https://doi.org/10.52326/ismv2024.31
CZU: 636.292:612.646.089.67

PROCEDURI DE EMBRIOTRANSFER LA BIVOLIȚĂ (BIVOLUL INDIGEN ROMÂNESC)

Ștefan CIORNEI[1] *, Dan DRUGOCI[1], Liliana CIORNEI[1], Florin NECHIFOR[1], Petru ROȘCA[1]
[1] *University of Life Science, Faculty of Veterinary Medicine, Iași, Romania*
** Corresponding author: stefan.ciornei@iuls.ro*

Abstract. Reproduction management in buffaloes is a challenge for practitioners and researchers and any research in this regard is considered to be an important step in the development of bioeconomy. Recently, this species has been marginalized both in the field of research, biodiversity and production. Embryo transfer to ruminants is a biotechnique known and applied all over the world, but at a potential that is below par, compared to the benefits brought. Embryo transfer through the MOET or IVD method (new name), highlights the genetics of the female, those females selected as bull mothers. The ET IVD method is the cheapest because it does not consume many media and consumables like IVF. Through the polyovulation protocol carried out in Mediterranean buffaloes, the Romanian variety (BIR), is appreciated as variable and inconstant, regardless of the polyovulatory hormone used (pFSH vs eCG), according to the type of estrus (spontaneous sv induced), season and farm management. In the Romanian Indigenous Buffalo, the polyovulatory response generated an average of 3.57 CL/session (2.29 CL left ovary vs 1.28 right), with a predilection for the standing ovary of +28%. All embryos obtained had a high quality grade (code 6-1, 7-1) with a pregnancy rate of 25% per experiment and a total of 16.6% in recipients. At the Terra di Bufala farm in the town of Războieni, Iași county, it was reported in 2018 to the national profile forums (ARET), European (AETE) and world (IETS), the obtaining of the first Romanian buffalo calf obtained through embryo transfer biotechnology (ET IVD).
Keywords: Buffalo, embriotransfer (ET), MOET, IVD, polyiovulation.

INTRODUCERE

Deși au fost făcut progrese remarcabile în ceea ce privește aspecte ale fiziologiei reproducerii bubalinelor, cu toate acestea, recenziile anterioare (Palta și Chauhan 1998; Gasparrini si col. 2002) și contemporane sugerează că rata producției de embrioni transferabili rămâne la nivel inferior (Manjunatha și colab., 2009, Tobă G., si col. 2021). Rezultatele sunt destul de variabile între autori și sunt cel mai probabil legate de diferențele în fiziologia și particularitățile de reproducere la varietățile de bubaline, de calitatea gameților, sezonalitate, metabolismul și cerințele culturii în rândul bivoliilor (Otava G. și col. 2016). Sunt necesare, de asemenea, studii suplimentare pentru îmbunătățirea crioconservării embrionilor produși in vitro (Bogdan A.T., și col. 2010).

Cu toate că primul raport al obținierii primului vițel rezultat în urma embrio transferului la bivoliță a apărut cu mai mult de douăzeci de ani în urmă (Drost, 1983), activitățile de producție embrionară și ET ulterioare au fost limitate și s-au localizat pe lângă marile ferme, chiar și în țările în care bivolii au o tradiție și reprezintă baza industriei produselor lactate (Italia, India, Pakistan).

Așadar, managementul reproducției la bivolițe este o provocare pentru practicieni și cercetători și se consideră că orice cercetare în acest sens reprezintă un pas important în dezvoltarea bioeconomiei. În ultimul timp această specie a fost marginalizată atât în domeniul cercetării, biodiversității dar și al producție.

MATERIAL ȘI METODĂ

Mai multe protocoale de embrio-transfer la bivolițe au fost initiate în perioada 2017 – 2019 la o fermă privată *Terra di Bufala*, Războieni, Iași și la *Statiunea SCDB Șercaia*, Brașov. Astfel a fost vizată punerea în valoare a bivolițelor cele mai productive din ferme la momentul respectiv.

Astfel au fost selectate pe baza criteriilor zootehnice și ginecologice un număr de 7 bivolițe donatoare de embrioni.

