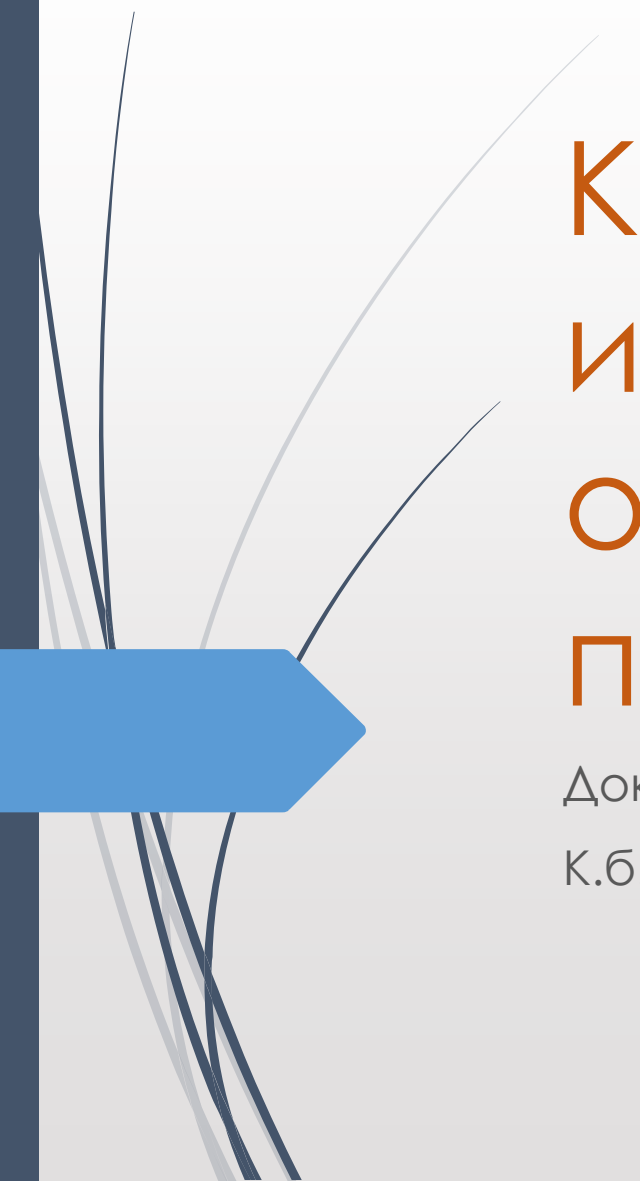




Контроль качества спермы импортного и отечественного производства

Докладчик:

К.б.н., доцент С.М. Борунова



- В настоящее время ФГБУ «ВГНКИ» является единственным аккредитованным Росакредитацией учреждением на проведение исследований спермопродукции животных. Всё оборудование поверено и аттестовано.
- Так же наблюдается активный рост экспорта/импорта спермы сельскохозяйственных производителей на территорию Российской Федерации.
- Основная цель аналитической эпизоотологии генетического материала – проверка реальности эпизоотологических проблем и гипотетических факторов риска, а так же определение направлений противоэпизоотической работы.



В современной России за последние годы была разработана целая линейка ГОСТов в сфере репродукции и воспроизводства отечественных сельскохозяйственных животных. Однако эти ГОСТы являются прототипами уже существовавших в СССР и не были адаптированы, актуализированы под реалии сегодняшнего дня, что затрудняет проводить должный контроль согласно современным требованиям системы менеджмента качества к генетическому материалу.

- Указанная в ГОСТе 32277-2013 методика окрашивания сперматозоидов не отвечает современным требованиям определения и идентификации аномальных сперматозоидов. Указанный в ГОСТе краситель эозин, азур-эозин по Романовскому лучше всего использовать для определения количества мертвых и живых сперматозоидов, но не для дифференциации морфофункциональных характеристик изучаемых сперматозоидов.
- Недостаточная информативность использования этих методов окрашивания, а также долгосрочная рутинная пробоподготовка не дают достоверного и желаемого результата для выявления и подсчета патологических форм – аномальных сперматозоидов.

- 
- ▶ ГОСТом 20909.3-75 установлены методы испытаний морфологических свойств спермиев с целью определения размеров и мертвых форм спермиев и содержания количества с аномальной морфологией;
 - ▶ ГОСТом 20909.4-75 были определены методы испытания биологических свойств спермы – подвижности спермиев, показателя абсолютной выживаемости и выживаемости в часах, физиологической резистентности и т.д.;
 - ▶ в ГОСТе 20909.6-75 изложены методы биохимических исследований с целью определения содержания аденозифосфатов в спермиях, микроэлементов и кетоновых тел в сперме. Данные методические рекомендации, изложенные в этих нормативных документах, были настоящим катализатором в концепции развития всего искусственного осеменения сельскохозяйственных животных того времени.



