

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

**УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

Кафедра физиологии, биотехнологии и ветеринарии

БИОТЕХНИКА РАЗМНОЖЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

**Часть 3. РАЗБАВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ.
ОСЕМЕНЕНИЕ САМОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ**

**Для студентов специальности 1-74 03 01 – зоотехния
специализаций 1-74 03 01 01 – биотехнология и селекция
животных, 1-74 03 01 03 – птицеводство, 1-74 03 01 06 –
производство свинины на промышленной основе**

Горки 2008

Одобрено методической комиссией зооинженерного факультета 16.07.2008 (протокол № 9).

Составили: Г. Ф. МЕДВЕДЕВ, Н. И. ГАВРИЧЕНКО, И. А. ДОЛИН.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Тема 6 Разбавление спермы	3
Тема 7 Хранение спермы	22
Тема 8 Подготовка и обеззараживание инструментов, посуды и материалов	31
Тема 9. Осеменение самок сельскохозяйственных животных и птиц	42
Тема 10. Учет и отчетность на племпредприятиях и пунктах искусственного осеменения сельскохозяйственных животных и птиц	73

УДК 619:591.16

Биотехника размножения сельскохозяйственных животных.
Часть 3. Разбавление и хранение спермы. Осеменение самок сельскохозяйственных животных и птиц; методические указания. / Белорусская государственная сельскохозяйственная академия; сост. Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, И. А. Долин. Горки, 2008. 80 с.

Приведены по пяти темам цель занятий, материалы и оборудование; рассмотрены состав сред для разбавления спермы, технология ее разбавления и хранения; порядок подготовки и обеззараживания инструментов, посуды и материалов для искусственного осеменения; организация выявления животных в охоте, способы и техника искусственного осеменения самок сельскохозяйственных животных и птиц, а также система учета при использовании искусственного осеменения в животноводстве.

Для студентов специальности 1-74 03 01 – зоотехния специализаций 1-74 03 01 01 – биотехнология и селекция животных, 1-74 03 01 03 – птицеводство, 1-74 03 01 06 – производство свинины на промышленной основе.

Таблиц 1. Рисунков 7.

Рецензент профессор И.С. СЕРЯКОВ.

© Составление. Г.Ф. Медведев,
Н.И. Гавриченко, И.А. Долин, 2008

© Учреждение образования
«Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2008
сельскохозяйственная академия», 2008

Тема 6. РАЗБАВЛЕНИЕ СПЕРМЫ

Цель занятий: приобретение студентами навыков приготовления синтетических сред и разбавления спермы производителей сельскохозяйственных животных с учетом условий и срока хранения.

Объекты исследования, материалы и оборудование: самцы животных, животные-манекены или чучела (для быка и хряка); сперма свежеполученная и разбавленная; инструменты, оборудование и материалы для получения спермы; термостат, холодильник, водяная баня, магнитная мешалка, биологический термостат; спектрофотометр (электрический фотоколориметр), микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями, микроскоп МБИ-11 или БИОЛАМ-М с телевизионной камерой; обогревательные столики, предметные и покровные стекла; посуда – колбы, мерные цилиндры и мензурки, смесители для спермы; градуированные пипетки, стеклянные палочки; фильтры бумажные и марлевые, мембранный фильтр 0,45 мкм; спиртовые тампоны; компоненты сред: вода дистиллированная, куриные яйца, гомогенизированное молоко (гомогенизированные сливки и обрат), лактоза, глюкоза, фруктоза, сахароза, глицин, глицерин, натрия цитрат, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, натрия хлорид, натрия гидрокарбонат, калия хлорид, аммония сульфат, магния сульфат, хелатон, капроновая кислота, токоферол (25–30%-ный масляный раствор), ди-трет-бутил-крезол (ДТБК), декстрин, гуммиарабик, трис-буфер, лимонная кислота, ксилит, спермосан-3 или спермосан ППК или полиген, стрептоцид, пенициллин, стрептомицин, каталаза, тилозин, гентамицин, линкомицин, спектинамицин.

Методические указания. Занятия проводятся в клинике и лаборатории кафедры (учебном пункте). Сначала студентам необходимо четко уяснить цель и значение разбавления спермы, затем познакомиться с составом наиболее распространенных синтетических сред для разбавления спермы производителей и правилами их приготовления. Особое внимание следует обратить на требования к компонентам сред, сроки хранения сред после приготовления, условия разбавления (температура и др.), степень разбавления спермы с учетом количества подвижных сперматозоидов в одной дозе для осеменения.

При использовании готовых коммерческих сред и автоматической системы оценки и разбавления спермы студенты должны познакомиться с последовательностью и сущностью отдельных технологических операций.

После этого студенты должны самостоятельно приготовить одну из синтетических сред. После приготовления среды (возможно одновременно с приготовлением ее) можно приступить к получению спермы от производителя. Полученную сперму оценивают и затем разбавляют. Перед разбавлением обязательно необходимо проверить качество при-

готовленной среды. Разбавленную сперму оставляют для изучения выживаемости сперматозоидов.

6.1. Состав сред и значение разбавления спермы

Значение разбавления спермы. Разбавление спермы позволяет увеличить объем эякулята и осеменить больше самок, а также сохранить жизнеспособность и оплодотворяющую способность сперматозоидов вне организма.

Требования к средам для разбавления спермы. Для разбавления используют специальные среды, биологические и синтетические. Они должны отвечать следующим требованиям:

- поддерживать оптимальное равновесие минеральных веществ, необходимых для жизнедеятельности сперматозоидов, и иметь осмотическое давление, равное (изотоническое) крови самца;

- предохранять сперматозоиды от температурного шока и предотвращать или ослаблять губительное влияние на них процессов, происходящих в замораживаемой или оттаиваемой сперме;

- способствовать сохранению плазматической мембраны и акросомы, препятствовать агглютинации сперматозоидов;

- снижать активность метаболических процессов в сперматозоидах при хранении при относительно высоких температурах (4 – 20°C);

- защищать сперматозоиды от токсических продуктов, образующихся в процессе метаболизма;

- предупреждать развитие микроорганизмов, которые губительно действуют на сперматозоиды и половой тракт самок.

Вещества, используемые для приготовления сред. Для приготовления сред применяют компоненты (реактивы) в заводской упаковке: в стеклянных банках с притертыми пробками (или с корковыми пробками, залитыми сверху парафином), а также в запаянных полиэтиленовых мешочках. На упаковке должна быть этикетка с обозначением названия препарата и предприятия, выпустившего реактив, степени чистоты реактива (ЧДА – чистый для анализа, ХЧ – химический чистый) и номера контрольного анализа. Хранят реактивы в шкафах в сухом теплом помещении.

Для приготовления сред используют следующие вещества.

Натрия цитрат ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – трехзамещенный, пятиводный). Белые прозрачные кристаллы или мелкокристаллический порошок, слабощелочного, солоноватого вкуса. Обладает хелатными свойствами (активно связывает ионы кальция и тяжелых металлов и уменьшает содержание их в среде) и понижает набухание и проницаемость мембраны сперматозоидов, предохраняя их от потери электрического заряда и агглютинации; рассеивает жировые шарики в желтке так, что при оценке разбавленной спермы под микроскопом можно на-

блюдать за отдельными сперматозоидами; вместе с другими компонентами создает необходимое осмотическое давление и pH среды.

Натрия цитрат ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – трехзамещенный двухводный), идентичен $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Калия фосфат (однозамещенный – KH_2PO_4). Большие прозрачные кристаллы или кристаллический порошок, слабокислый на вкус.

Натрия фосфат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – двузамещенный двенадцативодный). Белые крупные кристаллы.

Натрия гидрокарбонат (NaHCO_3). Белый порошок, щелочной на вкус.

Магния сульфат ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Бесцветные кристаллы.

Аммония сульфат [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. Бесцветный кристаллический порошок, возможен легкий желтоватый оттенок.

Трилон Б (*хелатон-3*, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Белые кристаллы; хранят в темном месте.

Все эти соли подобно натрий цитрату связывают ионы кальция и оказывают благоприятное действие на состояние и целостность мембран сперматозоидов, создают необходимое осмотическое давление и pH среды.

Натрия хлорид (NaCl). Мелкокристаллический порошок или таблетки массой 0,9 г.

Калия хлорид (KCl). Белый мелкокристаллический порошок.

Кислота лимонная ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Белый кристаллический порошок, хорошо растворим в воде.

Трис-буфер (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол). Мелкокристаллический белый порошок. Устойчиво удерживает первоначальную величину pH среды, обладает осмотическим действием, хорошо проникает через клеточную мембрану. Он способен соединяться с H^+ и CO_2 и устранять явления дыхательного ацидоза клеток и может заменить в средах глюкозу и натрия цитрат.

Глюкоза (виноградный сахар, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Белый гигроскопичный порошок сладкого вкуса.

Фруктоза (гексоза, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Белый порошок сладкого вкуса.

Сахароза (тростниковый сахар, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). Представляет собой белые кристаллы, сладкие на вкус.

Лактоза (молочный сахар – $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$). Белые кристаллы или белый кристаллический порошок без запаха, со слабым сладким вкусом, растворимы в воде. Хранят в бытовом холодильнике при температуре 5°C.

Глицин (аминоуксусная кислота, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). Белый мелкокристаллический порошок, слабого специфического запаха и сладковатого вкуса.

Введение в среды сахаров или глицина (гликокола) понижает их электропроводность и защищает сперматозоидов от агглютинации (склеивания их головками или всем телом в результате потери отрицательного электрического заряда). Сахара (глюкоза, фруктоза) могут быть использованы сперматозоидами для метаболических процессов.

Благоприятное действие сахаров на сперматозоиды связано не только с участием их в метаболических процессах. Сахара являются источником редуцирующих веществ. Воспринимая кислород и окисляясь, они могут служить антиоксидантами и предохранять антагглютинин и ферменты, содержащие сульфгидрильную группу, от окисления. Сахара увеличивают вязкость среды и препятствуют развитию гнилостных микроорганизмов. Кроме того, они способны задерживать воду или заменять ее в структурах, чувствительных к дегидратации.

Желток куриных свежих (1–2 дня!) яиц. Содержит: глюкозу, которая используется сперматозоидами раньше, чем фруктоза плазмы спермы, различные протеиды, водорастворимые и жирорастворимые витамины, каротин, холестерин и другие вещества, стимулирующие активность дегидрогеназ сперматозоидов. Лецитин желтка защищает сперматозоиды от температурного шока, а ряд других веществ и соединений могут служить в качестве окислительных субстратов, предохраняющих сульфгидрильные группы ферментов и антагглютинин от разрушения. Желток имеет слабокислую реакцию (рН 6,0–6,3). Обычно она нейтрализуется введением в среду лимоннокислого натрия. В среды для спермы быка и барана желтка включают 12,5–20,0%. Оптимальным количеством для спермы хряка и кролика является 3–5%, а для жеребца – менее 1% желтка.

Глицерин ($\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{CH}_2\text{OH}$). Простейший трехатомный спирт; представляет собой густую, прозрачную, бесцветную, гигроскопичную жидкость. Легко смешивается с водой или этиловым спиртом в любых пропорциях. При охлаждении до -196°C затвердевает без образования кристаллов льда. Таким же свойством обладают и растворы с концентрацией его 70% или более. Точка замерзания растворов даже с небольшим содержанием глицерина понижается, а объем их уменьшается. Введенный в среды для замораживания спермы глицерин уменьшает опасность образования кристаллов льда и механического повреждения ими сперматозоидов, способствует снижению давления на клетки и препятствует сильному повышению концентрации растворенных веществ при образовании кристаллов льда из воды. Глицерин используется сперматозоидами путем окисления для образования энергии, а в аэробных условиях восполняет содержание фруктозы. Вносится он в количестве от 3 до 10 мл на 100 мл среды.

Бактериостатические вещества – пенициллин, стрептомицин, гентомицин, тилозин, линкомицин, спектиномицин, стрептоцид белый растворимый или комбинированные препараты: спермосан-3, спермо-

сан ППК, полиген, комбиспермосан ЛАП и др. Все антибиотики должны быть проверены на безвредность для сперматозоидов.

При хранении спермы возможно развитие в ней микроорганизмов. Попадают они в момент получения или обработки спермы. Размножаясь, микроорганизмы выделяют в среду продукты обмена, которые отрицательно сказываются на выживаемости сперматозоидов. При осеменении внесенные со спермой в половые пути самки микроорганизмы могут препятствовать оплодотворению или развитию беременности. Особенно большую опасность представляет загрязнение спермы возбудителями специфических половых инфекций. Для предупреждения размножения микроорганизмов в сперме и инфицирования спермы вносят сульфаниламиды и антибиотики.

Среды готовят на *дистиллированной (желательно дважды дистиллированной)* воде. Проводить дистилляцию необходимо в цельностеклянном дистилляционном аппарате, чтобы вода не соприкасалась металлическими деталями. Хранят в закрытых стеклянных сосудах.

Среды для разбавления спермы быка. Сперму быка хранят при температуре -196°C (в жидком азоте), иногда при $0..5^{\circ}\text{C}$ и при комнатных температурах. Разбавляют сперму средами, состав которых зависит от технологии расфасовки и хранения. Многие среды запатентованы.

При замораживании спермы (в гранулах и соломинах) разбавление проводят ЛЖГ (*лактозо-желточно-глицериновой*) средой или ЛЖЦГ (*лактозо-желточно-цитратно-глицериновой*). В ее составе:

Вода дистиллированная	100 мл	100 мл
Лактоза	11,5 г	10,5 г
Натрия цитрат	—	0,2 г
Желток куриных яиц	20 мл	20 мл
Глицерин	5 мл	5 мл
Спермосан-3	50 тыс. ЕД.	50 тыс. ед

Многие организации по искусственному осеменению используют двухфракционные среды и сперму разбавляют дважды. Не содержащая глицерина *фракция А* используется для начального разбавления и охлаждения спермы, вторая *фракция Б* с удвоенным содержанием глицерина добавляется после того, как сперма охлаждена до $+5^{\circ}\text{C}$. Введение глицериновой фракции после охлаждения уже разбавленной спермы предотвращает возможные повреждения сперматозоидов и обеспечивает проявление действия антибиотиков. Наиболее простая среда — *желточно-цитрато-глицериновая (ЖЦГ)*, состоящая из двух фракций:

Ф р а к ц и я А

Цитратный буфер 2,9%-ный	400 мл
Желток свежих (1–2 дня) куриных яиц	100 мл

Ф р а к ц и я Б

Цитратный буфер	330 мл
Желток	100 мл
Глицерин	70 мл

Финальное соотношение фракции А + сперма и фракции В – 1:1. При таком соотношении содержание компонентов (в %) в смеси: *буфер цитратный* – 73, *желток* – 20 и *глицерин* – 7. В эту среду (в одну или обе фракции) можно включать фруктозу или глюкозу; конечная концентрация в среде от 1 до 1,25%. ЖЦГ среда должна иметь рН 6,8–6,9 и осмотическое давление 285–300 миллиосмомолей.

Медведев Г.Ф. и Гуминская Е.Ю. (2007) предложили модифицированную *цитратно–лактоза–желточно–глицериновую среду (ЦЛЖГ)*. В состав этой среды входят: натрия цитрат 3-замещенный 2-водный ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), лактоза (химически чистая $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$), желток куриных яиц (1–2 дня) и глицерин.

Ф р а к ц и я А среды

Цитратный буфер с концентрацией 2,9% – 100 мл
Лактоза – 3,58 г
Желток куриных яиц – 25 мл
Смесь антибактериальных веществ – 2 мл

Ф р а к ц и я Б среды

Цитратный буфер с концентрацией 2,9% – 82,5 мл
Лактоза – 3,58 г
Желток куриных яиц – 25 мл
Глицерин – 17,5 мл.

В двух мл стерильного водного раствора антибактериальных веществ должно содержаться 10 мг тилозина тартрата, 50 мг гентамицина и 30/60 мг линкоспектина. Осмотическое давление среды – 335–380 миллиосмомолей, рН 6,9–7,0.

В предыдущие годы широко использовалась *молочная среда*. Так, в США в 1992 г. 1/4 часть всей спермы была разбавлена молочной средой. Единственный серьезный недостаток этой среды – это наличие оптически различных жировых шариков, которые затрудняют оценку подвижности сперматозоидов.

Готовят две фракции среды.

Фракция А

Прогретое молоко 500 мл

Фракция Б

Прогретое молоко	430 мл
Глицерина	70 мл

Молочная среда должна иметь pH 6,5–6,6 и осмотическое давление 260–290 среды миллиосмолей.

Сперму быка можно хранить и при температуре +2...5°C в течение 72 ч, разбавив *глюкозо-цитрато-желточной средой*.

Вода дистиллированная	100 мл
Глюкоза	3 г
Натрий лимоннокислый	1,4 г
Желток куриных яиц	20 мл
Спермосан-3	75–90 тыс. ед.

В США широко использовалась *желточно-фосфатная среда*: фосфатный буфер и желток куриных яиц в соотношении 1:1.

Фосфатный буфер (pH 6,7–6,8) содержит в 100 мл дистиллированной воды 0,2 г KH_2PO_4 и 2,0 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Смесь подогревается в кипящей водяной бане до растворения солей. Хранится при температуре 15°C. Перед использованием добавляется необходимое количество желтка.

Рекомендуется и другая среда – *Cornell University Extender*: буфер – 80% (объема), желток – 20% (объема), пенициллина – 1000 ед и стрептомицина – 1000 ед.

Натрия лимоннокислого ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	14,5 г
Натрия бикарбоната	2,1 г
Калия хлорида	0,4 г
Глюкозы	3,0 г
Глицина	9,4 г
Лимонной кислоты	0,9 г
Сульфаниламида (стрептоцида)	3,0 г
Дистиллированной воды	до 1 л

В Новой Зеландии широко практикуется хранение спермы в течение трех дней при комнатных температурах (18–24°C). Осеменение скота сезонное – с середины сентября до декабря. Осеменяют ежегодно до 1,8 млн. животных. В 1991 г. спермой быка голштинской породы Crocketts Trevor было проведено в течение трех месяцев 380000 осеменений.

Для разбавления спермы используют *желточно-цитратную среду*, в основу которой положен цитратный буфер. Среду насыщают азотом и добавляют капроновую кислоту.

Натрия лимоннокислого ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	14,5 г
Глюкозы	0,3%
Глицина	1,0%
Глицерина	1,25%
Капроновой кислоты	0,03125%
Сульфацетида	0,01%
Воды дважды дистиллированной	до 100 мл

Желток, пенициллин и стрептомицин добавляют в среду перед использованием. Содержание желтка после разбавления – 5%. Сперма разбавляется нередко из расчета 2 млн. сперматозоидов в дозе (0,5 мл), но чаще ее расфасовывают в соломины объемом 0,25 мл. Добавление каталазы 20 мкг на 1 мл среды повышает оплодотворяемость на 1–2%. Каталаза разрушает образующуюся в процессе метаболизма сперматозоидов перекись водорода.

Среды для разбавления спермы барана и козла. Для хранения спермы при температуре +2...+4°C в течение одного–двух дней применяют *глюкозо-цитрато-желточную* среду в составе:

Вода дистиллированная –	100 мл
Глюкоза –	0,8 г
Натрий лимоннокислый –	2,8 г
Желток куриных яиц –	20 мл
Спермосан-3 –	50–75 тыс. ед.

В США для разбавления спермы используют желточно-цитратный или желточно-фосфатный буфер. *Цитратный буфер* готовят из расчета 36 г трехзамещенного пятиводного ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5^{1/2}\text{H}_2\text{O}$) или 30 г двухводного ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) цитрата натрия в 1 л дистиллированной (ультрачистой) воды. *Фосфатный буфер* готовят растворением 2 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 г KH_2PO_4 в 100 мл дистиллированной (ультрачистой) воды. Раствор стерилизуют и добавляют к нему 20 % (к объему) желтка свежего куриного яйца (в момент разбавления спермы).

Замораживание спермы барана практикуется реже, чем спермы быка. Это связано с недостаточно стабильными результатами осеменения маток замороженной спермой, а также с особенностями организации искусственного осеменения в овцеводстве и сроков его проведения. Для разбавления и замораживания рекомендуется ряд синтетических сред.

Состав лактозо-желточной (ЛЖ) среды

Вода дистиллированная	100 мл
Лактоза	12 г
Желток	20 мл

Состав ЛЖГТЦГ-среды

Лактоза	14,5 г
Гуммиарабик	6,0 г
Желток	20 мл
Глицерин	17,0 мл
Трис-(оксиметил)-аминометан	0,6 г
Лимонная кислота	0,27 г
Спермосан-3	25 тыс. ед.
Вода дистиллированная	100 мл

Состав среды ВИКА

Сахароза	9,84 г
Натрий-кальциевая соль ЭДТА	0,84 г
Желток	10 мл
Глицерин	5,0 мл
Токоферол (25-30%-ный масляный раствор)	2,0 мл или
Ди-трет-бутил-крезол (ДТБК)	0,05 г
Спермосан-3	25 тыс. ед.
Вода дистиллированная	до 100 мл

Состав ГЖУК-трис-буферной среды

Лактоза	8,4 г
Ксилит	0,26 г
Хелатон-3	0,135 г
Желток	20 мл
Глицерин	6,0 мл
Трис-(оксиметил)-аминометан	0,105 г
Декстрин	5 г
Спермосан-3 или ППК	25 тыс. ед.
Вода дистиллированная	100 мл

Рекомендуется и *молочная среда*.

Среды для разбавления спермы хряка. Хранят сперму хряка при температуре +17...+18° С в течение 3 – 10 сут (иногда до 14 сут). Для этого используют среды для краткосрочного, среднесрочного и долгосрочного хранения (ГХЦС и ГХЦ и таблица 1, 2).

Состав разбавителей ГХЦС и ГХЦ (Киев)

Вода дистиллированная	1000 мл	100 мл
Глюкоза.....	40 г	60 г
Хелатон	2,6 г	3,7 г
Натрий лимоннокислый.....	3,8 г	3,56 г
Сульфат аммония.....	1,8 г	—
Натрий двууглекислый	0,5 г	1,2 г
Спермосан-3	250–300 тыс. ед.	250–300 тыс. ед.

