



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

205 509

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 09 78
(21) PV 2719-79

(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 kanců

1

Vynález řeší konzervaci kančího 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 pufrování a možnosti zvýšeného obsahu žloutku v ředidle podle Serdžuka. Ani jedno z těchto ředitel neřeší optimálně osmotické poměry v ředěném semeni při nižších stupních ředění. Ve všech třech případech uváděných dosud užívaných ředitel 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

205 509

vynálezu, které obsahuje na 1 000 ml redestilované vody, 1,8 g natriumcitrátu dihydrátu, 1,6 g chelatonu III, 0,5 g hydrogenuhlíčitanu sodného, 50 až 60 g glukosy pro analýzu, 20 až 50 ml vaječného žloutku a antibiotickou směs, která je tvořena 200 až 300 mg Linkomycinu, 200 až 300 mg Erythromycinu a 250 000 mg. j. Colistinu. Respektuje fyziologické požadavky spermií v ředěném semeni z hlediska osmotických poměrů podle stupně ředění, kvality a osmotické úrovně získaných ejakulátů, což má praktický význam při použití po 24 h a 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 vyprodukovaného potomstva.

U varianty I zvýšením osmotického tlaku ředidla dojde k tomu, že se vyrovnají osmotické poměry v ředěném semeni k hranici blízké fyziologickému optimu. Tím se zamezí možnosti bobtnání až svlékání akrosomů a tím i unikání akrosomálních enzymů do semenné plazmy, 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 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 podle Serdžukové, 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 aparátu 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 antibiotikování, které vede účinný zásah proti G- zárodkům, podílejícím se na vývoji endometritid 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 uvedených 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
Aqua redestillata	1000 ml	1000 ml
Glukóza pro analýzi	60 g	50 až 60 g
Natriumcitrát dihydrát	1,8 g	1,8 g
Hydrogenuhlíčitán 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:		
Linkomycin	200 až 300 mg	
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 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 1 uvádí výsledky vyšetření motility v procentech živých spermií po 48 a 72 hodinách konzervace v ředidle v současné době používaném (kontrola - spodní údaj) a v ředidle navrženém (pokus - vrchní údaj). Získaný ejakulát byl zpracováván 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. Srovnána byla motilita do 72 h po odběru.

Vzorek pokusný/vzorek kontrolní

Tabulka I

Státní registr	ředění	po 48 h	po 72 h	Státní registr	ředění	po 48 h	po 72 h
Bit 25	1:5	100	80	Jac 7	1:6	80	30
Jac 11	1:9	30	0	Mlk 18	1:5	65	50
Te 1	1:9	90	80			60	20
Mlk 19	1:9	0	0	Ter 9	1:4	70	70
Plk 6	1:5	70	60			60	50
Pt 4	1:7	0	0	Bit 71	1:6	55	0
RR 128	1:4	90	80			80	80
Kb 6	1:3	0	0	Kb 6	1:9	50	45
Jac 11	1:6	95	80	Lfk 17	1:4	80	70
Jac 13	1:5	50	0	Plk 7	1:6	60	60
Jac 12	1:3	80	70	RR 90	1:12	70	70
Lfk 17	1:6	70	70	Ter 10	1:4	60	50
Mlk 13	1:4	80	80	Pl 15	1:6	60	50
Plk 6	1:4	95	90	Mlk 10	1:7	55	50
Jac 12	1:10	85	70	Bit 25	1:3	80	80
Jac 14	1:10	100	90	Vso 82	1:3	80	60
Mlk 16	1:8	90	70	Kom 9	1:5	70	70
Kb 6	1:10	80	70	Te 1	1:7	80	60
Kom 9	1:6	60	70	Jac 11	1:10	70	70
Mlk 17	1:7	0	0	Jac 13	1:7	60	50
Jac 8	1:7	80	80	Jac 17	1:7	80	80
Ler 101	1:4	0	0	Mlk 16	1:9,9	70	70
Jor 83	1:4	95	90	Mlk 13	1:5	60	50
St 13	1:4	0	0	Hap 5	1:6	70	60
Mlk 20	1:9	90	90	Ost 6	1:9	80	80
Mlk 10	1:6	20	0	Sh 30	1:8	70	70
Mlk 14	1:12	60	50	Ler 93	1:5	60	50
Te 1	1:6	80	80	Ost 8	1:6	95	90
Kom 9	1:8	60	50			95	90
Ter 1	1:8	90	80			80	70
		60	55			80	70
		70	0	Celkem vzorků		55	42
		90	80	nevyhovuje pokus.		2	1
		45	40	nevyhovuje kontrol.		13	16
		70	70				
		70	50				
		80	70				
		70	50				
		70	60				
		60	55				
				$\chi^2_{(1)} =$		9,34	16,59

