

Vědecké protokoly použité při hodnocení zavaděče **New Absolute** Σ UI™ v porovnání s tradičními pěnovými zavaděči

Výzkumníci:

Asist. Prof. Kampon Kaeoket, DVM, MSc, PhD (Reprodukce prasat) E-mail: vskkk@mahidol.ac.th

Dr. Dusit Laohasinnarong, DVM
E-mail: vsdlh@mahidol.ac.th

Fakulta veterinární medicíny, Univerzita Mahidol, Salaya,
Phutthamonthon, Nakorn-pathom, Thajsko 73170
Tel: 66 02 4415242 ext 1526 Fax: 66 02 4410937

Cíle

- Porovnat distribuci spermií v děložně vejcovodním křížení (UTJ) a vejcovodu (porovnání AI a IUI)
- Porovnat míru oplodnění (porovnání mezi AI a IUI)
- Porovnat míru březosti (porovnání mezi AI a IUI)
- Porovnat míru zabřeznutí (porovnání mezi AI a IUI)
- Porovnat velikost vrhu (porovnání mezi AI a IUI)
- Porovnat inseminační dávky (1.5 vs 3.0×10^9 spermatu)

Plán experimentu

Dohromady 60 prasnic bylo rozděleno do 4 skupin (15 prasnic v každé skupině). Prasnice byly nakoupeny na soukromé farmě a drženy v Mahidolově universitě. **Skupina-A (15 prasnic)**: inseminována pomocí **pěnové olivky** dávkou o 1.5×10^9 spermatu.

Sk.-A1 (5 prasnic): porážka pro zjištění distribuce spermatu v děloze a vejcovodech (5-6 h po AI)

Sk.-A2 (5 prasnic): porážka pro zjištění míry zabřeznutí (3 dny po AI)

Sk.-A3 (5 prasnic): pro zjištění míry březosti, míry zabřeznutí a velikosti vrhu **Skupina-B (15 prasnic)**: inseminována pomocí **pěnové olivky** dávkou 3.0×10^9 spermatu.

Sk.-B1 (5 prasnic): porážka pro zjištění distribuce spermatu v děloze a vejcovodech (5-6 h po AI)

Sk.-B2 (5 prasnic): porážka pro zjištění míry zabřeznutí (3 dny po AI)

Sk.-B3 (5 prasnic): pro zjištění míry březosti, míry zabřeznutí a velikosti vrhu

Skupina-C (15 prasnic): inseminována pomocí **nového zavaděče (Absolute Σ UI™)** dávkou **1.5 x 10⁹** spermatu.

Sk.-C1 (5 prasnic): porážka pro zjištění distribuce spermatu v děloze a vejcovodech (5-6 h po AI)

Sk.-C2 (5 prasnic): porážka pro zjištění míry zabřeznutí (3 dny po AI)

Sk.-C3 (5 prasnic): pro zjištění míry březosti, míry zabřeznutí a velikosti vrhu

Skupina-D (15 prasnic): inseminována pomocí **nového zavaděče (Absolute Σ UI™)** dávkou **3.0 x 10⁹** spermatu.

Sk.-D1 (5 prasnic): porážka pro zjištění distribuce spermatu v děloze a vejcovodech (5-6 h po AI)

Sk.-D2 (5 prasnic): porážka pro zjištění míry zabřeznutí (3 dny po AI)

Sk.-D3 (5 prasnic): pro zjištění míry březosti, míry zabřeznutí a velikosti vrhu

Materiál a Metody

Detekce říje a monitorování ovulace

Detekce říje byla provedena kontrolou pochvy ohledně zduření a pocení (prooestrus) stejně tak jako kontrolou příznakového reflexu (oestrus) a to za přítomnosti kance. Detekce říje byla prováděna dvakrát denně. Ovulace byla sledována každých 8 hodin transrektálním ultrasonografem jak bylo popsáno dříve (Kaeoket a kolektiv, 2002; Kaeoket a kolektiv, 2005).

Inseminace a porážka

Všechny prasnice byly dvakrát inseminovány tou samou osobou 24 hodin a 36 hodin po příznacích říje dávkou smíchaných semen (dva kanci s prokázanou plodností), obsahující 1.5 x 10⁹ nebo 3 x 10⁹ spermatu v 100 ml BTS (Beltsville rozmrazující roztok, Pursel a Johnson, 1976). Po rozředění bylo semeno uloženo při 16-

18°C a použito do 48 hodin pomocí pěnové olivky a nového zavaděče.

Prasnice na porážku byly rozvrženy na **v různých skupinách**.

Skupina-A (15 prasnic): inseminována pomocí **pěnové olivky** dávkou **1.5 x 10⁹** spermatu.

