



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

**Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий**

РУКОВОДСТВО

по получению и трансплантации
эмбрионов крупного рогатого скота

ISBN: 978-5-9909981-1-7

УДК: 619.618.177.089.888.11

ББК: 48

К71

Руководство по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота

Разработано: ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»

Авторы: Д.В. Попов, А.В. Бригида, д.б.н., профессор РАН Г.Ю. Косовский

Руководство составлено в соответствии с разделом VI «Требования к организации по трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных» Правил в области племенного животноводства «Виды организаций, осуществляющих деятельность в области племенного животноводства», утвержденных приказом Минсельхоза России от 17 ноября 2011 г. № 431 в редакции Приказов Минсельхоза России от 16 апреля 2013 г. №183 и 16 февраля 2016 г. №56. («Правила в области племенного животноводства «Виды организаций, осуществляющих деятельность в области племенного животноводства»./ Х.А. Амерханов, директор Департамента животноводства и племенного дела Минсельхоза России – М.:ФГБНУ «Росинформагротех», 2016 – 51 с.).

ISBN: 978-5-9909981-1-7

УДК: 619.618.177.089.888.11

ББК: 48

К71

ГЛАВА 1

Введение

Цели и задачи трансплантации эмбрионов коров

Трансплантация эмбрионов — биотехнологический метод, позволяющий проводить ускоренное воспроизводство высокопродуктивных животных путем получения множества эмбрионов от выдающихся высокоценных животных (доноров) и последующей трансплантации одного или нескольких эмбрионов менее ценным животным (реципиентам). Технология трансплантации эмбрионов позволяет получать от одной генетически ценной коровы-донора эмбрионов в десятки раз больше потомства, чем при обычном осеменении. Трансплантация эмбрионов применяется в молочном и мясном скотоводстве. Использование малоценных особей вида в качестве реципиентов для пересадки эмбрионов, полученных от одной отобранной коровы - донора, позволяет увеличить число ее потомков в десятки и сотни раз.

Принципиальная возможность увеличения количества потомков от одной коровы обусловлена большим потенциалом продуцирования яйцеклеток, который всегда значительно больше, чем возможность получения приплода. С помощью трансплантации эмбрионов достигается более полное использование биологических возможностей воспроизведения потомства от лучших животных.

Метод трансплантации эмбрионов в сочетании с криоконсервацией позволяет сохранить эмбрионы от выдающихся животных, а также генофонд локальных, исчезающих пород и воспроизвести их. В перспективе, генофонд исчезающих пород может быть использован для восстановления ценных качеств, утерянных в других породах при интенсивной селекции.

Метод трансплантации эмбрионов позволяет решить целый ряд задач:

- 1) размножения и тиражирования генетически ценных особей;
- 2) получения идентичных животных путем деления ранних эмбрионов;
- 3) сохранения генофондов редких и аборигенных популяций;
- 4) получения потомков от бесплодных, но генетически ценных животных;
- 5) выявления нежелательных рецессивных генов и хромосомных аномалий;
- 6) повышения устойчивости животных к болезням;

- 7) получения животных заданного пола;
- 8) межвидовых пересадок;
- 10) получения химерных животных.

В трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота сделан огромный прогресс, вследствие чего этот метод занял прочное место в современных программах селекции. Метод трансплантации вместе с искусственным осеменением рассматривается как основа современной биотехнологии воспроизводства высокопродуктивных племенных животных.

ГЛАВА 2

Этапы получения и трансплантации эмбрионов

Отбор, подбор и подготовка коров-доноров	
Метод получения эмбрионов	
Метод получения эмбрионов <i>in vivo</i> <ul style="list-style-type: none"> • Индукция суперовуляции • Осеменение доноров • Извлечение эмбрионов 	Метод получения эмбрионов <i>in vitro</i> <ul style="list-style-type: none"> • Получение незрелых ооцитов; • Дозревание ооцитов <i>in vitro</i> (in vitro maturation, IVM); • Оплодотворение ооцитов <i>in vitro</i> (in vitro fertilization, IVF); • Культивирование эмбрионов <i>in vitro</i> до ранних предимплантационных стадий развития (in vitro cultivation, IVC), пригодных для нехирургической трансплантации реципиентам.
Оценка качества эмбрионов	
Криоконсервация эмбрионов	
<ul style="list-style-type: none"> • Метод программного замораживания эмбрионов <ul style="list-style-type: none"> • Метод витрификации эмбрионов 	
Отбор, подбор и подготовка реципиентов	
Трансплантация эмбрионов реципиентам	

Требования, предъявляемые к технологии получения и трансплантации эмбрионов коров *in vivo*

3.1. Требования к организации по получению и трансплантации эмбрионов коров *in vivo*

Коллектив организации по получению и трансплантации эмбрионов коров может быть представлен группой или группами квалифицированных специалистов, включающих минимум одного ветеринарного врача, функций которой является получение, обработка и хранение эмбрионов.

Группа по получению и трансплантации эмбрионов должна соответствовать следующим требованиям:

- 1) Специалисты группы должны обладать достаточным уровнем квалификации (лицензии, сертификаты, дипломы).
- 2) Группа находится под руководством входящего в её состав ветеринарного врача.
- 3) На ветеринарного врача группы возлагается ответственность за всю работу группы, в частности, за проверку ветеринарного состояния доноров, соблюдение ветеринарно-санитарных требований при обращении с донорами, проведение хирургических вмешательств, а также за проведение дезинфекции и санитарно-гигиенических процедур.
- 4) Персонал группы должен быть хорошо подготовлен и разбираться в методах контроля и профилактики болезней и строго выполнять правила гигиены для недопущения распространения инфекций.
- 5) Группа по получению и трансплантации эмбрионов должна вести регистрационный журнал, хранящийся минимум два года с даты получения эмбрионов, предъявляемый при проверках органам ветеринарного контроля, и всю предписанную регламентом документацию (см. приложения).
- 6) Группа по получению и трансплантации эмбрионов должна ежегодно проходить проверку официальными органами ветеринарного контроля на предмет соблюдения санитарно-гигиенических правил получения, обработки и хранения эмбрионов.

Организация (центр, лаборатория) по работе с эмбрионами должна полностью соответствовать правилам, представленным кодексом здоровья наземных животных МЭБ (глава 4.7 - отбор и обращение с эмбрионами скота и непарнокопытных, отобранными *in vivo*, статьи 4.7.2, 4.7.3) и утвержденным

Департаментом ветеринарии Минсельхоза России. Организация по получению и трансплантации эмбрионов коров может быть стационарным центром, лабораторией или мобильной (передвижной) лабораторией. Лаборатория должна быть физически отделена от животных. Как в стационарной, так и в передвижной лаборатории "чистый" сектор (где ведутся манипуляции с эмбрионами) должен быть надёжно изолирован от "грязного" сектора (где содержатся животные).

- Лаборатория по работе с эмбрионами должна находиться под непосредственным контролем ветеринарного врача группы и регулярным контролем официального ветеринарного врача.
- Лаборатория по работе с эмбрионами должна быть защищена от грызунов и насекомых.
- Облицовочные материалы, использованные для внутренней отделки лаборатории, должны позволять проведение эффективной уборки и дезинфекции, которые должны проводиться с регулярной частотой и в обязательном порядке перед началом и по окончании каждой операции с эмбрионами.

Стационарная и мобильная лаборатория должны быть оснащены следующими устройствами и оборудованием:

- 1) системой отопления, кондиционирования и дезинфекции помещения для создания необходимого микроклимата;
- 2) холодильным оборудованием;
- 3) стереомикроскопами;
- 4) программным замораживателем ;
- 5) стационарными и переносными сосудами Дьюара;
- 6) размораживателем с блоком питания;
- 7) стерилизатором для используемого инструмента;
- 8) ультразвуковым сонографом с датчиками для диагностики стельности;
- 9) временными таймерами;
- 10) необходимыми устройствами, средами, расходным материалом и лабораторной посудой.

3.2. Требования, предъявляемые к донорам эмбрионов

Происхождение коров и телок-доноров:

- а) Органы ветеринарного контроля должны располагать сведениями о стаде или поголовье, из которого поступили доноры;
- б) Доноры не должны поступать из поголовья или стада, на которое наложены ветеринарные ограничения (Список МЭБ глава 4.7 - отбор и обращение с эмбрионами скота и непарнокопытных, отобранными *in vivo*, статья 4.7.4).

В категорию «болезни и инфекции крупного рогатого скота» включены:

- 1) анаплазмоз крупного рогатого скота;
- 2) бабезиоз крупного рогатого скота;
- 3) вирусная диарея крупного рогатого скота;
- 4) губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота;
- 5) геморрагическая септицемия;
- 6) заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота;
- 7) инфекционный ринотрахеит / инфекционный вульвовагинит;
- 8) *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC*;
- 9) кампилобактериоз крупного рогатого скота;
- 10) тейлериоз;
- 11) трихомоноз;
- 12) трипаносомоз (передаваемый мухой це-це);
- 13) туберкулёз крупного рогатого скота;
- 14) энзоотический лейкоз крупного рогатого скота.

в) Перед отбором доноры должны подвергаться клиническому осмотру ветеринарным врачом группы (или другим ветеринарным врачом в присутствии ветеринарного врача группы).

Донорами эмбрионов могут быть коровы и тёлки со следующими характеристиками:

- клинически здоровые, без признаков нарушения обмена веществ (ожирение, дистрофия и т. д.);
- высокопродуктивные: молочная продуктивность с учетом средней продуктивности за все лактации не менее 8 тыс. кг с содержанием жира в

молоке не менее 3,8%, белка 3,2%. Телки должны иметь хороший экстерьер, отличную родословную, продуктивность матери за наивысшую лактацию - не менее 9000 кг, содержание жира 3,9%, белка 3,3%;

- выдающиеся особи аборигенных или генофондных пород животных.

В основе отбора доноров должны учитываться не только показатели продуктивности, но и комплекс селекционных признаков, легкость отелов, жизнеспособность приплода, продуктивное долголетие и др., что особенно важно для получения от этих животных высокоценных быков-улучшателей.

При одинаковой продуктивности предпочтение отдается коровам с более высоким содержанием жира в молоке, а также коровам с длительным сроком использования, имеющим высокопродуктивных дочерей или положительно оцененных по качеству потомства сыновей.

