

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Вологодская государственная молочнохозяй-
ственная академия имени Н.В. Верещагина»**

Факультет ветеринарной медицины и биотехнологий

Кафедра внутренних незаразных болезней,
хирургии и акушерства

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ
И ПОДГОТОВКА ЕЁ К ОСЕМЕНЕНИЮ**

***Методические указания
по проведению практических занятий***

для студентов по специальности среднего профессионального образова-
ния: 36.02.01 Ветеринария

Квалификация выпускника – Ветеринарный фельдшер
Форма обучения – очная

**Вологда – Молочное
2024**

УДК 636.082.453.52(071)

ББК 48.76р30

С о с т а в и т е л ь - Бритвина И.В., доцент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства, к.с.-х. наук

Р е ц е н з е н т ы:

Рыжакина Е.А., доцент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства, к.вет. наук

Бургомистрова О.Н., доцент кафедры зоотехнии и биотехнологии, к.с.-х. наук

ПМ 05.01 «Выполнение работ по одной или нескольким профессиям рабочих, должностям служащих»

Методические указания / Бритвина И.В. - Вологда- Молочное: 2024 г.
42 с.

Методические указания являются дополнительным материалом для изучения студентами методов оценки качества спермы производителей и подготовки ее к осеменению.

Методические указания предназначены для студентов очной формы обучения По специальности среднего профессионального образования: 36.02.01 Ветеринария

УДК 636.082.453.52(071)

ББК 48.76 р30

М 545

© И.В. Бритвина

© ИЦ ВГМХА, 2024

Цель занятия: отработка студентами техники оценки качества спермы, закрепление лекционного материала.

Место проведения: лаборатория кабинета акушерства кафедры Внутренние незаразные болезни, хирургии и акушерства.

Методика поведения занятия. Сначала преподаватель объясняет методику оценки качества спермы. Затем студенты, разделившись на группы (по 2 человека на рабочее место) проводят оценку качества спермы быка. В конце занятия каждая группа по результатам исследования делает заключение о возможности использования данной спермы для дальнейшего разбавления и хранения.

I. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕРМЫ

По химическому составу сперма относится к наиболее сложным жидкостям организма. Количество и внешний вид спермы, соотношение жидкой части и спермиев варьируют в зависимости от вида животных и их индивидуальных особенностей.

Сперма состоит из двух частей различного происхождения: спермиев, образующихся в семенниках и созревших в придатке семенника и плазмы спермы (семенной плазмы) — смеси секретов придатков семенников и секретов придаточных половых желез (ампул спермиопроводов, пузырьковидных, предстательной, куперовых/луковичных и уретральных). Состав, количество и биологические свойства спермы находятся в большой зависимости от условий существования производителя (кормление, содержание, уход, эксплуатация).

Спермии - главная часть спермы. В них заложена наследственная основа в виде молекулы ДНК. Однако и плазма играет важную роль, так как содержит различные химические вещества и соединения, обеспечивающие изотоничность, буферность, а также соответствующее осмотическое давление и рН.

Соотношения между объемом спермиев и объемом плазмы различны у животных разных видов. Жеребцы и хряки (животные с маточным типом естественного осеменения) выделяют много секретов придаточных половых желез, спермии у них составляют лишь 2—5 % объема эякулята; у баранов спермии составляют 25—50 %, у быков — 12—20 % объема эякулята (табл.1.1).

Составные части плазмы спермы

Таблица 1.1.

Производитель	Секрет придатка и ампул спермиопроводов	Секрет придаточных половых желез			
		пузырьковидных	предстательной	куперовых (луковичных)	уретральных
Бык	5	45	6-8	40	2-4
Баран	50	30	-	20	-
Хряк	1	25	50	24	-
Кобель	13	-	75	-	12

Количество спермы, выделяемой во время полового акта, называется эякулятом. Объем эякулята и число спермиев в единице объема имеют существенные видовые отличия. Так, бык за садку выделяет 5-10 мл спермы, баран – 0,3-2 мл (до 3 мл у баранов романовской породы). Эти животные относятся к влагалищному типу естественного осеменения. У животных с маточным типом естественного осеменения объем эякулята сравнительно большой: у жеребца 20-150, мах 200 мл, хряка – 150-1000, кобеля – 2-40 (в зависимости от породы). Четко прослеживается обратная зависимость между объемом эякулята и концентрацией спермиев (табл. 1.2.).

Таблица 1.2.

Физиологические показатели свежеполученной спермы.

Вид животного	Объем эякулята, мл	Концентрация спермиев, млн./мл	Количество спермиев, млрд.	Количество садок в неделю	Место введения эякулята
<i>Бык</i>	4-20	1200-2000	2-4	2-4	влагалище
<i>Жеребец</i>	20-300	100-150	1-2	2-6	матка
<i>Баран</i>	0,3-5	2000-6000	2-8	6-12	влагалище
<i>Хряк</i>	100-1000	150-500	1-4	2-4	матка
<i>Петух</i>	0,3-0,4	2000-3500	0,3-0,4	3-4	яйцепровод

Свежеполученная сперма быка и барана нейтральной (рН 7,0) или слабокислой (рН 6,7 — 6,9) реакции, а реакция спермы жеребца и хряка — слабощелочная (рН 7,2—7,6).

Спермий (сперматозоид) - зрелая мужская половая клетка, своеобразно построенная и способная к оплодотворению, которая коренным образом отличается от всех других клеток организма. Образование этих клеток происходит в семенниках - мужских половых железах, расположенных в мошонке (рис. 1.1).

Сперматогенез

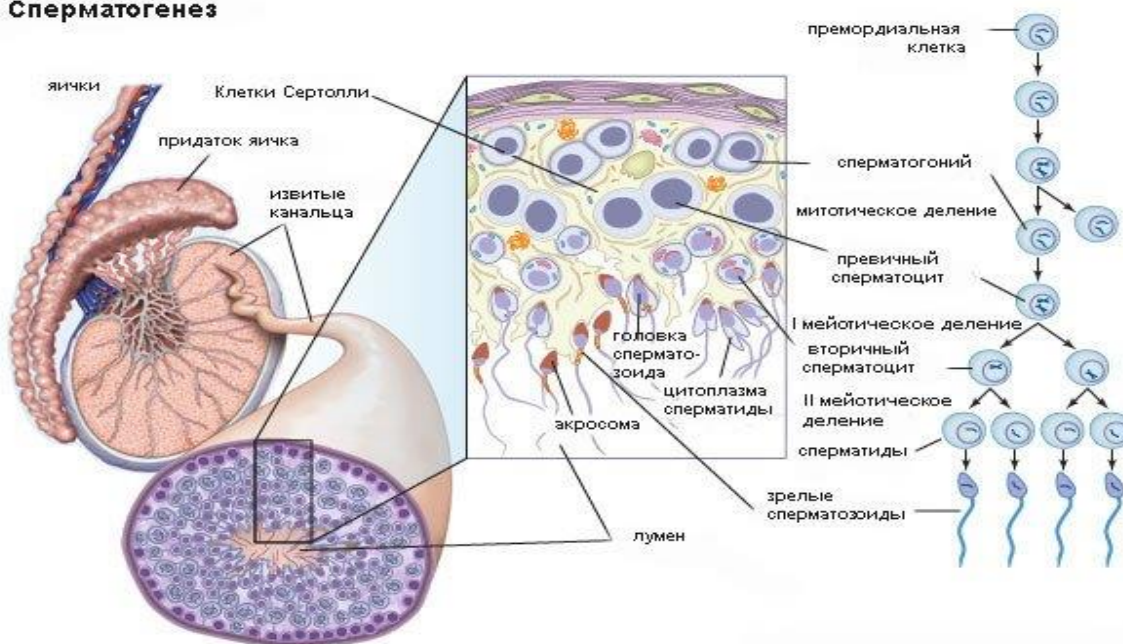


Рис.1.1. Сперматогенез.

Спермий – клетка, состоящая из головки, шейки (соединительная часть), тела и длинного подвижного хвостика (жгутика) (рис.1.2., 1.4.).



Рис. 1.2. Сперматозоиды.



Рис. 1.3. Сперматозоид возле яйцеклетки

Головка является носителем наследственной информации. Шейка, тело и хвост – двигательная часть спермия. По форме головки спермии разных животных также отличаются друг от друга. Длина спермиев млекопитающих примерно в 2 раза меньше яйцевой клетки, а объем спермия в 160000 раз меньше яйца (Рис.1.3.). Величина спермиев колеблется в пределах 50-80 мкм. По данным Г. А. Шмидта длина спермия быка 65 мкм, у жеребца — 55—60, у козла — 55, у кота — 60, у собаки— 66, у морской свинки — 100 мкм.

Головка спермия (*caput spermii*) представляет собой вогнуто-выпуклую пластинку овальной (ложкообразной) формы и несколько суженную со стороны шейки. Большая часть головки – ядро с гаплоидным набором хромосом, которое состоит преимущественно из нуклеопротеидов (ДНК). Количество ДНК является постоянным, а уменьшение его вызывает у быков бесплодие. Поверхность головки покрыта очень тонкой оболочкой (мембраной), непрерывно переходящей на шейку, тело и хвост спермия. Под мембраной в передней части головки находится акросома в виде чехлика, покрывающего две трети головки спермия. Акросома вырабатывает фермент — гиалуронидазу, растворяющий вязкое вещество (гиалуроновую кислоту), связывающее клетки лучистого венца яйцеклетки. Акросома — очень чувствительная часть спермия: при хранении спермы белок ее легко набухает, акросома отпадает от спермия, а последний теряет оплодотворяющую способность.

Шейка спермия (*collum spermii*) представляет собой самую короткую, более узкую часть, образованную мягким, гомогенным плазматическим веществом. Короткой и тонкой **шейкой** головка прикреплена к телу спермия. Она располагается сразу же за головкой и в ней располагается *проксимальная*

центросома расположенная у основания головки и *дистальная центросома*. Центросомы связаны между собой тремя пучками коротких фибрилл (волокон). Центросомы образуют клеточный центр (центросом). Он представляет собой исходный пункт, который формирует осевую нить. Осевая нить является основой шейки, тела и хвоста, она состоит из 11 отдельных фибрилл: из них, две центральные, связаны между собой, а 9 боковых, состоящих из тонких внутренних и толстых наружных нитей, окружают их (спиральные нити). Фибриллярный комплекс покрыт снаружи постепенно истончающимся слоем цитоплазмы.

Мягкое вещество шейки обуславливает сравнительную подвижность головки по отношению к хвосту, и ее наклон под определенным, почти прямым углом. Длина шейки составляет приблизительно 0,5 мк. Шейка очень хрупкая и при оплодотворении, когда спермий проникает в яйцо, ломается; в яйце остается лишь содержащая ядро головка (проксимальная центриоль во время оплодотворения переходит в яйцо).

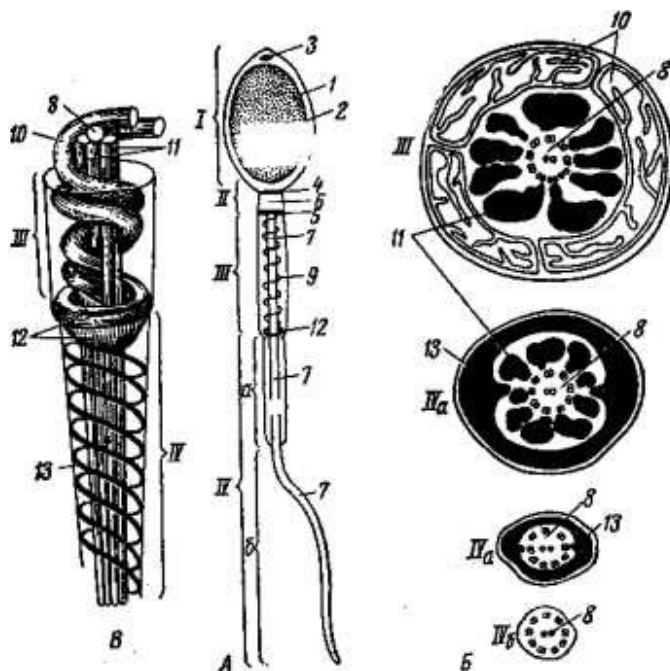


Рис. 1.4. Схема строения спермия: А — общий вид; Б — электронно-микроскопическая картина строения разных отделов спермия на поперечном разрезе и пространственной модели (В),

I — головка: 1—ядро; 2—цитоплазма; 3 — акросома;

II — шейка: 4 — передний узелок; 5 — задний узелок; 6 — промежуточная масса;

III — связующий отдел хвоста или тело: 7 — осевая нить; 8 — она же, по данным электронной микроскопии (состоит из девяти парных и двух

центральных фибрилл); 9 — спиральная нить митохондрий; 10 — она же по электроннограммис; 11—девять опорных тяжей; 12 — замыкающее кольцо;

IV — хвост: а — главный отдел хвоста; 13 — фиброзный слой; б — концевой отдел хвоста.