МИНИСТЕРСТВО ПРОМЫШЛЕННОСТИ
И ТОРГОВЛИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО
ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И
МЕТРОЛОГИИ
(Росстандарт)

Китайгородский проезд, д. 7, стр. 1, Москва, 109074
Тел: (499) 236-03-00; факс: (499) 236-62-31
E-mail: info@gost.ru
<http://www.gost.ru>

ОКПО 00091089, ОГРН 1047706034232
ИНН/ КПП 7706406291/770601001

ФГБНУ «Всероссийский научно-
исследовательский институт
животноводства имени академика
Л.К.Эрнста» (ВИЖ им. Л.К.Эрнста)

fatima.borunova@mail.ru

02.02.2017 № 1385-ОМ/03

На №

Управление технического регулирования и стандартизации Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии сообщает, что поправка к межгосударственному стандарту ГОСТ 26030-2015 «Средства воспроизводства. Сперма замороженная. Технические условия» и пояснительная записка к ней направлены в ОАО «ВНИИС» для проведения экспертизы и подготовки к утверждению.

И.о. начальника Управления технического
регулирования и стандартизации

О.В.Мезенцева

Подлинник электронного документа, подписанного ЭП,
хранится в системе электронного документооборота
Федерального агентства по техническому регулированию и
метрологии.

СВЕДЕНИЯ О СЕРТИФИКАТЕ ЭП

Сертификат: 1161EA000300C2018D02
Кому выдан: Мезенцева Оксана Васильевна
Действителен: с 24.06.2016 до 24.06.2017

Исп. И.Г.Иванилова
8(499)236-05-80

Внесение поправки ГОСТ 26030-2015

- Данный перечень предложений и исправлений был отправлен письмом руководителю Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии Абрамову А.Ф..
- В письме было указано, что разработчики Межгосударственного стандарта – ГОСТ 26030–2015 «Средства воспроизводства Сперма быков замороженная. Технические условия» ознакомились с замечаниями по данному стандарту, и пришли к выводу о необходимости внесения ряда дополнений и изменений.

Внесение изменений

Пункт	Трактовка ГОСТ 26030-2015	Замечания
4.3	Однородная, желтая или светло-желтая жидкость без посторонних примесей.	Характеристика приведена для нативной спермы. цвет замороженной спермопродукции зависит от компонентов разбавителя и может иметь, согласно п. 4.2 (...в соответствии с документами государства, принявшего данный стандарт) любой оттенок.
	Исключено примечание от 01.12.87к ГОСТУ 26030-83	Вернуть примечание от 01.12.87к ГОСТУ 26030-83 в сокращенной редакции «Допускается использовать сперму с подвижностью не ниже 3 баллов (30%) и количеством сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением не ниже 10 млн. для высокоценных быков-производителей признанных улучшателями по показателям продуктивности, а также для быков мясных пород .
4.5.2	Каждую упаковочную единицу спермы маркируют с указанием предприятия изготовителя и его товарного знака (при наличии), наименования продукции, номера серии, клички и инвентарного номера быка, даты замораживания	Длина соломинки стандартна и равна 13,3±0,1 см (возможен различный диаметр). Предписанный перечень информации на соломинку не поместится, либо он будет нечитабельным, следовательно, не будет иметь смысла. Более того дата изготовления пересекается с серийным номером. Стандартно на соломинке указывается название племпредприятия, кличка, номер и порода производителя, дата изготовления. Этого достаточно.
4.6.4.	Сперму, упакованную в канистры, пластиковые тубы, гоблеты или соломинки помещают в сосуды Дьюара различной вместимости и конструкции...	Соломинки также помещаются в тубы или пластиковые стаканы (гоблеты). Россыпью упаковывать соломинки в сосуд Дьюара категорически запрещается!

Утвержденные поправки ГОСТ 26030-2015

Поправка к ГОСТ 26030-2015

Средства воспроизводства

Сперма быков замороженная. Технические условия

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 4.3. Таблица 1. Графа «Характеристика и норма». Показатель «Внешний вид, консистенция, цвет»	светло-желтая	светло-желтая*
Показатель «Число сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в дозе, млн, не менее»	15	15**
Сноски	—	* Допускается другой цвет спермы, обусловленный разбавлением ** Допускается использовать сперму с количеством сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением не менее 10 млн в дозе для высокоценных в племенном отношении быков-производителей.
Пункт 4.4. Таблица 2. Графа «Наименование показателя»	Общее число непатогенных микроорганизмов в дозе, шт., не более Коли-титр, см ³ , не более	Общее число непатогенных микроорганизмов в дозе, КОЕ, не более Коли – титр