На молочных комплексах и фермах с промышленной технологией производства отдают предпочтение животным, прошедшим не менее трех лактаций, сохранившим хорошие воспроизводительные функции и устойчивость к технологическим стрессам.

Предпочтительный возраст донора - 3-6 лактации. Коров с высоким удоем целесообразно использовать через 2-3 месяца после отела при наличии у коров не менее 2-х физиологических эстральных циклов.

В выборе донора принимают участие ветеринарные специалисты хозяйства. На каждое животное оформляют ветеринарный паспорт с указанием клинического состояния здоровья, благополучию по бруцеллезу, туберкулезу, вирусным респираторным заболеваниям, лейкозу, трихомонозу, вибриозу, ящуру и другим возбудителям заболеваний, заражающих эмбрионы. В ветеринарном паспорте указывают дату проведения последних диагностических исследований и обработок.

Корова-донор при последнем отеле не должна иметь осложнений (трудные отелы, задержание последа, послеродовые заболевания половых органов).

Состояние половых органов контролирует ветеринарный специалист методом ректального исследования на 5-7-й и 15-20 дни после отела и последующих наблюдений в течение полутора-двух половых циклов.

Коровы с нарушенным половым циклом, гинекологически нездоровые, к использованию в качестве доноров непригодны.

При отборе и подборе коров-доноров для получения эмбрионов методом *in vivo* необходимо учитывать индивидуальные особенности суперовуляции, и первоначальное количество отобранных коров-доноров должно превышать потребность в них в 2-3 раза. Отбор коров-доноров производится непосредственно в хозяйствах (на фермах). Окончательный отбор проводят после установления реакции коров на введение гонадотропных препаратов для

индукции суперовуляции. При отсутствии реакции на гормональную обработку корову в группу доноров не переводят. Коров, прошедших разовую гормональную обработку и давших биологически полноценных эмбрионов, не менее 4-х за первую операцию, переводят в группу коров-доноров и составляют об этом акт (см. приложения).

3.3. Индукция суперовуляции

Проведение процедуры индукции суперовуляции у самок животных включает в себя введение гонадотропных гормонов, обладающих действием стимуляции роста (развития) антральных фолликулов яичника. В практике получения эмбрионов для проведения процедуры индукции суперовуляции используют препараты, содержащие следующие виды гонадотропинов:

- 1) Сывороточные гонадотропины – гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК, eCG);
- 2) Гипофизарные гонадотропины – фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, FSH);
- 3) Рекombинантный ФСГ – полученный рекомбинантным методом (Рек-ФСГ, R-FSH).

Наиболее используемыми на практике по эффективности индукции суперовуляции являются препараты, содержащие гонадотропины гипофизарного происхождения. В настоящее время получают ФСГ и ЛГ (лютеинизирующий гормон) из гипофиза животных (свиней, овец) или рекомбинантным способом. В отличие от гонадотропных препаратов, полученных, например, из сыворотки крови жеребых кобыл, гипофизарные гонадотропины имеют короткий период полураспада, не нарушают воспроизводительную функцию животного после проведения процедуры индукции суперовуляции, сохраняют чувствительность яичников к вводимым гонадотропинам, не вызывают аллергических реакций.

Для полноценной реализации реакции и достижения успеха при проведении индукции суперовуляции в организме животного, помимо постоянного уровня ФСГ, необходимо одномоментное присутствие ЛГ. ФСГ вызывает и стимулирует рост и созревание фолликулов в яичниках, а ЛГ инициирует, в последующем, их овуляцию. Соотношение ФСГ/ЛГ имеет большое значение для получения хороших результатов индукции суперовуляции. При этом, диапазоном их соотношений, необходимых для оптимальной реакции суперовуляции у млекопитающих, является соотношение ФСГ/ЛГ, которое составляет 1/0,001-1/1 и используется при производстве коммерческих препаратов.

При проведении индукции суперовуляции общепринятым является 8-10-кратное введение в лютеальную фазу полового цикла коровам- и телкам-

донорам препаратов, содержащих ФСГ и ЛГ, каждые 12 часов в течение 4-5 дней в общей дозе 30-50 единиц Арморовского стандарта (Арм.ед.) или 700-1000 международных единиц (МЕ) и с последующим введением простагландина F2 α через 48 часов после первой инъекции ФСГ.

Для оптимизации процедуры индукции суперовуляции препаратами, содержащими гипофизарный ФСГ, разрешено их применение в виде однократной инъекции композиции полной дозы препарата (30-50 Арм.ед. или 700-1000 МЕ) с пролонгатором – полиэтиленгликоль (ПЭГ) и последующее через 48 часов после инъекции этой композиции (препарат ФСГ+ПЭГ) введение препарата простагландина F2 α . Для снижения вариативности ответной реакции, повышения результативности индукции суперовуляции и выхода пригодных к использованию в репродукции эмбрионов допустима обработка доноров биологически активными препаратами (витамины, стимуляторы, пептиды). Повторную процедуру индукции суперовуляции у доноров эмбрионов проводят по прошествии как минимум одного полового цикла.

Для индукции суперовуляции применяют различные схемы гормональной обработки. Наиболее используемыми являются следующие схемы:

Схема 1

Индукция суперовуляции с применением
сывороточного гонадотропина (ГСЖК)

День эстрального цикла	Препарат/ мероприятие	Доза
2	Витамин	10 мл
10-12	ГСЖК; Витамин	2500-3000 М.Е.; 10 мл
12-14	Простагландин F2 α	4 мл
14-16	ЛГ (Гн/Пр)/ Охота и осеменение,	5 мл
21-23	Вымывание эмбрионов	

Схема 2

Индукция суперовуляции с применением
гипофизарного гонадотропина (ФСГ)

День эстрального цикла	Препарат/ мероприятие	Доза
10	ФСГ	утро – 2,5 мл / вечер – 2,5 мл
11	ФСГ	утро – 2,0 мл / вечер – 2,0 мл
12	ФСГ	утро – 1,5 мл / вечер – 1,5 мл
13	ФСГ - простагландин F2 α	утро – 1 мл – 3 мл /вечер – 1 мл – 1,5 мл
15	Охота и осеменение	
22	Вымывание эмбрионов	

Применяемые с целью индукции суперовуляции гормональные препараты должны быть допущены к использованию на территории РФ, иметь не истёкший срок годности и храниться в условиях согласно инструкции и требованиям к применению и хранению гормональных препаратов.

После проведения процедуры индукции суперовуляции составляют акт (см. приложения), где указывают название препарата, его серию, дату выпуска и срок годности, производителя и протокол (схему) введения.

3.4. Осеменение доноров эмбрионов. Требования, предъявляемые к семени и быкам- производителям

Осеменением должны заниматься высококвалифицированные техники, знающие особенности охоты у суперовулировавших доноров.

Для осеменения доноров применяют цервикальный метод введения спермы. Осеменение доноров проводят с применением стерильных инструментов одноразового использования. Наиболее предпочтителен ректоцервикальный способ, позволяющий контролировать состояние половых органов коров и более глубоко вводить сперму в тело матки. При проведении процедуры искусственного осеменения необходимо следовать правилам:

- 1) доноров следует осеменять трижды с 12-часовым интервалом;
- 2) семя необходимо оттаивать в теплой воде (35-37 °С) в течение 15-20 сек.;
- 3) инструмент рекомендуется проводить через шейку матки как при обычном искусственном осеменении;
- 4) введение спермы в один из рогов матки при осеменении донора недопустимо. Лучшим способом считается введение спермы поровну в каждый из рогов матки.

Отсутствие признаков полового возбуждения у донора в период осеменения может свидетельствовать о низкой реакции яичников на введённые гонадотропины. Таких коров выявляют до 5-7 %.

При отсутствии признаков охоты у суперовулировавших доноров либо повторяют обработку, либо проводят обычное осеменение.

Повторные слизистые выделения у донора через 2-3 дня после осеменения свидетельствуют о низкой вероятности получения жизнеспособных эмбрионов при вымывании, так как в яичниках, на месте фолликулов, не образовались полноценные желтые тела. При увеличении числа таких случаев по стаду специалистам необходимо обратить внимание на условия содержания и полноценность кормления доноров.

Для осеменения коров-доноров используют семя выдающихся быков-производителей, проверенных по качеству потомства, признанных улучшателями по селекционным признакам, прошедших молекулярно-

генетические и цитогенетические исследования на предмет отсутствия наследственных заболеваний и стабильности генетического аппарата.

Подбор производителей и коров-доноров ведется в соответствии с планом селекционно-племенной работы.

С целью получения удовлетворительных результатов суперовуляции рекомендуют использовать дозу спермы от 20 млн. и более живых спермиев с прямолинейно-поступательным движением.

Семя для осеменения самок-доноров должно быть получено и обработано согласно положениям Главы 4.6 кодекса здоровья наземных животных МЭБ.

После проведения процедуры по осеменению донора составляют акт, где указывают все характеристики быка, чье семя использовалось, количество затраченных доз семени и т.д. (см. приложения).

3.5. Учет реакции и извлечение эмбрионов

Вымывание эмбрионов проводят на 7-8-й день после осеменения. Первый день эстрального цикла доноров принимают за ноль. Перед вымыванием эмбрионов из матки донора проводят учет реакции яичников на введение гонадотропинов. Непосредственно перед вымыванием эмбрионов проводят подсчет желтых тел и неовулировавших фолликулов. Следует учитывать, что полноценное желтое тело при ректальной пальпации представляет собой бугорок, твердый на ощупь и имеющий на верхушке небольшое углубление - «ямку», а неовулировавшие фолликулы - флюктуируют и имеют нечеткие границы.

Эффективность получения эмбрионов во многом зависит от способа их извлечения, квалификации персонала, правильного использования приборов и инструментов.

Вымывание эмбрионов современными устройствами имеет ряд преимуществ: относительная простота исполнения, без риска нарушить воспроизводительную способность животных и повторного использования их в качестве доноров. Для вымывания эмбрионов не требуется специального операционного помещения, что позволяет успешно применять его непосредственно на животноводческих фермах.

Процедура вымывания эмбрионов представляет собой подачу промывочного раствора в рога матки самки-донора, орошения внутренней полости рога матки с целью смыва находящихся там эмбрионов, забора промывочного раствора с эмбрионами из рога матки, сбор его в специальный сосуд и/или локализации вымытых эмбрионов в эмбриосборнике.

