

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ – МСХА имени К.А. Тимирязева»**

**Белозерцева Н.С., Федотов С.В., Бригида А.В.,  
Артюшина З.С., Свистунов Д.В.**

**ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ОЦЕНКА  
КАЧЕСТВА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ  
СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

**Учебно-методические пособие**

**Москва 2025**

Белозерцева Н.С., Федотов С.В., Бригида А.В., Артюшина З.С., Свистунов Д.В. Основные показатели и оценка качества криоконсервированной спермы быков-производителей: Учебно-методические пособие. – М.: ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2025, – 100 с.

Настоящее учебно-методическое пособие посвящено актуальной проблеме современного животноводства – контролю качества криоконсервированной спермы быков-производителей.

Материал изложен в соответствии с новым учебно-тематическим планом и программой по «Биотехнике воспроизводства животных». Пособие предоставляет собой теоретическую базу и практическую инструкцию для проведения лабораторных занятий со студентами обучающихся по направлениям «Ветеринария» и «Зоотехния», а также для подготовки участников конкурсов профессионального мастерства по стандартам WorldSkills в компетенции «Ветеринария».

Рецензенты:

Коба И.С., д.в.н., доцент, зав. кафедрой эпизоотологии и организации ветеринарного дела ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

Авдиенко В.С., заслуженный ветеринарный врач РФ, д.в.н., профессор кафедры генетических и репродуктивных технологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

Рассмотрены и утверждены на заседании кафедры ветеринарной медицины института зоотехнии и биологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева (протокол № 17 от 26.08.25).

## Оглавление

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>                                                         | <b>5</b>  |
| <b>1 ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ СПЕРМЫ .....</b>                                   | <b>11</b> |
| <b>БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ.....</b>                                              | <b>11</b> |
| 1.1 СОСТАВ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ .....                                  | 11        |
| 1.2 СТРОЕНИЕ СПЕРМИЕВ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ .....                              | 14        |
| 1.2.1 Химический состав сперматозоидов быков-производителей .....             | 16        |
| 1.3 ДВИЖЕНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ .....                        | 17        |
| 1.3.1 Источники энергии движения сперматозоидов быков-производителей .....    | 18        |
| 1.3.2 Анабиоз и его значение при хранении спермы быков-производителей .....   | 20        |
| 1.4 ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ..... | 21        |
| 1.4.1 Влияние света .....                                                     | 21        |
| 1.4.2 Влияние температуры .....                                               | 21        |
| 1.4.3 Влияние осмотического давления.....                                     | 22        |
| 1.4.4 Реакция среды.....                                                      | 24        |
| 1.4.5 Влияние солей .....                                                     | 25        |
| <b>2 ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИДКИМ АЗОТОМ .....</b>                | <b>28</b> |
| <b>3 ПОДГОТОВКА ИНСТРУМЕНТОВ И ПРАВИЛА .....</b>                              | <b>35</b> |
| <b>РАЗМОРАЖИВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ .....</b>                       | <b>35</b> |
| <b>БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ.....</b>                                              | <b>35</b> |
| 3.1.1 Оттаивание криоконсервированной спермы в .....                          | 45        |
| открытых гранулах.....                                                        | 45        |
| <b>4 ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ .....</b>                    | <b>52</b> |
| <b>БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ.....</b>                                              | <b>52</b> |
| 4.1 МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ (ГОСТ 32222-2013).....                                 | 52        |
| 4.1.1 Отбор проб криоконсервированной спермы быков-производителей.....        | 52        |
| 4.1.2 Маркировка криоконсервированной спермы .....                            | 52        |
| быков-производителей .....                                                    | 52        |
| 4.2 ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА .....                                        | 53        |
| КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-.....                                       | 53        |
| ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ (ГОСТ 26030-2015, ГОСТ 32198-2013).....                        | 53        |
| 4.3 МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ .....                                 | 54        |
| КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ .....                                             | 54        |
| БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ.....                                                     | 54        |
| 4.3.1 Определение цвета .....                                                 | 54        |
| 4.3.2 Определение объема и массы эякулята .....                               | 55        |

|       |                                                                                               |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.3 | Определение pH.....                                                                           | 55 |
| 4.3.4 | Определение осмотического давления.....                                                       | 56 |
| 4.3.5 | Определение концентрации сперматозоидов .....                                                 | 60 |
| 4.4   | МЕТОДЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ .....                                                           | 66 |
|       | КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ .....                                                             | 66 |
|       | БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ.....                                                                     | 66 |
| 4.4.1 | Определение подвижности сперматозоидов.....                                                   | 66 |
| 4.5   | МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА .....                                                           | 70 |
|       | КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ .....                                                             | 70 |
|       | БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ.....                                                                     | 70 |
| 4.5.1 | Определение содержания кетоновых тел .....                                                    | 70 |
| 4.6   | МЕТОДЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА .....                                                         | 71 |
|       | КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ .....                                                             | 71 |
|       | БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ.....                                                                     | 71 |
| 4.6.1 | Определение содержания сперматозоидов с аномальной .....                                      | 71 |
|       | морфологией и включений.....                                                                  | 71 |
| 4.6.2 | Определение количества мертвых сперматозоидов .....                                           | 76 |
| 4.6.3 | Определение размеров сперматозоидов.....                                                      | 79 |
| 4.6.4 | Определение целостности акросомы сперматозоидов .....                                         | 81 |
| 4.6.5 | Методика быстрого дифференциального окрашивания спермы .....                                  | 84 |
|       | «ДИАХИМ-ДИФФ-КВИК» .....                                                                      | 84 |
| 4.7   | МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА .....                                                      | 86 |
|       | КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ .....                                                             | 86 |
|       | БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ (ГОСТ 32198-2013).....                                                   | 86 |
| 4.7.1 | Определение общего количества микроорганизмов .....                                           | 86 |
| 4.7.2 | Определение бактерий группы кишечной палочки .....                                            | 89 |
| 4.7.3 | Исследование спермы на наличие синегнойной палочки .....                                      | 92 |
| 4.7.3 | Исследование спермы на наличие синегнойной палочки .....                                      | 92 |
| 4.7.4 | Исследование спермы на наличие анаэробной микрофлоры.....                                     | 92 |
| 4.7.5 | Исследование спермы на наличие грибов .....                                                   | 93 |
| 4.7.6 | Исследование спермы на наличие золотистого стафилококка ( <i>Staphylococcus aureus</i> )..... | 93 |
| 4.7.6 | Идентификация выделенных микроорганизмов .....                                                | 94 |
| 4.7.7 | Изучение морфологических и культуральных свойств .....                                        | 94 |
|       | микроорганизмов .....                                                                         | 94 |
| 2.5.8 | Определение патогенности выделенных микроорганизмов .....                                     | 95 |

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широкое применение нашел метод замораживания и длительного хранения спермы быков в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). При этом методе хранения сперматозоиды находятся в условиях полного анабиоза, когда сильно замедляются все биохимические процессы. Научными исследованиями установлена способность сперматозоидов переносить низкотемпературное замораживание. Наиболее опасной для живых клеток и тканей температурной зоной является интервал от 0 до  $-30^{\circ}\text{C}$ . В этом интервале процесс образования и рост кристаллов льда происходят с наибольшей интенсивностью, что приводит к быстрой гибели (повреждение) клеток.

Таким образом, при сверхбыстром замораживании спермы до температур  $-79$ ,  $-183$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  благодаря явлению витрификации можно длительное время сохранять ее оплодотворяющую способность и после ее оттаивания и искусственного осеменения самок получать нормально развитое потомство сельскохозяйственных животных.

Метод длительного хранения спермы производителей в замороженном состоянии имеет ряд преимуществ по сравнению с ее краткосрочным хранением, которое не позволяет регулярно использовать быков с полной нагрузкой. Благодаря этому методу племенные предприятия могут получать сперму от быков на протяжении всего года, хранить ее месяцами и даже годами и создавать ее большие запасы. Замороженная сперма элитных производителей может быть использована по селекционному плану на большом поголовье. При получении спермы от быка 2 раза в неделю можно собрать за год не менее 200 полноценных эякулятов или  $800-1000\text{ см}^3$  спермы, которой после разбавления можно осеменить до 10 тысяч коров вместо 1000-1500 при использовании других способов хранения спермы.

Внедрение метода длительного хранения спермы в замороженном состоянии позволяет коренным образом изменить организацию племенной работы и осеменения животных. Вместо доставки спермы на пункты по

осеменению животных через 2-3 суток, как это принято при других способам хранения, можно создать годовой запас спермы. Имея на пункте необходимый запас спермы разных быков, можно осеменять коров только спермой тех производителей, которые закреплены за стадом по селекционному плану. Замороженную сперму можно использовать на 100%, тогда как сохраняемую при температуре 2-4°C – только на 50-70%. Метод длительного хранения замороженной спермы в 6-7 раз сокращает транспортные расходы.

Применение замороженной спермы дает большой экономический эффект, так как позволяет изъять малоценных и максимально использован, высокоценных быков-производителей и расширить зону действия племенных предприятий и число обслуживаемых животных (до 300-500 тысяч коров и телок в год). Быков-производителей можно использовать независимо от их местонахождения, можно широко применять обмен спермой производителей как внутри страны, а также между странами.

Для перевозки спермы в жидком азоте (-196°C) применяют специальные стальные и алюминиевые двустенные сосуды с вакуумно-порошковой либо многослойно-вакуумной изоляцией. Вместимость сосудов – от 4 до 50 л жидкого азота (АТ-6, СДС-20, «Харьков-30» и «Харьков-34А»). Суточный расход жидкого азота в них колеблется от 1 до 3% в зависимости от размеров и качества изоляции.

Хранится сперма на племенных предприятиях в стационарных хранилищах и емкостях (типа ХБ-0,5 ХВ-6202 и др.), в специально закрывающихся канистрах или пластмассовых стаканах, которые должны быть погружены в жидкий азот. Канистры или стаканы имеют съемные перегородки, поэтому в них можно сделать до четырех отделений и хранить несколько эякулятов. Заполненные стаканы помещают один на другой в металлический футляр. На верхнем крае стакана имеется держатель, к которому прикрепляют этикетку с номером быка или номером футляра.

**Способ замораживания спермы быков-производителей в соломинках по литовской технологии.** При использовании такого способа

разбавленную сперму расфасовывают в стерильные полипропиленовые соломинки по 0,25 см<sup>3</sup>. На каждой соломинке маркировочной машиной М6-ММС делают надписи с помощью сменяемого клише, изготовленного для каждого быка на барабане машины. Соломинки маркируют специальной краской СВКФ-01, и которую добавляют 4% нафтенатно-кобальтовый сиккатина и перемешивают. На поверхности соломинок печатается наименование племенного предприятия, кличка и инвентарный номер быка, дата замораживания спермы, а при необходимости другие данные. После работы с машины краску удаляют смесью уайтспирта и ацетона (3:1).

Маркированные соломинки в коробке помещают в настольную бактерицидную камеру УНБК-1 или в другую камеру подобного назначения, включают бактерицидные лампы и облучают соломинки в течение 4 ч. В стерильной камере соломинки хранятся до их использования.

После второго (окончательного) разбавления спермы ее расфасовывают в стерильные и безвредные для спермиев литовские соломинки (с наружным диаметром 2,5 мм, длиной 100 мм и вместимостью 0,25 см<sup>3</sup>) и укупоривают окрашенными стеклянными шариками на машине М6-МУ2-С. Соломинки размещаются в один ряд в металлические рамки до 140 штук. Для раскладки соломинок рамку помещают на раскладную рейку, рукой берут соломинки и быстро их раскладывают. При укупорке соломинок шарик расширяет их концы, по лому после их раскладки строго в один ряд между ними образуются небольшие промежутки. Это является нормой. Чтобы соломинки в рамке остались на своих местах, сверху их прижимают держателем. Для охлаждения спермы и соломинках заполненные рамки кладут одну на другую. До пяти рамок с соломинками (до 700 шт.) помещают в коробку и ставят в холодильник (ХЖС-300), в котором поддерживается температура около 4°C. В один холодильник ставят не более 16 коробок (до 11200 соломинок). В холодильнике сперма постепенно, равномерно (0,3-0,5°C/минуту) в течение 1 ч охлаждается до 4°C. Сперму выдерживают в холодильнике 3-4 ч и затем замораживают.

Известен также способ подготовки семени к криоконсервации по «Харьковской технологии» (Ф.И. Осташко, В.А. Шинкаренко). Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Данный метод заключается в том, что подготовленное в стерильных условиях семя быков-производителей фасуется в одноразовую упаковку при комнатной температуре с помощью специального аппарата APC-2 (Ф.И. Осташко, В.А. Чирков, 1971) непрерывной разливки в пленочную трубчатую упаковку, с последующей запайкой-разделением на отдельные облицованные гранулы, которые ссыпаются в алюминиевые тубы, проходят эквilibрацию при  $t = 2-5^{\circ}\text{C}$ , вращаясь в барабане, установленном в холодильной камере.

**Современная технология замораживания семени.** В настоящее время известен способ «Французская технология» (автор R. Cassu, 1964 г.), заключающийся в применении оригинальных расфасовочных машин-автоматов для розлива разбавленного патентованной средой «Лецифосплас – 470» семени быков-производителей в микроконтейнеры (рис. 1 а, рис. 1 б), по французской технологии – пайеты или капиллярные трубочки из полимеров (рис. 2), с последующим замораживанием в парах жидкого азота для длительного хранения.



а.



б.

Рисунок 1 (а, б) – Машина для фасовки пайет GENOM'X

На каждой соломинке указываются название предприятия, кличка быка, его номер, порода и дата заморозки спермы, которая соответствует дате ее взятия. Этот этап автоматизирован. Информация с компьютера из базы данных поступает на станок по расфасовке и маркировки спермы.

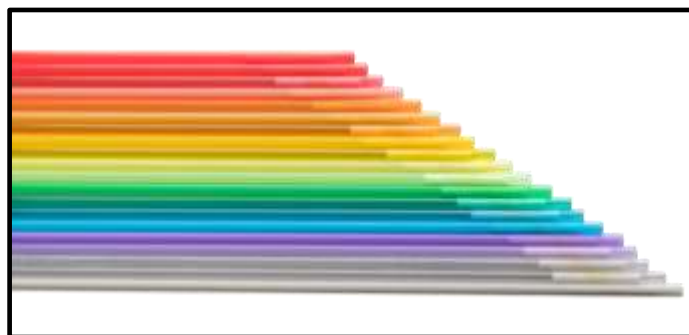


Рисунок 2 – Пайеты 0,25 см<sup>3</sup> и 0,5 см<sup>3</sup>

В дальнейшем соломинки размещают на специальные рамки. На них сперма находится в течение 2-3 ч при температуре 3-5°C (рис. 3, рис. 4).



Рисунок 3 – Распределительный блок для 175 пайет 0,25 мл

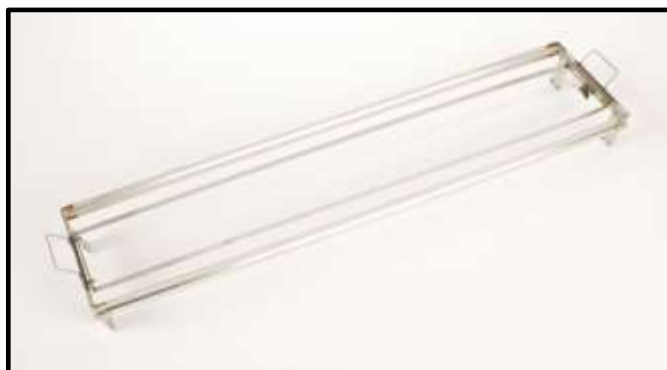


Рисунок 4 – Подставка для замораживания 175 пайет 0,25 см<sup>3</sup>

Устанавливается программа постепенного понижения температуры. После охлаждения до температуры 3-5°C сперму помещают в специальные камеры, в которых происходит ее замораживание жидким азотом, сначала до -100°C, а затем до -100°C (рис. 5 а, рис. 5 б).



а.



б.

Рисунок 5 (а, б)– Замораживатель DIGITCOOL на 30 подставок для замораживания пайет

После этого сперму помещают в банк хранения, где она находится в жидком азоте.

# 1 ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ СПЕРМЫ

## БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

### 1.1 СОСТАВ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Сперма быков-производителей состоит из двух основных частей:

- сперматозоидов;
- жидкости, называемой плазмой.

В состав плазмы входят секреты придаточных половых желез (три пары желез: пузырьковидные, предстательные и луковичные; все они открываются своими протоками в тазовую часть мочеполового канала; по строению все эти железы сложные альвеолярно-трубчатые), а также железы придатков семенников и ампул спермиопроводов.

**Пузырьковидная железа** – *gl. vesicularis* – парная; она развита, у самцов неодинаково и располагается дорсально от мочевого пузыря в мочеполовой складке брюшины, латерально от железистой части семяпровода. Выводной проток каждой железы сливается с семяпроводом, образуя общий выводной проток, открывающийся на семенном холмике. Железа выделяет клейкий секрет.

У быка пузырьковидные железы эллипсоидной формы, довольно плотные, дольчатые, с бугристой поверхностью. В их основе находятся гладкие мышечные волокна. Длина железы достигает 10-12 см, толщина 3 см, ширина 5 см.

**Предстательная железа** – *gl. prostata* – имеется у всех самцов, как продуктивных, так и непродуктивных животных. Она бывает застенная и пристенная. Застенная железа размещается дорсально на шейке мочевого пузыря и начальной части мочеполового канала. На ней различают боковые доли – *lobi laterales*, среднюю часть – перешеек – *isthmus prostatae* – и тело – *corpus prostatae*. Ее остов содержит гладкие мышечные волокна. Железа открывается многочисленными выводными протоками латерально от семенного холмика. Пристенная часть называется рассеянной предстательной железой – *gl. prostata disseminata*. Она расположена между слизистой и

мышечной оболочками тазовой части мочеполового канала, в его кавернозном теле; протоки железы открываются двумя парными рядами в дорсальной стенке канала. Рассеянная часть предстательной железы бывает крупнее при, отсутствии застенной части железы.

Секрет железы активизирует подвижность сперматозоидов.

У быка застенная предстательная железа имеет длинную среднюю часть – до 3,5-5 см толщиной до 1,5 см. Рассеянная часть предстательной железы концентрируется в основном (до 10-12 мм) в дорсальной стенке мочеполового канала, а в вентральной стенке она развита слабо (всего лишь 2 мм).

**Луковичная, или бульбоуретральная, железа** – *gl. bulbourethralis* – парная; размещается она в каудальной части уретры, прикрыта луковичнокавернозной мышцей – *m. bulbocavernosus*.

У быка луковичная железа небольшая (2,8×1,8 см), проток один, отверстие его прикрыто складкой слизистой оболочки.

Быки выделяют достаточно густую сперму, сперматозоиды в которой составляют 14% от всего объема. Остальной объем составляет плазма.