	Патогенные и условно-патогенные бактерии, грибы, вирусы и микоплазмы	Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы
графа «Норма»	0,1	Отрицательный
Подпункт 4.5.2, пятый абзац	— клички и инвентарного номера быка;	— клички, породы и инвентарного номера быка;
Раздел 6, пункт 6.3	Для проведения испытаний по показателям качества и безопасности от каждой серии отбирают две дозы спермы, упакованные в соломинки (пайеты) вместимостью 0,50 см ³ ; пять гранул спермы, замороженной объемом по 0,20 см ³ .	Для проведения испытаний по показателям качества и безопасности от каждой серии отбирают 10 доз спермы.
Раздел 7, пункт 7.10	Определение патогенных и условно-патогенных бактерий, вирусов, грибов – по ГОСТ ISO 8607 и ГОСТ 32198, микоплазмы – методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих тест-систем по документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.	Определение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов – по ГОСТ ISO 8607 и ГОСТ 32198.
Библиография. Позиция [2]	Ветеринарно-санитарный Кодекс МЭБ. Париж, 1997	—

Средние показатели качества биологических свойств семени

- Во всех исследуемых образцах спермы, разделенной по полу производства Великобритании присутствовали патологические формы сперматозоидов.
- В 80% этих образцов содержание аномальных форм превышали нормы по ГОСТ 54633-2011, где указано, что количество сперматозоидов с аномальной морфологией не должно превышать 18 %.

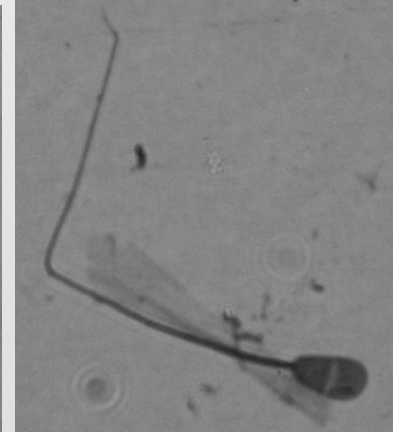
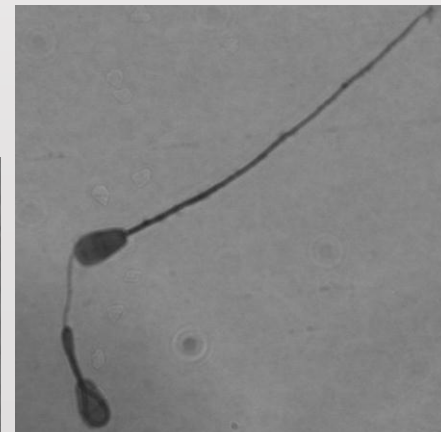
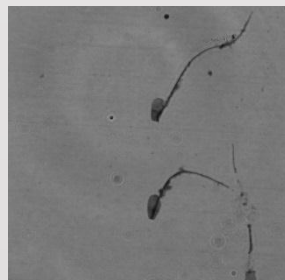
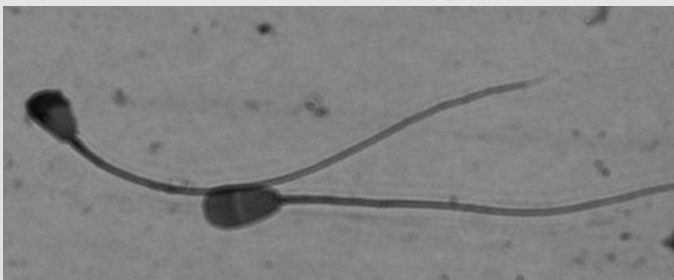
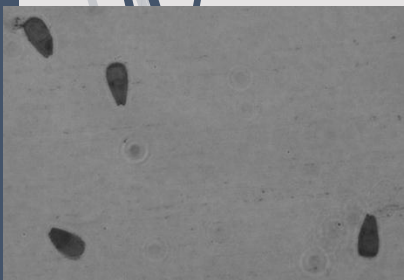
Сравнительный анализ биологических свойств спермы						
Сперма	Концентрация, млн в дозе	Общая подвижность %	ППД, %	Аномальные формы, %	Целостность акросомы, %	Индекс фрагментации, %
Сексированная импортная сперма (20 быков)	2	30	16,9	27	78	13,7
Импортная сперма не разделенная по полу (50 быков)	12,4	50,3	34	20	80	8,6
Отечественная сперма не разделенная по полу (100 быков)	35,6	60	40	6,9	81	1,32

Таблица 1. Сравнительный анализ биологических свойств спермы, разделенной и не разделенной по полу

Новые методы морфологического анализа

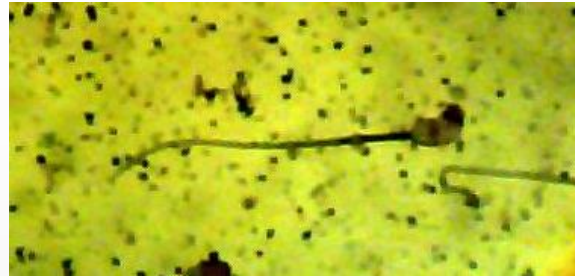
Быки-производители	Спермопроб исследовано	Патологические формы			
		Отделившаяся головка	Аномальная головка	Согнутые хвосты	Закрученные хвосты
20	40	23%	32%	36%	33%