Тело спермия (соединяющая, средняя часть спермия /pars conjunctionis spermii/) — **связующий отдел хвоста**. Длина тела вдвое больше, чем головка, около 10 мкм. Тело спермия цилиндрической формы, внутри находится осевая нить спермия. Кроме этого зрелые спермии имеют двойное спиральное кольцо (двойное кольцо Иенсена), которое обвивается вокруг осевой нити по всему телу в направлении против часовой стрелки. Это кольцо состоит из митохондрий (частички диаметром от 0,5 до 2 мкм разной формы), в которых образуется энергия, необходимая для движения хвоста спермия.

Осевая нить и спиральные кольца окружены тонким слоем цитоплазмы. Осевая нить выходит из тела сперматозоида через кольцеподобное образование— *замыкающее кольцо* и проходит далее по хвосту спермия.

Хвост, или жгутик (*cauda spermii*) представляет собой собственно продолжение осевой нити тела спермия и является органом поступательного движения. Его длина около 50 мкм. Границей тела и началом хвоста считают замыкающее кольцо вокруг осевой нити (последнее кольцо Иенсена). Хвост по всей своей длине тянется в виде осевой нити, обвитой, за исключением кончика, тремя чрезвычайно тонкими спиральными фибриллами и покрытой тонким слоем цитоплазмы (*pars principalis*). Кончик хвоста лишен оболочки, покрывающей все остальные части спермия и постепенно утончаясь, заканчивается заострением (*pars terminalis*). При большом увеличении он похож на кисточку. Хвостик сперматозоида подвижен и его движения способствуют активному передвижению спермия.

В придатке семенника спермии приобретают липопротеиновый покров, который придает им одноименный заряд, предохраняющий от слипания, и делает их более устойчивыми. Эта оболочка выявляется под микроскопом только после длительного хранения спермы или выдерживания спермиев в воде. Оболочка состоит преимущественно из цистина и является таким же белковым образованием, как и кератин кожи. Она имеет большую проницаемость, благодаря чему при обмене веществ возможна диффузия.

Таким образом, сперматозоид является весьма специализированной клеткой, снабженной всеми необходимыми функциональными и морфологическими приспособлениями, обеспечивающими оплодотворение.

Успех искусственного осеменения зависит от жизнеспособности спермиев, устойчивости в половом аппарате самки и во внешней среде и от активности или их движения.

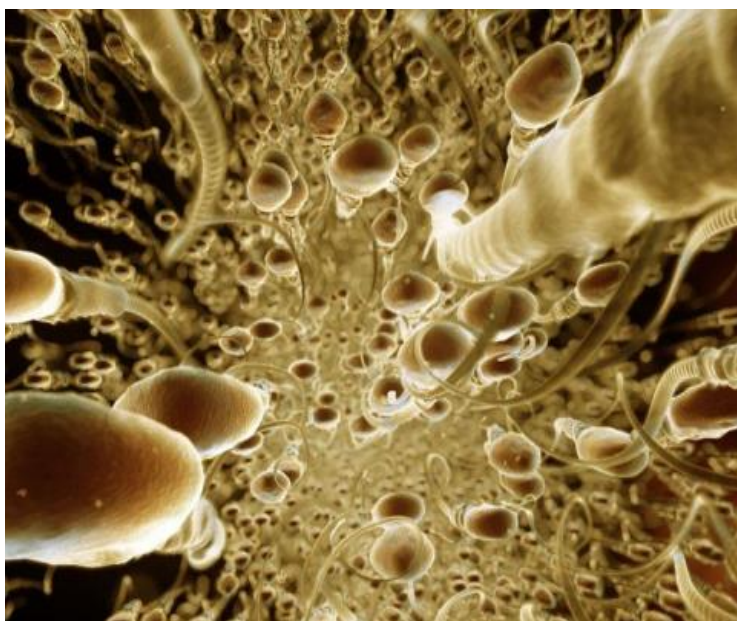


Рис. 1.5. Движение спермиев в половых путях.

Способность двигаться - важное биологическое свойство спермиев, которое необходимо для достижения ими места оплодотворения и проникновения вглубь яйцеклетки. Центр движения находится в шейке и теле спермия. При отрывании хвоста от тела, спермий становится неподвижным, тогда как спермии без головки могут продолжать двигаться.

Движение и переживаемость – два взаимосвязанных явления.

У различных животных спермии сохраняют свою жизнеспособность в половых путях самок в течение различного времени. У большинства млекопитающих спермии живут короткое время (у овцы — 30—36 часов, у крупного рогатого скота — 25—30 часов, у кролика — 8—12 часов); зато у некоторых видов (например, у летучих мышей) спермии способны оплодотворить яйцевую клетку через долгое время после полового сношения, поскольку оплодотворение у этих животных наступает лишь через несколько месяцев после копуляции. Условия, обуславливающие жизнеспособность спермиев и ее различную длительность у различных видов животных, до сих пор остаются еще не полностью выясненными.

На жизнедеятельность спермиев (как свежеполученной, так и сохраняемой) вне организма оказывают влияние разнообразные условия: температура, свет, осмотическое давление, химические вещества, медикаменты, pH среды, электролитный состав и другие. Поэтому при работе со спермой необходимо учитывать влияние всех этих внешних факторов.

Все изложенное заставляет осторожно относиться к оценке качества спермы, а также свидетельствует о необходимости применения комплексных методов контроля при определении качества спермы.

II. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ

Решающим показателем качества производителя служат результаты исследования спермы. Понятие об оценке качества спермы включает в себя определение ее биологической полноценности, т.е. способности оплодотворить яйцеклетку и дать начало новому жизнеспособному потомству. Высокие экстерьерные показатели и кровность теряют всякое значение, если у производителя выявляется аспермия или неполноценная сперма.

При получении спермы для оценки производителя пользуются искусственной вагиной. Если сперма недоброкачественная, ее исследуют повторно. Нельзя забывать, что после длительных перерывов в половой нагрузке производитель при первом коитусе почти всегда выделяет сперму низкого качества. Качество спермы не является строго постоянным, а изменяется в зависимости от условий кормления, содержания, режима полового использования, состояния его здоровья.

Определения качества спермопродукции необходимо для:

- оценки производителя по качеству спермы,
- пригодности каждого полученного эякулята для искусственного осеменения,
- установления оптимальной степени разбавления.

Спермоприемник после взятия спермы отсоединяют от искусственной вагины и передают в лабораторию через стерильный шлюз (рис.2.1.). В лаборатории спермоприемник открывают (стеклянный), или край одноразового отрезают стерильными ножницами после его протирания спиртовым тампоном; берут пробу - 0,5 мл спермы для оценки качества под микроскопом. Пробы следует отбирать только микропипетками или пипеточными дозато-

рами из середины свежеполученных эякулятов, не допуская попадания пены или вазелина. А весь остальной эякулят в спермоприемнике помещают в стерильный термостат (35⁰С) до конца оценки спермы. Работу со спермой в лаборатории следует проводить при температуре 18-25⁰С.

Исследованию подвергают каждый эякулят в отдельности. При взятии спермы у быков–производителей, когда берут подряд два эякулята, следует оценивать качество каждого порознь, а уже затем их можно смешать (если это необходимо). Если один из эякулятов имеет показатели, ниже допустимых, по инструкции его нельзя употребить для осеменения. Сперму жеребца и хряка сразу после получения перед разбавлением обязательно, если не были использованы спермоприемники с фильтром, фильтруют через стерильную марлю. Сперму нужно разбавлять не позже чем через 10—15 мин после ее получения.



по инструкции его нельзя употребить для осеменения. Сперму жеребца и хряка сразу после получения перед разбавлением обязательно, если не были использованы спермоприемники с фильтром, фильтруют через стерильную марлю. Сперму нужно разбавлять не позже чем через 10—15 мин после ее получения.

Рис.2.1. Лаборатория племпредприятия.

Методы определения оплодотворяющей способности спермы делятся на прямые и косвенные.

Прямые методы определения оплодотворяющей способности спермы. Определение оплодотворяющей способности спермы по результатам осеменения (отел, ректальное исследование через 2,5—3 месяца после осеменения, отсутствие полового цикла). Как видно, для оценки спермы этими методами требуется длительное время. Поэтому в практике, наряду с прямыми, применяются косвенные методы.

Косвенные методы определения оплодотворяющей способности спермы. Эти методы позволяют быстро, в течение 10—15 мин. определять качество и количество спермиев, полученных в эякуляте и назначить для осеменения такую дозу спермы, которая обеспечивала бы плодотворное осеменение, но не допускала ненужного перерасхода спермы. Ибо одним из необходимых условий получения максимального количества приплода от ценных производителей — это рациональное использование их спермы.

Ценность того или иного косвенного или предварительного метода оценки качества спермы определяется степенью его корреляции с показателем оплодотворяющей способности спермы. Для прогнозирования оплодо-

творяющей способности спермы предложены физические, биохимические, биологические методы исследования.

В их число входят:

1. *органолептическая (макроскопическая) оценка* по объему, цвету, консистенции, запаху, примесям;

2. *химическая оценка* — определение рН, осмотического давления;

3. *микроскопическая оценка* — определение подвижности или активности, густоты, концентрации, переживаемости, выживаемости спермиев, процента их с аномальной морфологией, осмотической резистентностью, устойчивости к холодовому удару, содержание аденозинтрифосфата, активности дегидрогеназ и т.д.;

4. *биологическая оценка* — определение количества непатогенных микробных тел и колли-титра, индикацию патогенных грибов, возбудителей инфекционных болезней (в случае подозрения на то или иное инфекционное заболевание) в свежеполученной сперме и смывах из препуция. При проведении этих исследований пользуются методами, принятыми в бактериологии.

Из предложенных и используемых методов оценки качества спермы выделяют *обязательные* и *дополнительные*. Обязательной оценке подвергается каждый взятый эякулят. Дополнительными методами оценивают свежеполученную сперму периодически. Полное исследование качества спермы проводится при постановке производителя на станцию искусственного осеменения, а затем периодически, через 10-15 дней, но не реже одного раза в месяц. Систематически же при каждом получении эякулята оценку производят по внешним признакам, объему эякулята, подвижности, густоте и концентрации спермиев. На пунктах искусственного осеменения, при использовании разбавленной охлажденной или глубокозамороженной спермы оценку производят в обязательном порядке на активность спермиев после размораживания и подогревания.

К обязательным методам относят:

1) *макроскопическую оценку или органолептическое исследование - оценку внешних свойств спермы,*

2) *оценку спермы по подвижности (активности) и густоте сперматозоидов и*

3) *определение концентрации сперматозоидов в сперме.*

Дополнительные методы, используемые для более полной характеристики качества спермы, включают:

1) *определение процента морфологически ненормальных сперматозоидов;*

2) *определение процента живых сперматозоидов путем дифференциальной окраски;*

3) *определение метаболической активности сперматозоидов (по скорости обесцвечивания метиленовой сини, индексу фруктолиза, показателю рН и др.);*

4) определение абсолютного показателя живучести сперматозоидов и др.

Различают средние и минимально допустимые показатели качества спермы. Если какой-либо показатель оказывается ниже допустимых пределов, то это свидетельствует либо о заболеваниях половых органов производителя, либо о нарушении в его кормлении, содержании или половом использовании. Снижение активности сперматозоидов, их резистентности и некоторых других показателей может произойти при несоблюдении правил получения и обработки спермы, а также в процессе ее хранения.

У каждого полученного эякулята предварительно определяют объем или массу. Затем оценивают визуально (макроскопическое, органолептическое исследование), устанавливая при этом, цвет, консистенцию, запах, нет ли в сперме примесей. Сперма с примесями к использованию не допускается. После предварительной оценки измеряют густоту, подвижность (активность) и определяют концентрацию сперматозоидов.

Для биологического контроля оставляют от каждого разбавленного эякулята быка 0,5-1 см³, барана - до 0,5 см³, хряка - 10 см³, жеребца 3-5 см³, отправляют в лабораторию и исследуют в течение 3 дней. Результаты оценки записывают в лабораторный журнал.