Таблица 1. **Среды для разбавления и хранения спермы хряка в течение 3 – 14 дней**

Класс разбавителя	Название разбавителя	Максимальный срок хранения, дней
Кратко-срочный	Beltsville Thawing Solution, BTS	3
	V.S.P.	3
	Модифицированный BTS	3
Средне-срочный	Модифицированный Киев (ГХЦ)/SpermAid	3 – 5
	Modena	3 – 5
	VITAL®	4 – 5
	Merck III™/ Киев/EDTA	4 – 6
Долго-срочный	Модифицированный Modena	5 – 7
	MR-A	6 – 7
	Androhep®	6 – 7
	Androhep®lite™	6
	Androhep PLUS™	7
	X-CELL™	7
	ACROMAX	7 – 8
Сверх-срочный	Mulberry III	7 – 14

Таблица 2. **Состав разбавителей Guelph и Zorpva для спермы хряка**

Компоненты	Краткосрочный разбавитель Guelph, г/л	Среднесрочный разбавитель Zorpva, г/л
D глюкоза	60,0	11,50
Натрий лимоннокислый трехзамещенный	3,70	11,65
Di-sodium EDTA Di-sodium EDTA	3,70	2,35
Натрий гидрокарбонат	1,20	1,75
Поливиниловый спирт (тип II)	–	1,00
Трис	–	5,50
Лимонная кислота	–	4,10
Цистеин	–	0,07
Пенициллин	500000 IU	600000 IU
Стрептомицин	0,5 г	1,0 г

Среды для разбавления спермы жеребца. Для разбавления и хранения спермы жеребца при температуре +2...+4°C в течение 48 ч применяется *лактозо-хелато-цитратно-желточная среда (ЛХЦЖ)*.

Вода дистиллированная	100 мл,
Лактоза	11,0 г,
Натрий двууглекислый	8,0 г,
Натрий лимоннокислый	89,0 мг,
Хелатон	100 мг,
Желток куриных яиц	1,6 мл,
Спермосан-3	24–30 тыс. ед.

Эта же среда, но с добавлением 3,5 мл глицерина применяется для разбавления и замораживания спермы.

6.2. Приготовление сред и технологии разбавления спермы

Приготовление сред. Среды готовят в день разбавления спермы. Работу по разбавлению спермы проводят в стерильной камере или в специально оборудованной лаборатории, облученной бактерицидными лампами. Температуру (18–20°C) в лаборатории поддерживают бытовыми кондиционерами.

Среды для краткосрочного хранения спермы быка и барана (ГЦЖ) готовят следующим образом. В химическую колбу наливают дистиллированную (бидистиллированную) воду, закрывают колпачком из пергаментной бумаги и стерилизуют кипячением в течение 5–7 мин; затем охлаждают до 35°C.

На точных весах отвешивают глюкозу и натрия цитрат и высыпают их в другую стерильную колбу. Стерильной мензуркой или цилиндром отмеривают нужное количество прокипяченной воды, переливают ее в колбу с реактивами и размешивают до полного их растворения. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют в водяной бане 5–10 мин. Охлаждают до 35°C и добавляют спермосан-3 и желток.

Свежие (1–2 дня) куриные яйца моют теплой водой с детергентом, затем промывают теплой и дистиллированной водой, обеззараживают 70%-ным этиловым спиртом и высушивают. Стерильным скальпелем яйцо раскалывают пополам и, оставляя желток в одной половинке скорлупы, сливают в чашку белок; при этом следят, чтобы оболочка желтка не была повреждена острым краем скорлупы. Осторожно наклоняя скорлупу, перемещают желток на стерильную фильтровальную бумагу. Для освобождения желтка от оставшейся части белка край бумаги приподнимают, поворачивают в разные стороны и скатывают медленно желток к другому ее краю. Поддерживая желток на несколько сжатой бумаге, стерильным пинцетом или скальпелем разрушают его оболочку и выливают в подготовленную мензурку (цилиндр). Один желток имеет объем 10–20 мл. Приготовленная среда должна быть использована в течение 3–4 ч. В это время ее можно хранить при температуре 32–35°C в термостате или водяной бане.

Среда ЛХЦЖ для разбавления спермы жеребца. Отвешивают согласно рецепту лактозу и хелатон и высыпают в стерильную колбу. В эту колбу добавляют 0,2 мл 4,2%-ного стерильного раствора натрия гидрокарбоната и 0,25 мл 35,7%-ного стерильного раствора натрия цитрата (из расчета на каждые 100 мл среды) и приливают необходимое количество прокипяченной охлажденной дистиллированной воды. Содержимое растворяют, фильтруют через стерильный бумажный фильтр и добавляют желток.

Среду ГХЦС для разбавления спермы хряка в форме сухих заготовок, выпускаемых лабораториями научно-исследовательских институтов, готовят согласно наставлению по применению "Глюкозо-хелатно-цитратно-сульфатно-бикарбонатной смеси в порошке".

Среда ГХЦ для разбавления спермы хряка также выпускается в форме сухих заготовок или же ее готовят в лаборатории пункта. Для этого стерильным мерным цилиндром или мензуркой отмеривают необходимый объем прокипяченной дистиллированной воды и переливают ее в химическую стерильную колбу. Сюда же вносят взвешенные на точных весах необходимые компоненты, кроме saniрующих препаратов. Приготовленную среду кипятят в водяной бане 5–10 мин, охлаждают до 40–45°C и добавляют спермосан-3 из расчета 250–300 тыс. ед. на 1000 мл. Колбу закрывают стерильной пергаментной бумагой и фиксируют резиновым кольцом.

При использовании ЛЖГ и ЛЖЦГ сред для спермы быка в чистую стерильную колбу наливают необходимый объем бидистиллированной (дистиллированной) воды, закрывают колпачком из пергаментной бумаги и кипятят 10–15 мин. В горячую (90–95°C) воду вносят лактозу и перемешивают до полного растворения порошка; добавляют глицерин и содержимое еще раз тщательно перемешивают, а затем охлаждают до 20–30°C.

В охлажденную среду добавляют saniрующий препарат, растворяют его, добавляют желток и натрия цитрат (в среду ЛГЦЖ, в которой лактозы 10,5 г и натрия цитрата 0,2 г). Колбу плавно покачивают до полного растворения и размешивания всех компонентов. После приготовления часть среды (20%), предназначенную для первичного разбавления спермы, помещают в термостат при 27±1°C. Другую часть оставляют при комнатной температуре (18–20°C) и используют для окончательного разбавления. Приготовленная среда должна быть использована в течение 3–4 ч.

При использовании *желточно-цитратно-глицериновой* среды сначала готовят цитратный буфер. На аналитических или других точных весах отвешивают 29 г натрия цитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ХЧ или ЧДА. Навеску вносят в мерную колбу вместимостью 1000 и добавляют 500–600 мл дистиллированной воды. С помощью магнитной мешалки рас-

творяют навеску, затем добавляют воды до метки. Раствор переливают в колбу для стерилизации. Колбу закрывают пергаментной бумагой и помещают в автоклав. Выдерживают в автоклаве в течение 30 мин при давлении 0,2 атм. Допускается стерилизация в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Можно стерилизовать буфер и путем фильтрации его через мембранный фильтр с величиной пор 0,45 мкм в стерильную посуду. После стерилизации раствор должен иметь осмотическое давление 285–300 mOsm и pH 6,8–6,9. Хранят в течение 1–2 недель при 5°C до использования.

Для приготовления *молочной среды* используют свежее или пастеризованное, гомогенизированное цельное молоко жирностью около 3,5% (или гомогенизированные сливки + обрат из расчета получения смеси, жирностью 3,5%). Такое молоко содержит вредные для сперматозоидов энзимы, но при нагревании его в течение 10 минут при 92–95°C они разрушаются. Прогревают молоко в закрытом двойном стеклянном бойлере или в водяной бане; затем охлаждают до комнатной температуры. Переливают охлажденное молоко в стерильную колбу, оставляя пену в бойлере или при необходимости фильтруют через стерильный фильтр. Разделяют на две фракции. При использовании гомогенизированных сливок и обрат после стерилизации и охлаждения смеси к ней приливают стерильный раствор фруктозы и дистиллированную воду, а затем разделяют на две фракции. В фракцию А молочных сред добавляют антибиотики, в фракцию Б – глицерин. Первую фракцию оставляют при температуре 32...35°C, а фракцию Б охлаждают до температуры 4°C.

При приготовлении *среды ВИКА для спермы барана* токоферол может быть заменен 0,05 г ди-трет-бутил-крезолом (ДТБК). Раствор сахарозы и натрий-кальциевую соль ЭДТА стерилизуют в водяной бане в течение 15 мин. Желток эмульгируют с токоферолом в стерильном мерном стакане в водяной бане при температуре 37°C в течение 5–7 мин, постоянно помешивая стеклянной палочкой (удобнее пользоваться магнитной мешалкой). Затем в этот стакан вносят последовательно стерильный раствор сахарозы с солью ЭДТА, спермосан-3 и глицерин. Техника приготовления ЛЖГТЦГ-среды более сложная, что обусловлено требованиями длительной стерилизации в водяной бане (30 мин для ЛЖ-среды и 60 минут для ЛЖГТЦГ-среды) всех компонентов, кроме желтка и спермосана, контроля испарения воды в процессе стерилизации путем взвешивания колбы с содержимым и восполнения воды при значительных ее потерях.

Технология разбавления спермы зависит от свойств и состава среды. При использовании *однофракционных сред* признанную годной после предварительной оценки сперму быка вначале разбавляют 1:1 непосредственно в спермоприемнике; перед разбавлением температу-

ра среды и спермы должна быть одинаковой ($27 \pm 1^\circ\text{C}$). Для этого посуду со средой хранят в термостате или на подогреваемой магнитной мешалке. Через 15–20 мин после предварительного разбавления проводят финальное разбавление при температуре $18\text{--}20^\circ\text{C}$. Разбавляют сперму так, чтобы в дозе спермы после оттаивания содержалось 10–15 млн. подвижных сперматозоидов.

При разбавлении используют шприц непрерывного действия. Разбавляют сперму средой постепенно. Для этого среду приливают к предварительно разбавленной сперме небольшими порциями в полиэтиленовый спермоприемник, осторожно смешивают после добавления каждой порции среды.

При использовании градуированного смесителя разбавленную в спермоприемнике 1:1 сперму быка переливают в смеситель и небольшими порциями по стенке добавляют среду. После добавления каждой порции смеситель наклоняют так, чтобы сперма оставалась внизу его расширенной части; вращая смеситель, смешивают сперму.

Современные технологии предусматривают автоматизированное разбавление спермы с контролем температуры и выбором степени разбавления с учетом подвижности и концентрации сперматозоидов в сперме, а также количества подвижных сперматозоидов в дозе (пайете) для осеменения.

При использовании *двухфракционных сред ЖЦГ и ЦЛЖГ* перед разбавлением спермы буфер подогревают до $32\text{--}35^\circ\text{C}$, разделяют на две фракции, добавляют в каждую из них необходимое количество желтка и глицерина (в фракцию Б). В фракцию А вносят из расчета на каждый миллилитр среды 100 мкг тилозина, 500 мкг гентамицина и 300/600 мкг линкоспектина, растворенных в 0,02 мл бидистиллированной стерильной воды. Весовые количества антибиотиков необходимо приводить в соответствие с их активностью, которая может различаться в зависимости от партии препарата. Все антибиотики должны быть проверены на безвредность для сперматозоидов. Гентомицин и тилозин могут сохраняться в растворе при 5°C в течение 8 дней, а в парах жидкого азота – до 6 месяцев.

Сначала из полученного и оцененного по внешним свойствам эякулята берут пробы для определения подвижности и концентрации сперматозоидов в сперме. Если эякулят пригоден для использования, то проводится санация неразбавленной спермы. В спермоприемник вносят пипеточным дозатором смесь антибиотиков. На каждый миллилитр спермы добавляют 0,02 мл раствора, в котором содержится 100 мкг тилозина, 500 мкг гентамицина и 300/600 мкг линкоспектина. После осторожного смешивания сперму выдерживают 5 мин при температуре 30°C , затем ее оценивают по подвижности сперматозоидов.

Если используется полиген, то он вносится в необходимых количествах в обе фракции сред, а в сперму не добавляется.

После выдержки в течение 5 мин сперму разбавляют фракцией А ЖЦГ или ЦЛЖГ-среды. Среду приливают аккуратно и медленно в спермоприемник (или по стенкам стеклянного смесителя со спермой) во избежание сильных отрицательных осмотических явлений. Эта не содержащая глицерина фракция добавляется из расчета, чтобы объем спермы и среды составил половину запланированного объема разбавленной спермы (с учетом получения в одном миллилитре 200 миллионов сперматозоидов). Температура спермы и среды – 30°C.

Предварительно разбавленная фракцией А сперма помещается в холодильник и охлаждается в течение 2 ч до 5°C. Для того чтобы охлаждение проходило равномерно, колбу с разбавленной спермой помещают в стакан с водой, температура которой – 30°C. Фракцию Б среды, содержащую глицерин, также помещают в холодильник, где она охлаждается до момента использования. Эта фракция может содержать 5–10% концентрации антибиотиков, определенной для фракции А.

Через 2 ч начинается второй этап разбавления спермы. В предварительно разбавленную фракцией А сперму вносят охлажденную глицериновую фракцию Б в соотношении 1:1, т. е. к одному объему разбавленной спермы прибавляют равный объем охлажденной (до 5°C) среды. Фракцию Б вносят не сразу, а делят на три равные части и прибавляют через 10–15-минутные интервалы медленно и постепенно. Этот этап разбавления производится в холодильнике при температуре 5°C на протяжении 30–45 мин. После финального разбавления в 1 мл разбавленной спермы должно содержаться 100 млн. сперматозоидов.

После завершения разбавления сперму расфасовывают в пайеты, которые размещают в планшеты. В каждой пайете должно содержаться 25 млн. сперматозоидов.

Если расфасовывают сперму в гранулах (0,2 мл), тогда после финального разбавления фракцией Б в 1 мл спермы должно содержаться 125 млн. сперматозоидов.

Для достижения выравнивания концентрации глицерина с наружной и внутренней сторон клеточной мембраны достаточно 4 ч (время эквilibрации). В течение этого времени окончательно разбавленную сперму выдерживают при температуре 5°C, а затем замораживают по стандартной технологии.

Сперму быка разбавляют с расчетом получения 10 – 15 млн. сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением при подвижности не менее 4 баллов. Для расчета степени разбавления используют формулу

$$P = \frac{C \cdot A \cdot V}{0,010 \cdot 10},$$

где Р – количество разбавителя для 1 мл спермы;

С – концентрация сперматозоидов в сперме, млрд. мл;

А – подвижность сперматозоидов после размораживания (4 балла);

V – объем дозы спермы, мл.

0,010 – подвижных сперматозоидов в дозе, млрд.

10 – перевод баллов (4) в количество подвижных сперматозоидов.

Разбавление спермы барана и козла. После получения сперму постепенно охлаждают до 25–30°C. В момент разбавления сперма и среда должны иметь одинаковую температуру. Разбавляют сперму в спермоприемнике. На 1 мл спермы добавляют 1–2 мл среды. Охлаждают разбавленную сперму постепенно до 2–4°C в течение 2–3 ч. Желательно флаконы со спермой поместить в химический стакан с водой температуры 25–30°C и поместить в холодильник на 2 часа.

При использовании сред для замораживания и длительного хранения после получения сперму выдерживают не более 15 мин. Средой ВИКА разбавляют в один прием в соотношении 1:2 при концентрации сперматозоидов 2,5–3,3 млрд. в мл и 1:3 при концентрации их выше 3,3 млрд. в мл. Среду (температуры 30°C) добавляют в сперму осторожно по стенкам спермоприемника.

При использовании ЛЖГТЦГ-среды сперму разбавляют в два приема: сначала ЛЖ-средой в соотношении 1:0,5 при температуре 28±2°C, а затем добавляют один объем ЛЖГТЦГ-среды при температуре 20±2°C.

ГЖУК- трис-буферной средой свежеполученную сперму разбавляют в один прием в соотношении 1:3 при концентрации сперматозоидов 3–4 млрд. в мл и 1:4 при концентрации их свыше 4 млрд. в мл.

Сперму козла разбавляют в 5–20 раз. Из одного эякулята можно получить до 40 доз, а в неделю от одного самца во время полового сезона – до 300 доз.

Разбавление спермы хряка. После получения сперму выдерживают в течение 20–30 мин при комнатной температуре и разбавляют в 2–10 раз. В неразбавленной сперме должно содержаться не менее 100 млн. сперматозоидов, подвижность – не ниже 7 баллов. В одной дозе объемом 100 мл должно быть 2,5 млрд. подвижных сперматозоидов.

Пример расчета количества доз и количества разбавителя. Процент сперматозоидов с нормальной подвижностью – 70% (0,7), концентрация – 134 миллиона в 1 мл, масса эякулята – 233 г.

Количество доз – $233 \cdot 0,134 \cdot 0,7 : 2,5 = 8$ доз.

$8 \cdot 100 = 233 = 567$ мл разбавителя.

Разбавление спермы жеребца. Разбавляют сперму, если концентрация сперматозоидов не менее 150 млн. в мл и подвижность не ниже 6 баллов. Степень разбавления – 1:2 – 1:3. Среду приливают к сперме

небольшими порциями и осторожно смешивают после добавления каждой порции среды.

Разбавление спермы птиц. Оплодотворяющая способность свежеполученной спермы птиц сохраняется недолго. Сперму петухов и индюков можно использовать в течение 30 мин., а чтобы обеспечить стабильно высокие результаты выводимости цыплят и индюшат, ее используют в течение 15–20 мин. После разбавления сперму можно хранить до 2–3 ч. Для разбавления используют несколько сред (табл. 3). Разбавляют сперму 1:1 – 1:3.

Таблица 3. Состав сред для разбавления спермы птиц

Наименование реактива	ВИРГЖ-2	Лейка	Тироде
Натрия хлорид	—	—	0,8
Калия хлорид	—	—	0,02
Кальция хлорид	—	—	0,02
Магния хлорид	—	0,0676	0,01
Натрия ацетат	—	0,613	0,1
Натрий двузамещенный фосфорнокислый	—	—	0,005
Калия цитрат	—	0,128	—
Натрий глютаминовокислый	2,8	1,92	—
Фруктоза	—	1,0	1,0
Глюкоза	1,8	—	—
Дистиллированная вода	100 мл	100 мл	100 мл

6.3. Контроль осмотического давления и pH сред для разбавления спермы

Осмотическое давление определяют методом криоскопии, pH-потенциометрическим методом с помощью соответствующего прибора.

Криоскоп имеет внутреннюю пробирку (цилиндр на 100 мл без основания, с плоским дном), в которую вставляется резиновая пробка. Пробка имеет центральное отверстие для термометра Бекмана и небольшое отверстие в боковой части с металлической втулкой, через которую проходит проволоочная мешалка; в процессе работы втулку смазывают капелькой машинного масла. Внутренняя пробирка с термометром Бекмана и мешалкой вставляется в более широкую пробирку (цилиндр на 250 мл без основания, с плоским дном) и укрепляется в ней посредством широкого (4–5 см) толстого резинового манжета. Широкая пробирка служит воздушной рубашкой для внутренней пробирки. Собранный прибор погружают через отверстие в крышке с резиновой втулкой в толстостенный стакан (высота 200 мм, внутренний диаметр 115–120 мм). Предварительно стакан заполняют охладитель-

ной смесью, состоящей из мелко раздробленного льда или снега и соли в весовом отношении 5:1. Температура охлаждающей смеси должна поддерживаться на 3–5°C ниже температуры замерзания синтетической среды путем добавления льда или снега. Причем смесь льда (снега) и соли периодически перемешивается проволоочной мешалкой, которая вставляется через боковое отверстие в крышке сосуда.

Термометр Бекмана имеет два резервуара ртути: основной нижний и дополнительный в верхней части; оба резервуара соединены между собой капилляром; при необходимости можно ртуть перемещать из одного в другой. Возможность перераспределения ртути в резервуарах позволяет настроить термометр так, чтобы температура замерзания растворителя (воды) лежала в верхней части шкалы.

Основная шкала термометра длинная – около 25 см и разделена на 5–6°C, цена деления – 0,01°. На шкале с помощью лупы можно делать отсчет с точностью до 0,001–0,002°C.

Перед работой необходимо настроить термометр, т. е. установить измеряемую температуру замерзания дистиллированной воды таким образом, чтобы при 0°C ртуть находилась в верхней части шкалы, примерно между делением 3 и 5. До начала настройки следует убедиться в том, что нижний резервуар при комнатной температуре полностью заполнен ртутью.

В стакан емкостью 200–250 мл наливают 150–200 мл дистиллированной воды и, добавляя кусочки льда, охлаждают до 2–3°C; контролируют температуру обычным термометром. В термометре Бекмана нагревают рукой ртуть в нижнем резервуаре и следят, чтобы она заполнила до верху капилляр, после чего термометр переворачивают вверх нижним резервуаром. Продолжая нагревать резервуар, добиваются соединения столбика ртути с ртутью верхнего резервуара. После этого осторожно и плавно, чтобы не разорвать столбик ртути в капилляре, придают термометру обычное вертикальное положение и погружают нижний резервуар в подготовленную охлажденную воду. Выдерживают 3–5 мин, постоянно помешивая термометром (резервуаром) в воде кусочки льда. Затем осторожно вынимают термометр и резко опускают нижним резервуаром на ладонь руки. Столбик ртути должен оборваться между значениями шкалы 3 и 4. Если столбик оборвался выше, то подогреванием резервуара рукой смещают столбик ртути за изгиб капилляра к верхнему резервуару и пытаются оборвать столбик в небольшом расширении капилляра верхнего резервуара. Затем быстро помещают термометр в охлажденную воду. При температуре 2–2,5°C столбик ртути должен находиться между делением шкалы 4,5 и 5°C (при 0°C – между 3 и 4,5°C). После настройки термометр закрепляют с помощью штатива в вертикальном положении в стакане с охлажденной водой. Пробка с проволоочной мешалкой должна посто-

янно оставаться на термометре (при вставлении термометра в центральное отверстие пробки можно разорвать столбик ртути).

Для того чтобы определить температуру замерзания среды для разбавления спермы (и по ней высчитать осмотическое давление), необходимо сначала определить точку замерзания дистиллированной воды по шкале настроенного термометра. Для этого во внутреннюю пробирку криоскопа наливают 30 мл дистиллированной воды и помещают пробирку в охлаждающую смесь; охлаждают в течение нескольких минут до $1-3^{\circ}\text{C}$. Температуру контролируют обычным термометром. Пробирку извлекают из охлаждающей смеси, высушивают снаружи фильтровальной бумагой и закрепляют в наружной пробирке. Стенки внутренней пробирки не должны соприкасаться со стенками наружной пробирки. Соединенные обе пробирки вставляют через отверстие в крышке в сосуд (стакан) с охлаждающей смесью. Затем во внутреннюю пробирку вставляют настроенный термометр с пробкой и проволоочной мешалкой и укрепляют его с помощью штатива. Основной резервуар с ртутью термометра должен быть полностью погружен в дистиллированную воду, но не касаться дна. По термометру Бекмана наблюдают за понижением температуры воды. Так как охлаждение дальнейшее ее идет медленно, вода переохлаждается и не замерзает ниже точки ее замерзания (0°C). Столбик ртути медленно опускается. Для равномерного охлаждения воды ее постоянно помешивают проволоочной мешалкой. Наступает момент, когда в переохлажденной воде начинается процесс кристаллизации. При этом выделяется скрытая теплота отвердевания, и температура быстро повышается (температурный скачок). Воду продолжают помешивать и с помощью лупы наблюдают, когда столбик ртути полностью остановится. Это и будет точкой замерзания воды (например, $4,12_3$). Последняя цифра приблизительная. Для получения точного результата определяют температуру замерзания воды два-три раза.

