучить влияние испытанных нами антибактериальных препаратов на жизнеспособность и приживляемость эмбрионов.

## 2.2 Материалы и методика исследований

Все исследования по данной работе проводились в лаборатории трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных Харьковского биотехнологического центра Украинской академии аграрных наук и на пункте трансплантации эмбрионов опытного хозяйства «Кутузовка». Работа выполнялась в период с июля 2000 года по август 2001 года.

Пункт трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, построенный по типовому проекту, имеет манеж для санитарной обработки животных перед операцией, операционную, поисковую и стерильный бокс для первичной обработки эмбрионов, помещение для замораживания и хранения эмбрионов, моечную и др. В манеже и операционной расположены специальные фиксационные станки. Операционная, поисковая и стерильный бокс оборудованы бактерицидными лампами. Пункт оснащен необходимым лабораторным, технологическим оборудованием и лабораторной посудой.

Предметом исследования были коровы и телки черно-пестрой породы и полученные от них эмбрионы.

В опытном хозяйстве «Кутузовка» беспривязная система содержания на глубокой несменяемой подстилке.

Кормление животных проводили по общепринятым нормам. Рационы были сбалансированы по общей питательности, белку, фосфору, кальцию и витаминным добавкам.

Животные регулярно подвергались ветеринарно-профилактическим и санитарным обработкам, клинико-гинекологическим обследованиям, постоянно находились под ветеринарно-зоотехническим наблюдением.

Исследования проводили на коровах-донорах и телках-реципиентах с нормальным состоянием половых органов и цикличностью воспроизводительной функции. Опытная группа состояла из коров в возрасте 3–8 лет, с живой массой 500–600 кг и телок в возрасте 16–18 месяца, с живой массой 350–380 кг. В контрольную группу отбирали коров и телок методом пар-аналогов. В экспериментах использовано 25 коров-доноров и 60 телок – реципиентов. Для вызывания суперовуляции применяли препараты ФСГ.

Животные обрабатывались по 4-х дневной схеме ФСГ‑п производства фирм «Schering Corp» или» Burns Biotec» США и ФСГ-супер (Россия) в общей дозе 50 мг (Табл. 1).

Таблица 1. Схема гормональной обработки коров-доноров препаратом ФСГ‑п (50 мг) производства США

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| День эстрального цикла | Название препарата | Доза (мг) | | Общая доза |
| утро | вечер |
| 10–12 | ФСГ‑п | 7 | 7 | 14 |
| 11–13 | ФСГ‑п | 6,5 | 6,5 | 13 |
| 12–14 | ФСГ‑п | 6 | 6 | 12 |
|  | Простогландин | 250 | 250 | 500 мкг |
| 13–15 | ФСГ‑п | 5,5 | 5,5 | 11 |
| 14–16 | Охота и осеменение |  |  |  |
| 21–23 | Нехирургическое извлечение эмбрионов |  |  |  |

Синхронизация полового цикла доноров и реципиентов осуществлялась инъекцией экстрофана.

Осеменение коров-доноров проводилось двукратно двойной дозой замороженно-оттаянной спермы с содержанием не менее 25 млн. активных спермиев (рис. 1). Из спермодозы готовили мазки для определения патологических форм спермиев. Мазки высушивали, фиксировали и окрашивали гематоксилином Караччи. Сперму, содержащую 18% и более патологических спермиев, выбраковывали, так как высокий процент патологических спермиев снижает оплодотворяющую способность спермы.



Рис. 1. Нормальные спермии быка



Рис. 2. Патологические формы спермиев



Рис. 3. Патологические формы спермиев



Рис. 4. Патологические формы спермиев

Для бактериологических исследований использовали мясо-пептонный агар (МПА) и мясо-пептонный бульон (МПБ), среду Китт-Тароцци, Сабуро и Булира, агар Эндо.

МПА и МПБ использовали для культивирования различных микроорганизмов неопределенного состава.

Для культивирования анаэробных микроорганизмов использовали среду Китт-Тароцци (МППБ).

Среду Булира и агар Эндо применяли для культивирования кишечной палочки.

Для выращивания грибов использовали среду Сабуро.

Все среды перед бактериологическим исследованием разливали в пробирки по 5 мл. Пробирки закрывали ватно-марлевыми пробками и стерилизовали автоклавированием при температуре 120°С в течение 15–30 минут. МПА после стерилизации скашивали, установив пробирки в наклонном положении до застывания среды.

Среду, предназначенную для культивирования бактерий на чашках разливали по 20–25 мл и оставляли на несколько минут до застывания агара. Когда требовалось вырастить микроорганизмы на агарезированной среде в виде изолированных колоний, чашки после засева помещали в термостат дном вверх.

Отбор проб для бактериологических исследований проводили на всех этапах подготовки эмбрионов к трансплантации.

### **2.2.1 Подготовка лаборатории, посуды и инструментов для манипулирования с эмбрионами**

В помещениях лаборатории, где подготавливали инструменты, оборудование, посуду, среды для получения, пересадки и криоконсервации эмбрионов, ежедневно проводили влажную уборку.

Все оборудование бокса, его стены, пол не реже одного раза в неделю мыли моющими средствами и протирали дезинфицирующими растворами. Для дезинфекции использовали 2%-й раствор хлорамина «Б». Перед работой бокс и другие помещения лаборатории облучали в течение 40–60 минут ультрафиолетовыми лучами из расчета 2–3 вт/м.

В боксе в день работы с эмбрионами проводили дополнительную обработку столов и оборудования 96° этанолом.

Все сотрудники лаборатории работали в стерильных халатах и сменной обуви. Спецодежду (халаты, косынки, шапочки, марлевые повязки) стирали не реже одного раза в неделю с обязательным кипячением и проглаживанием утюгом. Обувь регулярно по окончании работы мыли и обеззараживали 2%-м раствором хлорамина.

Употребляемые для работы с эмбрионами инструменты, посуду стерилизовали различными способами в зависимости от материала, из которого они изготовлены.

Стеклянную посуду (флаконы, колбы, пипетки, цилиндры и пр.), а также инструменты для пересадки эмбрионов закрывали пергаментной бумагой и стерилизовали автоклавированием при 1,5 атм. в течение 30 мин. Затем сушили при температуре 80°С в течение 60 минут.

Шприцы, иглы, пинцеты, ножницы, влагалищные зеркала и системы для вымывания эмбрионов стерилизовали кипячением в течение 30 минут.

Перед стерилизацией новую стеклянную посуду мыли водопроводной водой с мылом или порошком, с помощью щеток и ершей, ополаскивали и погружали в раствор соляной кислоты (1 ст. ложка соляной кислоты на 3 литра дистиллированной воды) и выдерживали в нем 24 часа. После чего посуду отмывали в проточной воде, а затем многократно в би- и тридистиллированной воде и высушивали.

Бывшую в употреблении стеклянную посуду мыли в горячем 2–3% растворе двууглекислой соды, затем тщательноополаскивали водопроводной водой, после чего би- и тридистиллированной водой и высушивали.

Бывшие в употреблении металлические предметы также мыли в вышеуказанном растворе соды, ополаскивали водопроводной, би- и тридистиллированной водой и высушивали.

Одноразовые полимерные инструменты (ампулы, чехлы, пипетки и др.) стерилизовали в боксе путем их облучения бактерицидными лампами БУФ‑30 или ПРК‑2 в течение 20 мин. с обеих сторон на расстоянии 20 см от источника облучения.

Резиновые инструменты (катетер для вымывания) обрабатывали 70°С спиртом-ректификатом. Наружную поверхность стерилизовали, облучая лампами БУФ‑30 в течение 20 мин. на расстоянии 20 см от источника ультрафиолетовых лучей, перед работой ополаскивали 2–3 раза средой Дюльбекко.