Для проведения процедуры вымывания эмбрионов необходимо иметь фиксационный станок; катетеры для извлечения эмбрионов и необходимые к

ним вспомогательные инструменты (стилеты, мандрены, манжетки и т.д); системы для подачи и оттока промывочной среды, состоящие из гибких шлангов и трубок с зажимами; шприцы и устройства для подачи и забора промывочного раствора; промывочные среды, представляющие собой буферные растворы с добавленными к ним питательными веществами и антибиотиками; устройства и фильтры для локализации вымываемых эмбрионов; терапевтические средства для расслабления матки и прямой кишки донора.

Инструменты и устройства для проведения процедуры вымывания, сбора и локализации эмбрионов могут быть различной модификации и отличаться техническими характеристиками.

Методы извлечения эмбрионов способом вымывания их из матки зависят от модификации и технических характеристик используемого инструментария и могут быть разными по своему техническому исполнению:

- Метод «шприцевания» – оператор вводит двуканальный катетер в рог матки донора, далее через катетер путем нагнетания промывочный раствор подаётся в дозах 20-60 мл в рог матки донора и забирается оттуда путем отсоса при помощи шприца Жане, на каждый рог матки используют 300-500 мл промывочного раствора;
- Метод «самотёка» – двуканальный катетер вводят в рог матки, и через него промывочный раствор самотёком подается по системе трубок во внутреннюю полость рога матки, в дозе 20-60 мл, затем подачу прекращают, перекрыв подающий канал системы. Далее технолог проводит манипуляции с рогом матки, открывает заборный канал системы, и промывочный раствор с эмбрионами через катетер по системе трубок поступает в эмбриосборник или сосуд для его сбора. При этом методе можно использовать и трехканальный катетер, при этом необходимость прерывания циклов подачи и забора промывочного раствора отпадает, так как конструкция такого катетера позволяет проводить эти этапы синхронно. Для промывания одного рога матки используют 300-500 мл промывочного раствора.
- Комбинированный метод – через установленный в роге матки двуканальный катетер по подающему каналу системы промывочный раствор при помощи нагнетательного устройства (шприц, насос, помпа) в дозах 20-60 мл поступает во внутреннюю полость рога матки, затем подающий канал системы перекрывают, технолог проводит манипуляции с рогом матки, открывают заборный канал системы, и промывочный раствор с эмбрионами

через катетер по системе трубок поступает в эмбриосборник или сосуд для его сбора. При использовании трехканального катетера необходимость прерывания циклов подачи и забора промывочного раствора отпадает, так как конструкция такого катетера позволяет проводить эти этапы синхронно. Для промывания одного рога матки используют 300-500 мл промывочного раствора.

Промывочные растворы, которые используются для вымывания эмбрионов, содержащие биологические продукты животного происхождения, не должны содержать патогенных микроорганизмов. Среды и растворы, используемые для вымывания эмбрионов, стерилизуют принятыми способами, описанными в Руководстве IETS (Международного общества пересадки эмбрионов), и подвергают манипуляциям в условиях, гарантирующих поддержание стерильности. Антибиотики должны добавляться в среды, используемые для отбора, манипуляции, промывки и хранения, согласно рекомендациям Руководства IETS.

Процедуру вымывания эмбрионов проводят, соблюдая все правила обращения с животными, техники безопасности и с соблюдением норм и правил ветеринарного контроля. После проведения процедуры вымывания эмбрионов составляют акт (см. приложения), где указывают все характеристики донора, применяемый метод, все характеристики используемого промывочного раствора.

3.6. Требования, предъявляемые к эмбрионам, полученным методом *in vivo*, и к условиям их обработки.

При получении эмбрионов методом *in vivo* проводят вымывание эмбрионов из матки донора на 7- 8 день после первого осеменения. Полученные таким способом эмбрионы коров подвергают микроскопическому исследованию при помощи стереомикроскопа или бинокулярной лупы при 150-200-кратном увеличении. Характеризуют и классифицируют их согласно ГОСТ 28424-2014 «Средства воспроизводства. Эмбрионы крупного рогатого скота. Технические условия» (далее- ГОСТ 28424-2014).

При работе с эмбрионами соблюдают все предписания и правила, отраженные в ГОСТ 28424-2014, в кодексе здоровья наземных животных МЭБ (глава 4.7 статья 4.7.5) и ветеринарном законодательстве РФ.

В плане распространения болезней пересадка эмбрионов, полученных *in vivo*, представляет собой метод передачи генетического материала, несущий низкий риск.

Вне зависимости от вида животных процесс получения и трансплантации

эмбрионов делится на три этапа, определяющие окончательный уровень риска:

1) Первый этап, относящийся к болезням, не входящим в категорию 1 по классификации IETS (Международного общества пересадки эмбрионов) (Статья 4.7.14. кодекса здоровья наземных животных), касается вероятности риска заражения эмбрионов, который зависит от:

- а) эпизоотического положения региона;
- б) ветеринарного состояния поголовья или стада и доноров, от которых получают эмбрионы;
- в) патогенности возбудителей, от которых региональные органы ветеринарного контроля стремятся защитить свою территорию.

2) На втором этапе ведётся снижение риска с помощью международных принятых процедур обработки эмбрионов, которые определены в Руководстве IETS и ГОСТ 28424-2014. Такие процедуры включают следующие действия:

а) эмбрионы должны промываться минимум десятикратно при минимальном разведении 1/100 между каждой промывкой, а для переноса эмбрионов между промывками каждый раз должна обязательно использоваться новая пипетка;

б) допускается групповая промывка исключительно эмбрионов, взятых у одного животного, а их число не должно превышать десяти в каждой промывке;

в) после промывки исследуют блестящую оболочку каждого эмбриона по всей поверхности для исключения её повреждения и отсутствия посторонних включений.

г) при транспортировке к эмбрионам должны прилагаться необходимые документы, подписанные ответственным ветеринарным врачом группы по получению эмбрионов, в котором подтверждается проведение указанной обработки эмбрионов.

Среды, используемые при обработке и промывки эмбрионов, в состав которых входят биологические продукты животного происхождения, не должны содержать патогенных микроорганизмов.

Среды и растворы, используемые для обработки и хранения эмбрионов, стерилизуют принятыми способами, описанными в Руководстве IETS, и подвергают манипуляциям в условиях, гарантирующих поддержание стерильности.

Антибиотики должны добавляться в среды, используемые для отбора, манипуляции, промывки и хранения, согласно рекомендациям Руководства IETS.

После проведенных лабораторных исследований составляют акт, где отражают все характеристики полученных эмбрионов (см. приложения).

3.7. Криоконсервация эмбрионов, полученных методом *in vivo*

Глубокое замораживание эмбрионов и хранение их в жидком азоте при температуре -196°C обеспечивает длительное сохранение их жизнеспособности и проведение трансплантации в любое удобное время.

Замораживание эмбрионов проводят с помощью автоматических программируемых аппаратов, обеспечивающих регулирование скорости охлаждения в заданных режимах.

Автоматические программные замораживатели являются сложными приборами, состоящими из 3-х основных частей: электронного блока, камеры для замораживания и емкости с жидким азотом. В качестве хладагента используют пары жидкого азота.

Для замораживания используют только свежеполученные эмбрионы отличного и хорошего качества согласно ГОСТ 28424-2014. Продолжительность времени подготовки эмбрионов к замораживанию должна быть минимальной. Работы по подготовке эмбрионов к замораживанию проводят в стерильном помещении с использованием стерильных инструментов.

Для защиты эмбрионов от негативного воздействия низких температур и повреждения при замораживании и оттаивании применяют криопротекторы (например, глицерин, этиленгликоль).

Перед замораживанием эмбрионы последовательно помещают в растворы криопротектора возрастающей концентрации, в каждом из них выдерживают для уравнивания осмотического давления. Проводку эмбрионов через ряд последовательных концентраций производят под микроскопическим контролем. Используют четырехлучные чашки Петри, которые накрывают сверху крышками и указывают на них номер донора.

Схема насыщения эмбрионов глицерином

Порядковый номер раствора	1,0 М раствора		1,4 М раствора	
	концентрация глицерина	выдержка минут	концентрация глицерина	выдержка минут
1	0,25 М	5	0,46 М (3,3%)	5
2	0,50 М	5	0,92 М (6,6%)	5
3	0,75 М	5	1,4 М (10%)	10
4	1,0 М	10		-

После выдержки в последнем растворе криопротектора эмбрионы готовы к замораживанию.

Подготовленные к криоконсервированию эмбрионы переносят в пайеты

(соломинки) объемом 0,25 мл, в которых проводят замораживание эмбрионов. В соломинках замораживают по 1-2 эмбриона, заправку компонентов в соломинку проводят в такой последовательности: раствор культуральной среды (2/5 объема соломины), пузырек воздуха, 1,4 М глицерин, пузырек воздуха, эмбрион в 1,4 М глицерина (1/5 объема), воздух, 1,4 М раствор глицерина (2/5 объема соломы), пузырек воздуха, раствор культуральной среды. При этом обязательным условием является то, чтобы среда с эмбрионом не смешивалась и была разделена столбиком воздуха до оттаивания. В соломинку эмбрион переносят с помощью 1 мл шприца с резиновым переходником, либо микропипеткой. Среду подводят к пыжку, который размокая, фиксирует все столбики жидкостей, заправленные в пайету. Другой конец соломины закрывают пластмассовой пробкой подходящего диаметра.

Соломинки с эмбрионами маркируют и подвергают глубокому замораживанию. Данные маркировки заносят в соответствующий журнал.

Процесс замораживания эмбрионов состоит из следующих этапов:

- 1) подготовленные для замораживания соломинки с эмбрионами, помещают в соответствующее гнездо замораживающей камеры и проводят охлаждение от 20 до $-6^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$;
- 2) затем проводят искусственную кристаллизацию (Seeding). Для этого касаются стенки соломинки переохлажденным в жидком азоте пинцетом или каким-либо другим предметом;
- 3) охлаждение проводят со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до -35°C ;
- 4) осуществляют перенос эмбрионов в жидкий азот.

Пайеты (соломинки) с эмбрионами помещают в охлажденный пластмассовый гоблет, на котором нестирающимся маркером указывается количество эмбрионов, номер донора и номер быка, порода, наименование хозяйства, дата замораживания. Гоблет помещают в сосуд Дьюара. Все манипуляции с пайетами с замороженными эмбрионами необходимо проводить в жидком азоте, избегая перепада температур, так как это отрицательно сказывается на качестве эмбрионов.

