



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

205 507

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 09 78
(21) PV 2715-79

(51) Int. Cl.³ A 01 N 1/00

(40) Zveřejněno 29 08 80
(45) Vydáno 01 09 83

(75)
Autor vynálezu HOVORKA JAROSLAV MVDr., SEDLČANY

(54) Ředidlo pro konzervaci semene kančů

1

Vynález řeší konzervaci kančího semene se zaměřením na zdravotní aspekty této problematiky.

V současné době se při zpracování semene plemenných kančů používá technologie, která zajišťuje konzervaci semene při 15 až 16 °C po dobu 24 h bez poklesu březosti a plodnosti. V podstatě se používají dva typy ředidel: a) bez žloutku, podle Pliška, b) se žloutkem, podle Sadovnikové a podle Serdžuka. Ředidlo podle Pliška je užíváno při nižších poměrech ředění, jeho nevýhodou je, že neobsahuje vaječný žloutek, který zabraňuje shlukování spermií, a tím prodlužuje i použitelnost takto ředěného semene. Procento přežívajících spermií se však i při použití tohoto ředidla po 24 h významně snižuje a nezajišťuje podmínky pro dobrou březost a plodnost. Nevýhody bezžloutkového ředidla do značné míry odstraňují ředidla podle Sadovnikové a podle Serdžuka, která umožňují podstatné prodloužení přežitelnosti spermií. Tato ředidla se liší ve způsobu pufování a možnosti zvýšeného obsahu žloutku v ředidle podle Serdžuka. Ani jedno z těchto ředidel neřeší optimálně osmotické poměry v ředěném semeni při nižších stupních ředění. Ve všech třech případech uváděných dosud užívaných ředidel je použito k antibiotikování penicilinu a streptomycinu. Tento způsob antibiotikování nesplňuje požadavky a potřeby současné praxe.

Výše uvedené nedostatky jsou odstraněny ředidlem pro konzervaci semene kančů podle

205 5⁰⁷

vynálezu, které obsahuje na 1 000 ml redestilované vody, 1,8 g natriumcitrátu dihydrátu, 1,6 g chelatonu III, 0,5 g hydrogenuhlíkatu sodného, 50 až 60 g glukózy pro analýzi, 20 až 50 ml vaječného žloutku a antibiotickou směs, která je tvořena 500 000 m. j. drasel-
né soli penicilinu, 200 až 300 mg Erythromycinu a 250 000 m. j. Colistinu. Respektuje fy-
ziologické požadavky spermií v ředěném semeni z hlediska osmotických poměrů podle stupně
ředění, kvality a osmotické úrovně získaných ejakulátů, což má praktický význam při použi-
tí po 24 hodinách i déle. Možnost zvýšeného obsahu žloutku umožňuje v závislosti na jeho
kvalitě prodloužení přežitelnosti spermií. Zásadní otázkou však je způsob antibiotikování,
který se významnou měrou podílí na zajištění zdravotní nezávadnosti inseminační dávky.
Tím je dána nejen úroveň výsledků reprodukce, ale i úroveň zdravotního stavu vyprodukova-
ného potomstva.

U varianty I zvýšením osmotického tlaku ředidla dojde k tomu, že se vyrovnají osmo-
tické poměry v ředěném semeni k hranici blízké fyziologickému optimu. Tím se zamezí možnos-
ti bobtnání až svlékání akrosomů a tím i unikání akrosomálních enzymů do semenné plasmy,
což je spojeno se snížením fertility takto ředěného semene. Snižuje se i možnost použití
po 24 h konzervace z toho důvodu, že se dostavuje snížení březosti a plodnosti. Snižuje se
pohyblivost ředěného semene a kvalita tohoto pohybu. Tato varianta má své opodstatnění
při použití ředění do 1:5.

Varianta II je na úrovni osmotických poměrů ředidla podle Sadovnikové a Serdžuka,
přičemž nejvhodnější ředění jsou z hlediska osmotických poměrů ředění nad 1:5. Je však
nutno počítat s tím, že při ředěních nad 1:10 může dojít ke snížení počtu selat ve vrhu.

