14746-69

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

СРЕДА ГЛЮКОЗО-ЦИТРАТНО-ЖЕЛТОЧНАЯ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ БЫКОВ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ 2—5°С

ГОСТ 14746—69

Издание официальное

Цена 4 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СТАНДАРТОВ
СОВЕТА МИНИСТРОВ СССР
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 615.7 : 619(083.74) Группа Р31

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

СРЕДА ГЛЮКОЗО-ЦИТРАТНО-ЖЕЛТОЧНАЯ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ БЫКОВ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ 2—5°С

Medium, glucose-citrate-yolk, for keeping of bull sperm at temperature 2—5°C

ГОСТ 14746—69

Постановлением Комитета стандартов, мер и измерительных приборов при Совете Министров СССР от 17/VI 1969 г. № 692 срок введения установлен с 1/I 1970 г.

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на синтетическую глюкозо-цитратно-желточную (ГЦЖ) среду, предназначенную для хранения спермы быков-производителей при температуре 2—5°С, применяемой на станциях и пунктах искусственного осеменения.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Глюкозо-цитратно-желточную среду готовят непосредственно перед ее применением на станциях искусственного осеменения в соответствии с Инструкцией по искусственному осеменению крупного рогатого скота, утвержденной Министерством сельского хозяйства СССР, и Ветеринарно-санитарными правилами работы станций с пунктов искусственного осеменения, утвержденными Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР.

1.2. В состав ГЦЖ среды входят компоненты, указанные в табл. 1.

Таблица 1

Наименования компонентов	Нормы
1. Глюкоза по ГОСТ 6038—51 или медицинская в г	3,0
2. Натрий лимоннокислый трехзамещенный пятиводный по ГОСТ 5.1314—72 в г	1,4

Издание официальное Перепечатка воспрещена

Переиздание. Август 1973 г.

© Издательство стандартов, 1974.

Продолжение

Наименования компонентов	Нормы
3. Желток куриного яйца в мл	10±2
4. Стрептомицин сернокислый или солянокислый для внутримышечных инъекций в тыс. единиц	75—100
5. Пенициллин кристаллический (калиевая или натриевая соль) для внутримышечных инъекций в тыс. единиц	75—100
6. Стрептоцид белый растворимый в г	0,12±0,02
7. Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72 в мл	100

1.3. Глюкоза медицинская ч. д. а. или х. ч., антибиотики и белый растворимый стрептоцид должны отвечать требованиям Государственной фармакопеи. Все препараты перед применением проверяют на безвредность для спермиев животных. Безвредность антибиотиков определяют по ВТУ 117—67, утвержденным Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР, а глюкозы и цитрата — по эталонам этих препаратов, установленных Государственным научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов.

1.4. Содержание влаги в глюкозе допускается не более 10%.

При приготовлении среды препарат берут в большем количестве, чем указано в рецепте, с учетом содержания кристаллизационной воды.

Количество глюкозы (X) в г вычисляют по формуле:

$$X = \frac{3 \cdot 100}{100 - б},$$

где

3 — количество безводной глюкозы, требуемое рецептом;

$б$ — содержание воды в препарате в процентах по анализу.

1.5. Желток куриных яиц берут от проверенных здоровых кур, из яиц со сроком хранения при температуре 2—5°С не более 7 суток. Желательно брать желтки, окрашенные в ярко-оранжевый цвет.

1.6. Среду готовят в день разбавления спермы. Компоненты, входящие в состав среды, отвешивают на аналитических весах.

Перед отвешиванием реактивов проверяют точность весов и используют для навески часовое стекло, обработанное тампоном, смоченным 96%-ным этиловым спиртом по ГОСТ 5962—67.

1.7. Для приготовления среды используют стерильные колбы и мерные цилиндры по ГОСТ 1770—64.

Дистиллированную воду кипятят 15—20 мин и берут ее в необходимом объеме.

Глюкозу и цитрат стерилизуют ультрафиолетовыми лучами в бактерицидной камере (УНБК-1) в течение 15—20 мин или в растворе текучим паром при 100°С в течение 30 мин.

После охлаждения раствора до 80—90°С в стерильных условиях добавляют в него стрептоцид. Затем при температуре 58—60°С в раствор добавляют желток куриных яиц. Для этого скорлупу яиц обеззараживают тампоном, смоченным 70%-ным раствором этилового спирта, или ультрафиолетовыми лучами в настольной бактерицидной камере в течение 10—15 мин.

