



>



Изучение микробной контаминации спермы жеребцов-производителей и выбор препаратов для её санации.

М. М. Атрощенко¹, В. В. Калашников¹, А. М. Зайцев¹, Р.Ф. Уразбахтин²

ФГБНУ «ВНИИ коневодства»¹, ФГБНУ «Башкирский НИИСХ»²

Аннотация.

Проведено изучение микробной контаминации спермы жеребцов-производителей, определён видовой и количественный состав выделенных микроорганизмов. Изучена эффективность различных saniрующих препаратов с учётом сохранения оптимальных показателей активности и выживаемости сперматозоидов.

Введение. Одним из основных требований в воспроизводстве лошадей является тщательное соблюдение ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на предотвращение возникновения и распространения инфекционных заболеваний. Установлено, что сперма здоровых животных, полученная с соблюдением санитарно - гигиенических требований, не содержит микроорганизмов [1]. Основной причиной микробной контаминации спермы является несоблюдение санитарных правил [13]. При взятии спермы от жеребцов – производителей основными источниками загрязнения являются: воздух случного манежа, волосяной покров жеребца и кобылы, препуциальная полость жеребца и т.д. [2, 12, 18]. Контаминация также возможна через лабораторную посуду и инструменты, при разбавлении, эквilibрации и фасовке спермы [8].

Данные, приводимые рядом авторов по общей микробной загрязнённости спермы производителей различных видов сельскохозяйственных животных, неодинаковы. Общая микробная загрязнённость находится в широком интервале от нескольких тысяч до 120 млн. микробных тел в 1 мл спермы [7, 14]. Видовой и количественный состав микрофлоры, выделяемой из спермы жеребцов разнообразен и непостоянен, и в основном зависит от соблюдения санитарно-гигиенических мероприятий.

Достаточно часто микроорганизмы, обнаруживаемые в сперме при заболеваниях половой системы животного, являются представителями воздушного или почвенного микробиоценоза, и для определения источника контаминации необходимы дополнительные исследования.

Бочаров И.А. с соавт. (1964) не выделил никакой специально адаптированной группы микроорганизмов, населяющих сперму быков. Смывы с препуция, из мочеполювого канала и сперма содержали так называемую «банальную микрофлору», которую нет основания считать «микрофлорой спермы», несмотря на постоянное присутствие её во многих пробах.

По данным Балашова Н.Г (1978), из спермы быков была выделена 121 культура микроорганизмов. Из них 60 культур (49,6%) гемолитических, из которых 30 культур были патогенными для белых мышей.

За последние десятилетия из спермы производителей выделяли различные виды микроорганизмов. При проведении исследований по санитарному состоянию искусственного осеменения в коневодстве, Семёнов С.Л. (1955) выделил из спермы жеребцов: *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Micrococcus* spp.

Позже Паршутин Г.В. (1961) исследовал видовой состав микрофлоры, выделенной из 30 эякулятов от 7 жеребцов и осла. В результате было установлено, что наиболее часто в сперме жеребцов встречаются бактерии: *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina flava*.

По данным Куклина А.Д. (1973) при микробиологическом исследовании семени жеребцов были выделены: *Sarcina citrea*, *B. megaterium*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus* spp. и т.д. Большинство выделенных микроорганизмов были сапрофитными.

По результатам исследований Храбровой Л.А. (1990), в сперме жеребцов преобладает сапрофитная микрофлора, которая представлена бациллами, микрококками, флавобактериями, грибами.

При микробиологических исследованиях спермы жеребцов, в основном выделяли сапрофитную непатогенную микрофлору, и только при исследовании спермы от жеребцов с воспалительными процессами в половой системе были выделены условно - патогенные микроорганизмы [7].

Неспецифическая микрофлора может вызывать воспалительные процессы в уретре и придаточных половых железах, изменяя тем самым состав семенной плазмы, что неблагоприятно сказывается на жизнедеятельности сперматозоидов. По данным Горохова Л.Н. с соавт. (1972), микрофлора своими токсинами и продуктами метаболизма вызывает гибель или снижение выживаемости сперматозоидов, что в свою очередь приводит к низкой оплодотворяемости яйцеклеток. Продукты обмена микроорганизмов в большинстве случаев токсичны для сперматозоидов. При быстром размножении микрофлоры происходит накопление токсических продуктов обмена, которые оказывают негативное влияние на сперматозоиды.

Попадая в сперму, условно патогенная микрофлора «конкурирует» со сперматозоидами за «питание», выделяет продукты своего обмена, вызывает изменение pH среды. Это приводит к снижению активности сперматозоидов, тем самым уменьшается оплодотворяющая способность спермы. Наблюдаются многочисленные случаи прилипания (адгезии) микробов к сперматозоидам, что мешает нормальному движению последних.

