

Международные новости в области ИО от Minitube

SpermNotes®

Высокоэффективное производство спермы хряков

План хрячника и лаборатории.....	02
Современные лаборатории по производству спермы хряков.....	05
Производство высококачественной спермы в Германии.....	08
Значение качества воды в лаборатории по производству спермы хряков.....	09

План хрячника и лаборатории

План лаборатории

Хрячник является центральной точкой организации в свиноводстве. Основной целью хрячника является производство жидкой генетики (= спермы хряка) наивысшего качества и наиболее эффективно.

Для выполнения данных требований должны быть хорошо спроектированы хрячник и лаборатория по производству спермы. На рисунке 1 изображена станция на 100-200 хряков со всеми необходимыми сооружениями. В каждом из хрячников (1) могут содержаться до 100 хряков.

Биозащита является важным аспектом, поэтому необходимо

препятствовать контакту ценных животных с любым возможным прямым или косвенным источником заражения. На рисунке показан двойной забор, выступающий в качестве ограждения от диких животных, людей и транспортных средств, которые не должны попадать на территорию станции. Только чистые и продезинфицированные транспортные средства могут пересекать внешнее ограждение. Сотрудники и посетители станции должны пройти через внутреннее ограждение, чтобы получить доступ к рабочим областям. По возможности, следует предотвращать любое перемещение людей и транспортных средств.