Sk.-A1 (5 prasnic): porážka pro zjištění distribuce spermatu v děloze a vejcovodech (5-6 h po AI)

Sk.-A2 (5 prasnic): porážka pro zjištění míry zabřeznutí (3 dny po AI)

Skupina-B (15 prasnic): inseminována pomocí **pěnové olivky** dávkou **3.0 x 10⁹** spermatu.

Sk.-B1 (5 prasnic): porážka pro zjištění distribuce spermatu v děloze a vejcovodech (5-6 h po AI)

Sk.-AB (5 prasnic): porážka pro zjištění míry zabřeznutí (3 dny po AI)

Skupina-C (15 prasnic): inseminována pomocí **nového zavaděče (Absolute Σ UI™)** dávkou **1.5 x 10⁹** spermatu.

Sk.-C1 (5 prasnic): porážka pro zjištění distribuce spermatu v děloze a vejcovodech (5-6 h po AI)

Sk.-C2 (5 prasnic): porážka pro zjištění míry zabřeznutí (3 dny po AI)

Skupina-D (15 prasnic): inseminována pomocí **nového zavaděče (Absolute Σ UI™)** dávkou **3.0 x 10⁹** spermatu.

Sk.-D1 (5 prasnic): porážka pro zjištění distribuce spermatu v děloze a vejcovodech (5-6 h po AI)

Sk.-D2 (5 prasnic): porážka pro zjištění míry zabřeznutí (3 dny po AI)

Pohlavní orgány byly odebrány ihned po porážce. Byl spočítán počet corpora lutea.

Odejmутí oocytů a spermatu z propláchnutých vejvodů

Technika propláchnutí poskytuje přesnější zhodnocení počtu a distribuce vejvodního spermatu než pozorování in situ pomocí elektronového mikroskopu (Mburu a kolektiv, 1996). Z tohoto důvodu bylo UTJ (1 cm špičky rohu dělohy a 1 cm šíje) dvakrát propláchnuté 0.5 ml a šíje a vejvod odděleně dvakrát 10 ml fosfátového vyrovnávacího solného roztoku (PBS) při 37°C (obě strany). Veškeré propláchnutí bylo prováděno přímo do plastických Eppendorf nádobek (UTJ) nebo do petriho misky (šíje a vejvod). Sperma z propláchnutého UTJ bylo ustáleno solným roztokem a prozkoumána pod mikroskopem pomocí měřiče červených krvinek (Bürkerova komora, zvětšení x400). Oocyty byly odejmuty pod stereomikroskopem a prozkoumány pod obráceným fázově kontrastním mikroskopem (zvětšení x200) ohledně přítomnosti spermatu. Vejcovody (šíje a vejvod) prasnic byly také propláchnuty za účelem odejmutí oocyt.

Odejmутí nezabřeznutých a rozštěpených oocytů z propláchnutých rohů dělohy

Rohy dělohy (20 cm od vrcholu rohů) z prasnic byly propláchnuty dvakrát denně fosfátovým vyrovnávacím solným roztokem (PBS) při 37°C a tekutina byla sbírána do petriho misek. Oocytes byly poté izolovány a prozkoumány pod stereomikroskopem a pod obráceným fázově kontrastním mikroskopem (Olympus, Japonsko; zvětšení x200) za účelem zjištění jejich morfologie a vývojového stádia. Oocyte bylo považováno za neoplozené, pokud nebylo zjištěno žádné rozštěpení. Rozštěpená oocyta byla považována za normální, pokud byl vidět prostor mezi vejcem zónou pellucida a blastomery byly umístěny bez příznaků disintegrace.

Míra březosti, míra zabřeznutí a velikost vrhu

Detekce březosti byla provedena mezi 18.-20. dnem po inseminaci pomocí real time (B-mód) ultrazvuku.

Také byla zaznamenána míra zabřeznutí a velikost vrhu.

Statistické analýzy

Data byla analyzována pomocí SAS programu (1989). PROC FREQ (Fisherův přestý test, dva konce) byl použit pro srovnání distribuce spermatu, počtu oocytů s akcesorickými spermii se zónou pellucida a oplodněnými oocyty mezi pěnovou olivkou a novými IUI zavaděči.

Reference

- Mburu, J.N., Einarsson, S., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., 1996. Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 45, 109-121.
- Kaeoket, K., Persson E., Dalin A.-M., 2002. The influence of pre- and post-ovulatory insemination on sperm distribution in the oviduct, accessory sperm to the zona pellucida, fertilisation rate and embryo development in sows. *Anim. Reprod. Sci.* 71, 239-248.
- Kaeoket, K., Tantasuparuk, W, Kunavongkrit, A. 2005. The effect of post-ovulatory insemination on the subsequent oestrous cycle length, embryonic loss and vaginal discharge in sows. *Reprod. Dom. Anim.* 40, 492-494.