По данным Althouse G.C. et al.(2008) и Bussalleu E. et al. (2011) присутствие микроорганизмов в сперме хряков связано со снижением подвижности и жизнеспособности сперматозоидов. Кроме того высокая микробная контаминация спермы может вызывать преждевременную акросомную реакцию или агглютинацию сперматозоидов [15]. Также микроорганизмы могут вызывать выработку антител, направленных против комплекса гликокаликса сперматозоидов [9, 11].

Зверева Г.В. с соавт. (1961) установила, в эякулятах микроорганизмы образуют большие скопления вокруг сперматозоидов. В местах соприкосновения микробной клетки с перфораторием происходит его распад, оболочка сперматозоида в местах внедрения микробов прогибается, а затем набухает и распадается.

Таким образом, микроорганизмы оказывают как механическое влияние (нарушение активности сперматозоидов вследствие оседания на них микробов), так и химическое (ферментативный процесс разрушения спермиев и их гибель под влиянием продуктов обмена микроорганизмов). В то же время, сперматозоиды сами становятся переносчиками микробов.

Из спермы производителей выделяют не только отдельные микроорганизмы, но и микробные ассоциации [6], которые оказывают более негативное влияние на сперматозоиды. В таких случаях непатогенные или слабо патогенные микроорганизмы могут вызывать, кроме снижения выживаемости спермы, патологические изменения со стороны половой системы самок при осеменении. В некоторых случаях комбинация даже двух сапрофитов может быть вирулентной.

Кузьмин М.Д. с соавт. (1998) указывает, что высокая микробная обсеменённость спермы мужчин, с низкой фертильностью, видовое разнообразие микроорганизмов, широкая распространённость и выраженность антилизоцимного признака, высокая адгезивная активность, полиантибиотикорезистентность свидетельствуют об определённой роли персистирующей микрофлоры в формировании патоспермии. С этими выводами согласны и многие другие исследователи [12, 10, 16], изучающие вопрос бактериальной контаминации спермы.

Снижение общей резистентности организма под влиянием внешних или внутренних факторов предрасполагает к развитию воспалительных процессов. Неполноценное кормление, нарушения в технологии содержания, несоблюдение санитарно гигиенических мероприятий при проведении случной кампании, всё это создаёт благоприятные условия для развития воспалительных процессов в организме. Наличие субклинических и клинических воспалительных процессов со стороны мочевой системы (уретрит, цистит и т.д.) снижает противомикробную резистентность слизистых оболочек половой системы (уровень местного иммунитета). Наличие тяжёлых соматических заболеваний, острых воспалительных процессов в анамнезе (даже при проведённом адекватном лечении) всегда чревато развитием вялотекущих воспалительных процессов в уретре и придаточных половых железах [3].

Одним из источников попадания в сперму микроорганизмов и «резервуаром» микрофлоры является препуциальная полость. В препуциальной полости создаются благоприятные условия для скопления химически раздражающих кожу веществ и развития микроорганизмов. Выделение потовых и сальных желез, уретральное отделяемое, слущенный эпителий, капли мочи с кристаллами солей образуют смегму, которая собирается в препуциальной полости, нарушает защитную функцию кожи и является прекрасным

источником питания для микроорганизмов. Постоянное или временное отсутствие гигиенических мероприятий (промывание препуциальной полости с удалением скопившейся смегмы) может приводить к развитию раздражения слизистой и воспалительным процессам в препуции. Патогенно факультативные микроорганизмы у жеребца могут быть случайными или персистировать на слизистой оболочке пениса и мочеиспускательного канала. При преодолении естественной антимикробной локальной защиты организма возникают характерные признаки воспаления, при которых создаются условия для размножения условно патогенной микрофлоры.

Klug E. et al. (1992) и Turecek K. et al. (1988) считают, что значение анализа спермы жеребцов на присутствие инфекционных патогенов в практике искусственного осеменения трудно переоценить.

Микробную загрязнённость спермы производителей необходимо снижать на всех этапах: взятия спермы, технологической обработки, фасовки, замораживания. Однако, Балашов Н.Г. с соавт. (1985), считает, что применение рекомендованных приёмов асептического взятия спермы (облучение манежа для взятия спермы бактерицидными лампами, чистка производителей, санация препуциальной полости, стерилизация лабораторной посуды и инструментов и т.д.) не обеспечивает получение свободной от микроорганизмов спермы. Любая технология взятия спермы не гарантирует получения стерильного семени в 100% случаев.