### 

### 4.2.2 Подготовка доноров и реципиентов

Подготовку донора начинали в манеже с чистки и мытья кожного покрова и конечностей. Затем животное переводили в операционную, фиксировали в станке, прямую кишку освобождали от содержимого. Для снятия напряжения прямой кишки проводили эпидуральную анестезию 2%-ым раствором новокаина в дозе 5 мл. По инструкции наружные половые органы и перенеальную область тщательно мыли водой с мылом, осушали салфеткой, дезинфицировали аэрозолем «Септонекс» или 70°-м этанолом. В опытах, корень хвоста, область промежности и наружные половые органы тщательно мыли теплой водой с мылом, осушали ватным тампоном. Кожу наружных половых органов и половые пути (преддверие влагалища, влагалище и влагалищную часть шейки матки) орошали раствором Люголя. Для этой цели хвост отводили в сторону вперед, фиксировали его при помощи веревки за переднюю перегородку станка. Во влагалище вводили подготовленное влагалищное зеркало. Через открытое зеркало орошали слизистые оболочки половых путей раствором Люголя. Через 15 минут после санации половых путей проводили извлечение эмбрионов.

Подготовку реципиентов к пересадке эмбрионов осуществляли также, как и подготовку доноров для нехирургического извлечения зародышей. Для предотвращения заноса микрофлоры в матку реципиента проводили санацию половых путей раствором Люголя за 15 мин. до пересадки эмбрионов.

Приготовление раствора Люголя.

Раствор Люголя готовили по следующей прописи:

кристаллический йод – 1,0 г

йодистый калий – 2,0 г

дистиллированная вода – 300,0 мл.

2,0 г йодистого калия растворяли в 100 мл воды, добавляли 1,0 г кристаллического йода и ставили на 10–12 часов в термостат до полного растворения йода. При этом йод растворяется в йодистом калии. Раствор переливали в большую мерную склянку и доводили общий объем до 300,0 мл. Затем его фильтровали и хранили во флаконах из темного стекла. Раствор использовали не более 30 дней.

### 4.2.3 Извлечение и подготовка эмбрионов к пересадке

Извлечение эмбрионов проводили на 7-8 день полового цикла нехирургическим методом. Перед операцией донора готовили по методике, описанной в разделе 1.2, затем эпидурально вводили 5–7 мл 2%-го новокаина в зависимости от веса животного. Беспокойным добавочно вводили 0,3–0,5 мл ромпуна. Ректально методом пальпации оценивали состояние полового аппарата, проводили подсчеты желтых тел и фолликулов. Для вымывания эмбрионов использовали катетеры различных конструкций. Промывная жидкость подавалась через закрытую систему самотеком из емкости, расположенной в верхнем гнезде штатива над донором. Промывание маточного рога проводили 8–10 раз, вводя по 60–50 мл промывной среды. На вымывание одного рога расходовали 450–500 мл модифицированной среды Дюльбекко с добавлением 1% инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота.

В научно-производственных опытах по санации промывных буферных сред добавляли комплекс антибиотиков гентамицин-ампициллин в концентрациях 12 мкг/мл и 100 Ед/мл, соответственно. Бактерицидную дозу санирующих препаратов испытывали на штаммах микроорганизмов, как монокультуре, так и в ассоциации, методом серийных разведении. Безвредность санирующих препаратов для эмбрионов определяли методом культивирования эмбрионов крупного рогатого скота в средах содержащих различные дозы испытуемых препаратов.

Эффективность применения санирующих препаратов учитывали по результатам приживляемости эмбрионов.

Смыв отстаивали 15–20 мин. при температуре 37°С в термостате. Надосадочную жидкость аспирировали с помощью сифона. Осадочную среду разливали в стерильные чашки Петри с расчерченным на полоски дном. Поиск зародышей производили под стереоскопическим микроскопом МБС-9.

Обнаруженные эмбрионы переносили стерильным микрошприцем на малую чашку Петри диаметром 40 мм. Жизнеспособность эмбрионов определяли по общепринятой методике оценки морфологического состояния эмбриона (В. Shea et al., 1976), учитывая их компактность, симметричность, плотность. (Инструкция по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, 1987).

В сравнительных опытах по многократному отмыванию эмбрионов использовали буферные среды, приготовленные за 10–15 мин. до начала поиска эмбрионов. Отмывная среда для эмбрионов состояла из стерильного буфера Дюльбекко с добавлением 15–20% инактивированной фетальной сыворотки, которую в стерильных условиях расфасовывали в полиэтиленовые ампулы по 2 мл. В другой емкости готовили такую же среду с добавлением комплекса антибиотиков гентамицин-ампициллин (12 мкг/мл и 100 Ед/мл). При отмывании использовали микрошприц и микропипетку для захвата эмбрионов с минимальным объемом среды. Устройство применяли с целью захвата, переноса и микробной деконтаминации эмбрионов.

Культивирование эмбрионов проводили при температуре 37,5°С без доступа кислорода в модифицированной среде Дюльбекко, содержащей 20% фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

В среду для культивирования подопытных эмбрионов вносили комплекс антибиотиков гентамицин-ампициллин (12 мкг/мл и 100 Ед/мл), в первом контроле использовали пенициллин (100 Ед/мл) и стрептомицин (50 Ед/мл), во втором контроле для культивирования эмбрионов использовали среду без антибиотиков.

Эмбрионы в средах с антибиотиками выдерживали 2 часа. Затем меняли среду и культивировали 72 часа. Морфологическое состояние эмбрионов оценивали через 2, 24, 48 и 72 часа.

### 4.2.4 Влияние микробного фактора на приживляемость эмбрионов

При проведении опытов по определению влияния микробного фактора на приживляемость эмбрионов использовали чистые культуры микроорганизмов, ранее выделенные из половых путей коров-доноров и телок-реципиентов. Инокуляцию отмытых и подготовленных к пересадке эмбрионов проводили чистыми суточными культурами. Чистые культуры Stapha и Ecoli выделяли методом Коха. Принцип метода заключается в получении чистой культуры из колонии, рост которой считали результатом развития одной клетки.

Для выделения чистой культуры производили высев на поверхность агаровой среды из накопительной культуры (с ее разведения). Разведение делали с таким расчетом, чтобы получить на поверхности агаровой среды изолированные колонии. Для посева на поверхность плотной агаровой среды наносили каплю этой культуры, которую осторожно распределяли по всей поверхности стерильным шпателем с последующим переносом ее на поверхность агара последовательно во вторую, третью и четвертую чашки. В первых двух чашках после инкубации при температуре 37°С для Staph. aureus и 43 «С для E.coli наблюдали «сплошной» рост микроорганизмов, тогда как в последующих чашках отмечали рост изолированных колоний. Одну из колоний отбирали стерильной петлей и производили высевы в пробирки с МПБ и на поверхность скошенного агара. Идентификацию E.coli проводили путем высева на среду Булира и Эндо, a Staph. aureus на МПБ и МПА с добавлением 1% глюкозы.

Чистые культуры Staphaureus и Е. coli в разведении 1:10 контаминировали в среды с эмбрионами.

Для получения определенного количества микроорганизмов в 1 мл среды необходимо было получить суспензию этих культур и приготовить их разведение. Чаще всего для инокуляции используют чистые суточные культуры микроорганизмов в разведении 1:10 – 1:10. Для приготовления таких разведении, стерильный физиологический раствор разливали по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исходной суспензии, взятой стерильной пипеткой, переносили в первую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора – получали первое разведение 1:10. Затем этой же пипеткой брали 1 мл полученного разведения и переносили его во вторую пробирку. Получали второе разведение

Таким же образом готовили и последующие разведения.

В эксперименте по определению влияния микробного факторана приживляемость эмбрионов было взято две группы животных-аналогов по 20 голов в каждой. Телкам-реципиентам опытных групп пересаживали эмбрионы, инокулированные чистыми культурами микроорганизмов в вышеуказанных разведениях. 10 животным трансплантировали эмбрионы, инфицированные Staph. aureus, другим 10 – эмбрионы с внесенной культурой E.coli, 20 контрольным телкам пересаживали эмбрионы, отмытые в пяти чашках стерильными буферными средами, без добавления микроорганизмов.

В природе отмечено, что микроорганизмы в ассоциациях могут быть синергистами либо антагонистами. Поэтому нами проведены исследования по определению антагонизма микроорганизмов, выделенных из половых путей самок. В этих опытах применяли метод посева испытуемых микробов на чашках Петри с МПА радиальными штрихами к предварительно выращенным колониям предполагаемого антагониста по методике В.В. Аврех и А.Ф. Зак, описанной в справочнике И.О. Биргера (1973).