Доля секретов придаточных половых желез в образовании эякулята у разных видов сельскохозяйственных животных различна. У быка секрет пузырьковидных желез составляет 40-65%, предстательной железы – 5-6%, луковичных и уретральных желез – 25-30%, придатка семенника (без сперматозоидов) – 5-10% эякулята.

Соотношение между объемом плазмы и сперматозоидов не является строго определенным. Оно может колебаться не только у разных самцов одного вида, но и в разных эякулятах одного и того же самца.

Секреты придаточных половых желез имеют сложный состав. Они содержат фруктозу, белки, липиды, различные соли, лимонную кислоту, ряд ферментов и др. Все эти вещества создают определенное осмотическое давление в сперме и ее буферность, при которой реакция поддерживается на более или менее постоянном уровне.

Секреты придаточных половых желез играют большую роль в выделении спермы и жизнедеятельности сперматозоидов.

Перед половым актом секреты уретральных желез очищают мочеполовой канал от остатков мочи, увлажняют его, ослизняют конечную часть полового члена, что облегчает вход его во влагалище.

Во время эякуляции секреты придаточных половых желез разбавляют густую массу сперматозоидов, что способствует лучшему продвижению спермы по мочеполовому каналу. В придатках семенников сперматозоиды находятся в неподвижном состоянии – анабиозе (слабокислая среда, недостаток кислорода, отсутствие сахара и несколько пониженная температура). При этих условиях они продолжительное время (более месяца) сохраняют оплодотворяющую способность. Слабощелочные секреты придаточных половых желез, содержащиеся в них электролиты (особенно соли натрия) и другие вещества выводят сперматозоиды во время эякуляции из состояния анабиоза. Приобретая активное состояние, сперматозоиды быстро расходуют свои жизненные ресурсы и не могут сохраняться длительное время.

Секрет уретральных желез имеет щелочную реакцию.

Химический состав спермы разных видов животных представлен в табл.

1.

Таблица 1 – Основные составные вещества спермы быков-производителей

| Составные вещества                   | Бык-производитель |
|--------------------------------------|-------------------|
| Вода, %                              | 90                |
| Азот общий, мг %                     | 1022              |
| Белок, %                             | 5,8               |
| Фруктоза, мг %                       | 222-872           |
| Сорбит (шестиатомный спирт), мг %    | 73                |
| Липиды (жироподобные вещества), мг % | 152,4             |
| Лимонная кислота, мг %               | 720               |
| Молочная кислота, мг %               | 29-63             |
| Фосфор общий, мг %                   | 82                |
| Калий, мг %                          | 227,8             |

|               |       |
|---------------|-------|
| Натрий, мг %  | 227,8 |
| Кальций, мг % | 38,9  |
| Хлор,         | 217   |

Из табл. 1 видно, что 85-98% веса спермы составляет вода. Сперма всех видов животных содержит много белков – от 1 до 10%. В сперме быка имеется большое количество сахара, фруктозы (до 872 мг%) и липидов.

Плазма спермы содержит относительно большое количество солей.

## 1.2 СТРОЕНИЕ СПЕРМИЕВ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Сперматозоиды являются самой важной в биологическом отношении частью спермы. Спермий состоит из головки, шейки, тела и хвоста (рис. 6).

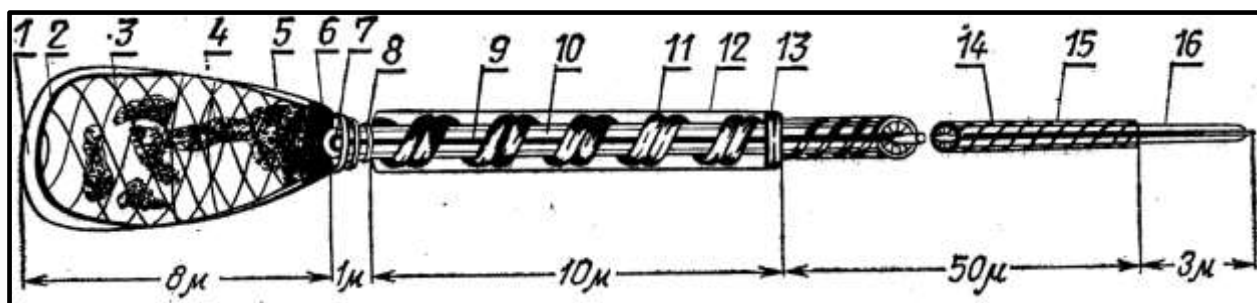


Рисунок 6 – Схема строения сперматозоида (по данным электронной микроскопии):

1 – чехол головки; 2 – акросома; 3 – пересекающиеся фибриллы; 4 – хромосомы; 5 – бокаловидная оболочка; 6 – кольцевидный слой основы головки; 7 – клеточный центр (центросом); 8 – спираль шейки; 9 – осевые фибриллы; 10 – дорзальный и вентральный боковые каудтики, каждый состоит из четырех фибрилл; 11 – двойная спираль соединяющей части; 12 – эктоплазма; 13 – последнее (замыкающее) кольцо (по Йенсену); 14 – три спиральных фибриллы хвоста; 15 – оболочка хвоста; 16 – концевая часть.

Общая длина сперматозоидов сельскохозяйственных животных составляет 0,056-0,07 мм, или 56-70 микрон, а ширина от 0,001 до 0,005 мм, или 1-5 микрон. Размеры спермиев быков-производителей представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Размеры сперматозоидов быков-производителей в зависимости от породного состава, мк (табл. 2)

| Вид животного | Длина спермия | Длина, ширина, толщина головки | Длина |      |        |
|---------------|---------------|--------------------------------|-------|------|--------|
|               |               |                                | шейки | тела | хвоста |
| Бык           | 68            | 9×4×1                          | 1,0   | 11,5 | 48     |

**Примечание:** Микрон = 0,001 мм.

Объем сперматозоида очень мал, он в 10-20 тысяч раз меньше объема яйцеклеток млекопитающих.

Головка сперматозоида представляет собой пластинку ложечкообразной формы. Рассматривая под микроскопом медленно плывущих сперматозоидов, можно увидеть их вращение вокруг своей продольной оси. Головка сперматозоида при этом попеременно поворачивается то широкой стороной, то ребром, отчего заметно «мерцание» сперматозоидов.

Передняя часть головки закруглена, а задняя ее часть у сперматозоидов быка несколько сужена и резко срезана. В средней и задней части головки находится ядро, а в передней ее части имеется особое тельце в виде колпачка-акросома. Она выделяет фермент гиалуронидазу, который при оплодотворении способствует проникновению сперматозоидов в яйцо.

Снаружи головка сперматозоида покрыта плотной прозрачной оболочкой – мембраной из рогоподобного белкового вещества (кератина). Она покрывает также шейку, тело и хвост сперматозоида. Только конечная часть хвоста свободна от оболочки. При длительном хранении спермы оболочка набухает и отслаивается от сперматозоида в виде шариков или лоскутков. Такие сперматозоиды теряют способность к оплодотворению.

Головка соединена с телом короткой шейкой. От основания головки отходят три пучка тонких волокон (фибрилл), образующих осевую нить. Последняя через шейку проходит в тело и хвост. В шейке имеется двойная спиральная нить, которая окружает осевую нить.

Хвост обеспечивает движение сперматозоида, он состоит из осевой нити, окруженной тройной спиральной нитью и мембраной. Конечная часть хвоста не покрыта спиральной нитью и оболочкой. Она состоит из фибрилл осевой нити и имеет вид кисточки.

Шейка, тело и хвост являются двигательной частью сперматозоида.

### **1.2.1 Химический состав сперматозоидов быков-производителей**

По данным Н.П. Шергина, сперматозоиды в своем составе содержат 25% сухого вещества и 75% воды. Сухое вещество состоит в основном из сложного и простого белка (85%), липидов (жировые и жироподобные вещества) (13,2%) и минеральных веществ (натрий, калий, кальций, магний) (1,8%). Эти вещества в сперматозоидах находятся в виде солей, фосфорной, хлористоводородной, серной кислот и солей органических кислот. В составе белков и липидов содержится фосфор (2,7%). В голове и хвостовой части сперматозоида состав жизненно важных химических веществ значительно различается.

В головке сперматозоида содержится в основном сложный белок – дезоксирибонуклепротеид, состоящий из дезоксирибонуклеиновых кислот (сокращенно ДНК) и простого белка (гистона), а также липопротеид (соединение белка с липидом), небольшое количество солей и других веществ. ДНК играют основную роль в передаче наследственных задатков потомству по линии отца. В ней содержится много фосфора.

В теле и хвосте сперматозоида содержатся простые белки, сложный белок липопротеид и свободные липиды. Они являются одним из источников энергии и имеют важное значение в двигательной функции сперматозоидов.

Во всех частях спермия имеется сера, состоящая из вещества, близкого к кератину, которой пропитана оболочка, придающая ей прочность.

### 1.3 ДВИЖЕНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Способность к движению является характерной особенностью сперматозоидов. Центр движения находится в шейке и теле. При отрывании хвоста от тела он становится неподвижным, тогда как сперматозоиды без головки могут продолжать двигаться.

*Имеется несколько видов движения сперматозоидов:*

- прямолинейно-поступательное (сперматозоиды активно перемещаются вперед по прямой линии);
- манежное (сперматозоиды вращаются вокруг своей головки или перемещаются по кругу с радиусом, равным примерно длине сперматозоида);
- колебательное (сперматозоид на одном месте изгибается вправо и влево).

Прямолинейно-поступательное движение сперматозоидов является нормальным движением, а манежное и колебательное – патологическим. Движение сперматозоидов осуществляется при помощи хвоста. Он изгибается в одну сторону, а затем быстро выпрямляется. Такие движения хвоста быстро повторяются одно за другим, и в результате отталкивания его от жидкости, в которой он, находится, сперматозоид продвигается вперед. В 1 секунду хвост сперматозоида быка при  $37^{\circ}$  производит 9 ударов. Ложечкообразная форма головки сперматозоида при односторонних движениях хвоста обеспечивает вращение его вокруг своей продольной оси. Сочетание ударов хвоста с вращением вокруг оси приводит к прямолинейно-поступательному движению сперматозоида. Сперматозоиды быков-производителей в нормальных условиях движутся с большой скоростью (4-6 мм в минуту).

Манежное движение появляется у ослабленных сперматозоидов после длительного их хранения или когда головка набухает и изменяет свою обычную ложечкообразную форму.

Колебательное движение наблюдается при ослаблении сперматозоида, когда движения хвоста становятся слабыми и медленными. Колебательные движения могут быть и у нормального сперматозоида при низкой температуре

и кислой реакции среды, когда замедлено образование энергии для движения. Подогревание или подщелачивание спермы вызывает восстановление прямолинейно-поступательного движения.

Нормальные сперматозоиды в медленно текущем потоке двигаются в одном направлении – против тока жидкости. Эта особенность называется реотаксисом. Благодаря реотаксису сперматозоиды двигаются в яйцевode навстречу яйцеклетки. Мертвые, неподвижные сперматозоиды перемещаются с током жидкости.

Все нормальные сперматозоиды имеют отрицательный электрический заряд. Наличие одноименного электрического заряда отталкивает сперматозоидов друг от друга, и поэтому в густой сперме не происходит их столкновения и слипания. Под влиянием электрического заряда в густой сперме сперматозоиды располагаются параллельно друг другу, что создает определенный порядок в их движении. При снижении электрического заряда взаимное отталкивание сперматозоидов ослабляется, и они агглютинируют, т.е. слипаются головками или всеми частями. Агглютинация сперматозоидов чаще всего происходит при повышении кислотности спермы и под влиянием воздействия многовалентных металлов (кальция, магния, алюминия), которые ослабляют или полностью снимают отрицательный электрический заряд сперматозоидов. Электрический заряд сперматозоидов могут снять также агглютинины – особые вещества, появляющиеся в сыворотке животного при иммунизации его чужеродными белками.

Сперма с агглютинированными сперматозоидами – показатель низкого ее качества. Такие сперматозоиды не способны продвигаться в половых путях самки для встречи с яйцеклеткой.

### **1.3.1 Источники энергии движения сперматозоидов быков-производителей**

Движение сперматозоидов связано с затратами большого количества энергии. Сперматозоиды получают ее за счет двух основных биохимических

процессов: дыхания с использованием кислорода окружающей среды и фруктолиза при расщеплении сахара в бескислородной среде. Третий процесс – распад аденозинтрифосфата – является вспомогательным. Для получения энергии сперматозоиды используют вещества, находящиеся в окружающей среде или в цитоплазме. При дыхании сперматозоиды могут использовать для окисления углеводы, липиды (фосфатиды) и белки. Однако преимущественно они окисляют углеводы, главным образом моносахариды – фруктозу и глюкозу, а также молочную кислоту, образующуюся при распаде сахаров в процессе гликолиза. Расходуя углеводы для дыхания, сперматозоиды получают около 90% энергии для движения. Сперматозоиды окисляют также многоатомный спирт – сорбит, поступающий в сперму в составе секретов пузырьковидных желез. При отсутствии в окружающей среде углеводов сперматозоиды в процессе дыхания используют липиды.

При распаде липидов в сперме образуется глицерин, который при дыхании может окисляться с образованием молочной кислоты и «фруктозы».

Чтобы увеличить количество энергетических веществ для сперматозоидов, в полученную сперму вводят глюкозу и фруктозу, яичный желток, содержащий до 7% лецитина, и лимоннокислый натрий (цитрат), нейтрализующий кислотность желтка и поддерживающий буферность среды.

Сперматозоиды в такой среде значительно лучше сохраняются, чем в естественной плазме спермы.

В процессе окисления углеводов образуется двуокись углерода ( $\text{CO}_2$ ), вода и большое количество энергии. При окислении одной грамм-молекулы сахаров образуется 680000 малых калорий энергии.

Процесс дыхания осуществляется при помощи ряда ферментов (цитохромоксидазы, карбоксидазы, дегидрогеназы и др.), содержащихся в сперме.

На процесс дыхания оказывает влияние температура, а также степень кислотности или щелочности среды. При понижении или повышении температуры на каждые  $10^\circ\text{C}$  соответственно ослабляется или увеличивается

в 2 раза дыхание. В кислой среде дыхание ослабляется, а в щелочной – усиливается. Сперма высокого качества характеризуется большой интенсивностью дыхания.

Фруктолиз (гликолиз) – получение энергии счет расщепления сахара в бескислородной среде. Оно осуществляется при участии ферментов (дегидрогеназа и др.), а также фосфорной кислоты. В результате расщепления фруктозы образуется молочная кислота и энергия.

При фруктолизе образуется в 20 раз меньше энергии на одну грамм-молекулу сахара, чем при дыхании. Таким образом, по сравнению с дыханием сперматозоида в бескислородной среде затрачивают во много раз больше питательных веществ. Но этот процесс имеет для сперматозоидов важное значение в том случае, когда сперма попадает в половые органы самки, где кислорода нет.

Фруктолиз значительно выражен в сперме быка, так как в ней содержится сравнительно большое количество сахара. Для спермы этого вида животных характерен также и высокий уровень дыхания. Сперма быков незначительно разбавлена секретами придаточных половых желез, содержит большое количество сахара и мало солей, имеет интенсивный фруктолиз.

### **1.3.2 Анабиоз и его значение при хранении спермы быков-производителей**

Образовавшаяся молочная кислота выделяется через оболочку сперматозоида в окружающую среду. Накопление молочной кислоты в сперме приводит к замедлению или полному прекращению движения сперматозоидов. Сперматозоиды при этом впадают в состояние анабиоза. При анабиозе значительно затормаживаются процессы дыхания и фруктолиза, что способствует более длительному сохранению сперматозоидов.

Сперматозоиды переходят в состояние анабиоза и при понижении температуры. Низкие температуры, так же как и кислая среда, тормозят жизненные процессы сперматозоидов и в то же время сохраняют их энергию.

Подщелачивание или нагревание спермы до температуры тела восстанавливает подвижность сперматозоидов.

Применяемые в практике искусственного осеменения методы хранения спермы основаны на переводе сперматозоидов в состояние анабиоза.

Большая концентрация молочной кислоты действует на сперматозоиды губительно.

## **1.4 ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

На жизнедеятельность сперматозоидов вне организма производителя оказывают влияние разнообразные условия внешней среды – свет, температура, осмотическое давление в жидкой части спермы, реакция среды, растворы солей, химические вещества и медикаменты.

### **1.4.1 Влияние света**

Рассеянный солнечный свет не оказывает вредного влияния на сперматозоиды. Прямые солнечные лучи вызывают гибель сперматозоидов через 20-40 минут. Поэтому при работе со спермой необходимо предохранять ее от воздействия прямых солнечных лучей. С этой целью окна следует завешивать занавесками.

### **1.4.2 Влияние температуры**

на жизненные процессы сперматозоидов весьма сильное. При температурах, близких к температуре тела животных (37-39°C), сперматозоиды двигаются наиболее активно, но быстро погибают. Это объясняется тем, что при активном движении сперматозоидов происходит быстрый расход энергетических ресурсов, содержащихся в сперме, и значительное накопление молочной кислоты (в сперме быка), которая вызывает отравление сперматозоидов.

Температура выше 39°C вызывает быструю остановку движения сперматозоидов и их гибель из-за коагуляции (свертывания) белка.

При температурах ниже, чем температура тела животных, движение сперматозоидов замедляется. При постепенном охлаждении спермы до температуры около 0°C движение сперматозоидов прекращается, и они переходят в состояние анабиоза. При подогревании спермы до температура 37-39°C подвижность их восстанавливается. При низких температурах сперматозоиды сохраняют жизнеспособность длительное время. Большинство методов хранения спермы связано с ее охлаждением. Однако резкое охлаждение спермы вызывает температурный шок – гибель сперматозоидов или их повреждение с потерей оплодотворяющей способности. Температурный шок наиболее сильно проявляется при быстром понижении температуры спермы ниже 18-20°C. Наиболее чувствительна к быстрому охлаждению свежеполученная сперма производителей. После выдержки ее при комнатной температуре в течение 1-2 часов она становится менее чувствительной к быстрому понижению температуры.

Разбавление спермы средой с желтком куриного яйца повышает устойчивость сперматозоидов к температурному шоку.

Чтобы избежать гибели сперматозоидов от температурного шока, необходимо все работы со спермой проводить при температурах 18-25°C. Такую же температуру должны иметь среды для разбавления спермы, посуда, приборы и инструменты, соприкасающиеся со спермой.

Чтобы избежать вредного действия высокой температуры окружающей среды работу по искусственному осеменению производят рано утром и вечером.