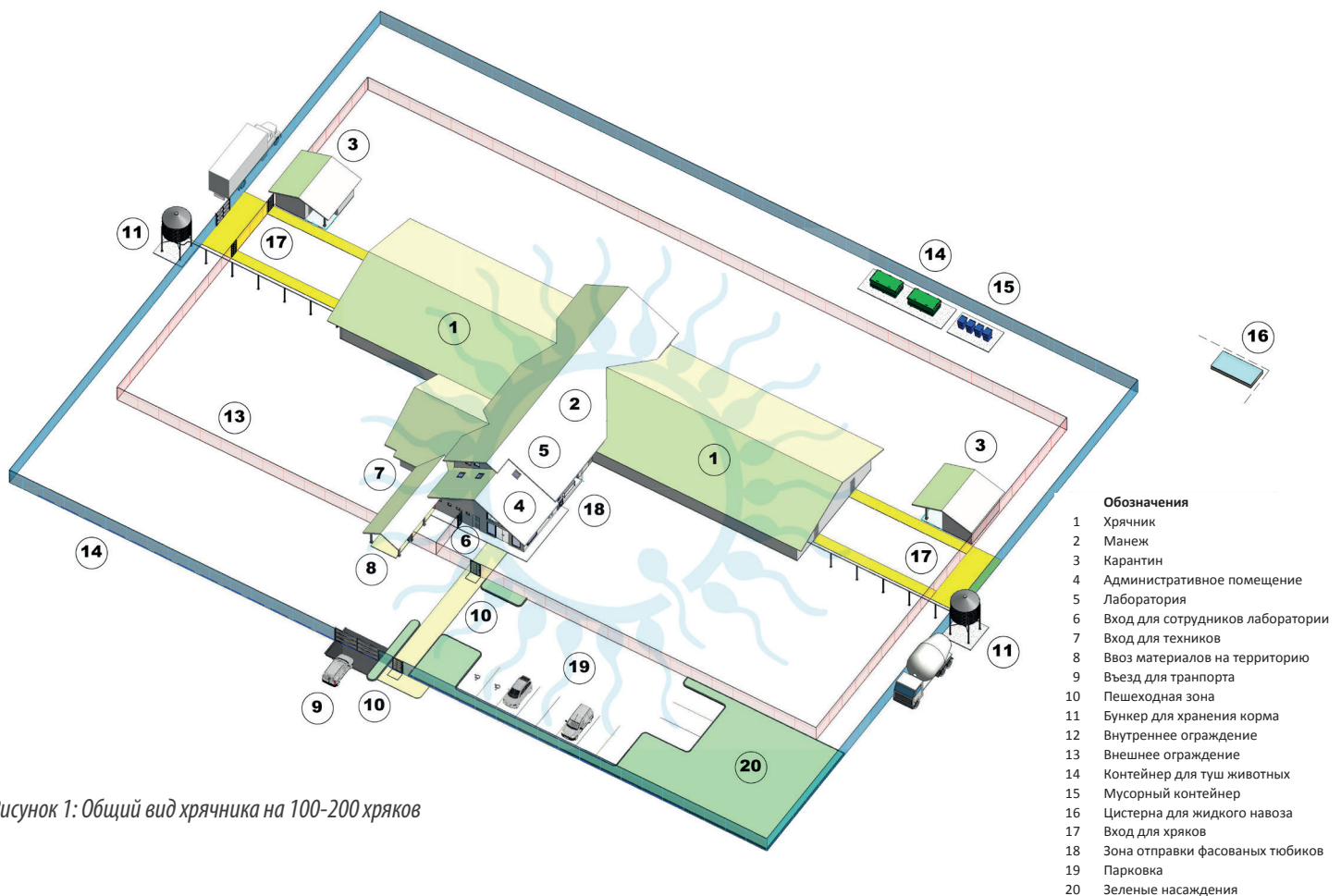


Рисунок 1: Общий вид хрячника на 100-200 хряков

План лаборатории

Лаборатория по производству спермы хряка на рисунке 3 организована в соответствии с оптимальным рабочим процессом обработки спермы. Сперма, собранная у хряков в манеже, поступает в лабораторию через шлюз и, в первую очередь, проходит взвешивание (3) для определения объема эякулята. Во время процесса проведения анализа спермы эякуляты остаются теплыми (4). Анализ спермы включает оценку подвижности и концентрации с помощью микроскопа и системы CASA, такой как AndroVision® (5). После ввода данных в лабораторное программное обеспечение,

такое как IDEE, сперма хряков разбавляется (6, 7). На следующем этапе сперма хряка фасуется в тубики с помощью устройства для фасовки, запайки и маркировки типа MiniBSP (8, 9). Тележка (10) помогает собирать и организовывать уже фасованные тубики. После фасовки тубики либо хранятся при комнатной температуре, либо передаются в зону охлаждения/упаковки при 16°C (11), в зависимости от протокола работы лаборатории. В холодной комнате тубики со спермой хранятся и упаковываются для доставки клиенту.

