

**TAČR GAMA – VÚŽV, v. v. i**

**Projekt TG01010082**

**Závěrečná zpráva za dílčí projekt**

*Číslo dílčího projektu*

**TG002**

*Název*

Ředidlo ve formě koncentrátu pro krátkodobou případně střednědobou konzervaci kančího spermatu

*Doba řešení*

9/2015-8/2017

**Předkladatel: Ing. Frydrychová Soňa, Ph.D.**

## Shrnutí projektu

V současné době je krátkodobá konzervace spermatu u plemenných kanců určených k umělé inseminaci zajišťována pomocí ředidel, které jsou především v práškové podobě. Prášková forma ředidel mnohdy komplikuje a prodlužuje přípravu ředidla pro naředění kančího spermatu. Práškové formy ředidla nejsou vždy homogenní a je s tím také spojena obtížná manipulace při navažování ředidla, abychom získali požadovaný objem pro přípravu inseminačních dávek (ID). Uvedené nevýhody odstraňuje tekutý koncentrát ředidla pro krátkodobou případně střednědobou konzervaci kančího spermatu, který byl předmětem řešení tohoto projektu. V průběhu řešení projektu bylo navrženo, odzkoušeno a upravováno složení tekutého koncentráту ředidla. V rámci projektu byla také zkoušena možnost nahradit antibiotika chemickými látkami, ale jejich účinnost nepokryla celé spektrum výskytu mikroorganismů v kančím semeni a tak se nakonec použila směs antibiotik dle směrnice 90/429/EEC, kde jejich účinnost v koncentráту ředidla byla také odzkoušena.

Koncentrát ředidla byl testován pomocí vybraných spermatoanalytických metod. U koncentráту ředidla se sledovalo pH a osmotická aktivita. Dále byla provedena testace tekutého koncentráту ředidla, kde byla použita k jeho porovnání krátkodobá komerční ředidla typu A jako standard dále ředilo B, C, D a E. Konečná testace byla provedena pouze v poměru ředění 1+4, protože v poměru ředění 1+2 nebyly z předešlých testů zjištěny velké rozdíly v motilitě spermií mezi ředidly. Kvalita naředěného vzorku se hodnotila jen do 72h doby uchování, protože z předchozích výsledků vyplývá, že je ředidlo vhodné spíše pro krátkodobou konzervaci spermatu. V testaci byly použity metody hodnotící kvalitu membrán spermií a to metodou stanovení % živých a mrtvých spermií a krátkodobého testu hypoosmotické bobtnavosti - sHOST test. Testace ředidel probíhala objektivním sledováním motility spermií pomocí SCA programu (Sperm class analyzer), kde se hodnotila motilita spermií 0h po dobu uchování 72h tj. 24h, 48h a 72h od naředění. Pro podrobnější vyhodnocení přežitelnosti spermií byl použit termorezistentní test (TRT), který hodnotil motilitu spermií 1h, 3h a 5h ve vodní lázni (37°C), v době uchování 24h, 48h a 72h od naředění. Současně s testací ředidel se také testovala účinnost antibiotik v jednotlivých ředidlech.

Výsledky z analýz jsou zahrnuty v příloze. Z výsledků testů vyplývá, že stanovená průměrná hodnota pH a osmotická aktivita u koncentráту se nijak výrazně neodlišovala od ostatních ředidel viz. Tabulka 1. V Grafu 1. jsou uvedeny průměrné hodnoty % živých

spermií a výsledky sHOST testu. Výsledky motility spermií celkem a progresivní motility dle SCA jsou zahrnuty v Grafu 2, kde jsou výsledné hodnoty vztaženy k ředidlu A jako standardu 100 %. Zde je vidět, že koncentrát ředidla vykazuje k porovnání ke standardu vyšší hodnoty progresivní motility a motility celkem. Dále byl vyhodnocen TRT test (Graf 3), kde k porovnání ke standardu A poklesla motilita spermií u koncentrátu ředidla zhruba o 40 % během testu, nejvyšší pokles motility byl zaznamenán mezi 1h a 3h sledování během TRT testu (Graf 4). Celkově koncentrát ředidla v TRT testu ukázal horší výsledky v udržení motility během 5h sledování oproti ostatním testovaným ředidlům. Z výsledků vyplývá, že toto ředidlo je spíše vhodné pro krátkodobou konzervaci kančího spermatu (3 dny) v optimálním poměru ředění ID 1+2.