II.1. МАКРОСКОПИЧЕСКАЯ (ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКАЯ) ОЦЕНКА СПЕРМЫ.

Материальное обеспечение: полученный эякулят быка в запаянном одноразовом спермоприемнике, электронные весы, термостат, настроенный на температуру 35 °С, в котором находятся стеклянные смесители, градуированные стаканчики для спермы, спиртовые тампоны, стерильные ножницы, мыло, полотенце.

Техника исследования.

Объем эякулята, полученный в стеклянный или другой спермоприемник неоднократного использования измеряют по делениям на самом спермоприемнике (если они есть), либо при помощи градуированной пипетки или шприца, а также в градуированной смесительной колбе. Эякулят, полученный в полиэтиленовый спермоприемник одноразового пользования взвешивают на электронных весах. Масса 1 г спермы принимается за 1 мл (табл. 2.1.1.).

В европейской модели вагины объем эякулята определяют по шкале градуированного спермоприемника. При получении спермы быка в стеклянный двустенный спермоприемник ее предварительно разбавляют 5 мл среды и затем переливают в специальный градуированный смеситель и определяют объем (не учитывая при этом 5 мл среды).

Все приспособления для измерения предварительно стерилизуют и нагревают до температуры 35 °С, так как резкое охлаждение спермы, в особенности свежеполученной, вызывает холодовой удар и гибель сперматозоидов.

Для определения объема эякулята жеребца и хряка полученную сперму из спермоприемника процеживают через сложенную вчетверо стерильную марлевую салфетку в теплый (35 °С) стерильный мерный цилиндр или мензурку и накрывают стеклянной крышкой (если не использовался одноразовый спермоприемник с фильтром). Секрет пузырьковидных желез, оставшийся на марле, выбрасывают, так как он мешает при работе со спермой и снижает жизнеспособность сперматозоидов.

Таблица 2.1.1.

Объем эякулятов самцов сельскохозяйственных животных и птиц

Вид производителя	Объем эякулята, мл		
	минимальный	средний	максимальный
Баран	0,6	1–2	5
Бык	2	4–6	20
Жеребец	20	50–100	300
Хряк	100	250 – 350	1000
Кролик	0,2	0,5	4,0
Кобель	0,5	10	40
Кот	0,1	0,2	0,5
Петух	0,2	0,5	0,6
Индюк	0,2	0,3	0,4
Гусак	0,2	0,5	1,3

Цвет спермы определяют сразу после взвешивания. Край полиэтиленового спермоприемника обрабатывают спиртовым тампоном, затем вскрывают его стерильными ножницами, раскрывают и сразу же определяют цвет, запах, консистенцию, примеси. Спермоприемник при этом осторожно покачивают, не допуская вспенивания спермы.

Цвет спермы зависит от вида животных и насыщенности сперматозоидами. Чем выше содержание сперматозоидов в сперме, тем более белый и даже желтоватый ее цвет. Сперма барана белого цвета с желтоватым оттенком, быка – белого или желтоватого, жеребца и хряка – серовато-белого цвета, кобеля и кота – молочно-белый. Розовый или красный цвет указывает на попадание крови, желтый – о наличии в сперме мочи, зеленоватый цвет указывает на наличие гноя.

Запах нормальная сперма сельскохозяйственных животных не имеет, за исключением спермы барана и козла – у них возможно присутствие в сперме запаха жиропота. Гнилостный или другой запах в ней может быть результатом воспалительного процесса в половых путях, и это дает основание для выбраковки эякулята.

Консистенция, как и цвет спермы, зависит от концентрации сперматозоидов. Сперма барана сливо- или сметанообразной консистенции, быка – сметанообразной, жеребца и хряка – водянистой. В сперме жеребца часто бывает примесь слизеподобного секрета пузырьковидных желез, в сперме хряка — студенисто-клейкие зерна луковичных желез. Сперма кобеля и кота водянистая.

Наличие вихревого движения. В густом эякуляте свежеполученной спермы барана и быка образуются вихри и завихрения, видимые невооруженным глазом. В густой сперме энергично двигающиеся в одном направлении сперматозоиды образуют своеобразные потоки ("струи"). Когда такие струи сталкиваются, в спермоприемнике видны завихрения, которые быстро исчезают.

Примеси. Примеси могут быть патологическими. Примесь крови устанавливают по розовому или красному цвету в сперме, что указывает на попадание крови из свежей травмы, бурый цвет спермы говорит о травме давнего происхождения. О наличии в сперме мочи судят по желтому цвету и специфическому запаху, зеленоватый цвет указывает на наличие гноя, хлопья в сперме бывают при воспалении придаточных половых желез.

Примеси непатологические. Наличие в сперме посторонних примесей (опилки, навоз), снижает её качество, и указывают на неблагоприятное санитарное состояние содержания производителей подготовки их к взятию спермы.

Сперма с примесями к использованию не допускается.

II. II. МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СПЕРМЫ.

(обязательные методы)

После оценки свежеполученной спермы по внешним признакам, проводят основную микроскопическую оценку по: густоте, активности и концентрации.

1. Определение подвижности (активности) спермиев.

Оценка спермы по густоте.

Материальное обеспечение: свежеполученная сперма, находящаяся в термостате при температуре 35 С° от момента получения не более 30 минут; теплые и стерильные предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, находящиеся в термостате; марлевые салфетки; микроскопы МБИ-11 (БИО-ЛАМ - М); осветители ОИ-35, либо МКИ-11; электрические обогревательные столики.

Первоначально подвижность и густоту спермы определяют на плем-предприятии в лаборатории после ее получения при микроскопическом ис-

следовании. Повторно это исследование проводят перед осеменением животного после размораживания спермы.

Техника исследования.

Эта оценка производится одновременно путем просматривания спермы под микроскопом при увеличении в 120–400 раз. Обогревательный столик помещают на предметный столик микроскопа и включают в сеть. После подготовки микроскопа готовят мазок и помещают его на обогревательный столик, при этом мазок спермы нагреется до 35 °С.

Подготовка мазка. На чистое подогретое предметное стекло дозатором пипеточным (стерильной стеклянной палочкой или пипеткой) наносят капельку спермы и накрывают ее покровным стеклом. Желательно, чтобы каждый раз величина капельки была одинаковой, так как от этого в значительной мере зависит объективность и точность оценки. Это условие в полной мере можно выдержать при использовании дозатора пипеточного регулируемого или калиброванного на 0,03 мл. Чтобы капля равномерно растеклась под покровным стеклышком (без пузырьков воздуха) и не выходила за его края, поступают следующим образом. Держа двумя пальцами за грани (ребрышки) покровное стеклышко, касаются одной его гранью предметного стекла возле края капли под углом 45–50°. Когда капля расплывется по всей ширине стеклышка, медленно его опускают. Перед этим покровное стеклышко должно быть тщательно вытерто. Протирают его марлевой салфеткой между большим и указательным пальцами, поворачивая за ребрышки пальцами другой руки.

Исследование проводят при температуре 38–40°С (*Сперма очень чувствительна к температурным колебаниям. При резком ее охлаждении наступает холодовой удар (температурный шок), движение спермиев прекращается, значительная часть их погибает, для чего и пользуются специальными обогревательными столиками.*

При помощи макровинта приближают объектив (увеличение 80 – 120х) к предметному столику микроскопа на расстояние 4–5 мм и устанавливают



необходимое освещение. Равномерность и сила освещения достигается за счет приподнимания или опускания конденсора микроскопа и прикрытия диафрагмы. Для улучшения видимости сперматозоидов желательно использовать конденсор темного поля ОИ-10, в поле зрения отчетливо просматриваются ярко светящиеся контуры половых клеток на темном фоне.

Рис. 2.2.1. Комплекс автоматизированной микроскопии.

Густота спермы определяется по количеству сперматозоидов, наблюдаемых в поле зрения микроскопа. Такая оценка проводится с целью получения предварительных данных о содержании половых клеток в сперме и о необходимости дальнейшей ее оценки. Наиболее хорошо она разработана для спермы быка и барана. Имеет самостоятельное значение лишь в том случае, когда по какой-либо причине не определяют концентрацию сперматозоидов.

Результаты исследования.

Классифицируют сперму как густую (Г), среднюю (С) и редкую (Р).

Густая сперма – все поле зрения заполнено сперматозоидами без промежутков между ними (обозначается буквой Г).

Средняя сперма – промежутки между сперматозоидами имеются, но они не превышают размеров одного сперматозоида (обозначается буквой С).

Редкая сперма – промежутки между сперматозоидами превышают размеры спермия (обозначается буквой Р).

Олигоспермия – в поле зрения имеются единичные сперматозоиды (обозначается буквой О).

Аспермия – в поле зрения сперматозоиды отсутствуют (обозначается буквой А).

По густоте спермы приблизительно судят о концентрации сперматозоидов. Густота спермы, определяемая при глазомерной микроскопической оценке, дает приблизительное представление о количестве спермиев в 1 мл эякулята. Это субъективная оценка, ошибка может достигать 25-30%.

К использованию для разбавления допускается сперма быка, жеребца и хряка с оценкой “густая” и “средняя” – Г, С, сперма барана – только “густая” - Г.

Оценка спермы по подвижности (активности) сперматозоидов

Одновременно с оценкой по густоте определяют и процент спермиев с *прямолинейно-поступательным движением (ППД)*. Просматривают под микроскопом весь препарат. Подсчет спермиев производят не менее чем в трех полях зрения микроскопа с наибольшей подвижностью спермиев.

Различают три вида движения сперматозоидов:

- прямолинейно-поступательное (ППД - сперматозоиды движутся по прямой линии с небольшими остановками);

- манежное (М - перемещение спермиев по кругу, диаметром не превышающем длину одного сперматозоида, либо вокруг головки, либо вокруг хвостика);

- колебательное (К - спермии не передвигаются, но производят движение головкой или хвостиком).

Некроспермия – все сперматозоиды в поле зрения неподвижны; обозначается буквой Н.

Нормальным для сперматозоидов движением является прямолинейно-поступательное. Сперматозоиды с *манежным, колебательным* движением или *неподвижные* неспособны к оплодотворению.

Результаты исследования.

Подвижность сперматозоидов оценивают по 10-балльной шкале. Если около 90% сперматозоидов в поле зрения микроскопа движутся прямолинейно поступательно, то такой сперме ставится оценка 9 баллов, если 80% – 8 баллов и т.д.

Окончательную оценку производят по двум показателям: по густоте и подвижности и обозначается двумя знаками, например, Г-9, С-10, Р-7 и т.д. Например, Г-8 - сперма густая, около 80% спермиев с ППД; С-7 - сперма средней густоты, около 70% спермиев с ППД и т. п.

Свежеполученная сперма допускается к использованию по подвижности, если она у барана и быка не ниже 8 баллов, у хряка не ниже 7 баллов, у жеребца не ниже 6.

Для разбавления и хранения допускается сперма барана с оценкой не ниже Г-9, быка и хряка - не ниже Г-8 и С-8, жеребца - Г-6 и С-6.

2. Определение концентрации сперматозоидов в сперме.

Материальное обеспечение: свежеполученная сперма, находящаяся в термостате при температуре 35 С° от момента получения не более 30 минут; чистые камеры Горяева и покровные стекла к ним; стеклянные палочки; эритроцитарный и лейкоцитарный смеситель (меланжер); натрия хлорид 3%, дистиллированная вода; спирт-ректифкат; спиртовые тампоны; марлевые салфетки; микроскопы МБИ-11 (БИОЛАМ - М); осветители ОИ-35, либо МКИ-11;

Концентрацию сперматозоидов можно определить: 1) путем прямого подсчета спермиев в счетной камере, 2) методом сравнения со стандартами, 3) с помощью фотоэлектроколориметра или специальных электронных счетчиков (наиболее современный метод).

Определение концентрации сперматозоидов путем подсчета в счетной камере Горяева.

Счетная камера Горяева представляет собой пластинку из толстого



стекла, поделенную желобами на поля: центральное и два опорных. Центральное поле разделено средним поперечным желобом на две части, на каждой из которых его нанесена сетка. Это поле на 0,1 мм ниже опорных полей. При помещении на опорные поля покровного стекла

над сетками образуется камера 0,1 мм глубиной.

Рис. 2.2.2. Счетная камера Горяева.