Vyřešením zvýšené účinnosti antibiotikování ředidla pro přípravu inseminačních dávek
je dána možnost cíleně zasáhnout a ovlivňovat mikrofloru se vztahem k reprodukčnímu apará-
tu jak ze strany kance, tak i prasnice, zábrana přenosu zárodků k antibiotikům citlivých
prostřednictvím inseminační dávky. Speciálně je to použití antibiotik, která likvidují
zárodky ze skupiny Mycoplasmat, které dnes v ředidlech používaná antibiotika nepotlačují.
Nelze opomenout účinný zásah proti zárodkům, působícím hnisavé endometritidy, které jsou
v dnešní době převážně k používaným antibiotikům necitlivé. Bylo úspěšně vyřešeno antibio-
tikování, které vede účinný zásah proti G - zárodkům, podílejícím se na vývoji endometri-
tid nehnisavých. Instilace těchto účinných nespermicidních antibiotik do dělohy prasnice
v inseminační dávce vede k eliminaci veškeré podmíněně patogenní mikroflory k antibiotikům
citlivé, což má příznivý vliv na reprodukční ukazatele, zejména březost a plodnost. Tímto
je řešena nejen otázka účinnosti navržených antibiotik, ale i jejich nespermicidnosti,
což bylo dlouhodobě největším problémem u používaných dostupných STM. Kromě jeho časté
spermicidnosti je neúčinný v používaných koncentracích na zárodky ze skupiny Mycoplasmat,
citlivost podmíněně patogenních zárodků, spadajících do jeho spektra účinnosti je rozdílná.

Složení ředidla:

Komponenty:	Varianta I	Varianta II
Agua redestillata	1000 ml	1000 ml
Glukóza pro analýzi	60 g	50 až 51 g
Natriumcitrát dihydrát	1,8 g	1,8 g
Hydrogenuhlíčitan sodný	0,5 g	0,5 g
Chelaton III	1,6 g	1,6 g
Vaječný žloutek	30 až 50 ml	20 až 40 ml

Použití při poměru ředění do 1:5 nad 1:5

antibiotikování:

Penicilin draselná sůl	500 000 m. j.
Erythromycin	200 až 300 mg
Colistin	250 000 m. j.

Příprava ředidla:

Destilovaná voda se nechá přejít varem a zchladí se na 35 °C. Přidá se navážené množství citrátu, bicarbonátu, chelatonu a glukózy, nechá se rozpustit (takto připravený roztok se může uchovávat při 15 °C ve tmě po dobu 24 hodin). Těsně před použitím se přidá vaječný žloutek a antibiotika. Antibiotika se předem rozpustí v malém objemu připravovaného ředidla, potom v celém objemu. Před každým zařazením nové šarže antibiotik nutno provést zkoušku na spermicidnost. Sterilně připravený vaječný žloutek se řádně rozmixuje. Ředidlo se nesmí po přidání chelatonu zahřát na teplotu vyšší než 35 °C. Připravené ředidlo musí mít pH 6,6 až 6,9, teplota uchování ředěného semene je 14 až 16 °C.

Vaječné žloutky zdravotně nezávadné by bylo možné použít i mražené. Ředidlo podle vynálezu by bylo možné vyrábět i centrálně tak, že jako 1. komponenta by byl citrát, bikarbonát, chelaton, 2. komponentou glukóza a 3. komponentou antibiotika. Další 2 komponenty, tj. vaječný žloutek a voda by byly dodávány až na plemenářské stanici.

Výsledky zkoušek:

Tabulka I uvádí výsledky vyšetření motility v procentech živých spermií po 48 a 72 hodinách konzervace v ředidle v současné době používaném (kontrolní) a v ředidle navrženém (pokusný). Získaný ejakulát byl zpracováván standartní technologií, která je používána na plemenářských stanicích, byl před vlastním zpracováním rozdělen na část, která byla ředěna používaným ředidlem a část, která byla ředěna ředidlem podle vynálezu.