После этого осторожно извлекают термометр Бекмана из пробирки и помещают его в стакан с охлажденной до $2-3^{\circ}\text{C}$ водой. Во внутреннюю пробирку криоскопа вместо дистиллированной воды наливают 30 мл охлажденной среды для разбавления спермы (без глицерина) и затем в нее вставляют термометр Бекмана. Процедуру охлаждения среды до замерзания осуществляют так же, как и воды. После температурного скачка фиксируют на шкале термометра точку замерзания среды (например, $3,56_2$).

Разница между первым числом ($4,12_3$) и вторым ($3,56_2$) укажет на фактическую точку замерзания среды – она будет равна $0,561^{\circ}\text{C}$. Для определения осмотического давления в милли осмомолях необходимо это число разделить на 0,00186. В данном случае осмотическое давление составит 301. При этом принимается во внимание, что одна осмомоля соответствует депрессии $1,86^{\circ}\text{C}$, а милли осмомоля – $0,00186^{\circ}\text{C}$.

Концентрацию водородных ионов (рН) в среде определяют при помощи рН-метров согласно наставлениям по применению приборов.

Контрольные вопросы

1. Цель разбавления спермы?
2. Какие требования предъявляют к средам для разбавления спермы?
3. Роль желтка куриных яиц, глицерина, сахаров, различных солей в средах для разбавления спермы?
4. Что такое изотонический раствор (буфер), какова его роль в среде для разбавления спермы? Наиболее часто используемые буферы?
5. Для чего включают в среды противомикробные вещества? Какие антибиотики и сульфаниламиды наиболее часто используются, какая концентрация их в разбавленной сперме?
6. Возможно ли внесение антибиотиков в неразбавленную сперму?
7. Какие недостатки имеет молочная среда? Какова основа этой среды? Какие вещества дополнительно вносятся в эту среду?
8. Какое осмотическое давление в сперматозоиде? Каково оно должно быть в среде для разбавления спермы?
9. При каких температурах производится начальное разбавление спермы? Почему и как необходимо охлаждать сперму перед финальным разбавлением?
10. В какой степени разбавляют сперму производителей сельскохозяйственных животных? От каких факторов зависит степень разбавления?
11. Какое количество сперматозоидов должно содержаться в одной дозе для осеменения коровы, овцы, свиньи, кобылы?

Тема 7. ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ

Цель занятий: изучить способы хранения спермы самцов сельскохозяйственных животных, освоить технику замораживания и оттаивания спермы быка.

Материалы и оборудование: разбавленная сперма быка (барана, жеребца, хряка); термоса, бытовой холодильник, сосуды Дьюара с канистрами или марлевыми мешочками, пеналы (стаканчики) для соломин, металлическая воронка для сбора гранул, лопатка для съема гранул с пластины, корнцанги и пинцеты, фторопластовые пластины; лед, жидкий азот; синтетические соломины (пайеты) для расфасовки спермы, стеклянные шарики для укупорки соломин, вакуумный насос, машины для маркировки (М6-ММС-2 или М6-ММС-3), наполнения и укупорки соломин (М6-АПА); прямоугольная теплоизолированная емкость (30 × 40 × 30 см) или широкогорлый цилиндрической формы сосуд Дьюара; биотермостаты, микроскопы, подогревательные столики;

бюретка с резиновой трубкой, зажимом и стеклянным наконечником для дозирования спермы или автоматическое устройство для расфасовки спермы при замораживании в гранулах.

В настоящее время для сохранения спермы самцов сельскохозяйственных животных применяют кратковременное хранение или долгосрочное в замороженном состоянии.

При кратковременном хранении сперму быков сохраняют до 72 ч, жеребцов – до 72 ч, баранов – до 24 ч при температуре +2...+4°C. При этом используют холодильники или широкогорлые термосы со льдом.

Сперму хряков сохраняют 3–14 сут при температуре +17...+18°C, используя для хранения и транспортировки термосы-ящики.

Для хранения спермы быков, баранов, жеребцов и хряков в течение длительного времени без потери оплодотворяющей способности применяют замораживание ее в жидком азоте при –196 С.

7.1. Хранение спермы при температурах выше 0 °C

Хранение спермы хряка при температуре 17–18°C. Для разбавления и хранения спермы хряка при температуре 17–18°C в течение 3–10 (до 14) суток применяют соответствующие синтетические среды. Разбавляют сперму после получения и определения ее качества. Для разбавления и краткосрочного хранения (до 3 сут) используют эякуляты с концентрацией сперматозоидов не менее 100 млн. в 1 мл спермы. Для более длительного хранения необходимы эякуляты с высоким содержанием сперматозоидов. Обычно это наиболее качественная часть второй фракции, собираемой при мануальном получении спермы. Степень разбавления варьирует от 1:2 до 1:9. После разбавления в 1 мл спермы должно содержаться около 30 млн. сперматозоидов, а в дозе для осеменения (100 мл) – не менее 2,5 млрд. подвижных клеток.

Разбавленную сперму расфасовывают в полиэтиленовые флаконы, бутылочки, пакеты, флекситюбики, в специальные катетеры для осеменения и хранят в темноте при температуре 17–18°C в стерильном боксе-термостате или в специальных термосах для хранения и транспортировки. Во время хранения сперму осторожно перемешивают не менее двух раз в сутки. При хранении и транспортировке необходимо строго следить за температурным режимом. Отклонение температуры от оптимальной отрицательно влияет на оплодотворяющую способность спермы.

Хранение спермы при температуре 2–5°C. Сперму быка, сохраняемую при 2–5°C, фасуют в стерильные стеклянные флаконы, одно-разовые полиэтиленовые ампулы или в пайеты. Расфасованную сперму оставляют при комнатной температуре (18–25°C) на 20–30 мин,

упаковывают и помещают в холодильник при температуре 2–5°C или в пищевые термоса со льдом.

Быстрое охлаждение разбавленной спермы нежелательно. Поэтому целесообразно, чтобы понижение температуры от 32°C до 2–5°C происходило постепенно в течение 2–3 ч. Для этого сначала необходимо поместить разбавленную сперму в стеклянный стакан или ванночку с водой такой же температуры, как и температура спермы (32°C), а затем перенести их в водяную баню температуры 22°C на 20 минут, после чего производить фасовку и дальнейшее охлаждение спермы. Хранят в течение трех дней. Используют сперму с активностью не ниже 7 баллов.

Этот способ хранения применяется очень редко.

Хранение спермы барана. При искусственном осеменении овец широко используют свежеполученную неразбавленную сперму, которая обеспечивает наиболее высокую оплодотворяемость маток. Разбавление и хранение спермы несколько ухудшает результаты. Однако рациональное использование ценных производителей легче достигается при условии разбавления и хранения спермы.

Для разбавления и хранения спермы при температуре не ниже 0°C используют синтетические среды ГЦЖ и ГФЖ. Разбавляют сперму в соотношении 1:1 – 1:2 при температуре 25–30°C.

После разбавления сперму можно использовать для осеменения в течение 4 ч, если хранить ее при температуре не ниже 16°C. Если же сперму охлаждают до 2–5°C, то срок хранения увеличивают до 24 ч. Хранят сперму в холодильниках или в пищевых термосах со льдом. Перед помещением в термос флаконы со спермой обертывают ватой или вставляют в гнезда специальных поролоновых амортизаторов и затем упаковывают в полиэтиленовые мешочки. Мешочки кладут на лед в термос, а сверху их также помещают небольшое количество льда.

Хранение спермы жеребца. Для разбавления и краткосрочного (в течение 48 ч) хранения спермы при температуре 2–5°C используется среда ЛХЦЖ. Разбавляют свежеполученную сперму с подвижностью сперматозоидов не ниже 6 баллов и концентрацией 150 миллионов в мл в соотношении 1:3; температура среды в момент разбавления должна быть 25–30°C. Расфасовывают сперму в стерильные флаконы емкостью 50–100 мл с притертыми пробками; пробки закрепляют резиновым кольцами. Флаконы со спермой заворачивают в марлевые салфетки или бумагу и упаковывают в полиэтиленовые пакеты. Пакеты со спермой помещают в термос со льдом. Охлаждение спермы должно проходить постепенно. Поэтому особое внимание уделяют подготовке термосов и теплоизоляционных прокладок; лед в термос помещают в полиэтиленовых мешочках.

7.2. Хранение спермы в жидком азоте (при – 196°C)

Замораживание спермы быка в гранулах. Разбавленную сперму выдерживают в холодильнике при температуре +2...+4°C в течение 4–5 ч. Затем в теплоизолированную емкость или широкогорлый сосуд Дьюара наливают на $\frac{2}{3}$ жидкий азот. Фторопластовую пластину протирают спиртовым тампоном, опускают в жидкий азот в широкогорлом сосуде Дьюара и охлаждают в течение нескольких минут до прекращения кипения азота. Затем пластину поднимают к верхнему краю сосуда и после испарения азота протирают ее сухим стерильным ватным тампоном и с помощью бюретки, шприца или разливочной машины разливают сперму в лунки пластины. Пластина в это время должна иметь температуру минус 160...170°C. После того как в последней лунке сперма затвердеет, пластину опускают ближе к жидкому азоту и выдерживают на расстоянии 5–10 см от поверхности азота в течение 1–2 мин. Далее пластину погружают на 1 мин в жидкий азот, где происходит дальнейшее охлаждение гранул и отделение их от пластины. Затем пластину поднимают из жидкого азота до верхнего уровня сосуда, сгребают гранулы в охлажденный контейнер и переносят в сосуд Дьюара на длительное хранение.

Этот способ расфасовки хранения спермы в настоящее время используется крайне редко.

Замораживание спермы быка в полипропиленовых соломинках (пайетах). После финального разбавления спермы ЛГЖ-средой при температуре 18–20°C сперму расфасовывают в стерильные полипропиленовые соломины внутренним диаметром 2 мм, емкостью 0,25 мл. Соломины должны быть промаркированы. Это делается на машине М6-ММС-2 (или других, более современных машинах) с помощью сменяемого клише, изготавливаемого для каждого быка, или М6-ММС-3 кодовой надписью набираемых цифр. На соломине печатается наименование племпредприятия (первые 3 цифры), порода быка (две последующие цифры), номер быка (пять цифр), а затем последовательно по две цифры год, месяц и день получения спермы. Маркированные соломины в коробках помещают в настольную бактерицидную камеру и стерилизуют в течение двух часов.

Для автоматического наполнения соломин разбавленной спермой и их закупорки имеется специальная машина М6-АПА (или другие современные аппараты). В коробку машины помещается 700 соломин, а в ее бункерочек – 6000 стеклянных шариков. До использования стеклянные шарики выдерживают сутки в растворе соляной кислоты (10 мл концентрированной кислоты на 1 л дистиллированной воды), промывают проточной водой, затем 3–4 раза дистиллированной водой и засыпают на сито с отверстиями 1,7 x 2,0 мм, чтобы удалить обломки.

Высушенные шарики помещают в стеклянную банку и стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 180°C в течение 1,5 ч.

Перед работой корпус машины протирают марлевой салфеткой; детали, непосредственно соприкасающиеся с соломинами и стеклянными шариками (бункера для шариков и соломин, укупориватели), обрабатывают спиртовым тампоном. Наконечники и сопла, медицинские поливинилхлоридные трубки и уплотнители стерилизуют кипячением.

Коробку с маркированными стерильными соломинами фиксируют рычагом у механизма подачи их на барабан, подсоединяют поливинилхлоридную трубку с соплом для подачи спермы, конец трубки с надетым наконечником погружают в емкость с разбавленной спермой. После включения машины сперма нагнетается в соломинку с обеих сторон и закупоривается двумя стерильными цветными стеклянными шариками. В процессе работы следят, чтобы столбик воздушного пузырька был длиной 5–12 мм, а стеклянные шарики заталкивались на глубину 1,5–2 мм.

Наполненные спермой соломины берут в руку воздушными пузырьками вниз и встряхивают несколько раз для того, чтобы пузырьки переместились на середину.

Если используются пайеты Кассу, то сперма заполняется с одного свободного конца до смачивания пробочки из поливинилового спирта и бумаги, а второй конец запаивается ультразвуком. В них пузырек воздуха отсутствует. Пайеты этого типа могут иметь различный цвет (всего 18 цветов), что позволяет легче идентифицировать породу и класс производителя, удобнее и быстрее извлекать нужный образец спермы для использования.

После заполнения соломины раскладывают по 143 шт. в металлические рамки и сверху прижимают держателем. Рамки кладут одна на другую по 5 штук, помещают в коробку и ставят в холодильник ХЖС-300, в котором поддерживается температура около 4°C. В холодильнике сперма постепенно и равномерно охлаждается до температуры 4°C в течение часа (со скоростью 0,3–0,5°C в мин). Выдерживают сперму при такой температуре в течение 3–4 ч и потом замораживают в биологических хранилищах на замораживающем устройстве – медном щите, который закрепляют на расстоянии 6–8 см от поверхности жидкого азота.

Для поддержания стабильной температуры на щите (минус 130...150°C) после загрузки рамок с соломинами и обеспечения оптимальной скорости замораживания спермы необходимо под давлением 0,2–0,3 атм. подавать газообразный азот с вентили газосброса транспортной цистерны. Конец шланга должен лежать на дне биологического хранилища. Если замораживание производится без обдува, тогда щит замораживающего устройства должен касаться поверхности жидкого азота.

Замораживание спермы ведется в течение 7 мин. После этого соломины переносят с помощью специальной воронки в пластмассовые стаканы, наполненные жидким азотом и закрепленные в гнездах щита замораживающего устройства. Затем стаканы с соломинами быстро переносят в подготовленные канистры и размещают их в биологических хранилищах ХБ-0,5 или ХБ-0,2-1.

Многие зарубежные организации по искусственному осеменению и большинство племпредприятий Беларуси используют высокотехнологичное оборудование (MINITUB) для маркировки соломин, наполнения и укупорки их стеклянными шариками или по методу Кассу, для автоматического контроля замораживания и упаковки замороженных соломин. Замораживание спермы барана. Разбавленную сперму охлаждают в течение 2–3 ч до +2...4°C. При этом флаконы (полиэтиленовые капельницы) со спермой погружают в кювету с теплой (20...25°C) водой и ставят в бытовой холодильник. После охлаждения кювету с флаконами погружают в тающий лед до момента замораживания спермы.

Сперму замораживают на поверхности сухого льда или на охлажденной до минус 80°C фторопластовой пластине. Для обеспечения такой температуры пластину после охлаждения в жидком азоте поднимают и устанавливают с помощью штатива на уровне верхнего края широкогорлого сосуда и выдерживают 4–6 мин. После этого в лунки пластины накапывают сперму по 0,2 мл. Как только сперма затвердеет, пластину опускают ниже и выдерживают над поверхностью жидкого азота на расстоянии 3–5 см в течение 1,5–2,0 мин, а затем погружают на 1 мин в жидкий азот. После окончания замораживания пластину извлекают из азота и собирают гранулы в алюминиевые тубы или мешочки из тонкой алюминиевой фольги. Емкости должны быть промаркированы. Замороженную сперму помещают в сосуд Дьюара на карантинное хранение на 28 дней.

Замораживание спермы жеребца. Для замораживания и длительного хранения в жидком азоте сперму разбавляют ЛХЦЖ-средой с добавлением глицерина. Разбавляют также в соотношении 1:3, в один прием. Разбавленную сперму объемом не более 100 мл при высоте слоя 2,5 см в колбе выдерживают в холодильнике 2 ч и замораживают на поверхности сухого льда или в алюминиевых пакетах в парах жидкого азота. При замораживании в форме гранул сперму наносят каплями по 0,2 мл в лунки на поверхность сухого льда; выдерживают в течение 5 мин, после чего гранулы собирают и упаковывают в алюминиевые тубы или пластмассовые стаканы и помещают на хранение в жидкий азот. В каждой упаковке должно быть 125–130 гранул, что составляет около 25 мл оттаянной спермы.

При использовании алюминиевых туб (пакетов) в зависимости от их величины сперму расфасовывают по 25 мл или 13 мл. В обоих слу-

чаях толщина пакета со спермой не должна быть больше 4–5 мм. Перед использованием пакеты охлаждают, а после заполнения спермой осторожно вытесняют из них воздух и концы закатывают дважды. Пакеты со спермой помещают в специальные держатели с пенопластовыми поплавками и переносят в широкогорлый сосуд Дьюара. Выдерживают в течение 5–7 мин в парах жидкого азота, на расстоянии 10–12 мм от его поверхности. После этого пакеты помещают в жидкий азот на хранение.

При замораживании спермы и в гранулах и в пакетах в одной дозе (125–130 гранул, один пакет объемом 25 мл или 2–3 пакета по 13 мл) должно содержаться около 800 млн. сперматозоидов, а после оттаивания – 300–400 млн. подвижных клеток.

7.3. Хранение, перевозка и оттаивание замороженной спермы

Сосуды для хранения спермы. Замороженную сперму хранят в узкогорлых сосудах Дьюара. Такие сосуды различной емкости – 5, 20, 50 и 500 литров. Изготавливаются они из нержавеющей стали, двустенные. Пространство между стенками заполняется порошковой или порошково-вакуумной термоизоляцией. На горловине сосуда подвешиваются металлические канистры или марлевые мешочки для спермы. Крышка сосуда имеет пенопластовую втулку, которая размещается в горловине.

Чтобы температура спермы во время хранения не повышалась, в сосуде любого типа должно оставаться не менее 30–40% жидкого азота (от полной емкости), поэтому сосуд необходимо регулярно (через 30–60 сут) пополнять азотом.

Техника безопасности при работе с жидким азотом. Жидкий азот – прозрачная, бесцветная и легко испаряющаяся жидкость, удельный вес ее 0,8 кг/л, кипит при температуре минус 196°C.

Азот не токсичен, однако в результате испарения и накопления его в помещении содержание кислорода в воздухе уменьшается, что может вызывать у людей головную боль, головокружение и даже потерю сознания. При попадании на открытые участки тела вызывает обморожение (ожог).

Помещение, в котором находятся сосуды Дьюара или стационарные хранилища с жидким азотом, должно быть оборудовано приточно-вытяжной естественной или принудительной вентиляцией. Курение в таком помещении категорически запрещается. Температура жидкого азота поддерживается на постоянном уровне (–196°C) в результате его непрерывного испарения. Поэтому горловина сосуда Дьюара не должна быть плотно закрыта, особенно при перевозке. Персоналу, работающему с азотом, следует закрывать горловину сосуда Дьюара крышками, предназначенными только для них. Если плотно закрыть

сосуд, то возможен его взрыв. Не допускается эксплуатация сосудов, у которых верхняя часть горловины обрастает льдом.

При длительной эксплуатации сосудов Дьюара приходится постоянно доливать жидкий азот, в котором имеются примеси кислорода. Кислород кипит при более высокой температуре – минус 183°С. Поэтому концентрация его в сосуде постепенно возрастает и остающаяся смесь газов становится огнеопасной. Племпредприятия должны контролировать содержание кислорода в сосудах и при достижении содержания его 15% перенести сперму в другой сосуд, а из контролируемого – слить остатки азота вдали от предметов органического происхождения (дерева, бумаги, тряпок, особенно промасленных) и наполнить его свежим азотом. Во избежание взрыва запрещается удалять обогащенную кислородом жидкость из сосуда путем выпаривания.

Работать с жидким азотом необходимо в защитных очках и свободных кожаных рукавицах, чтобы при необходимости их можно было легко сбросить. Брюки должны быть без манжет и прикрывать верхнюю часть обуви. Если жидкий азот попадает на незащищенную кожу, ее следует обмыть водой. Особую осторожность следует соблюдать при оттаивании спермы, замороженной в соломинах. При плохой герметизации и быстром испарении азота в период нагревания может резко повыситься давление в соломине, что приведет к разрыву ее оболочек.

При заправке сосудов или биологических хранилищ азотом гибкий шланг опускают до дна заправляемой емкости, чтобы предупредить выброс конца шланга из горловины сосуда и попадание азота на стоящих рядом людей. Заливать азот в сосуд надо медленно.

Если при испытании сосуда Дьюара обнаруживается нарушение теплоизоляции – утрата вакуума (покрыт вблизи горловины слоем инея), его запрещается оставлять на обогрев в помещении, где могут находиться люди. Необходимо после слива азота поместить сосуд на 3–5 суток в изолированном помещении.

Оттаивание спермы в гранулах. Для оттаивания одной гранулы необходимо иметь 1 мл 2,9%-ного раствора натрия цитрата (выпускается в ампулах) и водяную баню или биотермостат с температурой воды 38–40°С. У основания шейки ампулы с натрия цитратом делают круговой надрез пилкой по стеклу. Надпиленный участок протирают спиртовым тампоном и отламывают верхнюю часть ампулы. Если отверстие недостаточно для прохождения гранулы, то его расширяют путем откалывания стерильным пинцетом небольших участков стекла. Для этого одну ветвь пинцета вставляют в ампулу, по кругу продвигают пинцет и обламывают стекло. Затем ампулу с цитратом натрия закрывают стерильным ватным шариком и помещают в водяную баню одновременно (за 3–5 мин) для подогрева.

Корнцанг для извлечения спермы обтирают спиртовым тампоном, снимают крышку с сосуда Дьюара и кладут ее рядом пробкой вверх, а корнцанг помещают внутрь сосуда для охлаждения. После этого поднимают канистру со спермой до горловины сосуда и корнцангом извлекают одну гранулу; канистру опускают в азот. Сняв ватный шарик, быстро переносят гранулу в ампулу с подогретым цитратом натрия, и опять закрывают ампулу ватным шариком, а затем закрывают крышку сосуда Дьюара. Оттаивают сперму до полного растворения (8–10 с) слегка вращая ампулу между пальцами; достают ампулу с оттаянной спермой, вытирают ее насухо салфеткой и ставят на стол. Размороженная сперма должна быть использована в течение 15 мин.

Оттаивание спермы в пайетах. Для оттаивания спермы в пайетах, включают оттаиватель (биотермостат) и доводят температуру воды до 38°C (пайеты длиной 10 см), 37–38 °C (пайеты длиной 13,5 см), 35–38°C (канадские пайеты длиной 13,5 см) или до иной температуры, указываемой производителями. Корнцанг для извлечения спермы обтирают спиртовым тампоном, снимают крышку с сосуда Дьюара, кладут ее рядом пробкой вверх, охлаждают корнцанг. Поднимают канистру со спермой до уровня 10 см от верхней части горловины сосуда и корнцангом извлекают одну пайету, опускают канистру в азот, перехватывают пайету пинцетом, легко встряхивают ее 1–2 раза, чтобы удалить азот и быстро помещают в оттаиватель. Закрывают крышку сосуда Дьюара, оттаивают сперму в течение 10–11 с (отечественные пайеты), 35–40 с (канадские пайеты) или в течение иного времени, указываемого производителями. В водяной бане пайетку удерживают в вертикальном положении и постоянно перемещают в воде. Вынимают пайету из оттаивателя, вытирают ее насухо салфеткой и кладут на подставку. Салфетку выбрасывают в ведро. После размораживания сперма должна быть использована в течение 15 мин.