### **1.4.3 Влияние осмотического давления**

Как известно, при растворении какого-либо химического вещества в воде в ней возникает осмотическое давление. Осмотическое давление раствора прямо пропорционально концентрации растворенного вещества (при

постоянной температуре), т.е. с повышением концентрации растворенных веществ в жидкости увеличивается и осмотическое давление. Раствор, имеющий одинаковое осмотическое давление, называют изотоническим, с повышенным давлением – гипертоническим, с пониженным давлением – гипотоническим. Определенное осмотическое давление в сперме создают растворенные в ней различные соли, сахара и другие вещества.

Осмотическое давление в сперме разных видов животных имеет неодинаковую величину. Иногда это наблюдается и у одного и того же вида производителей, что зависит от времени года, породы животных, условий кормления, возраста, полового режима и других факторов.

Осмотическое давление плазмы спермы и сперматозоидов примерно одинаковое. Сперматозоиды очень чувствительны к изменениям осмотического давления. Повышение или понижение его в окружающей среде губительно действует на сперматозоиды. Особенно вредное влияние оказывает на них резкое изменение осмотического давления. Однако постепенное незначительное его повышение не оказывает заметного влияния на выживаемость сперматозоидов.

По данным Н.П. Шергина, при хранении спермы быка вне организма осмотическое давление в ней повышается.

Если каплю спермы разбавить дистиллированной или кипяченой водой, то сперматозоиды довольно быстро гибнут. Вода по отношению к сперме является гипотоническим раствором. Быстро проникая внутрь сперматозоидов, она вызывает набухание их головок, закручивание хвостов и гибель. При добавлении к сперме 0,9%-ного раствора хлористого натрия сперматозоиды будут иметь хорошую подвижность и некоторое время жить. Такой раствор для спермы является изотоническим. Этот раствор применяют для промывания и ополаскивания посуды, приборов и инструментов, которые соприкасаются со спермой.

Добавление к сперме 3%-ного раствора хлористого натрия вызывает гибель сперматозоидов. Под влиянием такого раствора происходит

обезвоживание цитоплазмы спермиев. Трехпроцентный раствор хлористого натрия для сперматозоидов является гипертоническим раствором. Применяемые синтетические среды для разбавления спермы являются строго изотоническими. В них осмотическое давление почти соответствует осмотическому давлению спермы.

#### **1.4.4 Реакция среды**

Подвижность и выживаемость сперматозоидов зависят от реакции окружающей их среды или степени ее кислотности (рН).

Дистиллированная вода имеет нейтральную реакцию – рН около 7,0, при кислой реакции рН будет меньше, а при щелочной – больше 7,0.

В придатке семенника сперматозоиды находятся в кислой среде (рН = 5,57-6,9). Во время эякуляции происходит смешивание содержимого придатка семенника со щелочными секретами придаточных половых желез, отчего реакция спермы изменяется в нейтральную или слабощелочную (рН = 7,0). В сперме быка реакция слабокислая (рН = 6,5-6,7), что связано с большей или меньшей степенью разбавления жидкости придатка секретами придаточных половых желез.

В сперме с нейтральной или слабокислой реакцией сперматозоиды обладают большей жизнеспособностью, чем со щелочной реакцией. При хранении в сперме быка происходит увеличение кислотности вследствие накопления молочной кислоты. Движение сперматозоидов при этом тормозится, и они впадают в анабиоз.

Изменения реакции среды неблагоприятно отражаются на жизнеспособности сперматозоидов. Однако сперма обладает способностью противодействовать резкому ее изменению. Такое свойство спермы называется буферностью. Буферами в сперме являются соли слабых кислот (угольной, лимонной, молочной, фосфорной), а также белки.

Под влиянием воздействия сильной кислоты соли слабых кислот отдают свой металл этой кислоте и нейтрализуют ее. Также происходит и

нейтрализация щелочей. Белки спермы, являясь одновременно и слабыми кислотами и слабыми основаниями, способны связывать кислые и щелочные вещества. Соли лимонной кислоты являются наиболее сильным буфером в сперме. Сперма быка отличается наибольшей буферностью.

#### **1.4.5 Влияние солей**

Растворенные в плазме спермы соли (электролиты) оказывают определенное влияние на жизнедеятельность сперматозоидов.

В придатке семенника содержится незначительное количество солей (электролитов), так как стенки канала придатка способны поглощать их. При эякуляции концентрация солей в плазме возрастает в связи с разбавлением содержимого придатков секретами придаточных половых желез. Соли медленнее проникают в протоплазму сперматозоидов, чем неэлектролиты (сахара, органические кислоты), поэтому в среде, окружающей сперматозоиды, и внутри их создается различие в электролитном составе. Значительное изменение электролитного состава среды во время эякуляции оказывает влияние на физико-химические процессы в сперматозоидах – возбуждает их движение, производит сдвиги в осмотическом давлении и сильно сокращает их жизнеспособность.

В сперме быка электролитов мало. Как показали исследования, сперматозоиды погибают быстрее в тех эякулятах, которые больше разбавлены секретами придаточных половых желез. Однако при введении в сперму этих животных сахарных растворов (фруктозы, глюкозы, лактозы и др.) вредное действие секретов предотвращается, а их выживаемость значительно увеличивается.

Сперма быка в своем составе содержит мало секретов придаточных половых желез, и незначительное количество электролитов в ней оказывает меньшее влияние на физико-химические изменения в сперматозоидах. Поэтому их сперма сохраняет жизнеспособность более длительное время.

Положительное влияние на жизнеспособность сперматозоидов оказывают некоторые соли многоосновных кислот – фосфорной, виннокаменной, серной и лимонной. Поэтому в составе синтетических сред для разбавления спермы используют эти соли, особенно соль лимонной кислоты (цитрат).

#### **1.4.5 Влияние на сперматозоиды химических веществ и медикаментов**

Различные дезинфицирующие вещества губительно действуют на сперматозоиды. Пары лизола, креолина, скипидара, нашатырного спирта, эфира, йода и крепких кислот (соляной, серной, азотной и др.) вредны для спермиев. Весьма ядовиты для сперматозоидов окиды и соли тяжелых металлов – ртути (сулема), свинца, меди, железа и др. Поэтому в помещении, где производится работа со спермой, категорически запрещается хранить медикаменты и дезинфицирующие вещества. При обработке инструментов (мытьё и стерилизация) используется только стеклянная, эмалированная и алюминиевая посуда. Применяемые в работе по искусственному осеменению инструменты (корнцанги, пинцеты, влагалищные зеркала, подставки для приборов и др.) должны быть хорошо покрыты металлом – никелем. Содержать их следует чистыми.

В качестве дезинфицирующего средства для обеззараживания инструментов, используемых для введения спермы, используют только спирт-ректификат. После обработки инструментов спирт быстро испаряется и не оставляет после себя следов. Остатки спирта после обеззараживания можно удалить из приборов также многократным промыванием их изотоническим раствором хлористого натрия или бикарбоната натрия.

Для обеззараживания посуды, приборов и инструментов применяют кипячение, сухой жар (в сушильном шкафу), фламбирование (обжигание на некоптящем пламени), текущий пар с использованием специального парообразователя, нагретый пар под давлением (в автоклаве).

Сульфаниламиды (белый стрептоцид) и некоторые антибиотики (пенициллин, стрептомицин) в известных концентрациях не оказывают вредного влияния на спермиев, но обладают антимикробным действием. Поэтому для подавления размножения микроорганизмов в сперме ее разбавляют средой, содержащей в своем составе эти препараты.

## 2 ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИДКИМ АЗОТОМ

Обучающийся должен пройти инструктаж по технике безопасности и иметь допуск к работе с сосудами Дьюара. При этом следует руководствоваться «Рекомендациями по технике безопасности и эксплуатации сельскохозяйственного криогенного оборудования» (М., 1984) и «Правилами по охране труда в животноводстве» (Орел, 1995), утвержденными Министерством сельского хозяйства Российской Федерации.

Жидкий азот – прозрачная, бесцветная, легкоиспаряющаяся жидкость массовой плотностью 0,804 кг/л при давлении 760 мм рт. ст.

Жидкий азот инертен, не вступает в реакции ни с какими веществами в обычных условиях. Однако, попадая на открытые участки тела, может вызвать ожоги, поэтому необходимо строго соблюдать технику безопасности при обращении с ним.

Сосуд Дьюара – это криогенный контейнер, предназначенный для хранения и транспортировки веществ при экстремально низких температурах (рис. 4 а, рис. 4 б). Наиболее часто он используется для жидкого азота. Основное назначение сосуда – минимизация теплопередачи между внутренней средой и окружающей атмосферой.

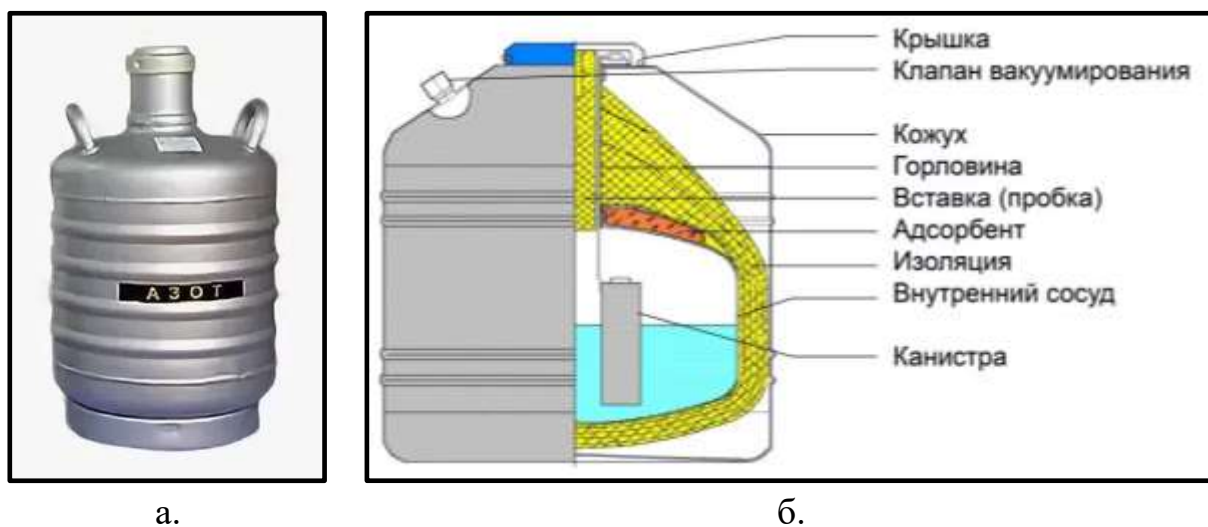


Рисунок 7 (а, б) – Строение сосуда Дьюара

Конструкция сосуда основана на принципе двух емкостей, вложенных одна в другую. Между стенками создается вакуум, что позволяет существенно снизить теплопередачу за счет исключения конвекции и теплопроводности. Такая изоляция делает возможным длительное поддержание сверхнизкой температуры содержимого.

***При эксплуатации сосудов Дьюара необходимо соблюдать следующие правила:***

- при заправке сосуда нельзя стоять около шланга, необходимо помнить, что азот вызывает головокружение, головную боль и потерю сознания.
- заливать жидкий азот в теплый (имеющий температуру окружающего воздуха) сосуд Дьюара надо медленно, не допуская вскипания и резкого выброса жидкого азота из горловины.
- при заливке жидкого азота в сосуд Дьюара категорически запрещается заглядывать в горловину.
- нельзя ставить сосуд Дьюара под прямые солнечные лучи и около отопительных приборов. Попадание азота на горюче-смазочные материалы может вызвать взрыв.
- при разгерметизации сосуда Дьюара он покрывается инеем, В данном случае нужно принять меры по сохранности семени, переставить канистру с семенем в другой сосуд или увезти на ближайший пункт искусственного осеменения.
- запрещается плотно закрывать горловину сосуда Дьюара, что часто делается при транспортировке. Азот в сосуде должен иметь контакт с внешним воздухом, проникновение тепла из окружающей среды внутрь сосуда Дьюара вызывает испарение жидкого азота, что является нормальным процессом. Прекращение выхода испарившегося азота из сосуда в атмосферу вызывает повышение давления в сосуде, нарушение его целостности, прорыв жидкого азота в межстенное вакуумное пространство и взрыв.

➤ во время работы с жидким азотом надевать защитные очки и перчатки или рукавицы из натуральных материалов, которые можно легко сбросить с руки;

➤ не заглядывать в сосуд для определения уровня заполнения;

➤ не заполнять жидким азотом случайные емкости;

➤ не закрывать горловину сосуда герметически, так как это может привести к повышению давления паров во внутреннем сосуде и взрыву; использовать только крышку, входящую в комплект;

➤ не использовать сосуд при появлении вокруг горловины инея или «снеговой шубы»;

➤ медленно опускать канистры и вводить инструменты в жидкий азот во

➤ избежание разбрызгивания, вызванного «кипением» азота при контакте с теплыми предметами;

➤ переливать жидкий азот из одного сосуда в другой допускается только с помощью переливного устройства. Наклонение сосуда при переливании азота может привести к повреждению соединения стеклопластиковой горловины внутреннего сосуда с верхней крышкой кожуха и стать причиной потери вакуума;

➤ в случае появления на поверхности крышки кожуха сосуда инея или «снежной шубы», слой которой нарастает по мере испарения жидкого азота, сосуд немедленно разгрузить, жидкий азот слить, поставить сосуд на отопление на одни-два суток в помещении, куда запрещен доступ посторонним (подобные сосуды подлежат списанию);

➤ перевозить сосуд всеми видами транспорта только в вертикальном положении, предохраняя от повреждений и опрокидываний. При подготовке сосуда к перевозке авиатранспортом его заливают жидким азотом наполовину гидравлической емкости. В целях предотвращения образования взрывоопасной смеси в сосуде вследствие обогащения жидкого азота кислородом производят его контроль с помощью переносного газоанализатора ГХП-3. Такой анализ проводят в хранилище 1 раз в год, а в сосудах на пунктах

– 1 раз в 6 месяцев. Если накопление кислорода составит 15%, сосуд Дьюара необходимо опорожнить в безопасном месте, свободном от предметов органического происхождения: дерева, бумаги, тряпок (особенно промасленных), навоза и др.

- немедленно смыть водой и насухо вытереть кожу при попадании жидкого азота на нее;
- оборудовать помещение вентиляцией во избежание несчастных случаев при пониженной концентрации кислорода.

### **3 ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ**

В пункте искусственного осеменения замороженную сперму хранят в сосудах Дьюара в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Канистры со спермой при хранении должны быть обязательно погружены в жидкий азот. Хранение спермы в парах азота недопустимо.

Объем жидкого азота в сосуде Дьюара должен составлять не менее  $1/3$  объема сосуда. Оператор обязан следить за уровнем жидкого азота и периодически проверять его. Для определения уровня жидкого азота рекомендуется пользоваться пластиковой (деревянной) мерной линейкой или деревянной палочкой длиной, соответствующей высоте сосуда. Предварительно продезинфицированную спиртовым тампоном линейку или палочку опускают внутрь, до дна сосуда на 5-6 с, заметив пальцем на ней верхний край горловины сосуда. После извлечения на воздухе часть линейки или палочки, которая была погружена в жидкий азот, покрывается инеем, по высоте которого определяют уровень азота в сосуде.

При работе с замороженной спермой следует строго придерживаться следующего правила: не допускать преждевременного оттаивания спермы и повторного ее замораживания.

Нельзя хранить весь запас спермы в одной канистре, чтобы не допускать изменения температурного режима хранения спермы при извлечении соломинок или гранул.

В пункте сосуды Дьюара должны быть установлены на деревянных подставках.



Рисунок 8 – Банк спермы

Сосуды состоят из кожуха и внутреннего сосуда, подвешенного на стеклопластиковой или металлической горловине. НПО «Гелиймаш» производит для сельского хозяйства и реализует следующие сосуды Дьюара: СДС-6М, СДС-6-2, СДС-16, СДС-35М, СДСТ-35, СДСТ-35М (рис. 9, табл. 3).



Рисунок 9 – Внешний вид сосудов Дьюара производства «Гелиймаш»

Таблица 3 – Техническая характеристика сосудов Дьюара производства «Гелиймаш»

| Показатели                       | СДС-6-2 | СДС-6М | СДС-35М | СДСТ-35 | СДСТ-35М |
|----------------------------------|---------|--------|---------|---------|----------|
| Вместимость, л                   | 6       | 6      | 35      | 35      | 35       |
| Потери от испарения, г/ч         | 7,5     | 4,6    | 4,2     | 6,5     | 7,3      |
| Время полного испарения, сутки   | 28      | 45     | 280     | 185     | 165      |
| Внутренний диаметр горловины, мм | 58      | 58     | 58      | 88      | 8        |
| Число канистр                    | 6       | 6      | 6       | 6       | 6        |
| Размеры, мм:                     |         |        |         |         |          |
| ➤ сосуда:                        |         |        |         |         |          |
| ✓ высота                         | 525     | 63     | 752     | 755     | 755      |
| ✓ диаметр                        | 255     | 255    | 516     | 516     | 516      |
| ➤ канистры:                      |         |        |         |         |          |
| ✓ высота                         | 190     | 190    | 190     | 280     | 190      |
| ✓ диаметр                        | 45      | 45     | 45      | 70      | 45       |
| Масса порожнего сосуда, кг       | 6,0     | 6,5    | 21      | 20      | 20       |

Заправку сосудов Дьюара рекомендуется проводить после испарения азота не более 2/3 от вместимости. В случае задержки с дозаправкой надо опустить канистры со спермой на дно сосуда.

В стойловый период сосуд Дьюара должен находиться на стационарном пункте искусственного осеменения в хорошо вентилируемом помещении в отдалении от отопительных приборов.

С переводом скота на летнее содержание все необходимое оборудование, в том числе сосуд Дьюара, размещают в передвижном пункте искусственного осеменения, который должен находиться в более прохладном и защищенном от попадания прямых солнечных лучей месте.

Во избежание перепада температур при работе с замороженной спермой на пункте не допускается использование канистр с решетчатым дном и с утечкой жидкого азота. В случае использования сосудов, укомплектованных канистрами с решетчатым дном, необходимо иметь специальные пластиковые стаканы-вкладыши.

Для расфасовки необлицованных гранул не следует использовать полотняные и марлевые мешочки во избежание механического повреждения, предпочтительны металлические тубы.

Категорически запрещается хранить медикаменты и дезинфицирующие средства, не предусмотренные на пунктах по осеменению животных.

Запрещается курить в помещении, где хранится сперма.

На племпредприятиях Российской Федерации сперму замораживают по трем технологиям: в необлицованных гранулах, облицованных гранулах и в соломинках.

При работе с замороженной спермой надо соблюдать следующие правила: *приступать к работе со спермой только после того, когда выяснено, сколько животных подлежит осеменению, ни в коем случае не оттаивать сперму впрок.*

При резком снижении температуры оттаянной спермы ниже + 18°C гаметы могут испытать холодовой шок и погибнуть. Во избежание этого температура на пункте искусственного осеменения должна поддерживаться не ниже +18°C. При переносе из лаборатории к месту осеменения шприцы со спермой следует помещать в полиэтиленовые чехлы, перчатки, а в холодное время использовать утепленные пеналы.

