



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

205 511

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 09 78
(21) PV 2723-79

(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 pufrování 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

205 511

vynálezu, které obsahuje na 1 000 ml redestilované vody, 1,8 g natriumoitrátu 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, sestávající z 500 000 m. j. draselne soli penicilinu, 200 až 300 mg Spiramycinu, 250 000 m. 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 hodinách konzervace a dále. 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 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 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 pohyblivost ředěného semene a kvalita tohoto pohybu. Tato varianta má své opodstatnění při použití ředění do 1:15.

Varianta II je na úrovni osmotických poměrů ředidla podle Sačovníkové 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 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 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. Je tímto řešena nejen otázka účinnosti ředidla, ale i nespermicidnosti antibiotik, 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:

Agua redestillata

Varianta I

1000 ml

Varianta II

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:		
Penicilin G draselná sůl	500 000 m.j.	
Spiramycin	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, bicarbonát 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 v současné době používaném (kontrola) (spodní číslo) a v ředidle podle vynálezu (pokus) (horní číslo). Získaný ejakulát byl zpracován technologií, která je používána na plemenářských stanicích, byl před zpracováním rozdělen na část, která byla ředěna používaným ředidlem a část, která byla ředěna ředidlem podle vynálezu. Srovnávána byla motilita do 72 hodin po odběru. Poměr ředění vyjadřuje 1 díl semene a počet dílů ředidla.

Tabulka I

Vzorek pokusný/vzorek kontrolní

Státní registr kance	ředění	motilita		Státní registr kance	ředění	motilita	
		po 48 h	po 72 h			po 48 h	po 72 h
Jac 8	1:6	70	50	Te 1	1:9,5	80	0
MLk 20	1:8,3	60	50	MLk 16	1:7,3	70	30
Hr 13	1:8,4	50	50	Plk 6	1:5,9	90	40
		20	0				

205 511

Pt 4	1:9	70	50	Jac 14	1:6,2	80	
MLk 18	1:6	30	10	MLk 17	1:9,9	50	
		70	50			80	
Jac 12	1:3,5	0	0	Plk 7	1:7,4	50	
Plk 5	1:5	70	50	MLk 10	1:5	90	
		60	50			70	
Jac 17	1:5	90	80	Jac 7	1:3,2	90	
		0	0			80	
MLk 13	1:4	80	80	Jac 12	1:2,8	90	
		50	20			70	
Ter 1	1:4	70	70	Pl 15	1:2,6	90	
		40	0			80	
Pl 198	1:3,6	80	0	Bit 71	1:4	80	
		0	0			70	
Bit 25	1:2,6	70	60	RR 90	1:2	90	
		30	0			70	
Kom 9	1:5,7	60	0	Ost 11	1:5	80	70
		20	0			70	60
Ter 9	1:9	70	30	Zak 112	1:6	80	80
		30	0			50	50
Kb 6	1:4,2	60	50	Vso 90	1:5	60	50
		0	0			60	60
MLk 15	1:5	90	70	Nik 59	1:8	60	60
		60	20			60	60
MLk 14	1:7	60	60	Bit 123	1:6	60	60
		60	55			60	60
Jac 13	1:7	60	50	Sh 29	1:6	80	80
		55	50			80	80
Jac 9	1:7,6	60	60	Ler 97	1:4	90	90
		50	40			80	70
MLk 19	1:7	80	70	OA 28	1:5	70	60
		45	30			70	60
		80	80	Al 8	1:4	60	50
		40	0			80	70
				Jor 65	1:6	90	80
						80	70
				Ost 7	1:5	90	90
						80	80
				Celkem vzorků	43	31	
				nevyhovuje ČSN:			
				vzorků pokusných	3	3	
				vzorků kontrolních	17	17	

Statistické vyhodnocení bylo provedené chí kvadrátem vyhodnocením počtu vzorků, které vyhovují ČSN (50% a větší motilita) a které nevyhovují ČSN při použití ředidla podle vynálezu a současného. Bylo zjištěno, že snížení počtu nevyhovujících vzorků je statisticky vysoce průkazné.

Tabulka II uvádí výsledky bakteriologického vyšetření semene neředěného a semene ředěného ředidlem podle vynálezu. Pro srovnání jsou uvedeny výsledky bakteriologického vyšetření při použití antibiotikování podle současného stavu. Ejakuláty byly po naředění uchovávány po dobu 24 až 96 hodin do bakteriologického vyšetření.

Tabulka II

Státní registr kance	semeno neředěné	semeno ředěné
Mg 67	Pseudom. aerug., Achromobacter	Pseudom.aer.Acinetob.
Ler 93	Achromobacter	Achromobact., aer.sporul.
Ler 97	Aeromonas hydroph. Proteus	bez nálezu
OA 25	mikrokoky, colif. zár.	bez nálezu

Zak 112	směs přer. Proteem	Achromobact. Branhamella
M11 50	Acinetobacter	Bordetella bronchisept.
OA 27	Proteus, E.coli, Aeromonas	bez nálezu
Al 8	colif. zár.	Aeromonas hydroph.
Vso 90	bez nálezu	bez nálezu
Bit 132	bez nálezu	bez nálezu
Jak 20	Acinetobacter	bez nálezu
SH 30	Acinetobacter	bez nálezu
Nik 59	E.coli, Proteus, Aeromonas	Acinetobacter
SH 29	E.coli, Flavobacter	bez nálezu
Jak 19	Acinetobacter	bez nálezu
Ost 6	Branhamella, Acinetobacter	bez nálezu
Ntl 19	Acinetobacter, mikrokoky	bez nálezu
Jor 65	Aeromonas, E.coli	bez nálezu
Ost 8	Acinetobacter	aer.sporul, Branhamella
Ost 7	Proteus	bez nálezu
Ost 11	Proteus, colif. zár.	bez nálezu
Bit 123	Proteus	bez nálezu
Celkem vzorků	22	22
bez nálezu	2	15

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

Srovnání se současným stavem

při antibiotikování penicilinem

ze 74 vzorků neřaděných bylo 14 bez nálezu

ze 68 vzorků řaděných bylo 17 bez nálezu

na základě statistického vyhodnocení nelze prohlásit, že má vliv na bakteriologické nálezy.

při antibiotikování 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 nelze prohlásit, že má 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 % spermí. Semeno bylo fixováno roztokem podle Hankocka a barveno podle Giemsa.

205 511

Tabulka III

při použití 60 g glukózy	počet vzorků	nevyhovujících	
		neřaděných	řaděných
při poměru ředění do 1:5	21	1	2
nad 1:5	20	0	1
při použití 51 g glukózy			
při poměru 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 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 Mycoplasmat, které zpravidla nebývají v ejakulátech prokazovány.

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. 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 postačilo zásobování chovů pouze 2x nebo 3x týdně.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Ředidlo pro konzervaci semene kanou, obsahující 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 analýzu, 20 až 50 ml vaječného žloutku a antibiotickou směs, vyznačující se tím, že antibiotická směs sestává z 500 000 m. j. draselné soli penicilinu, 200 až 300 mg Spiramycinu a 250 000 m. j. Colistinu.