snížení počtu nevyhovujících vzorků je statisticky vysoce průkazné

Statistické vyhodnocení bylo provedeno chi kvadrátem vyhodnocením počtu vzorků, které vyhovují ČSN (50% a větší motilita) a které nevyhovují ČSN, při použití ředidla současného a nového. Bylo zjištěno, že snížení počtu nevyhovujících vzorků je statisticky vysoce významné.

Tabulka II uvádí výsledky bakteriologického vyšetření semene neřaděného a semene řaděného ředidlem podle vynálezu. Pro srovnání se uvádějí výsledky bakteriologického vyšetření při

použití antibiotikování podle současného stavu.

Tabulka II

Státní registr	semeno neředěné	semeno ředěné
Bit 132	směs přerostlá Proteem	colif. zár. Aeromonas
Jak 20	Proteus, Enterobacter	colif. z. Acinetobacter
Nik 59	coliformní z. Aeromonas	colif. z. Acinetobacter
Mg 59	coliformní zár.	colif. z. Aeromonas
Mil 51	Proteus	mikrokoky
Oa 27	coliformní zár. Aeromonas	Flavobacter
AA 38	E.coli, Aeromonas	Flavobacter, Aeromonas
Ntl 19	coliformní zár. Aeromonas	Aeromonas, Flavobacter
Mg 69	Proteus	colif. z. Flavobacter
Ost 6	Proteus	E.coli, Flavobacter
Sh 30	coliformní zár.	Aeromonas
Ost 11	bez nálezu	coliformní zár.
Sh 29	bez nálezu	bez nálezu
Bit 24	bez nálezu	bez nálezu
Hap 4	coliformní zár. Aeromonas	colif. z. Flavobacter
Ost 11		Achromobacter
Oa 27		Citrobacter
Al 7		bez nálezu
Ntl 20		Flavobacter
Jak 20		Citrobacter
Ler 93		bez nálezu
Ntl 20		bez nálezu
Al 8		bez nálezu
Mg 69		bez nálezu
Egt 176		bez nálezu
Dlk 2		bez nálezu
Bit 132		bez nálezu
Mg 67		bez nálezu
Celkem vzorků	15	29
bez nálezu	3	
původní mikroflora potlačena u		21

Statistické vyhodnocení: $\chi^2_{(1)} = 10,95$ - statisticky vysoce průkazné

Srovnání se současným stavem:

Penicilin - ze 74 vzorků neředěných bylo 14 bez nálezu

ze 68 vzorků ředěných bylo 17 bez nálezu

205 508

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

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

Tabulka III uvádí vliv koncentrace glukózy na počet vzorků se zbobtnalými akrosomy u více než 10 % spermí. Semeno bylo fixováno roztokem podle Hankocka a barveno podle Giemsa.

Tabulka III

Při použití 60 g glukózy	počet vzorků	nevyhovujících	
		neředěných	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 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 spermí. Účinné antibiotikování zajišťuje vysoké procento ejakulátů bez bakteriologického nálezu po 72 až 96 hodinách, velmi dobrou motilitu do 72 hodin i déle. 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 konversi živin, projevující se vyšší průměrných denních přírůstků a průměrné spotřeby krmiva na 1 kg přírůstku. Touto cestou lze 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. Použitím 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 stačilo zásobování chovů pouze 2x nebo 3x týdně.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

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 obsahuje 200 až 300 mg linkomycinu, 200 až 300 mg erythromycinu a 250 000 m. j. colistinu.