В экспериментах по определению бактериальной загрязненности половых путей доноров и реципиентов нами выделено в основном 4 вида бактерий: Bac.subtilis, E.coli, Staph.aureus и Ps.aeruginosa. Перечисленные виды микроорганизмов относятся к группе возбудителей специфических половых инфекций. Известно, что в определенных условиях резистентность организма значительно ослабевает и нормальный количественный и качественный состав микрофлоры изменяется или активизируется деятельность имеющихся микроорганизмов.

Попадание микробов в глубокие отделы полового аппарата самки в природных условиях при естественном спаривании явление не столь уж редкое. Именно вследствие этого возникла у самок активная защитная реакция в эстральном периоде. И у самих зародышей в процессе эволюции выработался защитный механизм, особенно необходимый на ранних стадиях развития, когда еще не существует плацента с ее барьерной функцией. Это подтверждено опытами Б.П. Токина(1956).

## 4.3 Анализ экономической деятельности предприятия

Таблица 4.3.1. Анализ фонда заработной платы Харьковского биотехнологического центра

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Должность |  | Заработная плата, грн. | Всего за месяц, грн. | Всего за год, грн. |
| Директор | 1 | 800 | 800 | 9600 |
| Зам. директора | 1 | 650 | 650 | 7800 |
| Зав. отделом | 2 | 550 | 1100 | 13200 |
| Ст. научн. сотрудники | 10 | 450 | 4500 | 54000 |
| Научн. сотрудники | 12 | 400 | 4800 | 57600 |
| Лаборанты | 8 | 160 | 1280 | 15360 |
| Гл. врач | 1 | 220 | 220 | 2640 |
| Вет. врач | 1 | 180 | 180 | 2160 |
| Прочий персонал | 14 | 140 | 1960 | 23520 |
| Всего | 50 | - | 15490 | 185880 |

Анализ фонда заработной платы показал, что в биоцентре работают 50 человек, из них специалисты – 38 человек.

Средняя заработная плата составляет 309,8 грн. Самая высокая оплата труда оказалась у специалистов.

Согласно КЗоТа Украины рабочий день не должен превышать 8 часов при 2 выходных днях в неделю. Следовательно, каждый рабочий за год, с учетом выходных и праздничных дней, отпуска в среднем отработал 257 дней.

257 дней \* 8 часов \* 50 человек = 102800 Чел. часов = 102,8 тыс. Чел. часов

Так, затраты труда в 2001 году по биоцентру составили 102,8 Чел.часов, что на 23,4% больше, чем в 2000 году. На данный показатель производительности труда повлияло расширение штата персонала центра, а также сокращение процентов рабочих мест по болезни.

Анализ финансового состояния биоцентра показал, что основным источником финансирования являются:

1. Украинская академия аграрных наук;

2. Министерство науки Украины;

3. Министерство аграрной политики Украины;

4. Различные организации и учреждения, пользующиеся услугами ХБТЦ;

Таблица 4.3.2. Финансовые поступления в ХБТЦ

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Организации | 1999 | | 2000 | | 2001 | |
| Тыс. грн | % | Тыс. грн | % | Тыс. грн | % |
| УААН | 497,3 | 65,4 | 621,6 | 63,4 | 643,9 | 58,5 |
| МНУ | 125,4 | 16,5 | 141,2 | 14,4 | 114,5 | 10,4 |
| МАПУ | 78,4 | 10,3 | 93,2 | 9,5 | 62,8 | 5,7 |
| Прочие поступления | 59,3 | 7,8 | 124,5 | 12,7 | 279,5 | 25,4 |
| Всего | 760,4 | 100 | 980,5 | 100 | 1100,7 | 100 |

Анализ таблицы 4.3.2 показал, что основным источником ХБТЦ является УААН. Так, в 2001 году в структуре финансирования на УААН приходилось 58,5% или 643,9 тыс. грн. Однако, динамика финансовых поступлений за 3 исследуемых года показала, что общая сумма финансирования в 2001 году возросла на 44,8% по сравнению с 1999 годом и составила 1100,7 тыс. грн. Данные таблицы показывают, что структура финансовых поступлений за три года существенно изменилась. Возросли прочие финансовые поступления с 7,8 до 25,4% и составили 279,6 тыс. грн. На данный показатель существенно повлияло увеличение оказания услуг посторонним организациям, т.е. биоцентр стремится быть финансово независимым от вышестоящих структур и пытается собственными силами обеспечить финансовую независимость. По нашему мнению целесообразно было бы данному учреждению организовать маркетинговый отдел, который бы занимался рекламной кампанией по пропаганде научных достижений и разработок биоцентра в ближнем и дальнем зарубежье, что позволит существенно увеличить финансовые поступления.

Таблица 4.3.3. Поступления ветеринарных препаратов, реактивов для научных исследований

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Предприятия | Поставки препаратов, % | Поставки препаратов, тыс. грн |
| Укрзооветпромпостач | 80 | 58 |
| «Биолек» | 10 | 7,25 |
| Харьковский мясокомбинат | 6 | 4,35 |
| Харьковская биофабрика | 4 | 2,9 |
| Всего | 100 | 72,5 |

Таблица 4.3.4. Анализ сметы предприятия

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Статьи сметы | 1999 | | 2000 | | 2001 | |
| Тыс. грн. | % | Тыс. грн. | % | Тыс. грн. | % |
| Заработная плата с отчислениями | 119,9 | 14,8 | 158,4 | 17,4 | 186,1 | 20,1 |
| Поддержание основных фондов | 306,4 | 37,8 | 331,5 | 36,4 | 356,5 | 38,5 |
| Материальные ресурсы, в т.ч. | 179,9 | 22,2 | 175,7 | 19,3 | 237,9 | 25,7 |
| электроэнергия | 136,1 | 16,8 | 115,6 | 12,7 | 151,9 | 16,4 |
| ГСМ | 12,9 | 1,6 | 13,7 | 1,5 | 44,6 | 4,8 |
| Материалы и реактивы | 44,5 | 5,5 | 58,3 | 6,4 | 72,2 | 7,8 |
| Прочие затраты | 159,7 | 19,7 | 232,2 | 25,5 | 206,5 | 22,3 |
| Всего | 810,4 | 100 | 910,4 | 100 | 925,7 | 100 |

Анализ сметы организации показал, что затраты за исследуемый период увеличились на 19,2% и в 2001 году составили 925,7 тыс. грн. Основными статьями сметы – содержание основных средств 38,5%, материальные затраты – 25,7%. Так, увеличение численности работников повлекло и увеличение затрат на заработную плату, а также проведенные работы за 1999–2001 гг. по реконструкции, модернизации и совершенствованию основных средств организации повлекло и увеличение затрат на содержание и амортизационные отчисления. Анализ динамики сметы организации показал, что организация стремится к расширению своей деятельности, увеличивая количество предоставляемых услуг, работ, научных исследований. На перспективу развития необходимо увеличивать смету организации, так как на достигнутом уровне ХБТЦ не останавливается, а постоянно увеличивает спектр научных исследований, что способствует интеграции научных достижений ученых ХБТЦ с практическим их применением.

Таблица 4.3.5. Экономическая эффективность деятельности ХБТЦ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Показатели | 1999, тыс. грн | 2000, тыс. грн | 2001, тыс. грн |
| Финансовые поступления | 760,4 | 980,5 | 1100,7 |
| Затраты предприятия | 810,4 | 910,4 | 925,7 |
| Прибыль или убыток | -50,0 | 70,4 | 175,0 |

Анализ таблицы экономической эффективности деятельности ХБТЦ показал, что организация неизменно стремится к получению прибыли. Так в 1999 году данное учреждение было убыточным -50 тыс. грн. Существенное влияние на убыточность оказало неполное финансирование государством, а также огромные затраты на непредвиденный ремонт зданий и сооружений, реконструкцию коммуникаций и строительство новой отопительной системы. Начиная с 2000 года, ХБТЦ расширило свой круг деятельности, увеличились финансовые поступления на 12,3% прежде всего за счет оказания дополнительных услуг посторонним организациям, увеличение хоздоговорной тематики и в 2000 году ХБТЦ впервые получил прибыль в размере 70,1 тыс. грн. с увеличением ее до 175,0 тыс. грн. в 2001 году.

