МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32277—2013

Средства воспроизводства

СПЕРМА

Методы испытаний физических свойств и биологического, биохимического, морфологического анализов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0–92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом животноводства Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии), Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ») и Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Научно-исследовательский институт племенного дела» (ФГБНУ «ВНИИплем»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации (ТК 148)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 59-П от 27 сентября 2013 г.)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 октября 2013 г. № 1261-ст введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 года

5 Взамен ГОСТ 20909.3–75, ГОСТ 20909.4–75, ГОСТ 20909.5–75 и ГОСТ 20909.6–75

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2014

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и рассмотрен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Средства воспроизводства

СПЕРМА

Методы испытаний физических свойств и биологического, биохимического, морфологического анализов

Product for reproduction.
Semen.
Physical, biological, biochemical, morphological analysis technique

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на свежеполученную неразбавленную, свежеполученную разбавленную и замороженную сперму производителей сельскохозяйственных животных (далее - сперма) и устанавливает методы испытаний физических свойств, биологического, биохимического и морфологического анализов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 6 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019–79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 302–79 Термометр медицинский максимальный стеклянный. Технические условия

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия

ГОСТ 2290-76 Бальзам пихтовый. Технические условия

ГОСТ 2874-82 Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством

ГОСТ 4014-75 Красители органические. Нигрозин водорастворимый. Технические условия

ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234-77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4478-78 Реактивы. Кислота сульфосалициловая 2-водная. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-1–2003 Точность (правильность и прецезионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и анализа

ГОСТ ИСО 5725-6–2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 5962-67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6507-90 Микрометры. Технические условия

ГОСТ 6672–75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 6995–77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 9284–75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 9293–74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия
ГОСТ 9307–78 Красители органические. Нигрозин спирторастворимый. Технические условия
ГОСТ 9412–93 Марля медицинская. Общие технические условия
ГОСТ 9949–76 Ксилол каменноугольный. Технические условия
ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 17299–78 Спирт этиловый технический. Технические условия
ГОСТ 21239–93 (ИСО 7741–86) Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний
ГОСТ 21241–89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний
ГОСТ 22280–76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия
ГОСТ 24104–2001 Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 25706-83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования
ГОСТ 27775–88 Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Термины и анализа
ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
ГОСТ 32222-2013 Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 27775.

4 Отбор проб спермы

Отбор проб – по ГОСТ 32222.

Для анализов используют свежеполученную неразбавленную и разбавленную сперму, хранившуюся при температуре 30 °С – 35 °С не более 30 мин с момента ее получения, и замороженную сперму, хранившуюся не более 30 мин после оттаивания.

5 Методы испытаний физических свойств

5.1 Определение цвета

Цвет спермы определяют визуально при хорошем естественном или искусственном освещении.

5.2 Определение объема и массы эякулята

5.2.1 Объем эякулята в кубических сантиметрах (см^3) определяют в градуированных спермоприемниках или мерной стеклянной пипеткой.

5.2.2 Массу эякулята в граммах (г) определяют взвешиванием на лабораторных весах типа ВЛТ-500 (ВТК-500) с погрешностью не более ± 0,08 г по ГОСТ 24104.

5.3 Определение pH

5.3.1 Сущность метода

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

5.3.2 Средства измерений, материалы и реактивы

Для проведения анализа применяют:

- pH-метр-милливольтметр с диапазоном измерения от 0 до 14 ед. pH, погрешностью ± 0,04 ед. pH;

- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- калий хлористый по ГОСТ 4234;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

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

5.3.3 Проведение анализа

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

5.3.4 Обработка результатов

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами двух измерений не должны превышать ± 0,1ед. pH.

5.4 Определение осмотического давления

5.4.1 Сущность метода

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

5.4.2 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Для проведения анализа применяют:

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

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

5.4.3 Подготовка к проведению анализа

5.4.3.1 Готовят термос с одной из следующих охлаждающих смесей:

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

Температуру в термосе постоянно поддерживают на уровне минус 38 °С – минус 40 °С.