Metoda IVD/MOET de embriotransfer folosită este cea clasică diferența o face schema de tratament folosit pentru poliovulație. În urma unor cercetări publicate în Bubaline Theriogenology IVIS (2015) și Hafez E., (2010) dezvoltarea embrionilor la bubaline au o evoluție mai rapidă cu aproximativ 24 h față de embrionii bovini.

Protocolul nr 1 de poliovulație cu eCG (Folligon) – 2500 UI, a constat în administrarea i.m. în ziua a 9-a a ciclului sexual, apoi, după 48 ore se administrează i.m. PGF2α (Estrumate) în doză de 15 mg (Prosolvin) și la 48 – 72h două însămânțări artificiale la interval de 12 ore; cu 2 ore înainte de prima I.A. s-a administrat i.v.1500 UI de hCG (Chorulon).

Protocolul de poliovulatie nr 2 cu pFSH (Pluset) – 1000UI, a constat în administrarea i.m. de 8 doze la 12 ore in doze descrescânde incepand din a 11-a zi a ciclului sexual, iar cu 48 de ore de la terminarea tratamentului, a fost admin PGF in doza dupal (Estrumate 2 ml la 12 ore)

In cazul în care nu se știe exact ciclul sexual al donatoarei, se utilizează spirale intravaginale cu progesteron administrate 11 zile (PRIDE).

Protocolul de sincronizare a receptoarelor de embrioni a fost organizat astfel: blocaj cu progesteron timp de 11 zile (intravaginal- PRIDE), in ziua 9 PGF 2ml (Estrumate), ziua 11 PMSG/eCG (1000 UI Folligon) și in ziua 13 HCG (1500UI Chorulon).

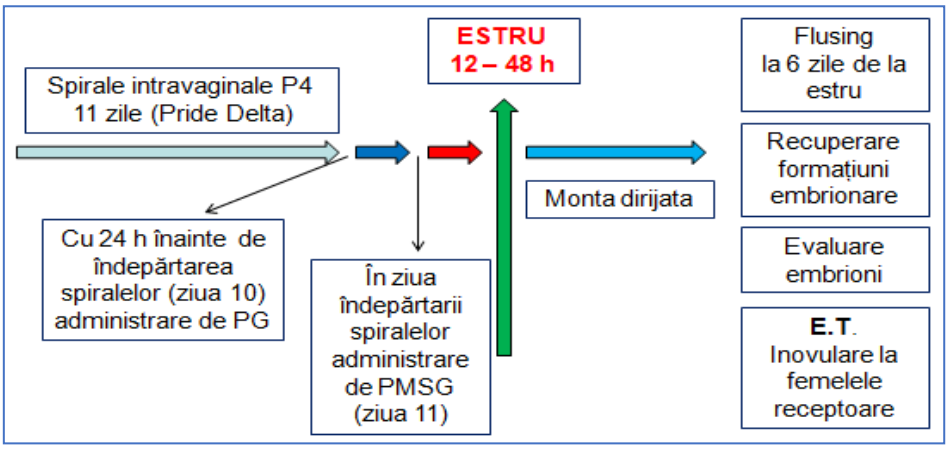


Figura 1. *Protocolul de poliovulație a donatoarelor cu P4-11-PG-eCG*
Ovulation synchronization protocol with PRIDE DELTA-PG-PMSG