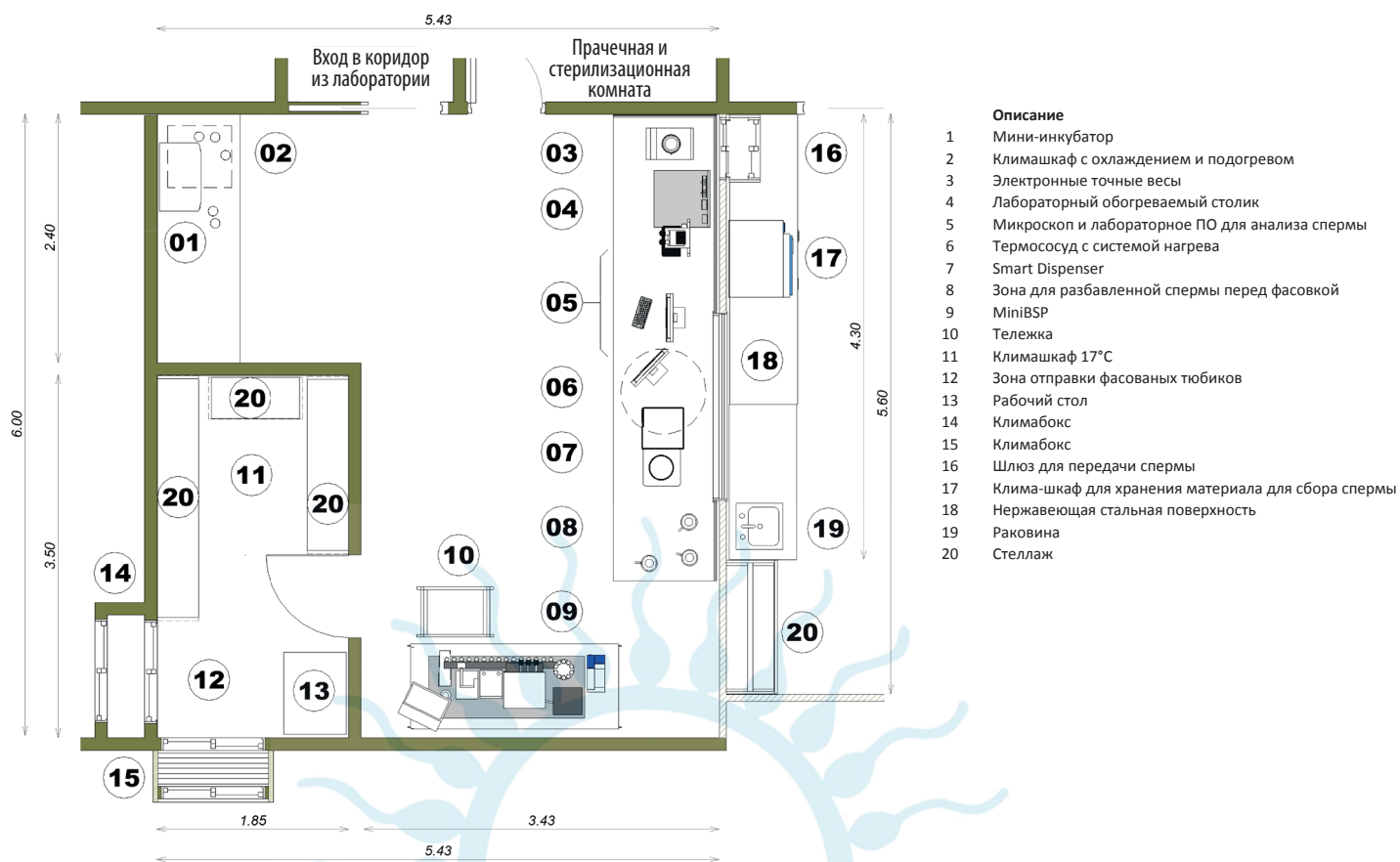


Рисунок 3: План лаборатории по производству спермы хряков

Современные лаборатории по производству спермы хряков

Высококачественные сперматозоиды обеспечивают высокую фертильность спермиев и предотвращают попадание патогенных организмов в половой тракт свиноматки. Таким образом, строгие гигиенические меры на всех этапах сбора и обработки спермы являются основополагающими, чтобы минимизировать биологическую нагрузку разбавленной спермы. Кроме того, высокий уровень автоматизации также минимизирует риск заражения при производстве спермы.

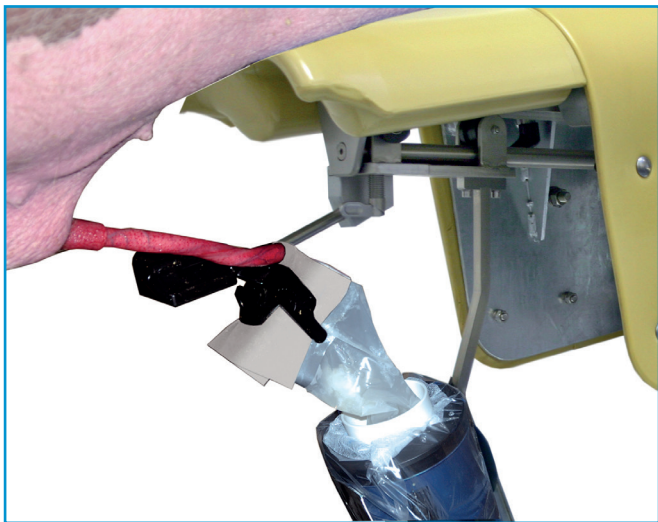


Рисунок 4: VoarMatic - система сбора спермы хряка

На рисунке 4 изображена полуавтоматическая система сбора спермы хряка VoarMatic. Чучело для хряка с интегрированным механизмом автоматического сбора спермы включает в себя салазки под манекеном с держателем спермоприемника и зажим для одноразовой искусственной вагины (ИВ). Одноразовая ИВ является точной копией цервикса свиноматки в плане текстуры и поверхности. Отрывная внутренняя оболочка для приема первой фракции эякулята и пленочный вкладыш, по которому он стекает в спермоприемник, крепятся внутри ИВ. Как показано на рисунке, пенис хряка удерживается в замкнутой системе. Таким образом сперма направляется через ИВ в BlueBag. Закрытая система минимизирует риск заражения во время сбора спермы.

На рисунке 5 приведено содержание бактерий в эякулятах хряков, сравнивающих ручной и автоматический сбор спермы.

Мешок для сбора спермы BlueBag от Minitube - это универсальное решение от сбора спермы до ее фасовки, а также идеально сочетается с VoarMatic. BlueBag имеет встроенный фильтр, который удаляется после сбора вместе с гелевой фракцией эякулята хряка. Спермоприемник можно быстро подготовить к использованию, а фильтр и внутренняя поверхность BlueBag являются стерильными. BlueBag можно использовать как для ручного сбора спермы, так и для сбора спермы с помощью VoarMatic.