Перевозка спермы. Перевозят сперму с племпредприятия в районные станции или на пункты искусственного осеменения на специально оборудованных машинах. Нередко сочетают доставку азота и спермы. Сосуды Дьюара или емкости, заполненные жидким азотом, необходимо надежно закрепить на транспортном средстве. Сосуды, которые предполагается транспортировать самолетом, надо заполнять не более чем на половину емкости.

Транспортируют сперму хряка в боксе-термостате или в специальных термосах для хранения и транспортировки, бытовых сумках-холодильниках, термосах-ящиках, в которых для теплоизоляции применяется поролон. На период транспортировки колбы и флаконы плотно укупоривают, а после доставки на пункт ослабляют резиновые кольца, фиксирующие бумагу на кольцах, или расслабляют крышки флаконов. Сперму транспортируют через 30 мин после разбалования.

Контрольные вопросы

1. Для чего проводится окрашивание среды для разбавления спермы или соломины (пайеты)?
2. Сперма каких животных хранится при температуре, близкой к 0°C? Какие среды для разбавления используются?
3. Какие приборы (оборудование) необходимы для хранения спермы при температуре 2–4°C?
4. Сперма каких животных и в течение какого срока может храниться при комнатной температуре? Каков принцип краткосрочного хранения и какие среды используются?
5. Каковы преимущества хранения спермы при низкой температуре (минус 196°C)?
6. Как расфасовывается сперма перед замораживанием?
7. Какое оборудование необходимо для расфасовки, замораживания и упаковки спермы?
8. Как хранится замороженная сперма в племпредприятии, на фермах?
9. Какие термоса используются для перевозки спермы?
10. Как часто необходимо пополнять азотом сосуд Дьюара? Какие меры предосторожности необходимо соблюдать при работе с такими сосудами?
11. Как оттаивают сперму, замороженную в гранулах и соломинах? Какое оборудование необходимо для оттаивания?
12. В течение какого времени необходимо использовать оттаянную сперму?
13. Какая подвижность сперматозоидов в свежеполученной и в разбавленной и сохраняемой сперме?

Тема 8. ПОДГОТОВКА И ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ИНСТРУМЕНТОВ, ПОСУДЫ И МАТЕРИАЛОВ

Искусственное осеменение – это ряд организационных мероприятий и технологических процессов. Для осуществления их на государственных предприятиях и пунктах искусственного осеменения необходимы специальное оборудование, материалы, растворы, инструмент. Перед использованием они должны быть соответствующим образом подготовлены: быть чистыми, сухими и стерильными. Это необходимо для предотвращения повреждений или гибели сперматозоидов при контакте спермы с ними. Подготовка проводится в специально оборудованных помещениях.

Искусственное осеменение – это ряд организационных мероприятий и технологических процессов. Для осуществления их на государственных предприятиях и пунктах искусственного осеменения необ-

ходимы специальное оборудование, материалы, растворы, инструмент. Перед использованием они должны быть соответствующим образом подготовлены: быть чистыми, сухими и стерильными. Это необходимо для предотвращения повреждений или гибели сперматозоидов при контакте спермы с ними. Подготовка проводится в специально оборудованных помещениях.

Предприятия по искусственному осеменению имеют отдельные комнаты для мытья и стерилизации инструмента, приборов и посуды, которые используются при получении, обработке и хранении спермы. Стены в этих комнатах облицованы глазурованной керамической плиткой, полы выстланы метлахской плиткой.

В моечной комнате должен быть водопровод (холодная и горячая вода) с трапами для стока воды. При отсутствии магистрального водопровода в ней устанавливают газовую колонку или электронагреватель для подогревания воды. Для мытья искусственных вагин размещают ванну. Для размещения использованной и подготовленной посуды необходимо иметь столы. Шкафы стеклянные нужны для запасных искусственных вагин, спермоприемников и другого инструмента. Платяной шкаф необходим для спецодежды.

В моечной размещают также стиральную машину.

В стерилизационной комнате устанавливаются сушильные шкафы, автоклавы, стерилизаторы, газовая или электрическая плита, дистилляторы воды, термостат для подготовленных вагин.

Для обеззараживания воздуха и предметов в стерилизационной и во всех помещениях лаборатории, в которых ведется работа со спермой, а также в манеже устанавливаются бактерицидные лампы – источники ультрафиолетовых лучей.

Использованная или новая посуда, инструмент и материалы должны быть соответствующим образом вымыты и обеззаражены. Новую стеклянную посуду моют теплым раствором соды или специальным моющим средством (типа "Чистоль"), удаляя наклеенные этикетки, жировые пятна и другие механические загрязнения. Моют с помощью ерша, поролона или куска ваты или марли, укрепленных на деревянные палочки. После мытья посуду выдерживают в течение суток или более в растворе соляной кислоты (одна столовая ложка дымящейся кислоты на 3 л дистиллированной воды); посуда должна быть полностью погружена в раствор кислоты. После этого посуду тщательно моют проточной водой и затем ополаскивают несколько раз дистиллированной водой и высушивают на специальной доске с колышками. Посуда считается хорошо подготовленной, если на ее наружной и внутренней поверхности после сушки не остается пятен.

Использованную стеклянную посуду моют также в содовом растворе или теплой водой, тщательно ополаскивают проточной водой и затем несколько раз дистиллированной. При сильном загрязнении по-

суды синтетическими средами для разбавления спермы, которые содержат желток или молоко, ее погружают в хромовую смесь на 24 ч (иногда достаточно обработать смесью внутреннюю поверхность в течение нескольких минут) и многократно промывают проточной водопроводной водой, затем споласкивают дистиллированной водой и высушивают.

Новые пипетки и стеклянные трубки моют проточной водой и помещают на сутки в раствор соляной кислоты. Использованные пипетки достаточно вымыть водой и только сильно загрязненные моют хромовой смесью. Кислоту или хромовую смесь наливают в высокий цилиндр и в него помещают пипетки. Жидкость постепенно заполняет их просвет. После выдержки пипетки тщательно промывают проточной водой, а затем дистиллированной. Во время мытья следят, чтобы вода полностью заполняла просвет пипетки. Удобно пользоваться специальными цилиндрами с сифоном (пипеткомойками) или же дистиллированную воду помещать в бутылку с патрубком внизу, к которому присоединяют эластичную (резиновую или из полимерного материала) трубку с зажимом. После промывания пипеток водой их поочередно присоединяют к трубке и промывают дистиллированной водой.

В современных лабораториях обычно используются дозаторы пипеточные с одноразовыми полиэтиленовыми наконечниками. В таких случаях нет необходимости использования стеклянных пипеток.

Новые изделия из резины (цилиндры и камеры искусственных вагин, катетеры для осеменения кобыл, трубки и пробки) моют в теплом 2–3%-ном растворе соды, затем тщательно ополаскивают проточной водой и высушивают.

Загрязненные цилиндры мерные и мензурки, которые используются для отмеривания жидкостей, моют теплой проточной водой и ополаскивают несколько раз дистиллированной водой.

Термоса для хранения спермы – сосуды Дьюара два раза в год подвергают мойке и дезинфекции. После освобождения их от жидкого азота и выравнивания температуры внутренних стенок с температурой воздуха (отогревания) их моют 2%-ным раствором натрия гидрокарбоната, затем ополаскивают теплой водой. Остатки воды удаляют марлевыми салфетками.

Подготовленную чистую высушенную посуду перед использованием стерилизуют сухим жаром или другим общепринятым способом.

8.1. Приготовление растворов, марлевых салфеток, ватных тампонов, фильтров

Цель занятий: приобрести навыки приготовления растворов и материалов, необходимых для работы по искусственному осеменению и трансплантации зародышей.

Объекты исследований, материалы и оборудование: натрия хлорид (NaCl), натрия гидрокарбонат (Na_2HCO_3), натрий лимоннокислый трехзамещенный двухводный ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); спирт-ректификат, фурацилин, калий двуххромовокислый, серная кислота, дистиллированная вода; стеклянная посуда (флаконы емкостью 100 мл, мерные цилиндры на 100, 250 и 500 мл, мерные колбы на 250, 500 и 1000 мл, колбы стеклянные на 50, 100, 250, 500 и 1000 мл); тампоны с притертыми крышками, баночки на 100 мл с притертыми пробками, стеклянные воронки, стеклянные палочки; марля, гигроскопическая вата, бумага фильтровальная и пергаментная; ножницы прямые; весы аналитические или лабораторные, весы аптечные с разновесом, спиртометры; магнитная мешалка; автоклав, мембранные фильтры 0,45 мкм; газовая или электрическая плита.

Методические указания. Занятия проводятся в лаборатории кафедры или учебном пункте искусственного осеменения. Сначала студенты знакомятся с правилами приготовления растворов, тампонов, марлевых салфеток, затем самостоятельно готовят один из растворов или салфетки, тампоны, фильтры. Целесообразно студентам работать парами.

Приготовление физиологического раствора. Нужно количество дистиллированной (очищенной) воды отмеривают цилиндром и переливают в коническую колбу. На весах отвешивают химически чистый натрий хлорид из расчета 0,9 г на 100 мл воды и помещают в колбу с водой. Если натрия хлорид расфасован в таблетках по 0,9 г, то на каждые 100 мл воды берут одну таблетку. Колбу закрывают пергаментной бумагой, помешивают до полного растворения навески и подогревают до кипения. Вместо дистиллированной воды можно использовать воду очищенную, приготовленную путем фильтрования в бытовых очистителях водопроводной воды. Готовят раствор ежедневно.

Применяют физиологический раствор для промывания внутренней поверхности инструмента для осеменения, обеззараженного 70%-ным спиртом (стеклянные шприцы-катетеры и микрошприцы), резинового катетера для осеменения кобыл после стерилизации кипячением, увлажнения влагалищного зеркала или стеклянного расширителя, а также же при оценке качества спермы.

Приготовление 70%-ного спирта. Для приготовления 100 мл 70%-ного спирта в мерный цилиндр наливают дистиллированной воды 73 мл и добавляют до метки (27 мл) 96%-ного спирта этилового (спирта-ректификата). Расчет для приготовления спирта проводят по формуле

$$\begin{array}{l} 96\% \quad - \quad 100 \\ 70\% \quad - \quad x \end{array} \quad x = \frac{70 \cdot 100}{96} = 72,8$$

Крепость приготовленного спирта контролируют спиртомером. Для этого размешивают стеклянной палочкой спирт с водой и медленно опускают в цилиндр спиртомер. После стабилизации положения прибора по шкале его определяют крепость спирта. Хранят спирт в баночке с притертой пробкой. Используют для обеззараживания внутренней поверхности стеклянного инструмента (шприцы-катетеры, микрошприцы), а также трубок из полимерных материалов, используемых при извлечении зародышей. После обеззараживания остатки спирта удаляют тщательным промыванием инструмента 0,9%-ным раствором NaCl или средой Дюльбекко.

Приготовление 2,9%-ного раствора натрия цитрата (см. приготовление желточно-цитрато-глицериновой среды). Применяют раствор для оттаивания спермы, замороженной в гранулах, при оценке качества свежеполученной и сохраняемой спермы и в качестве компонента желточно-цитратной среды для разбавления спермы быка.

Приготовление раствора фурацилина. Готовят 0,02%-ный раствор фурацилина на физрастворе. Дистиллированную (очищенную) воду подогревают до кипения, затем помещают навеску натрия хлорида (на 100 мл воды 0,9 г соли) и фурацилина из расчета 0,2 г на 1 л (20 мг на каждые 100 мл). Тщательно размешивают и переливают в стерильную бутылку из темного стекла. Хранят в течение двух–трех дней в затемненном месте. Применяют раствор для обработки искусственных вагин после использования, подмывания препуция у производителей перед получением спермы и наружных половых органов у коров и свиней перед осеменением.

Приготовление 1%-ного раствора гидрокарбоната натрия. В коническую колбу на 500 мл наливают дистиллированную воду и стерилизуют в течение 0,5–1 мин кипячением. Охлаждают проточной водой или дают остыть при комнатной температуре до 40–45°C. Затем отвешивают необходимое количество гидрокарбоната натрия из расчета 1 г на 100 мл воды. Навеску помещают в стерильную стеклянную колбу. Отмеривают стерильным цилиндром (мензуркой) необходимое количество простерилизованной дистиллированной воды и переливают ее в колбу с навеской. Колбу закрывают стерильной пергаментной бумагой. Помешиванием добиваются растворения натрия гидрокарбоната. Нельзя нагревать раствор свыше 60°C, так как натрия гидрокарбонат разлагается и становится токсичным для сперматозоидов. Готовят раствор ежедневно. Используют при оценке качества спермы, для увлажнения влагалищного зеркала и промывания инструмента, обработанного 70%-ным спиртом.

Приготовление фосфатно-солевого буфера (среды Дюльбекко). ФСБ готовят путем смешивания трех различных стерильных растворов.

Раствор ФСБ-А. В мерную колбу на 2 л наливают 1,5 л бидистиллированной воды и помещают в нее навески: натрия хлорида 20 г, калия хлорида 0,5 г, калия фосфорнокислого однозамещенного 0,5 г и натрия фосфорнокислого двухзамещенного 12-водного, высушенного до постоянной массы – 2,88 г. Помешиванием раствора добиваются растворения внесенных солей. Затем добавляют воды до метки и тщательно перемешивают с помощью магнитной мешалки. Буфер разливают по 400 мл в бутылки объемом 500 мл. Для стерилизации автоклавируют при давлении 1 атм. в течение 15 мин. Хранят при комнатной температуре.

Раствор ФСБ-Б. В мерную колбу на 250 мл вносят навеску кальция хлорида безводного, высушенного до постоянной массы – 0,25 г и добавляют до метки бидистиллированной воды при постоянном помешивании. Приготовленный раствор разливают по 50 мл во флаконы или колбы соответствующей емкости, закрывают пергаментной бумагой и стерилизуют автоклавированием при давлении 1 атм. в течение 15 мин. Хранят при комнатной температуре.

Раствор ФСБ-В. В мерную колбу на 250 мл вносят навеску магния хлорида 6-водного, высушенный до постоянной массы – 0,25 г и добавляют до метки бидистиллированной воды при постоянном помешивании. Приготовленный раствор разливают по 50 мл во флаконы или колбы соответствующей емкости, закрывают пергаментной бумагой и стерилизуют автоклавированием при давлении 1 атм. в течение 15 мин. Хранят при комнатной температуре.

Для получения полного ФСБ смешивают 400 мл ФСБ-А с 50 мл ФСБ-Б и 50 мл ФСБ-В. В таком виде буфер можно хранить при 4°C до двух недель.

Используют фосфатно-солевой буфер в качестве среды для промывания матки при извлечении зародышей у коров-доноров.

Приготовление хромовой смеси. В коническую колбу отмеривают 1 л дистиллированной воды и растворяют в ней 60 г калия двуххромовокислого, а затем осторожно добавляют малыми порциями 100 мл концентрированной серной кислоты. Приготовленной хромовой смесью обрабатывают сильно загрязненную стеклянную посуду. После тщательно промывают проточной водой, споласкивают дистиллированной водой и высушивают.

Приготовление раствора перекиси водорода. Для приготовления 10 л раствора в стеклянную бутылку, в кастрюлю или ведро наливают 8750 мл питьевой воды, добавляют 1200 мл перигидроли и 50 г моющего средства типа "Прогресс", "Сульфанол" или др. Раствор готовят непосредственно перед употреблением. Норма расхода дезинфицирующего раствора 70–100 мл на 1м². Используют раствор для мытья полов, стен и мебели в боксах для работы с зародышами. Можно использовать этот раствор и при уборке манежа и чучел для получения

спермы от производителей, а также помещения пункта искусственного осеменения.

Приготовление фильтров. В лаборатории фильтры можно приготовить из фильтровальной бумаги. Для этого ножницами разрезают бумагу на квадратные листы соответствующего воронке размера. Складывают лист по диагонали и разглаживают основание образовавшегося треугольника. Затем его еще раз складывают пополам и разглаживают сторону уже четырехслойного малого треугольника. Раздвигают один слой бумаги и вкладывают фильтр в стеклянную воронку так, чтобы после обрезания ножницами выступающих краев бумаги он полностью помещался в воронке, а края его на несколько мм были ниже края ее.

Фильтры бумажные используются для приготовления очищенной воды, фильтрования раствора натрия цитрата перед стерилизацией (а при необходимости – и растворов А, Б и В, используемых для приготовления ФСБ), а также красителей, применяемых при оценке качества спермы. При наличии стандартных стерильных фильтров используют их. Воронку с фильтром помещают в горловину колбы и осторожно порциями выливают на фильтр раствор или прокипяченную воду. При этом не следует переливать жидкость выше края фильтра. Фильтрация позволяет удалить механические примеси и обеспечивает чистоту и прозрачность раствора.

Приготовление ватных тампонов. Пласты гигроскопической ваты расслаивают и отделяют тонкие кусочки. Края кусочков заворачивают так, чтобы они приобрели форму дисков диаметром 4–6 см. По мере приготовления тампоны складывают стопочкой и помещают в банку-тампонницу с притертой крышкой. Надавливая пинцетом в различных местах, хорошо пропитывают 96%-ным спиртом и закрывают банку. Можно тампоны сначала положить в чашку Петри, пропитать спиртом, отжать руками и затем пинцетом разделить их и поместить в тампонницу.

Применяют спиртовые тампоны для дезинфекции искусственных вагин, стеклянных палочек и инструментов для осеменения самок, пинцетов и корнцангов, ножниц, термометров, подставок для инструментов, поверхности стола и рук и др.

Сухие ватные тампоны помещают в бумажные пакеты или в стеклянные банки, которые закрывают бумагой, и стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 1,5 ч. Такие тампоны необходимы для смазывания вазелином стилета катетера для извлечения зародышей, удаления с приборов и инструментов остатков вазелина, слизи, спирта, физиологического раствора и др.

Приготовление марлевых салфеток. Марлю складывают в несколько слоев и разрезают прямыми ножницами так, чтобы получить куски величиной от 20х20 до 40х40 см. Проглаживают утюгом и скла-

дывают вчетверо. Затем упаковывают в стерильную пергаментную бумагу. Салфетки используют для протирания оптики, предметных и покровных стекол, удаления капель воды с приборов и инструментов. Для протирания половых губ самки перед осеменением после подмывания можно использовать одноразовые стерильные бумажные салфетки. Стерилизуют их в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 1 ч.

8.2. Подготовка и обеззараживание посуды и инструментов

Цель занятий: изучить методы стерилизации материалов, посуды и инструментов.

Объекты исследований, материалы и оборудование: стеклянная посуда (цилиндры мерные и мензурки емкостью 100, 200, 250 и 500 мл; мерные колбы емкостью 200, 250, 500 и 1000 мл; флаконы емкостью 100 мл; колбы для растворов емкостью от 50 до 1000 мл); баночки на 100 мл с притертыми пробками; инструмент для осеменения самок сельскохозяйственных животных; тазы эмалированные, кастрюля эмалированная на 3–5 л, ерши и щетки для рук; раствор натрия гидрокарбоната 1%-ный и 2–3%-ный, соляная кислота; резиновые или поролоновые губки для рук; полотенца, вата, марлевые салфетки, бумага фильтровальная, фильтры; перчатки резиновые и полиэтиленовые одноразовые; анатомические и хирургические пинцеты, анатомические ножи, скальпели, ножницы прямые и Купера; предметные и покровные стекла, чашки Петри, часовые стекла, стеклянные палочки; шприцы и иглы, кюветы; автоклав, сушильный шкаф, стерилизатор, бактерицидная лампа; газовая или электрическая плита, примус; спиртовые тампоны, дистиллированная вода; доска с колышками.

Методические указания. Занятия проводятся в лаборатории кафедр, акушерской (ветеринарной) клинике или учебном пункте. Сначала студенты изучают порядок подготовки инструментов и посуды, предметных и покровных стекол; знакомятся с назначением, устройством и правилами работы с автоклавом, стерилизаторами, сушильным шкафом, бактерицидной лампой и с методами стерилизации. При этом особое внимание обращают на соблюдение техники безопасности при работе с газами и электрическими приборами. Затем получают от преподавателя задание и самостоятельно стерилизуют подготовленные ими инструмент, посуду, материалы.

Стерилизация кипячением. Кипячением обеззараживают: металлический инструмент и влагищные зеркала; резиновые трубки, пробки и катетеры для осеменения кобыл; иглы и шприцы для многократного пользования; стеклянные банки и склянки, расширители влагища и шприцы-катетеры. Стерилизация проводится в хирургиче-

ских электрических, а также простых стерилизаторах и специальных стерилизаторах для искусственных вагин.

Металлический инструмент (ножницы, пинцеты и корнцанги, шприцы для осеменения ШО-3 и ШО-4 и трансплантации зародышей, расширитель шейки матки, подставки для инструментов и др.) и влагалитные зеркала кипятят в дистиллированной или очищенной воде в течение 15–20 мин. Чтобы они не покрывались ржавчиной, их нужно опускать сразу в кипящую воду, а режущий и колющий инструмент (скальпели, ножницы, иглы и пр.), кроме того, обертывают марлей для предохранения от затупления. Добавление к воде 1–2% соды усиливает стерилизующий эффект и также предохраняет инструмент от ржавчины.

Шприцы для инъекций, различного типа переходники для соединения полимерных трубок, шприцы-катетеры и другие стеклянные предметы (банки, склянки и мелкая посуда) кипятят 30 мин в дистиллированной или очищенной воде без добавления щелочей. Их кладут в воду до начала подогревания, чтобы не лопались, причем шприцы разбирают и обертывают марлей. В шприцах-катетерах поршни индивидуально притерты к цилиндру и менять их нельзя. Поэтому при обертывании марлей к каждому шприцу прикрепляют и поршень. После этого их помещают на сетку стерилизатора, прикрытую марлей, и заливают теплой дистиллированной или очищенной водой. Стерилизатор накрывают крышкой, нагревают воду до кипения и кипятят 15–20 мин.

После кипячения инструмент и посуду вместе с сеткой извлекают из воды, кладут на крышку стерилизатора и высушивают, с горячей поверхности вода быстро испаряется. Инструмент, непосредственно контактирующий со спермой, необходимо сразу же встряхнуть, чтобы удалить из него воду, а оставшиеся капли удаляют обеззараженными марлевыми салфетками или сухими стерильными ватными тампонами. Из шприцев-катетеров воду удаляют вставленными поршнями, заворачивают их в стерильную пергаментную бумагу, трехслойные марлевые салфетки или фольгу и хранят в шкафу. Собирая шприцы для инъекций и шприцы-катетеры, поршень вставляют в цилиндр лишь после остывания. Пользуются при этом стерильным пинцетом.