5.4.3.2 Перед началом анализа проводят настройку термометра, устанавливая на нем нулевую точку. Для этого термометр вначале помещают в мелкораздробленный тающий лед или снег и наблюдают уровень ртути в капилляре.

Затем устанавливают нулевую точку на термометре по замерзанию дистиллированной воды, определяя ее следующим образом. Закрепляют на штативе пробирку с размером диаметра 2,2 – 2,5 см. Во вторую пробирку меньшего диаметра наливают дистиллированную воду в таком объеме, чтобы после введения в пробирку термометра с надетой на него проволочной мешалкой его ртутный резервуар был полностью погружен в воду. На пробирку с термометром и дистиллированной водой надевают два резиновых кольца. Подготовленную таким образом пробирку с термометром вставляют в пробирку, закрепленную в штативе. Пробирки с термометром опускают в термос (ванну) с охлаждающей смесью. В процессе охлаждения воду беспрерывно помешивают вертикальными движениями мешалки, постоянно наблюдая за понижением уровня ртути в капилляре. При переохлаждении воды начинает выделяться теплота кристаллизации и столбик ртути быстро поднимается до истинной температуры замерзания воды, оставаясь некоторое время на этом уровне. Температуру замерзания воды регистрируют с точностью до 0,2 °С.

5.4.4 Проведение анализа

В промытую и тщательно подсушенную фильтровальной бумагой пробирку наливают сперму в таком количестве, чтобы ртутный резервуар термометра был полностью погружен в нее. Пробирку с термометром помещают во вторую пробирку, закрепленную в штативе. Температуру замерзания спермы устанавливают по 5.4.3.2. При определении осмотического давления разных эякулятов пробирку и термометр после каждого испытания тщательно ополаскивают дистиллированной водой и просушивают.

5.4.5 Обработка результатов

5.4.5.1 Осмотическое давление спермы при температуре 0 °С P_0, Па (кгс/см^2), вычисляют по формуле

$$P_0 = K \cdot \Delta t\,, \qquad (1)$$

где K – постоянный коэффициент, используемый при расчете осмотического давления, равный 1,204 Па×град$^{-1}$ или 12,04 кгс×см$^{-2}$×град$^{-1}$;

Δt – разность между нулевой точкой на термометре и истинной температурой замерзания спермы, °С.

Результат округляют до третьего десятичного знака.

Пример

Нулевая точка на термометре установлена на уровне 4,46 °С. После трехкратного измерения истинная температура замерзания спермы составляла 3,80 °С, 3,81 °С и 3,80 °С. Таким образом, среднеарифметическое значение температуры замерзания спермы составит 3,80 °С.

Разность температуры Δt = 4,46 - 3,80 = 0,66 °С.

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

P0 = 1,204 (или 12,04) · 0,66 = 0,794 Па (или 7,94 кгс/см2).

5.4.5.2 Осмотическое давление спермы при заданной температуре P_n, Па (кгс/см^2), вычисляют по формуле

$$P_n = \left(\frac{T_0 + t_n}{T_0}\right) P_0\,, \qquad (2)$$

где T_0 – константа, равная 273°С;

t_n – температура, при которой требуется определить осмотическое давление спермы, °С;

P_0 – осмотическое давление при температуре 0 °С, Па (кгс/см^2).

Результат округляют до второго десятичного знака.

Пример

Осмотическое давление спермы при температуре 39 °С составляет: P39 = (273 +39) / 273 · 0,79 (или 7,94) = 0,91 Па (или 9,1 кгс/см2).

5.5 Определение концентрации сперматозоидов

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

5.5.1 Определение концентрации сперматозоидов в счетной камере

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

5.5.1.2 Оборудование, материалы и реактивы

Для проведения анализа применяют:

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

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

5.5.1.3 Проведение анализа

Сперму тщательно перемешивают и набирают до метки «1» в меланжер, предварительно обработанный смесью спирта и эфира в соотношении 1 : 1 и высушенный. Для разбавления спермы и обездвиживания сперматозоидов в меланжер вводят до метки «101» 3 %-ный раствор хлористого натрия (разбавление спермы в 100 раз). Зажав большим и указательным пальцами оба конца наполненного меланжера, тщательно перемешивают содержимое, переворачивая меланжер вверх и вниз не менее 60 раз.