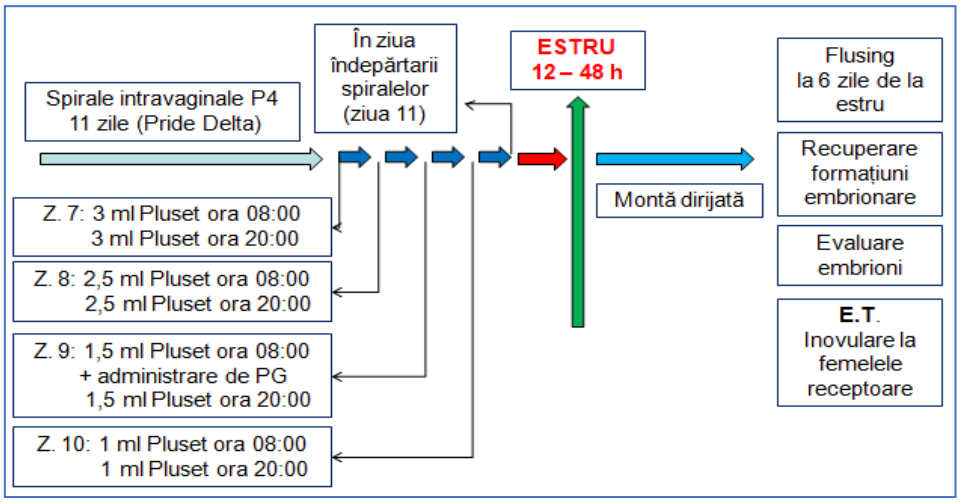


Figura 2. *Protocolul de poliovulației a bivolițelor donatoare cu Progesterone P4-PG-PLUSET*
Ovulation synchronization protocol with PRIDE DELTA-PG-PLUSET

REZULTATE

La donatoarea 1, după 6 zile de la montă au fost identificați doar trei corpi luteali pe ovarul stâng. Dimensiunea ovarelor a fost de 6/5 cm ovarul stâng și de 2/1 cm ovarul drept. Nu a fost posibilă recuperarea embrionilor din cauza agresevității bivoliței cu tot cu sedare și anestezie epidurală, deoarece la pasajul cervixului s-a produs o perforare a uterului lezionând structurile endometriale ceea ce a făcut ca experimentul să se oprească.

Apreciem un răspuns slab al bivolitei D1 la tratamentul cu Pluset 1000 UI, consecutiv estrului spontan, deoarece a produs ovulația doar a trei foliculi pe ovarul stâng.

În iulie 2017, au fost selectate două donatoare, bivolița 8043 la a doua lactație și cu peste 60 zile postpartum la care s-a administrat următorul tratament de poliovulație: P4-11 zile în asociație cu PGF-eCG (fig.1.) și bivolița 2013, la prima lactație, cu P4-11 zile – PGF- pFSH (fig. 2). În momentul apariției estrului s-a efectuat monta dirijată cu malac autorizat.

Sincronizarea bivolițelor receptoare a fost facută după schema P4-PG-PMSG-HCG, cu o sincronizare în același timp cu donatoarele și ulterior procesul ovulator de 100%, prin evidențierea CL eflorescent la 6 zile după tratament.

Bivolița cu numărul 8043 (D2) poliovulată cu PMSG 2500 U.I. a avut o reactivitate bună (6 CL) obținându-se la flusing patru embrioni, transferați la patru receptoare sincronizate. La diagnosticului de gestatie de la 45 de zile de la ET s-a stabilit o rată de gestație de 25%. Conform Asociației Române de Embrio Transfer (Raport ARET 2019 și AETE), a fost raportată fătarea primul vițel de bivol obținut prin ET la Bivolul Indigen Românesc.

Tabel 1. Proceduri de embriotransfer aplicate a sesiunilor de ET la bivolițe.The following table shows the attempts to apply ET sessions to buffaloes.

Dona-toare	data	locația	Metoda de poliovulație	Stimulare ovariana	Embrioni recoltați	observații
D1. 8869	02.2017	Terra di Buffala, Războieni	pFSH 100 UI, estru spontan ziua 10	3 CL ovar St	0 Leziuni cervico-uterine	monta cu taurul ION, nr. 08864 (Șercaia)
D2. 8043	07.2017	Terra di Buffala, Războieni	P4-11-PGF-eCG (2500UI)	6 CL (3st/3 dr)	4 embrioni (7-1)	Transfer la receptoare 25% RC
D3. 2013			P4-11 zile – PGF- pFSH (100UI)	3 CL (2 st/1dr)	0	Rata de recuperare 0
D4. 1552	05.2018	Terra di Buffala, Războieni	P4,11-PG-eCG- hCG	0 CL	0	foliculi neovulați
D5. 4623			PLUSET 1000 UI	3 CL (0/3dr)	2 embrioni (6-1)	Transferati la receptoare, 0% RC.
D6. 1852	09.2019	SCDB Șercaia	PLUSET 1000 UI dupa 2x PGF la 11 zile + GnRH	6 CL (4 st/2 dr)	0	Foliculi multipli la flushig
D7. 1971				4 CL (4dr/0st)	0	Ovar stang areactiv

Bivolița cu numărul 2013 (D3) cu Pluset a avut o reacție slabă la tratamentul de poliovulație. În momentul fazei estrale ovarul drept a avut o dimensiune de 3/2 cm, iar șapte zile mai târziu 3,5/3 cm cu prezența a doi corpi luteali; ovarul stâng de 2,9/1,8 cm, iar în faza estrală 2,5/1,5 cm și un corp luteal în momentul flusingului. În urma flusingului nu s-a reușit recuperarea embrionilor.