Замораживание эмбрионов проводят с соблюдением всех правил и требований, отраженных в кодексе здоровья наземных животных МЭБ (глава 4.7 статья 4.7.8).

Вся информация по криоконсервации эмбрионов отражается в акте (см. приложения).

Методы получения и трансплантации эмбрионов коров in vitro

Многочисленными исследованиями показано, что ооциты из антральных фолликулов яичников коров и половозрелых телок могут созревать *in vitro*. При этом непременным условием является сохранение связи ооцита с клетками кумулюса в процессе созревания. Поэтому важно выделить из фолликулов ооциты в комплексе с окружающими клетками кумулюса, так называемые комплексы ооцит-кумулюс (КОК).

В технологии получения эмбрионов *in vitro* используются два способа получения женских гамет. Во-первых, ооциты могут быть аспирированы из поверхностных антральных фолликулов яичников животных прижизненно (метод *ovum pick-up*, OPU). Процедура выполняется с минимальным хирургическим вмешательством, при этом предварительная гормональная обработка животного не является обязательным условием, а выделенные ооциты созревают *in vitro*. При этом выделение ооцитов у одного животного может проводиться с интервалом в 1–2 недели. Второй способ получения гамет представляет собой выделение ооцитов из антральных фолликулов постубойных животных.

При получении эмбрионов методом *in vitro* ооциты отбирают у доноров главным образом двумя методами: индивидуальный отбор и отбор партией. Рекомендуемые требования к каждому из них различны.

Индивидуальный отбор заключается обычно в том, что проводят интروагинальную пункцию яичников с целью аспирации фолликулярной жидкости с ооцитами у живых животных, осуществляется такая процедура на ферме, где содержатся животные или в лаборатории при помощи специального оборудования под визуальным контролем с применением УЗИ-сканера. Иногда ооциты могут быть взяты из яичников живых доноров пункцией после ампутации этих органов. Когда ооциты извлекаются у живых животных, последующие процедуры, касающиеся доноров, должны находиться в соответствии с положениями и требованиями к донорам как при получении эмбрионов методом *in vivo* (глава 4.7 статья 4.7.4. кодекса здоровья наземных животных МЭБ). В этих случаях обязательны очистка и стерилизация инвентаря (например, зонда) после каждого использования у донора согласно рекомендациям, содержащимся в Руководстве Международного общества пересадки эмбрионов (IETS).

Если ведётся отбор партиями, яичники отбирают на бойне у убитых самок; затем изъятые яичники отправляют в лаборатории по обращению и

отбору эмбрионов, где и производится отбор ооцитов аспирацией фолликулов. Отбор партиями имеет один недостаток, а именно – невозможность установления принадлежности поступивших в лабораторию яичников конкретным животным. Данный недостаток может быть устранен при дальнейшем развитии электронных методов идентификации отдельных животных. При этом следует строго следить за отбором исключительно здоровых тканей и добиваться, чтобы сам отбор у доноров и транспортировка материала в лаборатории проходили в надлежащих санитарных условиях.

Помимо этого:

1) Ветеринарным органам должно быть известно поголовье или стадо, из которого поступили доноры.

2) Доноры не должны поступать из поголовья или стада, на которое наложены ветеринарные ограничения по ящуру, чуме крупного рогатого скота, чумы мелких жвачных - ЧМЖ; отбор тканей или аспирация ооцитов не должны проводиться в заражённой зоне, а также в зоне, на которую наложены ветеринарные ограничения.

3) В случае отбора ооцитов у живых доноров следует проводить последующий надзор как их самих, так и поголовья или стада их происхождения.

4) Партии яичников и других тканей, отправляют в лабораторию, занимающуюся практическим получением эмбрионов методом *in vitro*, только после подтверждения, что результаты обследования доноров до и после убоя являются благоприятными.

7) Оборудование, используемое для взятия и транспортировки яичников и других тканей, предварительно подвергают стерилизации и применяют исключительно по назначению.

8) Регистрационные номера и данные о происхождении доноров вносятся в регистрационный журнал, который хранится в течение минимум 2-х лет, последовавших за получением эмбрионов.

В случае с отбором партиями могут возникнуть трудности со сбором таких сведений. Однако регистрационные номера поголовий или стад, из которых поступили доноры, должны фиксироваться в отдельном деле.

После проведения отбора ооцитов составляется акт (см. приложения).

4.1. Технологические процедуры и требования к ним при получении эмбрионов методом *in vitro*

Использование метода *ovum pick-up* в технологии IVP может способствовать ускоренному получению потомства ценных в генетическом отношении животных, у которых имеются нарушения в воспроизводстве, не

связанные с функцией яичников, или не проявляется адекватная реакция суперовуляции в ответ на гормональную обработку. Более того, эта технология позволяет получать полноценные эмбрионы для трансплантации при выделении ооцитов из яичников здоровых животных, в том числе и находящихся на разных сроках стельности. Существенным достоинством этого источника является хорошее качество получаемых ооцитов.

Другим источником женских гамет являются яичники, получаемые при убое животных. В этом случае также могут быть разово получены эмбрионы от ценных особей, выбраковка которых по ряду причин необходима. В промышленном масштабе этот источник используется для увеличения поголовья и повышения генетического потенциала в мясном скотоводстве. Кроме того, именно на нем основываются области эмбриологии и биотехнологии, для которых требуется использование зрелых яйцеклеток или эмбрионов на самых ранних стадиях развития, например, получение клонированных и генетически-модифицированных животных. Это доступный и недорогой источник ооцитов крупного рогатого скота, хотя они по качеству могут уступать полученным методом ovum pick-up.

4.1.1 Транспортировка яичников

После удаления из брюшной полости морфологически нормальные яичники освобождают от соединительной ткани и помещают в термос, содержащий стерильный раствор Дюльбекко или физиологический раствор с добавлением антибиотиков. Температура во время транспортировки зависит от времени, необходимого для доставки яичников в лабораторию.

4.1.2 Выделение ооцитов.

Выделяемые из яичников ооциты представляют собой предельно гетерогенную популяцию. На качество получаемых ооцитов может влиять ряд различных факторов, связанных с физиологическим статусом донора, в том числе уровень гормонов в крови и стадия эстрального цикла, а также морфология яичника, биохимические характеристики фолликулярной жидкости, диаметр и уровень атрезии фолликулов.

Яичники могут быть оценены по наличию и стадии желтого тела, а также по количеству и размеру поверхностных антральных фолликулов. Наибольшим потенциалом развития обладают ооциты, выделенные из яичников коров, находящихся на ранней лютеиновой стадии эстрального цикла, 0–7 дней, на поверхности которых имеется более 10 фолликулов с диаметром >10 мм или большое количество средних по размеру 2–5 мм в диаметре фолликулов.

Выделение ооцитов проводится в стерильных условиях при комнатной температуре около 25–27°C без применения нагревательных поверхностей.

Аспирация является наиболее распространенным и более быстрым методом выделения ооцитов, однако этот метод способствует нарушению целостности кумулюса в комплексе ооцит-кумулюс (КОК). Применение метода аспирации оправдано при стабильном поступлении достаточного количества яичников, что позволяет отбирать для дозревания наиболее подходящие по морфологическим показателям КОК.

При применении метода рассечения поверхности яичника получают большое количество ооцитов с неповрежденным кумулюсом, однако при этом общий пул получаемых ооцитов более гетерогенен.

При предварительном выделении цельных фолликулов определяют их уровень атрезии. Предварительное выделение фолликулов позволяет отобрать здоровые или находящиеся на ранних стадиях атрезии фолликулы для получения КОК. После разрывания стенки фолликула ооциты выделяются с сохранением целостности кумулюса, что существенно для качественного дозревания ооцитов *in vitro*.

4.1.3 Отбор ооцитов

В технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* требуются ооциты, способные возобновлять мейоз, дозревать и оплодотворяться *in vitro* с получением жизнеспособных эмбрионов, пригодных для дальнейшей трансплантации.

4.1.4 Дозревание отобранных ооцитов

Дозревание отобранных ооцитов проводят в течение 22–23 часов после выделения в среде дозревания (например, ТСМ-199) с добавлением лабильных элементов (глутамина, пирувата, цистеина) и фетальной сыворотки коров.

Все технологические процедуры с ооцитами для получения эмбрионов методом *in vitro* должны проводиться согласно принятым протоколам с соблюдением всех правил и предписаний, направленных на исключение возможности распространения инфекционных заболеваний через трансплантацию эмбрионов, полученных таким способом и соблюдением техники безопасности.

4.1.5 Оплодотворение дозревших *in vitro* ооцитов

Для оплодотворения используют, как правило, криоконсервированное семя быков. Одним из методов выделяют фракцию подвижных сперматозоидов, свободных от семенной плазмы и компонентов сред. Оплодотворяющая способность сперматозоидов может существенно варьировать у разных особей. Как правило, концентрация подвижных сперматозоидов при оплодотворении дозревших *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота составляет $0,5-1,0 \times 10^6$ сперматозоидов/мл. Семя, используемое для оплодотворения ооцитов *in vitro*,

должно соответствовать санитарным условиям и стандартам, предусмотренным в Главе 4.6. кодекса здоровья наземных животных МЭБ в зависимости от вида животных. При использовании для оплодотворения ооцитов семени, происходящего от умерших производителей, или от таких, ветеринарный статус которых по одной или нескольким болезням, от которых требуется защититься, не был известен на момент отбора семени, могут потребоваться дополнительные исследования неиспользованных эмбрионов с целью удостоверения, что эти болезни не были им переданы. Другой метод предполагает исследование аликвотной части самого семени, отобранного в тот же день.

Совместное инкубирование ооцитов и сперматозоидов проводят в среднем в течение 18–20 часов в средах, пригодных для оплодотворения (например, TALP-Fertility). День оплодотворения, обычно, считают нулевым.