Две квадратные сетки камеры Горяева имеют площадь по 9 мм². Каждая сетка имеет по 225 больших квадратов, из которых 25 разделены продольными и поперечными линиями на 16 маленьких квадратиков. Каждая сторона малого квадрата равна 1/20 мм, а площадью - 1/400 мм². Если накрыть среднюю пластинку покровным стеклом и претереть его к боковым пластинам (до появления радужных колец, Ньютоновских), то под ним глубина камеры будет равна 1/10 мм, а объем над поверхностью маленького квадратика составит 1/400 мм³.

Техника исследования.

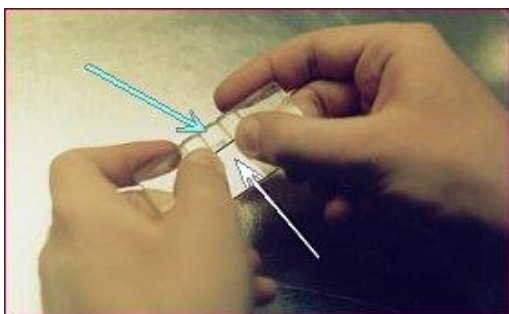


Рис. 2.2.3. Притирание покровного стекла к камере Горяева

Чтобы шлифованное покровное стекло прочно держалось, его помещают на чистую и обезжиренную спиртом камеру и, прижимая пальцами к опорным полям, притирают до появления радужных колец (Ньютоновских колец) на двух опорных полях. После притирания покровного стекла создается камера, закрытая с двух боковых сторон, а с двух других остаются щели (капиллярные пространства), через которые и заполняют камеру.

Способы подготовки обезжиренных стекол.

1. Чистые стекла выдерживают в смеси спирта и эфира (соотношение 1:1) в течение суток. Затем извлекают и протирают насухо.

2. После тщательного мытья в растворе детергента предметные стекла промывают в дистиллированной воде, протирают, заворачивают в бумагу и выдерживают в сушильном шкафу не менее 30 минут.

3. Полевой способ. На холодную поверхность электроплиты помещают в один слой чистые стекла. После того как стекла раскалятся, плиту выключают. Дают стеклам остыть.

Для подсчета спермиев сперму предварительно разбавляют 3%-ным раствором натрия хлорида или дистиллированной водой. Под влиянием гипертонического раствора натрия хлорида или воды спермии становятся неподвижными, что облегчает технику подсчета. Разбавление происходит в меланжере, который применяется в гематологии.

Смеситель (меланжер) состоит из градуированной капиллярной трубочки с яйцевидным расширением (ампулой). В ампулу помещена стеклянная бусинка для лучшего размешивания крови.

Имеются смесители для подсчета красных и белых кровяных телец. В смесителях для эритроцитов бусинка внутри ампулы окрашена в красный цвет, а для лейкоцитов - в белый. На капилляре смесителей имеются метки 0,5 и 1,0; они обозначают половину или целый объем капилляра. Выше яйце-

видного расширения метка 101 в смесителе для эритроцитов означает, что полость расширения (ампулы) имеет объем в 100 раз больший, чем объем полости капилляра. На смесителе для лейкоцитов имеется метка 11, свидетельствующая о том, что полость ампулы в 10 раз больше полного объема капилляра.

Рис.2.2.4. Смеситель для разведения крови:



1 - капиллярная трубочка; 2 - ампула; 3 - стеклянная бусинка для перемешивания крови; 4 - стеклянная трубка

Когда в смеситель для эритроцитов набирают сперму до метки 1,0, а затем разбавляют ее 3-процентным раствором NaCl, доводя общий объем до метки 101, сперма будет разведена в 100 раз. При разведении в 200 раз следует набрать сперму в капилляр смесителя до метки 0,5 и добавить разбавляющей жидкости до метки 101.

Смесители должны быть чистыми и сухими. Поэтому после использования их промывают многократно дистиллированной водой, а затем 96%-ным спиртом и эфиром (1:1) и высушивают путем продувания воздуха резиновым баллоном или шарами Ричардсона. Для удобства в работе каждый смеситель присоединяют к резиновой трубке (15–20 см), к другому концу которой присоединен кусочек зашлифованной стеклянной трубки. Перед использованием кончик пипетки смесителя обеззараживают спиртовым тампоном. Обеззараженную часть пипетки слегка погружают в сперму, берут в рот кончик резиновой трубки (отрезок стеклянной трубки) и осторожно набирают сперму до нужной метки.

Для спермы быка и барана применяют эритроцитарный смеситель (с красным шариком), для спермы жеребца и хряка – лейкоцитарный (с белым шариком).

Сперму барана разбавляют в 200 раз, набирая сперму до метки 0,5, а воду или соль – до 101. Сперму быка разбавляют в 100 раз, набирая ее до метки 1,0, а воду или соль – до 101. Сперму жеребца и хряка разбавляют в 20 раз, набирая ее до метки 0,5, а воду или соль – до метки 11.

Смеситель зажимают пальцами с обеих сторон и встряхивают в течение 2–3 минут до полного смешения спермы с дистиллированной водой. После перемешивания первые 3–4 капли из смесителя сливают отдельно. Этим достигается удаление из капилляра смесителя раствора, не смешанного со спермой. Конец капилляра смесителя обтирают салфеткой или ватой и заряжают камеру, поднеся кончик смесителя к центральному полю у края покровного стекла. Смесь при этом заполняет пространство между центральным полем и покровным стеклом. Если часть капли останется у края покров-

ного стеклышка, ее необходимо осторожно снять марлевой салфеткой. Другую сетку можно заполнить другим образцом спермы.

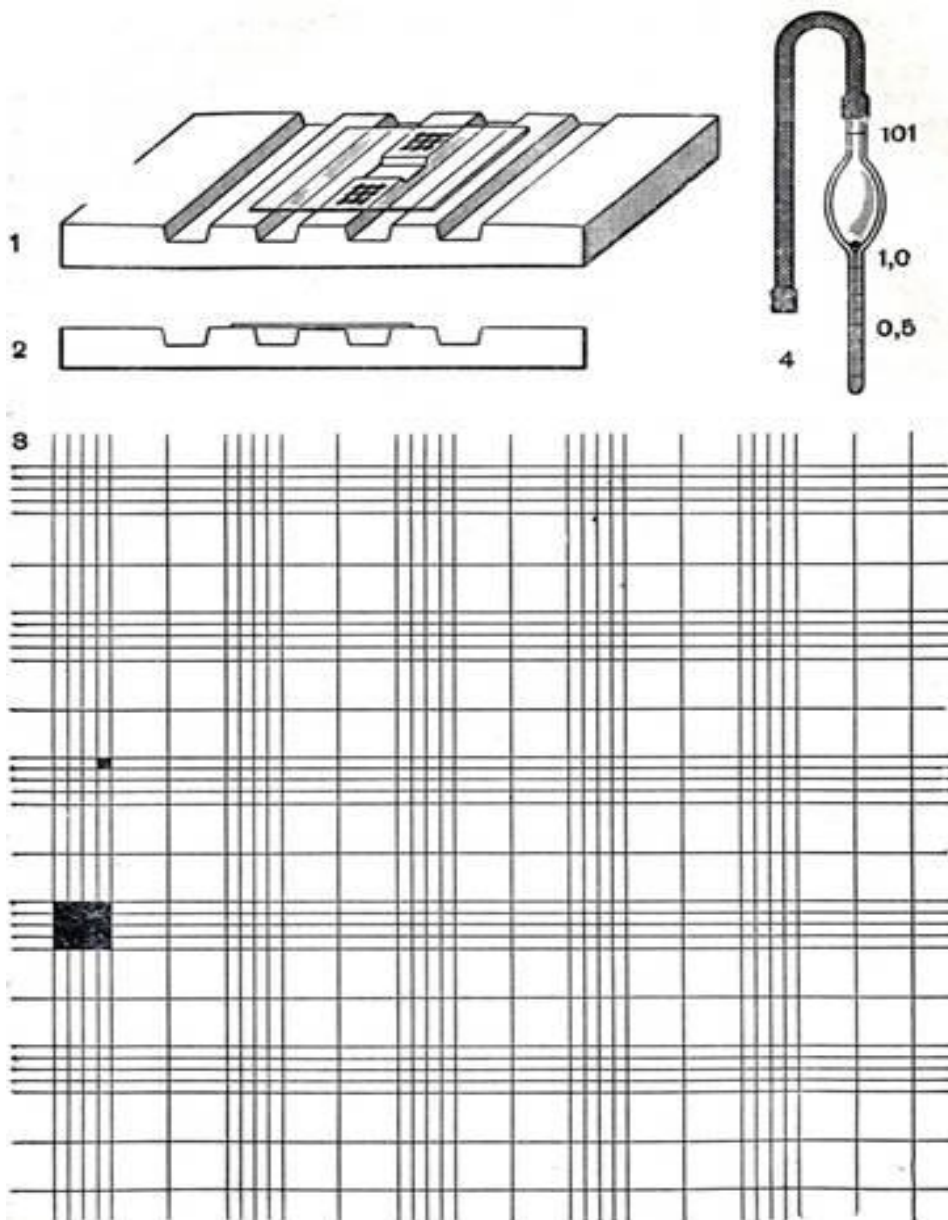


Рис. 2.2.5. Микроскопия камеры Горяева.

Камеру помещают на предметный столик микроскопа (строго горизонтальное расположение), устанавливают увеличение 200х, подбирают необходимое

освещение и осторожно наводят микроскоп.

Сперматозоидов подсчитывают в пяти больших квадратах сетки (по диагонали), каждый из которых поделен на 16 малых квадратов (всего 80 малых).



При подсчете принимают во внимание только головки спермиев, лежащие внутри квадрата и на их левых и верхних линиях. Головку считают лежащей внутри квадрата, если там находится три четверти ее размера. Если же головка пересечена пограничной линией квадрата пополам, две половинки считают за одного спермия. Подсчитанных в каждом большом квадрате спермиев записывают, затем данные подставляют в формулу.

Рис. 2.2.6. Сетка камеры Горяева



Результаты исследования.

Концентрацию спермиев вычисляют по формуле:

$$C = \frac{400 \times \Pi \times Д}{N \times P \times 1.000.000}$$

где С – концентрация сперматозоидов (млрд/мл);

Π – число подсчитанных спермиев;

Д – степень разбавления спермы водой или солью;

N – число малых квадратиков (80);

P – глубина камеры (мм) - 0,1

400 – множитель, введен в формулу для пересчета на 1 мм², так как площадь малого квадрата равна 1/400 1 мм²

В формуле концентрацию спермиев делят на 1000000, поэтому, полученное содержание спермиев будет выражено в миллиардах в 1 мл (1 см³).

Удобнее пользоваться упрощенными формулами, которые получены из приведенной выше:

а) формула для расчета концентрации спермы барана

$$C = N/200;$$

б) формула для расчета концентрации спермы быка

$$C = N/100;$$

в) формула для расчета концентрации спермы жеребца и хряка

$$C = N/1000,$$

где C – концентрация сперматозоидов в сперме, млрд/мл;

N – количество сперматозоидов, подсчитанных в пяти больших (80 малых) квадратах.

Определение концентрации сперматозоидов методом сравнения со стандартами.

Стандарты представляют собой запаянные пробирки, в которых находится похожая на сперму жидкость (раствор сернокислого бария). Содержимое каждой пробирки имеет внешний вид и оптическую плотность, соответствующие сперме различной концентрации. В наборе стандартов для спермы быка имеются образцы, соответствующие концентрации 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 и 1,4 млрд/мл, для жеребца – 10, 50, 100, 200, 300 и 500 млн/мл.

Пустую пробирку такого же диаметра, как и стандарты, заполняют исследуемой спермой и сравнивают с ними. Пробирки просматривают на свет, подбирая стандарт, близкий по прозрачности к исследуемой сперме. Указанная на стандарте концентрация принимается за концентрацию данной спермы.

Определение концентрации сперматозоидов с помощью фото-электроколориметра или специальных электронных счетчиков.

Электрофотоколориметрический метод основан на способности спермы ослаблять проходящий через нее пучок света пропорционально концентрации сперматозоидов. Величина ослабления света регистрируется фотоэлементами прибора ФЭК, позволяющего определить оптическую плотность спермы. Оптическая плотность различных образцов спермы при стандартном разбавлении повышается прямо пропорционально концентрации половых клеток.

Сперму необходимо исследовать сразу же после ее получения. Для этого из свежеполученного эякулята отбирают пробу спермы и разбавляют 2,9%-ным раствором цитрата натрия.