Donatoarea D1552 a fost poliovulată cu PMSG 2500 UI, după protocolul de sincronizare cu P4–PGF-eCG-hCG, în urma căruia au fost observați pe ovare foliculi evolutivi de diverse dimensiuni. În faza estrală au fost identificați peste 8 foliculi cu dimensiuni 0,8 - 1 cm pe fiecare ovar, dar și un folicul cu dimensiune mai mare, de 1,5 cm (fig. 3). In momentul flusingului pe ovare nu au fost identificați corpi luteali ci doar foliculi de dimensiuni mari și unii dintre aceștia cu septuri. Nu au fost recuperate formațiuni embrionare. Acțiunea stimulatorie a PMSG a fost foarte amplă asupra ovarelor cărora le-a indus creșterea multor foliculi, dar rezultatul este nesatisfăcător deoarece aceștia nu au ovulat, chiar dacă a fost administrată la momentul estrului și HCG 1500 UI.

Donatoarea D4623 a fost poliovulată cu PLUSET 1000 UI după protocolul cunoscut P4 – PG – FSHp.

În momentul estrului au fost identificati pe ovare 6 - 8 foliculi de aproximativ 0,6 -1 cm (fig.3), iar în momentul flusingului au fost observati 3 CL (fig.4) și alti câțva foliculi de dimensiuni medii neovulați.

În urma protocolului de flusing au fost recuperați doi embrioni, transferați direct, la două receptoare sincronizate (4625 și 3061). Diagnosticul de gestatie la 45 de zile de la transfer a fost negativ.

Sincronizarea receptoarelor a fost facută după schema P4 – PG - PMSG-HCG. Au fost selectate 5 receptoare care toate au manifestat faza estrală în același timp cu donatoarele și ulterior procesul ovulator a fost de 100%, prin evidențierea CL eflorescent la 6-7 zile.

Într-un alt studiu efectuat in septembrie 2019 la SCDB Șercaia, au fost examinate ca posibil donatoare de embrioni 4 bivolițe din care au fost selectate două (1852 D1 și 1971 D2). La 10 zile de la inducerea estrului cu PGF au fost poliovulate cu pFSH (Pluset) 6 administrari in 3 zile, (4+4, 3+3, 3+3 ml), în momentul estrului înainte de IA a fost administrat an alog GnRH (Receptal).

Rezultatele au arătat că la bivolițele de la SCDB Șercaia, a avut efect identificându-se astfel un nr total de 10 CL cu o medie de 5 CL. Răspunsul poliovulator general este sub datele oferite de alte experimente de această natură, posibil din cauza alimentației, insificienței susțineri hormonale din timpul protocolului terapeutic. La bivolița D2 ovarul stâng a fost areactiv în ciuda dimensiunii sale.



Figura 3. *Ovar de bivoliță cu 6 foliculi, la momentul estrului în poliovulația cu Pluset Buffalo ovary with 6 follicles, at the time of estrus with Pluset*



Figura 4. *Ovar de bivoliță cu 4 CL și dimensiune de 1,77/2,9 cm, Buffalo ovary with 4 CL and size of 1.77 / 2.9 cm*

DISCUȚII

Răspunsul ovarian la diverse scheme de hiperstimulare foliculară și poliovulație a fost apreciat ca variabil și inconstant, indiferent de hormonul poliovulator folosit (pFSH vs eCG), după tipul de estru (spontan sv indus), sezon și management de fermă. La Bivolul Indigen Românesc răsponsul poliovulator a generat în medie 3,57 CL / sesiune (2,29 CL ovar stâng vs 1,28 drept), cu o predilecție pentru ovarul stând de +28%. Toți embrionii obținuți au avut un grad de calitate