Рисунок 6: Универсальный мешок для сбора спермы (Blue Bag)

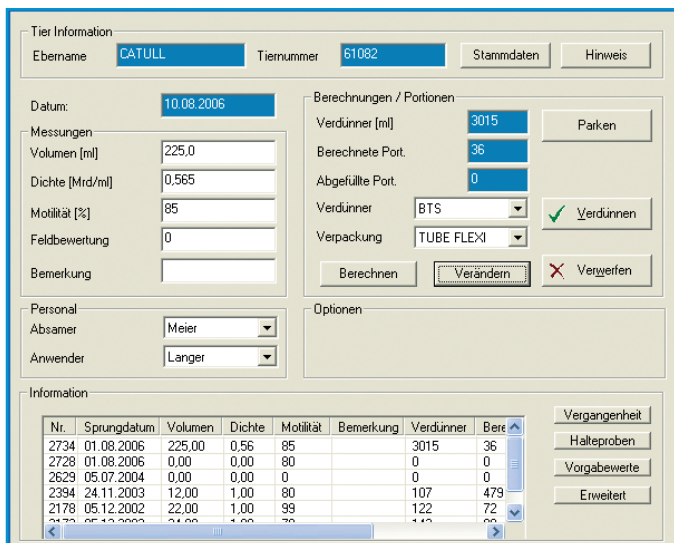
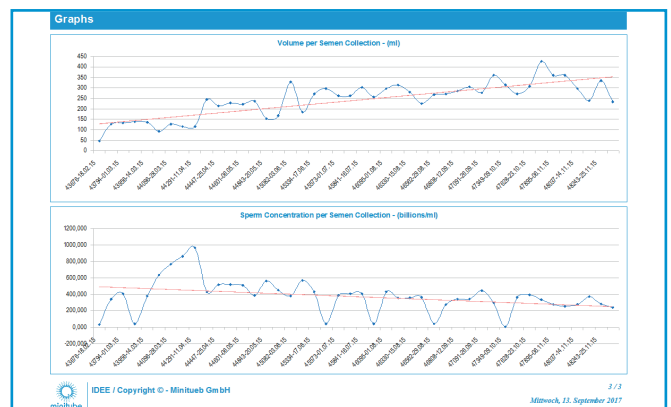
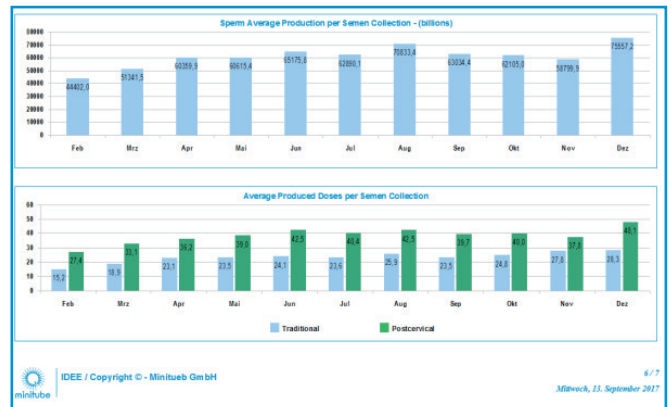
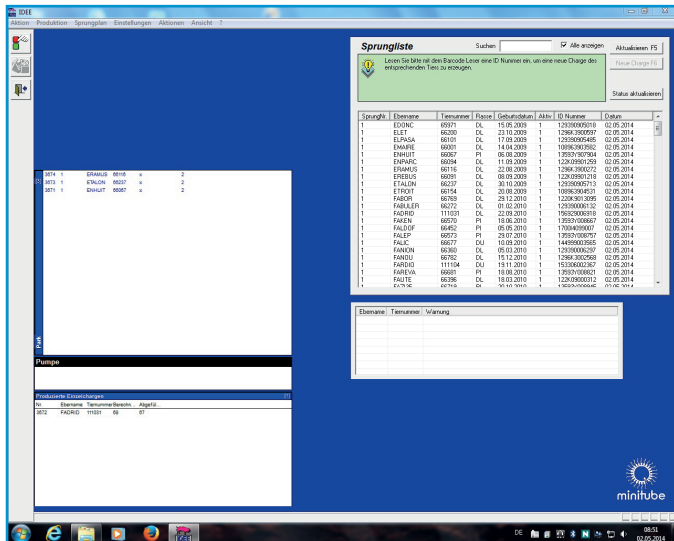
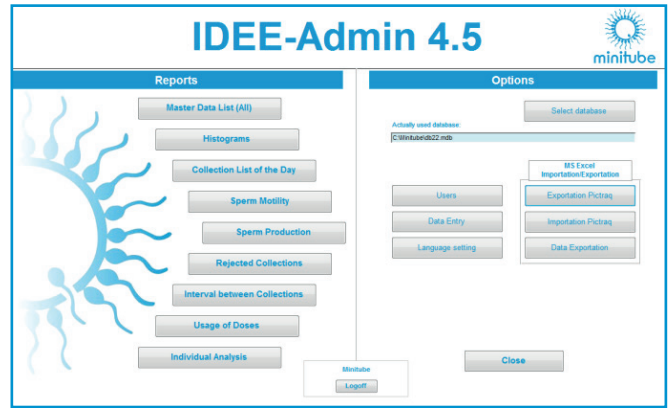


