



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU

205 514

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 15 09 78  
(21) PV 2731-79

(51) Int. Cl.<sup>3</sup> 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 kanců

1

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

V současné době se při zpracování semene plemenných kanců 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 kanců podle

205 514

vynálezu, které obsahuje na 1 000 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, která je tvořena 500 000 m. j. drasel-  
né soli penicilínu, 100 až 200 mg tylosinu a 250 000 m. j. colistinu. Respektuje fyziolo-  
gické požadavky spermií v ředěném semeni z hlediska osmotických poměrů podle stupně ředě-  
ní, kvality a osmotické úrovně získaných ejakulátů, což má praktický význam při použití  
po 24 hodinách konzervace a déle. Možnost zvýšeného obsahu žloutku umožňuje v závislosti  
na jeho kvalitě prodloužení přežitelnosti spermií. Zásadní otázkou je však způsob antibio-  
tikování, který se významnou měrou podílí na zajištění zdravotní nezávadnosti inseminační  
dávky. Tím je dána nejen úroveň výsledků reprodukce, ale i úroveň zdravotního stavu vypro-  
dukaného 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 hodinách konzervace z toho důvodu, že se dostavuje snížení březosti a plodnosti.  
Snižuje se i pohyblivost ředěného semene a kvalita tohoto pohybu. Tato varianta má své plné  
opodstatnění při použití ředění do 1:5.

Varianta II je na úrovni osmotických poměrů ředidla podle Sadovnikové a podle Serdžū-  
ka, 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, které likvidují zá-  
rodky ze skupiny Mycoplasmat, které dnes používaná antibiotika nepotlačují. Nelze opomenout  
účinný zásah proti zárodkům, působícím hnisavé endometritidy, které jsou k antibiotikům  
dosud v ředidlech používaným necitlivé. Instilace těchto účinných nespermicidních antibio-  
tik 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  
streptomycinů. Kromě jeho časté spermicidnosti je neúčinný na zárodky ze skupiny Mycoplas-  
mat, často i na podmíněně patogenní zárodky, spadající do jeho udávaného spektra účinnosti.  
Možnost použití takto ředěného semene se snižovala po 24 hodinách, kdy bylo již patrné  
snížení motility, právě tak jako při vyšších stupních ředění.

## Složení ředidla

| Komponenty              | Varianta I  | Varianta II |
|-------------------------|-------------|-------------|
| Aqua 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. |         |
| Tylosin                   | 100 až 200 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 a 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 možno použít i mražené. Ředidlo by bylo možné vyrábět i centrálně tak, že jako 1. komponenta by byl citrát, bikarbonát a chelaton, 2. komponentou glukóza, 3. komponentou antibiotika, 4. komponentou vaječný žloutek, 5. komponentou voda. 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 podle vynálezu (pokus) a v ředidle v současné době používaném (kontrola). Získaný ejakulát byl zpracován technologií, která je používána na plemenářských stanicích, byl před zpracováním rozdělen na část, která byla ředěna navrženým ředidlem a část, která byla ředěna používaným ředidlem. Srovnávána byla motilita do 72 hodin po odběru. Poměr vyjadřuje 1 díl semene a počet dílů ředidla.

## Tabulka I

| Vzorky pokusné/vzorky kontrolní | ředění | motilita |         |
|---------------------------------|--------|----------|---------|
|                                 |        | po 48 h  | po 72 h |
| Státní registr kance            |        |          |         |
| Bit 25                          | 1:5    | 80<br>30 | 60<br>0 |

