

УДК 636.1.:57.08:591.463.1

В. О. КЛАШНИКОВ, кандидат ветеринарних наук
Інститут тваринництва НААНУ, м. Харків

МІКРОБІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМИ ЖЕРЕБЦІВ

У статті представлені результати досліджень бактеріальної контамінації сперми жеребців-виробників тракененської і арабської порід у розбавленій і заморожено-відталій спермі. Вивчено чутливість мікрофлори виділеної зі сперми до антибіотиків. Запропоновано ряд антибіотик-претендентів для створення препарату сануючого сперму. Пропонується визначати бактеріальну контамінацію сперми жеребців-виробників з метою визначення можливості подальшого використання заморожено-відталої сперми в системі штучного запліднення кобил.

Ключові слова: бактеріальна контамінація, сперма, антибіотики, жеребці-плідники

У сучасній біотехнології відтворення тварин відзначається зростання бактеріальних захворювань тварин, які призводять до зниження ефективності племінного використання плідників та врешті решт до економічних збитків від недоотримання молодняка. За останні роки відмічають зростання розповсюдженості та патогенності мікроорганізмів, які раніше не мали патогенних властивостей або виявляли їх за певних умов. Крім того збільшення кількості патогенних бактерій серед тварин становить пряму загрозу для здоров'я людини [1].

Особливо гостро проблема бактеріальної контамінації набуває у біотехнології відтворення коней, оскільки діючі нормативні документи працюють понад тридцять років [2, 3]. Тому питання щодо впливу бактеріальної контамінації сперми жеребців на її біотехнологічну придатність та на вихід лоша на наш погляд є недостатньо вивчене.

Метою роботи було вивчення чутливості до антибіотиків виділеної мікрофлори та встановлення впливу бактеріальної контамінації сперми жеребців-плідників на її біотехнологічну придатність та на якість розбавленої та заморожено-відталої сперми.

Матеріали та методи. Проби сперми відбирали у 2 жеребців арабської породи та у 6 плідників тракененської породи які належали Чутівському кінному заводу «Тракен». У розбавленій та заморожено-відталій спермі визначали загальну кількість бактерій за ГОСТ 23681-79 «Сперма жеребцов неразбавленная свежеполученная» [2], та кількість бактерій з групи кишкової палички (БГКП). Ідентифікацію культур проводили загальноприйнятими методами [4]. Чутливість до антибіотиків визначали методом дифузії в агарі із застосуванням стандартних паперових дисків [5]. Кількісні та якісні показники сперми визначали згідно з загальноприйнятими методиками [6]. Отримання і кріоконсервацію сперми здійснювали за технологією, що розроблена лабораторією штучного осіменіння Інституту тваринництва УААН [7]. Статистичне опрацювання результатів здійснювали за загальноприйнятими методиками [8].

Результати досліджень. З таблиці 1 видно, що у нативній спермі тракєненських жеребців загальна бактеріальна контамінація була в середньому 12500 ± 2700 КУО/см³. У розбавленій спермі цей показник складав 16280 ± 2800 КУО/см³, і підвищувався на 30,2 % відносно цього показника у нативній спермі. У відталій спермі загальна бактеріальна контамінація дорівнювала 20360 ± 2500 КУО/см³, та була більше цього показника у нативній та розбавленій спермі на 38,6 % та 20,0 % відповідно. Кількість бактерій групи кишкової палички (БГКП) зростала від моменту отримання. Так, в заморожено-відталій спермі цей показник був більшим ніж у нативній і розбавленій спермі на 26,4 % та 9,6 % відповідно.

У відталій спермі жеребців арабської породи загальна бактеріальна контамінація була на рівні 22460 ± 1600 КУО/см³, тобто цей показник був більшим ніж в нативній та в розбавленій спермі на 53,6 та 23,4 % відповідно. Кількість БГКП також зростала від моменту отримання. Так, в заморожено-відталій спермі цей показник був більшим ніж у нативній і розбавленій спермі на 50,9 % та 6,4 % відповідно.

Таблиця 1.