Удалив из меланжера первые три – четыре капли, кончик меланжера обтирают марлевой салфеткой и осторожно наносят одну каплю смеси на край притертого к счетной камере шлифовального покровного стекла. Капля, затекая под стекло, заполняет камеру Горяева. Подсчет сперматозоидов проводят при таком увеличении микроскопа, чтобы в поле зрения помещалось 16 малых (один большой) квадратов. Сперматозоиды подсчитывают в 80 малых (пяти больших) квадратах, расположенных по диагонали. Для подсчета сперматозоидов, расположенных в глубине камеры, постоянно вращают микровинт. Положение сперматозоидов внутри или вне квадрата определяют по месту нахождения головки. Головки, расположенные на левой и верхней линиях, относят к тому квадрату, в котором проводят подсчет. Головки можно также учитывать на правой и нижней линиях.

5.5.1.4 Обработка результатов

Концентрацию сперматозоидов спермы C, млрд/см^3, вычисляют по формуле

$$C = \frac{n}{200}, \tag{3}$$

где n – количество подсчитанных сперматозоидов в 80 маленьких квадратах;

200 – постоянный коэффициент.

Пример

В 80 маленьких (пяти больших) квадратах насчитали 100 сперматозоидов. Следовательно, концентрация сперматозоидов в см3 составит

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

5.5.2 Определение концентрации сперматозоидов путем измерения светорассеяния

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

5.5.2.2 Средства измерений, материалы, посуда и реактивы

Для проведения анализа применяют:

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

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

5.5.2.3 Подготовка к проведению анализа

Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика используют сперму с высокой концентрацией сперматозоидов, из которой готовят разведения различной концентрации. Например, берут сперму с концентрацией сперматозоидов, равной 1,2 млрд/см^3. Сперму разводят 3,5 %-ным раствором лимоннокислого

натрия в соответствии с таблицей 1 из расчета приготовления разведений с интервалом концентрации сперматозоидов в растворе от 0,02 до 0,20 млрд/см^3.

Таблица 1

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

Концентрацию сперматозоидов в каждом разведении уточняют, подсчитывая их количество в камере Горяева по 5.5.1. Измеряют оптическую плотность приготовленных разведений при (675 ± 25) нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Для построения градуировочного графика откладывают по оси абсцисс значения концентрации сперматозоидов, а по оси ординат – соответствующие им величины оптической плотности. Градуировочный график строят для каждого прибора. Проверку градуировочного графика проводят ежемесячно.

5.5.2.4 Проведение анализа

В чистую пробирку наливают 5см^3 3,5 %-ного раствора лимоннокислого натрия и микропипеткой вносят точно 0,02 см^3 свежеполученной спермы быков; 0,01 см^3 свежеполученной спермы баранов и козлов; 0,2 см^3 свежеполученной спермы хряков и жеребцов, не допуская попадания пены или вазелина. Перед внесением спермы в раствор лимоннокислого натрия микропипетку вытирают снаружи чистой марлевой салфеткой для удаления излишка спермы. После внесения спермы микропипетку промывают в этом же растворе, набирая раствор в пипетку и выдувая его не менее трех раз. Суспензию тщательно перемешивают, осторожно переворачивая закрытый флакончик, не допуская при этом образования пены.-

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

5.5.2.5 Обработка результатов

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

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

6 Методы биологических анализов

6.1 Определение подвижности сперматозоидов

6.1.1 Сущность метода

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

6.1.2 Оборудование, материалы, посуда и реактивы

Для проведения анализа применяют:

- микроскоп биологический увеличением 150 – 200 раз;
- столик электрообогреваемый к микроскопу, обеспечивающий поддержание температуры спермы в пределах (37 ± 1) °С;
- термобокс водяной или электрический, обеспечивающий поддержание температуры (37 ± 1) °С;
- корнцанг;
- пинцет анатомический по ГОСТ 21241;

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

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

6.1.3 Подготовка к проведению анализа

6.1.3.1 От каждого свежеполученного эякулята отбирают 0,1 – 0 ,5 $см^3$ спермы; от каждой партии замороженной спермы, расфасованной в соломинки, облицованные или необлицованные гранулы, отбирают из жидкого азота по две дозы и помещают в отдельный сосуд Дьюара.