В целом считаем, что ХБТЦ – коммерческая организация, занимающаяся разработкой и внедрением биотехнологий воспроизводства сельскохозяйственных животных, которая крайне необходима в период рыночных преобразований в Украине, как центр науки и технологии в сельском хозяйстве, как координирующая организация по биотехнологическим исследованиям в Украине.

Экономический анализ ХБТЦ позволил сделать следующие выводы:

1. Необходим поток инвестиций для приобретения новейшего оборудования для научных исследований, которое позволит расширить спектр научных направлений;

2. В ближайшем будущем необходимо организовать маркетинговый отдел, который будет заниматься рекламой биоцентра не только в Украине, но и за рубежом;

3. Расширение и создание филиалов во всех регионах Украины;

4. Увеличение финансирования со стороны государства и принятие государственной программы по исследованиям и внедрению биотехнологии в АПК Украины.

## 4.4 Характеристика предприятия

Харьковский биотехнологический центр расположен на восточной окраине города Харькова на территории ПО «Кулиничи».

В центре имеются: административный и лабораторный корпус, в котором находятся научные лаборатории и манеж для работы с животными, а также гараж для автотранспорта организации. Также имеется животноводческое помещение, в котором находятся 8 быков – производителей и хранятся корма для животных.

ХБТЦ является структурным подразделением Украинской академии аграрных наук, является юридическим лицом, имеет расчетный счет в банке, имеет свою печать и бланки с название организации.

ХБТЦ является координирующим центром по биотехнологии воспроизводства сельскохозяйственных животных на Украине.

Основное направление деятельности центра – разработка и внедрение новых научно обоснованных методов по повышению уровня воспроизводства сельскохозяйственных животных.

Центр выполняет задания Академии аграрных наук Украины, Министерства аграрной политики Украины, Министерства науки Украины по разработке новых технологий в области искусственного осеменения, криоконсервации, микрохирургии, клеточной и генной инженерии и трансплантации ооцитов и эмбрионов сельскохозяйственных животных, а также занимается хозрасчетной деятельностью, работая по договорам с сельскохозяйственными предприятиями в сфере воспроизводства стада.

Научные исследования проводятся на базе опытных хозяйств института животноводства УААН.

Собственных земельных угодий ХБТЦ не имеет.

## 4.5 Результаты исследований

### 

### 4.5.1 Разработка мер предупреждения микробной контаминации эмбрионов на технологических этапах их подготовки

При изучении бактериальной загрязненности половых путей реципиентов в разные фазы полового цикла нами установлено, что в лютеальную фазу микробная контаминация выше, чем в эстральную, т.е. в это время матка наиболее чувствительна к микробному фактору. Кроме этого, нами доказано отрицательное влияние микробного фактора на приживляемость. Поэтому возникла необходимость в разработке мер предотвращению микробной контаминации на всех этапах трансплантации.

С целью предупреждения заноса инфекции в матку реципиента контаминированными эмбрионами на всех этапах трансплантации осуществляли бактериологический контроль. Бактериологические исследования показали, что промывные буферные среды содержат большое количество микроорганизмов, которые могут абсорбироваться на зоне пеллюцида эмбриона, а в дальнейшем при пересадке его переносится в матку реципиента. Поэтому мы считаем, что важным моментом в комплексе профилактических мероприятий микробной контаминации при трансплантации эмбрионов является санация промывных буферных сред и отмывка эмбрионов. Для санации промывных буферных сред и отмывки эмбрионов мы испытали различные комплексы антибиотиков. Контролем служили пробы. отобранные из промывных буферных сред и сред из чашек после отмывки эмбрионов без антибиотиков. Для исследований использовали чистые культуры микроорганизмов, ранее выделенные из половых путей коров и телок, а также промывных сред матки доноров. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что в сравнительных опытах по санации промывных буферных сред с инокулированными чистыми культурами в разведении 1:10 микробных тел/мл использовали комплексы антибиотиков: пенициллин (100 Ед/мл) + гентамицин (4,6,10 и 12 мкг/мл); ампициллин + гентамицин в тех же концентрациях; пенициллин (100 Ед/мл) + стрептомицин (50 Ед/мл).

Результаты бактериологических исследований после инокуляции культур и добавления антибиотиков через 1,5-2 часа показали, что к комбинациям пенициллин + гентамицин в концентрациях 100 Ед/мл и 12 мкг/мл и ампициллин + гентамицин в тех же концентрациях чувствительными оказались все взятые в опыт штаммы микроорганизмов. Концентрация гентамицина 4, б, 10 мкг/мл в комплексе с пенициллином (100 Ед/мл) значительно снижали рост микрофлоры, но полной бактерицидной активности не наблюдалось.

Комбинация пенициллина со стрептомицином, в указанных концентрациях, оказалась неэффективной против синегнойной палочки и испытуемого штамма кишечной палочки.

Для санации промывных буферных сред использовали комплекс антибиотиков гентамицин + ампициллин в концентрации 12 мкг/мл и 100 Ед/мл, предложенный А.Д. Бугровым и И.М. Величко (1986). Нашими исследованиями подтверждено, что лучшим антимикробным средством является вышеуказанная комбинация антибиотиков.

Таблица 1. Сравнительная активность комбинаций антибиотиков на чистые культуры микроорганизмов

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Концентрация антибиотиков (мкг/мл и ЕД/мл) | Культуры микроорганизмов | Количество проб | Рост микроорганизмов на питательных средах | | |
| МПА в чашках (кол-во колоний) | МПБ | Среда Булира |
| Гентамицин 4 Пенициллин 100 | В. Subtilis  Ps. aeruginosa  St. aureus  E. coli | 4  4  4  4 | 132–327  132–327  -  - | +  -  - | - |
| Гентамицин 4 Ампициллин 100 | B. subtilis  Ps. aeruginosa  St. aureus  E. coli | 4  4  4  4 | 9–72  -  - | +  -  - | - |
| Гентамицин 6 Ампициллин 100 | B. subtilis  Ps. Aeruginosa  St. aureus  E. coli | 5  5  5  5 | ед.  -  -  - | +  -  -  - | -  -  -  - |
| Гентамицин 10  Ампициллин 100 | B. subtilis  Ps. aeruginosa  St. aureus  E. coli | 2  2  2  2 | -  ед.  -  - | -  -  -  - | -  -  -  - |
| Гентамицин 12  Пенициллин 100 | B. subtilis  Ps. aeruginosa  St. aureus  E. coli | 4  6  4  5 | \_  -  -  - | \_  -  -  - | - |
| Гентамицин 12  Ампициллин 100 | B. subtilis  Ps. aeruginosa  St. aureus  E. coli | 4  4  4  4 | -  -  -  - | -  -  -  - | - |
| Пенициллин 100 Стрептомицин 30 | B. subtilis  Ps. Aeruginosa  St. aureus  E. coli | 5  5  5  5 | сп л. рост  сп л. рост | +  +  +  + | + |

Примечание: (+) наличие роста, (–) отсутствие роста. В контроле без антибиотиков во всех пробах наблюдали рост вышеуказанных культур микроорганизмов.

В последствии нами проведен опыт. Результаты приведены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 видно, что из 14 смывов, санированных комплексом антибиотиков гентамицин-ампициллин в концентрациях 12 мкг/мл и 100 Ед/мл, соответственно, 12 – свободных от микроорганизмов, что составляет 85%. В контрольных смывах без добавления антибиотиков только 42,9% смывов стерильны. Различия в росте микроорганизмов на питательных средах из контрольных и опытных смывов достоверны (Р<0,001). Учитывая вышеизложенное, мы считаем целесообразным для санации промывных буферных сред использовать комплекс антибиотиков гентамицин-ампициллин в концентрации 12 мкг/мл и 100 Ед/мл.