Поэтому необходимым фактором микробной деконтаминации спермы является её санация антимикробными препаратами [17, 18]. Мероприятия по снижению микробной загрязнённости спермы и её санация дополняют друг друга.

Сперма жеребцов, предназначенная для искусственного осеменения, должна соответствовать определённым стандартам. В сперме не должны присутствовать патогенные и условно патогенные микроорганизмы. Общее количество микроорганизмов в свежеполученной сперме не должно превышать 5000 микробных тел в 1 мл, в криоконсервированной - не более 500 [4, 5]. Поэтому, снижение микробной контаминации спермы до установленных санитарных норм является одним из важных условий для эффективной работы по искусственному осеменению.

Материалы и методы исследований.

Для выбора антимикробного препарата для санации спермы жеребцов и его оптимальной дозировки провели ряд микробиологических и клинико-диагностических исследований. В опытах использовали сперму 57 жеребцов. Во время проведения экспериментальных исследований условия кормления, содержания и использования жеребцов соответствовали установленным нормам. После получения спермы, каждый эякулят оценивали по стандартной методике. Для микробиологического исследования проводили посевы биоматериала и его десятикратных разведений на различные питательные среды (МПА, кровяной агар, желточно-солевой агар, среду Эндо, среду Сабуро). После инкубации посевов в термостате при $37\pm 0,5$ °C в течении 24 часов, изучали культуральные свойства изолированных колоний.

Из выделенных культур готовили мазки, окрашивали их по Граму и изучали под микроскопом морфологические и тинкториальные свойства микроорганизмов.

Антибиотикочувствительность микроорганизмов определяли путём посева выделенной культуры на среду АГВ диско - диффузионным методом, с использованием стандартных наборов дисков с антибиотиками. Учёт чувствительности культур к антибиотикам проводили по зоне задержки роста микроорганизмов. Количество микробных тел выделенных культур выражали в колониеобразующих единицах – КОЕ/мл.

Для изучения влияния антибиотиков на выживаемость и микробную загрязнённость спермы каждый эякулят разбавляли ЛХЦЖ средой в соотношении 1:3, и делили на несколько частей. Одну часть использовали как контроль (без санирующего препарата), в другие части вводили антибактериальные препараты.

По результатам антибиотикочувствительности микроорганизмов для испытаний были выбраны следующие антибиотики: ампициллин, гентамицин, левомицетин, линкомицин, оксациллин, цефазолин, цiproфлоксацин, цефтриаксон эритромицин и антимикробный препарат полиген. Все перечисленные препараты, кроме полигена, приобретены в медицинских аптеках. Препараты предназначены для внутримышечного или внутривенного применения, т.е. имели высокую степень чистоты.

Препараты вводили в среду в возрастающих концентрациях с разницей в дозировках в 3-5 мг. После разбавления контролировали подвижность сперматозоидов в баллах и их выживаемость в часах при хранении при температуре 2-4⁰С. После установления оптимального количества каждого препарата проводили сравнительное исследование среди перечисленных антибиотиков и выявляли лучшие препараты по влиянию на качество спермы. Замораживание спермы проводили в парах жидкого азота по технологии ВНИИ коневодства. Хранили замороженную сперму в жидком азоте при температуре -196⁰С.

Статистическую обработку осуществляли с использованием программы Microsoft Excel. Данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики и выражали в виде среднеарифметической (M) и её стандартной ошибки (m). Достоверность различий определялась с помощью t-критерия Стьюдента и по однофакторному дисперсионному анализу (F-критерия). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований. Общая микробная загрязнённость свежеполученной спермы жеребцов варьирует в довольно широком диапазоне и в основном зависит от соблюдения полного комплекса санитарных требований, предъявляемых к взятию спермы у производителей. Из 1 мл свежеполученной спермы мы выделяли от 0,1 до 300 тыс. КОЕ. В 2,3% случаев сперма была контаминирована грибами.

Из-за повышенной микробной загрязнённости 70,2% полученных эякулятов не соответствовало санитарным нормам.

Из спермы жеребцов были выделены следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Aerococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter diversus*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella atlante*, *Klebsiella oxytoca*, грибы рода *Candida*.

Все выделенные грамположительные микроорганизмы чувствительны к гентамицину и амикацину. Большинство микроорганизмов чувствительно к оксациллину (91,8%), доксициклину (91,8%), эритромицину (85,7%), ампициллину (73,4%), тетрациклину (71,4%), линкомицину (75,5%).