6.1.3.2 В чистую стерильную пробирку мерной пипеткой вносят 0,5 $см^3$ 2,9 %-ного раствора лимоннокислого натрия. Затем пробирки закрывают резиновыми пробками и ставят в термостат при температуре /(37 ± 1) °С на срок не более 30 мин.

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

6.1.3.4 Затем объем содержимого пробирок доводят до 1 $см^3$ 2,9 %-ным раствором лимоннокислого натрия, пробирки закрывают резиновыми пробками и перемешивают. Пробирки помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на срок не более 30 мин.

6.1.4 Проведение анализа

На электрообогревательный столик микроскопа помещают предметное стекло и после его нагрева до температуры (37 ± 1) °С стерильной пастеровской пипеткой из пробирки, находящейся в термобоксе, наносят небольшую каплю разбавленной спермы и покрывают стеклом. Устанавливают увеличение, дающее возможность добиться четкого изображения, и, просматривая весь препарат, выбирают участок с небольшим движением сперматозоидов. Определяют визуально в трех полях зрения соотношение сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением (ППД) к общему количеству сперматозоидов, включая и неподвижных, а также сперматозоидов, имеющих манежное и колебательное движение. В случае оценки свежеполученной спермы допускается проведение анализа в капле неразбавленной спермы.

6.1.5 Обработка результатов

Результаты анализа представляют в процентах.

6.2 Определение выживаемости сперматозоидов при температуре (37 ± 1) °С после оттаивания спермы

6.2.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в определении количества сперматозоидов в замороженной сперме, сохранивших прямолинейное поступательное движение (ППД) после оттаивания и хранения в течение 5 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С.

6.2.2 Оборудование, материалы, посуда и реактивы

Оборудование, материалы, посуда и реактивы – по 6.1.2 и 6.2.2.

6.2.3 Подготовка к проведению анализа

Оттаянную сперму в пробирке № 2 по 6.1.3.3 инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 ч.

6.2.4 Проведение анализа

После 1, 2 и 5 ч инкубации спермы в термостате определяют подвижность сперматозоидов по 6.1.

6.2.5 Обработка результатов

Сперматозоиды имеют выживаемость не менее 5 ч, если после 5 ч инкубации спермы в термостате при температуре (37 ± 1) °С в ней обнаруживают не менее 1 % сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением (ППД).

7 Методы биохимического анализа

7.1 Определение содержания кетоновых тел

7.1.1 Сущность метода

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

7.1.2 Оборудование и реактивы

Для проведения анализа применяют:

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

Допускается использование других реактивов и посуды по качеству не ниже вышеуказанных.

7.1.3 Подготовка к проведению анализа

7.1.3.1 Приготовление 10 %-ного раствора сульфосалициловой кислоты

В стеклянную пробирку вместимостью 10 $см^3$ по ГОСТ 25336 вносят 1,00 г порошка сульфосалициловой кислоты и растворяют в 9,0 $см^3$ дистиллированной воды.

Раствор применяют свежеприготовленным.

7.1.3.2 Приготовление 40 %-ного раствора гидроокисида натрия

В стеклянной пробирке вместимостью 10 $см^3$ по ГОСТ 25336 растворяют 4,00 г гидрооксида натрия в 6,0 $см^3$ дистиллированной воды.

Раствор применяют свежеприготовленным.

