



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

205 516

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 09 78
(21) PV 2739-79

(51) Int. Cl. 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 dle 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

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 glukózy pro analýzi, 20 až 50 ml vaječného žloutku a antibiotickou směs, sestávající z 200 až 300 mg ampicilinu a 250 000 m. j. colistinu. Respektuje fyziologické požadavky spermíí v ředěném semeni z hlediska osmotických poměrů podle stupně ředění, kvality a osmotické úrovně získaných ejakulátů, což má praktický význam při použití po 24 hodinách konzervace a dále. Možnost zvýšeného obsahu žloutku umožňuje v závislosti na jeho kvalitě prodloužení přežitelnosti spermíí. Zásadní otázkou je však způsob antibiotikování, který se významnou měrou podílí na zajišťování 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 semené 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 dle Sadovnikové a dle 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 aparátu jak ze strany kance, tak i prasnice, zábrana přenosu zárodků k antibiotikům citlivých prostřednictvím inseminační dávky. Speciálně je to použití antibiotik, které likvidují zárodky ze skupiny Mykoplasmat, které dnes používaná antibiotika nepotlačují. Nelze opomenout účinný zásah proti zárodkům, působícím hnisavé endometritidy, které jsou převážně k dosud používaným antibiotikům necitlivé. 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, což bylo dlouhodobě největším problémem u používaných dostupných streptomycinů. Kromě jeho časté spermicidnosti je neúčinný na zárodky ze skupiny Mykoplasmat, často i na podmíněně patogenní zárodky, spadající do jeho 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
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:

Ampicilin 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 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, 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 navrženém (pokus) a v ředidle používaném (kontrola). Získaný ejakulát byl zpracován technologií, která je používána na plemenářských stanicích, byl před zpracováním rozdělen na část, která byla ředěna ředidlem podle vynálezu, a část, která byla ředěna používaným ředidlem. Srovnávána byla motilita do 72 hodin po odběru. Poměr ředění vyjadřuje 1 díl semene a počet dílů ředidla. Byla použita koncentrace 300 mg ampicilinu na 1 litr ředidla.

205 518

Tabulka I

Vzorky pokusné/vzorky kontrolní

Státní registr kance	ředění	motilita	
		po 48 h	po 72 h
Jac 8	1:6	50	50
		0	0
Mlk 20	1:8,3	80	60
		45	0
Hr 13	1:8,4	60	60
		20	0
Pt 4	1:9	70	60
		30	10
Mlk 18	1:8	70	60
		0	0
Jac 12	1:3,5	80	70
		60	50
Plk 5	1:5	90	80
		0	0
Jac 17	1:5	90	80
		50	20
Mlk 13	1:4	80	60
		40	0
Ter 1	1:4	80	70
		0	0
Pl 198	1:3,6	80	50
		30	0
Bit 25	1:2,6	90	60
		20	0
Kom 9	1:5,7	90	80
		30	0
Ter 9	1:9	80	50
		0	0
Kb 6	1:4,2	90	80
		60	20
Mlk 15	1:5	60	60
		60	55
Mlk 14	1:7	90	70
		55	50
Jac 13	1:7	80	60
		50	40
Mlk 19	1:7	90	80
		40	0

		motilita	
		po 24 h	po 48 h
Te 1	1:9,5	80	70
		50	0
Mlk 16	1:7,2	90	70
		50	30
Plk 6	1:5,9	90	90
		60	40
Jac 14	1:6,2	50	30
		60	50
Mlk 17	1:9,9	90	90
		60	50
Plk 7	1:7,4	90	80
		80	70
Mlk 10	1:5	90	90
		90	80
Jac 7	1:5,2	90	90
		80	70
Jac 12	1:2,8	90	90
		80	70
Pl 15	1:2,6	80	70
		80	80
Bit 71	1:4	90	80
		80	70
RR 90	1:2	90	90
		80	70