Рисунок 5: Содержание бактерий в нативной сперме хряка после ручного или автоматического сбора спермы

Первым шагом после сбора спермы является оценка качества спермы. Программные решения для организации производства спермы и ее объективной оценки предотвращают ошибки, связанные с человеческим фактором.

Программное обеспечение IDENT содержит планирование сбора спермы, идентификацию хряков с помощью электронных ушных бирок, электронную идентификацию персонала сбора спермы и распечатку этикеток с данными хряка и штриховым кодом. Данное программное обеспечение существенно облегчает идентификацию эякулятов и предотвращает риск их смешения. IDENT можно легко интегрировать в программное обеспечение IDEE-Production для управления лабораторией. IDEE-Production автоматизирует и связывает анализ спермы, включая учет хранимых образцов, а также разлив разбавителя и фасовку спермы в тьюбики. IDEE гарантирует быстрое и точное управление данными об эякулятах.

IDEE-Admin служит инструментом отчетности для IDEE-Production и является неотъемлемой частью программного пакета IDEE. На рисунках (9-11) показаны примеры отчетов IDEE-Admin.



Рисунки 7-11: IDENT и IDEE - программное обеспечение для производства спермы хряка

Другое оборудование производственной линии спермы также может быть интегрировано в лабораторное программное обеспечение. AndroVision® - это система CASA для высокоэффективного автоматизированного и компьютеризированного анализа спермы. AndroVision® выполняет классический анализ CASA с более углубленными анализами функциональности спермиев. Результаты всех измерений, полученных с помощью AndroVision®, могут быть включены в карточку эякулята в IDEE.

AndroVision® может одновременно измерять концентрацию, подвижность спермиев, их процент с проксимальными и дистальными цитоплазматическими каплями и с закрученными хвостами. Все данные параметры могут быть включены в расчет спермадоз, чтобы оптимизировать качество произведенной спермы. Системы CASA становятся стандартами в анализе спермы, поскольку эти измерительные системы минимизируют влияние человека (= возникновение ошибок) на анализ спермы.



Рисунок 12: AndroVision® – интегрированный функциональный анализ спермы

Кроме того, дальнейшую обработку спермы хряка можно контролировать с помощью IDEE. Smart Dispenser состоит из электронного блока управления и весов, а также сопряжен с насосом, что позволяет обеспечить высокий уровень защиты и точности для процесса разбавления спермы.



Рисунок 13: Smart Dispenser - разбавление спермы хряка с высокой точностью

MiniBSP - автоматическое устройство для фасовки и запайки спермы хряка - имеет эргономичную рабочую поверхность и предназначено для обработки до 950 тюбиков в час. Оно оснащено встроенным магазином для тюбиков и контролем уровня наполнения электронными весоизмерительными ячейками с точностью заполнения +/- 1 мл на тюбик.

Разумеется, MiniBSP также может быть включено в программное обеспечение IDEE и контролироваться им.