Резиновые пробки помещают в чистые марлевые мешочки и кипятят в течение 20–25 мин отдельно от металлического инструмента. Затем мешочки с пробками извлекают из воды и сушат в сушильном шкафу при температуре не выше 60°C.

На искусственные вагины перед кипячением (а также автоклавированием) с обоих концов закрепляют чехлы (колпаки) из холста или плотной белой ткани. После этого вагину помещают в специальный или большой хирургический стерилизатор и кипятят в течение 20 мин. После кипячения быстро извлекают из воды и некоторое время удерживают в вертикальном положении, чтобы полностью удалить воду, и

кладут на подставку. Чехлы снимают непосредственно перед подготовкой к получению спермы. Если обнаружены на стенке камеры остатки воды, ее удаляют спиртовыми тампонами.

Стерилизация сухим жаром. Этим способом наиболее удобно стерилизовать стеклянную посуду, приборы и инструмент. Стерилизация проводится в электрических сушильных шкафах различных типов. Эксплуатация их осуществляется в соответствии с инструкцией по использованию. В рабочей камере сушильного шкафа температура может достигать 250–350°C. Перед стерилизацией разобранные шприцы-катетеры, мерные и пастеровские пипетки, часовые стекла и чашки Петри, а также мелкую посуду заворачивают в фильтровальную (пергаментную) бумагу или пищевую алюминиевую фольгу. При этом с банок снимают притертые крышки. Мензурки и мерные цилиндры большого объема закрывают колпаками из пергаментной бумаги или пищевой алюминиевой фольги, а колбы – ватно-марлевыми пробками. Подготовленные предметы размещают на полках сушильного шкафа, нагревают его до температуры 160–180°C и выдерживают в течение 45–60 мин. Затем шкаф выключают и после охлаждения по мере необходимости берут инструмент и посуду для использования.

Стерилизация в автоклавах. Надежным способом стерилизации спецодежды (полотенца, халаты, шапочки и косынки, фартуки, марлевые салфетки, вата), растворов, лабораторной посуды и инструмента является стерилизация паром под давлением – автоклавирование. Этот метод основан на том, что при кипении воды в герметически замкнутом приборе (автоклаве) повышается давление и температура пара. При этом температура кипения воды и давление находятся в определенной зависимости: при давлении 1, 1,2, 1,4 и 1,6 атм. температура кипения воды соответственно равна 99,1°C, 104,2°C, 108,7°C и 112,7°C. Высокая температура губительно действует на микроорганизмы и их споры. Инструмент, спецодежду, марлевые салфетки, вату упаковывают в биксы. Растворы и лабораторную посуду можно размещать непосредственно в стерилизационной камере. Горловину колб закрывают пергаментной бумагой.

Обеззараживание спиртом. Шприцы-катетеры (микро шприцы) для осеменения коров и овец можно обеззараживать путем промывания внутренней поверхности 70%-ным спиртом с последующим тщательным (5–6 раз) промыванием физиологическим раствором, 1%-ным раствором натрия гидрокарбоната или 2,9%-ным раствором натрия цитрата. Катетеры для извлечения зародышей из латексной резины полностью погружают в 96%-ный или 70%-ный спирт, а затем промывают средой Дюльбекко.

Изделия из пластмассы и резины можно стерилизовать путем погружения их в 0,5%-ный раствор хлорамина на сутки. После этого их

ополаскивают стерильной дистиллированной водой и физиологическим раствором.

Наружную поверхность стеклянного инструмента для осеменения самок, а также сухие стеклянные палочки, химические термометры, пластмассовые подставки, эбонитовые палочки для смазывания искусственных вагин вазелином, пинцеты, ножницы, скальпели и другое обеззараживают путем протирания тампонами, пропитанными 96%-ным спиртом. Отработанные спиртовые тампоны складывают в специальную баночку или тампонницу и используют затем для фламбирования инструментов.

Спиртом обеззараживают также отогретые вымытые сосуды Дьюара. Сухие внутренние стенки их протирают тампонами, пропитанными 96%-ным спиртом-ректификатом.

Стерилизация фламбированием (обжиганием). Этот способ применяется чаще в полевых условиях. Для стерилизации инструмент (влагалищные зеркала, ножницы, пинцеты, стеклянные палочки, подставки) проводят несколько раз над некопящим пламенем горящего спиртового тампона, спиртовки, паяльной лампы или газовой горелки. При этом стерилизуемые предметы постоянно поворачивают, медленно проводя через верхнюю часть языка пламени, где температура наиболее высокая, и обжигают (но не прокаливают) со всех сторон, чтобы была обеззаражена вся поверхность. Стеклянные предметы фламбируют осторожно: вначале обжигают над пламенем огня на расстоянии 15–20 см, а затем приближают к нему, равномерно обрабатывая со всех сторон.

Обеззараживание паром. Этот способ в практике искусственного осеменения используется крайне редко. Стерилизация проводится в аппарате Коха или при помощи парообразователя и только для обеззараживания внутренней поверхности стеклянных банок и колб, инструмента для искусственного осеменения свиней (вагины, спермоприемники, ампулы, зонды).

В парообразователь наливают на $\frac{3}{4}$ воду, закрывают его крышкой и нагревают до кипения на электроплитке или газовой плите. Образующийся пар поступает в резиновую трубку, присоединенную к патрубку крышки. Струю пара, выходящего из трубки, направляют на обеззараживаемый инструмент. По мере выкипания воды ее подливают в колбу через воронку, разжав зажим на резиновой трубке.

Продолжительность обеззараживания различных предметов (инструментов) неодинаково и зависит от их размеров, внешней температуры и силы струи пара. Обеззараживание проводят обычно в течение 3–5 мин с того момента, когда пар начинает выходить из обеззараживаемого прибора (пар вначале конденсируется на холодных стенках инструментов). Обработанные паром инструменты нужно промывать стерильным 1%-ным раствором бикарбоната натрия или 2,9%-ным рас-

твором лимоннокислого натрия, чтобы удалить с них оставшиеся капельки воды, которые могут неблагоприятно отразиться на качестве спермы.

Стерилизация вазелина. Белый или желтый вазелин используют для смазывания внутренней поверхности камер искусственных вагин, стилетов катетеров для извлечения зародышей, наружной поверхности ветвей влагалищного зеркала, рук или перчаток при вагинальном исследовании.

В стеклянную банку с притертой пробкой вазелин накладывают не слишком полно. Плотнo пробкой не закрывают, чтобы во время стерилизации она не прикипела к горловине или не лопнула банка; обычно пробку помещают в наклонном положении. На дно электрической водяной бани или кастрюли кладут сложенную в несколько слоев марлю (полотно, вату) и ставят на нее банку с вазелином. В баню (кастрюлю) наливают холодную или теплую воду так, чтобы уровень ее был несколько выше уровня вазелина в банке. Электрическую баню включают в сеть, а кастрюлю ставят на электрическую или газовую плиту. После начала кипения воды и расплавления вазелина обеззараживание его продолжают 20–30 мин. После этого банку извлекают из водяной бани и дают остыть, после чего плотно закрывают пробкой.

Если после расплавления вазелина на дне банки появляется осадок, верхний (чистый) слой вазелина переливают в другую банку и стерилизуют заново. Стерилизация вазелина должна проводиться ежедневно.

Контрольные вопросы

1. Какие растворы и материалы используются при проведении искусственного осеменения? Как их готовят?
2. Как готовят раствор натрия цитрата? Какую соль используют и в какой концентрации?
3. Какие методы стерилизации материалов, посуды и инструментов, применяемых для искусственного осеменения, можно использовать?
4. Какими методами можно стерилизовать инструменты многоразового пользования из полимерных материалов или резины?

Тема 9. ОСЕМЕНЕНИЕ САМОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Цель занятий: приобретение студентами практических навыков диагностики течки, половой охоты и овуляции и освоение техники осеменения самок сельскохозяйственных животных.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные в охоте – корова, кобыла, коза (овца), свинья; станки, случная шлейка, веревки для фиксации животных; половые органы убитых самок, му-

ляжи, рисунки, слайды; термоса или сосуды Дьюара с сохраняемой спермой; микроскопы, обогревательные столики, предметные и покровные стекла; дозаторы пипеточные (глазные пипетки) или стеклянные палочки; инструмент для осеменения (шприцы ШО-3, ШО-4 и чехлы полиэтиленовые к ним), перчатки полиэтиленовые; влагалищные зеркала с осветителем или специальные расширители; шприцы-катетеры, стеклянные баночки с физиологическим раствором и 70%-ным спиртом, спиртовые тампоны, сухие ватные тампоны; пипетки полистироловые одноразовые и полиэтиленовые шприцы с соединительной муфтой; катетеры и ампулы полиэтиленовые; микрошприцы для осеменения овец, шприц-полуавтомат; резиновый катетер с ампулой (шприцем) для осеменения кобыл; приборы УЗК-5 и ПОС-5; катетеры Melrose, фоамтипа и спиретта; металлические или пластмассовые подставки для инструмента; полотенце, вата серая и вата белая, марлевые и бумажные салфетки; пинцеты и корнцанг, ножницы прямые и Купера; раствор фурацилина, стрептоцид; мыло, кюветы, тазы, кружка Эсмарха, ведра.

Методические указания. Методы осеменения студенты осваивают в течение несколько занятий в акушерской (ветеринарной) клинике, в учебном пункте и на фермах. Сначала в клинике (в учебном пункте) студенты изучают технику искусственного осеменения самок различными способами на муляжах, рисунках, фантомах, животных; знакомятся с инструментом для осеменения и способами обеззараживания и подготовки его для использования. Затем студенты самостоятельно готовят инструмент и выполняют процедуру осеменения животного. При освоении способов осеменения коров под контролем преподавателя все студенты выполняют процедуру осеменения каждым из способов хотя бы на одном животном. На последующих занятиях студенты осваивают способы выявления животных в охоте и технику осеменения различными способами на фермах.

9.1. Осеменение коров и телок

Диагностика течки, половой охоты и овуляции. Процесс введения спермы в половые пути самки является последним, очень важным этапом метода искусственного осеменения. Сперма должна быть введена в наиболее подходящее место и в оптимальное время в период половой охоты, поэтому своевременному выявлению животных в охоте должно уделяться большое внимание. Знание признаков (внешних проявлений) половой охоты и ее продолжительности, а также правильный выбор метода выявления этих признаков имеют большое значение.

Половая охота проявляется в фазу эструс, когда хорошо выражены и другие феномены полового цикла – течка и половое возбуждение.

Длится охота 12–18 ч, хотя может быть более продолжительной или слишком кратковременной.

Течка – процесс выделения слизи из половых органов как следствие морфологических изменений в половом аппарате самки. Характеризуется гиперемией трубчатых половых органов, новообразованием и разрастанием секреторных клеток и желез слизистой оболочки яйцепроводов, рогов, тела и шейки матки.

Наиболее заметным изменениям подвергаются эпителиальные клетки передней части влагалища и секреторные клетки шейки матки. В середине цикла клетки влагалища варьируют от уплощенных до низких цилиндрических. В стадии проэструс происходит размножение и рост высоких цилиндрических слизеобразующих поверхностных клеток. В период эструса этот процесс усиливается, что приводит к сильному утолщению эпителия передней части влагалища. *За 12–24 ч до появления первых признаков охоты* начинается обильная секреция слизи из передней части влагалища и шейки матки. Количество слизи *увеличивается в течение охоты* и затем *постепенно уменьшается к четвертому дню после охоты*. В конце течки слизь содержит хлопья из лейкоцитов; максимальная лейкоцитарная инвазия слизистой оболочки влагалища наблюдается через 2–5 дней после охоты. Эластичность слизи варьирует, максимальная она – во время охоты. В связи с эластичностью изменяется и способность слизи к кристаллизации. Наиболее хорошо выражена кристаллизация во время охоты и в течение двух последующих дней, а в другое время отсутствует. Под микроскопом в мазках кристаллы слизи расположены в виде листка папоротника. Этот феномен (*арборизация*) так же, как количество и свойства слизи зависит от уровня эстрогенов. В начале охоты слизь клейкая, прозрачная, светлая, а к концу охоты становится более вязкой. Период яркого проявления охоты характеризуется наименьшей вязкостью слизи и максимальным понижением электрического сопротивления ее, а также максимальным увлажнением слизистой оболочки преддверия влагалища. Этот период совпадает с оптимальным временем осеменения. В конце охоты по мере возрастания вязкости слизи увеличивается и ее электрическое сопротивление. Электропроводность слизи можно контролировать с помощью специальных приборов.

Диагностируют течку осмотром наружных половых органов, влагалища, шейки матки, исследованием выделяющейся из половых органов слизи, клиническими и лабораторными методами.

В мазке-отпечатке с боковой стенки преддверия влагалища в фазу проэструс обнаруживаются малые и большие промежуточные эпителиальные клетки, эритроциты, иногда лейкоциты. В фазу эструс – преимущественно большие промежуточные эпителиальные клетки, безъядерные клетки или клетки вакуолизированные с небольшим пикнотическим ядром и эритроциты. Лейкоциты встречаются редко, только в

начале эструса, а в конце этой стадии доминируют безъядерные эпителиальные клетки. В фазу метэструса в мазке обнаруживается много лейкоцитов, исчезают безъядерные клетки, уменьшается число больших промежуточных клеток, появляются парабазальные клетки и малые промежуточные эпителиальные клетки, которые в последующем становятся вакуолизированными. При анэструсе в мазке преобладают парабазальные и малые промежуточные эпителиальные клетки.

Половое возбуждение (общая реакция) – изменение в поведении самки, возникающее в связи с созреванием фолликулов. Проявляется позднее течки и характеризуется ярко выраженной общей реакцией организма в виде беспокойства, отказа от корма, другими признаками. Самка проявляет "интерес" к самцу, может прыгать на него или других самок, но садку самца на себя не допускает.

Половая охота – строго специфическая, положительная сексуальная реакция самки на самца. Во время охоты самка стремится к самцу, принимает позу для полового акта, часто производит акт мочеиспускания, допускает садку и коитус. Половую охоту можно точно установить рефлексологическим методом, т.е., используя самца-пробника. Однако у коров и телок при контакте их с другими самками проявляются такие характерные для охоты признаки, которые позволяют практически безошибочно распознать ее. Знание этих признаков и умение их использовать помогают животноводам успешно организовать искусственное осеменение коров и телок без использования быков-пробников. Наиболее важными являются следующие признаки.

1. *Незадолго до начала охоты* корова обнюхивает и облизывает соседних коров, особенно их половые органы, а также подошедших близко людей. При этом спина впереди крестца выгибается, а затем сильно прогибается, хвост поднимается и опускается. Такое движение можно вызвать поглаживанием поясницы или прикосновением к вульве.

2. Слизистая оболочка преддверия влагалища припухшая, ярко розового или красного цвета, влажная и покрыта прозрачным секретом, который нередко вытекает из половой щели; поэтому пучок волос в нижнем углу вульвы всегда бывает влажным.

3. Постоянно переступает с ноги на ногу, находясь в группе коров, пытается приблизиться к другим животным в охоте (или не в охоте) и вспрыгнуть на них, иногда даже на человека.

4. *Корова в охоте* проявляет признаки общего возбуждения, чаще стоит; если кто-нибудь проходит сзади, она поднимает голову и провожает проходящего взглядом.

5. Глаза более живые, неподвижные и блестящие, зрачки расширены.

6. У некоторых коров охота сопровождается громким мычанием в течение нескольких часов или всего дня.

7. У многих животных наблюдается снижение удоя, но оно может пройти незамеченным; более обычным является затрудненное доение, так как корова задерживает молоко. Ослабевают деятельность рубца.

Если животные находятся в стаде, то признаки охоты выражены более отчетливо. Корова в охоте в 2–3 раза увеличивает двигательную активность (регистрируемую с помощью педометров), следует за другими животными и вспрыгивает на них, независимо от того, в охоте эти животные или нет. Наибольшая активность прыгать проявляется в конце проэструса, в эструс и в начале метэструса. Если замечено, что корова повторяет прыжки, то следует продолжить за ней наблюдение, так как возможно наступление охоты. Но этот признак не является определяющим. Он может наблюдаться и у животных, не находящихся в охоте.

8. Наиболее важным для выявления состояния охоты является поведение коровы в момент, когда на нее вспрыгивает другое животное: если она стоит спокойно или слегка уклоняется, то это указывает на наличие у нее охоты. В разгар охоты у коров проявляется, как правило, только такой типичный признак (*рефлекс неподвижности*) и лишь изредка – активный обнимательный рефлекс, но без совокупительных движений. В это время хорошо выражены и специфические изменения в наружных половых органах. Слизь вытекает в виде длинной вязкой нити, приклеивается к ягодицам и хвосту. Если животное лежало, то сзади его можно увидеть скопление мутноватой или голубоватого цвета слизи. У телок наблюдается и четкий подъем температуры во влагалище.

У животных с "тихой овуляцией" эти изменения также имеют место. Отмечается у них и возбужденное состояние, рев, попытки вспрыгивать на других коров. Но сами они не допускают садки других животных и не являются особо "привлекательными". При осеменении таких животных может произойти оплодотворение.

При контакте коровы в охоте с быком-пробником животные облизывают друг друга, после чего корова пытается вспрыгнуть на быка прежде, чем допускает садку сама. Если корова в охоте долгое время находилась в стаде, то вследствие садок других животных у нее стирается волос и появляются ссадины на корне хвоста и седалищных буграх. Эти признаки сохраняются 4–6 дней. Но если ссадины влажные с выделением экссудата или кожа болезненна и имеет повышенную температуру, то это говорит о том, что корова в охоте или охота только что прошла.

Иногда коровы в охоте следуют за другими коровами, с фырканьем обнюхивают их половые органы, опираются головой на поясницу, поднимают хвост и помахивают им. Нередко за такими коровами активно следуют другие животные.

После охоты (в течение 10 ч) у коров наблюдается выделение прозрачной слизи; в этот период животное не допускает на себя садку животных, хотя сама может делать садки на других животных.

Наблюдается повторяемость признаков проявления и длительности половых циклов у одного и того же животного в различные годы.

Для выявления охоты у коров целесообразно трехкратное в день наблюдение по 20–30 мин до раздачи корма во время их движения. При беспривязном содержании животные должны быть помечены бирками или ошейниками с хорошо заметными номерами. На крупных фермах наблюдение можно проводить с помощью телеустановок. Очень важное значение имеет степень освещенности помещений, особенно в осенне-зимнее время. В случае планирования сроков осеменения после отела (через 40–45 дней) и предоставления животным прогулок эффективно использование специальных детекторов (KaMaR), которые прикрепляются на крестце животного, а также пedomетров.

С целью более полного и своевременного выявления охоты у коров и определения оптимального времени их осеменения используют быков-пробников, а также специально подготовленных коров – выявительниц или натренированных собак.

Использование быков-пробников. Так как половая охота – строго специфическая реакция самки на самца, то ее можно достоверно определить с помощью пробника. Без пробника при регулярном визуальном наблюдении за стадом пропуски половой охоты у коров достигают 20% и более. Бык-пробник не только безошибочно выявляет охоту, но является мощным естественным стимулятором, способствующим своевременному и полноценному проявлению половой цикличности после родов. Быков-пробников используют с 13–14-месячного возраста для выявления охоты у тёлочек и с 15–16-месячного – у коров. К пробникам с низкой живой массой коровы иногда проявляют агрессивность; с помощью таких пробников пробуют коров на наличие охоты под контролем человека. До начала использования от вазэктомированного пробника необходимо дважды получить в искусственную вагину и проверить под микроскопом выделенный им секрет: если операция сделана правильно, сперматозоидов в секрете не будет.

Использование пробников эффективно при правильной организации работы с ними. Главным условием является непродолжительное пребывание пробников в загоне среди коров или тёлочек (утром и вечером не более 1.5–2 ч). С этой целью необходимо на каждой ферме иметь специальный загон, в который выпускают вместе с пробником коров после отела (за одну–две недели до планируемого осеменения), бесплодных коров, ремонтных тёлочек (с 15–16 мес), а также осеменённых коров и тёлочек (с 17-го по 25-й день после осеменения). В летний период пробу проводят в загоне перед выгоном животных на пастбище и после возвращения их с пастбы. Коров, у которых выявлена охота,

немедленно выводят из загона и осеменяют, а пробника оставляют для общения с другими самками.

Пробника нельзя оставлять постоянно в стаде, так как половая активность его будет снижаться. В зимний период быка-пробника выпускают на прогулку вместе с коровами утром или днём. Вечером пробника медленно проводят по проходу скотного двора. В плохую погоду вечернюю и утреннюю пробу на охоту проводят в коровнике.

В молочном комплексе на 800 коров при пункте осеменения содержат четырёх пробников и используют их попеременно (по два в день). Во всех случаях строго соблюдают принцип "дозированного" общения пробников с коровами и телками и постоянно контролируют их использование.

Способы осеменения. Для осеменения коров и телок применяют цервикальный метод осеменения, т.е. в шейку матки. Существуют три принципиально различающиеся по технике исполнения способа введения спермы в канал шейки: *визо-цервикальный*, *ректо-цервикальный* и *мано-цервикальный*. Независимо от способа введения спермы осеменение коров и телок должно проводиться на пункте или в подготовленном для этой цели помещении, где содержатся животные, с соблюдением технологических и ветеринарно-санитарных требований. При осеменении необходимо предупреждать болезненные и стрессовые реакции у животных, а также исключить возможность распространения инфекционных болезней. При маршрутно-кольцевом обслуживании нескольких пунктов оператор по искусственному осеменению может перевозить только сосуд со спермой. Другие необходимые инструменты и материалы должны быть на каждом пункте.

Перед осеменением животного специалист уточняет время, прошедшее после отела, или порядковый номер повторного осеменения; при необходимости знакомится с результатами акушерского и гинекологического исследования. Затем осматривает животное, его половые органы и выделяемую слизь. При наличии в слизи примесей гноя или крови животное не осеменяют и после осмотра его ветеринарным специалистом проводят соответствующее лечение.

После обследования животного оператор по искусственному осеменению снимает рабочий халат темного цвета, моет руки и надевает белый халат. Включает оттаиватель (биотермостат), чтобы температура воды достигла 38–40°C. Поверхность стола, покрытую полиэтиленовой пленкой или листом (40х60 см.) пластика, протирает спиртовым тампоном. Обрабатывает подставку для инструмента, пинцет, корнцанг, ножницы. Готовит инструмент для осеменения, оттаивает сперму и осеменяет животное одним из способов.

Визо-цервикальный способ осеменения – наиболее простой и доступный. Сущность его заключается в том, что во влагалище коровы или телки вводят теплое стерильное влагалищное зеркало, кото-

рое предварительно увлажняют теплым изотоническим раствором натрия хлорида или натрия гидрокарбоната. В момент введения зеркало держат левой рукой так, чтобы ветви его были плотно закрыты, а ручки обращены в сторону. Начальной частью ветвей делают движение сверху вниз между половыми губами и под небольшим углом вверх и затем вперед вводят его во влагалище до упора. После этого поворачивают зеркало ручками вниз и, надавливая на них, раскрывают зеркало. Во влагалище зеркало размещают так, чтобы можно было видеть отверстие шейки матки. При осеменении в недостаточно освещенном помещении к зеркалу присоединяют осветитель.

Затем инструмент для осеменения (шприц-катетер, полистироловую пипетку с присоединенным с помощью полиэтиленовой муфты пластмассовым шприцем или другой инструмент) вводят через зеркало в шейку матки на глубину 4–6 см и нажатием на поршень выдавливают сперму. Если сперма расфасована в соломинах, пользуются инструментом ШО-3 или ШО-4. Перед введением спермы зеркало несколько извлекают и уменьшают степень раскрытия влагалища.

Нередко используют металлическое зеркало с вырезом на верхней ветви. Изготавливают его из обычного инструмента. Для этого срезают правый край верхней ветви в виде полоски шириной от 11–12 мм в передней, до 55–60 мм в задней части ее. Кроме того, у основания зеркала делают дополнительный косой срез под углом 20–30°. Через такое зеркало шприц-катетер (или другой инструмент) обычным путем вводят в шейку матки. После этого катетер слегка прижимают к верхнему краю половой щели, а зеркало, повернув срезанной частью к шприцу, вынимают осторожно из влагалища. Через 20–30 с вводят сперму в шейку матки. В момент введения спермы снимаются болевые ощущения, связанные с нахождением во влагалище металлического инструмента, это способствует естественному проявлению сократительной функции матки, глубокому размещению спермы в канале шейки и повышению процента плодотворного осеменения.

В ряде стран вместо металлического влагалищного зеркала используют стеклянный расширитель.

Для асептического проведения осеменения этим способом необходимо животное зафиксировать в станке, подмыть теплой водой половые органы и вытереть салфеткой. Воду для подмывания наливают в полиэтиленовую бутылку емкостью 500–1000 мл, а в пробке делают одно или несколько отверстий. Такую бутылку можно поместить в карман халата. Влагалищное зеркало и шприц-катетер перед осеменением каждого животного необходимо обеззаразить одним из подходящих способов. Обычно зеркало (металлическое) стерилизуют кипячением в дистиллированной воде, а в полевых условиях – фламбированием; осветитель тщательно протирают спиртовым тампоном, шприц-катетер обеззараживают кипячением или 70%-ным спиртом.

Для обработки стеклянного шприца-катетера необходимы три баночки с притертыми пробками для физиологического раствора (баночки №№ 1, 3 и 4) и одна баночка (№ 2) для 70%-ного спирта. Кроме того, необходимы спиртовые тампоны и сухие ватные тампоны (в тампонницах), а также стерильные марлевые салфетки. Следует также иметь отдельную баночку для отработанного спирта, тампонницу для отработанных спиртовых тампонов, толстостенную чашку для отработанных растворов и специальную пластмассовую подставку.

Перед началом работы из шприца-катетера, сохраняемого с 70%-ным спиртом, удаляют спирт, протирают наружную поверхность катетера тампоном, смоченным 96%-ным спиртом, а затем промывают его раствором из баночек №3 и №4 по три–четыре раза из каждой. После последнего промывания инструмент поворачивают катетером вниз и, медленно двигая поршнем шприца, удаляют остатки раствора. Подготовленный инструмент опускают в ампулу с оттаянной спермой и, медленно оттягивая поршень вверх, набирают ее в шприц. Затем шприц поворачивают катетером вверх, несколько оттягивают поршень вниз, чтобы собрать сперму из катетера, после чего медленным движением поршня вытесняют воздух из шприца и катетера (до появления капельки спермы на кончике катетера). После осеменения животного катетер протирают сухим тампоном, промывают три–четыре раза из баночки № 1 физиологическим раствором, набирают 1–2 мл 70%-ного спирта и помещают на хранение до следующего осеменения.

В настоящее время визо-цервикальный способ осеменения коров используется редко. Инструментом для осеменения обычно служит полистироловая пипетка или металлический шприц для пайет.

Ректо-цервикальный способ – наиболее надежный из всех используемых в скотоводстве; заключается во введении инструмента для осеменения со спермой в шейку матки, которую фиксируют рукой через прямую кишку. Этот способ в одинаковой мере пригоден как для осеменения коров и телок, так и для пересадки зародышей реципиентам.

При использовании спермы, замороженной в гранулах, необходимо иметь одноразовые полистироловые пипетки, полиэтиленовый шприц с соединительной муфтой и полиэтиленовую перчатку. Для осеменения спермой в соломинах используют металлический шприц ШО-3 или ШО-4, поверх которого надевают защитный чехол. При использовании пайет Кассу необходимы соответствующие инструменты.

Оттаяв сперму в гранулах, оператор берет пакет с одноразовыми пипетками, протирает уголок спиртовым тампоном (со стороны незашлифованного конца пипетки) и ножницами делает небольшое отверстие. Выдвинув на одну треть длины пипетку, соединяет ее со шприцем. Затем извлекает пипетку полностью, отверстие в пакете зажимает скрепкой и после этого медленно набирает оттаянную сперму из ампу-

лы; сперма должна заполнить переднюю часть пипетки без столбика воздуха. Подготовленный инструмент оператор помещает в свободный стерильный пакет и кладет на стол.

После оттаивания спермы в соломинке оператор берет стерильный инструмент, поршень оттягивает примерно на 10 см и другой рукой вставляет соломинку до упора. Конец ее с пузырьком воздуха отрезает острыми ножницами перпендикулярно возле самого конца инструмента (соломина не должна выступать более чем на 1–2 мм). На инструмент надевает защитный одноразовый чехол, фиксирует его в замковом устройстве. Конец чехла изнутри должен плотно охватывать срезанную часть соломины и при надавливании на поршень сперма должна выходить через отверстие чехла и не попадать под чехол.

В защитных одноразовых чехлах для инструментов французского или немецкого производства имеется ползунок. При надевании на металлический инструмент со вставленной пайетой одноразового чехла ползунок смещается до конца чехла и плотно охватывает обрезанный конец пайеты. Это предотвращает попадание спермы между чехлом и пайетой.

Для осеменения этим способом (рис. 1) руку в перчатке вводят в задний участок прямой кишки животного. Затем несколько отодвигают ее назад и располагают так, чтобы большой палец разместился в области промежности выше угла половой щели, а остальные четыре пальца надавливали на нижнюю стенку прямой кишки впереди ануса. Это приводит к раскрытию половой щели. Подготовленный инструмент для осеменения (полистироловая пипетка, соединенная с помощью специальной муфты с полиэтиленовым шприцем; металлический инструмент всех типов с полипропиленовой соломинкой, зафиксированной в инструменте с помощью защитного чехла; специальный металлический инструмент для облицованных гранул) вводится в половые пути по верхней стенке преддверия влагалища вначале под углом 30–40°, чтобы не попасть в отверстие мочеиспускательного канала, а затем – горизонтально до упора в свод влагалища. Если инструмент упирается в складку стенки влагалища, необходимо осторожно рукой через стенку прямой кишки надавить на передний конец инструмента и продвинуть его вперед. Иногда это удается сделать только после отодвигания шейки матки вперед и распрямления верхней стенки влагалища. Можно инструмент для осеменения продвигать в половые пути раньше, чем будет введена рука в прямую кишку. Для этого одной рукой раскрывают половые губы, а другой инструмент направляют во влагалище по верхней стенке. Затем руку вводят в прямую кишку. Чтобы рука легче проходила через анальное отверстие, перчатку слегка намыливают или смазывают вазелином. Перед введением можно смазать и анальное отверстие.

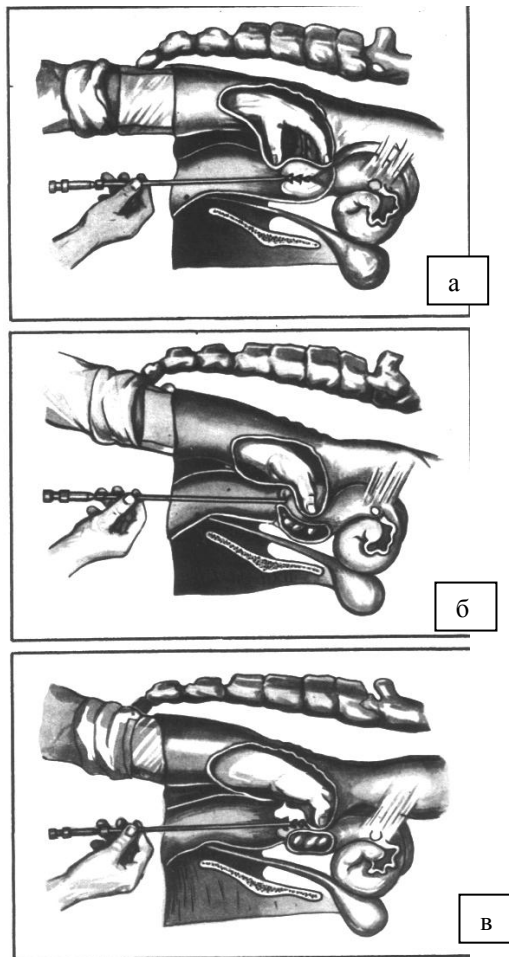


Рис.1. Введение инструмента в шейку матки коровы ректо-цервикальным способом.

Манипуляции по освобождению прямой кишки от каловых масс следует проводить тогда, когда сильно затруднено фиксирование шейки матки; введенный инструмент при этом оберегают от загрязнения. После полного введения инструмента во влагалище рукой через прямую кишку фиксируют шейку матки и направляют инструмент в канал шейки матки. Это наиболее трудная и ответственная операция.

Для начинающих осваивать этот способ можно рекомендовать два следующих приема.

Если по толщине шейка матки не слишком большая, то сначала необходимо отодвинуть и прижать ее к боковой стенке тазовой полости. При работе правой рукой прижимают шейку к левой стенке, а если левой, то к правой стенке. Затем полностью обхватывают заднюю часть шейки так, чтобы указательный, средний и безымянный пальцы размещались снизу шейки, а большой палец фиксировал ее сверху. Мизинец должен находиться сзади устья шейки матки и на нем располагают конец инструмента. Изменяя положение кисти руки с шейкой матки в сагиттальной плоскости, можно выбрать такой момент, когда кончик инструмента совпадет с наружным отверстием шейки, после чего его достаточно легко ввести в заднюю часть канала (рис. 1б).

Подталкивая инструмент вперед, руку в прямой кишке перемещают на переднюю часть шейки, фиксируют ее и, изменяя положение относительно инструмента в различных направлениях, "насаживают" на него полностью (рис. 1в). Когда пальцы ощутят инструмент через тонкую стенку тела матки, его несколько отодвигают назад и, надавливая на поршень шприца или толкатель других инструментов, медленно вводят сперму. Можно инструмент извлекать постепенно из канала шейки так, чтобы по крайней мере часть вводимой спермы осталась между складками шейки матки. Это способствует формированию первичного депо сперматозоидов. Более глубокое расположение такого депо, чем при естественном осеменении, позволяет уменьшить объем вводимой спермы и количество в ней подвижных сперматозоидов без снижения результатов осеменения.

Иногда диаметр шейки матки настолько велик, что трудно обхватить ее заднюю часть рукой. В этом случае четырьмя пальцами прижимают влагалищную часть шейки к лонным костям, а большим пальцем отыскивают наружное отверстие шейки и под контролем его направляют инструмент вперед (рис. 1а). После этого, манипулируя передней частью шейки матки, полностью вводят инструмент в канал шейки матки.

При ректо-цервикальном осеменении сперму можно ввести в половые пути на различную глубину. Наиболее рациональным является введение спермы в тело матки (рис. 2) при первом осеменении, а также при осеменении в стимулированную охоту, и в переднюю часть шейки матки при повторном осеменении.

Результативность ректо-цервикального способа осеменения коров и телок выше, чем других способов. При благоприятных условиях при первом осеменении после отела оплодотворяется 63–66% или более коров, т.е. столько же, сколько и после естественного осеменения.



Рис. 2. Положение кончика инструмента перед введением спермы.

Мано-цервикальный способ. Он применяется только для осеменения коров с достаточно широким половым каналом.

При осеменении mano-cervikal'nyy sposobom сперму вводят в канал шейки матки с помощью короткого полиэтиленового катетера с присоединенной к нему ампулой непосредственно рукой. На руку надевают стерильную полиэтиленовую перчатку. Для введения спермы в облицованных гранулах используется специальный инструмент – зоошприц, который состоит из цилиндрического корпуса, съемного фланца и толкателя.

Сначала готовят животное: фиксируют хвост, а наружные половые органы подмывают теплой водой (при необходимости с мылом) и дезинфицируют раствором фурацилина. Оператор по искусственному осеменению извлекает из упаковки полиэтиленовую ампулу, срезает колпачок наискось острым скальпелем или ножницами и соединяет ее с катетером. Затем набирает сперму, опять вкладывает в упаковку и кладет на подставку. На руку надевают полиэтиленовую перчатку, увлажняют ее 1%-ным раствором натрия хлорида или натрия гидрокарбоната и осторожно вводит во влагалище коровы. После нахождения влагалищной части шейки матки пальцами обхватывает ее и, поворачивая руку относительно продольной оси в одну и другую стороны, делает массаж (рис. 3).

Корова обычно успокаивается и до конца осеменения стоит неподвижно. Шейка матки и матка периодически сокращаются. В момент расслабления матка проявляет всасывающую функцию.

В это время техник, не вынимая кисти руки из влагалища, другой рукой подает подготовленный для осеменения инструмент и располагает его на ладони так, чтобы большой палец прижимал ампулу, а

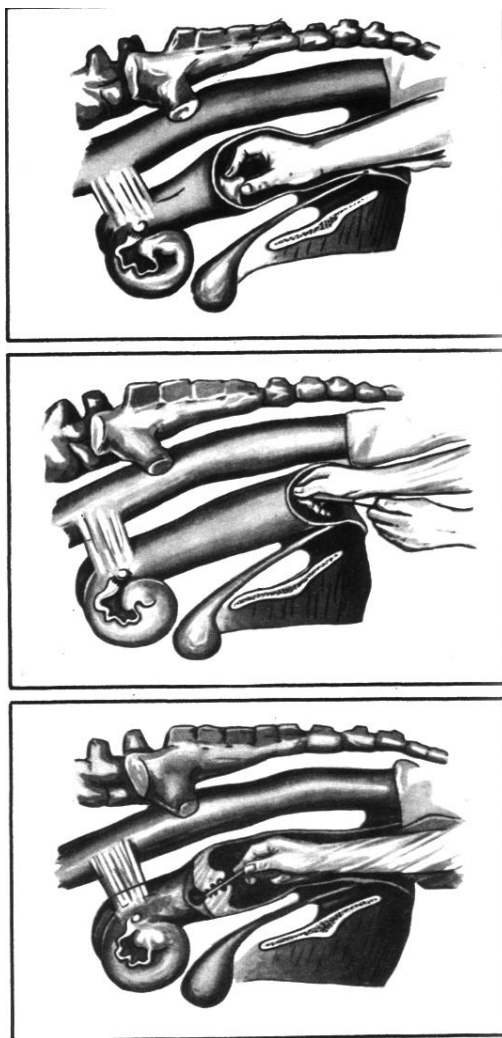


Рис. 3. Введение инструмента в шейку матки коровы
мано-цервикальным способом.

кончик катетера находился вблизи указательного пальца. Не меняя положения инструмента, вводит кисть руки до шейки матки и под контролем указательного пальца продвигает катетер на глубину 1,5–2 см

в цервикальный канал. Затем кончиками пальцев снова начинает массировать шейку матки, а ладонью подталкивает ампулу так, чтобы катетер вошел в канал на всю глубину (6–7 см). После этого ампулу приподнимает вверх на 2–3 см и выдавливает сперму из нее большим и указательным пальцами в момент расслабления матки. Чтобы сперма не оставалась, ампулу надо сжимать начиная с верхнего угла доньшка по направлению к шейке. После введения спермы ампулу не разжимают и вместе с катетером извлекают из канала шейки матки. Далее инструмент необходимо положить на дно влагалища и дополнительно массировать шейку матки и только после этого извлечь руку с инструментом из влагалища. Способ обеспечивают близкую к стандартной оплодотворяемость коров – 55–57%.

При использовании любого из трех способов наилучшие результаты получают при осеменении коров через 9–16 ч после начала охоты. Подходящее время и в период между 6 и 9 ч, а также с 16 до 28 ч. Если время начала охоты неизвестно, животное осеменяют немедленно; затем осматривают через 10–12 ч и при сохранении признаков охоты – осеменяют повторно. При длительно протекающей охоте животное следует тщательно исследовать ректально и при отсутствии патологии яичников осеменять третий раз.

Контрольные вопросы

1. Как проявляется течка у коров, какова ее продолжительность? Какими способами выявляют течку?

2. Какие изменения в наружных половых органах, во влагалище и в матке происходят в период течки и охоты? Какое состояние этих органов в середине полового цикла?

3. Как проявляется половая охота у коров? Какие признаки наблюдаются до начала охоты, во время охоты и после окончания ее? Какова продолжительность охоты?

4. Каковы способы и режим выявления половой охоты?

5. Когда происходит у коров овуляция относительно половой охоты? Как определить, что овуляция произошла? В какой период охоты осеменяют коров? Почему?

6. Как используют быков-пробников для выявления коров в охоте?

8. Какие способы искусственного осеменения коров и телок применяют в практике? Какой из них наиболее эффективен?

9. Как подготовить животное для осеменения.

10. Как подготовить инструмент для осеменения коровы спермой, расфасованной в соломинах?

11. Как подготовить инструмент для осеменения коровы спермой, расфасованной в гранулах?

12. Как подготовить влагалищное зеркало (расширитель) и инструмент для осеменения коровы визо-цервикальным способом?

13. Какой объем спермы необходим для осеменения коровы? Сколько подвижных сперматозоидов должно содержаться в одной дозе для осеменения?

14. В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении? Кратность осеменения коровы в течение охоты?

15. Как стерилизуют инструмент для осеменения? Как утилизируют инструмент для одноразового использования?

9.2. Осеменение овец

Диагностика течки, половой охоты и овуляции. *Течка* у овец не продолжительна, и обнаружить ее трудно. Проявляется гиперемией слизистых оболочек, увеличением числа слоев влагалищного эпителия и ороговением поверхностных клеток, иногда точечными кровоизлияниями, повышением тонуса мускулатуры матки, усилением секреции слизи клетками шейки матки. Слизь в начале охоты прозрачная, слегка опалесцирующая, затем становится более мутной и в конце охоты приобретает салообразную консистенцию.

Половая охота у овец проявляется не так ярко, как у других видов, и определить ее у большинства животных без барана-пробника практически невозможно. Она сопровождается выделением специфических пахучих веществ – аттрактантов (*феромонов*), которые легко воспринимаются самцами, и продолжается 36–38 ч (от 12 до 72 ч).

Овцы в охоте стучат копытами, помахивают хвостом, стремятся приблизиться к производителю, иногда группой ходят за бараном. Овца считается в охоте, если допускает садку барана.

У коз много общего с овцами в проявлении половой функции. Однако половая цикличность нередко нерегулярная, продолжительность цикла составляет 19–21 день, хотя возможны и более короткие циклы (5–9 дней). Охота длится 22–33 ч; овуляция наступает через 27–34 ч после начала охоты.

Для выявления охоты у овец используют баранов-пробников. Чтобы баран не мог осеменить овцу, а только выявил охоту, ему подвязывают на живот фартук из плотного материала, длиной 60 см и шириной 40 см. Иногда делают вазэктомию. На 80–100 овцематок готовят одного пробника. Обычно используют молодых, энергичных баранов. Если баран не вазэктотомирован, то племенная ценность его должна быть не ниже I класса. Перед началом работы как интактным, так и вазэктотомированным баранам подвязывают под брюхо фартуки для предотвращения коитуса. Чтобы облегчить процесс выборки овец в охоте, пробникам прикрепляют в области груди красящие метчики. Делая садку на овец, бараны окрашивают их с помощью таких устройств. Ес-

ли вазектомированным баранам не подвязывать фартуки, то у них торможение половых рефлексов возникает не так быстро и проявляется не так часто, как у баранов с фартуками. Более того, многократный коитус усиливает сократительную функцию матки у овец и ускоряет овуляцию, что позволяет ограничиться однократным осеменением взамен обычного двукратного. На протяжении полового сезона для поддержания половой активности интактным баранам-пробникам позволяют в неделю сделать одну садку на матку в охоте или же от него получают в искусственную вагину один-два эякулята.

Выбирают овец в охоте один раз (иногда два раза) в сутки, обычно утром. Для проведения выборки в первые 8–10 дней загон (баз) разделяют на две части. Пробников используют поочередно, по группам. Матку считают в охоте, если она не убегает при вскакивании на нее барана, а стоит спокойно. Таких маток вылавливают и помещают в станки из переносных щитов, которые размещают по углам загона. Когда поголовье не проявивших охоту овец уменьшится, выборку проводят в одном загоне, но площадь его постепенно ограничивают переносными щитами по мере перевода овец в группу осеменения. При выборке надо следить, чтобы овцы в загоне не собирались группами, а были распределены в нем равномерно. По завершении выборки баранов-пробников удаляют из отары, а маток выпускают на пастбище. Овец в охоте перегоняют на пункт осеменения, где осеменяют и содержат отдельно до следующего утра, а после выборки животных с продолжающейся охотой соединяют с ранее осемененными овцами. Из них формируют отдельную отару. С 10-го дня после начала искусственного осеменения организуют выявление овец, проявляющих половую охоту повторно. После осеменения маток метят специальной краской "Овцевод". Среди осемененных коз выборку животных в охоте начинают с 5-го дня от начала осеменения.

Способы и техника осеменения. При осеменении овец и коз применяют влагалищный и цервикальный методы. Яркам и переяркам из-за узости преддверия влагалища сперму вводят без применения влагалищного зеркала во влагалище (парацервикально). Для взрослых маток наиболее подходящим является цервикальный метод. При обоих методах для введения спермы используют стеклянный шприц-катетер (микрошприц) с дозирующим приспособлением, шприц-полуавтомат, металлический шприц для микропайет.

При влагалищном методе осеменения катетер вводят по верхней стенке преддверия влагалища и влагалища до упора, затем отводят назад примерно на 1 см и выталкивают сперму, надавливая пальцем на поршень. Если влагалищное осеменение практикуют часто, то изготавливают укороченный шприц-катетер. Для этого в обычном инструменте обрезают тонкую изогнутую конечную часть катетера, а место среза шлифуют или оплавливают на пламени. Объем вводимой

во влагалище неразбавленной спермы 0,15–0,20 мл, разбавленной и сохраняемой при 2–5°C – 0,2 мл и замороженной спермы (в гранулах) – 0,4 мл. В дозе должно содержаться 125 – 150 млн. подвижных сперматозоидов.

При цервикальном методе используют влагалищный расширитель с продольной прорезью сверху или металлическое влагалищное зеркало. Инструмент, обеззараженный и подогретый (металлическое зеркало), увлажняют 1%-ным раствором натрия хлорида и вводят во влагалище. После отыскания шейки матки кончик шприца-катетера направляют в канал шейки и вводят на максимальную глубину (1–3 см). Чтобы сперма не вытекала из влагалища, перед нажатием на поршень зеркало слегка оттягивают назад. При пользовании влагалищным расширителем перед введением спермы сначала извлекают расширитель, после чего, осторожно надавливая на поршень шприца, вводят необходимое количество спермы. При цервикальном осеменении вводят самке неразбавленной спермы 0,05 мл, разбавленной и охлажденной до 2–5°C – 0,1–0,15 мл и замороженной спермы (в гранулах) – 0,2 мл. Если не удастся ввести инструмент в канал шейки матки, то сперму выдавливают на наружную часть шейки, увеличивая при этом дозу вдвое.

Если замораживают сперму в микропайетах, то используют для осеменения маток специальный металлический инструмент с одноразовыми полиэтиленовыми чехлами.

Перед осеменением каждой овцы катетер аккуратно обтирают тампоном, пропитанным 70%-ным спиртом, оберегая кончик инструмента от попадания в него спирта. После осеменения 3–4 овец необходимо капельку спермы из шприца нанести на предметное стекло, накрыть покровным и определить подвижность сперматозоидов. Если подвижность их резко понизилась, то эту сперму не используют.

После расходования всего эякулята микрошприц промывают физиологическим раствором, а затем обеззараживают 70%-ным спиртом. Перед тем, как набрать новую порцию спермы от другого барана, микрошприц 4–5 раз промывают физиологическим раствором из других баночек. Влагалищное зеркало после осеменения каждой овцы моют горячей водой, насухо вытирают полотенцем и обеззараживают на огне с некоптящим пламенем.

Осеменяют овец в манеже пункта искусственного осеменения. Для фиксации животных устанавливают станок. Размещают его напротив окна или осветительной лампы. Маток поочередно фиксируют в станке или конвейерной установке для подачи их в манеж к рабочему месту оператора по искусственному осеменению. Во многих хозяйствах комната-манеж располагается в кошаре и проемом в стенке сообщается с другим, не отапливаемым помещением, куда загоня-

ют маток в охоте. В этом помещении имеется станок для фиксации овец. Осеменение их проводят через проем.

При осеменении в теплое время года нередко организуют временный (передвижной) пункт на пастбище. Осеменяют овец в загоне летнего лагеря. Обычно такой пункт работает с приобретаемой в племпредприятии спермой (замороженной или охлажденной до 2–5°C).

Оптимальным временем для осеменения овец является период в пределах 9–12 ч после начала охоты. Обычно же осеменяют овец дважды: первый раз сразу после выборки в охоте, второй раз спустя 8–10 ч. Маток с продолжительной охотой осеменяют и третий раз. Второе осеменение через 24 ч допускается при использовании свежеполученной спермы высокого качества.

Осеменение овец сезонное: при планировании ягнения в январе осеменение маток проводят в августе, а при ягнении в феврале – осеменяют их в сентябре. Благоприятные условия осени способствуют повышению плодовитости по сравнению с другими периодами на 15–20%. Осеменение проводят на протяжении двух половых циклов (35–40 дней). По окончании работы пункта организуют вольную случку маток, не оплодотворившихся после искусственного осеменения. В племенных хозяйствах для этой цели в течение 15–25 дней используются бараны, по качеству не уступающие основным, а в других хозяйствах – не ниже 1 класса.

Осеменение коз проводят в сентябре – ноябре.

Контрольные вопросы

1. Как проявляется течка и половая охота у овец, какова их продолжительность? Какими способами выявляют охоту?
2. Как используют баранов-пробников для выявления овец в охоте?
3. Какие способы искусственного осеменения овцематок и ярок применяют в практике? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?
4. В какой период охоты осеменяют овец? Кратность осеменения в одну охоту?
5. Как готовятся микрошприц или шприц-полуавтомат для осеменения овец?
6. Какой объем спермы свежеполученной, разбавленной и сохраняемой при температуре 0–4°C или минус 196°C необходим для осеменения овцы? Сколько подвижных сперматозоидов должно содержаться в одной дозе для осеменения?
7. В какой период года проводится осеменение овец? Какова продолжительность периода осеменения?

9.3. Осеменение свиной

Диагностика течки, половой охоты и овуляции. У свиной в период созревания фолликулов вульва (петля) набухает и приобретает красный цвет, слизистая оболочка влагалища становится отечной, розоватого или ярко-красного цвета. Из половой щели может выделяться слизь. В начале охоты слизь светлая, а к концу охоты беловатая. Выделяется слизи немного. Четкие изменения вульвы в период эструса наблюдают только у 75% самок. Набухание и покраснение ее редко сохраняется до конца охоты и обычно исчезает во время спаривания или ранее.

За 3–12 ч до наступления стадии эструса происходят изменения в поведении свиной. Она становится беспокойной, часто мочится, издает характерное хрюканье, мало ест, обнюхивает половые органы других животных, вспрыгивает на них и может позволять делать садку на себя другим свиным, пытается выбраться из станка. Некоторые самки активно преследуют хряков за день до наступления эструса. В этой стадии явления течки и охоты усиливаются.

Характерным признаком половой охоты (готовности свиной к спариванию с самцом) является неподвижность. В присутствии самца она настораживает уши, выгибает дугой спину и застывает в такой позе. Если в это время положить ей на крестец руку или сесть верхом, то она не уклоняется, а продолжает стоять спокойно. Но без хрюка такая реакция наблюдается только у половины животных.

Главными раздражителями рефлекса неподвижности являются обонятельные и слуховые. Внешний вид самца тоже имеет значение. Но наблюдения показывают, что если самка не видит хрюка, но слышит хрюканье и воспринимает его запах, то влечение к нему ослабляется незначительно. Записанное на магнитофон хрюканье хрюка вызывает рефлекс неподвижности более чем у половины свинок, которые не проявляли рефлекса без хрюка. Очень сильные и обонятельные раздражители. Свыше 60% свинок в охоте, которые не реагируют на надавливание рукой, проявляют неподвижность при переводе их в станок хрюка. Запах жидкости, взятой из препуция хрюка и подогретой до температуры тела, дает такой же эффект, как и запах самого хрюка. Реакция зависит от стероидного вещества, вырабатываемого в препуции и придающего характерный запах свиной. Оно синтезировано и используется при выявлении охоты (препараты суидор, феромаксеин и др.). Достаточно 0,1–1 мг такого вещества смешать со 100 г инертного вещества и распылить или разбрызгать в виде жидкости (аэрозоли) в свинарнике, чтобы стимулировать половую активность у свиноматок в охоте. Спустя 1–2 мин после применения его более половины свиной в охоте, у которых не были замечены ее признаки, проявляют рефлекс неподвижности и без хрюка.

Использование хряков-пробников. Наиболее точный способ выявления охоты у свиней – это использование хряка-пробника в группе из 4–8 самок. Целесообразно помещать в станок первым хряка, чтобы он привык к окружающей обстановке, а затем вводить маток. Если хряк обладает хорошей половой активностью, то бывает достаточно 5-минутного контакта с каждой самкой. Так как коитус у свиней длится долго, то можно использовать хряков без какого-либо хирургического вмешательства. После садки хряка можно столкнуть с матки. Надежно использование и вазэктомированных хряков.

При выявлении охоты у свиней животноводы должны учитывать и такие признаки, как повышенную возбудимость, потерю аппетита, характерное хрюканье, припухание и покраснение вульвы и др. Отдельно взятый признак не является надежным показателем охоты, но по их совокупности опытный работник, знающий всех животных индивидуально, легко может определить самок в охоте.

Способы осеменения свиней. При искусственном осеменении свиней сперма вводится в матку. В практике применяется два способа осеменения: фракционный и нефракционный. При обоих способах используется разбавленная сперма с содержанием подвижных сперматозоидов в 1 мл 30–50 миллион, но объем вводимой спермы различный.

При фракционном способе сначала вводится разбавленная сперма в объеме 50 мл взрослым маткам и 40 мл молодым свинкам, а затем глюкозо-солевой раствор (1 л дистиллированной воды, 30 г глюкозы и 4,5 г натрия хлорида) соответственно 100 мл и 70–80 мл. Для осеменения используются универсальный термос-прибор, универсальный зонд УЗК-5 и упрощенный зонд УЗК-6.

Универсальный термос-прибор приспособлен для осеменения свиноматок и переноски спермы на ферме. Состоит из деревянного футляра, металлических колонок с горячей водой (обогревательного бачка), трех стеклянных ампул, спиртовки для сухого спирта, катетера (зонда), шаров Ричардсона, резиновых трубок, зажимов и термометра. Зонд состоит из двух частей: одна изготовлена из металлической нержавеющей трубки длиной 25 см, другая присоединяется к первой при помощи винтовой резьбы и представляет собой спираль из никелированной проволоки. Внутри металлической трубки и спирали вставляется резиновая трубка, задний свободный конец которой служит для соединения зонда с ампулами прибора. На конец металлической спирали плотно надевается резиновая головка зонда диаметром 20 мм. К заднему концу зонда прикрепляется ручка. Другая модель зонда представляет собой металлическую трубку длиной 55 см без спирали.

В комплект более современного, широко используемого прибора УЗК-5 входит один полужесткий металлический катетер (зонд) с резиновой головкой и 10 пластмассовых катетеров в пластмассовых

чехлах. В предохранительный колпак прибора помещается два флакона: один с разбавленной спермой, а другой – с глюкозо-солевым раствором. Стекланные флаконы изготавливаются специально для прибора, но нередко их заменяют бутылочками для молочного питания детей или пластмассовыми флаконами из прибора ВИЖ. Содержимое флаконов выдавливается путем нагнетания в них воздуха при помощи шаров Ричардсона. В вариантах 2 и 3 прибора нет защитного колпака. К прибору прилагается термос-ящик для флаконов со спермой и раствором.

В упрощенном приборе УЗК-6 зонд состоит из прозрачной пластмассовой трубки длиной 40 см; на одном конце ее укрепляется резиновая головка диаметром около 20 мм, а на втором – резиновая ручка. В трубку-зонд вмещается до 50 мл спермы. Раствор (вторая фракция) находится в пластмассовом гофрированном флаконе, который присоединяется к резиновой ручке зонда при помощи специального наконечника. При сжатии флакона раствор через резиновую ручку поступает в зонд, надавливает на поршень и проталкивает содержащуюся там сперму. В конце зонда поршень неплотно прилегает к внутренним стенкам и способен пропускать вокруг себя раствор из гофрированного флакона. Через 20–30 с после введения спермы и раствора в матку животного извлекают зонд и удаляют остатки раствора.

Фракционный способ в Беларуси не применяется.

При нефракционном способе осеменения разбавленную сперму вводят за один прием. Доза спермы – 100–150 мл. Для введения спермы применяют приборы УЗК-5 или конструкции ВИЖ и ПОС-5. Два последних прибора состоят из полиэтиленовых тонкостенных флаконов, емкостью 100–150 мл с навинчивающимися крышками и катетеров с соединительными муфтами. Разница между ними состоит в том, что флаконы прибора ВИЖ плоскодонные, а флаконы от прибора ПОС-5 с округлым дном и имеют грубую градуировку (цена деления 25 мл).

В функционирующих и стоящих станциях по искусственному осеменению свиней предусмотрено использование технологии и инструментов фирмы МИНИТЮБ или IMV. Сперму расфасовывают в флекситюбики, бутылочки, полиэтиленовые мешки (пакеты). Соответственно к ним приспособлены катетеры Melrose, фоамтипа и спиретта (рис. 4). Имеется и специальное оборудование для их стерилизации.

Стерильные катетеры хранятся в полиэтиленовых чехлах. Перед осеменением ножницами отрезают часть чехла и извлекают конец катетера с соединительной муфтой и навинчивают на флакон вместо крышки. Чехол оставляют на катетере до момента введения в половые пути самки.

Маток в охоте перегоняют в манеж для осеменения и размещают в индивидуальных станках. Однако более удобно и надежно фиксиро-

вать животных во время осеменения в специальном устройстве. Такое устройство похоже на обычную клетку для взвешивания животного, но оборудовано лямками, которые не позволяют свиноматке лечь.

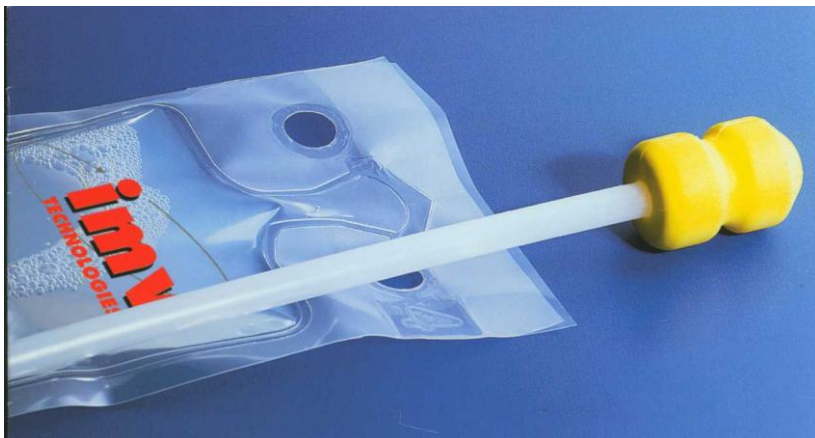


Рис. 8. Технология осеменения свиней IMV.
Катетер фоамтипа и заполненный спермой мешок.

Если манеж не оборудован станками или устройствами для фиксации, тогда осеменяют животных в станках, где их содержат. Однако это менее желательно, так как практически невозможно обеспечить необходимые санитарно-гигиенические условия в момент осеменения и надежно зафиксировать животное. Хотя свиньи в охоте проявляют состояние неподвижности, большинство из них (особенно молодые) не стоят во время осеменения, пытаются двигаться, и это создает трудности для удержания оператором по искусственному осеменению катетера в нормальном положении.

Перед осеменением наружные половые органы матки обрабатывают ватным тампоном, смоченным лигнином или раствором фурацилина 1:5000. При сильном загрязнении половые органы сначала обмывают теплой водой или 1–2%-ным раствором натрия гидрокарбоната, а затем дезинфицирующим раствором. После этого усиливают состояние неподвижности матки надавливанием на крестец рукой или левым плечом, в то время как другой раздвигают половую щель и вводят в нее катетер. При осеменении крупных свиноматок техник может сесть на заднюю часть туловища животного спиной к его голове. Присутствие в момент осеменения вблизи матки хрюка усиливает проявление неподвижности. Катетер продвигают по верхней стенке влагалища до

упора в шейку матки. В период половой охоты складки (выросты) шейки матки значительно расходятся и катетер с суживающегося кпереди влагалища может проскочить один-два "замка" шейки. Легче это происходит, если на конце катетера имеется утолщение в виде головки или оливообразное расширение, баллончик для воздуха, или же если конец сделан в форме полового члена хряка. При прохождении сначала первой, а затем второй складки ощущается небольшое сопротивление; слегка подталкивая катетер вперед, удается преодолеть его. Расширение на конце катетера предупреждает вытекание спермы. Катетер со спиралевидным концом одновременно продвигают и вращают в левую сторону до столкновения со складками шейки матки. У молодых маток кончик катетера может упираться в начало цервикального канала.

После введения катетера в половые пути матки флакон со спермой приподнимают выше спины животного, переворачивают его вверх дном и, слегка нажимая рукой, начинают вводить сперму. Можно емкость со спермой после введения катетера укреплять в верхнем положении при помощи покровного пояса или покровной рамы (рис. 5). Это позволяет специалисту одновременно осеменять несколько маток.

При фракционном способе осеменения после введения катетера до упора в шейку матки техник открывает зажим флакона со спермой



Рис. 4. Покровный пояс

и начинает нагнетать во флакон воздух. Если канал шейки матки открыт, то сперма будет поступать в матку и уровень ее во флаконе заметно понизится. После введения дозы спермы (половина стеклянного флакона) техник закрывает этот зажим, одновременно открывает зажим другого флакона и вводит необходимое количество раствора. Сперму и раствор необходимо вводить медленно. У взрослых свиноматок благодаря интенсивным всасывающим движениям матки сперма часто поступает самотеком через открытый канал шейки матки, но у молодых свинок это бывает реже. При осеменении в оптимальное время для введения спермы требуется 3–4 мин. Если канал шейки закрывается, то сперма начинает вытекать из влагалища. В этом случае давление на флакон (или давление воздуха) уменьшают, выжидают 10–20 с (иногда до 40 с), пока опять канал не расслабится, а затем продолжают введение.

Перед осеменением сперму, сохраняемую при 17–18°C, помещают в водяную баню (30–35°C) не менее чем на 10 минут. За это время емкость со спермой переворачивают несколько раз для того, чтобы сперма подогревалась равномерно. Неподогретая сперма, введенная в половые пути свиноматок, часто выталкивается обратно. Одновременно подогревают не более 5 доз спермы, чтобы использовать ее в течение получаса.

Время осеменения свиноматок. Осеменяют маток обычно в первую охоту после отъема поросят. Кормление подсосных маток должно быть полноценным, чтобы к этому моменту они имели хорошую упитанность и в течение последующих 4–7 дней проявили половую охоту. Маток слабо упитанных выделяют в отдельную группу, улучшают кормление. Не проявившим охоту в течение 8 дней маткам вводят ПГ-600. Половая охота у свиней длится 40–60 ч, а овуляция происходит через 30–36 ч после начала охоты. Продолжается овуляция не более 4–7 ч. Введенные в половые пути свиньи сперматозоиды сохраняют способность к оплодотворению не более 30 ч. Поэтому оптимальным временем для осеменения считается интервал в пределах от 12 до 16 ч перед овуляцией. Но это при условии использования свежеполученной спермы. Когда же осеменение проводится разбавленной или оттаянной после замораживания спермой, то оптимальное время для осеменения будет несколько ближе к овуляции – за 6–8 ч до нее. Обычно же при определении оптимального времени осеменения исходят не из срока овуляции, а из времени начала проявления рефлекса неподвижности. Наилучшим сроком для осеменения взрослых маток является конец первых и начало вторых суток, а для молодых – после 30 ч от начала половой охоты.

В практических условиях время осеменения определяется кратностью выборки животных в охоте. При четырехкратном контроле молодых свинок можно осеменять в течение 17–18 ч, а свиноматок – в

течение 21–24 ч после определения состояния неподвижности. Если выборка проводится два раза в день (с промежутком в 10–12 ч), то требуется двукратное осеменение: после выборки свиноматок в охоте утром осеменение их проводят вечером, а после вечерней выборки – утром следующего дня. Второй раз животных осеменяют, как правило, через 10–12 ч после первого осеменения. Молодых свиноматок, выбранных утром, можно осеменять через 2–5 ч повторно на другой день утром. Так поступают и при однократной выборке охоты у свиней. Если половая охота длится более 10 ч после повторного осеменения, то свиноматку целесообразно осеменить еще один раз.

Контрольные вопросы

1. В какой степени выражены изменения вульвы у свиней в период течки? Как долго они сохраняются?

3. Как проявляется половая охота? Какие признаки наблюдаются до начала охоты и во время охоты? Какова ее продолжительность?

4. Когда происходит у свиней овуляция относительно охоты? В какой период охоты их осеменяют? Кратность осеменения?

5. Способы и режим выявления половой охоты?

6. Как используют хряков-пробников (искусственных пробников) для выявления свиней в охоте?

7. Как подготовить свиноматку для осеменения? Где проводится осеменение, нужна ли фиксация животного?

8. *Какие способы искусственного осеменения свиней применяют в практике? Какой необходим инструмент? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?*

9. *При какой температуре и как долго хранится разбавленная сперма хряков?*

10. *Как стерилизуется инструмент для осеменения? Что делают с использованным инструментом?*

9.4. Осеменение кобыл

Диагностика течки, половой охоты и овуляции. После выжеребки половая цикличность возобновляется с 8–10-го дня (от 5 до 14 дней). Первая охота короче – 2–4 дня, а последующем длится в среднем 5–6 дней.

В стадии эструса вследствие гормонального влияния яичников усиливаются кровоснабжение и гиперемия половых органов, канал шейки матки приоткрывается и в него можно ввести сначала один, а затем и два пальца. Шейка матки укорачивается по длине и принимает по отношению к влагалищу центральное положение. Количество слизи увеличивается, она становится более водянистой и прозрачной. К

концу этой стадии слизь приобретает мутноватый цвет и вязкую консистенцию.

Признаки охоты хорошо выражены, вульва набухает, отмечается мигание половой щели. При этом кобыла открывает и закрывает половую щель, поднимает хвост, выпячивает клитор и испускает небольшое количество мочи и слизи. Во время охоты кобылы сильно возбуждены, непослушны, щекотливы, часто ржут. Услышав или увидев жеребца, они принимают позу для спаривания. Во время садки жеребца стоят спокойно.

На протяжении всего этого периода степень проявления признаков охоты прогрессирующе увеличивается. Поэтому различают несколько степеней охоты. *Охота первой степени*: при приближении жеребца кобыла стоит спокойно, однако не проявляет других признаков. *Охота второй степени*: кобыла допускает жеребца, поднимает хвост, отмечается мигание половой щели. *Охота третьей степени*: те же признаки и выделение мочи и слизи в момент мигания половой щели. *Охота четвертой степени*: в дополнение к перечисленным признакам – при обнюхивании жеребцом кобыла клонится в его сторону, раскидывает тазовые конечности, во время садки стоит спокойно.

По мере нарастания признаков охоты в яичниках происходит созревание фолликулов. Ректальной пальпацией можно определить степень их зрелости. *Вначале созревания* фолликула (диаметр 1–1,5 см) яичник принимает форму неправильного боба за счет увеличения одной его стороны; эта часть проявляет признаки незначительного размягчения. *Созревающий* фолликул приводит к увеличению яичника и изменению его формы до грушевидной; в самом фолликуле заметна флюктуация жидкости. *Почти зрелый* фолликул шарообразный, хорошо флюктуирует и придает яичнику явную грушевидную форму. *Полностью созревший* фолликул имеет форму шара, стенки его истончены, флюктуация легко ощущается. *При овуляции* напряженность стенок фолликула ослабевает, уменьшается его размер и изменяется форма. После окончания овуляции сильно уменьшается в размерах и яичник. Происходит овуляция примерно за одни–два суток до окончания охоты.