4.1.6 Культивирование эмбрионов *in vitro* до ранних предимплантационных стадий развития, пригодных для нехирургической трансплантации реципиентам

После завершения инкубирования ооцитов и сперматозоидов, предполагаемые зиготы освобождают от клеток кумулюса и помещают в среду культивирования (например, SOF, KSOM, и др.), содержащую соли неорганических кислот, включая бикарбонат натрия, пируват натрия, лактат натрия, глутамин, глюкозу, растворы заменимых и незаменимых аминокислот. В среду также добавляют фетальную сыворотку коров, бычий сывороточный альбумин или их макромолекулярные заменители (например, поливинилпирролидон) в сочетании с факторами роста и витаминами. Стадий развития, пригодных для нехирургической трансплантации (компактной морулы, бластоцисты, экспандированной бластоцисты), полученные *in vitro* эмбрионы достигают на 6-7 сутки культивирования.

4.1.7 Требования к работе с биологическим материалом и инструментами

Биологические продукты животного происхождения, в том числе культуральные клетки и составляющие жидкостей, использованных для отбора ооцитов, созревания, оплодотворения, культивирования, вымывания и хранения, не должны содержать живых патогенных возбудителей. Среда должны подвергаться предварительной стерилизации по утвержденным методикам, описанным в Руководстве IETS, а при манипуляциях оставаться стерильными. Антибиотики должны добавляться в жидкости и среды так, как рекомендовано в Руководстве IETS.

Инвентарь, используемый для отбора, манипуляций, культивирования, вымывания, замораживания и хранения ооцитов/эмбрионов, должен быть стерильным.

4.2. Требование к эмбрионам крупного рогатого скота, полученных методом *in vitro*

Оценку полученных *in vitro* эмбрионов коров проводят при помощи стереомикроскопа или бинокулярной лупы при 150-200-кратном увеличении. Характеризуют и классифицируют их согласно ГОСТ 28424-2014.

4.3. Криоконсервация эмбрионов полученных методом *in vitro*

Эмбрионы крупного рогатого скота, полученные методом *in vitro*, по ряду морфологических характеристик существенно отличаются от полученных *in vivo* эмбрионов и являются более чувствительными к воздействию факторов, связанных с криоконсервацией. В результате их криоконсервации с использованием технологии медленного замораживания жизнеспособность эмбрионов, полученных методом *in vitro*, существенно снижается.

В этой связи криоконсервацию эмбрионов, полученных методом *in vitro*, рекомендуется проводить методом витрификации. Витрификация представляет собой процесс перехода водных растворов при отрицательных температурах в стекловидное прозрачное твердое состояние без образования кристаллов льда. За счет своих технологических особенностей, в частности сверхвысокой скорости прохождения через критическую температурную зону в интервале от 15 до -5°C , в результате витрификация оказывается более эффективным методом криоконсервации, по сравнению с медленным замораживанием таких криочувствительных объектов, как полученные методом *in vitro* эмбрионы крупного рогатого скота. При проведении витрификации используется ряд проникающих (этиленгликоль, ДМСО, глицерин) и непроникающих (сахароза и т.д.) криопротекторов.

Основными этапами метода витрификации являются: инкубация эмбрионов в растворе эквilibрации, во время которой происходит вытеснение воды из цитоплазмы и насыщение эмбрионов проникающими криопротекторами; краткая инкубация в растворе витрификации, содержащего высокие концентрации проникающих и непроникающих криопротекторов, с целью обезвоживания эмбрионов, максимально быстрое погружение носителя с нанесенными на него эмбрионами в жидкий азот. При проведении отогревания витрифицированные эмбрионы максимально быстро переносят из жидкого азота в раствор отогревания, содержащий непроникающие криопротекторы в высокой концентрации, а затем проводят через ряд растворов с постепенно понижающейся осмолярностью. Большинство современных методик витрификации с высокой результативностью основываются на принципе охлаждения минимального объема. Для достижения максимальных скоростей

охлаждения и нагревания объем образца, содержащего эмбрионы, не должен превышать 0,1 мкл. При криоконсервации по методу витрификации полученных *in vitro* эмбрионов млекопитающих используется широкий ряд носителей открытого и закрытого типов (Патент РФ на изобретение №2584584 от 20.05.16г. «Система и устройство (варианты) для криоконсервации группы ооцитов и эмбрионов млекопитающих по методу витрификации при использовании в качестве носителя полого волокна» (авторы Маленко Г. П., Корниенко Е. В., Косовский Г. Ю.)).

Требования к консервации и транспортировке эмбрионов согласно кодексу здоровья наземных животных МЭБ:

- 1) В одну группу криоконсервации должны входить эмбрионы, полученные от одной самки-донора или происходящие из одной партии.
- 2) Эмбрионы должны криоконсервироваться в очищенных и стерильных контейнерах с жидким азотом, а затем храниться с соблюдением строгих условий гигиены в специально предназначенном для этой цели месте.
- 3) Носители с криоконсервированными эмбрионами маркируются, как указано в Руководстве IETS.
- 4) После проведения процедуры по криоконсервации эмбрионов заполняют соответствующую документацию, в которой отражены характеристики доноров, эмбрионов и проведенных процедур.

ГЛАВА 5

Этапы и техника трансплантации эмбрионов

5.1. Требование к реципиентам

В качестве реципиентов отбираются взрослые коровы и телки:

- телок для использования в качестве реципиентов отбирают в возрасте 16-20 мес., с живой массой 340-400 кг;
- реципиенты должны иметь крепкую конституцию и заводскую упитанность;
- отобранные реципиенты должны быть сосредоточены в стационарном месте со стабильным полноценным рационом кормления в течение 3-х мес. после трансплантации эмбрионов;
- реципиенты должны быть клинически здоровыми;
- проходить обязательное обследование на инфекционные заболевания (бруцеллез, туберкулез, вирусные респираторные заболевания, лейкоз, трихомоноз, вибриоз, ящур и др.)

- обязательная дегельминтизация предоставляемого поголовья для отбора в качестве реципиентов за 1,5 месяца до пересадки эмбрионов;
- обязательное проведение биохимического анализа крови предоставляемого поголовья для отбора в качестве реципиентов на содержание макро- и микроэлементов и представлением результатов анализа;
- реципиенты должны быть с нормальной физиологией половой системы без патологии родовых путей;
- в качестве реципиентов используют наименее ценных в племенном отношении животных;
- нельзя использовать в качестве реципиентов животных мелких пород для трансплантации эмбрионов от пород более крупных по массе.

После проведения мероприятий по отбору и комплектования группы реципиентов составляется акт (см. приложения).

5.2. Требование к методам управления и синхронизации половых циклов у доноров и реципиентов.

Управление половым циклом и синхронизация половой охоты (в пределах ± 12 ч) у доноров и реципиентов - важный элемент подготовки животных к получению и пересадке эмбрионов в запланированные сроки.

При подготовке реципиентов к трансплантации свежеполученных эмбрионов необходимо учитывать, что ко времени процедуры не все отобранные и прошедшие гормональную обработку реципиенты будут подходить по необходимым показателям к тому, чтобы им провели трансплантацию эмбриона. В этой связи надо исходить из расчета потребности на 1 донора должно быть подготовлено 3-5 реципиентов, при этом половая охота у подготавливаемых реципиентов должна совпадать с днем первого осеменения донора. Число реципиентов на одного донора может быть увеличено до 10 и более при суперовуляции донора, имеющего стабильный и высокий выход пригодных эмбрионов, а также при наличии криоконсервированных эмбрионов.

В практической работе по трансплантации эмбрионов коров выявить необходимое число реципиентов в спонтанной половой охоте в течение одного дня практически невозможно. Поэтому чтобы ко времени пересадки эмбрионов было необходимое поголовье реципиентов, проводят гормональную обработку отобранным для трансплантации коровам и телкам с целью управления их половым циклом и индуцирования у них половой охоты.

Гормональная обработка доноров и реципиентов позволяет управлять интродуцируемыми процессами, выравнивая стадии полового цикла, что позволяет планировать работы при пересадке эмбрионов без их

криоконсервации или использовать криоконсервированные эмбрионы для трансплантации большому числу реципиентов.

Для управления половым циклом и синхронизации половой охоты у доноров и реципиентов применяют препараты, разрешённые к использованию на территории РФ и содержащие такие гормоны как - прогестерон, синтетические аналоги простагландина F2 α , различные релизинг-факторы.

Для проведения мероприятий по управлению половыми циклами и синхронизации половой охоты у доноров и реципиентов применяют разработанные схемы и режимы введения гормональных препаратов.

Накопленные данные показывают, что асинхронность половых циклов у доноров и реципиентов снижает процент стельности, если реципиент приходит в охоту позднее донора более чем на 12 ч (-12ч) или раньше донора более чем на 24 ч (+24 ч). Поэтому при проведении мероприятий по синхронизации необходимо рассчитать длительность схем и режимов, чтобы день первого осеменения донора совпадал с днем охоты у реципиента. Следует иметь в виду, что синхронизация охоты донора и реципиента не должна проводиться отвлеченно, без учета стадии развития эмбрионов.

После проведения мероприятий по синхронизации половых циклов у доноров и реципиентов составляют акт, где указывают применённые схемы и режимы введения гормонов, все характеристики применяемых препаратов и результаты гормональной обработки (см. приложение).

5.3. Трансплантация эмбрионов реципиентам

В практической работе по трансплантации эмбрионов применяют нехирургический метод пересадки. Трансплантация эмбрионов реципиентам нехирургическим методом представляет собой процедуру переноса эмбриона из пайеты (соломинки) в рог матки реципиента. Такая процедура проводится при помощи специальных катетеров под ректальным контролем половых органов. Этот метод требует хороших навыков, позволяющих избежать травмирования слизистой оболочки половых путей, и его проводят в строгом соответствии со всеми требованиями и правилами по контролю и профилактики инфекционных заболеваний.

Приживляемость эмбрионов в большой степени зависит от синхронности проявления эструса у доноров и реципиентов. Наилучшие результаты приживляемости эмбрионов достигаются при полной синхронности полового цикла у донора и реципиента. Допустимы отклонения синхронности не более чем на один день.

Успешность приживляемости пересаженных эмбрионов также зависит от места их локализации в роге матки при проведении процедуры трансплантации,

по накопленным данным у реципиентов чаще отмечалось наступление стельности, если трансплантируемый эмбрион был расположен оператором ближе к верхушке рога матки. В этой связи профессионализм оператора и технические возможностей используемого инструментария оказывают прямое влияние на успешность мероприятий по трансплантации эмбрионов.

Оборудование и инструменты.