- Согласно методике, описанной в ГОСТ 32277-2013 «определение содержания сперматозоидов с аномальной морфологией» применяют растворы эозина и азур-эозина по Романовскому.
- Мы предлагаем метод окраски при помощи красителя Farelly (Minitube), благодаря которому были оптимизированы условия идентификации и дифференциации видов патологических форм сперматозоидов (условия пробоподготовки, время окрашивания, параметры оценки результата).
- В рамках выполнения НИР было исследовано 120 быков (342 пробы), из них 100 быков (250 проб) отечественных племпредприятий и 70 быков (92 пробы) импортных племцентров. Из 70 импортных быков семя от 20 быков относилось к категории разделенного по полу.

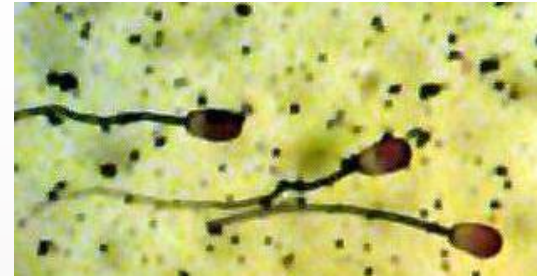


ОЦЕНКА АКРОСОМНОЙ РЕАКЦИИ

Результат окраски поврежденной акросомы сперматозоида

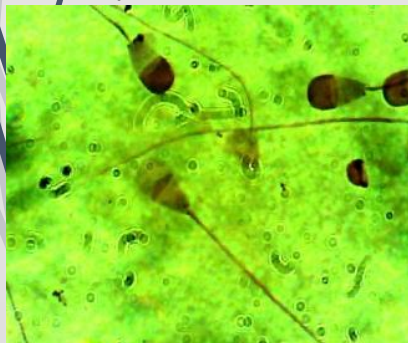


Результат окраски целой акросомы сперматозоида

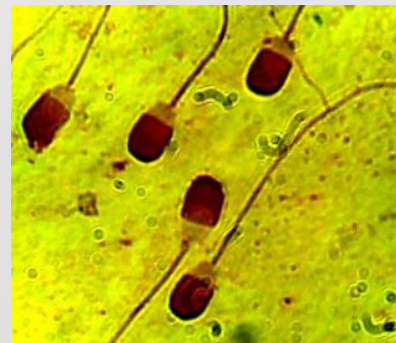


- При исследовании 100 проб от 100 быков в трехкратной повторности были получены следующие результаты: интактность акросомы сперматозоидов во всех случаях составила более 60 %, что соответствует значениям существующего ГОСТа, а с поврежденной акросомой соответственно от 20-до 40% сперматозоидов.
- При исследовании проб спермы, разделенной по полу от 20 быков было показано, что во всех исследуемых образцах средний показатель количества сперматозоидов с интактной акросомой составил у 19 быков 74%, а у одного быка Huijben DG Buick содержание количества сперматозоидов с интактной акросомой составило менее 50%, что не соответствует нормам ГОСТ Р 54633-2011
- Предлагаемая нами методика с использованием тест-набора Дифф-Квик позволяет получать результаты с высокой степенью достоверности и является более эффективной по сравнению с другими методами окраски акросомы сперматозоида животных-производителей.
- Данная методика была утверждена на Секции «Зоотехнии и ветеринарии» отделения сельскохозяйственных наук РАН РФ.

А)



Б)



Было показано, что сперматозоиды крупного рогатого скота с поврежденной акросомой при окрашивании красителями Дифф-Квик окрашиваются в светло-розовый цвет, в норме окрашиваются в коричневый:

а) сперматозоид с поврежденной акросомой
б) сперматозоид с целой акросомой;

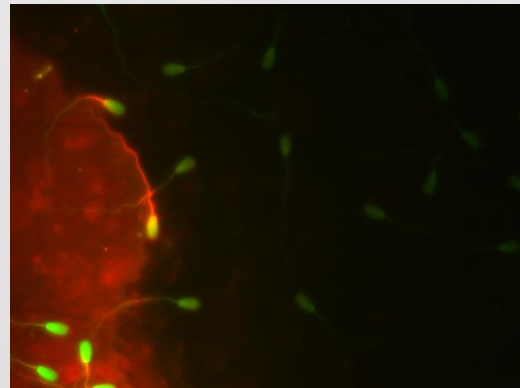
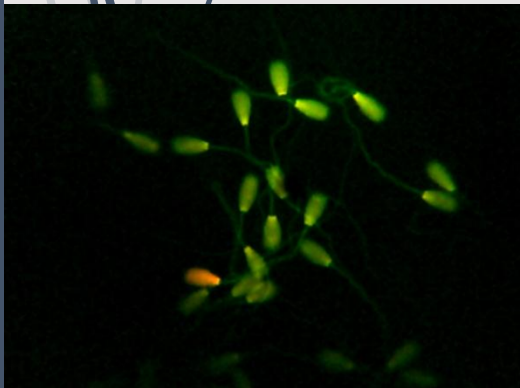
Исследование образцов закупленной сексированной спермы, в отделе электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии (МГУ)