Сперму быка разбавляют в 100 раз, взяв 0,1 мл спермы и 10 мл цитрата натрия.

Сперму барана разбавляют в 400 раз, взяв 0,025 мл спермы и 10 мл цитрата натрия.

Сперму хряка разбавляют в 30 раз, взяв 0,4 мл спермы и 12 мл цитрата натрия.

Разбавление производят во флаконе емкостью 10 – 20 мл. Необходимо до получения спермы приготовить столько флаконов, сколько планируется получить эякулятов, и в них заранее внести раствор натрия цитрата. В современных приборах предусмотрен автоматический отбор пробы спермы и разбавление ее в кювете для исследования.

При взятии проб спермы необходимо стремиться к высокой точности. Пробы следует отбирать только микропипетками или пипеточными дозаторами из середины свежеполученных эякулятов, не допуская попадания пены или вазелина. Перед внесением пробы спермы в раствор микропипетки следует вытирать снаружи чистой марлевой салфеткой для удаления излишней

спермы. Температура 2,9%-ного раствора цитрата натрия должна быть в пределах +20–+25 °С.

Для исследования необходимы две кюветы с рабочей толщиной 10 мм. Одну из них наполняют (до метки) спермой, разбавленной 2,9%-ным цитратом натрия, вторую – только 2,9%-ным цитратом натрия.

Кюветы ставят в кюветодержатель прибора и сначала располагают на пути пучка света (с длиной волны около 550 нанометров, красный светофильтр) кювету с цитратом натрия (без спермы). Стрелка гальванометра при этом смещается. Ручками грубой и тонкой настройки ее устанавливают на "0". Затем перемещают кюветодержатель, располагая на пути пучка света кювету со спермой. В результате стрелка гальванометра укажет величину, соответствующую оптической плотности спермы. Далее оптическую плотность спермы необходимо пересчитать в концентрацию.

Наиболее точно определить концентрацию сперматозоидов в сперме можно с помощью специальных электронных счетчиков - фотометров и более сложных анализаторов качества спермы.

Рис. 2.2.7. Фотометр



Фотометры имеют программы для определения концентрации спермы быка, хряка, жеребца, барана и козла. Они автоматически рассчитывают объема разбавителя и количество доз. В них дополнительно встроен принтер для распечатки производственных данных по эякулятам.

Рис. 2.2.8. Анализатор качества спермы.

В крупных центрах по искусственному осеменению ряда стран используют современное оборудование, позволяющее определять концентрацию и подвижность сперматозоидов (включая прямолинейное поступательное и манежное движение), а также их морфологию. Анализатор качества спермы — это сложный электронно-оптический прибор, заключивший в себе последние достижения микроскопии, оптики, программирования. Прибор посылает через пробу световой импульс, и с помощью оптической системы измеряет его параметры, отражающие характеристики сперматозоидов. В процессе анализа участвуют одновременно миллионы клеток, что позволяет обеспечить непревзойденную точность и объективность. Эти системы третьего поколения анализируют каждый объект (клетку) до хвоста и если не обнаруживают его, то не включают в общее количество. Использование этих систем позволяет повысить точность оценки качества спермы и ее оплодотворяющую способность.



II. III. САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ НА СТАНЦИЯХ И ПУНКТАХ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ

Наряду с описанными способами обязательным является ветеринарно-санитарная оценка спермы. Несоблюдение этого условия может привести к распространению (через сперму) многих инфекционных болезней (бруцеллез, туберкулез, лептоспироз, трихомоноз, кампилобактериоз, ящур и др.), а также инфицированию половых органов самок условно-патогенной микрофлорой (стафилококки, стрептококки, синегнойная и кишечная палочки и др.).

Оценка спермы включает определение общего количества апатогенных бактерий в 1 мл, коли-титр, индикацию патогенных грибов, возбудителей инфекционных болезней (в случае подозрения на то или иное инфекционное заболевание). При проведении этих исследований пользуются методами, принятыми в бактериологии.

Получение смыва из препуция.

Производителя фиксируют в специальном в станке. Проводят тщательный туалет препуция (обмывают мошонку и препуций водой и насухо вытирают полотенцем или салфеткой) и через стерильную резиновую трубку или катетер в его полость вводят стерильным шприцем 5-10 мл стерильного физиологического раствора. Край препуция зажимают рукой и проводят энергичный массаж. После этого насасывают раствор в шприц и выливают в стерильную пробирку.

1. Методика исследования коли-титра (на среде Булиржа).

Сперму и смыв препуция многократно последовательно разводят стерильным физиологическим раствором - 1:1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1: 10 000; 1:100 000; 1:1 000 000 - и из каждого разведения делают высев на среду Булиржа.

Посевы выдерживают в термостате при 37-37,5 °С и через сутки проверяют рост. При наличии в сперме или смыве бактерий из группы коли изменяет цвет среды, а в газовых трубочках образуется газ. О показателе коли-титра судят (до 1:1 000 000) по степени разведения исследуемого материала и роста микробов в среде.

При хорошем ветеринарно-санитарном состоянии помещений и соблюдении санитарно гигиенических правил при получении спермы от производителей *коли-титр спермы не превышает 1:1 - 1:10, а коли-титр смывов из препуция не должен быть более 1:100.*

2. Определение микробной и грибковой загрязненности спермы и препуция.

Для определения количества микробов в сперме и смыве из препуция делают посев на МПБ и МПА, а затем подсчитывают количество микробов и

определяют их вид. В зависимости от содержания микробов различают сперму:

- ❖ незначительно загрязненную - при содержании в 1 мл спермы до 0,1 тыс. микробов;
- ❖ слабозагрязненную - до 2 тыс. микробов в 1 мл;
- ❖ среднезагрязненную - до 5 тыс. микробов в 1 мл;
- ❖ сильнозагрязненную - более 5 тыс. микробов в 1 мл.

Допускают сперму с содержанием не более 5 тыс. микробов в 1мл.

3. Исследование на наличие синегнойной палочки и анаэробной микрофлоры.

Для выделения **синегнойной палочки** сперму и смыв из препуция высевают на МПБ с добавлением 1-2 % сахара (глюкозы или лактозы) и помещают в термостат при температуре 37 °С на 6-7 суток. Посев проверяют каждые 1-2 дня. При росте синегнойной палочки выделяемый ею пигмент пиоцианин постепенно окрашивает среду в зеленовато-голубоватый цвет.

Для обнаружения **анаэробных микробов** проводят посев спермы и смывов из препуция в две пробирки со средой Китта-Тароцци. Одну из пробирок прогревают на водяной бане при 80 °С в течение 20 минут для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры. Затем обе пробирки помещают в термостат при 37 °С на 10 сут.

Учитывают интенсивность роста микробов, характер осадка, а также наличие и степень газообразования. Через каждые 3-4 дня независимо от наличия или отсутствия признаков роста микробов делают мазки, окрашивают по Грамму и микроскопируют.

4. Исследование спермы и смывов из препуция на наличие грибов.

Посев спермы и смывов проводят на специальные среды - среду Литмана, ЛенНИВИ, Сабура и Чапека. Среды культивируют в термостате от 10 до 45 дней при температуре 22-37 °С. Выделенные грибы, проверяют на патогенность. Быка нельзя использовать, если в сперме и смыве из препуция постоянно выделяют патогенные грибы из родов аспергиллюс, кандиды, лихтгеймия.

5. Бактериологический контроль приборов и инструментов, используемых для получения и введения спермы.

С помощью стерильного физиологического раствора делают смывы с подготовленной искусственной вагины, шприца-катетера и влагалищного зеркала (5-10 мл физраствора). В МПБ и среду Китта-Тароцци вносят по 0,1 мл смыва. Дальнейшее исследование проводят в таком же порядке, как при определении микробного загрязнения спермы.

6. Определение микробной и грибковой загрязненности воздуха лаборатории, манежа и помещений для производителей.

В разных участках помещения на расстоянии 1,5 м от пола ставят на 5 мин открытые чашки Петри с МПА. Чашки помещают в термостат и ежедневно определяют количество колоний и видовой состав микроба. При росте грибов делают посевы на специальные среды для определения вида грибов.

II. IV. МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СПЕРМЫ. (дополнительные методы)

1. Определение процента живых и мертвых спермиев методом дифференциальной окраски

Метод, предложенный В.А. Морозовым (1938 г.), основан на свойстве эозина проникать через мембрану мертвых и ослабленных (с колебательным движением) сперматозоидов и окрашивать их; мембрана живых клеток не пропускает краску, и они остаются неокрашенными. Использование других красителей в сочетании с эозином может повышать точность метода за счет создания фона, на котором лучше просматриваются окрашенные и неокрашенные сперматозоиды.

Техника исследования.

На край обезжиренного предметного стекла наносят дозатором пипеточным (стеклянной палочкой, глазной пипеткой) маленькую капельку свежеполученной спермы и рядом с ней – капельку 5%-ного водного раствора эозина. Обе капельки быстро смешивают стеклянной палочкой (уголком шлифованного стекла) и делают тонкий мазок.

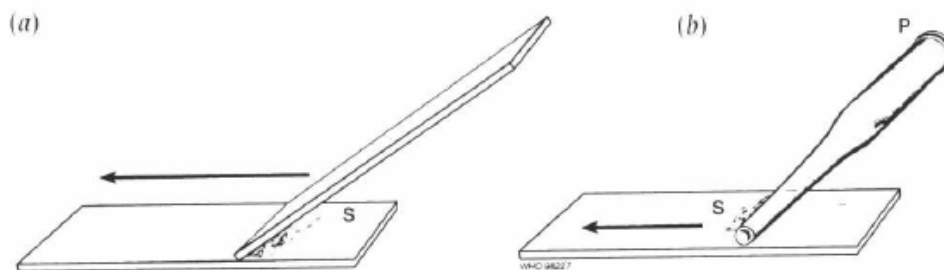


Рис 2.4.1. Приготовление мазка для окраски сперматозоидов и изучения морфологии. (а) Капля спермы (S) помещается на стекло и распределяется вторым стеклом под углом 45°. (б) Метод с использованием пипетки. Капля спермы (S) помещается на стекло и распределяется пипеткой (P), удерживаемой горизонтально.

Для этого прижимают торцевой гранью шлифованное стеклышко к предметному стеклу и подводят его под углом 35–40° к капле так, чтобы она растеклась сзади него на всю ширину грани. Придерживая в наклонном положении шлифованное стеклышко большим и указательным пальцами, быстро, но плавно тянут каплю вдоль предметного стекла к другому краю; при этом капля равномерно размазывается сзади стеклышка. Мазок получается

ровным, если указательный палец, фиксирующий шлифованное стеклышко, опустить несколько ниже грани предметного стекла и двигать по ней. Важно, чтобы мазок был тонким (заканчивался на расстоянии 0,5–1 см от края предметного стекла), в таких случаях он быстро высохнет. Чтобы ускорить высыхание, его следует положить на обогревательный столик или пластину (45–55°) и обдуть потоком теплого воздуха (можно использовать электрофен бытовой).

Высушенный мазок просматривают под микроскопом при увеличении 900х (иммерсионный объектив); увеличение 300–400х менее подходящее для этого метода. Процедура приготовления мазка (после смешивания спермы с красителем) до помещения его на теплую пластину не должна превышать 15 с, а высыхание – более 30 с.

В нескольких полях зрения микроскопа подсчитывают подряд 500 спермиев. К окрашенным (мертвым) клеткам относят тех, у которых окрашена полностью головка или задняя ее часть. После подсчета выводят процент неокрашенных (живых) клеток.

Результаты исследования

Для определения процента живых спермиев пользуются следующей формулой:

$$П = \frac{Ж \times 100}{500}, (\%),$$

где П - процент живых спермиев;

Ж – число сосчитанных неокрашенных (живых) спермиев

2. Определение процента патологических (морфологически ненормальных) сперматозоидов.

Для сперматозоидов каждого вида животных характерна своя структура и величина; не исключены и некоторые индивидуальные особенности. Появление в эякуляте значительного числа клеток с явными отклонениями в их структуре (*тератоспермия*) сопровождается понижением плодовитости производителя. Это может быть обусловлено тем, что продвижение ненормальных сперматозоидов в половом тракте самки к месту оплодотворения нарушено и не накапливается там необходимое число половых клеток (в половом тракте есть места, которые не пропускают ненормальных сперматозоидов), или же с неспособностью таких клеток вызвать оплодотворение и последующее развитие зародыша.