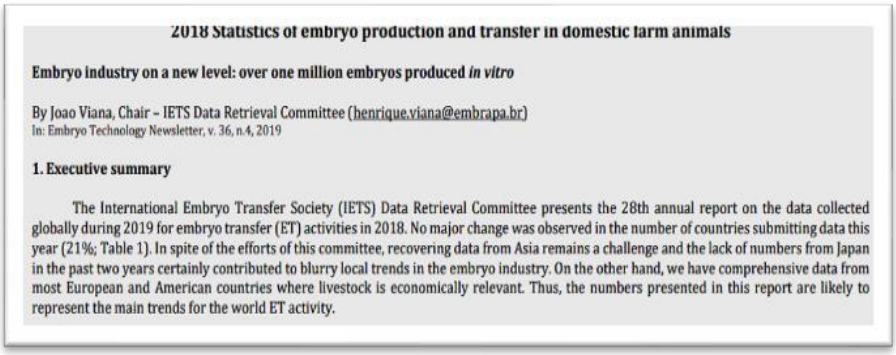
superioară (cod 6-1, 7-1) cu o rată de gestație la receptoare de 25 % pe experiment si totală de 16,6%.

Cunoașterea particularităților de specie, ale fiziologiei ovariene, alegerea terapiei optime pentru poliovulație și sincronizarea receptoarelor, dublate de aplicabilitatea continua a biotehnicilor de embriotransfer la bivolițe, poate produce rezultate încurajatoare.

În urma rezultatelor obținute după aceste experimente condiderăm că am îmbunătățit cunoștințele în domeniul biotehnologiei de reproducție la Bivolul Indigen Românesc. Prin publicațiile aferente a fost crescută vizibilitatea națională și internațională a reproducției asistate la bubalinele din România.

Datele obținute de noi în urma experimentelor de embrio-transfer la bivolițe, au fost raportate la IETS - Societatea Internațională de Embriotransfer din SUA, și publicate în decembrie 2019, iar la conferința anuală din data de 17 ianuarie 2020 au fost publicate activitățile privind ET la nivel internațional din anul 2018. La capitolul alte specii –reprezentate de BUFFALO, în Europa în anul 2018, numai Italia (producția in vitro) și România (in vivo) au raportat asemenea procedure (fig. 5).

Diseminarea rezultatelor a fost făcută și prin prezentări la conferințe și articole Proceeding și BDI, printre care amintesc: Conferința ESPERA 2019 a Academiei Române**,** unde Dl Dr Tobă Gh a prezentat rezultatele obținute la bivolul Indigen Românesc, și publicația în *Peter Lang GmbH (Verlag) a Identification, monitoring and conservation ofthe biodiversity of the national heritage ofthe Romanian buffalo breed, using breeding biotechnologies (Toba Gh. Și col 2021).*



2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals

Embryo industry on a new level: over one million embryos produced *in vitro*

By Joao Viana, Chair – IETS Data Retrieval Committee (henrique.viana@embrapa.br)
In: Embryo Technology Newsletter, v. 36, n.4, 2019

1. Executive summary

The International Embryo Transfer Society (IETS) Data Retrieval Committee presents the 28th annual report on the data collected globally during 2019 for embryo transfer (ET) activities in 2018. No major change was observed in the number of countries submitting data this year (21%; Table 1). In spite of the efforts of this committee, recovering data from Asia remains a challenge and the lack of numbers from Japan in the past two years certainly contributed to blurry local trends in the embryo industry. On the other hand, we have comprehensive data from most European and American countries where livestock is economically relevant. Thus, the numbers presented in this report are likely to represent the main trends for the world ET activity.

Table 13. Other species: IVD and IVP embryo collections and transfers

Region/ Country	IVD Embryos					IVP embryos					
	Flushes	Embryos	Embryo transfer			Donors	Oocytes	Embryos	Embryo transfer		
			Fresh	Frozen					Fresh	Frozen	
				Domestic	Foreign					Domestic	Foreign
Cervids											
Argentina	8	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Buffalo											
Italy	0	0	0	0	0	2	49	21	27	0	0
Romania	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	**3**	**6**	**0**	**0**	**0**	**2**	**49**	**21**	**27**	**0**	**0**

Figura 5. *Extras din Raportarea IETS din 17.01.2020, SUA. România și Italia au raportat activități de embrio-transfer la bubaline*
Quoted from the IETS Report of 17.01.2020, USA, Romania and Italy reported embryo-transfer activities in buffaloes

CONCLUZII

Embriotransferul la rumegatoare este o biotehnică cunoscută și aplicată în intreaga lume, dar la un potențial sub așterpari, raportat la beneficiile aduse. Embriotransferul prin metoda MOET sau IVD (denumirea nouă), pune în valoare genetica femelei, acele femele selectate ca mame de taur.