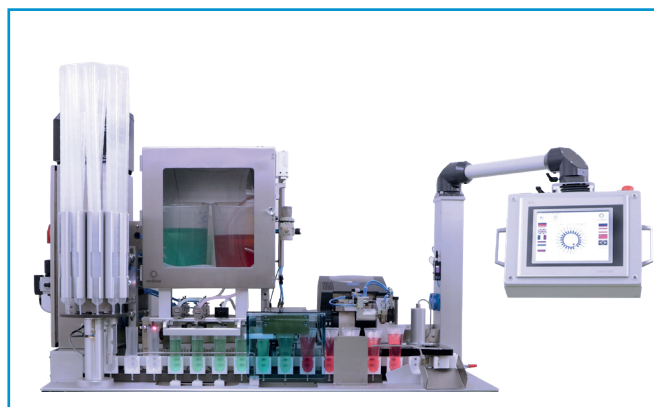


Рисунок 14: MiniBSP - автоматическое устройство для фасовки и запайки спермы хряка

Производство высококачественной спермы в Германии

Германия является одним из крупнейших производителей свинины в мире. В 2017 году в Германии поголовье свиней составило 27,1 млн. (из них 1,9 млн. свиноматок). Показатель среднего количества отлученных поросят на свиноматку в год составил 29. Лучшие фермы в Германии достигают показателя около 35 отлученных поросят на свиноматку в год.

Чтобы вышеприведенные показатели стали возможными, необходим высокий уровень производства спермы для искусственного осеменения. В Германии в среднем производится около 1900 спермадоз на одного хряка в год. Для сравнения, в США это количество достигает 1259 доз на одного хряка в год (Riesenbeck, 2011).

Основным фактором эффективности производства производства спермы хряка в Германии является очень высокий уровень автоматизации и стандартизации во всех лабораториях по производству спермы. Немецкие хрячники входят в состав национального объединения (BRS e.V.) в Бонне. Члены объединения придерживаются строгой приверженности в соблюдении минимального стандарта качества спермы хряка.

Например, все эякуляты хряков, которые используются для производства спермы, должны отвечать следующим требованиям:

В дополнение к этим требованиям для нативной спермы, спермадозы, произведенные лабораторией-членом BRS, должны иметь минимум 1,8 млрд. спермиев на тубик, объем спермадозы 80 мл и подвижность спермиев 65% после 3-х дней хранения. Чтобы сохранить этот высокий стандарт, все хрячники BRS имеют постоянную программу мониторинга качества. Сюда входят аудиты независимых специалистов, независимый контроль качества спермы национальными справочными лабораториями, регулярные курсы обучения персонала, научно-исследовательское развитие и многие другие параметры гарантии качества.

Рисунок 15. Минимальные требования к эякуляту хряка для его использования в производстве спермы

Показатель	Минимальные требования
Цвет	Серо-белый, белый, желто-белый
Консистенция	Млечная или сывороточная
Примеси (моча, кровь, гной)	Отсутствуют
Загрязнения (частицы экскрементов, шерсть)	Отсутствуют
Запах	Нейтральный
Объем без выделения бульбоуретральной железы	100
Концентрация спермы [10^6 /μl]	Возраст хряка: ≤ 9 месяцев: 0.150 > 9 месяцев: 0.200
Общее количество спермиев [10^9 /эякулят]	Возраст хряка: ≤ 9 месяцев: 15.0 > 9 месяцев: 20.0
Подвижность спермиев [%]	70
Подвижность спермиев [%] при хранении 72 часа	65
Морфологические аномалии (включая цитоплазматические капли) [%]	≤ 25
Спермии с измененными головками [%]	≤ 5
Спермии с измененными головными чехликами [%]	≤ 10
Спермии с цитоплазматическими каплями [%]	≤ 15
Спермии с закрученными хвостами [%]	≤ 15
Другие морфологические аномалии [%]	≤ 15
Содержание бактерий	Отсутствие патогенных для людей и животных микробов

Значение качества воды в лаборатории по производству спермы хряков

Очищенная вода необходима в производстве спермы для двух целей:

- Подготовка разбавителя
- Очистка и промывка лабораторной посуды, наполнение водяной бани и парового стерилизатора

Водопроводная вода содержит не только чистую воду (H₂O), но и минералы, такие как карбонат кальция, карбонат магния, нитраты, фосфаты и другие ионы. Она также может содержать химические отходы, органические соединения, микроорганизмы и эндотоксины в различных количествах. Во многих регионах в небольших количествах к водопроводной воде добавляется хлор и фтор для профилактики человеческого здоровья. Чтобы получить подходящую водопроводную воду для использования в лаборатории по производству спермы, вода должна пройти процесс очистки. В частности, спермадозы требуют очень высокого качества очистки воды.