Při sledování účinku působení antibiotik u všech ředidel byl potlačen nárůst všech mikroorganismů během testace oproti nativnímu vzorku a vzorku ředidla bez antibiotik viz Graf 5. Účinnost antibiotik byla také odzkoušena cca po 4 měsících u koncentrátu ředidla, kde byly výsledky opět negativní, což znamená, že účinnost antibiotik v koncentrátu ředidla nebyla po tuto dobu uskladnění nijak narušena.

Koncentrát ředidla byl prakticky odzkoušen v pokusné stáji, kde byly inseminovány 3 prasnice s připravenými inseminačními dávkami v optimálním poměru 1+2. Podíl úspěšnosti březosti byl 67 %. Výsledky z tohoto projektu jsou publikovány.

Příprava standardního práškového ředidla trvá cca 45 minut a příprava tekutého koncentrátu ředidla max. 10 minut. Ročně to představuje velkou úsporu pracovního času na jednoho pracovníka. Na druhé straně, představuje ředidlo nejen podstatně jednodušší přípravu ale má i významný podíl na eliminaci chyb laboratorního personálu.

### Komentář k nákladům

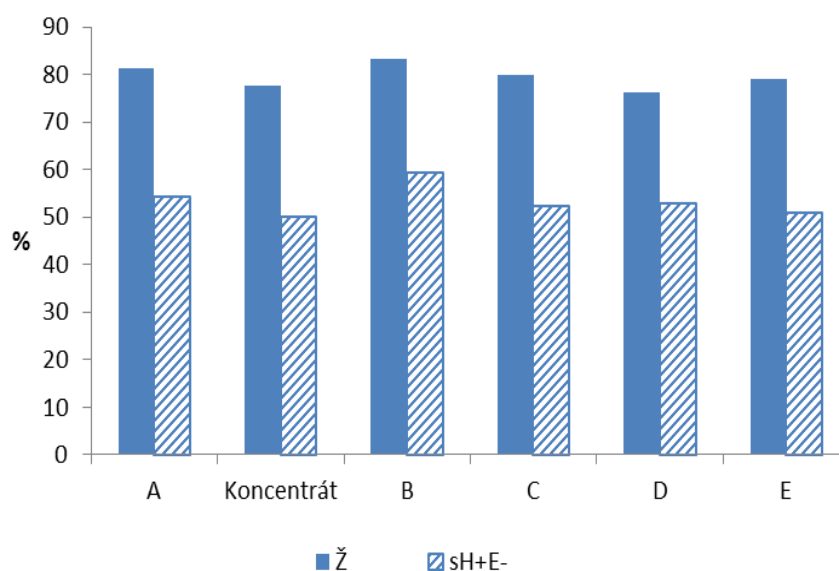
Čerpání nákladů probíhalo průběžně po celou dobu řešení projektu. Do nákladů byly zahrnuty objednávky na chemikálie, ředidla, pH elektrodu a spotřební materiál (mikroskopická sklíčka Leja a podložní sklíčka, špičky, zkumavky atd.). Ve výdajích na služby bylo zahrnuto stanovení osmotické aktivity v Oblastní nemocnici v Rychnově nad Kněžnou a na údržbu laboratorních přístrojů (oprava a servis osmometru, servis mikroskopů, destilačního přístroje a vah).