Яйцо раскалывают стерильным скальпелем, белок сливают в чашку, а желток осторожно перекладывают на стерильный лист фильтровальной бумаги, чтобы удалить остатки белка и оболочку желтка. Желтки перекатывают к краю фильтровальной бумаги, прокалывают оболочку и сливают их в стерильный цилиндр или мензурку.

Измеренное количество желтка вносят в колбу с раствором и тщательно встряхивают до получения однородного цвета.

Затем при температуре не выше 45°С вносят антибиотики в сухом виде или предварительно растворенными в 1—2 мл дистиллированной воды.

1.8. Приготовленная ГЦЖ среда по физико-химическим и биологическим свойствам должна отвечать требованиям и нормам, указанным в табл. 2.

Таблица 2

Наименования показателей	Нормы
1. Внешний вид	Однородная жидкость без комков, осадка и механических примесей
2. Цвет	От светло-желтого до темно-желтого
3. Запах	Специфический

Продолжение

Наименования показателей	Нормы
4. Стерильность	При посеве на питательные среды не должно быть роста микробных тел в течение 10 суток
5. Безвредность	Среда не должна вызывать понижение активности, выживаемости и оплодотворяемости спермиев. Выживаемость и оплодотворяемость спермиев должна выдерживать испытание по пп. 10—12 настоящей таблицы
6. Концентрация водородных ионов (pH)	6,9±0,2
7. Осмотическое давление при температуре 0°С в атм	7,4±0,2
8. Температура среды перед разбавлением спермы в °С	28—30
9. Оптимальная степень разбавления спермы	От 4 до 32 раз
10. Активность спермиев через 3 суток хранения разбавленной спермы при температуре 2—5°С в баллах	не ниже 7,0
11. Выживаемость спермиев до 1,0 балла включительно в ч:	
а) при температуре 2—5°С	252
б) при температуре 38±0,5°С	11
12. Показатель абсолютной выживаемости спермиев (S) при температуре 2—5°С	1400

Продолжение

Наименования показателей	Нормы
13. Оплодотворяемость здоровых коров в одну охоту при осеменении их разбавленной спермой со сроком хранения не более 3 суток в %, не менее	60

2. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

2.1. Для контрольной проверки качества ГЦЖ среды, а также соответствия ее требованиям настоящего стандарта должны применяться правила отбора проб и методы испытаний, указанные ниже.

2.2. Контрольная проверка ГЦЖ среды производится государственным контролером на предприятии-изготовителе (станция искусственного осеменения) или Государственным научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов Министерства сельского хозяйства СССР.

2.3. Для контрольной проверки отбирают готовую среду (100 мл) или препараты тех партий (серий), из которых приготовлена среда (глюкоза — 100 г; натрий лимоннокислый трехзамещенный пятиводный — 100 г; яйца куриные — 5 шт.; антибиотики — по 5 флаконов).

2.4. Внешний вид, цвет и отсутствие механических примесей устанавливают путем осмотра колбы со средой в проходящем свете при периодическом встряхивании.

2.5. Стерильность проверяют путем высева среды по 1 мл на мясопептонный бульон (МПБ), 2%-ный мясопептонный агар МПА с 1% глюкозы и на мясопептонный печеночный бульон под вазелиновым маслом (среда Китт—Тарощи).

Наблюдают за посевами в течение 10 суток в соответствии с методикой ветеринарно-санитарной оценки спермы и сред, утвержденной Главным управлением ветеринарии МСХ СССР.

2.6. Температуру среды 28—30°С поддерживают в бактерицидной камере (УНКБ-1) или в термостате.

2.7. Концентрацию водородных ионов определяют с помощью потенциометра ЛПУ-01 или другими приборами того же класса точности.

Правильность показаний pH-метра проверяют по стандартным буферным растворам, имеющим pH 1,68; 4,00; 6,88 и срок хранения не более 3 месяцев при температуре 2—5°С.

Подготовку прбора к работе и определение pH среды проводят по инструкции, прилагаемой к прибору.

2.8. Осмотическое давление среды определяют по разности температуры между точкой таяния льда (нулевая точка на термометре) и точкой истинной кристаллизации. Исследование проводят при помощи термометра Бекмана.

Перед началом работы каждый раз проводят калибровку термометра — установление нулевой точки. При этом термометр Бекмана помещают в мелкораздробленный тающий лед или снег и наблюдают уровень ртути в капилляре. Если уровень ртути окажется в нижней части шкалы или ниже делений шкалы термометра, то добавляют ртуть из верхнего резервуара. Для этого термометр перевертывают и нагревают рукой нижний резервуар ртути до тех пор, пока ртуть капилляра не соединится с ртутным столбиком верхнего резервуара. После этого термометр медленно охлаждают до температуры 2—3°С, погрузив его на 7—10 мин в воду со льдом. Затем, держа термометр правой рукой за верхнюю его треть, коротким но сильным ударом верхней части термометра по большому или указательному пальцу левой руки отрывают излишнюю ртуть от ртутного столба верхнего резервуара.

Добиваются разрыва столбика ртути в месте соединения капилляра с верхним резервуаром. После этого ставят термометр в мелкораздробленный лед и определяют уровень ртутного столбика. Указанную манипуляцию повторяют до тех пор, пока верхний мениск ртутного столбика в капилляре при температуре таяния льда не будет стоять в верхней части шкалы между 3—5°С.

Определяют нулевую точку с точностью до 0,01°С и записывают ее. Для исследования ГЦЖ среду каждый раз заливают в объеме 4—5 мл в чистую пробирку такого размера, чтобы ртутный резервуар термометра был полностью погружен в жидкость и не касался стенок и дна пробирки; для этого термометр фиксируют при помощи резинового кольца или корковой пробки.

Термометр с пробиркой помещают в другую пробирку такого размера, чтобы между стенками пробирок оставалось пространство в 2—3 мм. Подготовленный таким образом термометр переносят в охлаждающую ванну. Исследуемую среду постоянно помешивают петлевидной мешалкой, наблюдая при этом за понижением уровня ртути в капилляре. После переохлаждения выделяется теплота кристаллизации и столбик трути поднимается до истинной температуры замерзания ГЦЖ среды и некоторое время остается на постоянном уровне. Эту точку отмечают и записывают с точностью до 0,01°С. Исследование повторяют. Для этого пробирку со средой отогревают в руке и определяют точку замерзания.

Если после двух исследований расхождения не превышают 0,01°С, то проводят расчет осмотического давления. При расхождении после повторного исследования более чем на 0,01°С прово-

дят дополнительные исследования до получения необходимых расчетных данных.

При исследовании растворов разной концентрации пробирку и термометр после каждого исследования тщательно ополаскивают дистиллированной водой и просушивают.

Для охлаждения ванн применяют одну из указанных смесей:

а) смесь естественного льда с поваренной солью (3 : 1).

б) смесь спирта с сухим льдом;

в) спирт, охлажденный пропусканием через змеевик паров жидкого азота или воздуха.

Температуру в ваннах в период работы поддерживают на уровне минус 20—40°С.

Осмотическое давление вычисляют по депрессии — $\triangle t$ ГЦЖ среды, что представляет собой разность между нулевой точкой на термометре и истинной температурой замерзания среды.

Пример:

Допустим, что нулевая точка на термометре Бекмана соответствует 4,46°С. После трехкратного измерения истинная температура замерзания раствора составляет: 3,79; 3,80; 3,81°С.

Среднее значение — 3,80°С.

Определяем $\triangle t = 4{,}46 - 3{,}80 = 0{,}66$.

По формуле $P_0 = 12{,}04 \cdot \triangle t$ определяем осмотическое давление среды при 0°С:

$$P_0 = 12{,}04 \cdot 0{,}66 = 7{,}94.$$

Зная осмотическое давление раствора при 0°С, можно найти его давление при любой температуре (P_n) в атм, исходя из законов Гей-Люссака:

$$P_n = \frac{T_0 + T_n}{T_0} \cdot P_0,$$

где

T_0 — температура абсолютного нуля (минус 273°С);

T_n — температура, при которой требуется определить осмотическое давление жидкости, в °С;

P_n — определяемое осмотическое давление в атм.

Пример определения осмотического давления ГЦЖ среды при температуре 39°С (P_{39}) в атм:

$$P_{39} = \frac{273 + 39}{273} \cdot 7{,}94 = 8{,}05.$$

2.9. Качество спермы по подвижности спермиев определяют по десятибалльной оценке, под микроскопом при температуре 40—42°С и увеличении микроскопа не менее чем в 120 раз.

Исследование спермы на протяжении первых 5—6 суток проводят через каждые 24—48 ч, а при дальнейшем хранении спермы — через каждые 24 ч.

Для создания на предметном столике микроскопа стабильной температуры 40—42°С применяют термостаты для микроскопов (ТМ-1 и др.), снабженные стандартными контактными термометрами или нестандартными одиотемпературными термометрами.

Для оценки на чистое предметное стекло наносят небольшую каплю разбавленной спермы и 4—6 капель (2,8%) изотонического раствора лимоннокислого натрия. Капли раствора цитрата наносят вокруг капли спермы на расстоянии 2—3 мм. После накрывания покровным стеклом капля разбавленной спермы оказывается в центре, а раствор по краям.

Раствор цитрата должен выходить за пределы края покровного стекла. Такое приготовление раздавленной капли предупреждает преждевременное подсыхание капли спермы, создает хорошую видимость спермиев в поле зрения микроскопа и способствует правильной оценке спермы.

Результаты оценки спермы учитывают по форме приложения к настоящему стандарту.

2.10. Для определения выживаемости спермиев в сперме, сохраняемой при температуре 2—5°С, используют густую и среднюю сперму с активностью не ниже 8,0 баллов.

Опыты повторяют 3—5 раз и используют один смешанный эякулят спермы, полученный от одного, двух или трех быков-производителей.

Разбавленную сперму сохраняют в бытовом холодильнике или пищевом термосе со льдом, температуру которых ежедневно проверяют максимальным термометром и записывают в журнал.

Оценку сохраняемой спермы по активности (количеству живых спермиев) проводят в соответствии с п. 2.9. По окончании исследования спермы определяют выживаемость спермиев в часах и общий показатель абсолютной выживаемости спермиев.

Выживаемость спермиев в часах определяют по оценке подвижности спермиев до 1,0 балла включительно плюс $^1/_2$ времени, прошедшего до следующего исследования.

Например, через 10 суток от начала хранения активность спермы была установлена 1,0, а через 11 суток — единичная подвижность.

Следовательно, выживаемость спермиев — 252 ч.

Показатель абсолютной выживаемости (S) спермиев определяют по формуле:

$$S = a_1t_1 + a_2t_2 + a_3t_3 \ldots\ldots\ldots \text{ и т. д.},$$

где

a_1t_1; a_2t_2 и т. д. — показатели абсолютной выживаемости спермиев за отрезок времени;

a_1; a_2 и т. д. — количество живых спермиев в баллах;

t_1; t_2; t_3 и т. д. — показатель времени, вычисляемый по формуле:

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

где

T — время, прошедшее от начала опыта до момента следующего исследования (определяют для каждого дня нарастающим итогом $T_1 + T_2 + T_3$ и т. д.);

n — порядковый номер исследования.

Пример заполнения формы учета оценки спермы по подвижности спермиев приведен в таблице.

Примеры расчетов:

1. На 10.2.68:

$$t_4 = \frac{T_5 - T_3}{2} = \frac{120 - 48}{2} = 36;$$

$at = a_4 t_4 = 7 \cdot 36 = 252.$

2. На 16.2.68:

$$t_9 = \frac{T_{10} - T_8}{2} = \frac{252 - 216}{2} = 18;$$

$at = a_9 t_9 = 1 \cdot 18 = 18.$

Выживаемость спермиев в часах равна 252.

$t_{10} = 264 - 12$ ч, т. е. $^1/_2$ времени, прошедшего от предпоследнего до последнего исследования.

Полученные результаты по выживаемости спермиев в разных опытах обрабатывают биометрическим методом.

2.11. Для определения выживаемости спермиев, сохраняемых при температуре 38°С, пробы с разбавленной спермой ставят в термостат, который должен быть проверен за 3—5 дней до опыта на поддержание стабильной температуры.

Сперму, сохраняемую при 38°С, оценивают через каждые 1—4 ч. Оценку спермы и учет результатов исследования проводят по пп. 2.9. и 2.10.

2.12. Для определения оптимальной степени разбавления спермы заготавливают 7 стерильных флаконов, закрытых корковыми или резиновыми пробками, обернутыми пергаментной бумагой. В первый флакон наливают 7 мл ГЦЖ среды, а в остальные 6 флаконов — по 4 мл.

Затем во флакон № 1 при температуре среды 28—30°С добавляют 1 мл свежеполученной спермы быка с оценкой не ниже С—8,0.

Флакон с разбавленной спермой тщательно перемешивают.

При помощи стеклянной пипетки переносят 4 мл разбавленной спермы во флакон № 2 и получают разбавление в 16 раз.

Номер п/п.	Дата и время исследования (часы)	Порядковый номер исследования n	Время, прошедшее от начала опыта по момента следующего исследования в ч. T	Показатель времени, вычисляемый по формуле: $t_n = \frac{T_{n+1} - T_{n-1}}{2}$	Повторность проверки среды					
					1		2		3	
					Количество живых спермиев в баллах a	Показатель абсолютной выживаемости спермиев за отрезок времени at	a	at	a	at
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	6.2.14 после разбавления	1	0	12	9	108	9	108	9	108
2	7.2.14	2	24	24	9	216	9	216	9	216
3	8.2.14	3	48	36	8	288	7	252	8	288
4	9,2 не исследовали									
5	10.2.14	4	96	36	7	252	6	216	8	288
6	11.2.14	5	120	36	6	216	6	216	6	216
7	12.2 не исследовали									
8	13.2.14	6	168	36	5	180	6	216	5	180
9	14.2.14	7	192	24	3	73,5	5	122,5	4	96
10	15.2.14	8	216	24	2	48	2	48	2	48
11	16.2.14	9	240	18	1	18	1	18	1	18
12	17.2.14	10	264	—	е. п.	—	е. п.	—	е. п.	
	ИТОГО: S					1399		1412		1458

Примечание. В графе 3 порядковые цифры по вертикали 1; 2; 3 и т. д. указывают на T_1; T_2; T_3 и т. д, t_1; t_2; t_3 и т. д., a_1; a_2; a_3 и т. д., а также a_1t_1; a_2t_2; a_3t_3 и т. д.

Из флакона № 2 также переносят 4 мл разбавленной спермы во флакон № 3 и т. д. до флакона № 7.

Из флакона № 7, после тщательного перемешивания, 4 мл разбавленной спермы выбрасывают.

В результате последовательного разбавления спермы получают разведения 1 : 8; 1 : 16; 1 : 32; 1 : 64; 1 : 128; 1 : 256; 1 : 512.

ГЦЖ среду проверяют не менее трех раз.

Для этого готовят 3 ряда по 7 пробирок с вышеуказанными разведениями. В каждом ряду пробирок применяют сперму одного эякулята. Таким образом, при трех повторностях получают 21 флакон разбавленной спермы от одного и того же объема спермы.

Флаконы с пробами разбавленной спермы ставят на хранение при температуре 2—5°С. Оценку спермы и учет результатов исследования проводят по пп. 2.9 и 2.10.

Оптимальную степень разбавления спермы определяют по наибольшему показателю абсолютной выживаемости спермиев.

При этом учитывают, что в дозе должно содержаться не менее 40 млн. живых спермиев. При определении оптимальной степени разбавления спермы можно одновременно учитывать качество среды по п. 2.10.

2.13. Для определения процента оплодотворяемости животных в одну охоту после осеменения их разбавленной сохраненной спермой используют здоровых проверенных ректально и вагинально коров в возрасте до 5 лет, имевших 2—3 нормальных отела. Для этих целей можно использовать и телок случного возраста, отвечающих по своему развитию, весу и упитанности требованиям, предъявляемым к данной породе.

В опыте по установлению оплодотворяемости должно быть не менее 20 животных. Учет результатов осеменения проводят предварительно через 3 месяца по определению беременности методом ректального исследования, а конечный — по отелам.

3. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

3.1. ГЦЖ среду хранят и транспортируют в склянках по ГОСТ 1770—64 при соблюдении стерильности и температуры 2—5°С в течение 24 ч.

Замена

ГОСТ 5.1314—72 введен взамен ГОСТ 8161—57.

Форма учета результатов микроскопической оценки по подвижности спермиев

Номер п/п.	Дата и время исследования (часы)	Порядковый номер исследования n	Время, прошедшее от начала опыта до момента следующего исследования в ч T	Показатель времени, вычисляемый по формуле: $t_n = \frac{T_{n+1} - T_{n-1}}{2}$	Повторность проверки среды					
					1		2		3	
					Количество живых спермиев в баллах a	Показатель абсолютной выживаемости спермиев за отрезок времени at	a	at	a	at
1	6.2.14 после разбавления									
2	7.2.14									
3	8.2.14									
4	9.2.14 не исследовали и т. д.									

Редактор *В. Г. Сазонова*
Технический редактор *Т. И. Неверова*
Корректор *Э. В. Митяй*

gost.e-ecolog.ru

Сдано в наб. 1/XI 1973 г. Подп. в печ. 5/II 1974 г. 0,75 п. л. Тир. 2000

Издательство стандартов. Москва. Д-22. Новопресненский пер., д. 3.
Вильнюсская типография Издательства стандартов, ул. Миндауго, 12/14. Зак. 4999