Таблица 2. Действие комплекса антибиотиков гентамицин-ампициллин (12 мкг/мл и 100 Ед/мл) на микрофлору промывных сред

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Среды для вымывания эмбрионов | Всего исследовано смывов | Отсутствие роста микроорганизмов на питательных средах (МПБ, МПА) | |
| Количество | % |
| Гентамицин + ампициллин (12 мкг/мл и 100 Ед/мл) (опыт) | 14 | 12 | 85 |
| Без антибиотиков (контроль) | 14 | 6 | 42,9 |

Следовательно, из санированных промывных сред матки доноров большая вероятность получить деконтаминированные эмбрионы и предотвратить занос микроорганизмов в матку реципиента.

Полученые нами, промывные маточные среды от коров-доноров оценивали по внешним признакам: цвету, прозрачности. Из 14 проб, в которые антибиотики не добавляли, в 8 случаях (57,1%) отмечали рост микрофлоры на питательных средах и по внешнему виду они были мутными с примесями слизи. Это было основанием предположить, что в промывную маточную среду слизь могла попасть из влагалища или шейки матки, а также из матки при наличии скрытого эндометрита. Добавление антибиотиков в промывные буферные Среды снижали их бактериальную загрязненность и профилактировали эндометриты.

Кроме этого, санированная промывная среда профилактирует возникновение эндометритов при многократном использовании доноров. Микроорганизмы, попадая в микротравмы при извлечении эмбрионов, могут вызвать эндометриты. Об этом свидетельствуют данные В.И. Завирюхи, С.П. Хомина и соавт. (1987). Проведенный ими анализ практической работы показывает, что после проведения нескольких вымываний у коров-доноров развивается гнойной эндометрит.

Наши исследования по санации промывных буферных сред комплексом антибиотиков ампицилин+гентамицин доказывают, что даже при многократном использовании коров-доноров на питательных средах (МПБ и МПА) из проб промывных буферных сред, наблюдается незначительный рост микрофлоры. У отдельных коров-доноров эмбрионы извлекали по 3–4 раза, тем не менее, ни у одного из них эндометрита не наблюдали.

Это свидетельствует о том, что санация промывных буферных сред является средством профилактики заболеваний матки у коров-доноров.

В последние годы многие исследователи стали предлагать отмывку эмбрионов в нескольких стерильных средах, что по их мнению снижает концентрацию вирусов и бактерий в среде до неопасного субинфекционного уровня уже после третьего разбавления (E. Singh et al., 1982; D. Stringfellow et al., 1984). Для дополнительной гарантии полного блокирования случайной инфекции стали добавлять в стерильные среды антибиотики, либо обрабатывать эмбрионы ферментами (трипсином) (E. Singh et al., 1982).

Наши микробиологические исследования показали, что даже многократная отмывка эмбрионов стерильной фосфатно-буферной средой не всегда дает положительный антимикробный эффект. Так, при многократном отмывании эмбрионов стерильными средами до пятой чашки из 25 исследованных нами проб, в 3-х наблюдали рост микрофлоры на питательных средах. Для обеспечения стерильности эмбрионов нами было испытано многократное отмывание их в стерильных буферных средах с добавлением антибиотика гентамицина (12 мкг/мл) в комплексе с ампициллином (100 Ед/мл). Установлено эффективное антимикробное действие этого комплекса антибиотиков (табл. 3). Хотя различия между контролем и опытом не достоверны, существует тенденция к снижению роста микроорганизмов в средах для отмывки эмбрионов, что позволяло получить стерильный пересадочный материал.

С целью определения времени действия антибиотиков на микрофлору использовали в эксперименте модель, которая состояла из среды Дюльбекко, антибактериальных средств и чистых культур микроорганизмов. В качестве антибактериальных средств использовали комбинации антибиотиков в ранее испытанных концентрациях: гентамицин (12 мкг/мл) с ампициллином (100 Ед/мл); пенициллин (100 Ед/мл) со стрептомицином (50 Ед/мл). Действие антибиотиков испытывали на ассоциации чистых культур микроорганизмов, ранее выделенных из половых путей доноров и реципиентов влютеальную фазу полового цикла: Е. coli, Ps. aeruginosa, Вас.subtilis, Staph. aureus). После моделирования через каждые 15 минут производили высевы на питательные среды.

Таблица 3. Сравнительная оценка многократного отмывания эмбрионов средами с добавлением антибиотиков и без них

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Среды для отмывки эмбрионов | Всего исследовано сред | Рост микрофлоры на питательных средах (МПБ, МПА) | |
| Количество | % |
| Гентамицин + ампициллин (12 мкг/мл и 100 Ед/мл) (опыт) | 25 | 0 | 0 |
| Без антибиотиков (контроль) | 25 | 3 | 12±6,49 |

Опытная модель подвергалась воздействию комплекса антибиотиков гентамицин+ампициллин, контролем служили пробы с антибиотиками пенициллин+стрептомицин и без добавления антибиотиков.

Микробиологические исследования показали, что 15 минутное воздействие комплекса антибиотиков гентамицин+ампициллин убивает ассоциации вышеуказанных микроорганизмов (табл. 4).

Таблица 4. Влияние антибиотиков на микрофлору в промывных буферных средах

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Антибиотики, добавленные в среду Дюльбекко | Экспозици (мин.) | Рост микрофлоры на питательных средах | | |
| МПБ | МПА | МПА в чашках (кол-во колоний) |
| Гентамицин + ампициллин  Пенициллин + стрептомицин  Без антибиотиков | 15 | -  +  + | -  -  + | 0  5  20 |
| Гентамицин + ампициллин  Пенициллин + стрептомицин  Без антибиотиков | 30 | -  -  + | -  -  + | 0  0  47 |
| Гентамицин + ампициллин  Пенициллин + стрептомицин  Без антибиотиков | 60 | -  -  + | -  -  + | 0  0  59 |
| Гентамицин + ампициллин  Пенициллин + стрептомицин  Без антибиотиков | 90 | -  -  + | -  -  + | 0  0  100 |

Примечание: Вышеуказанные антибиотики в концентрациях: гентамицин 12 мкг/мл + ампициллин 100 Ед/мл, пенициллин 100 Ед/мл + стрептомицин 50 Ед/мл. (+) – рост микроорганизмов, (–) – отсутствие роста микроорганизмов

Таблица 5. Влияние антибиотиков на развитие эмбрионов

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  п/п | Среда для культивирования эмбрионов | Стадия развития | | | Всего эмбрионов, шт. | Стадия развития эмбрионов через 24 часа | | | | | | Количество развившихся эмбрионов | |
| МП | БР | БП | БР | % | БП | % | БЭ | % | Шт. | % |
| 1 | Без антибиотиков (контроль) | 7 | 5 | 7 | 19 | 5 | 71,4 | 5 | 100 | 5 | 71,4 | 15 | 78,95 |
| 2 | С комплексом антибиотиков: Гентамицин + ампициллин (12 мкг/мл и 10 ЕД/мл) | 9 | 5 | 7 | 21 | 5 | 55,5 | 5 | 100 | 5 | 71,4 | 15 | 71,43 |
| 3 | С комплексом антибиотиков: Пенициллин + стрептомицин (100 и 50 ЕД/мл) | 6 | 5 | 4 | 15 | 3 | 50 | 2 | 40 | 3 | 75 | 8 | 53,33 |

Существенным качественным параметром развития эмбриона в культуре является образование бластоцеля. В опыте, где была использована среда с добавлением комплекса антибиотиков гентамицин + ампициллин в концентрациях 12 мкг/мл и 100 Ед/мл, в контроле – среда с антибиотиками пенициллин+стептомицин (100 и 50 Ед/мл), во втором контроле – среда без добавления антибиотиков: 5 из 7 (71,4%), 5 из 9 (55,5%) и 3 из 6 (50%) эмбрионов развились из стадии морулы поздней (МП) в бластоцисту раннюю (БР); 5 из 5 (100%), 5 из 5 (100%), 2 из 5 (40%) эмбрионов развились из стадии бластоцисты ранней (БР) в бластоцисту позднюю (БП); 5 из 7 (71,4%), 5 из 7 (71,4%) и 3 из 4 (75%) эмбрионов развились из стадии бластоцисты поздней (БП) в стадию бластоцисты экспандированной (БЭ), соответственно (табл. 5).