Ненормальности головки имеют большее значение, чем ненормальности в области хвоста. В связи с этим классифицируют ненормальности сперматозоидов как: первичные (главные), вторичные и третичные. *Первичные* связаны с головкой или акросомой клетки, *вторичные* – с наличием цитоплазматической капельки в средней части хвоста и *третичные* – с другими дефектами хвоста.

В предприятиях по искусственному осеменению необходимо периодически (один – два раза в год) тщательно просматривать образцы спермы от

каждого производителя и при выявлении повышенного числа ненормальных клеток внимательно обследовать животное.

Техника исследования.

Более надежно исследование производить в окрашенных сухих мазках. Самый простой способ – это использование мазка, окрашенного смесью эозина и анилина голубого при определении процента живых и мертвых сперматозоидов. Однако можно готовить и окрашивать мазок непосредственно для определения патологических форм сперматозоидов.

При приготовлении мазка следует предотвратить температурный шок, в результате которого хвостики сперматозоидов закручиваются и невозможно отличить такие клетки от тех, которые образовались в семенниках. Попадание воды (например, влажное предметное стекло) также вызывает этот артефакт. Свежеполученные сперматозоиды легко разламываются в области шейки, что приводит к увеличению процента бесхвостых головок. Чтобы предотвратить такую опасность, можно до исследования сперму выдержать при комнатной температуре (сохраняемые сперматозоиды менее чувствительны к разломам).

Перед приготовлением мазка сперму разбавляют изотоническим раствором натрия хлорида или натрия цитрата в стерильной теплой пробирке. Сперму барана разбавляют в 20-30 раз, быка в 10-15 раз, хряка и жеребца - в 2-3 раза. Если концентрация в сперме хряка и жеребца 100 млн. спермиев в 1 мл и меньше, то ее не разбавляют.

В пробирку вносят необходимое количество раствора и добавляют сперму. Температура раствора и спермы перед смешиванием должна быть одинаковой. Смешивание проводят осторожно путем легкого постукивания пальцем по нижнему концу пробирки. Каплю приготовленной смеси помещают на обезжиренное предметное стекло и делают мазок.

Если сперма хранилась несколько часов, то можно нанесенную на предметное стекло каплю спермы накрыть вторым таким же стеклом и плавно, и ровно протянуть его по первому. Мазки высушивают при температуре 36–37°C в термостате, а затем фиксируют на пламени или погружением на 1–2 мин. в стаканчик с 96%-ным этиловым спиртом. После фиксации производят окрашивание. Используют различные красители. Хорошие результаты получают при двойном окрашивании анилиновым генцианвиолетом и карболовым фуксином Циля. Фиксация мазков после высушивания не требуется.

Анилиновый генцианвиолет (Эрлиха). Смешивают два раствора. Раствор №1 состоит из кристаллвиолета (85% красящего вещества) – 2,5 г и этилового спирта (96%-ный) – 12 мл. Раствор № 2: анилин – 2 мл и дистиллированная вода – 98 мл.

После полного растворения оба раствора смешивают вместе и хранят во флаконе со стеклянной пробкой.

Карболовый фуксин Циля также готовят при смешивании двух растворов. Раствор № 1: основной фуксин (90% красящего вещества) – 3 г;

этиловый спирт (96%-ный) – 10 мл. Раствор № 2: фенол (карболовая кислота) – 5 г; дистиллированная вода – 95 мл.

Раствор № 1 добавляют в раствор № 2, смешивают и хранят во флаконе со стеклянной пробкой. Для получения лучших результатов карболовый фуксин надо время от времени фильтровать.

Хранить обе краски можно бесконечно.

Высушенные мазки окрашивают в течение 2 минут анилиновым генцианвиолетом и сразу же промывают проточной, затем дистиллированной водой и высушивают. После этого, дополнительно окрашивают карболовым фуксином в течение 10–15 сек. или дольше, в зависимости, от желательной интенсивности окрашивания; промывают проточной водой, потом дистиллированной и высушивают.

Из каждого образца спермы готовят 2–3 мазка, исследуют под микроскопом с иммерсионной системой и в каждом из них просматривают 100–200 сперматозоидов. Это дает более надежные результаты, чем просмотр большего количества клеток (до 500) в одном мазке. При подсчете ненормальных сперматозоидов придерживаются какой-либо классификации. Проще всего аномалии в структуре сперматозоидов классифицировать по измененным частям их: аномалии в области головки, шейки, средней части (тела) и хвоста.

Результаты исследования

В разных частях препарата подсчитывают всего не менее 500 спермиев, отмечая отдельно нормальные и патологические формы. Подсчитывают процент патологических форм по формуле:

$$M = \frac{P \times 100}{G}, (\%)$$

где M - процент патологических форм спермиев;

P - число подсчитанных патологических форм спермиев;

G - общее число спермиев, подсчитанных в препарате.

В сперме барана содержание морфологически ненормальных сперматозоидов не должно превышать 14%, в сперме быка — 18%, в сперме хряка и жеребца – 20%. Самцы, дающие сперму с более высоким процентом содержания уродливых спермиев, должны рассматриваться как бесплодные.

Головки могут быть двойными, конусообразными и грушевидными, круглыми, сморщенными, большими, узкими, удлинёнными, уменьшенными, асимметричными. Наиболее частые *аномалии шейки*: сломанные шейки, бесхвостые головки. *Аномалии тела*: изогнутые, разорванные, удлинённые, утолщенные, двойные, нитевидные и рудиментарные, а также ненормальное прикрепление тела к головке. *Аномалии хвостика*: извитые, двойные, сломанные, изогнутые, закрученные и срезанные.

Присутствие в сперме большого количества спермиев с ненормальной формой называется тератоспермией. В качестве конкретных причин образования уродливых форм спермиев отмечают:

1. Поражение семенника и придатка (гигантские и карликовые спермия).

2. Длительные промежутки между коитусами (обуславливающие старение и распад спермиев в придатке), отдельные головки, изолированные хвостики.

3. Половое истощение производителя вследствие большой половой нагрузки или недостаточного кормления (спермии с протоплазматической каплей в области шейки, тела и хвоста, т.е. незрелые спермии).

Классификация патологических форм сперматозоидов в зависимости от степени влияния их на плодовитость

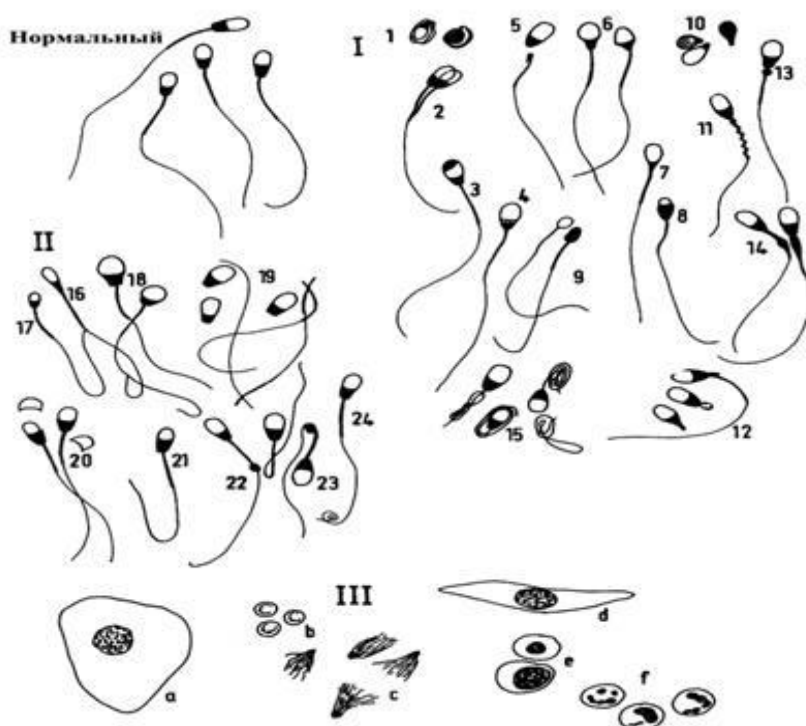


Рис 2.4.2. Главные дефекты спермиев

(I): 1 – несформировавшиеся клетки;

2 – сдвоенные;

3 – дефект акросомы (шишковидный сперматозоид); 4 – «корона» дефект;

5 – отделенная головка (хвост активный); 6 – грушевидные формы;

7 – головка с суживающимся основанием;

8 – головка с ненормальными очертаниями;

9 – маленькая ненормальная головка;

10 –отделенные ненормальные головки; 11 – штопорообразное тело; 12 – дополнительный хвост, культявидное тело; 13 – проксимальная цитоплазматическая капля;

14 – псевдокапелька, утолщение тела; 15 – извитой или сильно сложенный хвостик, «даг» дефект (клок свалявшейся шерсти).

Второстепенные дефекты (II): 16 – узкая головка; 17 – маленькая нормальная головка; 18 – гигантская и короткая широкая головка; 19 –

отделенные нормальные головки; 20 – отделенные акросомы; 21 – асимметричное прикрепление тела и хвоста; 22 – дистальная цитоплазматическая капля; 23 – правильно изогнутый хвост; 24 –

закрученный кончик хвоста.

Другие клеточные элементы (III): a – эпителиальные клетки; b – эритроциты; c – медузоподобные образования; d – ладьеобразные клетки; e –

мононуклеарные лейкоциты; f – нейтрофилы (Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. Eighth Edition. 2001. 868 p. Reprinted 2007).

3. Определение сперматозоидов с поврежденной акросомой

Акросома сперматозоидов содержит две группы ферментов, которые играют важную роль в процессе оплодотворения. Различные дефекты ее или повреждения структуры в процессе обработки и хранения спермы приводят к потере сперматозоидами оплодотворяющей способности. Такие повреждения, как правило, возникают в процессе замораживания и оттаивания спермы. При этом большое значение имеют индивидуальные особенности производителей. Высокая частота повреждений акросомы может существенным образом повлиять на результаты осеменения. Поэтому целесообразно оценивать замороженную сперму не только по подвижности, но и по числу сперматозоидов с поврежденной акросомой.

Сперматозоиды по окраске почти не отличаются от окружающей среды. Они не адсорбируют свет, не изменяют ни интенсивность, ни цвет прошедшего через них луча, поэтому микроскопия их затруднена. Однако они изменяют фазу волны света. Для обнаружения сдвига фаз используются интерференционные или фазово-контрастные микроскопы. При отсутствии их достаточно иметь микроскоп БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) и конденсор темного поля ОИ-10.

В фазово-контрастном микроскопе освещение устроено по методу светлого поля. Но в нем имеются: 1) дополнительная (кольцевая) осветительная диафрагма, которая помещается под конденсором (в его передней фокальной плоскости) и 2) фазовая пластинка из вещества, поглощающего свет и вносящего определенный сдвиг фаз; фазовая пластинка помещается в задней фокальной плоскости объектива, где изображается и кольцевая диафрагма. Изображения диафрагмы и фазовой пластинки (вследствие соответствия их размеров) совмещаются. Весь свет, не прошедший через объект, проходит через фазовую пластинку. Луч, прошедший через объект, распадается (подвергается дифракции) на пучки света (убывающей интенсивности), выходящие из объекта под разными углами. Этот дифрагированный свет проходит через весь зрачок объектива, в основном вне изображения кольцевой диафрагмы. Два пучка лучей – один от объекта, другой от среды, в которой находится объект, – соединяются, преобразуя при этом фазовые изменения, обусловленные объектом, в амплитудные (различной интенсивности). В результате получается видимое, фазово-контрастное изображение структуры объекта, в котором распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф.

Экспресс метод определения оплодотворяющей способности сперматозоидов (разработанный под руководством Соколовской И.И.).

Этот метод позволяет определять состояние акросом непосредственно у движущихся сперматозоидов в неразбавленной или оттаянной сперме быка, а также соотношение подвижных и неподвижных клеток.

Техника исследования.

Замороженную сперму быка оттаивают и разбавляют 10%-ным раствором желатины в отношении 1:1 для создания повышенной вязкости и сниже-

ния интенсивности движения сперматозоидов. Каплю разбавленной спермы (0,03 мл) наносят на предметное стекло дозатором пипеточным (Пастеровской пипеткой) и накрывают покровным стеклом. Сперму за пределами стекла удаляют при помощи фильтровальной бумаги. Приготовленные мазки немедленно исследуют под микроскопом БИОЛАМ, оснащенном окуляром 15х и объективом 40х и конденсором ОИ-10. Необходимый уровень освещения обеспечивается при помощи осветителя ОИ-19.