205 514

|         |       |    |    |
|---------|-------|----|----|
| Jac 11  | 1:9   | 80 | 60 |
| Te 1    | 1:9   | 0  | 0  |
| MLk 19  | 1:9   | 95 | 50 |
| Plk 6   | 1:5   | 0  | 0  |
| Jac 12  | 1:10  | 80 | 80 |
| Jac 14  | 1:10  | 0  | 0  |
| MLk 16  | 1:8   | 70 | 30 |
| Kb 6    | 1:10  | 50 | 0  |
| Kom 9   | 1:6   | 90 | 80 |
| MLk 17  | 1:7   | 60 | 0  |
| RR 90   | 1:12  | 95 | 90 |
| Ter 10  | 1:4   | 0  | 0  |
| Pl 15   | 1:6,5 | 80 | 80 |
| MLk 10  | 1:7   | 0  | 0  |
| Bit 25  | 1:3   | 90 | 70 |
| Vso 82  | 1:3   | 0  | 0  |
| Kom 9   | 1:5   | 70 | 70 |
| Te 1    | 1:7   | 60 | 50 |
| Jac 11  | 1:10  | 70 | 50 |
| Jac 13  | 1:7   | 60 | 50 |
| Jac 17  | 1:7   | 70 | 50 |
| Jac 8   | 1:7   | 80 | 60 |
| MLk 20  | 1:9   | 80 | 80 |
| MLk 14  | 1:12  | 70 | 50 |
| MLk 10  | 1:6   | 80 | 60 |
| Te 1    | 1:6   | 80 | 80 |
| Kom 9   | 1:8   | 70 | 50 |
| Ter 1   | 1:8   | 50 | 70 |
| Jac 7   | 1:6   | 70 | 55 |
| MLk 18  | 1:5   | 40 | 40 |
| Ler 101 | 1:4   | 50 | 70 |
| Jor 83  | 1:4   | 70 | 20 |
| St 13   | 1:4   | 40 | 70 |
| Ter 9   | 1:4   | 70 | 40 |
| Bit 71  | 1:6   | 70 | 70 |
| Kb 6    | 1:9   | 50 | 35 |
| Lik 17  | 1:9   | 70 | 60 |
| Plk 7   | 1:6   | 60 | 60 |
| MLk 16  | 1:9   | 70 | 50 |
| MLk 13  | 1:5   | 70 | 70 |
| Hap 5   | 1:6   | 80 | 80 |
|         |       | 70 | 70 |

|                |     |    |    |
|----------------|-----|----|----|
| Ost 6          | 1:9 | 80 | 70 |
|                |     | 70 | 60 |
| Sh 30          | 1:8 | 90 | 90 |
|                |     | 90 | 90 |
| Ler 97         | 1:5 | 90 | 90 |
|                |     | 90 | 90 |
| Ost 8          | 1:6 | 80 | 80 |
|                |     | 80 | 80 |
| Celkem vzorků  |     | 46 | 36 |
| nevyhovuje ČSN |     |    |    |
| pokusných      |     | 1  | 1  |
| kontrolních    |     | 16 | 17 |

Statistickým vyhodnocením chí kvadrátem bylo zjištěno, že rozdíly jsou statisticky vysoce průkazné. Byl hodnocen počet vzorků, které nevyhovují ČSN (50 % motilita) při použití ředidla navrhovaného a současného.

Tabulka II uvádí výsledky bakteriologického vyšetření semene ředěného a semene ředěného ředidlem podle vynálezu. Byla použita koncentrace tylosinu 100 mg na litr. Pro srovnání jsou uvedeny výsledky bakteriologického vyšetření při použití antibiotikování podle současného stavu. Ejakuláty byly po naředění uschovány po dobu 24 až 96 hodin do bakteriologického vyšetření. Semeno bylo ředěno v poměru 1 díl semene a 1 až 2 díly ředidla.

Tabulka II

| Státní registr kance | semeno neředěné         | semeno ředěné               |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Mlk 16               | E.coli                  | ojed.Pseudomonas aeruginosa |
| Mlk 15               | bez nálezu              | Achromobacter               |
| Mlk 17               | Pseudomonas aer.        | bez nálezu                  |
| Mlk 18               | E.coli                  | bez nálezu                  |
| Mlk 20               | bez nálezu              | bez nálezu                  |
| Mlk 19               | E.coli                  | bez nálezu                  |
| Pl 15                | bez nálezu              | bez nálezu                  |
| Ter 1                | bez nálezu              | bez nálezu                  |
| Leo 49               | ojed. E.coli            | ojed. Achromobacter         |
| Kom 9                | ojed. E.coli            | bez nálezu                  |
| Plk 5                | ojed. E.coli            | bez nálezu                  |
| Plk 6                | bez nálezu              | bez nálezu                  |
| Lfk 15               | coliformní zár.         | coliformní zár.             |
| Lfk 16               | coliformní zár.         | ojed. E.coli                |
| Mlk 13               | ojed.Pseudomonas aerug. | bez nálezu                  |
| Mlk 14               | bez nálezu              | bez nálezu                  |
| Jac 11               | ojed. E.coli            | bez nálezu                  |
| RR 128               | bez nálezu              | bez nálezu                  |
| Pt 4                 | bez nálezu              | bez nálezu                  |
| Plk 7                | bez nálezu              | bez nálezu                  |

