



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210373

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 20 04 79
(21) (PV 2741-79)

(40) Zveřejněno 29 05 81

(45) Vydáno 15 07 83

(51) Int. Cl.³
A 01 N 1/00

(75)

Autor vynálezu

HOVORKA JAROSLAV MVDr., SEDLČANY

(54) Ředidlo pro konzervaci semene kanců

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 - dle Pliška, b) se žloutkem - dle Sadovnikové a dle Serdžuka. Ředidlo dle Pliška je užíváno při nižších poměrech ředění, jeho nevýhodou je, že neobsahuje vaječný žloutek, který zabraňuje shlukování spermií a tím prodlužuje i použitelnost ředěného semene. Procento přežívajících spermií se při aplikaci bez-žloutkového ředidla po 24 h značně snižuje a nezajišťuje podmínky pro dobrou březost a plodnost.

Nevýhody bezžloutkového ředidla do značné míry odstraňují ředidla dle Sadovnikové a dle Serdžuka, která umožňují podstatné prodloužení přežitelnosti spermií. Tato ředidla se liší ve způsobu puškování a možností použít zvýšeného obsahu žloutku v ředidle dle Serdžuka. Ani jedno z těchto ředidel neřeší optimálně osmotické poměry v ředěném semeni při nižších poměrech ředění. Ve všech třech případech užívaných ředidel se podle známého stavu techniky používá k antibiotikování penicilinu a streptomycinu. Tento způsob antibiotikování nespíná 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 dihydrátu citronanu sodného, 1,6 g chelatonu III, 0,5 g hydrogenuhlíkatu sodného, 50 až 60 g glukózy pro analýzy, 20 až 50 ml vaječného žloutku a antibiotickou směs, která je tvořena 200 až 300 mg linkomycinu a 400 až 600 mg spektinomycinu. Respektuje fyziologické požadavky spermií v ředěném

210373

semeni z hlediska osmotických poměrů podle stupně ředění, kvality a osmotické úrovně získaných ejakulátů, což má praktický význam při použití po 24 hodinách konzervace i déle.

Možnost zvýšeného obsahu žloutku umožňuje v závislosti na jeho kvalitě prodloužení přežitelnosti spermií. 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 vyprádkovaného 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 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 Sadvnikové 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 mikroflóru 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 v dnešní době převážně k používaným antibiotikům necitlivé. Instalace těchto účinných nespermicidních antibiotik do dělohy prasnice v inseminační dávce vede k eliminaci veškeré podmíněné patogenní mikroflóry k antibiotikům citlivé, což má příznivý vliv na reprodukční ukazatele, zejména březost a plodnost. Je tímto 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:

	Varianta I	Varianta II
Aqua redestillata	1 000 ml	1 000 ml
Glukosa pro analysi	60 g	50 až 51 g
dihydrát citronanu sodného	1,8 g	1,8 g
hydrogenuhličitan 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

Doporučené antibiotikování:

Linkomycin	200 až 300 mg
Spectinomycin	400 až 600 mg

Příprava ředidla:

Destilovaná voda se nechá přejít varem a zchladí se na 35 °C. Přidá se navážené množství citrátu, bikarbonátu, 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 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 ředění vyjadřuje 1 díl semene a počet dílů ředidla. Bylo použito horní hranice koncentrace antibiotik.

T a b u l k a 1
Vzorky pokusné/vzorky kontrolní

St. reg.	ředění	motilita		St. reg.	ředění	motilita	
		po 48 h	po 72 h			po 48 h	po 72 h
Jac 8	1:5	60	60	Mlk 20	1:8,3	80	60
		60	50			45	0
Jac 13	1:5	70	50	Hr 13	1:8,4	60	60
		70	40			20	0
Pt 4	1:5	60	50	Pt 4	1:9	70	60
		60	20			30	10
Plk 7	1:5	60	50	Mlk 18	1:6	70	60
		60	40			0	0
Bit 71	1:6	70	70	Jac 12	1:3,5	70	60
		80	40			60	50
Jac 8	1:5	50	40	Plk 5	1:5	90	80
		60	60			0	0
RR 128	1:7	50	30	Jac 17	1:5	80	50
		70	55			50	20
Kom 9	1:5	70	70	Mlk 13	1:4	90	70
		50	45			40	0
Mlk 14	1:8	60	50	Ter 1	1:4	90	70
		60	55			0	0
Lík 16	1:5	60	50	Pl 198	1:3,6	80	80
		70	55			30	0
Mlk 13	1:6	70	60	Bit 25	1:2,6	90	90
		55	50			20	0
Jac 11	1:6	50	50	Kom 9	1:5,7	90	90
		60	60			30	0
Ost 11	1:5		80	Ter 9	1:9	80	50
			80			0	0
Zák 112	1:6		50	Kb 6	1:4,2	100	80
			50			60	20