Для получения четкого изображения прикрывают диафрагму конденсора и опускают его кремальеру до упора; находят изображение сперматозоидов в светлом поле конденсора, затем наводят фокус, полностью открывают диафрагму конденсора и вводят в ход лучи темного поля. Следя за изображением, медленно перемещают кремальеру вверх до появления ярко светящихся контуров половых клеток на темном фоне.

На этом фоне можно отчетливо различить три категории клеток:

– сперматозоидов с ярким свечением всего контура головки, иногда с утолщенным передним краем – это биологически полноценные клетки с неповрежденной акросомой; у таких сперматозоидов ярко светятся также тело и хвост (рис.);

– сперматозоидов с отчетливо заметным задним ядерным кольцом и хвостом, но слабо заметным контуром передней половины головки – это неполноценные половые клетки с разбухшей акросомой;

– сперматозоидов с полностью отсутствующими контурами всей передней части головки – это клетки с полностью разрушенной или утерянной акросомой.

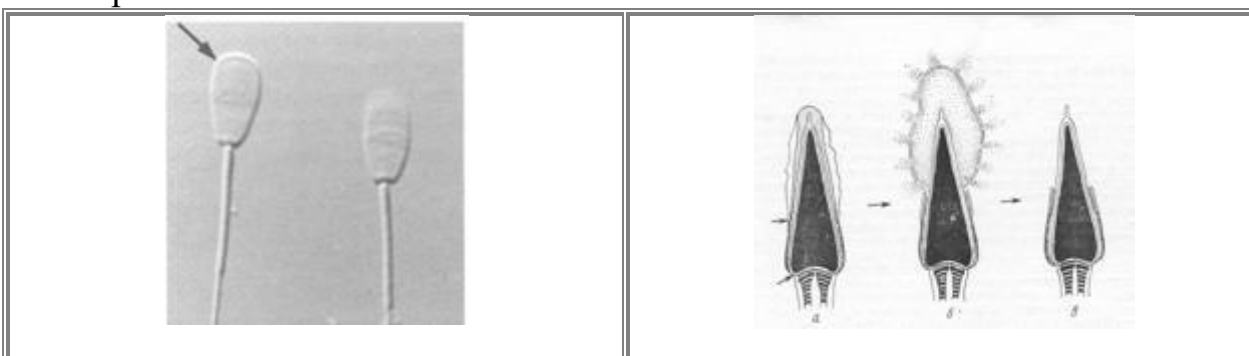


Рис 2.4.3. Слева: сперматозоид с нормальной акросомой (указана стрелкой) и поврежденной. Справа: схема акросомной реакции и потеря плазматической и наружной акросомной мембран при оплодотворении.

Результаты исследования

Просматривают в препарате 100 сперматозоидов, обладающих прямолинейным поступательным движением, и вычисляют процент клеток с поврежденной акросомой. Каждый образец спермы исследуют сразу после ее оттаивания и спустя 1 и 2 ч (по И.И. Соколовской – однократно). В период исследований сперму выдерживают в термостате при температуре 37°C.

В сперме *хорошего* качества через 2 ч после оттаивания не должно содержаться более 7 % дефектных сперматозоидов (из всех подвижных). В

сперме *удовлетворительного* качества число таких клеток может быть от 8 до 11%. При содержании 12 % или более дефектных сперматозоидов сперма оценивается как *низкого* качества (Медведев Г.Ф., Турчанов С.О., 2000).

4. Определение интенсивности дыхания (метаболической или дегидрогеназной активности) спермиев по обесцвечиванию метиленовой синьки

Метод основан на использовании спермиями кислорода синьки, добавленной в сперму, которая в результате этого обесцвечивается.

Техника исследования.

На чистое предметное стекло из глазной пипетки наносят каплю свежеполученной спермы быка или барана и к ней добавляют каплю 0,015-ного раствора метиленовой сини. Стеклопалочкой обе эти капли быстро перемешивают и набирают в трубочку смесь так, чтобы столбик был длиной около 2 см. Затем кладут трубку на лист белой бумаги и определяют по секундомеру время, в течение которого наступит обесцвечивание голубого столбика. Исследования проводят при температуре 20-22 С°.

Результаты исследования.

Полученные результаты сверяют с таблицей, по которой определяют качество спермы.

Оценка качества спермы по времени обесцвечивания метиленовой синьки (мин).

Качество спермы	Бык	Баран
Хорошее	5-10	3-7
Среднее	11-30	8-12
Плохое (непригодное для использования)	более 30	более 12

Чем интенсивнее поглощается кислород, тем скорее наступает обесцвечивание, тем выше выживаемость и оплодотворяющая способность спермиев.

5. Определение абсолютной и относительной выживаемости спермиев.

Выживаемость спермиев вне организма является одним из объективных показателей оплодотворяющей способности спермиев.

Для полной характеристики качества спермы определяют абсолютный показатель выживаемости спермиев - продолжительность их жизни при разных степенях разбавления спермы синтетической средой. Для этого неразбавленную сперму и сперму при разных степенях разбавления хранят при температуре около 0 °С и ежедневно определяют активность спермиев до тех пор, пока не установят полную их гибель во всех пробирках.

Относительная выживаемость — промежуток времени в часах между началом опыта и гибелью всех спермиев.

Техника определения Для определения абсолютной выживаемости спермиев 11 стерильных пробирок по 2 мл нумеруют восковым карандашом. Во все пробирки, за исключение первой, наливают пипеткой по 0,5 мл синте-

тической среды. В первую (пустую) и вторую пробирки вносят по 0,5 мл неразбавленной спермы. Первая пробирка служит контролем. Сперму во второй пробирке смешивают со средой и из нее переносят 0,5 мл в третью пробирку; в третьей пробирке смесь размешивают и переносят 0,5 мл в четвертую пробирку и т.д. Из последней пробирки 0,5 мл раствора выливают. Таким образом, в первой (контрольной) пробирке сперма неразбавленная, а в пробирке со второй по одиннадцатую сперма разбавлена в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 раза. Из каждой пробирки производят оценку активности спермиев. Пробирки со спермой устанавливают в штатив, закрывают стерильными пробирками и ставят на хранение при температуре около 0 °С в термостат.

В последующем ежедневно оценивают активность спермиев под микроскопом при температуре 40 °С. Перед исследованием к капле спермы на предметном стекле добавляют две капли 2,9%-ного раствора натрия лимоннокислого, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом. Оценку активности производят до установления гибели всех спермиев во всех пробирках. Результаты исследования заносят в таблицу.

Образец записи показателей для вычисления абсолютного показателя выживаемости спермиев

Порядковый номер хранения спермы	0		1		2		3		4	
Дата определения	15/III		16/III		17/III		18/III		19/III	
Время определения (часы)	9		9		9		9		9	
T	0		24		48		72		96	
t	12		24		24		24		24	
	a	at	a	at	a	at	a	at	a	at
Степень разбавления спермы										
Не разбавленная	8	96	2	48	Н					
1 : 1	8	96	8	192	8	192	7	168	5	120
1 : 3	8	96	8	192	8	192	8	192	6	144
1 : 7	8	96	7	168	6	144	6	144	4	96
										и т.д.

На основании записей определяют относительную (в часах) и абсолютную выживаемость спермиев. При вычислении абсолютной выживаемости интервал времени между последовательными оценками умножают на промежуточные показатели балльной оценки; полученные произведения суммируют.

Показатель выживаемости (S) определяют по формуле:

$$S = \sum at,$$

где \sum - знак суммы,
a - активность спермиев,
t - показатель времени.

Показатель времени определяют по формуле:

$$t = \frac{T_{n+1} - T_{n-1}}{2}$$

где t - часы опыта;

T_{n+1} - часы от начала опыта до последующего определения;

T_{n-1} - часы от начала опыта до предыдущего определения.

При определении выживаемости спермиев в день испытания, когда нельзя установить минимальную подвижность спермиев, интервал времени (t_n) в часах вычисляют по формуле:

$$t_n = \frac{T_{nc} - T_{n-1}}{2},$$

где T_{nc} - время выживаемости спермиев (см. ниже);

T_{n-1} - время, прошедшее от начала испытания до предпоследнего дня испытания, когда была установлена минимальная подвижность спермиев в баллах, ч.

Время выживаемости (относительной) спермиев (T_{nc}) в часах вычисляется по формуле:

$$T_{nc} = \frac{T_n - T_{n-1}}{2} + T_{n-1},$$

где T_n - время, прошедшее от начала испытания до последнего дня испытания, ч.

Результаты исследования. Хорошая сперма быка и барана, разбавленная синтетической средой в 16-32 раза, должна иметь показатель выживаемости спермиев не ниже 1400, хряка - 900, жеребца - 400 и выше.

ГОСТ на свежеполученную сперму сельскохозяйственных животных, которая является пригодной для разбавления и последующего хранения.

ПОКАЗАТЕЛИ	БЫК	БАРАН	ХРЯК	ЖЕРЕБЕЦ
Цвет	Молочно-белый или кремовый	Кремовый	Серо-белый	Серо-белый
Консистенция	Сливкообразная	Сметанобразная	Водянистая со сгустками	Водянистая со слизью
Объем, мл, (минимальный/максимальный)	4—5/20	1—2/5	300/1000	50—100/300
Концентрация спермиев, млрд/мл, не менее	0,8	1,0	0,1	0,15
Подвижность не менее, баллы	7,0	8,0	7,0	6,0
Густота	Г,С	Г	Г,С	Г,С
Выживаемость спермиев при 2-5° после разбавления ГЦЖ средой: — относительная, часы, не ниже — абсолютная, часы, не ниже	249	240	200	40
	1400	1400	900	450
Количество апатогенных микробов в 1 мл, не более	5000	5000	5000	5000
Коли-титр, не более	1:10	1:10	1:10	1:30
Максимальный процент патологических спермиев	18	14	30	30

Определение выживаемости спермиев при 38 °С после её оттаивания.

Метод заключается в определении количества спермиев, сохранивших прямолинейно-поступательное движение после оттаивания и 5 ч. хранения спермы в термостате при температуре 38 °С.

Техника исследования.

Сперму оттаивают по принятой технологии и в пробирке инкубируют в термостате с водяной рубашкой при температуре 38 °С. После 1, 2, 5 часов инкубации спермы в термостате определяют подвижность спермиев (технику определения смотри выше).

Результаты исследования.

Спермии имеют выживаемость не менее 5 часов, если при исследовании спермы после 5 часов инкубации в термостате при температуре 38 °С в ней обнаруживают не менее 5% (0,5 балла) спермиев с прямолинейно-поступательным движением.

Технология оттаивания семени

Строгое соблюдение мероприятий, изложенных в инструкции, приведет к увеличению процента оплодотворений в результате искусственного осеменения.

Соблюдение технологии при оттаивании семени необходимо для достижения наилучших результатов при искусственном осеменении.

Для сохранения высокого качества семени, нужно уделять большое внимание рекомендациям, изложенным в этой инструкции.

ФАСОВКА И ХРАНЕНИЕ СЕМЕНИ

Семя быков-производителей фасуется в пайету объемом 0,25см³. Пайета с семенем быка-производителя храниться в сосудах Дьюара (при -196 °С).

ТРАНСПОРТИРОВКА СЕМЕНИ

Семя доставляется в хозяйства в сосудах Дьюара. При переносе стаканов с семенем из одного сосуда в другой, необходимо два сосуда расположить рядом, что бы перенос занял не более 10 секунд. Пайеты, находящиеся в стакане, должны быть опущены в жидкий азот как можно быстрее.

ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ

Инструментарий для искусственного осеменения должен храниться в чистом и сухом месте. Инструментарий для искусственного осеменения

- * корнцанг для извлечения пайеты из сосуда Дьюара;
- * термос или термостат-оттаиватель биологический, с широким горлом и термометром;
- * ножницы прямые из нержавеющей стали;
- * бумажные полотенца или салфетки;
- * шприц-катетер для осеменения;
- * защитный чехол и санитарный чехол;
- * одноразовые перчатки для искусственного осеменения.

Шприц-катетер – это шприц с поршнем для осеменения. Вместе со шприцем необходимо использовать защитные чехлы.

Существуют разные типы шприцов: подходящие для пайет объемом 0,5 см³, 0,25 см³ и комбинированного типа, используемые для пайет обоих видов.

Виды фиксирующих механизмов шприцов:

- * фиксатор для шприцов без резьбы и утолщений;

- * резьба или утолщение.