Системы очистки воды

1. Дистилляция

В процессе дистилляции вода испаряется путем ее нагрева, конденсируется и собирается в виде дистиллированной воды. Дистиллированная вода практически стерильна и в высшей степени деионизирована. Однако летучие органические соединения остаются в дистилляте. Для дистилляции воды требуется моно- или бидистиллятор, также на предварительном этапе очистки воды часто используется деионизация. «Жесткая» вода с высоким содержанием карбоната кальция должна быть деионизирована перед вводом в дистиллятор. В противном случае процесс дистилляции становится очень трудоемким, а водогонные трубки внутри дистиллятора должны регулярно очищаться от накипи. Процесс дистилляции требует значительного дополнительного количества водопроводной воды для охлаждения. Дистилляция является превосходным вариантом, когда требуется относительно небольшой объем воды для подготовки разбавителей для спермы, то есть до 30 литров ежедневно. Дистиллятор требует надлежащего обслуживания и достаточно частой очистки от накипи. Плохо обслуживаемый дистиллятор не сможет производить очистку воды должным образом. Для средних или крупных лабораторий по производству спермы хряков процесс дистилляции обычно не достаточно быстрый.

2. Деминерализация

Деминерализация, также называемая деионизацией, удаляет ионные соединения из воды, такие как Ca²⁺ или Mg²⁺. Принцип работы состоит в прохождении воды через картридж со смолой, содержащей заряженные частицы. Ионная компонента задерживается в смоле. Через несколько месяцев (1-3, в зависимости от системы и потребности в очищенной воде) смолы необходимо заменить или переработать. Процесс очистки довольно быстрый и требует небольших энергетических затрат. Важно, чтобы к прибору подключалось устройство для измерения электропроводности, определяющее момент, когда процесс очистки воды перестает быть эффективным. Данное устройство для измерения электропроводности должно регулярно проверяться, и, когда фактическое значение измерений превышает норму, картридж необходимо немедленно заменить на новый. Деионизированная или деминерализованная вода не является стерильной. Бактерии, содержащиеся в воде, переживают этот процесс

очистки. Смолы также не являются стерильными и поэтому бактерии быстро растут внутри картриджей, что может привести в конечном результате к еще более загрязненному продукту, чем водопроводная вода. По этой причине важно использовать один и тот же картридж не более 3 месяцев, даже если результаты измерений электропроводности остаются ниже предела. Для борьбы с бактериями необходима дополнительная обработка деминерализованной воды. Это возможно путем дистилляции, с помощью бактериального фильтра (с размером пор 0,2 мкм) или с использованием ультрафиолетового излучения. Деминерализация в сочетании с бактериальным методом контроля является очень практичным решением для лабораторий, имеющих высокое качество водопроводной воды, большой запас картриджей или систему рециркуляции, а также способность длительно нести постоянные издержки. Данное решение особенно рекомендуется для лабораторий по производству спермы хряков с потребностью в больших объемах очищенной воды, то есть более 50 литров ежедневно.

3. Обратный осмос

В системах очистки обратного осмоса давление подается на контейнер с водопроводной водой, пропускающая водопроводную воду через полупроницаемую мембрану, которая задерживает нежелательные компоненты. После прохождения мембраны вода выделяется очищенной, из нее удаляются с помощью осмотического давления до 98% растворенных компонентов. Однако содержащиеся газы не задерживаются. Обратный осмос довольно эффективно удаляет бактерии. Если водопроводная вода «жесткая», обладающая высокой электропроводностью, обратный осмос является недостаточно эффективным для деминерализации, что делает необходимым установку второго способа очистки. По этой причине обратный осмос часто сочетается с деминерализацией и ультрафильтрацией. Обратный осмос нуждается в важном дополнительном объеме воды для промывки фильтрующей мембраны. Только от 20 до 30% использованной воды проходят очистку. Обратный осмос часто используется в лабораториях по производству спермы с высоким потреблением объема воды (100 литров или более ежедневно). Комбинация деминерализации и обратного осмоса очень эффективна, также часто сопровождается обработкой ультрафиолетовым излучением. Последний метод используется для стерилизации очищенной воды.

Наиболее используемая и эффективная система представляет собой комбинацию обратного осмоса, деионизации, фильтрации с угольным фильтром и ультрафиолетовым излучением. Выбранный метод очистки воды будет зависеть от качества водопроводной воды в центре по ИО и объемов очищенной воды, необходимых каждый день. В любом случае параметры качества должны быть соблюдены.