- Бык 1: содержание интактных головок нормальной формы с нормальным строением хроматина и акросомы **17%**/ Сперматозоидов с гипоплазией акросомы – **66%**, с прореагировавшей акросомой – **5%**, с электронно-прозрачной акросомой – **43%.**, с аномалиями морфологии аксонемы жгутика – **3%**
- Бык 2: содержание интактных головок нормальной формы с нормальным строением хроматина и акросомы **15%**. Сперматозоидов с гипоплазией акросомы – **61%**, с прореагировавшей акросомой – **20%**, с электронно-прозрачной акросомой – **44%**. с аномалиями морфологии аксонемы жгутика – **7%**
- Бык 3: содержание интактных головок нормальной формы с нормальным строением хроматина и акросомы **12%**. Сперматозоидов с гипоплазией акросомы – **80%**, с прореагировавшей акросомой – **2%**, сперматозоидов с электронно-прозрачной акросомой – **74%**. с аномалиями морфологии аксонемы жгутика – **6%**
- Бык 4: содержание интактных головок нормальной формы с нормальным строением хроматина и акросомы **27%**. Сперматозоидов с гипоплазией акросомы – **61%**, с прореагировавшей акросомой – **5%**, с электронно-прозрачной акросомой – **45%.**, с аномалиями морфологии аксонемы жгутика – **4%**
- Исследования произведены д.б.н. Брагиной Е.Е. 21.04. 2017 г.

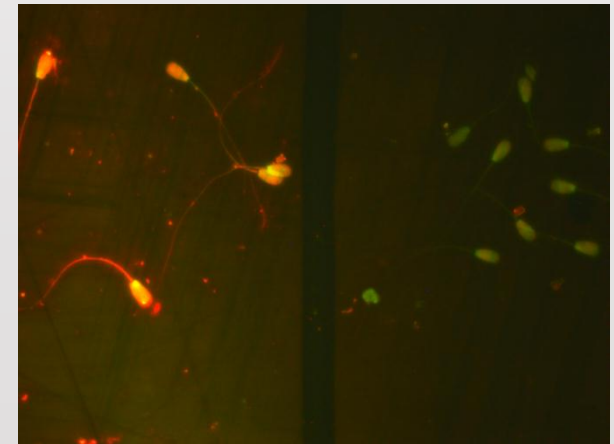
ОЦЕНКА СПЕРМОПРОБ, ПО ПОКАЗАТЕЛЮ ИНДЕКСА ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК-ХРОМАТИНА

При исследовании проб от 100 быков в трехкратной повторности были получены следующие результаты: индекс фрагментации ДНК сперматозоидов составил до 3 %, что характерно для быков с низкой подвижностью сперматозоидов.

- ▶ При исследовании проб спермы, разделенной по полу от 20 быков-производителей выявлено 4 быка с повышенным индексом фрагментации ДНК – более 30 % в головке сперматозоида и 6 быков с фрагментированной мт-ДНК – было зафиксировано свечение хвостовой части, т.е. установлена и зафиксирована митохондриальная дисфункция.
- ▶ Все исследованные пробы спермы разделенной по полу не соответствовали ГОСТ Р 54633-2011, число сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением составляло менее 40 %. Наши исследования подтвердили снижение подвижности сперматозоидов, а именно явление Астеноспермии у всех исследуемых проб, а также установили причину данного явления.
- ▶ Данная методика была утверждена на Секции «Зоотехнии и ветеринарии» отделения сельскохозяйственных наук РАН РФ.



Фрагментация ДНК
сперматозоида



- ▶ При выявлении индекса фрагментации более 30% спермопроба выбраковывается и не допускается для искусственного осеменения животных
- ▶ Проведенные исследования позволили ввести в отечественную ветеринарную андрологию не только новый термин, но и установить причину астеноспермии у семени, разделенного по полу, так популярного в нашей стране и малооправданного по эффективности его использования в искусственном осеменении.