Защитные чехлы – различаются по размеру для разного видов пайет. Они служат для фиксации пайет в шприце и обеспечивают введение семени без потерь. Чехлы выпускаются в стерильных упаковках.

Виды чехлов:

- * Чехлы без пластиковых вставок подходят для использования только для пайет объемом 0,5 см³.

- * Чехлы с пластиковыми вставками подходят для пайет объемом 0,25 см³ и 0,5 см³.

ХРАНЕНИЯ ОБОРУДОВАНИЯ

- * Храните сосуд Дьюара на деревянной подставке в сухом помещении. Регулярно проверяйте уровень азота мерной линейкой. Не допускайте снижения уровня азота более чем на 2/3 сосуда.

- * Чехлы необходимо хранить в сухом месте при комнатной температуре не ниже 18 °С.

Хранение чехлов в чрезмерно горячих или холодных местах приводит к их деформации.

Повреждённые чехлы подлежат утилизации.

- * Всегда удаляйте воду из термостата-оттаивателя по окончании работы и не забывайте протирать его насухо.

- * Инструменты для искусственного осеменения должны храниться в сухом и чистом месте.

ПОДГОТОВКА РАБОЧЕГО МЕСТА

- * Подготовить рабочее место, продезинфицировать рабочий стол, подготовить инструменты для искусственного осеменения, переодеться в рабочую одежду.

- * Проводим визуальное наблюдение по выявлению коров и телок в охоте продолжительностью 1 час (не менее 3-4 раз в сутки) или смотрим записи по выявлению коров и телок.

- * Сверьтесь с данными закрепления.

- * Тщательно вымойте руки перед началом работы.

- * Убедитесь, что вода в термостате-оттаивателе чистая и нагрета до оптимальной температуры 37-38 °С.(при разморозке пайет производства США температура воды должна быть ровно 35 °С)

- * Всегда используйте термометры для водяной бани. Помните! Все типы термометров подлежат периодической калибровке.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ И ОТТАИВАНИЕ ПАЙЕТ

- * При подъеме канистры из сосудов Дьюара, не допускается подъем выше линии замерзания (10-15 см. до верхнего края горловины.)
- * Для извлечения пайеты из сосуда Дьюара используйте корнцанг предварительно охлажденный в пустой канистре сосуда Дьюара.
- * с помощью корнцанга строго вертикально извлеките пайету из стакана.
- * Не пытайтесь ее согнуть - она может сломаться или появиться микротрещины.
- * Извлекайте одну пайету за один раз. Если процесс извлечения занял больше 10 секунд, опустите канистру с пайетами обратно в жидкий азот не менее чем 15 секунд для охлаждения.
- * После извлечения пайет аккуратно опустите канистру в сосуд Дьюара во избежание всплывания пайет.
- * Достав из сосуда пайету, аккуратно встряхните ее для удаления азота с поверхности пайеты и быстро (3-5 секунд) поместите в водяную баню с температурой воды 37-38°C, на 25 секунд (отсчет от 11 до 35 секунд). (при разморозке пайет производства США температура воды должна быть ровно 35°C ,а продолжительность разморозки ровно 45 секунд по секундомеру).
- * Оттаивайте не более одной пайеты одновременно.
- * Пайету помещайте заводской пробкой вниз, запаянной стороной вверх.
- * Для контроля времени оттаивания используйте таймер или часы с секундной стрелкой.
- * Важно поддерживать температуру пайеты не ниже 37-38 °С (при использовании пайет производства США температура пайеты должна быть ровно 35°C), во время всего процесса подготовки к осеменению.
- * Закройте сосуд Дьюара крышкой и установите сосуд на место.

ПОДГОТОВКА ШПРИЦА-КАТЕТЕРА

- * Подготовка инструмента для искусственного осеменения должна проходить в помещении с температурой не ниже 18 °С.
- * Подготовьте к использованию защитный чехол (выдвинув их из стерильной упаковки) и санитарный чехол.
- * Нагрейте шприц-катетер до 38 °С в термопене или путем его растирания бумажной салфеткой 5-6 раз.
- * Убедитесь, что поршень отведен на 15 см, чтобы можно было ввести пайету.
- * Извлекайте пайету из термостата-оттаивателя, салфеткой высушите ее и смотрите, чтобы воздушная пробка находилась у края запаянной стороны пайеты. Помните-вода губительна для семени.

Проверьте на дозе информацию (кличка, номер быка). Если невозможно прочитать надпись на пайете, не используйте ее.

Если пузырек находится в другом месте, аккуратно встряхните, чтобы он передвинулся в нужное положение.

* при использовании 0,25 см³ соломинок с универсальным шприцем, необходимо расположить пайету на поршне, а потом аккуратно задвигать пайету в шприц, оттягивая поршень.

* Отрезайте запаянный край пайеты прямыми ножницами. Отрезать соломинку нужно на расстоянии 0,6-0,8 см. от края осеменительного инструмента под углом 90 градусов, чтобы обеспечить полное прилегание пайеты к адаптеру защитного чехла во избежание протекания семени во внутрь чехла. Никогда не обрезайте пайету под другим углом.

* Обрезав пайету, вставьте обрезанный конец в адаптер защитного чехла. Затем, осторожно толкая и проворачивая, вставьте ее в адаптер и продолжайте проталкивать, пока не дойдет до конца чехла, далее наденьте санитарный чехол.

* Чтобы закрепить чехол на шприце с нарезкой, накручивайте чехол на шприц до тех пор, пока адаптер дойдет до конца чехла.

* Защитный чехол плотно фиксируется на шприце.

* Медленно надавите на поршень, чтобы выдавить воздух из наружного конца пайеты.

* Избегайте дальнейшего надавливания на поршень, чтобы не пролить семя.

КОНТРОЛЬ ТЕМПЕРАТУРЫ ПОСЛЕ ОТТАИВАНИЯ СЕМЕНИ

* Не допускайте резких перепадов температуры внешней среды с момента оттаивания до осеменения, убирайте снаряженный шприц в термо-пенал.

* Помните, что с момента разморозки, температура дозы семени должна оставаться стабильной.

* Максимальное время от размораживания до осеменения должна составлять не более 15 минут.

ЗАВЕРШЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ

* Осмотрите шприц-катетер после использования на предмет загрязнений, нехарактерных для здорового животного.

* Перед утилизацией сломайте чехол и пайету для невозможности их случайного использования.

* Заверните край перчатки так, чтобы чехол и пайета остались внутри, и утилизируйте.

* Разберите шприц-катетер, протрите спиртовыми салфетками или спиртовым тампоном, высушите и заново соберите.

* Провести записи в журнал искусственного осеменения.

СОВЕТЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

* Подогревайте шприц-катетер и защитный чехол перед контактом с соломинкой.

* Держите конец шприца рукой, чтобы сохранить его тепло. (Руки должны быть чистыми!)

- * Для сохранения температуры во время пути к животному используйте пенал для искусственного осеменения с подогревом.
- * Используйте одноразовые санитарные чехлы для дополнительной санитарной защиты шприца.
- * Вводите шприц в половые пути животного только после фиксации шейки матки через прямую кишку и после того, как животное успокоится.
- * Инструменты, используемые для оттаивания семени и осеменения животных должны быть стерильные.
- * Для стерилизации инструментов используйте салфетки с содержанием спирта 96 процентов.
- * Для обработки поверхностей рабочей зоны и рук используйте салфетки с содержанием спирта 70 процентов.

ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВУХ САНИТАРНЫХ ЧЕХЛОВ, КАК КОНТРОЛЬ НАД ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

- * Если в хозяйстве присутствуют животные с инфекционными заболеваниями половых путей, рекомендуем метод осеменения с использованием двух санитарных чехлов.
- * Помимо того, что чехлы используют дополнительную термозащиту, они уменьшают количество бактерий, переносимых из влагалища в матку во время искусственного осеменения, тем самым повышая процент успешных оплодотворений.
- * Используя данный метод, вводите шприц в половые пути, удалив только один санитарный (верхний чехол).
- * При введении шприца в шейку матки, натянув чехол, прорвите его шприцом и продолжите введение шприца.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СЕМЕНИ РАЗДЕЛЕННОГО ПО ПОЛУ

Ввиду того, что стоимость разделенного семени по полу достаточно высокая рекомендуется его использовать только для телок, осеменяемых первый раз. При этом целесообразно осеменять телок с точно установленным временем

прихода в охоту и ярко выраженными ее признаками. Осеменение необходимо проводить через 8-10 часов после начала охоты, используя только одну дозу. С целью снижения затрат на искусственное осеменение телок пришедших в охоту повторно (после осеменения разделным по полу семенем), целесообразно покрывать традиционным семенем согласно плану закрепления. Использовать сексированное семя только для осеменения первично отобранных, здоровых, не заживевших правильно развитых телок! [9]

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профессиональный стандарт "Работник в области ветеринарии". - Ставрополь : Энтропос, 2022. - 108 с. - URL: <https://znanium.com/catalog/document?id=420691>. - Режим доступа: по подписке. - Б. ц. - Текст : электронный.
2. Терентьева, Н. Ю. Оператор по искусственному осеменению животных и птицы : учебное пособие для студентов среднего профессионального образования, обучающихся по специальности 36.02.01 ветеринария / Н. Ю. Терентьева, В. А. Ермолаев, С. Н. Иванова. - Ульяновск : УлГАУ имени П. А. Столыпина, 2021. - 252 с. - URL: <https://e.lanbook.com/book/207239>. - Режим доступа: для авториз. пользователей. - Б. ц. - Текст : электронный.
3. Некрасов, Геннадий Давыдович. Акушерство, гинекология и биотехника воспроизводства животных : учебное пособие / Г. Д. Некрасов, И. А. Суманова. - Москва : ФОРУМ : ИНФРА-М, 2024. - 174 с. - (Среднее профессиональное образование). - URL: <https://znanium.com/catalog/document?id=436767> (дата обращения: 16.10.2023). - Режим доступа: по подписке. - ISBN 978-5-00091-538-7 : Б. ц. - Текст : электронный.
4. Полянцев, Н. И. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных : учебник для СПО / Н. И. Полянцев, Л. Б. Михайлова. — 7-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 448 с. — ISBN 978-5-507-50413-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/426581> (дата обращения: 06.12.2024). — Режим доступа: для авториз. пользователей.
5. Технология искусственного осеменения сельскохозяйственных животных : учебно-методическое пособие / Н. А. Малахова, А. П. Лищук, О. Г. Пискунова, Н. Н. Сергеева. - Орел : ОрелГАУ, 2023. - 130 с. - URL: <https://e.lanbook.com/book/362438> (дата обращения: 27.10.2023). - Режим доступа: для авториз. пользователей. - Б. ц. - Текст : электронный.
6. Авдеенко, Владимир Семенович. Биотехника воспроизводства с основами акушерства : учебник / В. С. Авдеенко, С. В. Федотов. - Москва : ИНФРА-М, 2021. - 454 с. - (Среднее профессиональное образование). - URL: <http://znanium.com/catalog/document?id=367932>. - Режим доступа: по подписке. - ISBN 978-5-16-013895-4 : Б. ц. - Текст : электронный.
7. Авдеенко, Владимир Семенович. Биотехника воспроизводства с основами акушерства животных. Практикум : учебное пособие / В. С. Авдеенко, С. В. Федотов. - Москва : ИНФРА-М, 2021. - 155 с. - (Среднее профессиональное

образование). - URL: <http://znanium.com/catalog/document?id=362831>. - Режим доступа: по подписке. - ISBN 978-5-16-013896-1 : Б. ц. - Текст : электронный.

8. Особенности современного подхода к организации искусственного осеменения коров на промышленных фермах и комплексах : методические рекомендации для специалистов зооветслужбы сельскохозяйственных предприятий по производству молока, а также для студентов по специальности 36.05.01 Ветеринария и направлению подготовки 36.03.02 Зоотехния / М-во сельского хоз-ва Рос. Федерации, Вологодская ГМХА, Фак. ветерин. мед. и биотехнол. ; сост. Т. В. Новикова [и др.]. - Вологда ; Молочное : ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА, 2021. - 44 с. - Систем. требования: Adobe Reader. - URL: <https://lk.molochное.ru/ebs/notes/2927/download>. - Режим доступа: для авториз. пользователей. - заглавие с титула экрана. - Б. ц. - Текст : электронный.

9. <https://plemminsk.by/wp-content/uploads/2021/07/instrukciya-ottivanie-spermy.pdf>