Пересадка эмбрионов производится с помощью специальных катетеров со вспомогательными инструментами и различных расходных материалов.

Мероприятие по пересадки эмбрионов состоит из следующих этапов:

1) Оттаивание эмбрионов

Оттаивание эмбрионов проводят в водяной бане при температуре воды 30°C . Требуемую соломинку быстро извлекают из канистры и помещают в водяную баню до момента почти полного исчезновения льда. Выдерживают в водяной бане 10-15 сек . Во время оттаивания соломинку плавно перемещают в воде маятникообразными движениями.

Оттаянные эмбрионы вместе со средой, в которой они находились в замороженном состоянии, переносят на стекло и проводят предварительную морфологическую оценку их качества. Эмбрионы последовательно помещают в заранее приготовленные растворы криопротектора в убывающей концентрации. Отмывку эмбрионов от криопротектора проводят по следующей схеме.

Схема отмывки эмбрионов от криопротектора - глицерина

Порядковый номер раствора	1 М раствора		1,4 М раствора	
	концентрация глицерина	выдержка (мин)	концентрация глицерина	выдержка (мин)
1	1,0 М	10	1,40 М	10
2	0,75 М	5	1,0 М	5
3	0,50 М	5	0,75 М	5
4	0,25 М	5	0,5 М	5
5	среда ФБС*	10-20	0,25 М	5
6			среда ФБС*	10-20

*ФБС - фосфатно-солевой буфер + 20% сыворотки крови

После трехкратной отмывки в ФБС + 20% сыворотки их помещают в эту же среду на 10-20 минут. Если были выявлены эмбрионы с морфологическими признаками, указывающими на их сомнительные качества, то такие эмбрионы выдерживают в термостате при 37°C до 2 часов с последующей их морфологической оценкой.

По окончании промывки оценивают жизнеспособность эмбрионов под микроскопом по морфологическим признакам. Эмбрионы, признанные

годными, используют для пересадки. Все операции по удалению криопротекторов проводят при комнатной температуре под микроскопическим контролем.

При использовании соломин, заправленных с сахарозой, проводят одноэтапное разбавление криопротектора раствором сахарозы в той же соломине. Для этого соломину после оттаивания встряхивают подобно клиническому термометру 3-4 раза для вытеснения пузырьков воздуха и смешивания, находящихся в ней растворов. Для уравнивания осмотического давления соломины размещают при температуре 25°C или 37°C в вертикальном положении на 15 минут. Проводят смену положений «верх-низ» с таким расчетом, чтобы в конце выдержки пьж находился в верхнем положении. Под лупой контролируют наличие эмбриона в соломинке и, по возможности, определяют его качество. После проведения указанных манипуляций эмбрион готов к пересадке. Данные по подготовке и проведению замораживания и оттаивания эмбрионов заносят в журнал криоконсервирования и использования эмбрионов.

2) Заправка инструментов эмбрионами для пересадки.

Подготовка инструментов для пересадки эмбрионов проводится в боксе, в стерильных условиях. Для пересадки эмбрионов весь инструментарий перед работой стерилизуют кипячением в течение 30 мин, затем подсушивают и выдерживают до начала работы с эмбрионами в настольном боксе под бактерицидными лампами. Перед началом работы с эмбрионами включают бактерицидные лампы.

При использовании для пересадки классических инструментов типа Кассу эмбрион заправляют в длинную тонкую соломину (диаметром 1 мм). Заправленную соломину, вставляют в наконечник устройства и присоединяют его к основной трубке. Прибор готов к работе, он передается специалисту по пересадке или сохраняется непродолжительное время в термостате или специальном термоконтейнере при температуре 37°C. Такие инструменты, как правило, изготовлены из нержавеющей стали, довольно жесткие и их технические возможности не позволяют осуществлять доставку трансплантируемого эмбриона в верхушку рога матки реципиента не нарушив целостности эндометрия.

При использовании для пересадки инструментов с эластичными капиллярами (патент РФ на полезную модель №154919 «Устройство для аппликации эмбрионов крупного рогатого скота» (авторы Косовский Г.Ю., Попов Д.В., Бригида А.В.)) эмбрион заправляют в эластичный капилляр и передают его оператору для пересадки. Такое устройство позволяет провести процедуру трансплантации эмбриона в верхушку рога матки реципиента, а

также осуществлять транспортировку и трансплантацию эмбрионов на фермах за несколько километров от пункта трансплантации. При этом теплый (37°C) заряженный капилляр помещают в утепленный контейнер, имеющий внутри такую же температуру. Контейнер транспортируют в горизонтальном положении, избегая резких толчков и наклонов. Запасные соломины с эмбрионами для пересадки перевозят в тщательно упакованном виде в этом же контейнере при температуре 37°C.

После транспортирования эмбрионов проверяют сохранность первоначального чередования воздуха и среды в каждой пайете (соломинке) и, если она не нарушена, помещают пайету в катетер и проводят пересадку.

Инструменты после пересадки одного эмбриона моют и дезинфицируют спиртом, орошают стерильной средой Дюльбекко, вставляют соломинку с эмбрионом, прибор помещают в чехол и проводят пересадку. При использовании устройств с эластичными капиллярами, дезинфицируют только зонд-направитель, а эластичный капилляр утилизируют. По окончании пересадки все использованные приборы и оборудование моют, дезинфицируют и готовят к следующему этапу работ.

3) Подготовка реципиентов

Подготовка реципиентов к пересадке эмбрионов осуществляется так же, как и при подготовке доноров для нехирургического извлечения зародышей:

- животных фиксируют в станке, наружные половые органы обмывают теплой водой с мылом, дезинфицируют 70%-ным этанолом, делают сакральную анестезию 2%-ным раствором новокаина (5 мл). Сильно возбудимым животным вводят релаксанты внутримышечно в дозе 0,5-0,8 мл;

- подготовленный к пересадке прибор (катетер) вводят во влагалище до шейки матки, вынимают защитный чехол и под ректальным контролем проводят катетер через цервикальный канал. При этом выполняют ректально те же манипуляции, что и во время введения катетера при нехирургическом извлечении эмбрионов. Осторожным движением катетер подвигают ближе к верхушке рога матки, ректально контролируя положение округлой головной части прибора. Убедившись в правильности расположения прибора, плавным нажатием на поршень устройства вводят содержимое соломины в просвет рога матки. Также плавным и осторожным движением прибор вынимают из полости матки.

- при использовании устройства для пересадки эмбрионов с эластичным капилляром (патент РФ на полезную модель №153867 от 09.07.2015г. «Устройство для сбора эмбрионов животных» (авторы Косовский Г.Ю., Попов Д.В., Бригида А.В.)) оператор вводит во влагалище зонд-направитель, удаляет защитный чехол, под ректальным контролем проводит зонд-направитель через

цервикальный канал к точке бифуркации и размещает его так, чтобы выходное отверстие на дистальном конце было развернуто в сторону канала рога матки, в который будет осуществляться трансплантация эмбриона, затем осторожным движением, через зонд-направитель, проводит эластичный капилляр с заправленным в него эмбрионом в рог матки и при достижении верхушки плавным нажатием на шприц вводит содержимое с эмбрионом в рог матки.

Как правило, эмбрион пересаживают в рог матки на стороне желтого тела в яйчнике.

По окончании пересадки животных кормят и содержат в обычных условиях, не допуская скученности, травмоопасных и других стрессовых ситуаций.

После пересадки эмбрионов, ведут контроль за возможным проявлением повторной охоты у животных-реципиентов. На 60-90 день после пересадки животных исследуют на наличие стельности методом ректальной пальпации. Строго контролируют случаи и частоту аборт стельных реципиентов. Окончательные показатели пересадки эмбрионов учитывают по результатам отела.

После проведения мероприятий по трансплантации эмбрионов составляют акт (см. приложения).

ГЛАВА 6

Учет и отчетность

Метод трансплантации эмбрионов требует четкой организации и последовательности работ, пунктуального и добросовестного оформления документации. Правильный учет на всех этапах технологии трансплантации эмбрионов необходим для постоянного контроля и анализа результатов, применения отдельных схем, режимов и методов в работе, что позволит повысить эффективность применения метода этого в практике животноводства.

На каждого животного донора и реципиента, поступающего для работы по трансплантации эмбрионов, заполняется соответственно оформленная карточка племенной коровы, телки. К карточке прилагают пояснительную записку или зоотехническо-гинекологическую карточку с характеристикой воспроизводительной способности животного и других показателей, перечисленных в требованиях при отборе коров-доноров. На выбракованных из молочного стада коров указывают причину выбраковки.

На быков-производителей, семя которых используется для осеменения коров-доноров, заполняется карточка племенного быка или племсвидетельство.

На каждого теленка, полученного методом трансплантации эмбрионов, в день его рождения составляют акт на оприходование приплода, ведется журнал регистрации приплода и выращивания молодняка крупного рогатого скота.

На каждого племенного бычка и телочку заполняется карточка теленка-трансплантанта.

Оперативный учет работ, непосредственно связанный с технологией трансплантации эмбрионов, осуществляется с помощью специальных карточек для животного: доноров, реципиентов и телят-трансплантантов. Лицевая сторона карточки донора и реципиента заполняется при отборе животных в хозяйстве, на основании данных первичного зоотехнического племенного учета, клинической и гинекологической диспансеризации, а также непосредственного осмотра и ректального контроля родополовых органов. Обратная сторона карточки предназначена для учета и контроля исполнения каждого элемента технологии трансплантации эмбрионов.

Одновременно ведется учет и регистрация работ в следующих рабочих журналах:

- учета поступления и использования доноров;
- гормональной индукции суперовуляции доноров;
- извлечения, оценки качества и использования эмбрионов;
- криоконсервирования и использования эмбрионов;
- учета результатов пересадки эмбрионов.

Вся информация в процессе работы сразу заносится в карточку или журнал с указанием даты и непосредственно исполнителя работ.

По результатам работы за каждый месяц заведующий составляет отчет, в который включает:

- итоговые показатели работы по трансплантации эмбрионов;
- опись и карточки на каждого используемого в работе донора, реципиента и полученного методом пересадки эмбрионов теленка;
- копию акта результатов ректального исследования реципиентов на стельность.