Полученные данные свидетельствуют о том, что контакт эмбрионов в течение 2-х часов в среде с комплексом антибиотиков гентамицин + ампициллин в концентрациях 12 мг/мл и 100 Ед/мл, соответственно, не оказывает на их дальнейшее развитие более существенного влияния, чем комплекс антибиотиков пенициллин + стрептомицин в общепринятых концентрациях (100 и 50 Ед/мл). Учитывая большую бактерицидную активность предложенного комплекса антибиотиков по сравнению с комплексом пенициллин + стрептомицин можно считать целесообразным его использование для санации промывных буферных сред и эмбрионов в практике эмбриотрансплантации.

С целью определения влияния комплекса антибиотиков гентамицин + ампициллин (12 мкг/мл и 100 Ед/мл) на приживляемость эмбрионов проведены опыты по пересадке их реципиентам. При подготовке эмбрионов к пересадке мы проводили последовательное отмывание их в пяти чашках буферными средами, содержащими вышеуказанный комплекс антибиотиков. Контролем служили эмбрионы, отмытые средами, не содержащими антибиотиков.

Отмытые опытные и контрольные эмбрионы пересаживали телкам-реципиентам. Стельность определяли по результатам ректальных исследований.

Данные по влиянию антибиотиков на приживляемость эмбрионов приведены в таблице 6.

Таблица 6. Влияние антибиотиков на приживляемость эмбрионов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Среды для отмывки эмбрионов | Всего исследовано реципиентов | Из них стельные | |
| Количество | % |
| Гентамицин + ампициллин (12 мкг/мл и 100 Ед/мл) (опыт) | 28 | 21 | 75 |
| Без антибиотиков (контроль) | 32 | 16 | 50 |

Данные таблицы 6 свидетельствуют о том, что из 28 реципиентов, которым были пересажены эмбрионы, отмытые в средах с комплексом антибиотиков гентамицин+ампициллин (12 мкг/мл и 100 Ед/мл), стельными стали 21 голова, что составило 75%, в контроле из 32 реципиентов только 16 голов оказались стельными или 50%.

Таким образом, комплекс антибиотиков гентамицин+ампициллин не только дает хороший антимикробный эффект, но и повышает приживляемость эмбрионов за счет того, что в матку реципиента вместе с пересадочным материалом (эмбрионами) вводилось небольшое количество среды с антибиотиками, которые создавали асептические условия в конкретном участке матки. Поэтому мы рекомендуем всем пунктам трансплантации добавлять указанный комплекс антибиотиков в среды для отмывки эмбрионов.

### 4.5.2 Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий

Экономический ущерб от снижения молочной продуктивности:

У2к =7\*13,1\*60\*0,73=1049,38 грн.

У2оп.=16\*13,1\*60\*0,73=9180,48

Экономический ущерб от недополучения приплода:

У5= Кр (Рв – Рф) \* Сп, где

Кр – коэффициент рождаемости

Рв – планировалось отелится

Рф – фактический отел

Сп – стоимость теленка при рождении

У5к = 0,5\*(28–21)\*263,53=922,3 грн.

У5оп = 0,5\* (32–16)\*263,53=2108,24 грн.

Уфк = У2 – У5 = 12971,74 грн.

Уф оп = 9180,48+2108,24=11288,72 грн.

Предотвращенный экономический ущерб при трансплантации эмбрионов

Пу = М0 \* Кз \* Кп \* Ц – Уф

М0 – количество восприимчивого поголовья

К3 – коэффициент заболеваемости

Кп - удельная величина потерь основной продукции в расчете на 1 заболевшее животное

Пу (к) = 160\*0,375\*617,7\*0,73–12971,74=14083,52

Пу (оп) = 160\*0,375\*705,55\*0,73–11288,72=19614,37

Зв (к) = 152,3\*32=4873,6

Зв (оп) = 157,6\*28=4412,8

Эв = Пу – Зв

Эв (к) = 14083,52

Эв (оп) = 19614,37–4412,8=15201,57

Экономический эффект на 1 грн. ветеринарных затрат

Эгрн = Эв / Зв

Эгрн = 9209,92/4873,6=1,89

Эгрн = 15201,57/4412,8=3,44

Вывод: экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на 1 гривну ветеринарных затрат составила в контрольной группе 1,89 грн, а в опытной – 3,44 грн, что оправдывает проведение данных мероприятий.

## 4.6 Обсуждение результатов собственных исследований

Как известно, низкий уровень воспроизводства у самок и длительный интервал времени между поколениями, в среднем 6-7 лет у крупного рогатого скота, ограничивают генетический прогресс в животноводстве. В настоящее время эта проблема решается в значительной степени за счет внедрения новых более радикальных методов разведения животных, в частности метода трансплантации эмбрионов. Значительным недочетом существующей технологии трансплантации является то, что она не предусматривает специальных мероприятий, повышающих приживляемость эмбрионов. Основной задачей нехирургической эмбриотрансплантации является повышение приживляемости эмбрионов, зависящей от многих факторов, одним из которых является асептичность всех проводимых операций.

На приживляемость эмбрионов оказывает влияние много причин. В своей работе мы изучали только влияние микробного фактора на приживляемость эмбрионов. Из литературных данных известно, что в процессе эволюции у животных сложились мощные иммунные барьеры, препятствующие инфицированию половых путей микрофлорой. Основными факторами, обеспечивающими защиту половых путей коров и телок являются барьерные функции слизистых оболочек, особенно шейки матки. Так, цервикальная слизь во время течки и охоты обладает бактерицидным действием (В.П. Полищук, 1984; В.С. Шипилов, 1988). Другие исследователи сообщают, что даже во время течки и половой охоты у многих коров в пробах слизи из шейки матки были обнаружены различные бактерии (M. Krisha et al., 1974).

Наши бактериологические исследования показали, что в промывных буферных средах даже у здоровых животных были обнаружены ассоциации микроорганизмов: E.coli, Staph.aureus, Staph.album, Pseudomonasa., Bac.subtilis.

Зная видовой состав микробов промывных буферных сред, который близок к таковому половых путей реципиентов, нами проведены испытания по санации промывных буферных сред и эмбрионов. Как известно из практики искусственного осеменения, для санации спермы используют различные антибиотики и их комбинации. Применение антибиотиков при эмбриотрансплантации ограничено. Для санации промывных буферных сред А.Д. Бугров и И.М. Величко (1986) использовали гентамицин в комплексе с пенициллинами в концентрации 12 мкг на мл и 100 Ед на мл, соответственно. В своей работе мы испытали три комплекса антибиотиков: гентамицин с ампициллином и гентамицин с пенициллином в концентрациях 4, 6, 10 и 12 мкг / мл и 100 Ед / мл, пенициллин со стрептомицином 100 и 50 Ед/мл, рекомендуемый инструкцией по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. Лучшими антимикробными свойствами обладали комплексы антибиотиков гентамицин с ампициллином и гентамицин с пенициллином в концентрациях 12 мкг / мл и 100 Ед /мл. Концентрация гентамицина 4, 6 и 10 мкг / мл хотя и подавляла в комплексе с пенициллинами рост синегнойной палочки, но полной бактерицидной активности не наблюдалось. Комбинация пенициллина со стрептомицином оказалась неэффективной против синегнойной палочки и испытуемого штамма кишечной палочки. В контрольной среде, без добавления антибиотиков, наблюдали сплошной рост микроорганизмов.

Поэтому для санации промывных буферных сред лучше использовать комплекс антибиотиков гентамицин с ампициллином или гентамицин с пеницилином (12 мкг / мл и 100 Ед/мл).

Известно, что многие антибиотики, в частности пенициллин со стрептомицином, оказывают токсическое действие на сперму (И.И. Соколовская, 1960; А.П. Волосевич, 1963; С.И. Сердюк и соавт., 1970), ооциты (М.Ф. Карашаев, 1987). Наши исследования показали, что контакт эмбрионов в течение двух часов в среде с комплексом антибиотиков гентамицин с ампициллином (12 мкг/мл и 100 Ед/мл) не оказывает на дальнейшее развитие эмбрионов более существенного влияния, чем комплекс антибиотиков пенициллин со стрептомицином в общепринятых концентрациях (100 и 50 Ед/мл).