**Повреждение
(фрагментация)
ядерной ДНК**

**Митохондриальная дисфункция
Мутации митохондриальной
ДНК**

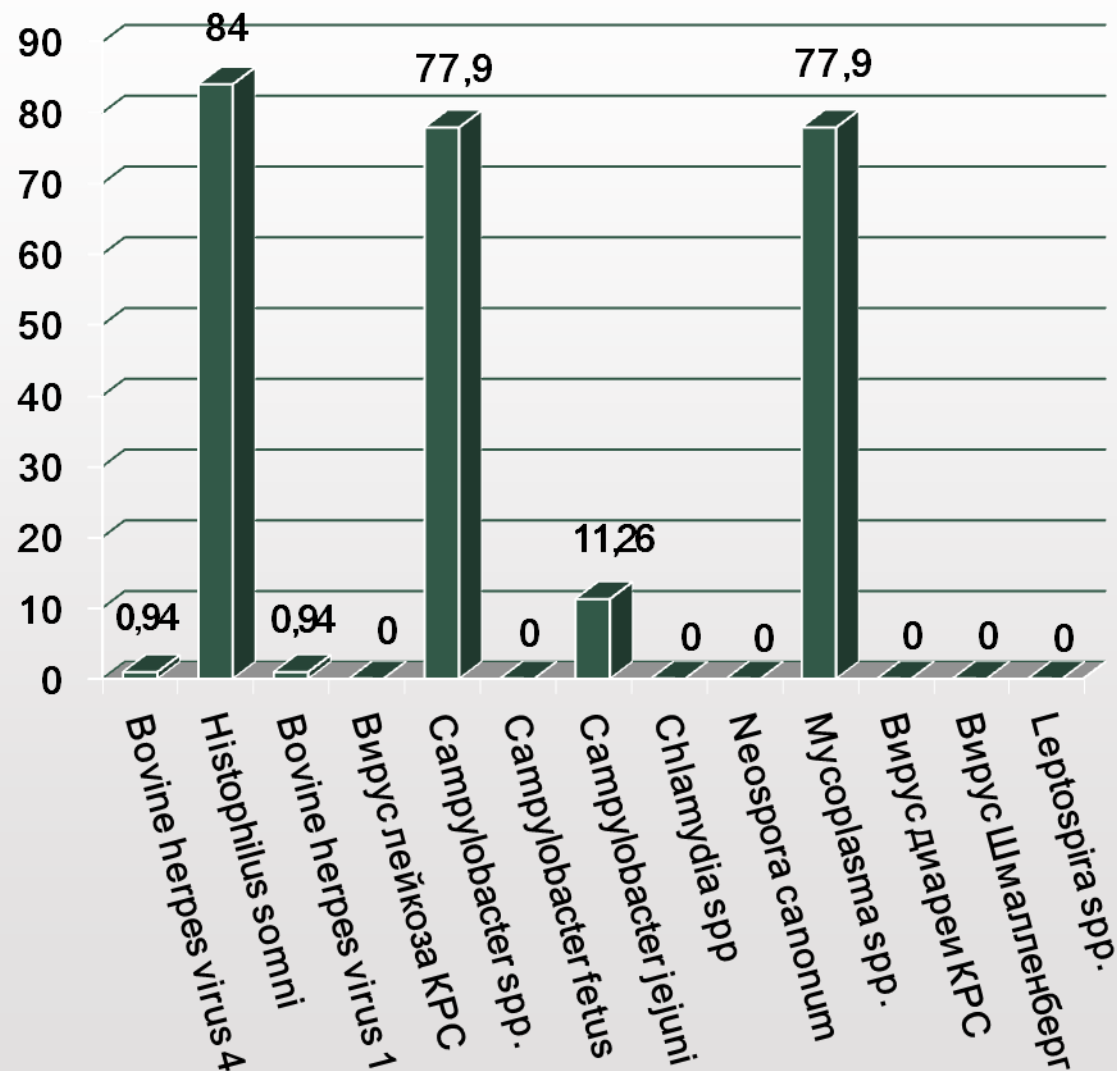


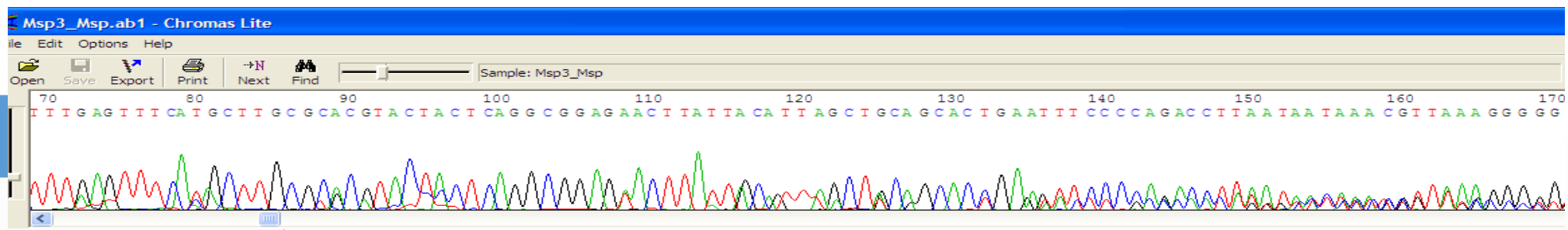
Микологическая экспертиза спермы

- Согласно используемому ГОСТ 32198-2013 на наличие грибов также как и в МУ 1978 года исследование спермы должно проводиться высевом на МПА, не предназначенном для выявления грибов, приспособленных к развитию в условиях низких температур и дифференциации выявляемых грибов.
- В настоящее время существуют питательные среды, позволяющие проводить более полное выявление и дифференциацию патогенных и условно-патогенных грибов.
- В работе были проведены микологические исследования 20 проб спермы с использованием современных дифференциальных сред. Были опробированы селективные добавки, проведено испытание рабочих характеристик питательных сред для выявления разных видов грибов, подобраны условия инокуляции и культивирования
- Метод основан на способности микромицетов, которые потенциально могут контаминировать сперму, расти на питательных средах.
- Метод заключается в посеве подготовленного образца спермы на набор питательных сред (Сабуро с глюкозой, Картофельно-глюкозный агар, среда с дихлораном и бенгальским розовым (DRBC), хромогенная среда для дифференциации грибов рода *Candida*) с дальнейшим культивированием микроскопических грибов и их идентификацией.
- Результат считается положительным, если как минимум на двух чашках из одного разведения обнаруживается рост аналогичных грибов, все чашки с контрольными средами чистые.