По итогам работы за год составляют годовой отчет с анализом деятельности по основным элементам технологии и экономической эффективности применения метода в производстве.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

КАРТОЧКА ДОНОРА (КОРОВА/ТЕЛКА)

Инв. № _____ Откуда поступило животное: _____

Кличка _____ Дата _____ Хозяйство _____

Дата рождения _____ Ферма _____

Живая масса _____ кг.

Порода _____

Молочная продуктивность

Лактация по счету	Удой за 305 дней, кг	% жира	% белка	Стадия лактации	Среднесуточный удой, кг	Примечание

Воспроизводительная функция

Дата отела	Исход отела	Послеродовые заболевания	Меры лечения	Дата прихода в охоту					Примечание
				1	2	3	4	5	

Средняя продолжительность эстрального цикла _____ дней

Результаты ректального исследования

Дата	Состояние влагалища и матки	Яичники (размер, кол-во и состояние ЖТ и Ф)		Примечание	Ф.И.О. специалиста
		левый	правый		

Результаты лабораторных исследований _____

Физиологическое состояние животного _____

Содержание, кормление _____

Заключение специалиста при отборе коровы в качестве донора _____

Дальнейшее использование _____

Дата _____

Ф.И.О. _____

Продолжение приложения 1

Обработка коровы-донора № _____

День эстрального цикла	Дата	Время (час. мин.)	Препарат	Доза	Способ инъекции	Ф.И.О. специалиста

Охота, осеменение после обработки

Дата	Охота			Осеменение			Ф.И.О. специалиста	
	Время (час.)		Интенсивность	Выделения	Дата	Время (час.)		Бык
	начало	конец						

Извлечение эмбрионов

Реакция яичников		Премедикация
левый	правый	
		Инструмент _____ Среда _____ Ф.И.О. специалиста _____

Результаты извлечения эмбрионов

Рог матки	Дата	Время извлечения, час		Среда		Обнаружено			Ф.И.О. специалиста
		начало	конец	введено, мл	получено, мл	эмбрионов		неоп-х яйцекл.	
						норм.	деген.		
Левый									
Правый									
Всего									

Использование эмбрионов

Результат	Дата	Время (час. мин.)	Количество	№ реципиентов	Примечание
Пересажено					
Заморожено					
Культировано					

Воспроизводительные функции после извлечения эмбрионов _____

Дальнейшее

использование

Дата _____

Ф.И.О. _____

Приложение 2**АКТ**

на вымывание и пересадку свежеполученных эмбрионов

_____ от _____ 20__ г.
 (наименование хозяйства)

Мы, нижеподписавшиеся, в лице _____

_____,
 (должность специалистов по вымыванию эмбрионов, наименование организации, ФИО)

_____,
 (должность специалистов хозяйства, наименование хозяйства, ФИО)

составили настоящий акт о том, что _____ 20__ г. произвели вымывание эмбрионов от _____ коров-доноров _____ породы № _____ – получено _____ эмбриона, № _____ – получено _____ эмбрионов, № _____ – получено _____ эмбрионов. Всего было получено _____ эмбрионов. Из _____ свежеполученных эмбрионов, _____ эмбрионов пересадили телкам-реципиентам _____ породы за № _____, которые были отобраны из _____ голов телок-реципиентов, согласно ректальным исследованиям яичников и обнаружения в них семидневного желтого тела. Всем телкам-реципиентам проводили синхронизацию полового цикла. К акту прилагается плем. свидетельства быка и коров-доноров, список реципиентов.

О чем и составлен настоящий акт.

 (должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)

 (должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)

 (должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

 (должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

Приложение 3

Наименование организации проводившей

т.э. _____

Адрес _____

Наименование хозяйства _____

Район _____

Область _____

Тел. _____

Тел. _____

БЛАНК НА ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ № _____

Порода _____

Донор _____ № _____ Дата рождения _____

Дата осеменения _____

 телка первотелка корова

Дата вымывания _____

Порода _____

Получено эмбрионов _____

Бык-пр. _____ № _____

Дегенерированных _____

Количество осеменений / количество потраченных доз _____ / _____

Яйцеклеток _____

Подпись _____ Специалист _____

Пересажено _____

(ф.и.о.)

Заморожено _____

ИНФОРМАЦИЯ О ПЕРЕСАДКЕ ЭМБРИОНОВ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕЦИПИЕНТОВ

Дней после _____ Дата _____

№ реципиента _____ Порода _____ охоты _____ Стадия _____ Качество пересадки _____ Примечание _____

1.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
4.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
5.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
6.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
7.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
8.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

Подпись _____ Специалист _____

(ф.и.о.)

ИНФОРМАЦИЯ О ЗАМОРОЗКЕ ЭМБРИОНОВ / ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭМБРИОНОВ

№	Номер пайеты	№ эмбрионов/ пайеты	Колич. промывок	Обработка трипсином	Стадия	Качество	Неповрежд. зоны	Примечание
1.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
4.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
5.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
6.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

Время от вымывания до заморозки _____ (мин/час). Крипротектор и последняя концентрация 1,5 М этиленгликоль. Режим заморозки: Температура при сидинге -6°C Скорость охлаждения -0,5°C/мин. Конечная температура -35°C

Рекомендуемый метод оттаивания: 5 секунд на воздухе, 20 секунд в водяной бане 30°C, пересадка

Подпись _____ Специалист _____

(ф.и.о.)

Приложение 4

АКТ
на отбор телок-реципиентов

_____ от _____ 20__ г.
(наименование хозяйства)

Мы, нижеподписавшиеся, в лице _____

(должность специалистов по вымыванию эмбрионов, наименование организации, ФИО)

(должность специалистов хозяйства, наименование хозяйства, ФИО)

составили настоящий акт в том, что _____ 20__ г. был произведен отбор телок-реципиентов _____ породы в количестве _____ голов для пересадки эмбрионов, с живой массой от _____ до _____ кг и в возрасте от _____ до _____ месяцев. Результаты осмотра показали, что они клинически здоровы и свободны от симптомов заразных болезней, которые указаны в требованиях по пересадке эмбрионов.

Список реципиентов прилагается

О чем и составлен настоящий акт.

(должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)

(должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)

(должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

(должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

Приложение 5

Подготовка телок-реципиентов для пересадки эмбрионов

« ___ » _____ 20__ г.

№ п/п	Инд. №	Дата рождения	Возраст, мес.	Живая масса, кг	Прод-ть матери Удой, кг	ж,%	Лейкоз		Туберкулез		Бруцеллез		Дегельминтизация
							дата исследования	результат	дата исследования	результат	дата исследования	результат	
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													

Главный зоотехник хозяйства: _____
(подпись, Ф. И. О.)

Главный ветеринарный врач хозяйства: _____
(подпись, Ф. И. О.)

АКТ

на пересадку эмбрионов

от _____ 20__ г.

(наименование хозяйства)

Мы, нижеподписавшиеся, в лице _____

_____,
(должность специалистов по вымыванию эмбрионов, наименование организации, ФИО)_____,
(должность специалистов хозяйства, наименование хозяйства, ФИО)

составили настоящий акт в том, что _____ 20__ г. произвели пересадку _____ заморожено-оттаянных эмбрионов _____ породы, телкам-реципиентам _____ породы в количестве _____ голов, которые были отобраны из _____ голов телок-реципиентов, согласно ректальным исследованиям яичников и обнаружения в них семидневного желтого тела. Всем телкам-реципиентам проводили синхронизацию полового цикла.

К акту прилагается список реципиентов.

О чем и составлен настоящий акт.

(должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)_____
(должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)_____
(должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)_____
(должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

Приложение 7
Список реципиентов

Хозяйство _____

Дата _____

№ п/п	Реципиент		Место пересадки эмбриона в рог		Использовано эмбрионов			Дата вымывания эмбриона		Оценка эмбрионов	
	корова, телка	инд. №	левый	правый	№ пайеты	донор	отец	стадия	качество		
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											

Специалист по трансплантации: _____
(подпись, Ф. И. О.)

Приложение 8
КАРТОЧКА РЕЦИПИЕНТА (ТЕЛКА/КОРОВА)

Инв. № _____
 Дата рождения _____
 Живая масса _____ кг.
 Порода _____
 Мол. пр-ть _____ кг, _____ %ж.
 (для телок пр-ть матери) _____

Кому принадлежит:
 Хозяйство _____
 Ферма _____
 Отметка о перемещении:
 Дата _____
 Куда _____

Синхронизация охоты

дата	Синхронизация время препарат, доза и способ инъекции	Охота			Ф.И.О. техника
		дата	время	интенсивность выделения	

Результаты ректального исследования

Дата	Влагалище, матка	Яичники		Примечание	Ф.И.О. техника
		левый	правый		

Результаты лабораторных исследований: _____

Физиологическое состояние животного: _____

Содержание, кормление: _____

Заключение специалиста при отборе реципиента: _____

Дата _____ Ф. И. О. _____

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ РЕЦИПИЕНТУ № _____

от донора № _____

Дата _____ Инструмент _____

Условия пересадки _____ Защитные приспособления _____

Пересадка эмбриона

Время (дни)	Место пересадки эмбриона в рог		Расположение в роге (середина, 2/3, верхушка)	Замечания по пересадке	Ф. И. О. специалиста
	левый	правый			
со дня извлечения до пересадки	операция (час. мин) начало	операция (час. мин) конец			

Характеристика эмбриона

Использован эмбрион	Дата и время получения эмбр.	Возраст эмбриона (дн.)	Морфологическая оценка и замечания по культивированию, проводке и оттаиванию	Культуральная среда, криопротектор	Прибор для замораживания, режим	Ф. И. О. специалиста по оценке и криоконсервации

Контроль пересадки

Местонахождение реципиента (хоз-во)	Дата		Проверка стельности		Ф. И. О. специалиста
	прихода в охоту после пересадки	осеменения	дата	метод	
	1	2			

Результаты пересадки и отела

Местонахождение реципиента (хоз-во)	Дата отела		Прод-ть ст-ти (дн.)		Получено приплода		Замечания по отелу	Дата охоты, осеменения реп.
	ожид.	факт.	инд. №	пол	ж. м., кг			

Использование, назначение животных

Реципиент	Дата	Кула переданы	Возраст	Живая масса	Назначение	Примечание

Приложение 9

АКТ

на ректальное обследование реципиентов.