Добавление антибиотиков в промывные буферные среды позволило резко снизить их микробную загрязненность. Так, из 14 смывов, санированных комплексом антибиотиков гентамицин с ампициллином (12 мкг / мл и 100 Ед/ мл), 12 – были свободны от микроорганизмов (85%), в тоже время в средах без добавления антибиотиков только 42,9% смывов были стерильны. Аналогичные результаты были получены С.В. Советкиным (1988), который использовал для санации промывных буферных сред ГАМП (гентамицин с ампициллином 50 мкг/мл и 50 Ед/мл).

Наличие или занос микроорганизмов в матку донора может привести к воспалительным процессам, в частности к эндометриту. Добавление антибиотиков в промывные буферные среды является хорошим антимикробным средством, что профилактирует заболевания матки у коров-доноров и позволяет использовать их многократно.

Эмбрионы, извлеченные из промывных буферных сред, в дальнейшем, согласно инструкции, должны проходить еще одну обработку – многократную отмывку в стерильных буферных средах. Наши микробиологические исследования показали, что из 25 проб, отобранных после пятикратного отмывания эмбрионов, в трех пробах наблюдали рост микрофлоры, а при добавлении антибиотиков в среды для отмывки эмбрионов все пробы были стерильными. Аналогичные результаты были получены С.В. Советкиным (1988).

Существенным качественным параметром развития эмбриона в культуре является образование бластоцеля. В опыте, где была использована среда с добавлением комплекса антибиотиков гентамицин + ампициллин в концентрациях 12 мкг/мл и 100 Ед/мл, в контроле – среда с антибиотиками пенициллин + стептомицин (100 и 50 Ед/мл), во втором контроле – среда без добавления антибиотиков: 5 из 7 (71,4%), 5 из 9 (55,5%) и 3 из 6 (50%) эмбрионов развились из стадии морулы поздней (МП) в бластоцисту раннюю (БР); 5 из 5 (100%), 5 из 5 (100%), 2 из 5 (40%) эмбрионов развились из стадии бластоцисты ранней (БР) в бластоцисту позднюю (БП); 5 из 7 (71,4%), 5 из 7 (71,4%) и 3 из 4 (75%) эмбрионов развились из стадии бластоцисты поздней (БП) в стадию бластоцисты экспандированной (БЭ), соответственно. Различия между опытом и контролем не достоверны (Р>0,05).

Полученные данные свидетельствуют о том, что контакт эмбрионов в течение 2-х часов в среде с комплексом антибиотиков гентамицин + ампициллин в концентрациях 12 мг/мл и 100 Ед/мл, соответственно, не оказывает на их дальнейшее развитие более существенного влияния, чем комплекс антибиотиков пенициллин + стрептомицин в общепринятых концентрациях (100 и 50 Ед/мл). Учитывая большую бактерицидную активность предложенного комплекса антибиотиков по сравнению с комплексом пенициллин + стрептомицин можно считать целесообразным его использование для санации промывных буферных сред и эмбрионов в практике эмбриотрансплантации.

Санация промывных буферных сред и отмывка эмбрионов средами с антибиотиками положительно влияли на приживляемость эмбрионов. Из 28 реципиентов, которым были пересажены эмбрионы, отмытые средами с антибиотиками, 21 телка (75%) стала стельной, в контроле без добавления антибиотиков приживляемость составила 50%.

Мы считаем, что это происходило благодаря тому, что в матку реципиента вместе с пересаженным материалом (эмбрионами) вводили небольшое количество среды Дюльбекко с антибиотиками, которые создавали асептические условия в конкретном участке матки.

В технологию по извлечению и пересадке эмбрионов для профилактики микробной контаминации нами были введены элементы, позволяющие повысить приживляемость эмбрионов, включающие:

1. санацию половых путей коров-доноров и телок-реципиентов с экспозицией 15 минут перед эмбриотрансплантацией;

2. санацию промывных буферных сред комплексом антибиотиков гентамицин с ампициллином в концентрации 12 мкг / мл и 100 Ед / мл;

3. отмывку эмбрионов в среде Дюльбекко с добавлением комплекса антибиотиков гентамицин с ампициллином (12 мкг / мл и 100 Ед/мл).

# 5. Охрана труда

## 5.1 Организация охраны труда

В соответствии с «Законом Украины об охране труда» от 14 октября 1992 года, утвержденного Верховным Советом Украины, руководители хозяйств обязаны разработать совместно с профсоюзным комитетом план мероприятий по охране труда и обеспечивать их выполнение.

В ХБТЦ за охрану труда несет ответственность директор и заведующие отделами, на которых возложена координация деятельности всех работников центра и организация контроля работы по созданию здоровых и безопасных условий труда (ДНАОП 0.00.4.21–93 Типове положення про службу охорони праці (Зміни від 17.05.96 №82)).

4 апреля 1994 года приказом государственного комитета Украины по надзору и охране труда утверждено «Типовое положение об обучении, инструктаж и проверке знаний работников по вопросам охраны труда». В хозяйстве проводится вводный инструктаж, первичный инструктаж на рабочем месте, повторный инструктаж, внеплановый и целевой. Все виды инструктажей проводятся применительно к профессиям в соответствии с действующими инструкциями, правилами и нормами по технике безопасности, руководствуясь перечнем вопросов, имеющихся в «Типовом положении» (ДНАОП 0.00.4.12–99 Типове положення про навчання працівників з питань охорони праці).

Фактические затраты на охрану труда в 1999–2001 годах выше планируемых. В связи с тем, что в хозяйстве имеют случаи травматизма, ежегодно проводится анализ несчастных случаев путём определения коэффициента частоты травматизма и заболеваний.

Финансирование мероприятий по охране труда происходит за счет собственных средств.

## 5.2 Производственная санитария

Помещения ХБТЦ построено согласно СНиПа II 97–76. Генеральные планы сельскохозяйственных предприятий и СНиПа 2.09.04.-87. Административные и бытовые здания. Микроклимат лаборатории соответствует ГОСТ 12.1.005–88 Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования. СНиП 2.04.04–86. Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха. Нормы проектирования. СНиП II‑4–79. Освещение. Нормы проектирования.

## 5.3 Пожарная безопасность

В ХБТЦ имеется пожарный щит с огнетушителями, вёдрами, простыми и основными лопатами, а также стоит бочка с водой и ящики с песком.

При возникновении пожаров в период уборки заготовки кормов и в местах их хранения вызывают пожарную помощь и присутствуют в ликвидации его имеющимися средствами.

Обеспечение пожарной безопасности предприятий и организаций возлагается на их руководителей и уполномоченных ими лица, если иное не предусмотрено соответствующим договором.

Система организационных мероприятий включает:

– Организацию пожарной охраны, разработку норм и правил пожарной безопасности (СНиП 2.01.02–85. Противопожарные нормы проектирования зданий и сооружений ГОСТ 12.1.004–91 Пожарная безопасность. Общие требования), а так же инструктаж о порядке работы с пожароопасными веществами и материалами, соблюдения противопожарного режима и о действии людей при возникновении пожара.

## Выводы и предложения

1. Улучшить финансирование охраны труда по инструктажу.
2. Четкий контроль за соблюдением охраны труда.
3. Привлечение к строгой ответственности за нарушение охраны труда, в плоть до увольнения с занимаемой должности (Законодавство України про Охорону праці. Збірник нормативних документів. В 4‑х томах. – К., 1997)

# 6. Выводы

1. Бактериальная контаминация половых путей телок-реципиентов снижается в фолликулярную фазу и возрастает в лютеальную фазу полового цикла в момент пересадки эмбрионов.

2. Микрофлора половых путей (Stahp.aureus и E.coli) оказывает отрицательное влияние на приживляемость эмбрионов при трансплантации их телкам-реципиентам.

3. Добавление в промывные буферные среды комплекса антибиотиков гентамицин 12 мкг/мл с ампициллином 100 Ед/мл снижает микробную контаминацию эмбрионов, профилактирует занос инфекции в матку реципиента, а также заболевания коров-доноров эндометритами.

4. Многократная отмывка эмбрионов средой Дюльбекко с добавлением комплекса антибиотиков гентамицин с ампициллином в концентрации 12 мкг/мл и 100 Ед/мл, соответственно, обеспечивает полную деконтаминацию эмбрионов и повышает их приживляемость на 25%.