St. reg.	ředění	motilita		St. reg.	ředění	motilita	
		po 48 h	po 72 h			po 48 h	po 72 h
Vso 90	1:5		80	Mlk 15	1:5	80	50
			50			60	55
Nik 59	1:8		60	Mlk 14	1:7	90	50
			60			55	50
Bit 123	1:6		60	Jac 13	1:7	90	60
			50			50	40
Sh 29	1:6		80	Jac 9	1:7,6	90	70
			70			45	30
Ler 97	1:4		90	Mlk 19	1:7	90	60
			70			40	0
OA 28	1:5		60	Te 1	1:9,5	70	
			60			0	
Al 8	1:4		80	Mlk 16	1:7,2	50	
			50			30	
Jor 65	1:6		80	Plk 6	1:5,9	90	
			50			40	
Ost 7	1:5		90	Jac 14	1:6,2	70	
			60			50	
Mlk 10	1:4	80	80	Mlk 17	1:9,9	70	
		0	0			50	
Ter 10	1:5	90	90	Plk 7	1:7,4	80	
		50	40			70	
Jac 14	1:5	60	50	Mlk 10	1:5	80	
		60	50			80	
Mlk 15	1:6	60	50	Jac 7	1:3,2	90	
		40	35			70	
Plk 7	1:6	40	30	Jac 12	1:2,8	90	
		50	40			70	
Jac 8	1:6	50	50	Pl 15	1:2,6	100	
		0	0			80	
Bit 71	1:4	80					
		90					
RR 90	1:2	100		Celkem vzorků		52	40
		70		nevyhovuje ČSN			
				pokusných		1	2
				kontrolních		15	20

Statistickým vyhodnocením chí kvadrátem bylo zjištěno, že rozdíly jsou statisticky výsokce 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 navrženým ředidlem. Pro srovnání uvádím výsledky bakteriologického vyšetření při použití antibiotikování podle současného stavu. Ejakuláty byly po naředění uchovávány po dobu 24 až 96 hodin do bakteriologického vyšetření. Semeno bylo ředěno v poměru 1 díl semene a 1 až 2 díly ředidla. Byla použita dolní hranice koncentrace antibiotik.

T a b u l k a I I

St. reg.	semeno neředěné	semeno ředěné
Te 1	bez nálezu	ojed. mikrokoky
Ter 10	bez nálezu	ojed. mikrokoky
Ter 1	Citrobacter	bez nálezu
Kom 9	Proteus rettgeri	bez nálezu
Jac 11	bez nálezu	bez nálezu
Jac 14	Citrobacter	bez nálezu
Ter 9	E. coli	bez nálezu
Jac 7	ojed. coliformní zárodky	bez nálezu
Mlk 19	Citrobacter	bez nálezu
Mlk 18	bez nálezu	bez nálezu
Kb 6	Citrobacter	bez nálezu
Jac 13	směs přerostlá Proteem	bez nálezu
Mlk 10	Citrobacter	bez nálezu
Lík 17	Pseudomonas aerug.	bez nálezu
Mlk 16	Proteus	bez nálezu
Jac 8	E. coli, Proteus	bez nálezu
Plk 6	Enterobacter aer.	bez nálezu
Plk 7	Acinetobacter, mikrokoky	bez nálezu
Pl 198	bez nálezu	bez nálezu
Mlk 20	Citrobacter	bez nálezu
Bit 25	Pseudomonas aerug.	bez nálezu
Mlk 17	Proteus	
Mlk 14	ojed. coliformní zárodky	bez nálezu
Plk 5	bez nálezu	bez nálezu
Ter 9	bez nálezu	bez nálezu
Pl 15	bez nálezu	bez nálezu
Jac 9	směs Proteus, Pseudomonas	bez nálezu
Mlk 13	směs Proteus	ojed. E. coli
Jac 13	směs Proteus	bez nálezu
RR 90	Enterobacter, enterokoky	bez nálezu
RR 128	ojed. E. coli	bez nálezu
RR 88	Enterobacter aerog.	bez nálezu
Jac 17	Proteus	bez nálezu
Pt 4	Proteus	bez nálezu
Mlk 15	Proteus	bez nálezu
Celkem vzorků	35	35
bez nálezu	7	32

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 podle vynálezu na počet vzorků se zbožtnalými akrosomy ve větším procentu než u 10 % počtu spermií. Semeno bylo fixováno roztokem dle Hankocka a barveno dle Giemsky.

T a b u l k a I I I

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 kanců s dobrou použitelností minimálně do 72 hodin po odběru, s možností poměru ředění 1:10 i více. Zajišťuje ve dvou variantách podle stupně ředění velmi dobrou přežitelnost a morfologickou neporušenost spermií. Účinné antibiotikování 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 Mykoplasmat, které zpravidla nebývají v ejakulátech prokazovány.

Zabráněním vertikálního přenosu infekčních zárodků k antibiotikům citlivých z pleménka na pleménici 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, 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 navrhovaného ředidla by postačilo 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 dihydrátu citronanu sodného, 1,6 g chelatonu III, 0,5 g hydrogenuhličitanu sodného, 50 až 60 g glukózy pro analýzu, 20 až 50 ml vaječného žloutku a antibiotickou směs, vyznačující se tím, že antibiotická směs sestává z 200 až 300 mg linkomycinu a 400 až 600 mg spectinomycinu.