Кількість колонійутворюючих одиниць у заморожено-відталій спермі жеребців-плідників тракєненської та арабської порід

Породи тварин	Кіль-ть проб, n	Загальна бактеріальна контамінація, КУО/см ³			БГКП, КУО/см ³		
		Нативна	Розбавлена сперма	Заморожено-відтала сперма	Нативна	Розбавлена сперма	Заморожено-відтала сперма
Тракєненська	31	12500 ±2700	16280 ±2800	20360 ±2500	9200 ±1800	11300 ±1500	12500 ±1450
Арабська	16	10400 ±2100	17200 ±1800	22460 ±1600	7600 ±1900	14500 ±2600	15500 ±2800

Виділена мікрофлора була представлена бактеріями видів *Escherschia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*

Важливим етапом для профілактики мікробної контамінації сперми може бути внесення до сперми антибіотиків, тому ми вивчили чутливість виділених мікроорганізмів до найпоширеніших у практиці антибіотиків: пеніцилінів, цефалоспоринів, аміноглікозидів, поліміксинів, тетрациклінів та препаратів з інших груп (табл. 2).

Половина штамів *E. coli*, виділених із клінічного матеріалу, були чутливими до гентаміцину, поліміксину, цефазоліну, норфлорсацину та мали значну стійкість до неоміцину, стрептоміцину, рифампіцину, пеніциліну і фузидину. Найактивнішими відносно кишкової палички виявилися антибактеріальні препарати фторхінолонової, цефалоспоринової групи та групи поліміксинів і аміноглікозидів – норфлорсацин, цефазолін, поліміксин та гентаміцин відповідно. До цих препаратів чутливі 60, 50, 50 і 50 % відповідно.

Вужчим діапазоном чутливості до антибіотиків характеризувалися бактерії роду *Staphylococcus spp.* Із тринадцяти перевірених антибіотиків лише до двох, норфлорсацину та цефазоліну, були чутливими більшість досліджених штамів, в 70 та 60 % відповідно. До інших препаратів, більше половини виділених мікроорганізми цього виду були резистентні.

Вивчення чутливості виділеної мікрофлори до антимікробних препаратів

Назва антибіотика	<i>E. coli</i> (n=10)			<i>Streptococcus spp.</i> (n=10)			<i>Staphylococcus spp.</i> (n=10)		
	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*
Пеніцилін	0	0	100	0	20	80	0	50	50
Ампіцилін	40	30	30	30	40	30	20	20	60
Цефазолін	50	30	20	80	20	0	60	40	0
Гентаміцин	50	20	30	30	40	30	20	40	20
Канаміцин	0	40	60	40	40	20	0	40	60
Неоміцин	0	20	80	40	50	10	20	60	20
Стрептоміцин	0	0	100	20	40	40	0	50	50
Поліміксин	50	30	20	40	40	20	40	20	40
Тетрациклін	10	40	50	40	40	20	30	50	20
Норфлораксацин	60	30	10	70	20	10	70	30	0
Левоміцетин	40	50	10	30	60	10	40	20	40
Ріфампіцин	0	20	80	10	20	70	0	50	50
Фузідин	0	20	80	0	20	80	0	20	80

Примітка: 1* - Чутливі штами, %;

2* – Помірно чутливі штами, %;

3* – Резистентні штами, %.

Половина та більше половини штамів роду *Streptococcus spp.* проявляли стійкість до ампіциліну та канаміцину (відповідно 60 % штамів) та стрептоміцину, ріфампіцину та пеніциліну (відповідно у 50,0 % штамів). Поряд із цим характеризувалися високою чутливістю до препарату фторхінолонового ряду – норфлораксацину (70,0 % штамів) та препарату цефалоспоринового ряду – цефазоліну (60,0 % штамів).

Таким чином, універсальними препаратами для санації сперми можуть бути препарати з групи цефалоспоринів – цефазолін та з групи фторхінолонів – норфлораксацин.

Хоча останні і мають ряд токсичних ефектів, але ці препарати ефективні при виникненні захворювань, викликаних полірезистентними штамми бактерій [9, 10, 11].

Вивчивши показники заморожено-відталого сперми (табл. 3.) жеребців тракененської та арабської породи можна зазначити, що спермії жеребців тракененської породи мали на 0,5 бала більшу рухливість, та на 0,3 год. більшу виживаність ніж у жеребців арабської породи. Біотехнологічна придатність сперми жеребців тракененської породи була на 11,1 % вище ніж у сперми жеребців арабської породи.

Отже визначення бактеріальної контамінації сперми слід проводити у нативній спермі, що дасть змогу спрогнозувати біотехнологічну придатність та підвищити ефективність робіт щодо створення кріобанку спермопродукції жеребців-плідників.

Висновки:

Зі сперми виділено штами бактерій родини *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*), бактерії видів *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* Серед протестованих антибактеріальних препаратів найефективнішими відносно всіх бактеріальних видів виявилися цефазолін (група цефалоспоринів) і норфлораксацин (група фторхінолонів) тому їх можна рекомендувати як антибіотики-претенденти для створення препаратів для санації сперми.