## Příloha

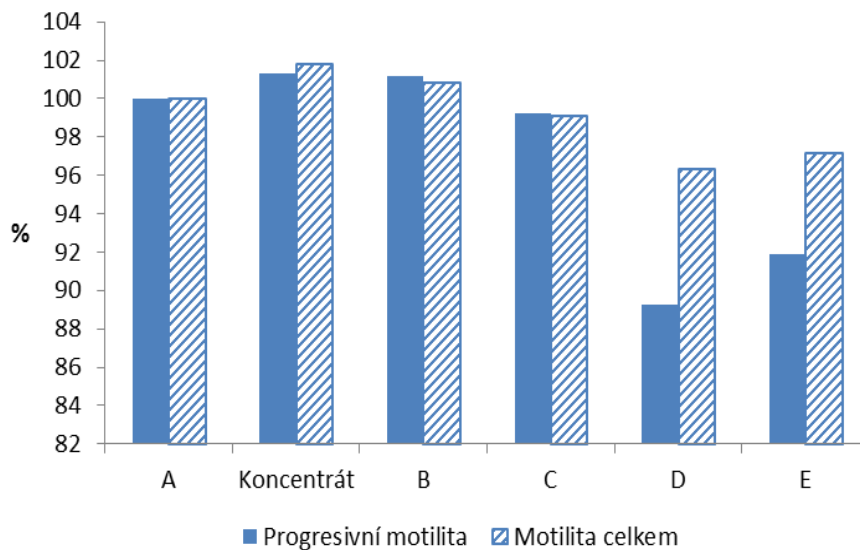
Tabulka 1. Průměrné hodnoty pH a osmotické aktivity u testovaných ředidel

	A	Koncentrát	B	C	D	E
<b>pH</b>	7,74	7,65	7,40	7,90	7,70	7,65
<b>Osmolalita (mOsmol/l)</b>	342,8	361,5	310,4	370	384,1	362,3

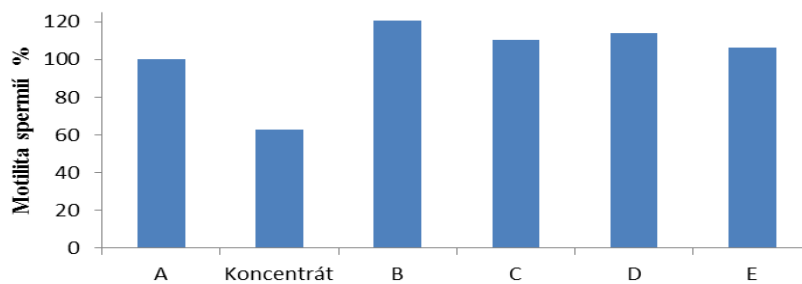
Graf 1. Celkové průměrné hodnoty % živých spermií a sHOST testu 0h po dobu sledování 72h.



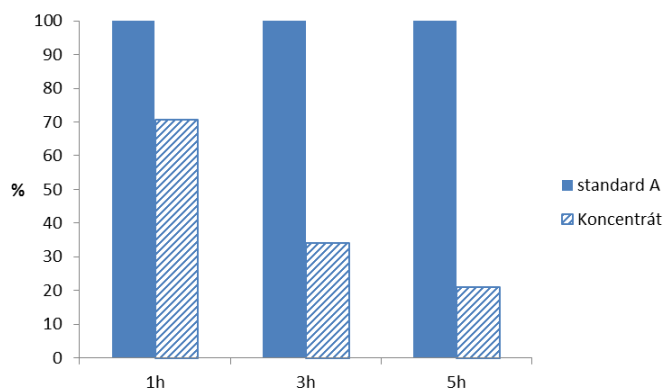
Graf 2. Celkové průměrné hodnoty progresivní motility a motility celkem dle SCA vztažena k ředidlu A jako standardu (100%).



Graf 3. Průměrné hodnoty motility spermií celkem v TRT vztažené k ředidlu A jako standardu (100%).



Graf 4. Průměrné hodnoty motility spermií během 1, 3 a 5h v TRT vztažené k ředidlu A jako standardu (100%).



Graf 5. Účinek antibiotik během testace