Tabulka I

Vzorek pokusný/vzorek kontrolní

Státní				Státní			
registr	ředění	po 48 h	po 72 h	registr.	ředění	po 48 h	po 72 h
Bit 25	1:5	90	70	Ler 101	1:4		50
		30	0				20
Jac 11	1:9	90	80	Jor 83	1:4		80
		0	0				50

203 307

Te 1	1:9	90	60	St 13	1:4	50
		0	0			20
MLk 19	1:9	90	80	Ter 9	1:4	50
		0	0			0
Plk 6	1:5	90	70	Bit 71	1:6	70
		50	0			35
Jac 12	1:10	90	80	Kb 6	1:9	80
		60	0			60
Jac 14	1:10	95	90	Lík 17	1:4	50
		0	0			50
MLk 16	1:8	70	70	Plk 7	1:6	60
		0	0			50
Kb 6	1:10	90	80	RR 90	1:12	60
		0	0			50
Kom 9	1:6	80	80	Ter 10	1:4	60
		0	0			50
MLk 17	1:7	70	60	Pl 15	1:6,5	50
		0	0			60
Jac 8	1:7	80	80	MLk 10	1:7	90
		20	0			80
MLk 20	1:9	20		Bit 25	1:3	80
		55				80
MLk 10	1:6	80		Vso 82	1:3	70
		0				80
MLk 14	1:12	80		Kom 9	1:5	80
		45				70
Te 1	1:6	70		Te 1	1:7	70
		50				60
Kom 9	1:8	60		Jac 11	1:10	50
		50				60
Ter 1	1:8	50		Jac 13	1:7	50
		55				70
Jac 7	1:6	70		Jac 17	1:7	70
		50				60
MLk 18	1:5	70		MLk 16	1:9,9	70
		70				50
				MLk 13	1:5	70
						70
Celkem		46	33	Hap 5	1:6	80
nevyhovuje ČSN pokus.		1	0			60
nevyhovuje ČSN kontr.		17	16	Ost 6	1:9	70
						70
$\chi^2(1) =$		17,68	21,12	Sh 29	1:8	90
						90
po 48 i po 72 hodinách je snížení nevyho-				Ler 97	1:5	90
vujících vzorků vysoce statisticky						90
průkazné				Ost 8	1:6	70
						80
P menší 0,01						

Statistické vyhodnocení bylo provedeno chí kvadrátem vyhodnocením počtu vzorků, které vyhovují ČSN (50% motilita) a které nevyhovují při použití ředidla současného a nového. Bylo zjištěno, že rozdíly v počtech vyhovujících vzorků jsou statisticky vysoce významné.

Tabulka II uvádí výsledky bakteriologického vyšetření semene neředěného a semene ředěného. Pro srovnání jsou uvedeny výsledky bakteriologického vyšetření při použití antibiotikování podle současného stavu.

Tabulka II

Státní registr kance	semeno neředěné	semeno ředěné
Ler 97	E. coli, Proteus	ojed. mikrokoky
Ost 7	bez nálezu	bez nálezu
Jor 65	E. coli, Proteus	bez nálezu
Mil 50	bez nálezu	bez nálezu

Bit 123	bez nálezu	bez nálezu
Zak 112	bez nálezu	bez nálezu
Ler 93	bez nálezu	bez nálezu
Ntl 20	coliformní zárodky	bez nálezu
Mg 67	Proteus	bez nálezu
OA 25	E. coli, Proteus	bez nálezu
Vso 89	Proteus, Enterobacter	bez nálezu
Ost 8	Proteus, E. coli	bez nálezu
Al 8	E. coli, Proteus	bez nálezu
OA 28	E. coli, Proteus	bez nálezu
Hap 5	E. coli, Proteus	bez nálezu
Jak 19	E. coli, Proteus	bez nálezu
Hap 4	E. coli, Proteus	bez nálezu
Mks 14	E. coli, Proteus	bez nálezu
Vso 90	E. coli, Proteus	bez nálezu
Ntl 19	coliformní z., Proteus	colif. zár.
Egt 173	coliformní zár.	bez nálezu
OA 25	Pseudomonas aer. colif.	Proteus
Ler 97	saprof. corynebact.	aer. sporul.
Mg 69	bez nálezu	coliformní zár.
Mg 51	Pseudom. aer.	saprofyt. corynebact.
Jak 20	coliformní zár.	Pseudomonas aer.
Mil 50	coliformní zár.	coliformní zár.
OM 8	mikrokoky	Pseudomonas aerug.
Celkem	37 vzorků	37 vzorků
bez nálezu	7 vzorků	32 vzorků (6x dodatečná kontaminace)