Вивчення показників якості заморожено-відталої сперми жеребців-плідників тракєненської та арабської порід Показники відталої сперми

Порода	Кількість отриманих еякулятів	Кількість еякулятів, що заморожували	Біотехнологічна придатність, %	Показники відталої сперми		
				рухливість, бали	виживаність при 37°C, годин	Збереженість сперми, %
Тракєненська	31	17	54,8	2,5 ±0,8	2,6 ±0,6	34,36 ±4,04*
Арабська	16	7	43,7	2,0 ±0,5	2,1 ±0,9	21,62 ±3,35*

Встановлено що мікробна контамінація сперми була більшою у заморожено-відталої сперми у порівнянні з розбавленою спермою.

Доведено, що збільшення бактеріальної контамінації нативної сперми жеребців-плідників знижує біотехнологічну придатність не впливаючи на її кількісні та якісні показники. Тому для більш ефективного створення кріобанку спермопродукції жеребців слід визначати кількість КУО/см³ у нативній спермі.

1. Касумов Ф.М. Микрофлора семени быков-производителей и методы борьбы с загрязнением эякулята микроорганизмами / Ф.М. Касумов // Животноводство.– 1963.– № 3.– С. 37-39.

2. ГОСТ 23681-79 Сперма жеребцов неразбавленная свежее-полученная. – Москва.: Издательство стандартов, 1979. – 6 с.

3. ГОСТ 24168-80 Сперма жеребцов замороженная. – Москва.: Издательство стандартов, 1980. – 4 с.

4. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т.С. Костенко, Е.И. Скаршевская, С.С. Гительсон. – М.: Агропромиздат, 1989.– 272 с.

5. Королюк А.М. Медицинская микробиология / В.Б. Сбойчаков. – СПб: ЭЛБИ-СПб, 2002. – 266 с.

6. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения / [А. П. Студенцов, В. С. Шипилов, В. Я. Никитин и др.]; Под.ред В.Я.Никитина и М.Г.Миролюбова. – 7-е изд.перераб. и доп.-М.: Колос, 2000.-495с.

7. Розробка технологічної лінії для отримання, кріоконсервації сперми жеребців та штучного осіменіння кобил / [О. Б. Сушко, О. О. Новіков, Ф. І. Осташко, О. В. Соклакова, О. В. Ткачов]. / Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Тваринництво ХХІ сторіччя: новітні технології, досягнення і перспективи» // НТБ ІТ УААН. – №94. – Х., 2006. – С.325 – 330.

8. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский.– М.: Колос, 1969.–256 с.

9. Поздеев О. К. Медицинская микробиология / О. К Поздеев, В. И. Покровский. – М. :ГЕОТАР-МЕД, 2001. – 656 с.

10. Clinical experience of serious infections caused by Enterobacteriaceae producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek University Hospital / M. Souli, F. V. Kontopidou, E. Papadomichelakis et al. // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46, N 6. – P. 847–854.

11. Elston D. M. Epidemiology and prevention of skin and soft tissue infections // Cutis. – 2004. – Vol. 73, N 5. – P. 3–7.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ/ В. А. Калашников

В статье представлены результаты исследований бактериальной контаминации спермы жеребцов-производителей тракененской и арабской пород в разбавленной и замороженно-оттаянной сперме. Изучена чувствительность микрофлоры выделенной из спермы к антибиотикам. Предложен ряд антибиотиков-претендентов для создания препарата санирующего сперму. Предлагается определять бактериальную контаминацию спермы жеребцов-производителей с целью определения возможности дальнейшего использования замороженно-оттаянной спермы в системе искусственного осеменения кобыл.

Ключевые слова: бактериальная контаминация, сперма, антибиотики, жеребцы-производители

MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF SPERM CRYOCONSERVATION STALLIONS/ V. O. Kalashnikov

The paper presents results of studies of bacterial contamination of semen stallions Trakehner and Arabian breeds in the diluted and frozen-thawed semen. Studied the sensitivity of microorganisms isolated from the sperm to antibiotics. Proposed a number of antibiotics, applicants for a drug sanifying sperm. It is proposed to determine the bacterial contamination of semen stallions in order to determine the feasibility of using frozen daylneyshego-thawed semen in the artificial insemination of mares.

Key words: bacterial contamination, semen, antibiotiks, stallions.

Рецензент – кандидат біологічних наук **М. М. Долгая**