- Разработанные методические рекомендации по микологической экспертизе спермы войдут в дальнейшем в разрабатываемый проект методических указаний по ветеринарно-санитарному контролю качества замороженной спермы быков-производителей.

Выявление возбудителей инфекционных болезней животных в системе контроля племенных животных и племматериала продуктивных животных молекулярно-генетическими методами

- На диаграмме отмечены результаты обнаружения возбудителей инфекционных болезней животных (%).
- При исследовании образцов спермы на присутствие ДНК микроорганизмов рода *Campylobacter* положительный результат был получен для 77,9% образцов.
- Дополнительно было проведено исследование образцов спермы на наличие ДНК *C. fetus* и *C. jejuni*.
- Фрагменты генома *C. fetus* выявлены не были, а ДНК *C. jejuni* была обнаружена в 11,3% образцов, полученных из отечественных и иностранных племенных центров. Возможно, присутствие в большом числе сперматозоидов ДНК *C. jejuni* является следствием контаминации образцов при заборе семени.
- ДНК *Histophilus somni* была выявлена в 84% образцов. Есть свидетельства, что *Histophilus somni* может присутствовать в репродуктивном тракте здоровых животных, однако также оказывает негативное влияние на репродуктивные качества семени.
- ДНК вируса BHV 1 типа выявлена в 2-х образцах отечественного семени, ДНК BHV 4 типа – в 1 образце отечественной и 1 образце импортной спермы.