Statistické vyhodnocení: $\chi^2_{(1)} = 33,88$ - vysoce statisticky průkazné snížení počtu kontaminovaných vzorků po ředění navrženým ředidlem

Srovnání se současným stavem:

Penicilin - ze 74 vzorků neředěných bylo 14 bez nálezu

ze 68 vzorků ředěných bylo 17 bez nálezu

$\chi^2_{(1)} = 0,77$ - nelze prohlásit, že má vliv na bakteriologické nálezy

Penicilin + Streptomycin - ze 74 vzorků neředěných bylo 14 bez nálezu

ze 32 vzorků ředěných bylo 6 bez nálezu

$\chi^2_{(1)} = 0,00$ - nelze prohlásit, že má vliv na bakteriologické nálezy

205 507

Tabulka III uvádí vliv koncentrace glukózy v ředidle podle vynálezu na počet vzorků se sbobtnalými akrosomy u více než 10 % spermií. Semeno bylo barveno metodou podle Giemsa, fixováno roztokem podle Hankocka.

Tabulka III

při použití 60 g glukózy	počet vzorků	nevyhov. nereděných	nevyhov. ředěných
poměr ředění do 1:5	21	1	2
nad 1:5	20	0	1
při použití 51 g glukózy			
poměr ředění do 1:5	38	16	28
nad 1:5	24	15	12

Do ředění 1:5 je při použití ředidla podle vynálezu zajištěna morfolozioká neporušenost akrosomu při dávce glukózy 60 g, při vyšších ředěních než 1:5 při 60 g i 51 g.

Využití ředidla podle vynálezu je možné na inseminačních stanicích.

Doba použitelnosti je minimálně do 72 hodin po odběru, s možností poměru ředění i více než 1:10. Motilita ředěného semene byla zjišťována i po 8 dnech. Zajišťuje ve dvou variantách podle stupně ředění velmi dobrou přežitelnost a morfoloziokou neporušenost spermií. Účinné antibiotikování zajišťuje vysoké procento ejakulátů bez bakteriologického nálezu po 72 až 96 hodinách, velmi dobrou motilitu. Antibiotická kombinace je rovněž účinná proti zárodkům ze skupiny Mycoplasmat, které zpravidla nebývají v ejakulátech kultivačně prokazatelné.

Zabráněním vertikálního přenosu infekčních zárodků k antibiotikům citlivých z plemene na plemeni lze dosáhnout lepších výsledků v reprodukci i v celkovém zdravotním stavu potomstva, což má další dopady na výkrmovou schopnost a konverzi živin, projevující se vyšší průměrných denních přírůstků a průměrné spotřeby krmiva na 1 kg přírůstku. Lze touto cestou preventivně ovlivňovat výskyt respiračních onemocnění a sípavky, průjmových onemocnění narozených selat, hnisavých a nehnisavých endometritid, sekundárně působených podmíněně patogenními zárodky původem z genitálního traktu prasnice. Podmínkou je vždy citlivost výše uvedených zárodků k antibiotikům. Tímto způsobem by bylo možné dosáhnout značných úspor na cestovním, které je dnes z důvodu denního zásobování chovů inseminačními dávkami velmi vysoké. Při použití navrhovaného ředidla by postačilo zásobování chovů pouze 3x nebo 2x týdně.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Ředidlo pro konzervaci semene kanců, obsahující na 1000 ml redestilované vody 1,8 g natriumcitrátu dihydrátu, 1,6 g chelatonu III, 0,5 g hydrogenuhličitanu sodného, 50 až 60 g glukózy pro analýzi, 20 až 50 ml vaječného žloutku a antibiotickou směs, vyznačující se tím, že antibiotická směs je tvořena 500 000 m. j. draselné soli penicilinu, 200 až 300 mg erytromycinu a 250 000 m. j. colistinu.