### **3 ПОДГОТОВКА ИНСТРУМЕНТОВ И ПРАВИЛА РАЗМОРАЖИВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

**(приведены согласно методике, принятой при оценке работы операторов  
по воспроизводству на региональных и всероссийских конкурсах)**

Для размораживания и оценки качества спермы используют специальные биологические термостаты, микроскоп с нагревательным столиком (Морозова или Пакенаса), криоперчатки, криофартук, очки защитные, канцелярскую скрепку, пипетки полистироловые для искусственного осеменения (защитные чехлы), ампулу с цитратом натрия (изотон), подставку для инструментов (гребенчатую подставку), шприц-катетер для осеменения, санитарную рубашку, пинцет анатомический длиной 25-30 см, ножницы, корцанг, камеру Горяева, меланжер эритроцитарный, часовое стекло, пенициллиновый флакон, 3%-ный раствор хлористого натрия, набор красителей «Диахим-Дифф-Квик», эозин водорастворимый, пипетки пастеровские, буферную смесь, шпатель для растяжки мазков, штатив-рельсы для окраски мазков, стеклянную палочку, бумажную салфетку, фильтровальную бумагу, кювету (лоток).



Рисунок 10 – Микроскоп лабораторный Levenhuk MED P1000LED



Рисунок 11 – Термостат биологический ТБ-2-220-2П



Рисунок 12 – Столик нагревательный с подсветкой «Велес-300»



Рисунок 13 – Пинцет анатомический длиной 25-30 см

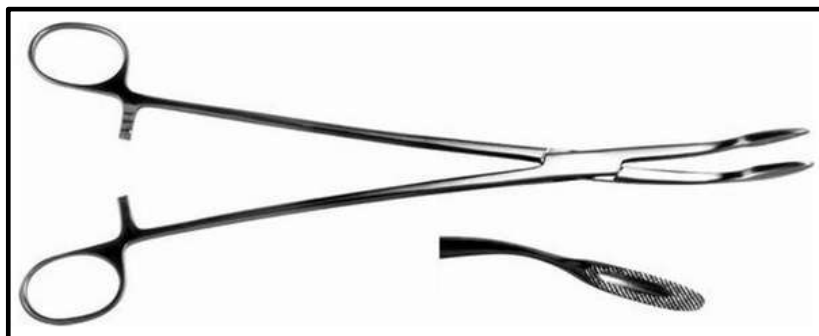


Рисунок 14 – Корнцанг изогнутый, 256 мм



Рисунок 15 – Ножницы хирургические



Рисунок 16 – Шприц для искусственного осеменения КРС



Рисунок 17 – Классический универсальный чехол для осеменения



Рисунок 18 – Скрепка канцелярская



Рисунок 19 – Камера Горяева (2-х сеточная)



Рисунок 20 – Универсальный лабораторный термометр с полным погружением, диапазон измерения от 20 до 150°C



Рисунок 21 – Предметные и покровные стекла



Рисунок 22 – Стеклопалочка

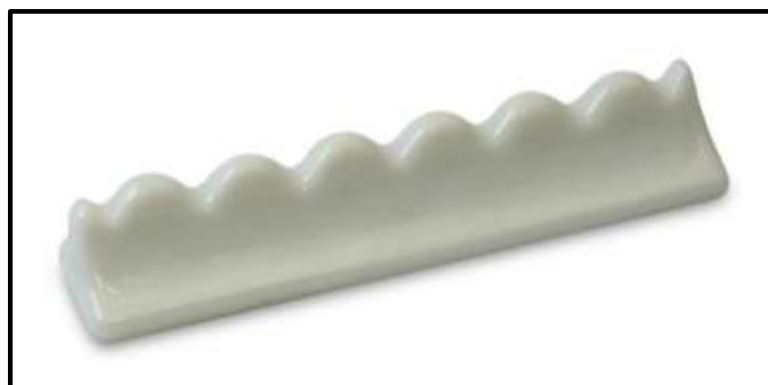


Рисунок 23 – подставка для инструментов (гребенчатая подставка)



Рисунок 24 – Тампонница с притертой крышкой для смоченных спиртом тампонов



Рисунок 25 – Меланжер эритроцитарный



Рисунок 26 – Часовое стекло



Рисунок 27 – Пенициллиновый флакон



Рисунок 28 – Пипетка пастеровская



Рисунок 29 – Шпатель для растяжки мазков



Рисунок 30 – Набор красителей «Диахим-Дифф-Квик»



Рисунок 31 – 2,9%-ный раствор цитрата натрия в запаянных стеклянных ампулах по 1 мл



Рисунок 32 – Санитарная рубашка



Рисунок 33 – Криофартук и криоперчатки



Рисунок 34 – Защитные очки



Рисунок 35 – Штатив-рельсы для окраски мазков



Рисунок 36 – Лоток (кювета)

### **3.1 ОТТАИВАНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

- Обучающийся надевает белый халат, колпак или косынку.
- Моет руки и обрабатывает стол.
- Снимает с микроскопа чехол, по необходимости протирает, подключает электроосветитель, регулирует освещенность в микроскопе, делая ее неярко-матовой; предметные и покровные стекла кладет на обогревательный столик микроскопа.
- Готовит термостатированную водяную баню температурой 35-37°C, опускает в нее термометр.
- На чистый стол ставит тампонницу с тампонами, пропитанными 96%-ным спиртом.
- На край стола кладет перчатки, канцелярские скрепки, пипетки, ампулы, салфетки и другие необходимые для осеменения инструменты согласно технологии.
- Пинцетом достает первый спиртовой тампон, обрабатывает пальцы рук от кончиков пальцев к ладони, свободную часть стола и выбрасывает тампон.

➤ Пинцетом берет второй тампон, обрабатывает подставку для инструментов, протирая сначала среднюю часть, а затем боковые и нижнюю (все в одном направлении), ставит на стол, тампон выбрасывает.

➤ Третьим тампоном обрабатывает стеклянную палочку, пинцет, корнцанг, ножницы, осеменительный инструмент, ампулу с цитратом (все по направлению сверху вниз), выбрасывает его.

➤ Обработанные инструменты кладет на подставку, а ампулу цитрата вскрывает резакон, так, чтобы в отверстие свободно входила гранула. Помещает ее в водяную баню или на столик Морозова для подогрева на 2-3 мин. Нельзя вскрывать ампулы, разбивая их по наружной стенке, так как стекло, попавшее в цитрат, может травмировать слизистую оболочку матки.

### **3.1.1 Оттаивание криоконсервированной спермы в открытых гранулах**

➤ Пинцетом достает 4-ый спиртовой тампон и обрабатывает пакет с пипетками (чехлами).

➤ Угол пакета надрезает стерильными ножницами или прорывает концом пипетки. Выдвигает пипетку на 1/3 длины.

➤ Извлекает пипетку из пакета и кладет ее на подставку. Открытый угол пакета закрепляет канцелярской скрепкой, тампон выбрасывает.

➤ Обучающийся надевает защитные очки и перчатки, открывает сосуд Дьюара, быстро подтягивает к верхней трети горловины (не более 5 секунд) канистру с тубой и вскрывает ее.

➤ Извлекает стерильным, предварительно охлажденным в азоте, пинцетом (корнцангом) гранулу и переносит ее в подготовленную ампулу или флакон с раствором цитрата.

➤ Тубу с оставшимся семенем сразу закрывает и опускает в сосуд Дьюара в положение хранения.

➤ Закрывает сосуд крышкой. Эти манипуляции должны занимать не более 5 секунд.

- Оттаивать гранулу необходимо при температуре 35-37°C в течении 30 секунд
- осторожным вращательным движением перемещая ампулу со спермой в водяной бане до тонкого ледяного стерженька.
- После оттаивания ампулу со спермой насухо вытирают стерильной салфеткой, ставят в штатив из теплоизолирующего материала и определяют качество спермы. Категорически запрещается оттаивать в одной ампуле более одной гранулы, а также оставлять оттаянную сперму в водяной бане.
- При заправке пипетки поршень шприца, соединенного с ней, следует отвести на 1/3, создав тем самым достаточный запас воздуха для выталкивания всей спермы из пипетки.
- Только после этого набирают сперму, не допуская ее попадания в шприц.
- Для проверки герметичности инструмент располагают вертикально: столбик семени должен остаться на месте.

Для осеменения коров спермой, замороженной в открытых гранулах, используют стерильные одноразовые полистироловые пипетки, соединенные полиэтиленовым переходником или эластичной трубкой длиной 30-50 мм со шприцом на 2-5 мл.



Рисунок 37 –Соединение полистироловой пипетки со шприцом

### **3.1.2 Оттаивание криоконсервированной спермы в облицованных гранулах**

- Гранулы объемом 0,25-0,33 мл осуществляют без разбавления в 2,9%-ном растворе цитрата натрия.
- Обучающийся надевает защитные очки и перчатки, открывает сосуд Дьюара, быстро подтягивает к верхней трети горловины (не более 5 секунд) канистру с тубой и вскрывает ее.
- Извлекает стерильным, предварительно охлажденным в азоте пинцетом (корнцангом) облицованную гранулу и быстро переносит ее пинцетом с широкими браншами в водяную баню температурой 38-40°C.
- Оттаивает до появления тонкого стерженька льда (для этого желательно использовать микротермостаты МТ-1,2 или термостат биологический ТБ-010).
- Через 10-20 секунд гранулу извлекает, насухо протирает стерильной салфеткой, проверяет на герметичность путем легкого сжатия между двумя пальцами: герметичной считается спермодоза, у которой не обнаружена утечка содержимого.
- После этого оценивает качество спермы.

### **3.1.3 Подготовка шприца-катетера к работе по оттаиванию криоконсервированной спермы**

- Пинцетом достает 4-ый спиртовой тампон и обрабатывает пакет с пипетками (чехлами).
- Угол пакета надрезает стерильными ножницами или прорывает концом пипетки. Выдвигает пипетку на 1/3 длины.
- Извлекает пипетку из пакета и кладет ее на подставку. Открытый угол пакета закрепляет канцелярской скрепкой, тампон выбрасывает.
- Обучающийся надевает защитные очки, перчатки, подтягивает к верхней трети горловины сосуда Дьюара (не более 5 секунд) канистру с тубой, быстро извлекает стерильным, предварительно охлажденным в азоте, пинцетом (корнцангом) соломинку за запаянный конец, встряхивает ее 2 раза, чтобы удалить остатки азота в текстильной пробке, и быстро погружает в термостат для оттаивания.



а.



б.

Извлечение соломинки должно проводиться стерильным  
корнцангом, процесс происходит в горловине сосуда Дьюара и  
длиться не более 5 секунд

Перепады температуры во время извлечения замороженной спермы  
снижают ее качество

Рисунок 38 (а, б) – Извлечение спермы, замороженной в соломинках

- Встряхивание способствует испарению жидкого азота из текстильной пробки и предупреждает возможное выдавливание пробки из соломинки.
- Канистру с семенем опускает в азот.
- Сосуд закрывает крышкой.
- Оттаивать соломинку необходимо в течение 30 секунд при температуре 35-37°C, перемещая круговыми движениями в воде.



а.



б.

Оттаивание спермы в соломинках производят в течение 20-30 секунд при  
температуре 37-38°C.

Соломинку после оттаивания необходимо насухо вытереть марлевой  
салфеткой и, держа за конец, встряхивать, чтобы воздушный пузырек  
опустился к пробке

Рисунок 39 (а, б) – Извлечение спермы, замороженной в соломинках

➤ Затем соломинку извлекает из термостата, тщательно осушает стерильной марлевой или бумажной салфеткой.

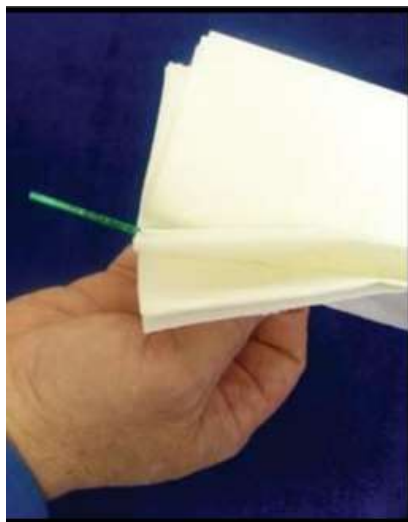


Рисунок 40 – Высушивание соломинки, вынутой из термостата

➤ Проверяет запись клички, номер быка и местонахождение пузырька воздуха (должен находиться с той стороны соломинки, которая запаяна в лаборатории).

➤ Поршень шприца оттягивает на 12 см (стержень поршня слегка искривлен, что удерживает его в одном положении).

➤ С помощью фильтровальной бумаги или стерильной марлевой салфетки необходимо согреть полость (камеру) шприца, устанавливает соломинку со стороны текстильной пробки в полость (камеру) шприца.

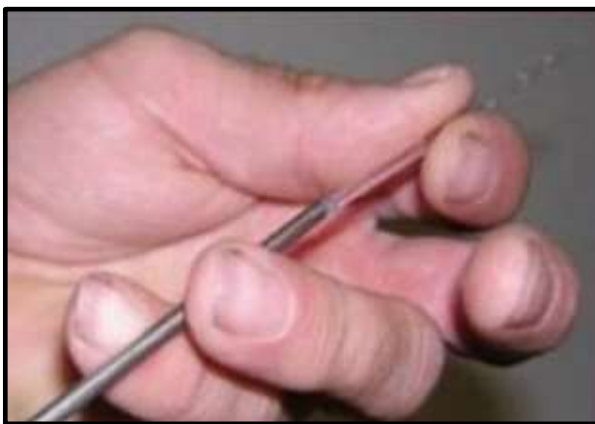


Рисунок 41 – Введение соломинки в шприц-катетер

➤ Конец соломинки со стороны запайки обрезают в середине воздушного пузырька стерильными ножницами строго перпендикулярно.



Рисунок 42 – Обрезание соломинки

➤ Ножницы должны быть острыми, так как тупые ножницы деформируют соломинку, при этом может нарушиться плотность соединения ее с внутренней частью конусного конца защитного чехла.

➤ На шприц с соломинкой надевают защитный чехол, который закрепляют навинчиванием.



Рисунок 43 – Надевание защитного чехла на шприц-катетер

➤ Надежность закрепления проверяет слабым надавливанием большого пальца руки на поршень шприца: чехол не должен сдвигаться. При этом удаляется воздушный пузырек и появляется капелька спермы, которую можно исследовать под микроскопом.



а.



б.

Подготовка препарата для оценки качества семени под микроскопом

Рисунок 44 (а, б) – Оценка качества спермы

## **4 ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

### **4.1 МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ (ГОСТ 32222-2013)**

#### **4.1.1 Отбор проб криоконсервированной спермы быков-производителей**

Отбор проб замороженной спермы для определения физических свойств проводят в объеме 1-10 см<sup>3</sup>, биологических – 0,5-1,0 см<sup>3</sup>, биохимических – 0,5-10 см<sup>3</sup>, морфологических анализов – 0,1-2,0 см<sup>3</sup> из каждой партии. Пробы помещают в отдельные стерильные флаконы или пробирки.

Для анализов используют замороженную сперму, хранившуюся при температуре 30°C-35°C не более 30 минут после оттаивания.

#### **4.1.2 Маркировка криоконсервированной спермы быков-производителей**

Каждую упаковку с пробами замороженной спермы (гоблеты, мешочки, пробирки) маркируют с обозначением клички самца-производителя, его номера и даты взятия пробы, наименования организации-производителя.

## 4.2 ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ- ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ (ГОСТ 26030-2015, ГОСТ 32198-2013)

Сперма после ее оттаивания по органолептическим, физическим, биологическим и морфологическим показателям должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в табл. 4.

Таблица 4 – Показатели качества криоконсервированной спермы быков-производителей после размораживания

| Наименование показателя                                                             | Характеристика и норма                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Внешний вид, консистенция, цвет                                                     | Однородная, желтая или светло-желтая жидкость без посторонних примесей. Допускается другой цвет спермы, обусловленный разбавителем                                                              |
| Число сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением, %, не менее           | 40                                                                                                                                                                                              |
| Объем дозы для осеменения, см <sup>3</sup> ,                                        | 0,2                                                                                                                                                                                             |
| Число сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в дозе, млн., не менее | 15<br>Допускается использовать сперму с количеством сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением не менее 10 млн. в дозе для высокоценных в племенном отношении быков-производителей. |
| Выживаемость сперматозоидов при температуре 38°C, ч, не менее                       | 5                                                                                                                                                                                               |
| Число сперматозоидов с интактной акросомой, %, не менее                             | 60                                                                                                                                                                                              |
| Число сперматозоидов с аномальной морфологией, %, не более                          | 18                                                                                                                                                                                              |

Сперма по ветеринарно-санитарным показателям должна соответствовать нормам, указанным в табл. 5.

Таблица 5 – Ветеринарно-санитарные показатели качества спермы быков-производителей после размораживания

| Наименование показателя                                        | Норма          |
|----------------------------------------------------------------|----------------|
| Общее число непатогенных микроорганизмов в дозе, КОЕ, не более | 500            |
| Коли-титр                                                      | 0,1            |
| Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы                 | Не допускается |

Соломинки или облицованные гранулы со спермой с помощью охлажденного корнцанга, а необлицованные гранулы с помощью охлажденного анатомического пинцета, вынимают из сосуда Дьюара. Соломинки или облицованные гранулы погружают в водяную баню при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  на 20-30 секунд, а затем вынимают и протирают насухо стерильной салфеткой. Ножницами отрезают оба конца соломинки или один конец облицованной гранулы. Одну дозу спермы из соломинки, облицованной гранулы или необлицованной гранулы помещают в пробирку с 2,9%-ным раствором лимоннокислого натрия, находящуюся в термостате.

Затем объем содержимого пробирок доводят до 1 см<sup>3</sup> 2,9%-ным раствором лимоннокислого натрия, пробирки закрывают резиновыми пробками и перемешивают. Пробирки помещают в термостат при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  на срок не более 30 минут.

### **4.3 МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

#### **4.3.1 Определение цвета**

Цвет спермы определяют визуально при хорошем естественном или искусственном освещении.

### 4.3.2 Определение объема и массы эякулята

Объем эякулята в кубических сантиметрах (см<sup>3</sup>) определяют в градуированных спермоприемниках или мерной стеклянной пипеткой.

Массу эякулята в граммах (г) определяют взвешиванием на лабораторных весах типа ВЛТ-500 (ВТК-500) с погрешностью не более  $\pm 0,08$  г по ГОСТ 24104.5.3

### 4.3.3 Определение pH

Этот показатель имеет очень важное значение для оценки качества спермы. Значительный сдвиг pH спермы в сторону щелочности или кислотности говорит о плохом ее качестве.