Metoda de ET IVD este cea mai ieftină deoarece nu este consumatoare de multe medii si consumabile ca FIV.

Prin protocolul de poliovulație efectuat la bivolitele Mediteraniene, varietatea Românească (BIR), este apreciat ca variabil și inconstant, indiferent de hormonul poliovulator folosit (pFSH vs eCG), după tipul de estru (spontan sv indus), sezon și management de fermă. La Bivolul Indigen Românesc răsponsul poliovulator a generat în medie 3,57 CL / sesiune (2,29 CL ovar stâng vs 1,28 drept), cu o predilecție pentru ovarul stând de +28%. Toți embrionii obținuți au avut un grad de calitate superioară (cod 6-1, 7-1) cu o rată de gestație la receptoare de 25 % pe experiment si totală de 16,6%.

La ferma Terra di Bufala din localitatea Războieni, jud Iași, a fost raportat în anul 2018 catre forumurile de profil naționale (ARET) europene (AETE) și mondiale (IETS), obținerea primului vițel de bivol românesc obținut prin biotehnologia de embriotransfer (ET IVD).

BIBLIOGRAFIE

1. Ciornei S. (2021). Embryo Transfer [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.99683. Available from: https://www.intechopen.com/online-first/78116

2. Ciornei S. 2021. Reproductive biotehnologies, practical guide, Editura "Ion Ionescu de la Brad", ISBN 978-973-147-435-9.

3. Ciornei S., Drugociu D., Rosca P., Ciornei L.,(2020), Increasing the genetic potential in a nucleus of Romanian Buffaloes, by artificial insemination with sexed semen, after stimulation with OvSynch protocol – A Case Report. 36th Annual Meeting of the Association of Embryo Technology in Europe (AETE). Anim Reprod, 17(3)

4. Hafez B., Hafez E.S.E., (2000), Reproduction in th farm animals, 7 ed, (Ed.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA

5. Mircu C., coord. (2020): Treatise on assisted reproduction (in Romanian), Ed agroprint, Timisoara, chapter 3, pages 139-168, ISBN 978-606-785-136-6

6. Runceanu L., Groza I.Ș., Șonea A., Zamfirescu S., Drugociu D., Roșca P., Ciornei Ș., Runceanu M., Iuga P., Drugociu D., Nechifor F., (2016), Seasonality of animal reproduction. (Ed.)Ion Ionescu de la Brad, Iași, Romania

https://doi.org/10.52326/ismv2024.32
CZU: 619:616.98:578.824.11-085.371

EFICIENȚA IMUNOLOGICĂ POSTVACCINALĂ ÎMPOTRIVA RABIEI LA VULPE PRIN DETECȚIA ANTICORPILOR ANTIRABICI POSTVACCINALI PRIN TEHNICA IMUNOENZIMATICA INDIRECTĂ (ELISA) ÎN REPUBLICA MOLDOVA

Maxim SÎRBU, Nicolae STARCIUC
Universitatea Tehnică a Moldovei

Abstract. The purpose of the conducted research was to establish the post-vaccination effectiveness of immunized foxes with vaccines applied as baits to reduce the incidence of rabies in wildlife from the territory of the Republic of Moldova. Vaccination was carried out as part of the national program of prophylactic vaccination in the period 2020-2023, by the aerial distribution method of the "Lisvulpen" vaccine, produced by the company Bioveta, Czech Republic.

The samples taken from the shot foxes (Vulpes vulpes) were sent for investigation to the Sanitary-Veterinary and Food Safety Laboratory, from Iasi, Romania, unique Laboratory Code RO213-ANSVSA. As samples for the research were fragments of the mandible (bone + teeth), thoracic fluid and brain samples. The samples were coded individually, the unique code, mandatory presentation of information such as: the age category of the animal, the place of sampling (district, locality), the place where the foxes were shot, the GPS coordinates (latitude and longitude), the origin of the samples (forest bypass, association by hunters).