# Предложения производству

1. Комплекс антибиотиков гентамицин в концентрации 12 мкг/ мл с ампициллином 100 Ед/мл рекомендуется добавлять в промывные буферные среды и в среды для отмывки эмбрионов.

2. Бактериологический контроль смывов из матки рекомендуется проводить раз в год у каждого донора для определения бактериальной загрязненности при вымывании эмбрионов на пунктах трансплантации.

# Список литературы

1. Балашов Н.Г. Определение безвредности, эффективности и порядок испытания препаратов для разбавления и санации спермы. // Справочник. Ветеринарные препараты. – М. – 1981. – с. 419 – 427, 435 – 438.
2. Беликов А.А. Институт животноводства УААН: Микробная контаминация спермы хряков: Повышение эффективности ведения свиноводства. – Быково, 1999, – С. 200–203 – 1999
3. Биргер И.О. Методика определения антагонизма микробов // Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М. – «Медицина». – 1973. - с. 121–125.
4. Бугров А.Д., Величко И.М., Теличка Т.А. Влияние антибиотиков на жизнеспособность эмбрионов. // Тезисы докладов II Республиканской научно-производственной конференции. – Львов. – 1988. – с. 11–12.
5. Бугров А.Д., Величко И.М. Микробная контаминация при трансплантации эмбрионов. // Тезисы докладов симпозиума по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. – Тарту. -1986. – с. 38.
6. Голубева Е.Д. Применение пенициллина и стрептомицина при бактериальной загрязненности спермы и влияния их на переживаемость спермиев // Плем. работа и повышение продуктивности в животноводстве. Минск. – 1965. – с. 49–53.
7. Жильцов Н.З., Мадисон В.В. Трансплантация эмбрионов в молочном скотоводстве // Животноводство. – 1986. – №6. – с. 64.
8. Завертяев Б.П. // Значение многоплодия в скотоводстве. – М.: «Россельиздат». – 1987. – с. 6–15.
9. Завертяев Б.П. // Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. – Л.: «Агропромиздат». - 1989.
10. Завирюха В.И., Хомин С.П., Шаловило С.Г., Гамота А.А. Профилактика субклинических эндометритов у коров-доноров. // Тезисы докладов республиканской научно-практической конференции. – Львов. -1987. – с. 28.
11. Зацепилова Т.А., Кудрин А.Н. Влияние лекарственных веществ на оплодотворенную яйцеклетку и эмбрион // Фармация. – 1983. – №4. – с. 48.
12. Зверева Г.В., Хомин С.П., Завирюха В.И., Шаловило С.Г., Гамота А.А. Ветеринарные аспекты трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота // Тезисы докладов республиканской научно-практической конференции. – Львов. – 1987. – с. 30–31.
13. Инструкция по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. – М. – Госагропром СССР. – 1987.
14. Качмар О.М.; Авдосьева I.К.; Урус Р.В. Виявлення мiкоплазм в спермi бугаiв-плiдникiв: Информ.бюл. / Укр.акад. аграр. наук. Ин‑т эксперим. клинич. вет. медицины, 1994, – С. 250–1994
15. Квасницкий А.В. Опыт межпородной пересадки яйцеклеток. // Советская зоотехния. – 1951. – №19. – с. 50–52.
16. Квасницкий А.В., Мартыненко Н.А., Близнюченко А.Г. // Трансплантация эмбрионов и генная инженерия в животноводстве. – Киев.: Урожай. -1988.
17. Клинский Ю., Сергеев Н., Шихов И. Теленок из замораживанного эмбриона // Животноводство. – 1980. – №7. – с. 35
18. Ковалев В.Ф., Волков И.Б., Виолин Б.В. и соавт. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны // Справочник. – М. ВО «Агропромиздат». – 1988. – с. 40–41.
19. Козловский Е.В., Емельяненко П.А. Микрофлора тела с.‑х. животных. // Ветеринарная микробиология. – М.: – «Колос». -1982. – с. 53–56.
20. Корниенко П.Ф., Трефилов А.А., Шохор З.И., Белоглазов П.Г. // Справочник по аппаратуре, приборам, инструментам и лабораторному оборудованию. – Киев.: «Урожай». – 1987.
21. Кондратов Б.Д. Псевдомонойрсительство у быков-производителей // Молочное и мясное скотоводство. – 1976. – №2. – с. 29.
22. Косарев С.Р. Влияние бактерицидных веществ на выживаемость спермиев хряков. // Сб. науч. трудов Всесоюзного государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов. – М. – 1984. – с. 221–240.
23. Косарев С.Р. Действие антибиотиков и золотистого стафилококка на спермиев хряков: Актуал. пробл. ветеринарии. – Барнаул, 1995, – С. 184-1995
24. Кузнецова С.М. Комбинированная антибиотикотерапия бактериальных инфекций // Антибиотики. – 1983. – 28. – 12. - с. 19–37.
25. Кудрявцев И.В., Голубев А.К. Перспективы использования методов биотехнологии в животноводстве // Успехи современной генетики./ М.: «Наука». – 1985. – №13. – с. 21.
26. Лакин Г.Ф. Статистические характеристики при альтернативной группировке вариант. // Биометрия. – М.: «Высшая школа». – 1990. – с. 64–65.
27. Логвинов Д.Д. Асептическое взятие спермы у быков. // Ветеринария. – 1972. – №5. – с. 86–89.
28. Логвинов Д.Д. Профилактика микробного и грибкового загрязнения спермы быков // Труды Харьковского зооветинститута. – 1970. – 5 (29) – с. 167–172.
29. Логвинов Д.Д., Плугарев В.П., Хатура Г.Г., Миллер А.Г. Санитарная оценка методов ведения спермы быков коровам и телкам. // Тезисы докладов республиканской научной конференции. – Харьков. – 1988. – с. 25–26.
30. Мартыненко Н.А. // Эмбриональная смертность с-х. животных и ее предупреждение. – Киев.: Урожай. – 1971. – с. 16–17, 238–256.
31. Мадисон В.В., Мадисон В.Л. Ветеринарный контроль при пересадках эмбрионов и борьба с инфекционными болезнями. // Трансплантация эмбрионов в практике разведения молочного скота. – М.: «Агропромиздат». – 1988. – с. 18–25.
32. Мадисон В.Л., Мадисон В.В. Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота // Животноводство. – 1985. – П. – с. 60–61.
33. Михайлов Н.Н. Значение инфекционных факторов в этиологии бесплодия с-х. животных. // Воспроизводство и профилактика бесплодия с-х. животных. – М. – 1976. – с. 65-74.
34. Мозгов И.Е. Антибиотики // Фармакология. – М.: «Колос». – 1974. – с. 383–410.
35. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Трансплантация эмбрионов и клеточная инженерия в животноводстве // Основы сельскохозяйственной биологии. – М – .1990. – с. – 236–300.
36. Мюйрсепп И.Я., Яакма Ю.Р. Влияние состояния эндометрия коров-доноров эмбрионов на количество, качество и приживляемость эмбрионов // Тезисы докладов научно-практической конференции. – Львов. – 1988. – с. 21.
37. Нежданов А.Г., Черемисинов Г.А., Ковальчук А.А. Значение йода и сроков осеменения в профилактике бесплодия с-х. животных. – М.: «Колос». – 1976. – с. 106.
38. Новохатский А.С., Герасимова С.С. Исследования противовирусного действия гентамицина // Антибиотики. – 1975. – т. 20. – №5. – с. 428–433.
39. Осидзе Д.Ф. Стимулирующие и лечебные препараты, кормовые добавки // Справочник ветеринарные препараты. – М.: «Колос». – 1981. – с. 350–414.
40. Осташко Ф.И., Величко И.М., Иванов B.C. Микробный фактор, как одна из причин изменяемости результатов искусственного осеменения крупного рогатого скота // Физиология воспроизведения сельскохозяйственных животных /Советско-американский семинар. - Харьков. – 1977. – с. 257–261.
41. Осташко Ф.И. Насущие вопросы искусственного осеменения крупного рогатого скота // Тезисы докладов научно-практической конференции по теории и практике воспроизводства с-х. животных. – Харьков. – 1972 – с. 16–18.