Для классификации качества очищенной воды была принята система ASTM, которая различает 4 разных типа воды

Параметры	Тип I	Тип II	Тип III	Тип IV
Электропроводность (мкСм/см)	0.056	1.0	2.5	5
Электрическое сопротивление (МОм/см)	18	1.0	4.0	0.2
Рост бактерий (КОЕ/мл)	0 (А)	10 (В)	100 (С)	100 (С)
Общий органический углерод (частиц на миллиард)	10	50	200	-
Натрий (частиц на миллиард)	1	5	10	50
Хлор (частиц на миллиард)	1	5	10	50
Силикаты (частиц на миллиард)	3	3	500	-
Тяжелые металлы (мг/л)	0.01	-	-	-
Эндотоксины	0.03	0.25	-	-

ASTM (American Society for Testing and Material)

Рисунок 16: Классификация типов воды

Для подготовки разбавителя для спермы рекомендуется качество воды Типа II по ASTM. Вода должна соответствовать следующим минимальным требованиям:

- Электропроводность: ниже 5 мкСм/см. Электропроводность – это показатель, выявляющий наличие ионов или солей в воде. Если значение слишком высокое, то вода будет приводить сперму в негодность, поскольку осмолярность среды увеличивается. Кальций должен быть полностью удален, так как процент капацированных спермиев увеличивается с течением времени. Можно использовать воду с более высокой электропроводностью (до 20 мкСм/см), если это будет компенсироваться более высокой концентрацией спермиев в спермадозах.
- Содержание бактерий: от идеального значения 0 и до максимального 1 КОЕ (= 1 колониеобразующая единица) на 10 мл. Содержание бактерий вредно и имеет тенденцию к быстрому размножению в разбавителе для спермы, который является отличной средой для роста бактерий. Бактерии часто обуславливают снижение срока хранения разбавленной спермы, поэтому приемлемым является лишь очень низкое содержание бактерий в воде. Однако определенные патогенные организмы (бактерии и вирусы, вызывающие специфические заболевания у животных) должны быть исключены. Наличие эндотоксинов должно быть минимальным, потому что они являются очень токсичными для спермиев.
- Общий органический углерод: максимум 50 частиц на миллиард. Это параметр для общего содержания органического углерода в воде. ООУ отражает присутствие органических соединений, производимых промышленными, бытовыми и сельскохозяйственными химическими отходами. Этот показатель не должен превышать норму, поскольку является надежным индикатором общего качества воды.

Требования к воде, используемой для промывки стеклянной лабораторной посуды или другого материала, контактирующего со спермой, установлены ниже. Для этих целей достаточно деминерализованной воды. Тем не менее, ополаскивание всегда

должно проводиться тщательным образом, чтобы устранить минералы или моющие средства, прилипшие к поверхностям, которые могли бы контактировать со спермой или разбавителем.

Важно помнить, что качество очищенной воды ухудшается со временем, в зависимости от системы ее хранения. Обычно хранение воды в течение более одной недели не рекомендуется.

Рекомендации

1. Прежде чем принять решение о системе очистки воды:
 - Анализ водопроводной воды: содержание карбоната кальция, бактерий, органических загрязнений, электропроводность и осмотическое давление.
 - Определение требований: Сколько очищенной воды нужно производить каждый день? В какой период времени этот объем воды будет необходим?
2. Обращение с очищенной водой: качество очищенной воды может легко ухудшиться еще до ее использования. Сразу после производства она может протекать через нестерильные трубки, содержащие биопленку с растущими колониями бактериальных клеток, которая постоянно загрязняет воду. Это происходит часто и особенно критично в относительно старых системах. Контейнеры и бутылки для хранения очищенной воды часто не являются стерильными, особенно если они не хранятся в закрытом виде. Также при воздействии света могут размножаться бактерии и водоросли. Некоторые бактерии, например, группы *Pseudomonas*, могут использовать пластиковые соединения трубок для их метаболизма. Очищенную воду нельзя хранить, она подлежит немедленному использованию. Трубки, краны и контейнеры следует регулярно стерилизовать.
3. Альтернатива: покупка воды. Если водоочистительная система отсутствует, лучшим выбором является покупка очищенной воды. Однако деионизированная вода для бытового потребления недостаточно очищена для подготовки разбавителя для спермы. Приобретенная вода должна быть стерильной, деионизированной (максимальная электропроводность 5 мкСм/см) и не содержащей пирогенов.