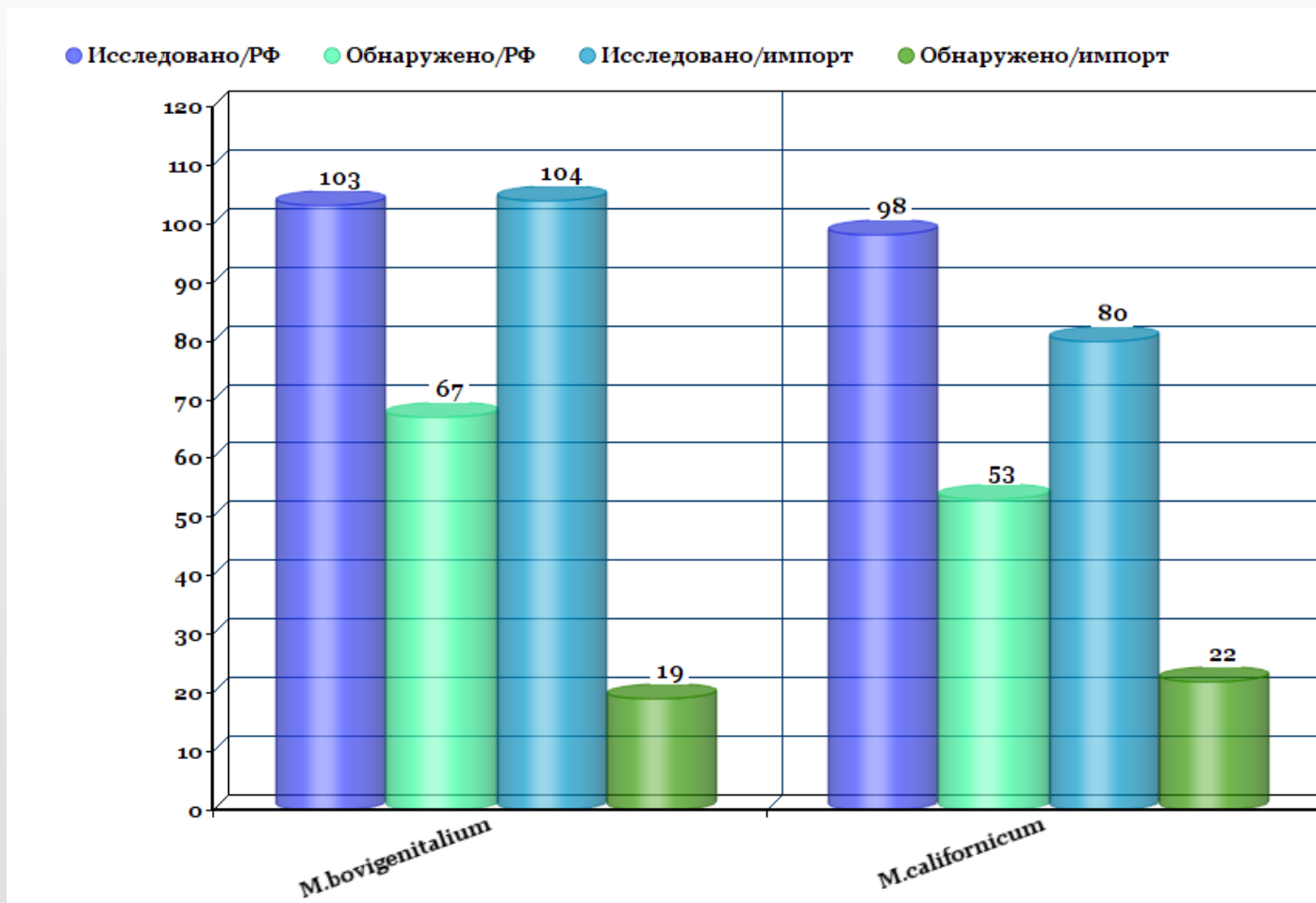




- Фрагменты ДНК *Mycoplasma spp.* были выявлены в 92% образцов спермы из отечественных племенных центров и в 62,7% образцов спермы из иностранных племенных хозяйств.
- Жизнеспособность микоплазм проверяли бактериологическим методом.
- В образцах сексированной спермы было наименьшее число обнаружений фрагментов генома патогенов.
- Чтобы уточнить видовую принадлежность микоплазм, для 33 образцов было проведено секвенирование продуктов ПЦР. В пробах обнаруживали *Mycoplasma bovis*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum*.
- Для большинства образцов было выявлено несколько сигналов чтения матрицы, что свидетельствует о возможном наличии в образце нескольких видов *Mycoplasma*.
- Для исключения контаминации спермопродукции видом *Mycoplasma bovis* образцы, для которых была выявлена генетическая неоднородность матрицы, были дополнительно исследованы с помощью набора LSI VetMAX™ на наличие *Mycoplasma bovis*. Ни в одном из исследованных образцов ДНК *Mycoplasma bovis* не была выявлена.
- Подобраны и синтезированы праймеры, позволяющие выявлять методом ПЦР в реальном времени *Mycoplasma bovis*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum* и собственные праймеры для ПЦР с электрофоретической детекцией для выявления *Histophilus somni*.

Результаты тестирования спермодоз с помощью подобранных праймеров для выявления 2-х видов микоплазм.

- ▶ Положительные образцы подтверждали секвенированием.
- ▶ Проводится разработка рекомбинантных контролей и валидация методики.



Разработка молекулярно-генетических методик идентификации мутаций, ассоциированных с наиболее распространенными наследственными патологиями КРС

- В рамках выполненной в 2016 году работы НИР были разработаны и утверждены методические рекомендации по идентификации мутаций, ассоциированных с наиболее распространенными наследственными патологиями КРС голштинской породы, молекулярно-генетическими методами.
- С использованием данной методики в 2017 году в рамках оценки распространенности генетических аномалий КРС были получены следующие данные:

BY		CVM		BLAD		DUMPS		CIT		FXID		CDH		
брахиспинальный синдром		комплексный порок позвоночника		недостаток адгезии лейкоцитов		недостаток уридинмонофосфат-синтетазы		цитруллинемии		дефицит фактора свертывания XI		дефицит холестерина		
всего	носитель	всего	носитель	всего	носитель	всего	носитель	всего	носитель	всего	носитель	болен	всего	носитель
151	2	191	4	213	1	203		218		231	1	1	238	10

Перспективы

- ▶ В связи с тем, что методические указания по ветеринарно-санитарному контролю качества спермы быков-производителей отменены приказом Минсельхоза РФ № 71 от 28.04.2005г в настоящий момент актуальным является модернизация и усовершенствование ветеринарно-санитарных требований, которые должны содержать всю исчерпывающую информацию по проведению контроля и мониторинга качества спермы быков производителей по эпизоотическим, генетическим и репродуктивным параметрам.
- ▶ В настоящий момент ведется работа по подготовке проекта методических указаний по биологическому мониторингу качества спермы быков-производителей, разделенной и не разделенной по полу.
- ▶ Необходимо внести изменения в Постановление Правительства РФ от 01.12.2009 № 982 «Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации и единого перечня продукции, подтверждение соответствия которой, осуществляется в форме принятий декларации о соответствии» в части включения импортного генетического материала продуктивных животных в список продукции, подлежащей обязательной сертификации