|               |                                 |                 |
|---------------|---------------------------------|-----------------|
| 205 514       |                                 |                 |
| RR 90         | bez nálezu                      | bez nálezu      |
| Bit 25        | bez nálezu                      | bez nálezu      |
| Kb 6          | ojed. <i>Pseudomonas aerug.</i> |                 |
| Jb 88         | bez nálezu                      | bez nálezu      |
| Te 1          | ojed. <i>E. coli</i>            | ojed. mikrokoky |
| Pl 198        | bez nálezu                      | bez nálezu      |
| Ih 48         | mikrokoky                       | bez nálezu      |
| Jac 17        | bez nálezu                      | ojed. mikrokoky |
| RR 88         | ojed. mikrokoky                 | bez nálezu      |
| Bit 71        | coliformní zár.                 | bez nálezu      |
| Celkem vzorků | 29                              | 30              |
| bez nálezu    | 13                              | 23              |

Statistické vyhodnocení bylo provedeno chí kvadrátem, kdy byl hodnocen počet vzorků bez nálezu v semeni neředěném a ředěném. Bylo zjištěno, že došlo ke statisticky vysoce průkaznému snížení počtu kontaminovaných vzorků.

Srovnání se současným stavem

při použití ředidla antibiotikovaného penicilinem

ze 74 vzorků neředěných bylo 14 bez nálezu

ze 68 vzorků ředěných bylo 17 bez nálezu

při použití ředidla antibiotikovaného penicilinem a streptomycinem ve sp. vet.

Penstrepten

ze 74 vzorků neředěných bylo 14 bez nálezu

ze 32 vzorků ředěných bylo 6 bez nálezu

na základě statistického hodnocení chí kvadrátem nelze prohlásit, že by uvedená ředidla měla vliv na bakteriologické nálezy

Tabulka III uvádí vliv koncentrace glukózy v ředidle na počet vzorků se zbobtnalými akrosomy ve větším procentu než u 10 % počtu spermií. Semeno bylo fixováno roztokem podle Hankooka a barveno podle Giemsy.

Tabulka III

| Při použití 60 g glukózy  | počet vzorků | nevyhovujících |          |
|---------------------------|--------------|----------------|----------|
|                           |              | neředěných     | ředěných |
| při poměru ředění do 1:5  | 21           | 1              | 2        |
| při poměru ředění nad 1:5 | 20           | 0              | 1        |
| při použití 51 g glukózy  |              |                |          |
| při poměru ředění do 1:5  | 38           | 16             | 28       |
| při poměru ředění nad 1:5 | 24           | 15             | 12       |

do ředění 1:5 je zajištěna morfologická 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 zjištěna i po 8 dnech. Zajišťuje ve dvou variantách podle stupně ředění velmi dobrou přežitelnost a morfologickou neporušenost spermií. Účinné antibiotikováni zajišťuje vysoké procento ejakulátů bez bakteriologického nálezu po 24 až 96 hodinách, velmi dobrou motilitu do 72 hodin i déle. Antibiotická směs 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. Touto cestou lze preventivně ovlivňovat výskyt respiračních onemocnění a sýpavky, průjmových onemocnění narozených selat, hnisavých a nehnisavých endometritid, sekundárně způsobených podmíněně patogenními zárodky původem z genitálního traktu prasnice. Podmínkou je vždy citlivost výše uvedených zárodků k antibiotikům. Použití tohoto ředidla by bylo možné dosáhnout značných úspor na cestovním, které je dnes z důvodu denního zásobování chovů inseminačními dávkami vysoké. Při použití ředidla podle vynálezu by postačilo zásobování chovů 2x nebo 3x týdně.

#### P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Ředidlo pro konzervaci semene kanců, obsahující na 1 000 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 sestává z 500 000 m. j. draselné soli penicilinu, 100 až 200 mg tylosinu, 250 000 m.j. colistinu.