_____ от _____ 20__ г.
 (наименование хозяйства)

Мы, нижеподписавшиеся, в лице _____,
 _____,
 (должность специалистов по вымыванию эмбрионов, наименование организации, ФИО)

 _____,
 (должность специалистов хозяйства, наименование хозяйства, ФИО)

составили настоящий акт о том, что _____ 20__ года было произведено ректальное обследование реципиентов на стельность, которым были пересажены эмбрионы с _____ по _____ 20__ года.

В результате ректального обследования выявлено следующее: из _____ обследованных реципиентов стельных составило _____ (____ %) голов, яловых _____ голов.

Список реципиентов прилагается.

О чем и составлен настоящий акт.

 (должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)

 (должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)

 (должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

 (должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

АКТ

на получение приплода

(наименование хозяйства)

от _____ 20__ г.

Мы, нижеподписавшиеся, в лице _____

(должность специалистов по вымыванию эмбрионов, наименование организации, ФИО)

(должность специалистов хозяйства, наименование хозяйства, ФИО)

составили настоящий акт о том, что был получен приплод от трансплантации.

От реципиента под № _____ был получен теленок инд. № _____ (пол - _____, живой массой при рождении _____ кг).

От реципиента под № _____ был получен теленок инд. № _____ (пол - _____, живой массой при рождении _____ кг).

От реципиента под № _____ был получен теленок инд. № _____ (пол - _____, живой массой при рождении _____ кг).

К акту прилагается карточка теленка-трансплантанта.

О чем и составлен настоящий акт.

(должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)

(должность специалиста по вымыванию эмбрионов, наименование организации, подпись, ФИО)

(должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

(должность специалиста хозяйства, наименование хозяйства, подпись, ФИО)

Приложение 11

КАРТОЧКА ТЕЛЕНКА-ТРАНСПЛАНТАНТА

Инв. № _____ Пол _____ Порода _____ Дата рожд. _____ Ж. м., кг _____

Хозяйство _____ Эмбриопересадка (дата) _____ Использов. эмбрион _____
(свежий, культивир-ый, заморож.-оттаяный)

Мать-донор №	Отец №	Реципиент №
Дата рожд. _____	Дата рожд. _____	Дата рожд. _____
Порода _____	Порода _____	Порода _____
Живая масса, кг _____	Живая масса, кг _____	Живая масса, кг _____
Удой за 305 дн. лактации:	Прод.-ть М _____ кг, ж% _____	Пр-ть М (для телок)
1. _____ кг, ж% _____	Категория _____	Лактация _____
2. _____ кг, ж% _____	Оценка по кач-ву потомства	Удой _____ кг, ж. % _____
3. _____ кг, ж% _____	_____	Собственная пр-ть:
4. _____ кг, ж% _____	_____	Лактация _____
5. _____ кг, ж% _____	_____	Удой _____ кг, ж. % _____
Хозяйство _____	Хозяйство _____	Хозяйство _____
Ферма _____	_____	Ферма _____

Показатели роста

Возраст, месяцев																		
при рождении	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.
Живая масса, кг																		
Среднесуточный прирост (г)																		

Хозяйственное использование

Назначение	Возраст (мес.)	Живая масса (кг)
При первом осеменении (телки)		
К началу использования (быка)		

Перемещение животного

Дата	Куда (хозяйство)	Возраст (лет. мес.)	Живая масса (кг)	Цель перемещения

Специалист: _____
(подпись, Ф.И.О.)Специалист хозяйства: _____
(подпись, Ф.И.О.)

Приложение 17

ОТЧЕТ О РАБОТЕ ПО ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ
ЗА _____ МЕСЯЦ 20__ г.

Использовано доноров	Получено качественных эмбрионов	Заморожено эмбрионов	Произведено эмбриопересадок	Стельных реципиентов	Получено телят
за месяц с 1.01.20__ г.					

Приложение 18

ОТЧЕТ
по трансплантации эмбрионов по хозяйству
за _____ 20__ год

№ п/п	Выполненная работа	За месяц	Всего с начала года
1.	Отобрано коров (телок) для использования в качестве доноров, гол.		
2.	Выбыло коров (телок) из числа доноров		
3.	Имеется доноров на отчетную дату		
4.	Обработано доноров для вызывания суперовуляции		
5.	Использовано доноров для извлечения эмбрионов		
6.	Получено зародышей всего, в т.ч.		
	нормальных		
	дегенерированных		
	неоплодотворенных яйцеклеток		
7.	Заморожено эмбрионов		
8.	Отобрано и подготовлено реципиентов		
9.	Проведено эмбриопересадок, всего, в т. ч.		
	замороженно-оттаянных		
10.	Исследовано реципиентов на стельность ректально, в т. ч.		
	установлена стельность, гол.		
11.	Получено телят от эмбриопересадок в т. ч.		
	мертвожденных		
12.	Абортировано реципиентов		

Список использованной литературы

1. Бабенков, В.Ю.; Бабенкова Л.В.; Якубец Ю.А.; Токолов В.П. Средство, пролонгирующее действие фолликулостимулирующего гормона, индуцирующего суперовуляцию у коров-доноров // заявка № 20020647, дата подачи 2002.07.23, зарегистрирована в госреестре изобретений 2009.07.27 // Патент Республики Беларусь на изобретение № 12490.
2. Гост 28424-2014 Средства воспроизводства. Эмбрионы крупного рогатого скота. Технические условия. Москва Стандартиформ 2015 с - 23.
3. Кодекс здоровья наземных животных / Всемирная организация здоровья животных МЭБ / Двадцать четвёртое издание, 2015 г. ISBN: 978-92-9044-993-5.
4. Косовский Г. Ю., Попов Д. В., Бригида А. В., / Трехканальный катетер, предназначенный для нехирургического извлечения эмбрионов у животных, со спиральным дистальным концом подающего канала / Патент Российской Федерации на полезную модель №160215
5. Косовский Г. Ю., Попов Д. В., Бригида А. В., / Трехканальный катетер, для нехирургического извлечения эмбрионов у животных / Патент Российской Федерации на полезную модель №160216
6. Косовский Г. Ю., Попов Д. В., Бригида А. В., / Установка для нехирургического извлечения эмбрионов у животных / Патент Российской Федерации на полезную модель №156767
7. Косовский Г. Ю., Попов Д. В., Бригида А. В., / Устройство для сбора эмбрионов животных / Патент Российской Федерации на полезную модель №153867
8. Косовский Г. Ю., Попов Д. В., Бригида А. В., / Устройство, обеспечивающее непрерывность циклов циркуляции промывочной жидкости при проведении процедуры вымывания эмбрионов из матки животного с использованием системы для нехирургического извлечения эмбрионов с замкнутым контуром / Патент Российской Федерации на полезную модель №156768
9. Косовский Г.Ю., Попов Д.В., Бригида А.В., Волколупов Г.В., / Суперовуляция у коров-доноров эмбрионов калмыцкой породы при применении пролонгированной формы препарата ФСГ / Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса 2015, №3(39), 106-108 с
10. Мадисон В.В., Мадисон В.Л. Трансплантация эмбрионов в практике разведения молочного скота. - М: ВО «Агропромиздат», 1988 г., стр. 67-71

11. Маленко Г. П., Корниенко Е. В., Косовский Г. Ю. / Устройство для витрификации ооцитов и эмбрионов млекопитающих / Патент Российской Федерации № 141452
12. Маленко Г. П., Корниенко Е. В., Косовский Г. Ю. / Система и устройство (варианты) для криоконсервации группы ооцитов и эмбрионов млекопитающих по методу витрификации при использовании в качестве носителя полого волокна / Патент Российской Федерации № 2584584
13. Пташинская М. Краткое руководство по репродукции животных. Intervet International BV.. 2009 год.- 176 С.
14. Kuwayama M., Ladies K. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method Clinic /Theriogenology 67 (2007) 73–80

Оглавление

ГЛАВА 1	3
<i>Введение</i>	3
Цели и задачи трансплантации эмбрионов коров	3
ГЛАВА 2	4
<i>Этапы получения и трансплантации эмбрионов</i>	4
ГЛАВА 3	5
<i>Требования, предъявляемые к технологии получения и трансплантации эмбрионов коров in vivo</i>	5
3.1. Требования к организации по получению и трансплантации эмбрионов коров <i>in vivo</i>	5
3.2. Требования, предъявляемые к донорам эмбрионов	7
3.3. Индукция суперовуляции	9
3.4. Осеменение доноров эмбрионов. Требования, предъявляемые к семени и быкам- производителям	11
3.5. Учет реакции и извлечение эмбрионов	12
3.6. Требования, предъявляемые к эмбрионам, полученным методом <i>in vivo</i> , и к условиям их обработки.....	14
3.7. Криоконсервация эмбрионов, полученных методом <i>in vivo</i>	16
ГЛАВА 4	18
<i>Методы получения и трансплантации эмбрионов коров in vitro</i>	18
4.1. Технологические процедуры и требования к ним при получении эмбрионов методом <i>in vitro</i>	19
4.2. Требование к эмбрионам крупного рогатого скота, полученных методом <i>in vitro</i>	23
4.3. Криоконсервация эмбрионов полученных методом <i>in vitro</i>	23
ГЛАВА 5	24
<i>Этапы и техника трансплантации эмбрионов</i>	24
5.1. Требование к реципиентам	24
5.2. Требование к методам управления и синхронизации половых циклов у доноров и реципиентов.	25
5.3. Трансплантация эмбрионов реципиентам	26
ГЛАВА 6	30
<i>Учет и отчетность</i>	30
Приложение 1	33
Приложение 2	35
Приложение 3	36
Приложение 4	37
Приложение 5	38

Приложение 6.....	39
Приложение 7.....	40
Приложение 8.....	41
Приложение 9.....	43
Приложение 10.....	44
Приложение 11.....	45
Приложение 12.....	46
Приложение 13.....	47
Приложение 14.....	48
Приложение 15.....	49
Приложение 16.....	50
Приложение 17.....	51
Приложение 18.....	51
Список использованной литературы.....	52

Руководство по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота

Подписано в печать 03.04.2017.

Формат 60×90/16.

Бумага офсетная. Усл. печ. л. 4,4. Тираж 300 экз. Заказ 1835.

Отпечатано в ООО «Клуб Принт»

127018, Москва, 3-й проезд Марьиной рощи, д. 40, к. 1

Тел.: +7 (495) 669-50-09

ISBN 978-5-9909981-1-7



9 785990 998117