Celkem vzorků

31

19

nevyhovuje ČSN pokusných

1

0

kontrolních

16

16

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 neředěného a semene ředěného ředidlem podle vynálezu. Bylo použito 200 mg ampicilinu na 1 litr vody. Pro srovnání jsou uvedeny výsledky bakteriologického vyšetření při použití antibiotikování podle současného stavu. Ejakuláty byly po naředění uchovávány po dobu 24 až 96 h 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
Te 1	<i>Proteus rettgeri</i>	coliformní zár., <i>Acinetobacter</i>
RR 90	<i>Flavobacter</i>	coliformní zár., <i>Aeromonas hydrof.</i>
Lík 17	coliformní zárodky	coliformní zár., <i>Acinetobacter</i>
Jac 7	<i>E.coli</i> , <i>Proteus</i>	coliformní zár., <i>Aeromonas hydrof.</i>
Kb 6	<i>Proteus rettgeri</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i>
MLk 15	<i>E. coli</i> , <i>Proteus</i>	<i>Acinetobacter</i>
Plk 7	coliformní zárodky	coliformní zár.
Jac 12	<i>E.coli</i> , <i>Proteus</i>	<i>Acinetobacter</i>
Plk 5	coliformní zárodky	bez nálezu
Ter 9	<i>Enterobacter</i>	coliformní zár., <i>Aeromonas</i>
Jac 8	<i>E.coli</i> , <i>Proteus</i>	coliformní zár.
Vso 82	ojed. mikrokoky	bez nálezu
Jac 14	<i>Proteus</i>	<i>Acinetobacter</i>
MLk 17	<i>E.coli</i> , <i>Proteus</i>	<i>Acinetobacter</i>
MLk 16	<i>Proteus</i>	coliformní zár., <i>Acinetobacter</i>
Kom 9	<i>E.coli</i> , <i>Proteus</i>	colif. zár., <i>Acinetobact.</i> , <i>Aerom.</i>
Ter 1	bez nálezu	bez nálezu
Jac 9	bez nálezu	bez nálezu
MLk 19	bez nálezu	bez nálezu
MLk 10	bez nálezu	<i>Acinetobacter</i>
Ter 10	bez nálezu	<i>Aeromonas</i>
Pt 4	bez nálezu	bez nálezu
Pl 198	bez nálezu	coliformní zár.
Plk 6	bez nálezu	bez nálezu
Jac 17	bez nálezu	bez nálezu
Bit 71	přerostlé <i>Proteem</i>	bez nálezu
Jac 11	colif. zár., <i>Proteus</i>	bez nálezu
Jac 13	přerostlé <i>Proteem</i>	bez nálezu
MLk 13	přerostlé <i>Proteem</i>	bez nálezu
Bit 25	<i>Pseudomonas aerug.</i>	bez nálezu

205 516		
Mlk 18	bez nálezu	bez nálezu
Mlk 14	bez nálezu	bez nálezu
Mlk 20	bez nálezu	bez nálezu
RR 88	bez nálezu	ojed.Acinetobact.mikrokoky
RR 128	E.coli	Acinetobacter
Pl 15	přerostlé Proteem	ojed.Acinetobacter
Hr 13	bez nálezu	ojed.Acinetobacter

Celkem vzorků 13 37

bez nálezu 13

k potlačení původní mikroflory došlo u 29 vzorků

dodatečná kontaminace 13 vzorků

Statistickým vyhodnocením chí kvadrátem bylo zjištěno, že rozdíly jsou statisticky vysoce průkazné. Byl hodnocen počet vzorků, které byly v neřaděném semeni bez nálezu, u řaděného vzorky, kde došlo k potlačení původní mikroflory. Bylo zjištěno, že rozdíly jsou vysoce statisticky průkazné.

Srovnání se současným stavem

při použití ředidla antibiotikovaného penicilinem

ze 74 vzorků neřaděných bylo 14 bez nálezu

ze 68 vzorků řaděných bylo 17 bez nálezu

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

Penstrepten

ze 74 vzorků neřaděných bylo 14 bez nálezu

ze 32 vzorků řaděných bylo 6 bez nálezu

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

Tabulka III uvádí vliv koncentrace glukózy v ředidle podle vynálezu na počet vzorků se zbožtnalými akrosomy ve větším procentu než u 10 % počtu spermií. Semeno bylo fixováno roztokem podle Hankocka, barveno podle Giemsky.

Tabulka III

při použití 60 g glukózy	počet vzorků	nevyhovujících	
		neřaděných	řaděných
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 koncentraci 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. Zajišťuje se dvěma variantách podle stupně ředění velmi dobrou přežitelnost a morfologickou neporušenost spermií. Účinné antibiotikování zajišťuje vysoké procento ejakulátů bez bakteriologického nálezu po 24 až po 96 hodinách, velmi dobrou motilitu do 72 hodin i déle. Antibiotická směs je rovněž účinná proti zárodkům ze skupiny Mykoplasmat, 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 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, 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. 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 2x nebo 3x týdně.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

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 sestává z 200 až 300 mg ampicilinu a 250 000 m. j. colistinu.