Наиболее резистентны грамположительные микроорганизмы к пенициллину – 67,4% штаммов, тетрациклину (24,5%), линкомицину (20,4%) и ампициллину – 18,4% выделенных штаммов.

Все выделенные грамотрицательные бактерии чувствительны к гентамицину, ципрофлоксацину, цефтриаксону, а также к амикацину и доксициклину. Большинство штаммов чувствительно к левомецетину (81,1%), цефазолину (71%) и полимиксину (64,9%). Грамотрицательные микроорганизмы наиболее устойчивы к пенициллину – 96,3% штаммов и ампициллину – 83,8% штаммов.

Информация по чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам постоянно меняется. Сидоренко С.В. (2002) указывает, что это происходит за счёт эволюции микроорганизмов с развитием у них различных механизмов устойчивости к действию антибиотиков. Изучение чувствительности микроорганизмов выделенных из спермы жеребцов к антибиотикам мы проводим в течение 14 лет, и по результатам исследований можно сказать, что за этот период времени устойчивость выделяемых микроорганизмов к исследуемым препаратам не повысилась.

Изучили влияние антимикробных препаратов на выживаемость спермы жеребцов при хранении спермы при температуре от +2 до +4°C (табл. 1). Определили минимальное количество каждого препарата, которое не снижает выживаемость сперматозоидов.

Таблица 1

Влияние антибиотиков на качество спермы жеребцов в процессе хранения спермы при температуре 2-4°C (n=100)

Название препарата	Дозировка, мг/100 мл ЛХЦЖ	Выживаемость, час	% к контролю
-	0	122 ± 10*	100
Ампициллин	10	130 ± 10*	106
Гентамицин	8	136 ± 12*	112
Левомецетин	10	140 ± 13*	115
Линкомицин	10	140 ± 12*	115
Оксациллин	10	135 ± 11*	110

Полиген	6	140 ±13*	115
Цефазолин	10	128 ±11*	105
Цефтриаксон	15	123 ± 9*	101
Ципрофлоксацин	5	121 ±10*	99
Эритромицин	10	138 ±13*	114

*** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$

Лучшая выживаемость спермы отмечена при использовании для санации полигена, гентамицина, линкомицина, оксациллина, эритромицина и левомицетина (табл. 1). Оптимальные дозы этих препаратов не оказали токсического влияния на сперматозоиды и достоверно улучшили выживаемость спермы вне организма на 10-15 %. Препарат ципрофлоксацин в минимальной концентрации 5 мг на 100 мл среды снижает выживаемость спермы. Результаты изучения влияния оптимальных концентраций этих антимикробных препаратов на микробную загрязнённость спермы представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние оптимальных концентраций антибиотиков на микробную загрязнённость свежеразбавленной спермы (n=100)

Название препарата	Дозировка, мг/100 мл ЛХЦЖ	КОЕ/мл	% к контролю
-	0	2470±186	100
Ампициллин	10	80±6,4*	3,2
Гентамицин	8	65±5,7*	2,6
Левомецетин	10	720±69*	29,1
Линкомицин	10	540±46*	21,9
Оксациллин	10	1020±89*	41,3
Полиген	6	50±4,2*	2,0
Цефазолин	10	590±52*	23,9
Цефтриаксон	15	670±56*	27,1
Ципрофлоксацин	5	810±74*	32,8
Эритромицин	10	570±48*	23,1

*** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$

По результатам микробиологических исследований установили, что максимальный saniрующий эффект в оптимальных дозировках оказали препараты: полиген, гентамицин и ампициллин (табл. 2). Причём, лучшие показатели отмечены при санации спермы полигеном и гентамицином. Микробная загрязнённость проб спермы, санированных другими препаратами, оказалась значительно выше, различия по влиянию антибиотиков на микробную загрязнённость по сравнению с контролем статистически значимы согласно t-критерию Стьюдента ($p < 0,001$).

Оптимальные по влиянию на выживаемость сперматозоидов дозировки препаратов: оксациллина, линкомицина, цефазолина, левомицетина, цефтриаксона, эритромицина не доводят микробную загрязнённость спермы до установленных санитарных норм.

Выводы.