В период осеменения необходимо у всех кобыл охоту выявлять не реже, чем через день, но лучше ежедневно, чтобы не пропустить тех животных, у которых она продолжается всего 2–3 дня. Для выявления охоты используют жеребца-пробника. Пробу проводят под контролем человека. Для этого раскованную на задние конечности кобылу выводят в открытый двор, держат ее под уздцы. Пробника (не имеющего племенной ценности здорового энергичного жеребца) подводят на двух длинных поводках к кобыле спереди. Если кобыла стоит спокойно, то пробника постепенно допускают к паху, а затем и к крупу кобылы. При отсутствии охоты кобыла уже при первом контакте с жереб-

цом проявляет агрессивность, поворачивается быстро к нему задом и стремится его ударить ("отбивает"). Кобыла в охоте проявляет характерные признаки, соответствующие степени охоты.

Пробу подсосных кобыл целесообразнее проводить через деревянный барьер длиной 2,5 м и высотой 1,2–1,3 м. Жеребца ставят с одной стороны барьера, а кобылу – с другой.

Для выявления половой охоты без жеребца-пробника используют акустические (звуковое подражание заигрывания жеребца) и тактильные стимулы (пальпация области холки, боков и половых органов). Они позволяют определить состояние эструса (спокойное поведение, поднятие хвоста, мигание половой щели и выделение слизи, раскидывание задних конечностей) или диэструса (нервозность, лягание и ржание).

Оптимальное время осеменения. После выявления признаков охоты проверку продолжают ежедневно, чтобы определить оптимальное время осеменения. Осеменяют первый раз кобыл при ярком проявлении признаков охоты (3 и 4-я степени) и затем повторяют осеменение через каждые 36–48 ч до затухания признаков охоты. Такие длительные промежутки между осеменением возможны благодаря тому, что сперматозоиды жеребца сохраняют способность к оплодотворению в половых путях кобылы до 140 часов. Если пальпацией определяют степень зрелости фолликула, то первое осеменение проводят при наличии почти зрелого или полностью созревшего фолликула; повторно осеменяют через 1–2 дня, если овуляция не наступила.

Способы осеменения. При осеменении кобыл сперму вводят в матку (маточный метод осеменения). В практике применяют два способа введения спермы: мануальный и визуальный.

При **мануальном** способе используют резиновый катетер И.И. Иванова и шприц емкостью 30–50 мл или ампулу. Катетер представляет собой толстостенную мягкую резиновую трубку с узким внутренним каналом. Передний конец его сужен, а задний имеет выступ в виде кольца и расширенное отверстие канала для соединения с канюлей шприца. Катетер вводят рукой во влагалище кобылы. Указательным пальцем находят устье шейки матки и под контролем пальца продвигают катетер в канал шейки матки на глубину 10–12 см. К катетеру присоединяют шприц со спермой и, нажимая на поршень, вводят сперму в матку. При **визуальном** способе используют стеклянный или эбонитовый катетер длиной 50 см, шприц и влагалищное зеркало. Обеззараженное влагалищное зеркало вводят в половые пути и размещают его так, чтобы хорошо видна была шейка матки. Под контролем зрения катетер через зеркало направляют в цервикальный канал. После введения в матку к стеклянному катетеру присоединяют посредством резиновой муфты шприц. Эбонитовый катетер с каню-

лей шприца соединяют заранее при помощи металлического хомутика с резиновой прокладкой.

Перед осеменением кобылу заводят в специальный станок или же фиксируют с помощью случной шлеи. Спокойных животных удерживают за повод и поднимают переднюю ногу, чтобы они не могли ударить оператора по искусственному осеменению. Конюх забинтовывает хвост кобылы и отводит в сторону; вульву обмывает теплой водой и вытирает насухо ватой. После этого оператор при участии помощника, который подает ему инструменты для осеменения, проводит осеменение кобылы.

Для осеменения одного животного используют от 20 до 40 мл спермы. В дозе должно содержаться около 700 млн. сперматозоидов. Крупным, старым, а также ожеребившимся кобылам следует вводить максимальную дозу спермы.

Контрольные вопросы

1. В какой период года проявляется половая цикличность у кобыл? Когда после родов наступает первая охота?

2. Какова продолжительность охоты? Одинаково ли проявление признаков охоты на всем ее протяжении? Когда происходит у кобыл овуляция относительно охоты?

3. Способы и режим выявления половой охоты? Каким способом можно определить время приближения овуляции?

4. Как подготовить кобылу для осеменения? Где проводится осеменение, как зафиксировать животное? В какой период охоты их осеменяют? Кратность осеменения?

5. Какие способы осеменения кобыл применяют в практике? Какой необходим инструмент? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?

6. Какой объем спермы необходим для осеменения кобылы? Сколько подвижных сперматозоидов должно содержаться в одной дозе для осеменения?

7. Какие способы хранения разбавленной спермы жеребцов применяют в практике?

9.5. Осеменение птиц

Искусственное осеменение птиц применяют для уменьшения числа самцов при получении яиц для инкубации и повышения выводимости цыплят (индюшат, гусят). При этом уменьшается опасность распространения инфекций половым путем, предупреждаются повреждения самок в процессе естественного спаривания, при котором отход маточного поголовья, например, индеек, в течение года вследствие нане-

сения травм самцами достигает 20–30%. При искусственном осеменении, кроме того, можно замораживать сперму самцов и длительное время сохранять отдельные линии и породы птиц.

Цель занятий: ознакомление с техникой получения спермы от самцов птиц и оценкой ее качества, разбавлением спермы, организацией и техникой осеменения самок.

Объекты исследований, материалы и оборудование: петухи, индюки, гусаки, куры, индейки, гусыни; станок с металлической сеткой для фиксации индейки, столик передвижной; электрический спермособирающий, вакуумные и обычные спермоприемники; стеклянные флаконы емкостью 15–20 мл с резиновыми пробками; микроскопы, обогревательные столики, предметные и покровные стекла; дозаторы пипеточные (глазные пипетки) или стеклянные палочки; инструмент для осеменения (стеклянные и полиэтиленовые пипетки с полиэтиленовыми или резиновыми баллончиками, микрошприц или шприц-полуавтомат для осеменения овец с укороченным катетером; стерильный физиологический раствор, раствор фурацилина, 70%-ный спирт, натрия хлорид, калия хлорид, кальция хлорид, магния хлорид, натрия ацетат, натрий двузамещенный фосфорнокислый, калия цитрат, натрий глутаминовокислый, фруктоза, глюкоза, дистиллированная вода; спиртовые тампоны, сухие ватные тампоны; полотенце, стерильные марлевые и бумажные салфетки; анатомический пинцет.

Методические указания. Занятие проводится в лаборатории кафедр или в учебном пункте. Сначала студенты изучают технику осеменения самок птиц. Затем получают сперму, проводят оценку ее качества, готовят инструмент, среду для разбавления спермы и разбавляют ее и, наконец, выполняют процедуру осеменения птиц. При возможном посещении птицефабрики студенты знакомятся со всеми технологическими процессами метода последовательно в составе производственных групп.

Искусственное осеменение кур. Осеменяют кур, как правило, во второй половине дня после яйцекладки. Для введения спермы используют индивидуальные стеклянные или полиэтиленовые пипетки с полиэтиленовым или резиновым баллончиком, длиной 100–150 мм и диаметром 6–7 мм. Удобен и микрошприц (шприц-полуавтомат) для осеменения овец с укороченным наполовину катетером. Осеменение обычно проводят вдвоем. Помощник берет курицу и, не вынимая из клетки, фиксирует левой рукой за хвост, несколько отгибая его к спине. Правой рукой надавливает на левую сторону живота между лонными костями и задним концом грудной кости. После того как клоака курицы начнет выпячиваться, техник левой рукой слегка растягивает ее, надавливает вокруг, пока не покажется отверстие яйцепровода. Затем вводит пипетку со спермой в канал яйцепровода на глубину 4–5 см. В этот момент помощник прекращает давление на живот кури-

цы и убирает руку. Для осеменения используют свежеполученную или разбавленную сперму в дозе 0,025–0,03 мл с содержанием в дозе не менее 100–150 млн. сперматозоидов и подвижностью не ниже 7 баллов. При первом осеменении вводят двойную дозу (0,05 мл), чтобы создать хорошую насыщенность яйцепровода сперматозоидами. Повторно осеменение проводят через каждые 5 дней.

Искусственное осеменение индеек. Осеменяют индеек при помощи шприца-полуавтомата, который применяют для осеменения овец, или индивидуальных пипеток из стекла или полистирола. Повторно употреблять пипетки можно после тщательного промывания их и стерилизации. Для осеменения индейки помощник техника прочно фиксирует ее левой рукой за обе ноги и надавливает на живот. Правой рукой заворачивает хвост на спину; при этом голова птицы должна находиться внизу. Техник левой рукой выворачивает клоаку до появления отверстия яйцепровода и вводит пипетку со спермой в канал его на глубину 4–5 см. В момент введения спермы помощник отпускает хвост индейки и несколько ослабляет общее фиксирование. Сперму выдавливают из инструмента только после того, как яйцепровод втянется в брюшную полость. Затем, не разжимая пальцев на резиновом наконечнике пипетки, извлекают ее из клоаки индейки. Индейку осторожно опускают на пол.

Первое осеменение индеек в стаде проводят через 14–17 дней после начала подготовки к яйцекладке и затем осеменяют еще дважды через 3–4 дня. После этого в течение 3-х месяцев яйцекладки осеменяют самок через 10–14 дней. В течение 4–5-го месяца интервалы между осеменением уменьшают до 9–10 и 8–10 дней, а в течение 6-го месяца осеменяют еженедельно. Оптимальная доза разбавленной 1:1 или неразбавленной спермы – 0,025 мл с содержанием в дозе не менее 80–100 млн. сперматозоидов и подвижностью не ниже 7 баллов.

Искусственное осеменение гусынь проводят в специальном станке (табуретка с широким желобом) во второй половине дня. Помощник держит птицу левой рукой у основания крыльев, а правой рукой слегка отгибает хвост. Техник вводит в клоаку гусыни указательный палец правой руки в перчатке и нащупывает отверстие яйцепровода, которое расположено левее и ниже входа в клоаку на 2–4 см. Затем вводит в его канал пипеткой 0,05 мл неразбавленной спермы с содержанием в ней 30–50 млн. подвижных сперматозоидов. Осеменение проводят каждые 6 дней.

Сперматозоиды у птиц размещаются в складках яйцепровода и сохраняют способность к оплодотворению у кур в течение 12–14 дней, у индюшек – 30–40 дней.

Контрольные вопросы

1. *Какие инструменты необходимы для осеменения птицы?*
2. *Какой объем спермы вводится при осеменении кур, индюшек, гусей? Сколько сперматозоидов содержится в дозе для осеменения?*
3. *В какой участок полового аппарата птицы вводится сперма? Как часто это делается?*

Тема 10. УЧЕТ И ОТЧЕТНОСТЬ НА ПЛЕМПРЕДПРИЯТИЯХ И ПУНКТАХ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Цель занятий: ознакомиться с формами учета производственной деятельности племпредприятий, районных станций и пунктов искусственного осеменения.

Объекты исследований, материалы и оборудование: инструкция по взятию, оценке и замораживанию спермы быков-производителей на племпредприятиях (1998 г., РБ), инструкция по организации и технологии работы предприятий и пунктов по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных; инструкция по искусственному осеменению и воспроизводству стада в скотоводстве (1999 г., РБ); инструкции по искусственному осеменению коров, овец, свиней, кобыл; журналы и бланки форм учета на племпредприятиях и пунктах искусственного осеменения животных; календари оператора по искусственному осеменению, другие формы оперативного учета и контроля воспроизводительной функции животных и результатов их осеменения; персональный компьютер, оснащенный соответствующими программами для ведения учета.

Методические указания. Занятие проводится в лаборатории кафедры или учебном пункте. Студенты должны быть обеспечены бланками форм учета и отчетности. Под контролем преподавателя они знакомятся с содержанием журналов, бланков и правилами заполнения их и внесения соответствующих данных в компьютер. Затем получают от преподавателя задание и заполняют необходимые данные по учету и отчетности. С отдельными документами и правилами их оформления студенты могут познакомиться во время посещения племпредприятия.

Документы, которые отражают производственную деятельность племпредприятия и пунктов искусственного осеменения животных в зоне его деятельности, хранятся в отдельных папках. Данные основных документов вносятся в память компьютера и записываются на дискеты.

В папке индивидуального учета производителя находятся: фотография производителя; племенное свидетельство; заводская карточка; журнал учета использования производителя и показателей спермопро-

дукции (форма № 1-ИО); ветеринарный паспорт производителя (форма № 13-ИО); акты перевода производителя из младшей в старшую группы, о выранжировке и выбытии, результаты испытания по качеству потомства. В ветеринарном паспорте отражаются данные о состоянии здоровья животного, ветеринарных диагностических исследований, обработках и др.

По каждому производителю предприятие ведет *лабораторный журнал учета качества спермы* (форма № 2-ИО) с приложением ведомостей на отправку спермы в хозяйство. В этот журнал заносят данные по всем эякулятам независимо от их качества, а также о времени взятия их. Данные журналов №№ 1 и 2-ИО также заносятся в компьютер.

На пункты хозяйств сперму производителей доставляют с сопроводительным документом – *ордером* (накладной) на отправку спермы (форма № 3-ИО). Его составляют в двух экземплярах. На лицевой стороне ордера приводятся сведения о производителе, количестве и качестве спермы. На обратной стороне документа оператор по искусственному осеменению вносит данные о животных, осемененных этой спермой, а также о ее качестве. Такие сведения обычно представляют на отдельных листах в районную станцию.

Форма № 4-ИО – *график доставки спермы* производителя на пункты искусственного осеменения. Обычно используется в случае краткосрочного хранения спермы и необходимости регулярной доставки ее на пункт осеменения. В отдельности по каждому хозяйству племпредприятие (районная станция) ведет *ведомость учета использования спермы* производителя (форма № 5-ИО), в которой указывается число осемененных животных и общий расход спермы на осеменение. На каждого производителя в конце года составляется *сводная ведомость учета искусственного осеменения маток по оплодотворяющей способности спермы* (форма № 6-ИО). Данные ведомости являются основанием для оценки производителя по плодовитости (воспроизводительной способности). По данным, предоставляемым пунктами искусственного осеменения, районные станции по племенной работе и искусственному осеменению ведут *картотеку* искусственного осеменения коров и телок по каждому обслуживаемому хозяйству.

Оплодотворяемость коров и телок определяют путем ректального исследования животных, по результатам которого составляется специальный *акт* (форма № 8-ИО) с приложением списка животных. Данные проверки сводят в ведомости (форма № 9-ИО).

Племпредприятие ведет также: *папку с документами по закреплению производителей за хозяйствами* и сроками их использования; *папку с договорами*, заключаемыми между племпредприятием и сельхозпредприятиями, отдельными фермерами; *папку с планами искусственного осеменения животных* в хозяйствах зоны обслуживания плем-

предприятия; *папку с ведомостями учета использования спермы производителей и вторыми экземплярами ордеров на сперму; папку с результатами анализов кормов, воды, крови, бактериальной загрязненности спермы, смывов из препуция и др.*

Ежегодно племпредприятие (районная станция) заключает с каждым хозяйством своей зоны *договор на проведение искусственного осеменения*, который подписывают директор племпредприятия (районной станции) и руководитель хозяйства. В договоре излагаются обязательства каждой из сторон. Племпредприятие обязуется организовать в хозяйстве искусственное осеменение животных, своевременно обеспечивать пункты спермой закрепленных за ними производителей и снабжать их хладагентом (жидким азотом), инструментами и оборудованием для осеменения; оказывать содействие хозяйству в приобретении (или поставлять) термосов и сосудов Дьюара, в подготовке и переподготовке операторов по искусственному осеменению, организации зооветеринарного контроля воспроизводства животных; осуществлять систематический контроль за результатами осеменения животных и ведением племенной работы.

Хозяйство обязуется подготовить и оборудовать помещение для пункта (лаборатории); выделить (подготовить) специалиста для работы на пункте и снабдить его транспортным средством; вести точные записи осеменения животных и своевременно представлять отчеты о результатах осеменения; приобретать необходимые инструменты, материалы, оборудование; своевременно выплачивать племпредприятию названную в договоре сумму за каждую дозу спермы (за осемененную и оплодотворенную самку).

На каждом пункте искусственного осеменения крупного рогатого скота необходимо иметь *книгу учета осеменений* (журнал искусственного осеменения). Оператор по осеменению животных обязан ежедневно сразу же после осеменения самки сделать в книге (журнале) соответствующую запись. Эти записи могут дублироваться на компьютере. О результатах своей работы оператор должен отчитываться ежемесячно.

На пункте искусственного осеменения овец и коз помимо *журнала искусственного осеменения*, в который ежедневно вносятся данные об осеменении всех овец по каждой отаре в отдельности, должна быть *ведомость прикрепления маток к производителю, карточки по учету использования баранов-производителей* с регистрацией качества полученной спермы, *ордера* на отправку спермы, *бланки отчета* о ходе искусственного осеменения.

На пункте искусственного осеменения свиней также ведется *журнал искусственного осеменения*, в который вносятся данные обо всех выявленных в охоте и осемененных животных, в том числе и повторно. В *лабораторный журнал учета качества спермы* вносятся сведе-

ния о времени получения, качестве, степени разбавления и использовании спермы производителя, а также об осемененных свиноматках.

Аналогичные журналы и документы ведутся на пунктах искусственного осеменения кобыл (случной журнал, форма № 3; карточка кобылы, форма № 2 и журнал использования жеребца, форма № 1).

Для своевременного выявления охоты у коров и их осеменения операторы по искусственному осеменению используют специальный календарь. Вместо календаря можно рекомендовать по каждой хозяйственной группе коров вести ведомость отелов и их осеменения на листах бумаги или в компьютере.

Календарь оператора можно сделать из брезента, полотна, фанеры или плотного картона размером 100х55 см. На лист такой величины нашивают (прикрепляют) 32 кармана размером 12х12 см. Можно календарь сделать из дерева или пластика. В верхних трех рядах делают по 7 передвижных, а в четвертом нижнем ряду устанавливают 15 неподвижных ящичков. Двенадцать неподвижных ящичков рассчитаны на месяцы в году, тринадцатый – для карточек ветврачу, четырнадцатый – для карточек выбраковываемых коров и пятнадцатый – контрольный.

На каждую корову и телку изготавливают карточку. Ежедневно оператор вносит в карточки сведения об отелившихся животных. Такие карточки он помещает в ящичек календаря, который будет соответствовать дате предполагаемой охоты (можно с 18 дней после отела). Например, коровы № 824 и 2400 отелились 26 марта, их карточки оператор помещает в передвижной ящичек с цифрой 13 (13 марта). Если наблюдением в этот день охота у животных не выявлена, карточки перекалывают в следующий карманчик (14) и т.д. Если корова не проявит половую охоту в течение 20–22-х дней (т.е. до 40 дней после отела), ее карточку помещают в карманчик "Ветврачу". В этот ящичек помещают и карточки коров с акушерскими и гинекологическими болезнями. Карточки животных, осемененных и не проявивших повторно охоту в течение 50–75 дней, помещают в контрольный ящичек (для диагностики стельности). Карточки стельных коров помещают в ящички по месяцам года исходя из предполагаемого срока отела.

Широко практиковалось ранее ведение специальных карточек, в которых отражались данные об отеле и приплоде, продуктивности коров, о заболеваниях и их лечении, датах осеменения и результатах исследования на стельность. Данные легко можно было перенести в ведомость. Многие фермеры за рубежом и ныне предпочитают такие ведомости более сложным формам учета. Правильно и постоянно заполняемая ведомость позволяет не только контролировать сроки осеменения, но и быстро и в любой момент определить основные показатели плодовитости по каждому животному и в среднем по стаду.

Г.Ф. Медведевым, О.Т. Экхорутмовен и Н.Г. Блохиным приспособлены и успешно используются такие ведомости для анализа и контроля воспроизводительной функции коров в РУП «Учхоз БГСХА».

РУП «Учхоз БГСХА»

Доярка: Автомеенко

Оператор по искусственному осеменению Капустин В.Н.

Корова	Лактация	Дата отела	Дата наблюдения охоты	Производитель	Планируемое осеменение	От отела до 1-го осеменения, дн.	Дата 1-го осеменения	Интервал между осеменениями, дн.	Дата 2-го осеменения	Интервал между осеменениями, дн.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
824	1	13.10.2007	07.11.07		27.11.07	47	29.11.2007	44	12.01.07	39
2400	9	28.12.07			11.02.2008	52	18.02.08	21	10.03.08	

окончание

Дата 3-го осеменения	Интервал между осеменениями, дн.	Дата 4-го осеменения	Интервал между осеменениями, дн.	Дата 5-го осеменения	Интервал между осеменениями, дн.	Дата 6-го осеменения	Число осеменений	Сервис период, дн.	Дата запуска	Заболевания, осложнения, назначаемое лечение
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
20.02.07	20	12.03.07					4	150		Эндометрит
							2	73		

Контрольные вопросы

1. Какие документы хранятся в папке индивидуального учета производителя? Какие данные заносятся в ветеринарный паспорт?
2. Какие данные заносятся в лабораторный журнал учета качества спермы производителя?
3. На какой срок оформляется договор на проведение искусственного осеменения между сельскохозяйственным предприятием и племпредприятием (райплемстанцией)?
4. Какие сведения вносятся в журнал искусственного осеменения? Как часто обновляется этот журнал?
5. Какие записи должен вести техник-осеменатор и какие – заведующий фермы (бригадир)?

Учебно-методическое издание

**Григорий Федорович Медведев
Николай Иванович Гавриченко
Игорь Анатольевич Долин**

БИОТЕХНИКА РАЗМНОЖЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

**Часть 3. РАЗБАВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ.
ОСЕМЕНЕНИЕ САМОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ**

Методические указания к лабораторным занятиям

Редактор Т. П. Рябцева
Техн. редактор Н. К. Шапрунова
Корректор Л. С. Разинкевич

ЛИ №348 от 09.06.2004. Подписано в печать 08.08.2008.
Формат 60 x 84 ¹/₁₆. Бумага для множительных аппаратов.
Печать ризографическая. Гарнитура «Таймс».
Усл. печ. л. 4,65. Уч.-изд. л. 4,50.
Тираж 100 экз. Заказ 274/08. Цена 6170 руб.

Редакционно-издательский отдел БГСХА
213407, г. Горки Могилевской обл., ул. Студенческая, 2
Отпечатано в отделе издания учебно-методической литературы, ризографии
и художественно-оформительской деятельности БГСХА
г. Горки, ул. Мичурина, 5