7.1.4 Проведение анализа

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

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

7.1.5 Обработка результатов

Массовую долю кетоновых тел в процентах определяют по интенсивности окрашивания кольца:

- слабо-розовое и светло-малиновое окрашивание – 0,5 – 2,9 · 10^{-3} %;
- окрашивание в малиновый цвет – 3,0 – 3,4 · 10^{-3} %;
- окрашивание в вишневый цвет – 3,5 – 4,9 · 10^{-3} %;
- окрашивание в темно-вишневый цвет – более 5 · 10^{-3} % кетоновых тел.

8 Методы морфологического анализа

8.1 Определение содержания сперматозоидов с аномальной морфологией и включений

8.1.1 Сущность метода

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

Примечание – К аномальным формам относят сперматозоиды с отклонениями в строении головки (микроскопическая, круглая, несимметричная, укороченная, заостренная, двойная, без мембраны или жгутика), шейки (двойная, ломаная, изогнутая, укороченная), тела (изогнутое, удвоенное, нитевидное, с цитоплазматической

капелькой), жгутика (изогнутый, двойной, извитой, скрученный, рудиментарный). К включениям спермы относятся форменные элементы крови, эпителиальные клетки и т.д.

8.1.2 Оборудование, материалы, посуда и реактивы

Для проведения анализа применяют:

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

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

8.1.3 Подготовка к проведению анализа

8.1.3.1 Приготовление 0,9 %-ного раствора хлористого натрия

В колбе вместимостью 100 $см^3$ растворяют 0,9 г хлористого натрия по ГОСТ 4233 в 91,0 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – не более 30 дней.

8.1.3.2 Приготовление 10 %-ного рабочего раствора нигрозина

В пробирке вместимостью 10 $см^3$ растворяют 1,0 г нигрозина в 9,0 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора в темном месте при комнатной температуре – не более 30 дней.

8.1.3.3 Приготовление 10 %-ного раствора эозина

В пробирке вместимостью 10 $см^3$ растворяют 1,0 г эозина в 9,0 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – не более 30 дней.

8.1.4 Проведение анализа

8.1.4.1 В пробе спермы определяют концентрацию сперматозоидов по 5.5 и затем доводят ее до концентрации 0,2 – 0,4 млрд/$см^3$, добавляя 0,9 %-ный раствор хлористого натрия. Приготавливают мазки спермы на сухих предметных стеклах, предварительно обезжиренных в течение 3 ч в смеси, состоящей из равных частей этилового спирта с петролейным эфиром.

Каплю подготовленной для анализа спермы пипеткой переносят на край предметного стекла и шлифовальным покровным стеклом делают мазок, проводя покровное стекло вдоль предметного, наклонив его на 45° в сторону, противоположную направлению движения.

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

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

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

Окрашивание эозином

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

Окрашивание азур-эозином по Романовскому

Используют готовую краску Гимза, представляющую собой смесь в определенных пропорциях метилен-азура, метиленового фиолетового и метиленового синего.

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

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

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

8.1.5 Обработка результатов

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

Содержание патологических форм сперматозоидов $N_П$, %, вычисляют по формуле

$$N_П = \frac{П}{П + Н} 100, \quad (4)$$

где П – количество патологических форм сперматозоидов, шт.;

Н – количество нормальных форм сперматозоидов, шт.

Содержание включений спермы $N_В$, %, вычисляют по формуле

$$N_В = \frac{В}{П + Н} 100, \quad (5)$$

где В – количество включений спермы, шт.

Пример

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

Следовательно, содержание патологических форм вычисляют по формуле

$$N_p = \frac{25}{25 + 85} 100 = 22{,}7\ \% \quad ,$$

содержание включений:

$$N_p = \frac{7}{25 + 85} 100 = 6{,}3\ \%.$$

8.2 Определение количества мертвых сперматозоидов

8.2.1 Сущность метода

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

8.2.2 Оборудование, материалы и реактивы

Для проведения испытания применяют:

- микроскоп биологический различных марок с увеличением 600 – 1350 раз (окуляр 15×, объектив 40× или 90×);
- pH-метр-милливольтметр типа pH-340 с диапазоном измерения от 0 до 14 ед. pH, погрешность ± 0,04 ед. pH;
- термостат для микроскопа, обеспечивающий поддержание температуры (37 ± 1) °С;
- весы типа ВЛТ-500 (ВТК-500) с погрешностью не более ± 0,08 г по ГОСТ 24104;
- стекла предметные 26 × 100 по ГОСТ 9284;
- стекла покровные 18 × 18 по ГОСТ 6672;
- стеклянные колбы по ГОСТ 1770 вместимостью 100 $см^3$;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- эозин водорастворимый;
- нигрозин водорастворимый по ГОСТ 4014;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, 3 %-ный раствор;
- эфир петролейный;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

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

8.2.3 Подготовка к проведению анализа

8.2.3.1 Вымытые и высушенные предметные стекла обезжиривают, выдерживают в течение 3 ч в смеси равных объемов этилового спирта с петролейным эфиром.

8.2.3.2 Приготовление 1 %-ного раствора лимонной кислоты

В колбе вместимостью 100 $см^3$ растворяют 1,0 г лимонной кислоты в дистиллированной воде и доводят объема раствора до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 10 дней.

8.2.3.3 Приготовление 3 %-ного раствора лимоннокислого натрия

В колбе вместимостью 100 $см^3$ растворяют 3,0 г лимоннокислого натрия в дистиллированной воде и доводят объем раствора до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 10 дней.

8.2.3.4 Для доведения 3 %-ного раствора лимоннокислого натрия раствора до pH = 7,2 ± 0,1 добавляют 1 %-ный раствор лимонной кислоты по 8.2.3.2. Полученный раствор используют свежеприготовленным.

8.2.3.5 Приготовление красок

1,5 г эозина и 10 г нигрозина растворяют в мерной колбе вместимостью 100 $см^3$ в 3 %-ном растворе лимоннокислого натрия с pH 7,2 ± 0,1 до метки.

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

8.2.3.6 Подготовка пробы

В сперме определяют концентрацию сперматозоидов по 5.5. Сперму с высокой концентрацией сперматозоидов разбавляют до концентрации 0,2 – 0,4 млрд/ $см^3$ 3 %-ным раствором лимоннокислого натрия.

8.2.4 Проведение анализа

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

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

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

8.2.5 Обработка результатов

Количество мертвых сперматозоидов H_C, %, вычисляют по формуле

$$H_C = \frac{C^+}{C^- + C^+} 100 \quad , \tag{6}$$

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

C^- – количество сперматозоидов с неокрашенными головками, шт.

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

8.3 Определение размеров сперматозоидов

8.3.1 Сущность метода

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

8.3.2 Оборудование, материалы и реактивы

Для проведения анализа применяют:

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

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

8.3.3 Подготовка к проведению анализа

8.3.3.1 Масштаб линейки и окулярного винтового микрометра меняют в зависимости от применяемого окуляра, объектива и величины тубуса микрометра. Истинную величину деления линейки определяют объект-микромет-ром. Для этого на предметный столик микроскопа помещают объект-микрометр, фиксируют объектив на шкале объект-микрометра и, наблюдая в микроскоп, совмещают линейки окуляр- и объект-микрометра. Определяют, сколько делений объект-микрометра приходится на определенное число делений окуляр-микрометра.

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

$$N = \frac{n_1}{n_2} \quad , \tag{7}$$

где n_1 – число делений объект-микрометра, умноженное на величину одного деления, мкм;

n_2 – число делений микрометра окулярного винтового, совпадающих с числом делений объект-микрометра.

Пример

Пять делений объект-микрометра покрывают 20 делений окуляр-микрометра. Одно деление объект-микрометра равно 10 мкм. В этом случае одно деление линейки окуляр-микрометра будет равно

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

8.3.3.2 Готовят раствор 3%-го лимоннокислого натрия по 8.2.3.3.

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

8.3.3.4 В сперме определяют концентрацию сперматозоидов по 5.5. Сперму, имеющую высокую концентрацию, разбавляют до концентрации 0,2 – 0,4 млрд/см^3 3 %-ным раствором лимоннокислого натрия.