1. Соблюдение санитарно-гигиенических требований, предъявляемых к воспроизводству лошадей в производственных условиях без санации спермы не обеспечивают ее необходимую микробную деконтаминацию.
2. Микробная загрязнённость свежеполученной спермы жеребцов варьирует в пределах от 0,1 до 300 тыс. КОЕ в 1 мл.
3. По результатам микробиологических исследований установили, что максимальный saniрующий эффект в оптимальных дозировках оказали препараты: полиген, гентамицин и ампициллин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов, В.С. Совершенствование способа асептического взятия и обработки спермы хряков: автореф. дис. ... канд. ветер. наук / В.С.Иванов.- Воронеж,1982.- 24 с.
2. Куклин, А.Д. Изучение контаминации микроорганизмами спермы жеребцов при замораживании: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.Д.Куклин.- Харьков,1973.- 24с.
3. Сагалов, А.В. Влияние санации хронических воспалительных процессов уретры и простатовезикулярного комплекса на нарушение половой функции у мужчин / А.В.Сагалов, В.Ф. Бавильский // Тезисы конференции ПАА.- М., 2001.- С. 57-62.
4. Сперма жеребцов замороженная: ГОСТ 24168-80. – М.: Изд-во стандартов, 1980.-4 с.
5. Сперма жеребцов неразбавленная свежеполученная: ГОСТ 23681-79.- М.: Изд-во стандартов, 1979.- 6 с.
6. Филатов, А.В. Новый подход в санации спермы при её разбавлении/ А.В.Филатов, И.Г.Конопельцев, С.Я. Долгоаршинных // Роль и значение метода искусственного осеменения с.-х. жив-х в прогрессе жив-ва XX и XXI веков.- Дубровицы, 2004.- С. 133-135.
7. Храброва, Л.А. Бактериальная загрязнённость спермы жеребцов / Л.А.Храброва // Новое в технологии коневодства и коннозаводства: сб. науч. тр. / ВНИИ коневодства. - Дивово, 1990.- С. 75-79.
8. Althouse, G.C. Sanitary procedures for the production of extended semen/ G.C.Althouse // *Reprod. Domest. Anim.*- 2008.-Vol. 43.-P. 374–378.
9. Auroux, M.R. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: An in vitro study in man with *Escherichia coli* / M.R.Auroux, L.Jacques, D. Mathieu // *Int. J. Androl.*- 1991.-Vol. 47.- P. 264–270.
10. Haines, M.D. Impact of 6 different intestinal bacteria on broiler breeder sperm motility in vitro / M.D.Haines, H.M.Parker, C.D.McDaniel, A.S. Kiess // *Poult. Sci.*- 2013.-Vol. 92.- P. 2174–2181.
112. Köhn, F.M. Influence of urogenital infections on sperm functions / F.M.Köhn [et al.] // *Andrologia.*- 1998.-Vol. 30.- P. 73–80.
11. Kurpisz, M. Carbohydrate moieties on sperm surface: Physiological relevance / M.Kurpisz, N.J. Alexander // *Fertil. Steril.*- 1995.-Vol. 63.- P. 158–165.
12. Malmgren, L. Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relationship to fertility under field conditions / L.Malmgren, E.E.Olsson, A.Engvall, A. Albihn // *Acta Vet. Scand.*- 1998.-Vol. 39.-P. 173–182.
13. Маринов, П. Възпроизводственият процес и микробиологичният статус на спермата, получавана и използвана у нас. / П.Маринов // *Вет. сб.*- 1988.- Г. 86.- № 6.- С. 46-47.
14. Mohanty, P.K. Bacterial load of frozen bovine semen / P.K.Mohanty, B.N.Mohanty, S.K.H.E.A. Ray // *Ind. Vet. J.* - 1988. - Vol. 65.- №6.- P. 516-518.
15. Monga, M. Spermagglutination by bacteria: Receptor-specific interactions / M.Monga, J.A. Roberts // *J. Androl.*- 1994.-Vol. 15.- P. 151–156.

16. Sepúlveda, L. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality / L.Sepúlveda, E.Bussalleu, M.Yeste, S. Bonet // *Anim. Reprod. Sci.*- 2014.- Vol. 150.- P. 96–106.
17. Sevinc, A. Dedisik antibiyotikler katılarak dondurulmuş boga sperma larından elde edilen doliverimi / A.Sevinc, N.Yurdaydin, N. Tekin // *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* - 1984.- Vol. 31.- № 3.- P. 491-497.
18. Smole, I. Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant / I.Smole, A.Thomann, J.Frey, V. Perreten // *Reprod. Domest. Anim.*- 2010.- Vol. 45.- P. 737–742.

М. М. Атрощенко, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии ФГБНУ «ВНИИ коневодства»
В. В. Калашников, академик РАН, директор ФГБНУ «ВНИИ коневодства»
А. М. Зайцев, кандидат с.-х. наук, заместитель директора ФГБНУ «ВНИИ коневодства» по научной работе
Р.Ф. Уразбахтин, канд. с.-х. наук, заведующий лабораторией продуктивного коневодства и кумысоделия, ФГБНУ «Башкирский НИИСХ»