Средние показатели pH у быков-производителей составляет 6,9.

**Сущность метода** pH спермы определяют потенциометрическим методом. Сущность метода заключается в измерении электродного потенциала, возникающего при погружении электрода в сперму.

**Средства измерений, материалы и реактивы.** Для проведения анализа применяют:

- pH-метр-милливольтметр с диапазоном измерения от 0 до 14 единиц pH, погрешностью  $\pm 0,04$  единицы pH;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- калий хлористый по ГОСТ 4234;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Допускается использование других средств измерений с аналогичными метрологическими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

Проведение анализа pH спермы определяют с помощью pH-метра-милливольтметра в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

**Обработка результатов.** За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые

расхождения между результатами двух измерений не должны превышать  $\pm 0,1$  единицы рН.

#### **4.3.4 Определение осмотического давления**

**Сущность метода.** Сущность метода определения осмотического давления свежеполученной неразбавленной спермы заключается в установлении разности температур в точке таяния льда и в точке истинной кристаллизации.

**Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы.** Для проведения анализа применяют:

- термометр лабораторный типа ТЛ-50 с конусным шлифом № 4 с диапазоном измеряемых температур от минус 30°C до 40°C, ценой деления 0,20°C;
- мешалку проволочную с петлей, входящей в пробирку с размером диаметра 1,4-1,7 см;
- штатив лабораторный;
- кольца резиновые толщиной 2-3 мм;
- лупу с увеличением 8-10× по ГОСТ 25706;
- термос металлический вместимостью не менее 1000 см<sup>3</sup>;
- лед или снег;
- углекислоту твердую (сухой лед) или азот жидкий по ГОСТ 9293 или натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- спирт этиловый технический по ГОСТ 17299;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Допускается использование другого оборудования с техническими характеристиками и средств измерений с метрологическими характеристиками, а также материалов, реактивов и посуды по качеству не ниже вышеуказанных.

**Подготовка к проведению анализа.** Готовят термос с одной из следующих охлаждающих смесей:

- лед с поваренной солью в соотношении 3:1;
- смесь этилового спирта с сухим льдом;
- этиловый спирт, охлажденный пропусканием через змеевик паров жидкого азота.

Температуру в термосе постоянно поддерживают на уровне минус 38°C - минус 40°C.

Перед началом анализа проводят настройку термометра, устанавливая на нем нулевую точку. Для этого термометр вначале помещают в мелкораздробленный тающий лед или снег и наблюдают уровень ртути в капилляре. Затем устанавливают нулевую точку на термометре по замерзанию дистиллированной воды, определяя ее следующим образом. Закрепляют на штативе пробирку с размером диаметра 2,2-2,5 см. Во вторую пробирку меньшего диаметра наливают дистиллированную воду в таком объеме, чтобы после введения в пробирку термометра с надетой на него проволоочной мешалкой его ртутный резервуар был полностью погружен в воду. На пробирку с термометром и дистиллированной водой надевают два резиновых кольца. Подготовленную таким образом пробирку с термометром вставляют в пробирку, закрепленную в штативе. Пробирки с термометром опускают в термос (ванну) с охлаждающей смесью. В процессе охлаждения воду непрерывно помешивают вертикальными движениями мешалки, постоянно наблюдая за понижением уровня ртути в капилляре. При переохлаждении воды начинает выделяться теплота кристаллизации и столбик ртути быстро поднимается до истинной температуры замерзания воды, оставаясь некоторое время на этом уровне. Температуру замерзания воды регистрируют с точностью до 0,2°C.

**Проведение анализа.** В промытую и тщательно подсушенную фильтровальной бумагой пробирку наливают сперму в таком количестве, чтобы ртутный резервуар термометра был полностью погружен в нее. Пробирку с термометром помещают во вторую пробирку, закрепленную в штативе. Устанавливают температуру замерзания спермы. При определении

осмотического давления разных эякулятов пробирку и термометр после каждого испытания тщательно ополаскивают дистиллированной водой и просушивают.

**Обработка результатов.** Осмотическое давление спермы при температуре 0°С  $P_0$ , Па (кгс/см<sup>2</sup>), вычисляют по формуле:

$$P_0 = K \cdot \Delta t,$$

где  $K$  – постоянный коэффициент, используемый при расчете осмотического давления, равный 1,204 Па×град<sup>-1</sup> или 12,04 кгс×см<sup>-2</sup>×град<sup>-1</sup>;  $\Delta t$  – разность между нулевой точкой на термометре и истинной температурой замерзания спермы, °С.

Результат округляют до третьего десятичного знака.

**Пример:** Нулевая точка на термометре установлена на уровне 4,46°С. После трехкратного измерения истинная температура замерзания спермы составляла 3,80°С, 3,81°С и 3,80°С. Таким образом, среднеарифметическое значение температуры замерзания спермы составит 3,80°С. Разность температуры  $\Delta t = 4,46 - 3,80 = 0,66$ °С.

Следовательно, осмотическое давление при температуре 0°С вычисляют по формуле:

$$P_0 = 1,204 \text{ (или } 12,04) \cdot 0,66 = 0,794 \text{ Па (или } 7,94 \text{ кгс/см}^2\text{)}$$

Осмотическое давление спермы при заданной температуре  $P_n$ , Па (кгс/см<sup>2</sup>), вычисляют по формуле:

$$P_n = \frac{T_0 + t_n}{T_0},$$

где  $T_0$  – константа, равная  $273^{\circ}\text{C}$ ;  $t_n$  – температура, при которой требуется определить осмотическое давление спермы,  $^{\circ}\text{C}$ ;  $P_0$  – осмотическое давление при температуре  $0^{\circ}\text{C}$ , Па (кгс/см<sup>2</sup>).

Результат округляют до второго десятичного знака.

**Пример:** Осмотическое давление спермы при температуре  $39^{\circ}\text{C}$  составляет:  $P_{39} = (273 + 39)/273 \cdot 0,79$  (или  $7,94$ ) =  $0,91$  Па (или  $9,1$  кгс/см<sup>2</sup>).

#### 4.3.5 Определение концентрации сперматозоидов

Концентрацию сперматозоидов определяют в счетных камерах, с помощью измерения светорассеяния и специальных компьютерных программ.

##### *Определение концентрации сперматозоидов в счетной камере*

Сущность метода заключается в подсчете сперматозоидов в счетной камере для форменных элементов крови.

Оборудование, материалы и реактивы. Для проведения анализа применяют:

- микроскоп биологический различных марок с окуляром 15× и объективом 20×;
- камеру счетную Горяева для анализа количества форменных элементов крови;
- баллон резиновый или груша резиновая;
- эритроцитарный смеситель (меланжер);
- стекла шлифованные покровные 20× 20 по ГОСТ 6672;
- салфетки марлевые по ГОСТ 9412;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233, 3%-ный раствор;
- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;
- эфир петролейный марки 40-70.

Допускается использование другого оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

Проведение анализа. Сперматозоиды подсчитывают в счетной камере (рис. 40), применяемой для определения числа форменных элементов крови (с сеткой Горяева, Томма или Бюркера).

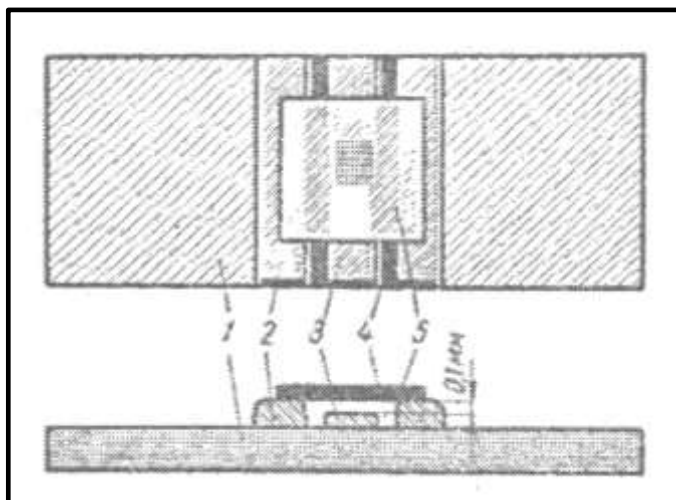


Рисунок 45– Счетная камера (вид сверху и сбоку)

1 – стекло камеры; 2 – опорные площадки; 3 – площадка с сеткой; 4 – желобки;  
5 – покровное стекло

Для спермы быка применяют эритроцитарный смеситель (меланжер) с красным шариком.

Технология приготовления счетной камеры представлена на рис. 41.

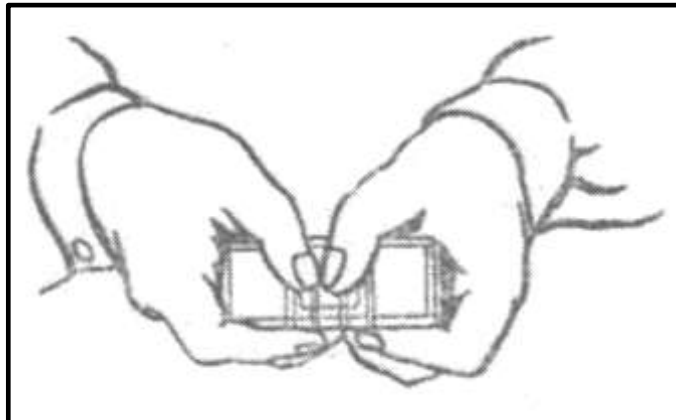


Рисунок 46 – Притирание покровного стекла

Сперму тщательно перемешивают и набирают до метки «1» в меланжер, предварительно обработанный смесью спирта и эфира в соотношении 1:1 и высушенный. Для разбавления спермы и обездвиживания сперматозоидов в меланжер вводят до метки «101» 3%-ный раствор хлористого натрия (разбавление спермы в 100 раз). Зажав большим и указательным пальцами оба

конца наполненного меланжера, тщательно перемешивают содержимое, переворачивая меланжер вверх и вниз не менее 60 раз (рис. 42).

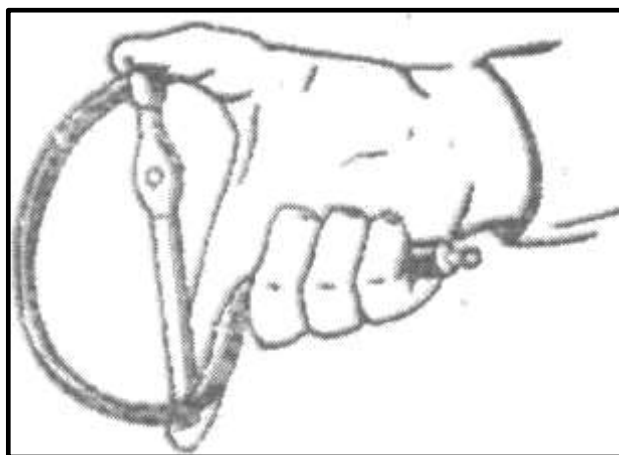


Рисунок 47 – Перемешивание спермы с 3%-ным раствором хлорида натрия

Удалив из меланжера первые три-четыре капли содержимого, кончик меланжера обтирают марлевой салфеткой и осторожно наносят одну каплю смеси на край притертого к счетной камере шлифовального покровного стекла. Капля, затекая под стекло, заполняет камеру Горяева (рис. 43).

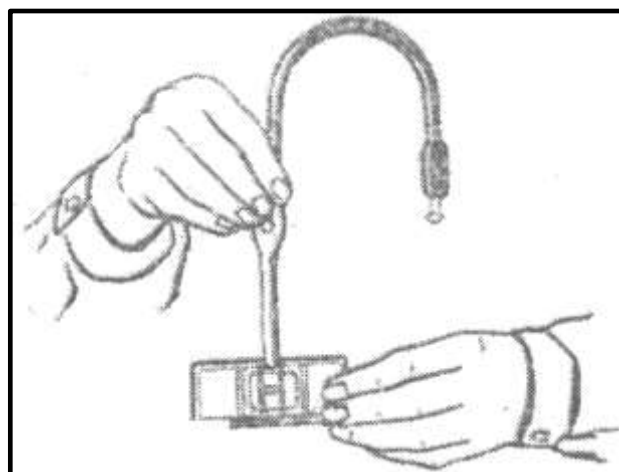


Рисунок 48 – Заполнение камеры спермой

Подсчет сперматозоидов проводят при таком увеличении микроскопа, чтобы в поле зрения помещалось 16 малых (один большой) квадратов. Сперматозоиды подсчитывают в 80 малых (пяти больших) квадратах,

расположенных по диагонали. Для подсчета сперматозоидов, расположенных в глубине камеры, постоянно вращают микровинт. Положение сперматозоидов внутри или вне квадрата определяют по месту нахождения головки. Головки, расположенные на левой и верхней линиях, относят к тому квадрату, в котором проводят подсчет. Головки можно также учитывать на правой и нижней линиях (рис. 44).



Рисунок 49 – Порядок подсчета спермиев в одном квадрате счетной камеры

Обработка результатов. Концентрацию сперматозоидов спермы  $C$ , млрд/см<sup>3</sup>, вычисляют по формуле:

$$C = \frac{n}{100},$$

где  $n$  – количество подсчитанных сперматозоидов в 80 маленьких квадратах; 200 – постоянный коэффициент.

Пример: В 80 маленьких (пяти больших) квадратах насчитали 100 сперматозоидов. Следовательно, концентрация сперматозоидов в см<sup>3</sup> составит:

$$C = \frac{100}{200} = 0,5 \text{ млрд./см}^3,$$

### ***Определение концентрации сперматозоидов путем измерения светорассеяния***

Сущность метода заключается в определении оптической плотности спермы, величина которой пропорциональна концентрации сперматозоидов.

Средства измерений, материалы, посуда и реактивы. Для проведения анализа применяют:

- фотометр, спектрофотометр, фотоэлектроколориметр, позволяющие измерять оптическую плотность раствора в диапазоне длин волн от  $(675 \pm 25)$  нм при допускаемой абсолютной погрешности измерения спектрального коэффициента пропускания не более  $\pm 2 \%$  в оптических кюветах толщиной поглощающего слоя 10 мм;
- воронка лабораторная В-56-80×С по ГОСТ 25336;
- пробирки типа П2Т по ГОСТ 25336 вместимостью 10 см<sup>3</sup>;
- пипетку градуированную вместимостью 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 29227;
- микропипетку вместимостью 0,1 см<sup>3</sup>;
- салфетки марлевые по ГОСТ 9412;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, 3%-ный раствор.

Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также материалов, реактивов и посуды по качеству не ниже вышеуказанных.

Подготовка к проведению анализа. Построение градуировочного графика. Для построения градуировочного графика используют сперму с высокой концентрацией сперматозоидов, из которой готовят разведения различной концентрации. Например, берут сперму с концентрацией сперматозоидов, равной 1,2 млрд./см<sup>3</sup>. Сперму разводят 3,5%-ным раствором

лимоннокислого натрия в соответствии с табл. 6 из расчета приготовления разведений с интервалом концентрации сперматозоидов в растворе от 0,02 до 0,20 млрд./см<sup>3</sup>.

Таблица 6 – Разведение спермы различной концентрации

| Номер пробирки | Объем спермы, см <sup>3</sup> | Объем раствора лимоннокислого натрия, см <sup>3</sup> | Концентрация сперматозоидов в растворе, млрд./ см <sup>3</sup> |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 1              | 1,0                           | 5,0                                                   | 0,20                                                           |
| 2              | 0,9                           | 5,1                                                   | 0,18                                                           |
| 3              | 0,8                           | 5,2                                                   | 0,16                                                           |
| 4              | 0,7                           | 5,3                                                   | 0,14                                                           |
| 5              | 0,6                           | 5,4                                                   | 0,12                                                           |
| 6              | 0,5                           | 5,5                                                   | 0,10                                                           |
| 7              | 0,4                           | 5,6                                                   | 0,08                                                           |
| 8              | 0,3                           | 5,7                                                   | 0,06                                                           |
| 9              | 0,2                           | 5,8                                                   | 0,04                                                           |
| 10             | 0,1                           | 5,9                                                   | 0,02                                                           |

Концентрацию сперматозоидов в каждом разведении уточняют, подсчитывая их количество в камере Горяева. Измеряют оптическую плотность приготовленных разведений при  $(675 \pm 25)$  нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Для построения градуировочного графика откладывают по оси абсцисс значения концентрации сперматозоидов, а по оси ординат – соответствующие им величины оптической плотности. Градуировочный график строят для каждого прибора. Проверку градуировочного графика проводят ежемесячно. Проведение анализа. В чистую пробирку наливают 5см<sup>3</sup> 3,5%-ного раствора лимоннокислого натрия и микропипеткой вносят точно 0,02 см<sup>3</sup> свежеполученной спермы быков; 0,01 см<sup>3</sup> свежеполученной спермы баранов и козлов; 0,2 см<sup>3</sup> свежеполученной спермы хряков и жеребцов, не допуская попадания пены или вазелина. Перед внесением спермы в раствор лимоннокислого натрия микропипетку вытирают снаружи чистой марлевой салфеткой для удаления излишка спермы. После внесения спермы микропипетку промывают в этом же растворе, набирая раствор в пипетку и выдувая его не менее трех раз. Суспензию тщательно перемешивают,

осторожно переворачивая закрытый флакончик, не допуская при этом образования пены.

Измеряют оптическую плотность суспензии, используя в качестве контрольного (фонового) раствора 3,5%-ный раствор лимоннокислого натрия.

Обработка результатов. Концентрацию сперматозоидов в миллиардах на кубический сантиметр (млрд./см<sup>3</sup>) спермы определяют при помощи градуировочного графика по соответствующему значению оптической плотности раствора.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений не должны превышать 10%.

## **4.4 МЕТОДЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

### **4.4.1 Определение подвижности сперматозоидов**

Сущность метода. заключается в визуальном определении с помощью микроскопа в раздавленной капле спермы количественного соотношения сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением (ПОД) к их общему числу.

Оборудование, материалы, посуда и реактивы. Для проведения анализа применяют:

- микроскоп биологический увеличением 150-200 раз;
- столик электрообогреваемый к микроскопу, обеспечивающий поддержание температуры спермы в пределах  $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ;
- термобокс водяной или электрический, обеспечивающий поддержание температуры  $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ;
- корнцанг;
- пинцет анатомический по ГОСТ 21241;

- ножницы по ГОСТ 21239;
- стекла предметные 26×100 по ГОСТ 9284;
- стекла покровные 20×20 по ГОСТ 6672;
- пипетки пастеровские;
- пипетки градуированные вместимостью 5 см<sup>3</sup> 2-го класса точности по ГОСТ 29227;
- пробирки вместимостью 2 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336;
- пробки резиновые для пробирок;
- салфетки марлевые стерильные;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, 2,9%-ный раствор;
- алюминиевый сосуд Дьюара вместимостью 4-35 дм<sup>3</sup>.

Допускается использование другого оборудования с техническими характеристиками, а также материалов, реактивов и посуды по качеству не ниже вышеуказанных.

Подготовка к проведению анализа. От каждого свежеполученного эякулята отбирают 0,1-0,5 см<sup>3</sup> спермы; от каждой партии замороженной спермы, расфасованной в соломинки, облицованные или необлицованные гранулы, отбирают из жидкого азота по две дозы и помещают в отдельный сосуд Дьюара.

В чистую стерильную пробирку мерной пипеткой вносят 0,5 см<sup>3</sup> 2,9%-ного раствора лимоннокислого натрия. Затем пробирки закрывают резиновыми пробками и ставят в термостат при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  на срок не более 30 минут.

Проведение анализа. На электрообогревательный столик микроскопа помещают предметное стекло и после его нагрева до температуры  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  стерильной пастеровской пипеткой из пробирки, находящейся в термобоксе, наносят небольшую каплю разбавленной спермы и покрывают стеклом. Устанавливают увеличение, дающее возможность добиться четкого изображения, и, просматривая весь препарат, выбирают участок с небольшим

движением сперматозоидов. Определяют визуально в трех полях зрения соотношение сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением (1111Д) (рис. 45) к общему количеству сперматозоидов, включая и неподвижных, а также сперматозоидов, имеющих манежное (рис. 46) и колебательное движение. В случае оценки свежеполученной спермы допускается проведение анализа в капле неразбавленной спермы.

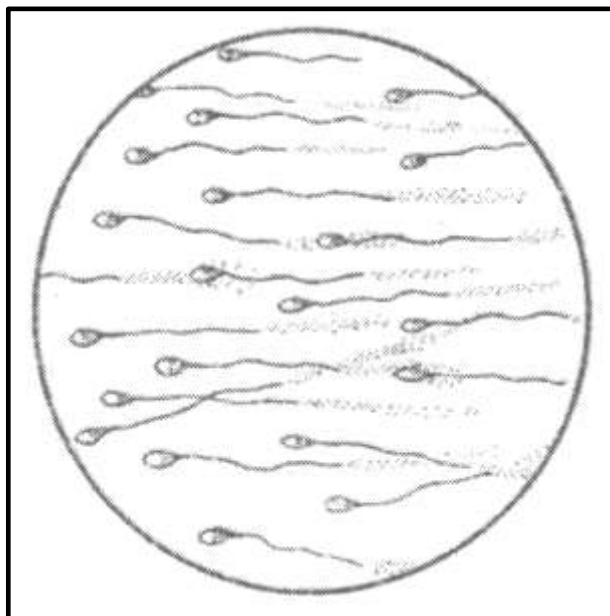


Рисунок 50 – Прямолинейное поступательное движение спермиев против тока жидкости

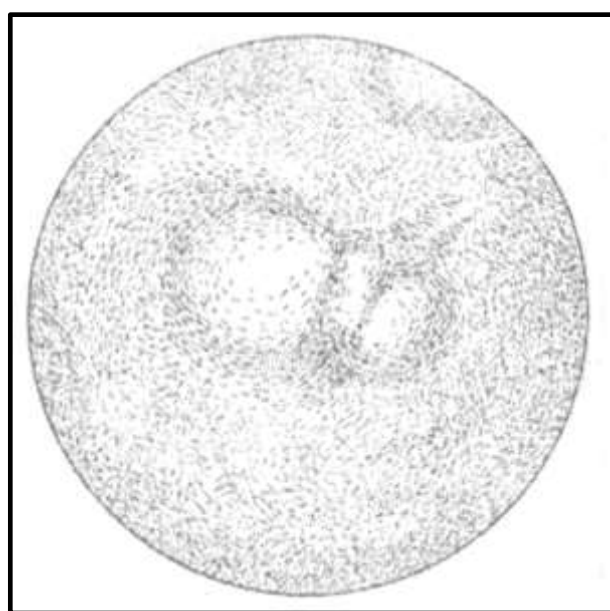


Рисунок 51 – Манежное движение спермиев

Обработка результатов. Результаты анализа представляют в процентах.

#### **4.4.2 Определение выживаемости сперматозоидов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ после оттаивания спермы**

Сущность метода. Сущность метода заключается в определении количества сперматозоидов в замороженной сперме, сохранивших прямолинейное поступательное движение (11Г1Д) после оттаивания и хранения в течение 5 часов в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

Оборудование, материалы, посуда и реактивы. Для проведения анализа применяют:

- микроскоп биологический увеличением 150-200 раз;
- столик электрообогреваемый к микроскопу, обеспечивающий поддержание температуры спермы в пределах  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ;
- термобокс водяной или электрический, обеспечивающий поддержание температуры  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ;
- корнцанг;
- пинцет анатомический по ГОСТ 21241;
- ножницы по ГОСТ 21239;
- стекла предметные  $26 \times 100$  по ГОСТ 9284;
- стекла покровные  $20 \times 20$  по ГОСТ 6672;
- пипетки пастеровские;
- пипетки градуированные вместимостью  $5 \text{ см}^3$  2-го класса точности по ГОСТ 29227;
- пробирки вместимостью  $2 \text{ см}^3$  по ГОСТ 25336;
- пробки резиновые для пробирок;
- салфетки марлевые стерильные;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, 2,9%-ный раствор;
- алюминиевый сосуд Дьюара вместимостью  $4-35 \text{ дм}^3$ .

Подготовка к проведению анализа. Оттаянную сперму в пробирке № 2 инкубируют в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 5 часов.

Проведение анализа. После 1,2 и 5 часов инкубации спермы в термостате определяют подвижность сперматозоидов.

Обработка результатов. Сперматозоиды имеют выживаемость не менее 5 часов, если после 5 часов инкубации спермы в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в ней обнаруживают не менее 1% сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением (ППД).

## **4.5 МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

### **4.5.1 Определение содержания кетоновых тел**

Сущность метода. Сущность качественного метода анализа содержания кетоновых тел в неразбавленной свежеполученной сперме заключается в положительной реакции нитропруссидной пробы в присутствии кетоновых тел и визуальной оценке интенсивности окрашивания.

Оборудование и реактивы. Для проведения анализа применяют:

- пробирки стеклянные типа П 2Т вместимостью  $10\text{ см}^3$  по ГОСТ 25336;
- пипетки пастеровские;
- натрий нитропруссид, насыщенный раствор;
- сульфосалициловую кислоту по ГОСТ 4478, 10%-ный водный раствор;
- натрия гидроксид (натрий едкий) по ГОСТ 4328, 40%-ный раствор;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Подготовка к проведению анализа. Приготовление 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. В стеклянную пробирку вместимостью  $10\text{ см}^3$  по ГОСТ 25336 вносят 1,00 г порошка сульфосалициловой кислоты и растворяют в  $9,0\text{ см}^3$  дистиллированной воды. Раствор применяют свежеприготовленным. Приготовление 40%-ного раствора гидроксида натрия. В стеклянной пробирке вместимостью  $10\text{ см}^3$  по ГОСТ 25336 растворяют 4,00 г гидроксида

натрия в  $6,0 \text{ см}^3$  дистиллированной воды. Раствор применяют свежеприготовленным.

Проведение анализа. В пробирку вместимостью  $10 \text{ см}^3$  вносят  $0,4 \text{ см}^3$  неразбавленной свежеполученной спермы, прибавляют три капли 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Пробирку встряхивают, затем добавляют одну каплю насыщенного раствора нитропруссид натрия. Пробирку снова тщательно встряхивают после чего осторожно пастеровской пипеткой с длинным концом подслаивают на дно пробирки  $0,2-0,3 \text{ см}^3$  40%-ного раствора гидроксида натрия.

При наличии кетоновых тел на границе соприкосновения раствора гидроксида натрия со спермой в течение 30 секунд образуется окрашенное кольцо.

➤ Обработка результатов. Массовую долю кетоновых тел в процентах определяют по интенсивности окрашивания кольца:

- слабо-розовое и светло-малиновое окрашивание –  $0,5-2,9 \cdot 10,3\%$ ;
- окрашивание в малиновый цвет –  $3,0-3,4 \cdot 10,3\%$ ;
- окрашивание в вишневый цвет –  $3,5-4,9 \cdot 10,3\%$ ;
- окрашивание в темно-вишневый цвет – более  $5 \cdot 10,3\%$  кетоновых тел.

## **4.6 МЕТОДЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

### **4.6.1 Определение содержания сперматозоидов с аномальной морфологией и включений**

Сущность метода. Сущность метода заключается в подсчете под микроскопом патологических форм сперматозоидов и включений спермы. При подсчете патологических форм сперматозоидов учитывают количество сперматозоидов с аномальной морфологией.

К аномальным формам относят сперматозоиды с отклонениями в строении головки (микроскопическая, круглая, несимметричная, укороченная,

заостренная, двойная, без мембраны или жгутика), шейки (двойная, ломаная, изогнутая, укороченная), тела (изогнутое, удвоенное, нитевидное, с цитоплазматической капелькой), жгутика (изогнутый, двойной, извитой, скрученный, рудиментарный) (рис. 47).

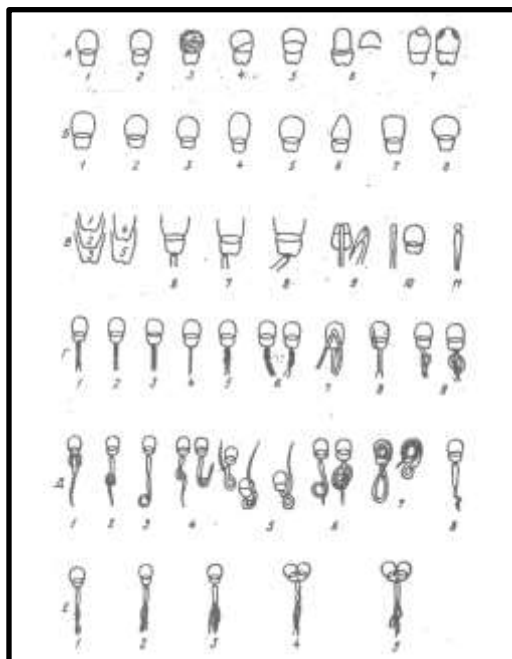


Рисунок 52 – Патологические формы спермиев быка (по Бретшнейдеру)

- А – Колпачок головки: 1 – нормальный; 2 – широкий; 3 – гранулированный; 4 – косой; 5 – маленький; 6 – неприкреплённый; 7 – уродливый.
- Б – Форма и величина головки: 1-3 – нормальная; 4 – узкая; 5 – грушевидная; 6 – ланцетовидная; 7 – лопатовидная; 8 – колбовидная.
- В – Основание головки и шейка: 1 – нормальная; 2 – прямая; 3 – суженая; 4 – узкая; 5 – широкая; 6 – симметричная; 7 – несимметричная; 8 – с изломом; 9 – с перегибом; 10 – с разломом; 11 – отсутствие головки.
- Г – тело: 1 – нормальное; 2 – короткое; 3 – широкое; 4 – тонкое; 5 – уродливое; 6 – разрывы; 7 – перегибы; 8 – осевой тип; 9 – расщепленное.
- Д – Хвостик: 1 – капелька на шейке, 2 – на теле, 3 – на хвостике и 4 – при изгибах хвостика; 5 – петлеобразный; 6 – в форме завитка; 7 – хвостик вокруг головки; 8 – рудиментарный.
- Е – Уродливые формы: 1 – одноголовый двуххвостый; 2 – одноголовый треххвостый; 3 – одноголовый четыреххвостый; 4 – двухголовый двуххвостый; 5 – двухголовый четыреххвостый.

К включениям спермы относятся форменные элементы крови, эпителиальные клетки и т.д.

Оборудование, материалы, посуда и реактивы. Для проведения анализа применяют:

- микроскоп биологический различных марок с увеличением 600-1350 раз (окуляр 15 × и объектив 40 × или 90 ×);
- микрометр окулярный винтовой типа АМ9-2;
- объект-микрометр по ГОСТ 6507;
- камеру счетную Горяева для подсчета форменных элементов крови;
- секундомер электронный типа СТС-1щ с диапазоном измеряемых интервалов времени от 0,1 до 9999,99 секунд;
- смеситель (меланжер) эритроцитарный;
- стекла шлифовальные покровные 20 × 20 по ГОСТ 6672;
- стекла предметные 26 × 100 по ГОСТ 9284;
- колбы стеклянные по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см<sup>3</sup>;
- стеклянные цилиндры по ГОСТ 1770 вместимостью 5-10 см<sup>3</sup>;
- пипетки пастеровские, палочки стеклянные;
- тушь черную;
- спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ 5962;
- эфир петролейный;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- нигрозин водорастворимый по ГОСТ 4014;
- эозин;
- азу-эозин;
- краску Гимза;
- ксилол по ГОСТ 9949;
- бальзам пихтовый по ГОСТ 2290;
- метанол по ГОСТ 6995;
- воду водопроводную по ГОСТ 2874;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Подготовка к проведению анализа. Приготовление 0,9%-ного раствора хлористого натрия. В колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> растворяют 0,9 г хлористого натрия по ГОСТ 4233 в 91,0 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Срок хранения раствора при комнатной температуре – не более 30 дней.

Приготовление 10%-ного рабочего раствора нигрозина. В пробирке вместимостью 10 см<sup>3</sup> растворяют 1,0 г нигрозина в 9,0 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Срок хранения раствора в темном месте при комнатной температуре – не более 30 дней.

Приготовление 10%-ного раствора эозина. В пробирке вместимостью 10 см<sup>3</sup> растворяют 1,0 г эозина в 9,0 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Срок хранения раствора при комнатной температуре – не более 30 дней.

Проведение анализа. В пробе спермы определяют концентрацию сперматозоидов и затем доводят ее до концентрации 0,2-0,4 млрд./см<sup>3</sup>, добавляя 0,9%-ный раствор хлористого натрия. Приготавливают мазки спермы на сухих предметных стеклах, предварительно обезжиренных в течение 3 часов в смеси, состоящей из равных частей этилового спирта с петролейным эфиром. Каплю подготовленной для анализа спермы пипеткой переносят на край предметного стекла и шлифовальным покровным стеклом делают мазок, проводя покровное стекло вдоль предметного, наклонив его на 45° в сторону, противоположную направлению движения.

Мазок подсушивают в течение 1-2 минуты на воздухе и фиксируют в течение 2-5 минут метанолом или в течение 15-20 минут смесью этилового спирта с петролейным эфиром. Допускается фиксировать препарат микроскопической техникой парами осмиевой кислоты.

Для лучшей видимости сперматозоидов проводят окрашивание мазка или затемняют его фон. Для создания темного фона вносят черную тушь или краску – 10%-ный водный раствор нигрозина. При этом сперматозоиды не окрашиваются, но их контуры на затемненном фоне ясно очерчены.

Для окрашивания сперматозоидов применяют водный 10%-ный раствор эозина или нейтральные красители (по методу Романовского).

**Окрашивание эозином.** Окрашивание сперматозоидов эозином проводят, добавляя к сперме в пробирке или на предметном стекле двойное или тройное количество краски. Смесь выдерживают в течение 3-5 минут, делают мазок и микроскопируют.

Окрашивание азур-эозином по Романовском. Используют готовую краску Гимза, представляющую собой смесь в определенных пропорциях метилен-азура, метиленового фиолетового и метиленового синего.

Перед окрашиванием приготавливают раствор краски. Для этого к 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды добавляют 0,5-1,0 см<sup>3</sup> краски. Окрашивание проводят в стеклянных цилиндрах, помещая в них предметные стекла с мазком спермы на 20-30 минут. Затем мазок промывают в течение 30-60 минут дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Для длительного хранения мазков (более 6-12 месяцев) предметное стекло после высушивания проводят через этиловый спирт и ксилол.

Подсчет нормальных и патологических форм сперматозоидов проводят в проходящем свете микроскопа с иммерсионной системой (увеличение 600-1350 раз). При подсчете используют клавишный прибор для подсчета форменных элементов крови. При отсутствии счетчика ведут запись на бумаге. Подсчитывают примерно общее количество 100-150 сперматозоидов, учитывая отдельно количество нормальных и патологических форм.

Также при подсчете общего количества сперматозоидов учитывают число включений спермы (форменные элементы крови, эпителиальные клетки и т.д.).

Обработка результатов. Подсчет сперматозоидов и включений проводят не менее чем в трех мазках, суммируя отдельно количество патологических форм, нормальных сперматозоидов и включений спермы.

Содержание патологических форм сперматозоидов  $N_{\text{п}}$ , %, вычисляют по формуле:

$$N_{\text{п}} = \frac{\text{П}}{\text{П} + \text{Н}} \cdot 100 ,$$

где П – количество патологических форм сперматозоидов, шт.; Н – количество нормальных форм сперматозоидов, шт. Содержание включений спермы  $N_B$ , %, вычисляют по формуле:

$$N_B = \frac{B}{\Pi + H} \cdot 100 ,$$

где В – количество включений спермы, шт.

**Пример:** В трех мазках спермы всего насчитано 110 сперматозоидов, в том числе 25 патологических и 85 нормальных форм. Кроме того, насчитано семь включений.

Следовательно, содержание патологических форм вычисляют по формуле:

$$N_{\Pi} = \frac{25}{25 + 85} \cdot 100 = 22,7\%$$

содержание включений:

$$N_B = \frac{7}{25 + 85} \cdot 100 = 6,3\%$$

#### 4.6.2 Определение количества мертвых сперматозоидов

Сущность метода. Количество мертвых сперматозоидов определяют дифференцированным окрашиванием. Сущность метода заключается в подсчете под микроскопом окрашенных мертвых клеток.

Оборудование, материалы и реактивы. Для проведения испытания применяют:

➤ микроскоп биологический различных марок с увеличением 600-1350 раз (окуляр 15×, объектив 40× или 90×);

- рН-метр-милливольтметр типа рН-340 с диапазоном измерения от 0 до 14 ед. рН, погрешность  $\pm 0,04$  ед. рН;
- термостат для микроскопа, обеспечивающий поддержание температуры  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ ;
- весы типа ВЛТ-500 (ВТК-500) с погрешностью не более  $\pm 0,08$  г по ГОСТ 24104;
- стекла предметные  $26\times 100$  по ГОСТ 9284;
- стекла покровные  $18\times 18$  по ГОСТ 6672;
- стеклянные колбы по ГОСТ 1770 вместимостью  $100\text{ см}^3$ ;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- эозин водорастворимый;
- нигрозин водорастворимый по ГОСТ 4014;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, 3%-ный раствор;
- эфир петролейный;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Подготовка к проведению анализа. Вымытые и высушенные предметные стекла обезжиривают, выдерживают в течение 3 часов в смеси равных объемов этилового спирта с петролейным эфиром.

Приготовление 1%-ного раствора лимонной кислоты. В колбе вместимостью  $100\text{ см}^3$  растворяют 1,0 г лимонной кислоты в дистиллированной воде и доводят объема раствора до метки. Срок хранения раствора при комнатной температуре – 10 дней.

Приготовление 3%-ного раствора лимоннокислого натрия. В колбе вместимостью  $100\text{ см}^3$  растворяют 3,0 г лимоннокислого натрия в дистиллированной воде и доводят объем раствора до метки. Срок хранения раствора при комнатной температуре – 10 дней.

Для доведения 3%-ного раствора лимоннокислого натрия раствора до  $\text{pH} = 7,2\pm 0,1$  добавляют 1%-ный раствор лимонной кислоты. Полученный раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление красок 1,5 г эозина и 10 г нигрозина растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> в 3%-ном растворе лимоннокислого натрия с рН 7,2±0,1 до метки.

Допускается применять растворы без фоновых красок (нигрозина). При этом готовят только 1-5 %-ный раствор эозина на 3%-ном растворе лимоннокислого натрия с рН 7,2±0,1.

Подготовка пробы. В сперме определяют концентрацию сперматозоидов. Сперму с высокой концентрацией сперматозоидов разбавляют до концентрации 0,2-0,4 млрд./см<sup>3</sup> 3%-ным раствором лимоннокислого натрия.

Проведение анализа. На чистое, обезжиренное, подогретое до температуры (37±1)°С предметное стекло наносят небольшую каплю неразбавленной или предварительно разбавленной 3%-ным раствором лимоннокислого натрия спермы и добавляют две-три капли раствора краски, подогретой до температуры 30°С. Сперму и краску смешивают в течение 2-4 секунд и делают тонкие мазки на трех обезжиренных стеклах.

Мазки подсушивают фильтровальной бумагой, высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой микроскопа при увеличении 600-1350 раз при голубом или зеленом светофильтре.

В каждом препарате подсчитывают по 100-150 сперматозоидов. Отдельно считают количество сперматозоидов с окрашенными и неокрашенными головками. Сперматозоиды с головками, окрашенными частично, относят к мертвым.

Обработка результатов. Количество мертвых сперматозоидов Нс, %, вычисляют по формуле:

$$H_c = \frac{C^+}{C^- + C^+} \cdot 100 ,$$

где  $C^+$  – количество сперматозоидов с окрашенными головками, шт.;  $C^-$  – количество сперматозоидов с неокрашенными головками, шт.

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами определений не должны превышать 10%.

#### **4.6.3 Определение размеров сперматозоидов**

Сущность метода. Сущность метода заключается в измерении сперматозоидов под микроскопом в проходящем свете при помощи окулярного микроскопа.

Оборудование, материалы и реактивы. Для проведения анализа применяют:

- микроскоп биологический различных марок с окуляром 15× и объективом 20 × или 40 ×;
- микрометр окулярный винтовой типа МОВ-1-15 ×;
- объект-микрометр типа ОМО с ценой деления шкалы 0,01 мм по ГОСТ 6507;
- стекла предметные 26×100 по ГОСТ 9284;
- стекла покровные 18 × 18 по ГОСТ 6672;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, 3%-ный раствор;
- эозин водорастворимый или нигрозин по ГОСТ 9307.

Подготовка к проведению анализа. Масштаб линейки и окулярного винтового микрометра меняют в зависимости от применяемого окуляра, объектива и величины тубуса микрометра. Истинную величину деления линейки определяют объект-микрометром. Для этого на предметный столик микроскопа помещают объект-микрометр, фиксируют объектив на шкале объект-микрометра и, наблюдая в микроскоп, совмещают линейки окуляр- и

объект-микрометра. Определяют, сколько делений объект-микрометра приходится на определенное число делений окуляр-микрометра.

Истинное значение деления микрометра окулярного винтового  $N$ , мкм, вычисляют по формуле:

$$N = \frac{n_1}{n_2},$$

где  $n_1$  — число делений объект-микрометра, умноженное на величину одного деления, мкм;  $n_2$  — число делений микрометра окулярного винтового, совпадающих с числом делений объект-микрометра.

**Пример:** пять делений объект-микрометра покрывают 20 делений окуляр-микрометра. Одно деление объект-микрометра равно 10 мкм. В этом случае одно деление линейки окуляр-микрометра будет равно:

$$N = \frac{5 \cdot 10}{20} = 2,5 \text{ мкм}$$

Готовят раствор 3%-го лимоннокислого натрия. Затем на 3%-ном растворе лимоннокислого натрия готовят красящую или фоновую краску: 2%-ный раствор эозина водорастворимого или 5-10%-ный раствор нигрозина.

В сперме определяют концентрацию сперматозоидов. Сперму, имеющую высокую концентрацию, разбавляют до концентрации 0,2-0,4 млрд./см<sup>3</sup> 3%-ным раствором лимоннокислого натрия.

Проведение анализа. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю спермы, добавляют к ней одну-две капли раствора краски, смешивают и делают один-два мазка. Мазки сушат на воздухе в течение 5-10 минут и микроскопируют.

Для измерения используют тубус длиной 152 мм. Окуляр-микрометр вкладывают в окуляр и винтовой окуляр-микрометр вставляют в тубус микроскопа. Измеряют сперматозоиды при увеличении 300-600 ×.

При измерении линейку окуляр-микрометра накладывают на сперматозоиды и подсчитывают количество делений, приходящихся на длину или ширину сперматозоида.

Длину (ширину) измеряют не менее чем у 20 сперматозоидов.

Обработка результатов. Длину  $L_C$  или ширину  $B_C$  одного сперматозоида, мкм, вычисляют по формуле:

$$L_C(B_C) = N \cdot n_1 ,$$

где  $N$  – значение одного деления шкалы микрометра окулярного винтового, мкм;  $n$  – число делений шкалы микрометра окулярного винтового, приходящееся на длину или ширину сперматозоида.

Результат округляют до третьего десятичного знака.

#### **4.6.4 Определение целостности акросомы сперматозоидов**

Сущность метода. Сущность метода заключается в определении под микроскопом числа сперматозоидов с интактной или поврежденной акросомой. Целостность акросомы определяют с помощью дифференцированного окрашивания.

Оборудование, материалы и реактивы. Для проведения анализа применяют:

- микроскоп биологический типа МБИ или МБР с окуляром 15× и объективом 40 ×;
- весы типа ВЛТ-500 (ВТК-500) с погрешностью не более  $\pm 0,08$  г по ГОСТ 24104;

- термометр медицинский максимальный типа ТБ-1 Б по ГОСТ 302 с диапазоном измерения температур от 32°C до 42°C с пределом допускаемой погрешности  $\pm 0,1$  С;
- стекла предметные 26×100 по ГОСТ 9284;
- стекла покровные 18 × 18 по ГОСТ 6672;
- стеклянные колбы по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см<sup>3</sup>;
- эозин водорастворимый;
- нигрозин водорастворимый по ГОСТ 4014;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, 3%-ный раствор;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Подготовка к проведению анализа. Вымытые и высушенные предметные стекла обезжиривают, выдерживая в течение 3 часов в смеси равных объемов этилового спирта с петролейным эфиром.

Приготовление красок. В мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> растворяют в 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 0,67 г эозина и 5 г нигрозина.

Подготовка пробы. Сперму, имеющую высокую концентрацию, разбавляют до концентрации 0,2-0,4 млрд./см<sup>3</sup> 3%-ным раствором лимоннокислого натрия.

Проведение анализа. В пробирке проводят разбавление спермы приготовленным раствором краски в соотношении 1:8 при температуре раствора 37°C. Раствор спермы инкубируют в течение 10-15 секунд. После чего на чистое, обезжиренное, подогретое до температуры 37°C предметное стекло наносят небольшую каплю смеси спермы и краски (10 μl) с помощью стеклянной палочки и накрывают покровным стеклом. Приготовленный образец микро-скопируют с иммерсионной системой микроскопа при увеличении 600×.

В каждом препарате подсчитывают по 100 сперматозоидов. Отдельно считают количество сперматозоидов с целой (неокрашенной) акросомой (рис.

48) и с поврежденной (окрашенной) акросомой. Сперматозоиды с акросомами, окрашенными частично, относят к поврежденным.

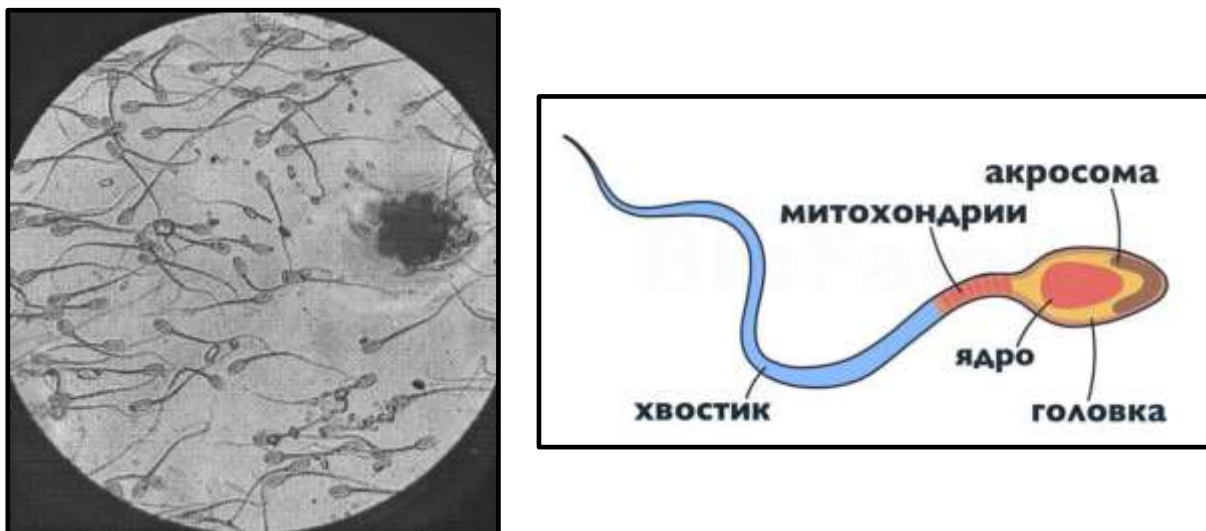


Рисунок 53 – Сперматозоиды с целой акросомой

Обработка результатов. Количество сперматозоидов с поврежденной акросомой  $A_n$ , %, вычисляют по формуле:

$$H_c = \frac{C^+}{C^- + C^+},$$

где  $C^+$  – количество сперматозоидов с окрашенными головками, шт.;  $C^-$  – количество сперматозоидов с неокрашенными головками, шт.

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами определений не должны превышать 10%.

#### **4.6.5 Методика быстрого дифференциального окрашивания спермы**

##### **«ДИАХИМ-ДИФФ-КВИК»**

Назначение. Набор реагентов для быстрого дифференцированного окрашивания биопрепаратов, предназначен для быстрого дифференцированного окрашивания эякулятов в клинико-диагностических лабораториях.

Характеристика набора. Состав: Раствор № 1 (фиксатор) – 100 мл; Раствор № 2 («розовый») – 100 мл; Раствор № 3 («синий») – 100 мл; Буферная смесь – 1 флакон (10 мл).

Принцип метода: форменные элементы клеток и клеточных элементов избирательно окрашиваются реагентами, входящими в состав набора.

##### Оборудование и материалы:

- лотки для сушки и окраски мазков;
- штатив для просушивания окрашенных стекол на воздухе в вертикальном или наклонном положении;
- штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стеклах;
- емкости для фиксации и окраски;
- пинцет или щипцы для взятия предметных стекол с препаратами;
- стекла предметные;
- микроскоп;
- таймер;
- чашки Петри;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- масло иммерсионное;
- перчатки резиновые.

Подготовка к анализу. Приготовление забуференной воды: Содержимое флакона с буферной смесью развести в 3-х литрах дистиллированной воды, pH забуференной воды должен находиться в диапазоне 6,8-7,2.

Приготовление мазков эякулята. Предметное стекло перед исследованием тщательно вымыть и обезжирить смесью для обезжиривания предметных стекол. 2-3 мазка эякулята сделать на предметных стеклах с помощью более узкого предметного шлифованного стекла следующим образом. Взяв предметное стекло за длинные края, прикоснуться его поверхностью (отступив на 0,5-1 см от узкого края) к капле препарата. Предметное стекло следует держать на столе или в левой руке за узкие края. Правой рукой приставить шлифованное стекло узким краем к стеклу с кровью слева от капли под углом  $45^\circ$  и продвинуть его вправо до соприкосновения с каплей препарата. Выждать до тех пор, пока препарат расплывется по всему ребру шлифованного стекла, и затем легким быстрым движением провести его справа налево до тех пор, пока не будет исчерпана вся капля. Капля спермы должна быть небольшой и соразмерна так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1-1,5 см до его края. Нельзя сильно нажимать на стекло, так как многие сперматозоиды могут оказаться поврежденными. Хорошо сделанный мазок тонок, имеет светло-белый цвет и оканчивается «метелочкой». После приготовления мазки следует быстро высушить на воздухе до исчезновения влажного блеска. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток. Затем надо уложить предметные стекла мазками кверху на стеклянный мостик для окраски.

Проведение анализа:

1. Непосредственно перед окрашиванием высушенные на воздухе мазки фиксировать в Растворе №1 окунанием в раствор на 15 секунд.
2. Удалить остаток Раствора №1, поставив стекло вертикально на фильтровальную бумагу.
3. Окрасить препараты Раствором №2 («розовым») окунанием в раствор на 10 секунд.
4. Удалить избыток раствора со стекла, поставив стекло вертикально на фильтровальную бумагу.

5. Окрасить препараты Раствором №3 («синим») окунанием в раствор на 10 секунд.
6. Удалить избыток раствора со стекла, поставив стекло вертикально на фильтровальную бумагу.
7. Промыть стекла с препаратом в забуференной воде.
8. Высушить.
9. Микроскопировать с иммерсионной системой.

Результаты окраски: ядра клеток окрашиваются в различные оттенки синего цвета (от синего до сине-сиреневого цвета), цитоплазма в розовый цвет.

#### **4.7 МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

##### **КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ**

##### **БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ (ГОСТ 32198-2013)**

##### **4.7.1 Определение общего количества микроорганизмов**

Проведение исследования. Сперму высевают в таком количестве, чтобы на чашках выросло не более 500 колоний (КОЕ) микроорганизмов.

Посев материала проводят из двух разведений спермы – 1:10 и 1:1000 на четыре чашки от каждого разведения с использованием двуслойного агарового метода.

Посев спермы на поверхность МПА проводят на заранее разлитую среду в бактериологические чашки. Толщина среды на дне чашки должна быть не менее 3 мм. Перед посевом бактериологические чашки с разлитым агаром выдерживают в термостате при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 24 часов (проверка на стерильность).

При посеве на поверхность МПА суспензию спермы равномерно распределяют по всей поверхности агара путем покачивания чашки или стерильным шпателем.

После посева чашки со слегка приоткрытыми крышками ставят в термостат для подсыхания. Затем чашки закрывают, переворачивают крышками вниз, и выдерживают в термостате в течение 48-72 часов при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

Количество выросших колоний подсчитывают в каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне. При подсчете пользуются лупой или прибором для счета колоний.

При небольшом количестве выросших колоний их подсчитывают на всей площади чашки и отмечают на ней восковым карандашом или чернилами. При сравнительно большом росте микроорганизмов дно чашки делят карандашом на секторы (2, 4, 8) и подсчитывают число колоний отдельно в каждом секторе. Полученные числа складывают. При равномерном распределении колоний можно ограничиваться подсчетом на ЛА или % площади чашки.

При большом количестве выросших колоний (более 500) пользуются камерой Вольфгюгеля. Для подсчета чашку кладут под стеклянную пластинку и подсчитывают при ярком боковом освещении. При сравнительно равномерном распределении колоний их подсчитывают в десяти квадратах, расположенных в разных участках чашки. Число колоний суммируют.

Обработка результатов. Количество микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> неразбавленной спермы при небольшом количестве выросших колоний вычисляют по формуле:

$$C = \frac{N \cdot D}{V \cdot S},$$

где N – количество насчитанных колоний, шт.; D – разведение спермы; V – объем суспензии, взятой для посева, см<sup>3</sup>; S - относительный размер площади чашки, на которой был проведен подсчет колоний, см<sup>3</sup>.

Площадь всей чашки, на которой проводят подсчет колоний микроорганизмов, принимают за 1, площадь половины чашки – 0,5; четверти – 0,25. За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое результатов четырех определений. Допускаемые расхождения между результатами определений не должны превышать 20%.

**Пример:** Высеяно 0,5 см<sup>3</sup> спермы, разбавленной в соотношении 1:10. Подсчет колоний проведен на % площади чашки, насчитано 20 колоний. Следовательно, количество микроорганизмов вычисляют следующим образом:

$$C = \frac{20 \cdot 10}{0,5 \cdot 0,25} = 1666$$

Таким образом, в 1 см<sup>3</sup> спермы содержится 1666 микроорганизмов (КОЕ).

Количество микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> неразбавленной спермы С при большом количестве выросших колоний вычисляют по формуле:

$$C = \frac{N \cdot \pi \cdot R^2}{n \cdot V},$$

где N – количество колоний, насчитанных в 10 квадратах;  $\pi \cdot R^2$  – площадь чашки, см<sup>2</sup>; D – разведение спермы;  $\pi$  – число квадратов, взятых для подсчета посева, см<sup>3</sup>; V – объем суспензии спермы, взятой для посева, см<sup>3</sup>.

**Пример:** При высеве 0,5 см<sup>3</sup> спермы, разведенной в соотношении 1:10, в каждом из квадратов насчитано колоний: 8, 10, 12, 11, 7, 14, 8, 12, 18 и 14. Всего 114. Следовательно, количество микроорганизмов вычисляют следующим образом:

$$C = \frac{114 \cdot 3,14 \cdot 5^2 \cdot 10}{0,5 \cdot 10} = 17898$$

Таким образом, в 1 см<sup>3</sup> спермы содержится 17898 микроорганизмов (КОЕ).

#### 4.7.2 Определение бактерий группы кишечной палочки

Количество бактерий группы кишечной палочки, обнаруженной в сперме, выражают в виде коли-титра (титр кишечной палочки) или коли-индекса.

Коли-титр можно перевести в коли-индекс и наоборот. Для перевода коли-титра в коли-индекс единицу делят на объем, выражающий коли-титр. Например, установлен коли-титр, равный  $0,01 \text{ см}^3$  (разведение 1:100). Следовательно, коли-индекс будет равен:  $1:0,01 = 100$ , т. е. в  $1 \text{ см}^3$  содержится 100 кишечных палочек.

Для перевода коли-индекса в коли-титр необходимо единицу разделить на число, выражающее коли-индекс. Например, коли-индекс равен 100. В этом случае коли-титр равен:  $1:100 = 0,01$ .

Проведение исследования. Коли-титр определяют методом бродильных проб при посеве на среду Булира. Сущность метода заключается в сбраживании микробами маннита, которое сопровождается выделением газа и изменением цвета среды.

В три пробирки, содержащие  $5-7 \text{ см}^3$  среды Булира, высевают по  $1 \text{ см}^3$  из одного разведения или из различных разведений спермы (1:10, 1:100, 1:1000). Сперму разводят физиологическим раствором.

Пробирки с посевом выдерживают в термостате при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 18-24 часов. В результате осмотра пробирок устанавливают бродильный титр.

Обработка результатов. При отсутствии помутнения среды и газообразования реакцию считают отрицательной. Изменение цвета среды (пожелтение, помутнение) и газообразование (пузырек в газовке) указывают на размножение в среде бактерий группы кишечной палочки, в этом случае реакцию считают положительной.

При положительной реакции на бродильный титр проводят исследование на идентификацию кишечной палочки. Для этого из пробирок с

измененным цветом среды и газообразованием производят посев на среду Эндо с таким расчетом, чтобы получить отдельные колонии.

Перед посевом дно чашки со средой Эндо делят на четыре сектора. Из каждой пробирки петлей высевает минимальное количество материала на отдельный сектор. Чашки с посевами крышками вниз помещают в термостат при температуре  $(37,5 \pm 0,5)$  С на 18-24 часов.

При отсутствии роста на среде Эндо колоний, типичных для бактерий группы кишечной палочки, сперму считают не загрязненной микроорганизмами этого вида.

При появлении на среде Эндо колоний, типичных для бактерий группы кишечной палочки (красных, нередко с металлическим блеском, розовых, бледно-розовых), а также бесцветных колоний проводят их идентификацию.

### **Окраска препаратов**

Из изолированных колоний, характерных для бактерий группы кишечной палочки, приготавливают препараты, которые окрашивают или по методу Грама, или по методу Грама в модификации Калины и микроскопируют.

Окраска по методу Грама. Мазок культуры, помещенный на предметное стекло, фиксируют над пламенем горелки и накладывают кусочек фильтрованной бумаги, наливают реактив 1 и выдерживают в течение 1-2 минуты. Краску сливают, бумагу снимают и, не промывая препарата водой, наливают раствор Люголя (реактив 2). Выдерживают в течение 1-2 минуты до почернения препарата. Сливают раствор Люголя и прополаскивают препарат в 96%-ном спирте в течение 0,5-1,0 минуты, пока не перестанет отходить краситель. Промывают тщательно дистиллированной водой, а затем дополнительно окрашивают в течение 2 минут спирто-водным раствором фуксина (реактив 3). Промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Окраска по Граму в модификации Калины. На чистое, хорошо обезжиренное предметное стекло наносят петлей небольшое количество агаровой культуры, но не размешивают. Приготавливая препарат из

бульонной культуры, на стекло наносят только ее каплю. Затем в каплю агаровой или бульонной культуры вносят петлей каплю реактива 4, смешивают и распределяют на площади приблизительно 1 см<sup>2</sup>, подсушивают при комнатной температуре и фиксируют, проводя медленно один раз через пламя горелки. На одном стекле можно готовить несколько мазков, отделяя их линиями, проведенными с обратной стороны стекла.

После остывания стекла на препарат наносят реактив 5 таким образом, чтобы реактив покрыл всю поверхность стекла. Окрашивают в течение 0,5-1,0 минуты, краску сливают, мазок помещают на 1-2 секунды в 30%-ный этиловый спирт, затем препарат ополаскивают дистиллированной водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

Микроорганизмы, красящиеся по Граму (грамположительные), окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, не красящиеся по Граму (бактерии грамотрицательные – группы кишечной палочки) – в красный цвет.

В зависимости от количества микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> неразбавленной спермы и коли-титра различают пять степеней чистоты спермы в соответствии с показателями, указанными в таблице 7.

Таблица 7 – Степень чистоты спермы

| Степень чистоты спермы | Количество микробных тел в 1 см <sup>3</sup> | Коли титр, см <sup>3</sup> | Санитарная оценка качества спермы |
|------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| I                      | –                                            | свыше 0,1 или 0,3          | Стерильная                        |
| II                     | до 100                                       | 0,1 или 0,3                | Незначительно загрязненная        |
| III                    | до 2000                                      | 0,1 или 0,3                | Слабо загрязненная                |
| IV                     | до 5000                                      | 0,1 или 0,3                | Средне загрязненная               |
| V                      | более 5000                                   | 0,01 или менее 0,3         | Сильно загрязненная               |

#### **4.7.3 Исследование спермы на наличие синегнойной палочки**

Для выделения синегнойной палочки сперму высевают на МПБ с добавлением 1-2 г глюкозы или лактозы на 100 г МПБ. Инкубируют посевы в течение шести-семи суток в термостате при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , проверяя рост каждые один-два дня. При росте бактерии продуцируют водорастворимый пигмент пиоцианин, который постепенно окрашивает бульон в зеленовато-голубой цвет. На МПА он дает круглые голубовато-серые колонии. При микроскопии – грамтрицательная палочка.

Основной признак культуры синегнойной палочки - положительная хлороформная проба: к 18- и часовой культуре добавляют 1,0 см<sup>3</sup> хлороформа. Культуру, давшую положительную реакцию (окраска хлороформа в синий цвет), относят к синегнойной палочке.

#### **4.7.3 Исследование спермы на наличие синегнойной палочки**

Для выделения синегнойной палочки сперму высевают на МПБ с добавлением 1-2 г глюкозы или лактозы на 100 г МПБ. Инкубируют посевы в течение шести-семи суток в термостате при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , проверяя рост каждые один-два дня. При росте бактерии продуцируют водорастворимый пигмент пиоцианин, который постепенно окрашивает бульон в зеленовато-голубой цвет. На МПА он дает круглые голубовато-серые колонии. При микроскопии – грамтрицательная палочка.

Основной признак культуры синегнойной палочки – положительная хлороформная проба: к 18- и часовой культуре добавляют 1,0 см<sup>3</sup> хлороформа. Культуру, давшую положительную реакцию (окраска хлороформа в синий цвет), относят к синегнойной палочке.

#### **4.7.4 Исследование спермы на наличие анаэробной микрофлоры**

Для исследования на наличие анаэробной микрофлоры одну-две капли спермы засевают в две пробирки со средой Китт Тароцци. Одну из пробирок после посева материала подогревают на водяной бане при температуре  $80^\circ\text{C}$  в

течение 20 минут для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры. Затем засеянные пробирки помещают в термостат при температуре 37°C на 10 суток. Учитывают интенсивность роста, характер осадка, а также наличие и степень газообразования. Дальнейшую идентификацию проводят по ГОСТ 28085.8.5

#### **4.7.5 Исследование спермы на наличие грибов**

Для исследования на наличие грибов чашки с высевами спермы на МПА после подсчета количества микроорганизмов оставляют при комнатной температуре на 8-10 суток в месте, удаленном от прямых солнечных лучей. По истечении этого срока чашки с посевами проверяют на наличие в них роста грибов. Проводят идентификацию выросших грибов.

#### **4.7.6 Исследование спермы на наличие золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*)**

1 см<sup>3</sup> каждого разведения спермы (от 1:10 до 1:100) переносят в пробирку с питательной средой для выращивания *St. aureus*.

Среду для выращивания *St. aureus* с посевным материалом инкубируют при температуре от 30°C до 35°C в течение 24-48 часов. При наличии роста делают пересев петлей на среду для идентификации *St. aureus*.

Посевы инкубируют при температуре от 30°C до 35°C в течение 24-48 часов. Наличие на среде золотисто-желтых колоний грамположительных кокков, окруженных желтыми зонами, свидетельствует о ферментации маннита. Чистую культуру стафилококка исследуют на наличие фермента плазмокоагулазы. Если обнаружены грамположительные кокки, которые ферментируют маннит и дают положительную реакцию плазмокоагуляции, сперма контаминирована *St. aureus*.

#### **4.7.6 Идентификация выделенных микроорганизмов**

Чашки с первичными посевами после учета числа выросших в них микроорганизмов используют для выделения чистых культур (изолятов) с последующей их идентификацией.

Изучают визуально морфологию колоний микроорганизмов, выросших на чашках с питательными средами: размер, форму, внешний вид, поверхности колоний, цвет.

Из колоний, выросших на питательной среде, готовят мазки, окрашивают их по Граму, микроскопируют и дифференцируют микроорганизмы в зависимости от окраски на грамположительные и грамотрицательные.

#### **4.7.7 Изучение морфологических и культуральных свойств микроорганизмов**

Для изучения культуральных и ферментативных свойств, по совокупности которых определяют видовую принадлежность исследуемого микроорганизма, проводят выделение чистой культуры.

Для выделения чистой культуры изолированную колонию одного вида или ее часть стерильной бактериологической петлей над пламенем горелки переносят в пробирки с МПБ и на поверхность скошенного МПА штрихом. Посевы инкубируют при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$  в течение 24-48 часов.

В посевах на МПА отмечают наличие пигмента и другие морфологические особенности микроорганизмов. В посевах на МПБ отмечают рост бактерий с равномерным помутнением среды, придонный рост с образованием осадка на дне (скудным или обильным, крошковидным или хлопьевидным), образование пигмента, наличие на поверхности бульона пленки или пристеночного кольца.

При изучении ферментативных свойств микроорганизмов определяют наличие ферментов протеолитических, сахаролитических и других специфических свойств для данной группы бактерий. Для этого исследуемую

культуру микроорганизмов высевают на специальные дифференциально-диагностические среды.

#### **2.5.8 Определение патогенности выделенных микроорганизмов**

Патогенность выделенных микроорганизмов определяют по гемолитическим, плазмокоагулирующим свойствам и биопробе.

*Определение патогенности выделенных микроорганизмов по  
гемолитическим свойствам*

Гемолитические свойства определяют на чашках Петри с кровяным агаром. Для этого изолированную культуру микроорганизма высевают на поверхность МПА, содержащего 5% крови. Посевы инкубируют при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 48 часов. При наличии вокруг выросших колоний зон гемолиза  $\alpha$  или  $\beta$  – реакцию считают положительной.

*Определение патогенности выделенных микроорганизмов по  
плазмокоагулирующим свойствам*

Реакцию плазмокоагуляции проводят с использованием свежеполученной или сухой стандартной плазмы кролика.

В пробирку вносят 2 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора лимоннокислого натрия и 8 см<sup>3</sup> свежеполученной крови кролика. Цитратную кровь оставляют на 18-20 часов в холодильнике при температуре 4-6 $^\circ\text{C}$ , затем подвергают центрифугированию при 3000 об./мин. в течение 15 минут. Сыворотку крови над осадком эритроцитов отбирают стерильной пипеткой, разбавляют физиологическим раствором в соотношении 1:4 и используют для исследования или лиофилизируют для дальнейшей работе.

Для постановки реакции берут 0,5 см<sup>3</sup> плазмы, разведенной в соотношении 1:5, которую переносят в стерильную пробирку и добавляют 18-20-часовую культуру изолята (культуру берут бактериологической петлей). Пробирки помещают в термостат при температуре  $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  и проверяют наличие свертывания плазмы через 1, 2, 5, 18 и 24 часов.

Патогенные микроорганизмы продуцируют фермент плазмокоагулазу, который свертывает плазму. Реакция считается положительной независимо от времени коагуляции плазмы и вязкости сгустка.

### *Определение патогенности выделенных микроорганизмов по биопробе*

Патогенность выделенных из спермы микроорганизмов определяют на лабораторных животных (кролики, морские свинки, хомяки, белые крысы и белые мыши), чаще всего на белых мышах. Для этого используют свежевыделенные 18-24-часовые культуры бактерий. Выращенную на соответствующих средах культуру разводят физиологическим раствором в соотношении 1:10, 1:100, 1:1000 и т. д. и вводят животным внутрибрюшинно в количестве 0,5 или 1,0 см<sup>3</sup>. Для каждого разведения берут не менее четырех животных. Наблюдение за животными проводят в течение 7-10 дней.

При отсутствии гибели животных в опытных группах, выделенные культуры микроорганизмов считают непатогенными. В случае гибели хотя бы одного животного в группе исследование проводят на удвоенном количестве животных. Если и при повторном исследовании происходит гибель животных, то выделенные из спермы микроорганизмы.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Авдеенко, В.С. Биотехника воспроизводства с основами акушерства: учебник / В.С. Авдеенко, Федотов С.В. – Москва: ИНФРА-М, 2016. – 454 с.
2. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных: учебник для студентов вузов. По спец. «Ветеринария» и «Зоотехния» / А.П. Сту-денцов, В. С. Шипилов, В.Я. Никитин и др.; Ассоциация «Агрообразование». -М.: КолосС, 2012. – 438 с.
3. Авдеенко, В.С. Ветеринарное акушерство с неонатологией и биотехника репродукции животных: учебное пособие / В.С. Авдеенко; Федотов С.В., С.О. Лощинин. – Спб. Лань. – 2019. – 198 с.
4. Белозерцева, Н.С. Кормление, содержание и рациональное использование племенных производителей. Учебно-методическое пособие / Н.С. Белозерцева, С.М. Борунова, П.Н. Абрамов. – М.: «Полиграф Сервис», 2014. – 116 с.
5. Белозерцева Н.С. Зависимость репродуктивной способности черно-пестрых коров от физиологического статуса / Белозерцева Н.С., Федотов С.В., Яхаев И.М. – Ветеринария. 2019. № 6. С. 41-44.
6. Белозерцева, Н.С. Сбор и криоконсервация спермы для искусственного осеменения лисиц (*vulpes vulpes*) / Н.С. Белозерцева, Е.А. Войнова / В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной репродуктологии и современные пути их решения. Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции. – Махачкала, 2024. С. 71-76.
7. Бригида, А.В. Биотехнологические методы ускоренного воспроизводства овец молочного направления продуктивности (Обзор) / А.В. Бригида, И.Е. Приданова // Достижения науки и техники АПК. 2025. Т. 39. №7. С. 73-82.
8. Бригида, А.В. Современные методы воспроизводства молочных овец (Обзор) / А.В. Бригида // Ветеринария и кормление. 2025. № 5. – С. 11-15.
9. Войнова, Е.А. Сбор и криоконсервация спермы для искусственного осеменения лисиц (*vulpes vulpes*) / Е.А. Войнова, Белозерцева / Материалы

международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 150-летию со дня рождения А.Я. Миловича. Сборник статей. – М.: ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2024 – С. 71-76.

10. ГОСТ 32198-2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы микробиологического анализа. - впервые; введ. 01.07.2015. – М.: Издательство стандартов, 2013. – 20 с.

11. ГОСТ 32222-2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. – Взамен ГОСТ 20909.1-1975; введ. 01.07.2015. – М.: Издательство стандартов, 2013. – 8 с.

12. ГОСТ 32277-2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы испытаний физических свойств и биологического, биохимического, морфологического анализов – ГОСТ 20909.3-75, ГОСТ 20909.4-75, ГОСТ 20909.5-75 и ГОСТ 20909.6-75; введ. 01.07.2015. – М.: Издательство стандартов, 2013. – 16 с.

13. Домосканова, А.С. Исследование эякулята кролика породы «серый великан» / А.С. Домосканова, Н.С. Белозерцева / Материалы международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 150-летию со дня рождения А.Я. Миловича. Сборник статей. – М.: ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2024. С. 339-341.

14. Дюльгер, Г. П. Физиология и биотехника размножения животных. Курс лекций: учебное пособие / Г. П. Дюльгер. – СПб.: Лань, 2021. – 236 с.

15. Пособие по искусственному осеменению коров и телок. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2012. – 60 с.

16. Машталер, Д.В. Оценка подвижности сперматозоидов в заморожено-оттаянной сперме быков отечественной и зарубежной селекции / Д.В. Машталер, Б.С. Иолчиев, Е.И. Приданова, С.Н. Ушакова, Т.А. Мороз А.В. Бригида // Исследования молодых учёных в реализации приоритетов научно-технологического развития в области животноводства. – Подольск: ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2025. – С. 51-52.

17. Селекция, кормление и воспроизводство крупного рогатого скота молочного и молочно- мясного направления продуктивности /методические рекомендации/ И. В. Щукина, С. Ю. Шуклин. – М.: «Гелиопринт»: 2023. – 104 с.
18. Скотоводство. Воспроизводство стада: учебно-методическое пособие / А. Г. Марусич. – Горки : БГСХА, 2017. – 64 с.
19. Сорокин, В.И. Руководство по внедрению репродуктивных технологий в воспроизводство крупного рогатого скота: практические рекомендации / В.И. Сорокин, А.В. Бригида, Д.А. Сюсюра, О.А. Скачкова, А.П. Жуков, О.В. Симонова - Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2019. – 112 с
20. Удалов, Г.М. Основные показатели и оценка качества спермы производителей животных / Г.М. Удалов, С.М. Борунова, Н.С. Белозерцева / Методические указания. – М.: ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, 2014, 30 с.
21. Ball P.J.H., Peters A.R. Reproduction in Cattle/ 3-d ed. - Blackwell Publishing, 2004. – 242 p.
22. BSVA Manual of small animal reproduction and neonatology/ Ed. by G.M. Simpson, G.C.W. England, M. Harvey. – UK, BSVA, 2004. – 235 p.
23. Choudhary, K. K. Advances in reproductive biotechnologies / K.K. Choudhary, K.M. Kavya, A. Jerome, R. K. Sharma. – Veterinary World, 2016. – P. 388-395.
24. Comparative Reproductive Biology/ Ed. by H. Schatten, G M. onstantinescu – Blackwell Publishing, 2007. – 402 p.
25. Di Iorio, M. Cryopreservation of rabbit semen: effectiveness of different permeable and non-permeable cryoprotectants on post-thaw sperm quality and reproductive performances. - Thesis, university of Molise, Italy, 2014. - 132p.
26. Effect of TG5 and LEP polymorphisms on the productivity, chemical composition, and fatty acid profile of meat from Simmental bulls / I. Sycheva, E. Latynina, A. Mamedov [et al.] // Veterinary World, 2023. – P. 1647-1654.

- 27.Koziol, J.H. *Sperm Morphology of Domestic Animals* / J.H. Koziol, C.L. Armstrong. – Wiley Blackwell, 2000. – 142 c.
- 28.Mocé E., Vicente J.S. Rabbit sperm cryopreservation: A review// *Animal Reprod. Sci.*, 2009. – Vol. 110. – P. 1–24.
- 29.Reproduction in Farm Animals// Hafez, E.S.E. (ed.) – Bailliere, Tindall and Cox, London, 1980.