8.3.4 Проведение анализа

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

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

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

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

8.3.5 Обработка результатов

Длину l_c или ширину b_c одного сперматозоида, мкм, вычисляют по формуле

$$l_c\ (b_c) = N \cdot n, \tag{8}$$

где N – значение одного деления шкалы микрометра окулярного винтового, мкм;

n – число делений шкалы микрометра окулярного винтового, приходящееся на длину или ширину сперматозоида.

Результат округляют до третьего десятичного знака.

8.4 Определение целостности акросомы

8.4.1 Сущность метода

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

8.4.2 Оборудование, материалы и реактивы

Для проведения анализа применяют:

- микроскоп биологический типа МБИ или МБР с окуляром 15× и объективом 40×;
- весы типа ВЛТ-500 (ВТК-500) с погрешностью не более ± 0,08 г по ГОСТ 24104;
- термометр медицинский максимальный типа ТБ-1Б по ГОСТ 302 с диапазоном измерения температур от 32 °С до 42 °С с пределом допускаемой погрешности ± 0,1 °С;
- стекла предметные 26 × 100 по ГОСТ 9284;
- стекла покровные 18 × 18 по ГОСТ 6672;
- стеклянные колбы по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3;
- эозин водорастворимый;
- нигрозин водорастворимый по ГОСТ 4014;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, 3 %-ный раствор;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

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

8.4.3 Подготовка к проведению анализа

8.4.3.1 Вымытые и высушенные предметные стекла обезжиривают, выдерживая в течение 3 ч в смеси равных объемов этилового спирта с петролейным эфиром.

8.4.3.2 Приготовление красок

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды, 0,67 г эозина и 5 г нигрозина.

8.4.3.3 Подготовка пробы

Сперму, имеющую высокую концентрацию, разбавляют до концентрации 0,2 – 0,4 млрд/ см^3 3 %-ным раствором лимоннокислого натрия.

8.4.4 Проведение анализа

В пробирке проводят разбавление спермы приготовленным раствором краски в соотношении 1 : 8 при температуре раствора 37 °С. Раствор спермы инкубируют в течение 10 – 15 с. После чего на

чистое, обезжиренное, подогретое до температуры 37 °С предметное стекло наносят небольшую каплю смеси спермы и краски (10 μl) с помощью стеклянной палочки и накрывают покрывным стеклом. Приготовленный образец микроскопируют с иммерсионной системой микроскопа при увеличении 600^{x}.

В каждом препарате подсчитывают по 100 сперматозоидов. Отдельно считают количество сперматозоидов с целой (неокрашенной) акросомой и с поврежденной (окрашенной) акросомой. Сперматозоиды с акросомами, окрашенными частично, относят к поврежденным.

8.4.5 Обработка результатов

Количество сперматозоидов с поврежденной акросомой $A_п$, %, вычисляют по формуле

$$A_п = \frac{C^+}{C^- + C^+} 100 \quad (9)$$

где C^+ – количество сперматозоидов с окрашенными акросомами, шт.;

C^- – количество сперматозоидов с неокрашенными акросомами, шт.

За окончательный результат, округленный до третьего десятичного знака, принимают среднеарифметическое значение результатов не менее чем трех измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами определений не должны превышать 10 %.

9 Контроль точности результатов измерения

Контроль точности результатов измерений предусматривает проведение контроля стабильности показателей повторяемости и промежуточной прецизионности измерений с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (раздел 6).

10 Требования безопасности

10.1 При подготовке и проведении анализов необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007 и требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004.

10.2 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

УДК 619:611-031.11:001.4 (083-74) МКС 11.220

Ключевые слова: свежеполученная разбавленная сперма, свежеполученная неразбавленная сперма, замороженная сперма, термины и определения, отбор проб спермы, методы испытаний физических свойств, методы биологических анализов, методы биохимического анализа, методы морфологического анализа, контроль точности результатов измерения, требования безопасности

Подписано в печать 01.11.2014. Формат $60 \times 84^{1}/_{8}$.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 33 экз. Зак. 4047.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru