

**Univerzita Pardubice**

**Fakulta chemicko-technologická**

**Inhibice mikroorganismů ve vzorcích spermatu chovných kanců**

**Bc. Kristýna Milichová**

**Diplomová práce  
2018**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Millichová**  
Osobní číslo: **C16451**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Inhibice mikroorganismů ve vzorcích spermatu chovných kanců**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Charakterizujte vlastnosti kančího spermatu.
2. Uveďte, jaký mají mikroorganismy vliv na kvalitu kančího spermatu.
3. Shrňte možnosti, kterými lze ovlivnit mikroorganismy ve vzorcích spermatu.

Experimentální část:

1. Vyšetřete vzorky spermatu chovných kanců, které jsou ředěny různými druhy ředících látek.
2. Vyhodnoťte výsledné působení ředících látek.
3. Výsledky porovnejte s literaturou.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce**

Vedoucí diplomové práce:

**RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 7. 5. 2018

Bc. Kristýna Millichová

## **PODĚKOVÁNÍ:**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce RNDr. Markétě Vydržalové, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost, poskytnuté materiály a čas strávený při zpracování této práce. Rovněž mé poděkování patří paní laborantce Janě Halákové za pomoc a rady při experimentální části této práce. Také děkuji chovné stanici prasat v Kostelci nad Orlicí za umožnění tohoto experimentu.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá testováním účinnosti různých druhů inhibičních látek na mikroorganismy kontaminující sperma chovných kanců. V úvodu je popsáno základní složení a charakteristické vlastnosti kančího spermatu. Dále jsou uvedeny mikroorganismy nejčastěji se vyskytující v kančím spermatu, jejich zdroj a vliv na kvalitu kančího spermatu. Velká část práce je věnována možnostem inhibice mikroorganismů kančího spermatu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kančí sperma, mikroorganismy, spermie, kvalita kančího spermatu, inhibice mikroorganismů, ředidla kančího spermatu, antibiotika

## **TITLE**

Inhibition of microorganisms in semen of breeding boars

## **ANNOTATION**

This master's thesis deals with testing the effect of various types of inhibition substances on microorganisms contaminating semen of breeding boars. The introduction describes the basic composition and characteristics of the boar semen. The microorganisms most commonly found in boar semen, their sources and their influence on the quality of the boar semen are also mentioned. A big part of this work is devoted to the possibilities of inhibition of microorganisms in boar semen.

## **KEYWORDS**

boar semen, microorganisms, spermatozoa, boar semen quality, inhibition of microorganisms, boar semen extenders, antibiotics

# OBSAH

ÚVOD .....	11
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA KANČÍHO SPERMATU .....	12
1.1.1 Složení kančího spermatu .....	12
1.1.2 Hodnocení kvality kančího spermatu .....	15
1.2 MIKROORGANISMY VE SPERMATU CHOVNÝCH KANČŮ .....	21
1.2.1 Zdroje mikroorganismů v kančím spermatu .....	21
1.2.2 Nejběžnější mikroorganismy kančího spermatu .....	21
1.2.3 Vliv mikroorganismů na kvalitu kančího spermatu .....	22
1.3 UMĚLÁ INSEMINACE .....	24
1.4 ŘEDĚNÍ A KONZERVACE KANČÍHO SPERMATU .....	26
1.4.1 Složení ředidel kančího spermatu .....	28
1.4.2 Nejpoužívanější ředidla .....	29
1.5 INHIBICE MIKROORGANISMŮ VE SPERMATU CHOVNÝCH KANČŮ .....	29
1.5.1 Antibiotika v ředidlech kančího spermatu .....	29
1.5.2 Koloidní centrifugace .....	32
1.5.3 Přírodní látky .....	34
1.5.4 Chemické látky .....	35
1.5.5 Kationické antimikrobiální peptidy .....	37
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>39</b>
2.1 VYŠETŘOVANÝ MATERIÁL .....	39
2.2 TESTOVANÉ LÁTKY .....	39
2.3 PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A POMŮCKY .....	41
2.4 PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ A ROZTOKŮ .....	42
2.5 STANOVENÍ ÚČINNOSTI INHIBIČNÍCH LÁTEK .....	42
2.6 STANOVENÍ CITLIVOSTI VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ NA ANTIBIOTIKA .....	44
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
3.1 TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI ŘEDIDEL PRO KRÁTKODOBÉ A DLOUHODOBÉ UCHOVÁVÁNÍ .....	46
3.1.1 Vzorky kančího spermatu č. 1 .....	46
3.1.2 Vzorky kančího spermatu č. 2 .....	48
3.1.3 Vzorky kančího spermatu č. 3 .....	50
3.2 TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI ŘEDIDEL PRO KRÁTKODOBÉ UCHOVÁVÁNÍ .....	52
3.2.1 Vzorky kančího spermatu č. 4 .....	52
3.2.2 Vzorky kančího spermatu č. 5 .....	53
3.2.3 Vzorky kančího spermatu č. 6 .....	55
3.2.4 Vzorky kančího spermatu č. 7 .....	56
3.2.5 Vzorky kančího spermatu č. 8 .....	57
3.2.6 Vzorky kančího spermatu č. 9 .....	59
3.2.7 Shrnutí účinnosti testovaných ředidel pro krátkodobé uchovávání .....	60
3.3 TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH A CHEMICKÝCH LÁTEK .....	62
3.3.1 Vzorky kančího spermatu č. 10 .....	63
3.3.2 Vzorky kančího spermatu č. 11 .....	66
3.4 TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI VYBRANÝCH ŘEDIDEL PRO KRÁTKODOBÉ UCHOVÁVÁNÍ A ÚČINNOSTI KARVAKROLU A THYMOLU .....	70
3.4.1 Vzorky kančího spermatu č. 12 .....	70
3.4.2 Vzorky kančího spermatu č. 13 .....	72
3.5 TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI THIOSÍRANU SODNÉHO .....	76
3.5.1 Vzorky kančího spermatu č. 14 .....	76
3.6 TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI VYBRANÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK .....	79
3.6.1 Vzorky kančího spermatu č. 15 .....	80
3.6.2 Vzorky kančího spermatu č. 16 .....	81
3.7 TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ NA ANTIBIOTIKA .....	86
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>91</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>93</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Morfologie kančí spermie (Bonet a kol., 2012) .....	13
Obrázek 2: Kančí sperma s oddělenou seminální plazmou od spermatických buněk .....	14
Obrázek 3: Cytoplasmatické kapky kančích spermií (Čeřovský a kol., 2005).....	17
Obrázek 4: Aglutinace kančích spermií (Rozeboom, 2000).....	19
Obrázek 5: Jednovrstevná centrifugace kančího spermatu (Morrell a kol., 2011b).....	33
Obrázek 6: Vzoroký kančího spermatu .....	39
Obrázek 7: Postup přípravy ředící řady .....	43
Obrázek 8: Kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 1 (KA, 48 h, 37 °C) .....	47
Obrázek 9: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 5 ředěného ředidlem VIP 3 (3. den; KA, 48 h, 37 °C).....	54
Obrázek 10: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 8 s ředidlem VIP 3 - 1. den (KA, 48 h, 37 °C).....	58
Obrázek 11: Kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 10 (1. den, 100x ředěný; KA, 48 h, 37 °C).....	63
Obrázek 12: Porovnání kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 10 s kultivacemi vzorků s obsahem síranu zinečnatého a thiosíranu sodného – 3. den (KA, 48 h, 37 °C).....	64
Obrázek 13: Kultivace vzorků kančího spermatu č. 10 s obsahem síranu zinečnatého a kys. gallové – 7. den (KA, 48 h, 37 °C) .....	64
Obrázek 14: Kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 11 – 1. a 7. den (KA, 48 h, 37 °C).....	66
Obrázek 15: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 11 s obsahem kys. gallové - 3. den, 10x ředěný (KA, 48 h, 37 °C).....	67
Obrázek 16: Kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 12 - 1. den, 100x ředěný (KA, 48 h, 37 °C).....	70
Obrázek 17: Kultivace vzorků kančího spermatu č. 13 ředěných BTS bez antibiotik a VIP 3 (KA, 48 h, 37 °C).....	73
Obrázek 18: Kultivace vzorků kančího spermatu č. 16 ředěných BTS bez antibiotik (1:2) a BTS bez antibiotik s obsahem síranu měďnatého (1:8) – 1. den (KA, 48 h, 37 °C) ...	82
Obrázek 19: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 16 ředěného BTS bez antibiotik s obsahem síranu měďnatého (1:2) - 2. den (KA, 48 h, 37 °C).....	82
Obrázek 20: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 16 ředěného BTS bez antibiotik s boraxem (1:4) - 3. den (KA, 48 h, 37 °C).....	83
Obrázek 21: Testování citlivosti <i>Escherichia coli</i> na antibiotika (MH agar, 24h, 37 °C).....	87
Obrázek 22: Testování citlivosti <i>Proteus vulgaris</i> na antibiotika (MH agar, 24h, 37 °C) .....	88
Obrázek 23: Testování citlivosti <i>Proteus mirabilis</i> na antibiotika (MH agar, 24h, 37 °C).....	89
Obrázek 24: Testování citlivosti <i>Klebsiella oxytoca</i> na antibiotika (MH agar, 24h, 37 °C) ...	90

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Normální a mezní hodnoty kvality spermií (Rozeboom, 2000).....	19
Tabulka 2: Citlivost některých mikroorganismů kančího spermatu na antibiotika (Schulze a kol., 2015) .....	32
Tabulka 3: Složení testovaných ředidel .....	40
Tabulka 4: Ředění vzorků kančího spermatu č. 1, 2 a 3 .....	46
Tabulka 5: Ředění vzorků kančího spermatu č. 4 - 9 .....	52
Tabulka 6: Složení vzorků kančího spermatu č. 10 a 11 .....	62
Tabulka 7: Ředění vzorků kančího spermatu č. 12 a 13 .....	70
Tabulka 8: Složení vzorků kančího spermatu č. 14 .....	76
Tabulka 9: Složení vzorků kančího spermatu č. 15 .....	79
Tabulka 10: Složení vzorků kančího spermatu č. 16 .....	79



Tabulka 11: Výsledky testování citlivosti <i>Escherichia coli</i> na antibiotika .....	86
Tabulka 12: Výsledky testování citlivosti <i>Proteus vulgaris</i> na antibiotika 1 .....	87
Tabulka 13: Výsledky testování citlivosti <i>Proteus vulgaris</i> na antibiotika 2 .....	88
Tabulka 14: Výsledky testování citlivosti <i>Proteus mirabilis</i> na antibiotika.....	89
Tabulka 15: Výsledky testování citlivosti <i>Klebsiella oxytoca</i> na antibiotika.....	90

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 1 - 1. den.....	48
Graf 2: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 1 - 3. den.....	48
Graf 3: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 2 - 3. den.....	49
Graf 4: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 2 - 7. den.....	49
Graf 5: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 3 - 1. den.....	50
Graf 6: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 3 - 3. den.....	51
Graf 7: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 3 - 7. den.....	51
Graf 8: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 4 - 1. den.....	53
Graf 9: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 4 - 3. den.....	53
Graf 10: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 5 - 1. den.....	54
Graf 11: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 5 - 3. den.....	55
Graf 12: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 6 - 1. den.....	55
Graf 13: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 6 - 3. den.....	56
Graf 14: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 7 - 1. den.....	56
Graf 15: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 7 - 3. den.....	57
Graf 16: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 8 - 1. den.....	58
Graf 17: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 8 - 3. den.....	58
Graf 18: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 9 - 1. den.....	59
Graf 19: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 9 - 3. den.....	59
Graf 20: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 10 - 1. den.....	65
Graf 21: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 10 - 3. den.....	65
Graf 22: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 10 - 7. den.....	65
Graf 23: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 11 - 1. den.....	67
Graf 24: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 11 - 3. den.....	68
Graf 25: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 11 - 7. den.....	68
Graf 26: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 12 - 1. den.....	71
Graf 27: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 12 - 3. den.....	72
Graf 28: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 12 - 7. den.....	72
Graf 29: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 13 - 1. den.....	73
Graf 30: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 13 - 3. den.....	74
Graf 31: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 13 - 7. den.....	74
Graf 32: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 14 - 1. den.....	77
Graf 33: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 14 - 2. den.....	77
Graf 34: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 14 - 3. den.....	78
Graf 35: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 15 - 1. den.....	80
Graf 36: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 15 - 2. den.....	81
Graf 37: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 15 - 3. den.....	81
Graf 38: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 16 - 1. den.....	83
Graf 39: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 16 - 2. den.....	84
Graf 40: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 16 - 3. den.....	84

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AMC	amoxicillin klavulanová kyselina
AMP	ampicilin
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
BTS	z angl. Beltsville Thawing Solution
CFR	cefadroxil
CFU	kolonie tvořící jednotky (z angl. colony forming units)
CXM	cefuroxim
DOX	doxycyklin
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina (z angl. ethylene diamine tetraacetic acid)
I	intermediální citlivost (z angl. intermediate)
kys.	kyselina
MBC	minimální baktericidní koncentrace (z angl. minimum bactericidal concentration)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z angl. minimum inhibitory concentration)
R	rezistence (z angl. resistant)
S	citlivost (z angl. susceptible)
<i>sp.</i>	druh - blíže neurčený druh určitého rodu (z angl. species)
<i>spp.</i>	druhy – více druhů jednoho rodu
<i>subsp.</i>	poddruh (z angl. subspecies)
SXT	sulfamethoxazol

## ÚVOD

Kančí sperma je složeno z kančích pohlavních buněk (spermií) a seminální plazmy, což je směs sekretů varlat, nadvarlat a vedlejších kančích pohlavních žláz.

V dnešní době je v reprodukci chovných prasat hojně využívána umělá inseminace. Pro úspěšnou umělou inseminaci je zásadní vysoká kvalita kančího spermatu. Proto jsou semenné dávky podrobovány různým testům, které určují jejich kvalitu pro následný výběr. Při hodnocení kvality kančího spermatu se testuje hlavně životaschopnost, pohyblivost, koncentrace, morfologie, aglutinace a osmotická rezistence spermií. Dále se u spermatu hodnotí jeho objem, barva, zápach, pH či chemické vlastnosti.

Mikroorganismy jsou kontaminanty mnoha tělních tekutin včetně spermatu lidí i zvířat. Sperma je ideálním prostředím pro růst bakterií, plísní a hub. Mikroorganismy mají škodlivý vliv na funkci spermií a kvalitu spermatu, mohou snižovat míru početí či způsobovat infekce samičího genitálního traktu. Zdrojem mikroorganismů v kančím spermatu může být infekce urogenitálního traktu kance nebo ke kontaminaci dochází v průběhu procesu odběru a zpracování. Nejčastěji jsou ve vzorcích kančího spermatu prokázáni zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Z důvodu zisku co největšího počtu inseminačních dávek je kančí sperma ředěno různými ředícími látkami, které obsahují velké množství živin a ochranných látek pro spermie. Za účelem inhibice mikroorganismů kontaminující kančí sperma jsou do ředidel přidávána různá antibiotika. Kvůli stále rostoucí rezistenci bakterií na antibiotika je snaha nalézt jejich alternativy jakými mohou být přírodní a chemické látky, koloidní centrifugace či kationické antimikrobiální peptidy.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Charakteristika kančího spermatu

### 1.1.1 Složení kančího spermatu

Hlavní funkcí kančího reprodukčního systému je tvorba a ejakulace spermatu (Bonet a kol., 2012). První ejakulace u kanců probíhá na začátku puberty, tedy mezi 5. a 6. měsícem (Oliveras, 2008). Ejakulát je tvořen sekrety varlat a nadvarlat (2 – 5 % z celkového objemu ejakulátu), sekrety semenných váčků (15 -20 %), sekrety bulbouretrálních žláz (10 – 25 %) a sekrety prostaty (55 - 75 %). Kančí ejakulát lze rozdělit do tří hlavních frakcí v závislosti na jeho složení (Bonet a kol., 2012):

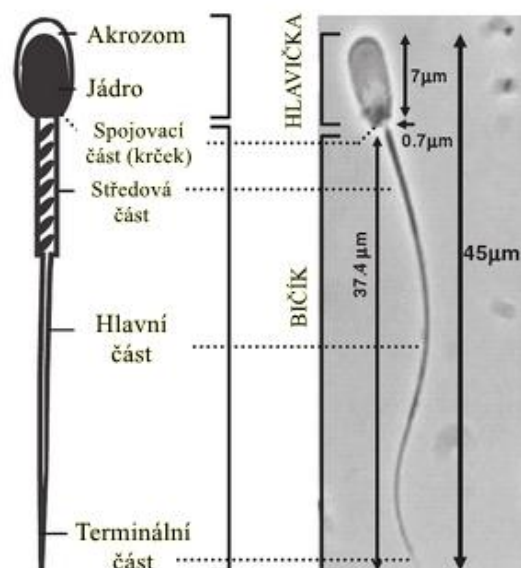
- **Prespermiová frakce:** Tato frakce je tvořena sekrety, které jsou produkovány prostatou, semennými váčky a Cowperovou (bulbouretrální) žlázou, ale neobsahuje spermie. Její objem je přibližně 10 - 15 ml a obvykle je průhledného vzhledu. Tato frakce slouží k vypláchnutí moči a bakterií z močovodu a proto velice zapáchá.
- **Spermiová frakce:** Jak z názvu vypovídá, tato frakce je bohatá na spermie. Může obsahovat až 80 – 90 % z celkového počtu spermií. Spermie jsou produkovány díky vysoké aktivitě varlat a jejich koncentrace se pohybuje okolo  $0,5 - 1 \cdot 10^9$  spermií/ml. Frakce obsahuje ale i sekrety produkované prostatou a semennými váčky. Objem frakce se pohybuje v rozmezí 70 – 100 ml a je mléčně bílé barvy. Tato frakce je využívána pro seminální dávky pro umělé oplodnění.
- **Postspermiová frakce:** Obsahuje nízkou hladinu spermií (méně než  $10^6$  spermií/ml), ale také se v ní nacházejí sekrety pocházející z prostaty a z Cowperovy žlázy. Objem této frakce je přibližně 150 – 200 ml a má světle bílé zbarvení. Tato frakce obsahuje velké množství semenné plazmy, která má funkci stimulace spermií, a proto se nevyužívá pro dávky určené pro umělou inseminaci (Knox, 2006; Oliveras, 2008).

Z toho je zřejmé, že sperma obsahuje buněčnou frakci (spermie) a nebuněčnou frakci (seminální plazmu):

### Spermie

Kančí spermie jsou samčí pohlavní buňky vznikající ve varlatech při procesu spermatogeneze. Velikost kančí spermie je 45  $\mu\text{m}$  a skládá se z hlavičky a bičíku (viz obr. 1).

Tyto dvě části jsou spojovány krčkem (tzv. spojovací část) přes centriolu. Krček se nachází ve spodní bázi hlavičky a má délku  $0,7\ \mu\text{m}$  a tloušťku  $0,5\ \mu\text{m}$  (Bonet a kol., 2012). Hlavička je plochá a oválná a její délka je  $7\ \mu\text{m}$ , šířka  $3,7\ \mu\text{m}$  a tloušťka  $0,4\ \mu\text{m}$ . Hlavička nemá totožné obě strany, ale jedna strana je plochá, zatímco druhá obsahuje apikální výběžek. Hlavička je tvořena jádrem obsahující vysoce kondenzovaný chromatin (Oliveras, 2008). Jádro je do jedné poloviny kryté akrozomem, který obsahuje enzymy nezbytné pro penetraci spermií do vajíčka (Rozeboom, 2000; Bonet a kol., 2012). Bičík se skládá ze tří segmentů: středové (spojovací), hlavní a terminální (koncové) části. Středová (spojovací) část bičíku je energetickým centrem spermie, protože je tvořena mitochondriální spirálou. Zbývající část bičíku je tvořena mikrotubulárními vlákny a umožňuje pohyb spermie. Struktura spermie odráží její základní funkci a to transport k vajíčku a jeho oplodnění (Bonet a kol., 2012).

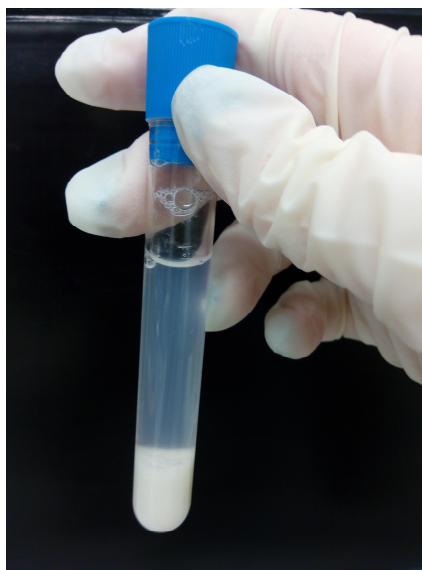


**Obrázek 1: Morfologie kančí spermie (Bonet a kol., 2012)**

Stejně jako jiné buňky i kančí spermie mají plazmatickou membránu sloužící k udržení buněčné integrity. Plazmatická membrána spermií, v porovnání s jinými buňkami, je vysoce heterogenní a obsahuje ostře definované membránové domény. Hlavně jsou organizované do lipidových domén, kterými se právě odlišují od somatických buněk a to membránovou fluiditou a lipidovým složením. Mimo to, většina proteinů plazmatické membrány spermií poukazuje na mozaicismus (liší se v distribuci intramembránových částic a v rozložení antigenů a náboje na membráně). Různé membránové domény se mohou vyznačovat různými funkcemi při procesu oplodnění. Tyto domény se mohou lišit ve vazebné afinitě k lektinům a to díky rozdílnému rozsahu a složení v jejich glykokalyxu (Bonet a kol., 2012).

## Seminální plazma

Seminální plazma je nebuněčná frakce ejakulátu a jedná se o komplexní směs sekretů varlat, nadvarlat a hlavně samčích vedlejších pohlavních žláz, mezi které patří semenné vajíčky, prostata a bulbouretrální žlázy (Bonet a kol., 2012; González-Cadavid a kol., 2014). Její pH je v rozmezí 7,3 – 7,9, protože obsahuje až 94 - 98 % vody (Bonet a kol., 2012). Je bohatá na organické a anorganické složky, ale také obsahuje širokou škálu biochemických složek, které se podílejí na procesu fertilizace (González-Cadavid a kol., 2014; Fraser a kol., 2016). Seminální plazma je důležitá pro pohyblivost spermií a má roli v ochraně buněčné membrány. Aktivita spermií je velice závislá na prostředí iontů. Jedním z nejdůležitějších iontů seminální plazmy je zinek, který ovlivňuje proces spermatogeneze, hraje hlavní roli v pohyblivosti spermií, stabilizuje buněčnou membránu spermií, působí ochranně a antioxidantně, zachovává schopnost jaderného chromatinu se dekonenzovat a reguluje funkci spermií (Lipenský, 2014). Seminální plazma (viz obr. 2) vzniká po centrifugaci kančího spermatu při 800 otáčkách po dobu 15 minut při 4 °C, kdy dojde k oddělení spermatických buněk (González-Cadavid a kol., 2014).



**Obrázek 2: Kančí sperma s oddělenou seminální plazmou od spermatických buněk**

Proteiny seminální plazmy jsou molekuly o vysoké molekulární hmotnosti a mají mnoho funkcí jako je vliv na vývoj spermií a jejich maturaci, vliv na transport a přežívání v samičím reprodukčním traktu, kapacitaci (proces kdy spermie maturuje a je připravena vniknout do vajíčka) a rozpoznávání vajíčka či k ochraně proti mikroorganismům nebo oxidačnímu stresu. Mezi nejhojnější proteiny seminální plazmy patří proteiny z rodiny spermadhesinů, což jsou glykoproteiny tvořené některými savčími druhy (býci, berani, kozy, králíci, prasata).

V kančí seminální plazmě může být obsah spermadhesinů až 75 – 90 % z celkového počtu proteinů. Mezi hlavní spermadhesiny kančí seminální plazmy patří: PSP-I a PSP-II (nejhojnější), AQN - 1, AQN-3 a AWN-1. Mezi další proteiny kančí seminální plazmy patří: albumin, imunoglobuliny, komplementový faktor H a laktadherin. Albumin je v kančí seminální plazmě přítomen jako řada isoform o vysoké molekulové hmotnosti (76 – 78 kDa). Jedná se o nejběžnější složku seminální plazmy, která hraje roli v ochraně spermií proti oxidačnímu stresu vzniklého peroxidací lipidů (González-Cadavid a kol., 2014).

### **1.1.2 Hodnocení kvality kančího spermatu**

Kvalita kančího spermatu může být posuzována dle buněčných a biochemických parametrů. Mezi buněčné parametry patří viabilita, motilita, koncentrace, morfologie a aglutinace spermií, ale také celistvost akrozomu a mitochondriálního pouzdra a osmotická rezistence (Oliveras, 2008). Dále lze kvalitu spermatu hodnotit dle fyzikálních (objem, barva, zápach, pH, koncentrace a mobilita) či chemických vlastností (Frunzä a kol., 2008). Bylo zjištěno, že nejkvalitnější kančí sperma je takové, které je získáváno od kanců ve věku 24 – 29 měsíců, žijících v mírném pásu. Bylo dokázáno, že na kvalitu kančího spermatu mají také vliv věkové a sezónní změny v hladinách hormonů (Fraser a kol., 2016).

Stanovení počáteční kvality je prvním krokem po odebrání spermatu. Cílem je vybrat jen ty vzorky spermatu, které jsou vhodné pro umělé oplodnění s nejvyšší kvalitou. Ejakuláty jsou podrobovány screeningovým metodám před a během jeho zpracování. Obecně se u spermatu hodnotí čtyři základní parametry: koncentrace, pohyblivost a morfologie spermií a neporušenost akrozomu. Pro výběr vhodných vzorků se nejčastěji využívá hodnocení koncentrace a motility spermií, protože se jedná o metody nejméně časově náročné a mimo to jsou získané výsledky zapotřebí pro výpočet velikosti semenné dávky pro umělou inseminaci (Rozeboom, 2000). Pro výběr vhodných dávek kančího spermatu pro inseminaci postačuje hodnotit dle dvou kritérií a to pohyblivost spermií a procentuální obsah morfologických abnormalit spermií a to zvláště u spermatu uchovávaného delší dobu (3 – 5 dní) než je využito pro inseminaci (Čeřovský a kol., 2005).

#### **Koncentrace spermatu**

Průměrná koncentrace kančího spermatu je 100 – 300 milionů spermií/ml (Frunzä a kol., 2008). Hodnocení koncentrace spermatu a celkového počtu spermií je spíše nástrojem sledování zdravotního stavu a produktivity kanců (Rozeboom, 2000).

### **pH spermatu**

Čerstvě ejakulované sperma má hodnoty pH v rozmezí 7,2 až 7,5 (Johnson a kol., 2000). Změny pH negativně ovlivňují životaschopnost a motilitu spermií. pH vyšší jak 8 naznačuje nízkou kvalitu spermií nebo přítomnost infekce v genitálním traktu či ve vedlejších pohlavních žlázách (Frunzã a kol., 2008). Při pH pod 7,2 se postupně snižuje motilita a metabolismus spermií (Johnson a kol., 2000).

### **Osmotický tlak spermií**

Kančí spermie mají osmotický tlak přibližně 290 – 300 mOsm a mohou tolerovat poměrně široké rozmezí osmotického tlaku od 240 do 380 mOsm (Gadea, 2003).

### **Motilita (pohyblivost) spermií**

Schopnost pohybovat se mají zralé spermie díky bičíku. Posouzení motility se obvykle skládá ze stanovení procentuálního zastoupení pohyblivých a nepohyblivých spermií (Oliveras, 2008). Motilita spermií je důležitým parametrem v hodnocení kvality spermatu a jedním z nejčastěji analyzovaných parametrů. Pohyblivost spermií (v procentech) se hodnotí vizuálně pomocí světelného mikroskopu. Pohyblivost spermií se snižuje s dobou skladování vzorku, a proto by mělo být na počátku hodnocení minimálně 60 % (někdy je uváděno 70 – 80 %) spermií pohyblivých (Rozeboom, 2000).

### **Viabilita (životaschopnost) spermií**

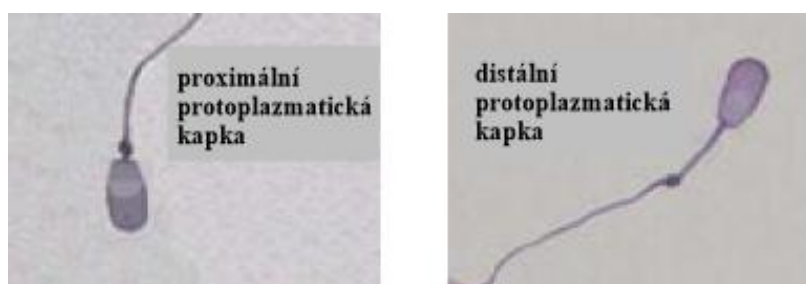
Viabilita spermií je velice důležitým parametrem v testování kvality ejakulátu. Popisuje procentuální zastoupení životaschopných a neživotaschopných spermií. Za standardních podmínek by prasečí ejakulát měl obsahovat 65 - 85 % životaschopných spermií. Pokud je obsah životaschopných spermií nižší než 65 %, označuje se tento jev jako nekrospermie nebo nekrozospermie (Oliveras, 2008).

### **Morfologie spermií**

Morfologie spermií a neporušenost akrozomů jsou parametry důležité pro odhad životaschopnosti spermií a mohou více prozradit o kvalitě spermatu. Morfologické poškození či špatná pohyblivost spermií ale neznamená vždy neschopnost oplodnění vajíčka. K hodnocení morfologie spermií se využívá fázového kontrastního mikroskopu. Hodnotí se morfologické odchylky, jako jsou deformace tvaru hlavičky, deformace bičíku



a cytoplazmatické kapky (proximální kapky blíže u hlavičky nebo distální kapky ve střední části bičíku, viz obr. 3). Je doporučována mezní hodnota normálních spermií minimálně 70 % (Rozeboom, 2000). Přesto že je výskyt proximálních kapek ve spermatu méně častý (vyskytují se při zvýšené teplotě ve varlatech), tak právě jejich výskyt může mít negativní vliv na plodnost, porodní váhu či velikost vrhu (Rozeboom, 2000; Čeřovský a kol., 2005). Je stanoveno, že výskyt cytoplazmatických kapek by neměl překročit 15 %. Hodnocení akrozomu je časově náročné a vyžaduje použití mikroskopu s fázovým kontrastem. Vzorky spermatu by měli obsahovat více než 51 % neporušených akrozomů (Rozeboom, 2000).



**Obrázek 3: Cytoplazmatické kapky kančích spermií (Čeřovský a kol., 2005)**

Některé morfologické abnormality spermií mohou být způsobeny patologickými procesy postihujícími varlata a nadvarlata či může mít vliv genetika (15 – 20 %) nebo zřídka i nevhodné podmínky chovu. Výskyt morfologických abnormalit má významný negativní vliv na míru březosti prasnic po inseminaci. V České republice je použitelnost ejakulátu pro inseminaci limitována výskytem morfologických abnormalit spermií do 25 % (Čeřovský a kol., 2005).

Je důležité vzít v potaz vliv kolísání teploty při přepravě spermatu do laboratoře, které by mohlo mít vliv na buňky spermií. Rychlý pokles teploty by mohl způsobit zvlnění bičíků okolo hlavičky, či může být bičík stočen těsně pod hlavičkou. Malé množství takto vypadajících spermií může být ve spermatu přítomno normálně, ale pokud je přítomno více jak 10 % takových buněk je to ukazatelem pro teplotu nižší než 32 °C a jedná se o nevhodný vzorek (Rozeboom, 2000). Při porovnání spermií domácích zvířat jsou kančí spermie nejvíce citlivé na nízkou teplotu, což je pravděpodobně způsobeno charakteristickým složením plazmatické membrány spermií obsahující fosfolipidy a cholesterol (Chutia a kol., 2014).

Proto, aby spermie získali schopnost vázat se a penetrovat do vajíčka, musí podstoupit proces kapacitace, při kterém dochází k biochemickým a fyziologickým změnám. Kapacitace probíhá uvnitř samičího genitálního traktu. Kapacitace zahrnuje procesy jako změny

fosfolipidů a cholesterolu v plazmatické membráně, aktivaci iontových kanálů, zvýšení hladin intracelulárního vápníku a cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), změny v aktivitě bičíku a fosforylaci proteinů (Sepúlveda a kol., 2016).

### **Objem ejakulátu**

Jedná se o fyzikální parametr, který se vyhodnocuje ihned po odběru ejakulátu. U kanců se objem liší v závislosti na věku, frekvenci ejakulací, stravě, zdravotním stavu a způsobu a času odběru. Maximální objem spermatu je v období pohlavní zralosti, tedy ve věku 5 – 8 měsíců a hladina zůstává takto až do období andropauzy, tj. 7 – 8 let (Frunzä a kol., 2008). Objem ejakulátu kance se pohybuje v rozmezí 150 - 300 ml. U zdravého kance by měl být objem ejakulátu větší než 150 ml (Rozeboom, 2000). Obecně u mladších kanců je objem spermatu nižší. Snížený objem nemusí hned znamenat patologie, ale je doprovázen nízkou koncentrací spermií. Průměrný objem spermatu jednoho ejakulátu je 250 ml, což je způsobeno hojným vylučováním vedlejších pohlavních žláz, hlavně semennými váčky. Želatinovou část spermatu vytváří bulbouretrální žláza (Frunzä a kol., 2008).

### **Vzhled a zápach spermatu**

Přesto že je mikroskopické hodnocení spermatu standardem pro výběr vhodných ejakulátů pro umělou inseminaci, tak je důležité zhodnotit i zřetelné vizuální či čichové vlastnosti spermatu. V závislosti na koncentraci ejakulátu by měl být mléčně bílé barvy. Koncentrace spermií ve spermatu má vliv na míru zakalení. Vzorek bohatý na spermie je krémovitého vzhledu, oproti vzorkům chudým na spermie, které jsou průhledné. Zbarvení může být trochu nažloutlé vlivem obsahu karotenů v krmivu, hnisavými procesy genitálního traktu nebo přítomností moči, ale normální vzhled připomíná odstředěné mléko. Následkem krvácení v močové trubici, penisu, předkožky nebo prostaty může být ve spermatu přítomno malé množství krve, které dává ejakulátu narůžovělé zbarvení. To nemá většinou vliv na životaschopnost spermií či plodnost, ale tmavší červené zbarvení ejakulátu je velice často spojeno s ostrým zápachem, což už je důvod pro vyřazení vzorku. Hnědé zbarvení spermatu označuje přítomnost poškozených erytrocytů, infekci prostaty nebo dlouhodobou léčbu fenotiazinem či prontosilem. Zeleno modré zbarvení je pozorováno u oligospermie či u léčby methylenovou modří. Neprůhlednost spermatu je pozorována při onemocnění varlat nebo u chorob vedlejších pohlavních žláz. Kančí sperma má charakteristickou vůni připomínající vůni vařených kostí nebo páchnoucího mléka. Znatelný zápach může být způsoben špatnými

hygienickými postupy během odběru, ale většinou je způsoben močí zachycenou na předkožce, která je obecně bohatá na bakteriální či jinou kontaminaci (Rozeboom, 2000; Frunzã, 2008)

### **Shlukování (aglutinace) spermií**

K aglutinaci spermií (viz obr. 4) dochází pokud se spermie váže na spermii další a to buď svými hlavičkami nebo bičíky. Za normálních podmínek by k aglutinaci spermií nemělo docházet (Oliveras, 2008). Ke shlukování spermií může dojít mezi nepohyblivými spermii, které byly poškozeny při průchodu varlaty nebo během ejakulace (Rozeboom, 2000). Jinou příčinou shlukování spermií může být velké teplotní kolísání během transportu ( $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), bakteriální kontaminace, dlouhá doba skladování či obsah bivalentních a trivalentních kationů v semenné plazmě (Rozeboom, 2000; Oliveras, 2008). O tom že by mělo shlukování vliv na plodnost je známo pouze málo. Shlukování spermií je důležité vzít v potaz při hodnocení koncentrace spermatu (Rozeboom, 2000).



**Obrázek 4: Aglutinace kančích spermií (Rozeboom, 2000)**

Celkové shrnutí normálních a mezních hodnot vlastností používaných při hodnocení kvality kančího spermatu je uvedeno v Tabulce 1:

**Tabulka 1: Normální a mezní hodnoty kvality spermií (Rozeboom, 2000)**

<b>Vlastnosti ejakulátu</b>	<b>Normální hodnoty</b>	<b>Mezní hodnoty</b>
Objem	100 – 500 ml	50 ml
Celkový počet spermií	$10 - 100 \cdot 10^9$	$10 \cdot 10^9$
Motilita	70 – 95 %	62 %
Shlukování	0 – 10 %	25 %
Zvlněné bičíky	1 – 2 %	10 %
Morfologické abnormality	5 – 10 %	30 %
Akrozomální abnormality	5 – 10 %	49 %
Cytoplazmatické kapky	< 5 %	15 %

## **Chemické parametry kančího spermatu**

Znalost chemického složení semenné plazmy je důležité pro tvorbu ředidel kančího spermatu. Kančí sperma obsahuje 8 % organických látek a 2 % minerálních látek. Celkem obsahuje 90 % vody a 10 % sušiny.

Spermie a semenná plazma obsahují sacharidy, které hrají důležitou roli v energetickém metabolismu. Koncentrace sacharidů závisí na hladině testosteronu a na ročním období. Kančí sperma obsahuje 77 mg sacharidů ve 100 ml.

Kančí sperma je bohaté na inositol (průměrně 600 až 725 mg/100 ml), který zajišťuje osmotický tlak kančí semenné plazmy. Obsahuje velmi vysoké množství kyseliny sialové a také kyselinu citronovou (průměrně 130 mg/100 ml) pocházející ze semenných váčků. Obsah lipoproteinů v kančím spermatu je průměrně  $404,02 \pm 27,82$  mg/100 ml a obsah glycerolfosforylcholinu je v rozmezí 110 až 240 mg/100 ml.

Z fosfolipidů kančí sperma obsahuje 37,4 % fosfatidylcholinu, 13,8 % fosfatidylethanolaminu (cefalinu), 12,6 % sfingomyelinů, 10,8 % plasmalogenu odvozeného od ethanolaminu, 10,5 % ostatních lipidů, 9,8 % plasmalogenu odvozeného od cholinu, 3 % kardiolipinů a 2,4 % fosfatidylserinů.

Kančí sperma průměrně obsahuje  $1,84 \pm 0,074$  g proteinů ve 100 ml. Z aminokyselin obsahuje nejvíce kyselinu glutamovou ( $64,96 \pm 2,73$  mg/100 ml), dále pak methionin (11,9 mg/100 ml), glycin ( $4,71 \pm 0,7$  mg/100 ml) a kyselinu asparagovou ( $2,91 \pm 0,46$  mg/100 ml). Celkový dusík je průměrně obsažen v množství 615 mg/100 ml a velká část dusíku je proteinové povahy. Dusík je třetí nejhojnější organickou složkou kančího spermatu po proteinech a inositolu. Množství proteinů spermatu je nižší než proteinů krevních. U kanců se obsah bílkovin ve spermatu pohybuje v rozmezí 3,26 až 4 g/100 ml.

Kančí sperma je bohaté na androgenní a estrogenní hormony a dále obsahuje také řadu enzymů, jako např. katalázu, fosfatázu, mucinázu, hyaluronidázu, trypsin, amylázu, lipázu a cholinesterázu. Z vitaminů obsahuje vitaminy A, B, C, D a další. Vitamin C je například důležitý pro životaschopnost spermií a jeho nízká koncentrace zhoršuje plodnost.

Sperma kanců je bohaté na anorganické látky. Minerální soli zajišťují potřebný osmotický tlak udržující integritu membrán spermií. Působení iontů přispívá k aktivaci enzymů. 100 ml kančího spermatu průměrně obsahuje 660 mg sodíku, 330 mg chloru, 260 mg draslíku, 11 mg hořčíku, 2 až 6 mg vápníku a 2 mg anorganického fosforu (Frunzä a kol., 2008)

## 1.2 Mikroorganismy ve spermatu chovných kanců

Obecně sperma zdravého kance neobsahuje bakterie (Kuster a kol., 2016). Ale protože proces odběru spermatu není prováděn za sterilních podmínek, tak významným kontaminantem čerstvě odebraného kančího ejakulátu jsou mikroorganismy (Úbeda a kol., 2013). Mikroorganismy jsou důležitými kontaminanty mnoha tělních tekutin včetně spermatu lidí i zvířat. Sperma je ideálním prostředím pro vznik a růst mnoha mikroorganismů jako jsou bakterie a plísňe (Martín a kol., 2010).

### 1.2.1 Zdroje mikroorganismů v kančím spermatu

Bakteriální kontaminace spermatu může vznikat buď jako následek infekce samčího reprodukčního traktu nebo může vzniknout při odběru spermatu či při jeho zpracování (Pinart a kol., 2017). Mikrobiální kontaminace je velmi často původem z močového či genitálního ústrojí kance, protože uretra je součástí obou těchto systémů (Martín a kol., 2010). Zdroje kontaminace spermatu během jeho odběru či při jeho následném zpracování mohou být buď savčího (včetně člověka) nebo neživočišného původu. Mezi zdroje kontaminace savčího původu patří výkaly, tekutina z dutiny předkožky, pokožka/srst, sekrety dýchacích cest a kontaminace způsobená personálem. Mezi zdroje kontaminace neživočišného původu patří voda, krmivo, podestýlka, kanalizace, systémy ventilace, pomůcky a vybavení a špatné hygienické prostředí. Tato bakteriální kontaminace semenné dávky určené pro umělou inseminaci není považována za primárně patogenní u prasat, ale může vést ke zhoršování některých charakteristik. Může zhoršovat životaschopnost a pohyblivost spermií či snižovat míru početí, dále pak může vést k úmrtí embrya nebo plodu, anebo může způsobovat kontaminaci samičího rozmnožovacího systému (Pinart a kol., 2017).

### 1.2.2 Nejběžnější mikroorganismy kančího spermatu

Bakteriální kontaminace v čerstvém spermatu se obvykle pohybuje v rozmezích  $10^3 - 10^5$  kolonie tvořící jednotky (CFU)/ml, ale bakteriální zátěž může samozřejmě i různě kolísat a dosahovat koncentrací až  $10^9$  CFU/ml (Sepúlveda a kol., 2016). Nejčastěji je bakteriální kontaminace spermatu způsobena gramnegativními bakteriemi patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, ale v některých případech byla zjištěna i přítomnost anaerobních bakterií např. *Clostridium perfringens* (Pinart a kol., 2017). Mezi nejčastější rody bakterií nalézané v kančím spermatu patří: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Actinomyces*, *Serratia*, *Enterobacter* a *Streptococcus* (Rozeboom, 2000).

V roce 2005 Althouse a kol. porovnali různé studie zabývající se běžnou bakteriální flórou kančího spermatu. Všechny studie se shodly, že k nejběžnějším bakteriím kančího spermatu patří: *Escherichia (E.) coli*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Bacillus spp.* a *Klebsiella spp.* Dále jsou zmiňované bakterie jako je *Enterobacter spp.*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Acinetobacter spp.* a další. Většina těchto bakteriálních rodů se nepovažuje za primární patogeny kanců (Althouse a kol., 2005).

### 1.2.3 Vliv mikroorganismů na kvalitu kančího spermatu

Rozsah mikrobiální kontaminace hraje roli v kvalitě spermatu. Mikroorganismy mají negativní vliv na funkci spermií a to buď přímý, nebo nepřímý. Přímý vliv mikroorganismů působí změnu struktury buněčné membrány spermií, čímž ovlivní jejich pohyblivost nebo vyvolají předčasnou exocytózu akrozomu. Nepřímý vliv mikroorganismů znamená, že stimulují produkci protilátek mířených na glykokalyx spermií (Martín a kol., 2010).

Hlavní spermatotoxické účinky bakterií na spermie primárně souvisí s přímým narušením buněk spermií. Bakterie mohou poškozovat spermie i jinými mechanismy jako např. působením lipopolysacharidů. Vliv bakterií na spermie závisí na koncentraci bakterií a má negativní vliv na kvalitu spermatu. Mimo koncentrace bakterií jsou kritickými body i čas a prostředí interakce bakterií se spermii. Pokud dojde k nekontrolovatelné aglutinaci spermií způsobené bakteriemi, dochází ke snížení reprodukčního výkonu kance (Althouse a kol., 2005).

Stupeň změn parametrů spermií závisí na druhu bakterie způsobující kontaminaci a na době skladování spermatu (Pinart a kol., 2017). Vysoká bakteriální kontaminace spermatu je spojena s častým výskytem aglutinace spermií a poškozením akrozomů či se špatnou motilitou spermií (Goldberg a kol., 2013). Škodlivé účinky mikroorganismů na spermie jsou zprostředkovány hlavně prostřednictvím produktů metabolismu bakterií, jejich exotoxiny a endotoxiny nebo bakterie způsobí destrukci energetických zdrojů obsažených v seminální plazmě, což negativně působí na viabilitu a fertilitu spermií (Mazurová a kol., 2015).

Rutinně se kančí sperma podrobuje kultivačnímu vyšetření pro monitorování hygienických postupů při jeho zpracování. Mikrobiologická kultivace je poměrně levná a velice dostupná metoda. Bakteriologická kontaminace kančího spermatu je téměř nevyhnutelná a může mít vliv na krátkou životnost spermií při skladování, shlukováním spermií či přetrvávající infekce dělohy samic po inseminaci, ale pravděpodobně neovlivňuje plodnost kance. Z těchto důvodů

je důležité kančí sperma testovat na bakteriální kontaminaci a určit co je jejím zdrojem pro zajištění případných opatření k jejímu zamezení (Rozeboom, 2000). Je tedy důležité identifikovat hlavně ty bakteriální druhy, které jsou přítomné v kančím spermatu ve vyšších koncentracích a představují tak hlavní riziko v reprodukci prasat. Znalost účinků bakterií na kvalitu kančích spermií je tedy užitečným nástrojem k vyloučení kontaminovaných semenných dávek pro umělou inseminaci, které by mohly způsobit ekonomické i zdravotní problémy (Sepúlveda a kol., 2014).

Nepříznivý vliv enterobakterií na buňky kančích spermií by neměl být podceňován. Dřívější studie popsali častý výskyt různých druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* v prostatické a seminální frakci kančího spermatu (Úbeda a kol., 2013). Většina mikroorganismů, které se vyskytují v nativním spermatu, patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Hlavně se jedná o rody *Escherichia*, *Enterobacter* a *Proteus*. Kromě toho lze nalézt ale i enterokoky, stafylokoky a *Pseudomonas aeruginosa*. Většina z těchto bakterií jsou ale pouze metabolicky aktivní oportunní patogeny, které jsou schopny snižovat biologickou kvalitu kančího spermatu. Také se mohou podílet na vyvolání zánětlivých procesů v děložní sliznici inseminovaných prasníc (Mazurová a kol., 2015).

*E. coli* je pravděpodobně nejčastěji izolovaným druhem z urogenitálního traktu lidí, psů a prasat. *E. coli* vyvolává aglutinaci spermií a zhoršuje jejich pohyblivost a to v poměru spermie:bakterie 1:1 (prahová úroveň) nebo vyšším. Mimo to má spermicidní účinky, které jsou ale závislé na koncentraci *E. coli*. (Althouse a kol., 2005; Bassaleu a kol., 2012). *E. coli* zhoršuje vlastnosti spermií mechanismem adheze na membránu buněk spermií pomocí míst vázající manózu a vyvolává tak ultrastrukturální změny na úrovni středové části spermie, plazmatické membrány nebo akrozomu, čímž negativně působí na funkce spermií (Bussalleu a kol., 2011).

Prieto-Martínez a kol. (2014) prokázali negativní vliv *Enterobacter cloacae* na kvalitu kančích spermií. Přítomnost *Enterobacter cloacae* závažně ovlivňuje motilitu spermií a poškozuje celistvost akrozomu. Jsou potvrzeny spermatotoxické účinky této bakterie zkracující životaschopnost spermií. *Enterobacter cloacae* snižuje osmotickou rezistenci spermií a zvyšuje tak citlivost spermií na změny životního prostředí. Nebyl zjištěn vliv *Enterobacter cloacae* na morfologii spermií, ale nelze tento vliv zcela vyloučit.

V kančím spermatu jsou často prokazovány bakterie z čeledi *Pseudomonadaceae* (Schulze a kol., 2016). *Pseudomonas aeruginosa* se v kančím spermatu může nacházet v koncentracích

$10^4 - 10^8$  CFU/ml (Sepúlveda a kol., 2016). Přítomnost vysokých koncentrací *Pseudomonas aeruginosa* v kančím spermatu uchovávaném při 15 – 17 °C snižuje kvalitu spermií. *Pseudomonas aeruginosa* ovlivňuje motilitu kančích spermií, stejně jako jiné bakterie např. *E. coli* a *Enterobacter cloacae*. Je možné, že *Pseudomonas aeruginosa* má vliv na životaschopnost a integritu akrozomů kančích spermií (Sepúlveda a kol., 2014).

Rody jako *Alcaligenes*, *Actinomyces*, *Streptococcus* a *Staphylococcus* nemají negativní vliv na přežívání spermií při dlouhodobém skladování ani při jejich vysokých hladinách ve spermatu ( $10^{10} - 10^{12}$  CFU/ml), jejich přítomnost způsobuje mírné snížení pH (6,3 – 6,5). Byla provedena řada kontrolních studií *in vitro*, kdy bylo prokázáno škodlivé trvalé poškození motility a životaschopnosti spermií vlivem bakteriální kontaminace způsobené druhy *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kuster a kol. (2016) uvádí, že bakteriální kontaminace nemá takový vliv na změnu morfologie, ale spíše na integritu akrosomu, aglutinaci spermií, osmotickou rezistenci či pH (Kuster a kol., 2016).

Ačkoliv je pozornost bakteriální kontaminace kančího spermatu většinou zaměřena na gramnegativní bakterie, tak i některé grampozitivní koky jako je *Enterococcus faecalis* mají schopnost produkovat cytolyzin, který má negativní vliv na spermie (Kuster a kol., 2016).

### 1.3 Umělá inseminace

Dnes je umělá inseminace jednou z nejpoužívanějších technologií asistované reprodukce u prasat (Althouse a kol., 2011). V západní Evropě je více než 90 % prasnic oplodňováno umělou inseminací (Maes a kol., 2011). Umělá inseminace (oplodnění) v prasečím průmyslu našla významné místo, protože poskytuje genetické zlepšení plodnosti prasat a tím přispívá ke zvýšení produkce vepřového masa (González-Cadavid a kol., 2014; Karunakaran a kol., 2016). Při porovnání umělé inseminace s přirozeným pářením je umělá inseminace užitečným nástrojem pro vnesení genů do stád prasnic s minimálním rizikem onemocnění (Maes a kol., 2011). Pro umělou inseminaci je velmi důležitá nejvyšší kvalita inseminační dávky (Lipenský a kol., 2013).

Výhodami umělé inseminace je rychlé rozmnožování prasat, zesílení genetické hodnoty, ekonomické úspory a kontrola onemocnění. Ironické je, že většinu těchto výhod lze současně považovat i za nevýhody, protože umělou inseminací se mohou přenášet a zesilovat genetické vady či šířit infekční onemocnění.



Vzhledem k tomu, že umělou inseminací může dojít k přenosu choroby do stáda, tak mikrobiologická kontrola inseminačních dávek nesmí být podceňována. Infekční bakterie mohou skrze umělou inseminaci způsobit brucelózu, chlamydoofilózu a leptospirózu. Na plodnost kance mají negativní vliv i patogenní viry jako např. prasečí circovirus typu 2 (PCV2), prasečí parvovirus (PPV) a virus způsobující reprodukční a respirační syndrom prasat (PRRS). Dále mohou působit i viry způsobující Aujeszkyho chorobu, mor prasat, cholera prasat, japonskou encefalitidu, kulhavku, slintavku atd. (Althouse a kol., 2011).

Většina umělých oplodnění prasat (intracervikální inseminace) je prováděna za použití kančího spermatu uchovávaného v kapalném stavu při 16 – 18 °C (Maes a kol., 2011; Karunakaran a kol., 2016). Kančí sperma je vysoce citlivé na nízkou teplotu, a proto je obvykle přechováváno v kapalném stavu (Karunakaran a kol., 2016). Při kryokonzervaci kančího spermatu totiž dochází k poškození membrány a organel spermií, což vede k nízké míře oplodnění (González-Cadavid a kol., 2014). Chlazení a rozmrazování spermatu může způsobovat těžké poškození až smrt určitého procenta spermií. Ta je způsobena tvorbou nadměrného množství reaktivních forem kyslíku při reakcích katalyzovaných aromatickými aminokyselinami, což vede k narušení buněčné funkce a smrti spermií. S prodlužující dobou skladování spermatu se zhoršuje jeho kvalita a snižuje se rychlost oplodnění (Karunakaran a kol., 2016). Kvůli nízké ceně a frekvenci odběru spermatu je široce využíváno krátkodobé ředění kančího spermatu (Lipenský a kol., 2013). Většina inseminací se provádí se spermatem uchovávaným po dobu 2 dnů, někdy z ekonomického hlediska až 4 - 5 dnů. Během skladování spermatu při 18 °C jsou spermie stále metabolicky aktivní, čímž dojde k vyčerpání dostupných živin a naopak ke hromadění metabolických produktů jako jsou reaktivní formy kyslíku. V případě zvýšených hladin reaktivních forem kyslíku dochází u spermií k oxidačnímu stresu. Zralé spermie mají ale pouze malou schopnost opravovat poškození vzniklá oxidačním stresem, protože cytoplazma spermií obsahuje pouze malou koncentraci enzymů, které by tyto reaktivní formy kyslíku vylučovaly. Seminální plazma má antioxidační vlastnosti a má tedy schopnost vylučovat reaktivní formy kyslíku a ochraňovat tak spermie proti oxidačnímu stresu. Proto je nutné dát si pozor na různá ředění spermatu, protože ředidla snižují ochranou schopnost seminální plazmy (Karunakaran a kol., 2016).

## 1.4 Ředění a konzervace kančího spermatu

Kančí sperma se ředí z důvodu zisku většího objemu a tím většího počtu inseminačních dávek (Smítal, 2001). Normální ejakulát obvykle obsahuje dostatek spermií pro inseminaci 15 až 25 prasnic. (Maes a kol., 2011). Ředění kančího spermatu se provádí také z důvodu obsahu živin a ochranných látek důležitých pro spermie (Smítal, 2001).

K ředění kančího spermatu lze použít tři typy ředidel:

- **Extendory** – ředidla pouze zvětšující objem spermatu
- **Protektory** – ředidla poskytující živiny spermiím, pro uchovávání 1 – 3 dny i déle
- **Implementory** – protektory obsahující navíc látky působící na pohlavní orgány prasnic (Smítal, 2001)

Dále rozlišujeme ředidla, dle toho, jak dlouho lze uchovat tekuté kančí sperma bez vlivu na plodnost:

- **Ředidla pro krátkodobé uchovávání** - zaručují kvalitu spermatu pouze pár dní (méně než 3 dny)
- **Ředidla pro dlouhodobé uchovávání** - jsou schopny udržet biologické hodnoty spermií až na dobu jednoho týdne i déle (Smítal, 2001; Ibănescu a kol., 2015). Liší se od krátkodobých ředidel hlavně obsahem komplexních pufovacích systémů (HEPES, Tris) a přítomností bovinního sérového albuminu BSA (Maes a kol., 2011).

Principem konzervace kančího spermatu je uvedení spermií do stavu tzv. anabiózy, při které je zastaven pohyb spermií a je velice omezen jejich metabolismus. Během konzervace nesmí dojít k poškození povrchových membrán spermií, čímž by byla poškozena schopnost spermií oplodnit vajíčko. Při krátkodobé konzervaci se anabiózy docílí snížením teploty prostředí okolí na 16 °C, kdy i důležitou roli hraje složení ředidla. Krátkodobé uchovávání spermatu je stále nejrozšířenější. Dlouhodobá konzervace spočívá na principu zmrazování spermatu v zahuštěné formě (kryokonzervace). Inseminace zmrazeným kančím spermatem není tak rozšířená v praxi, protože je to metoda nákladná a náročná na čas a vybavení. Většinou je pro inseminaci využíváno čerstvé tekuté sperma (Smítal, 2001).

Funkcí ředidla je zajištění stability buněčné membrány při chladných teplotách, zajištění zdroje energie pro metabolismus spermií a zajištění vhodného pH a iontů pro membránovou a buněčnou rovnováhu (Knox, 2006). Ředidla jsou média velmi bohatá na živiny (Úbeda a kol., 2013). Živiny obsažené v ředidlech jsou nezbytné pro udržení správné funkce spermií

a přežití *in vitro*, ale také jsou ideálním prostředím pro růst bakterií (Bussalleu a kol., 2011). Ředěné kančí sperma je v podstatě buněčné kultivační médium ideální pro růst bakteriální kontaminace (Kuster a kol., 2016). Čerstvé sperma je ředěno s cílem prodloužit životnost spermií a zvýšit počet dávek na více než 50 z ejakulátu u kanců s dobrou genetickou výbavou. Vysoká kvalita ředidel kančího spermatu je zásadní pro úspěšnou umělou inseminaci. Protože se zvyšují požadavky na kvalitu spermatu a současně se snaží snížit počet spermií obsažených v dávkách určených pro umělou inseminaci, tak dochází k vyšší zranitelnosti spermií. Zranitelnost spermií je způsobená vysokým ředěním a teplotním a časovým režimem nutným pro automatizovaný ředící a plnicí proces. Proto je cílem minimalizovat vliv ředění, tak aby nezpůsobovalo ztrátu motility a membránové integrity spermií a změny v organizaci lipidů a proteinů na povrchu spermií, které by vedly k destabilizaci buněčné membrány. Zpracování spermatu v centrech pro umělou inseminaci tedy hledá kompromis mezi jemným ošetřením spermií, minimálními hygienickými riziky a účinností pro získání semenné dávky (Schulze a kol., 2017).

Vždy byl doporučován postup ředění takový, že bylo příslušné ředidlo přidáváno v malém množství k ejakulátu za mírného promíchávání a ne v opačném pořadí. Předpokládalo se, že přidávání ředidel do spermatu způsobuje méně změn u spermií a je tedy méně škodlivé v porovnání s postupem, kdy se přidává sperma k ředidlu. V centrech umělé inseminace se k čerstvému spermatu (200 – 500 ml) přidává velké množství ředidla (1000 – 7000 ml na jeden ejakulát), což způsobuje pění a tím také riziko že pěna přijde do kontaktu s plnicí tryskou. Tvorba pěny je velice častá u ředidel obsahující BSA, ale vyskytuje se i u jiných ředidel a je třeba se jí vyhnout. Z praktického a hygienického hlediska se tedy přidání ředidla do spermatu považovalo za nevýhodné. Nejnovější studie Schulze a kol. (2017) nevidí výhodu v tomto standardním ředícím postupu. Tato studie prokázala, že přidávání spermatu do ředidla nijak neovlivňuje kvalitu kančích spermií (Schulze a kol., 2017).

Zda může být kančí sperma ředěno, se vyhodnocuje dle následujících kritérií - objem, vzhled (průhlednost, zakalení) a barva. Míra ředění je u zdravých kanců (koncentrace spermií 20 – 60 miliard) většinou od 1:4 do 1:10 (Knox, 2006).

Uchovávání kančího spermatu je odlišné v porovnání s jinými domácími zvířaty, hlavně kvůli vysoké citlivosti kančích spermií na chlazení, mrazení a rozmrazování. Většina ředěných semenných dávek je použita pro umělé oplodnění ještě v den jeho odběru, ale některé jsou využity až třeba 3 - 5 dní po odběru. Doba skladování ředěného spermatu má vliv na míru porodnosti a velikost vrhu, kdy dlouhé skladování spermatu tyto vlastnosti zhoršuje.

To je způsobeno stárnutím spermií během skladování způsobující strukturní a funkční změny, kterému se nedá zabránit. Ředění kančího spermatu pravděpodobně redukuje proteiny, přirozené antioxidanty a další složky seminální plazmy, které jsou nutné pro normální funkci a membránovou integritu spermií (Boe-Hansen a kol., 2005).

U 90 % chovů prasat v Evropě, USA a Kanadě je pro umělou inseminaci používáno ředěné sperma. Z tohoto důvodu a vzhledem k poškození kančích spermií bakteriální kontaminací jsou kladeny vysoké nároky na hygienickou kontrolu během odběru, zpracování a skladování kančího spermatu určeného pro umělou inseminaci (Prieto-Martínez a kol., 2014).

### 1.4.1 Složení ředidel kančího spermatu

Proto, aby ředidla správně fungovala, musí mít přesné složení. Za účelem udržení metabolické a výživné funkce je přidávána glukóza. Ochrannou funkci proti tepelnému šoku zajišťuje BSA. Za účelem udržení pH je přidáván bikarbonát, Tris nebo HEPES. NaCl a KCl jsou přidávány pro kontrolu osmotického tlaku. Ředidla mohou obsahovat i antibiotika pro inhibici mikroorganismů (Gadea, 2003).

Glukóza v ředidlech kančího spermatu udržuje osmolalitu. Kančí spermie tolerují poměrně široký rozsah osmolarity (240 až 380 mOsm), ale izotonická nebo mírně hypotonická ředidla zachovávají lepší schopnost oplodnění než ředidla hypertonická. Vysoký obsah glukózy ve většině ředidel kančího spermatu způsobuje značné snížení intracelulárního pH pod 6 (intracelulární acidóza), což umožňuje spermiím přežít skladování několik dní (Johnson a kol., 2000). Glukóza je také považována za zdroj energie. Tu spermie potřebují hlavně pro buněčný metabolismus a pohyb. Kromě glukózy lze využít i fruktózu, galaktózu či ribózu (Gadea, 2003).

Jako pufr se pro ředidla kančího spermatu používají hlavně hydrogenuhličitan sodný, citrát sodný či chlorid draselný (Johnson a kol., 2000). Hodnota pH ředidel kančího spermatu se pohybuje v rozmezí 6,8 – 7,2 (Althouse a kol., 2005).

Pro regulaci osmotického tlaku jsou přidávány do ředidel soli anorganických iontů, jako je chlorid sodný nebo draselný (Gadea, 2003).

Kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA) se využívá v ředidlech jako chelatační činidlo, které zachycuje ionty bivalentních kovů (hlavně  $\text{Ca}^{2+}$ ) a omezuje jejich prostup přes plazmatickou membránu a brání zahájení kapacitace a akrozomové reakce (Johnson a kol., 2000).

Bovinní sérový albumin se přidává do ředících látek z důvodu kompenzace ztrát způsobené právě ředěním. Ředěním dochází ke snižování koncentrací složek semenné plazmy nutných pro životaschopnost spermií. BSA zvyšuje motilitu a zlepšuje míru plodnosti (Gadea, 2003).

### **1.4.2 Nejpoužívanější ředidla**

Existuje velké množství ředidel kančího spermatu, ale velmi se liší ve vlivu na životaschopnost spermií a na schopnost spermií oplodnit vajíčko (Karunakaran a kol., 2016). Dále se ředidla liší samozřejmě i svou cenou (Lipenský a kol., 2013).

Jedním z nejvíce využívaných krátkodobých ředidel pro kančí sperma je BTS (z angl. *Beltsville Thawing Solution*). Toto ředidlo vytvořili v roce 1975 Pursel a Johnson v laboratoři v Beltsvillu. BTS je využíváno jako rozmrazovací roztok. Jedná se o tzv. extendor a proto má BTS omezenou schopnost udržovat spermie živé a pohyblivé při delší době skladování než 3 dny. BTS obsahuje glukózu (37 g/l), citrát sodný (6 g/l), hydrogenuhličitan sodný (0,75 g/l), chlorid draselný (0,75 g/l), EDTA (1,25 g/l) a další pomocné látky (Johnson a kol., 2000; Smital, 2001; Pinart a kol., 2017).

Mezi další využívané ředidlo patří Androhep, které vytvořil v roce 1990 Weitze. Jedná se o dlouhodobé ředidlo obsahující HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethan sulfonová kyselina), BSA, glukózu, EDTA, citrát sodný a hydrogenuhličitan sodný. Lze použít pro skladování kančího spermatu na dobu až 5 dnů (Johnson a kol., 2000).

Ředidla kančího spermatu typu VIP, jsou ředidla sloužící k ředění ejakulátu a jeho uchovávání do inseminace po dobu 3 dnů (VIP 3), 5 dnů (VIP 5) a 7 dnů (VIP 7). Tyto ředidla obsahují glukózu, citrát trisodný, EDTA, hydrogenuhličitan sodný, kyselinu citronovou, laktózu, chlorid draselný, N-acetyl L-cystein, agens chránící buněčnou membránu a akrozomy spermií a antimikrobiální inhibitory (HEMA Malšice s.r.o., 2014).

## **1.5 Inhibice mikroorganismů ve spermatu chovných kanců**

### **1.5.1 Antibiotika v ředidlech kančího spermatu**

Do ředidel jsou obvykle přidávány různé antimikrobiální látky pro inhibici bakteriální kontaminace (Smital, 2001; Bassalleu a kol., 2011). Díky nim je kančí sperma možné skladovat několik dní při 15 – 17 °C a spermie jsou tak udržovány životaschopné (Bussalleu

a kol., 2011). Životnost spermií může být poškozena metabolickými vedlejšími produkty bakterií, které mimo to způsobují i kolísání pH (Smital, 2001). I přes použití antibiotik je velice obtížné se bakteriální kontaminaci vyhnout (Úbeda a kol., 2013). Některé studie uvádějí, že více než 90 % bakterií izolovaných ze zředěného kančího spermatu je na většinu antibiotik používaných v ředidlech rezistentní (Bussalleu a kol., 2011).

Výhodou použití antibiotik je hlavně zneškodnění bakteriální kontaminace, čímž nedochází k soutěžení spermií a bakterií o živiny obsažené v ředidle. Další výhodou je to, že bakterie nejsou přenášeny do samičího pohlavního ústrojí při umělé inseminaci (pokud nejsou rezistentní) a nedochází tak ke vzniku onemocnění.

Existují však i nevýhody použití antimikrobiálních látek. Mohou působit toxicky na spermie, což lze redukovat kombinací vhodných antibiotik. Při využití kombinace antibiotik však může docházet více k rozvoji antibiotické rezistence než při použití jednotlivých antibiotik. Dále mohou způsobovat kontaminaci životního prostředí při špatné likvidaci materiálu obsahující antimikrobiální látky.

Použití ředidel bez antibiotik může být výhodné, ale i rizikové. Mezi výhody patří to, že nedochází k toxickému působení antibiotik na spermie a nedochází k rozvoji antibiotické rezistence. Rizika jsou následující: soutěž bakterií se spermii o živiny obsažené v ředidlech, produkce různých toxických meziproductů a lipopolysacharidů bakterií poškozující spermie a také může docházet k rozvoji onemocnění samičího pohlavního ústrojí po umělé inseminaci (Morrell, 2016).

V současné době není k dispozici žádné antibiotikum, které by úspěšně působilo na všechny druhy bakterií přítomné v kančím spermatu. Dříve ředidla velmi často obsahovala kombinaci antibiotik penicilinu a streptomycinu. Tato kombinace má dnes již omezené spektrum účinku. Dnes jsou již dostupná mnohem účinnější širokospektrá antibiotika (Smital, 2001). Zdaleka nejoblíbenější skupinou jsou aminoglykosidy (gentamicin a neomycin), ale populární jsou i  $\beta$ -laktamová antibiotika (ampicilin) a linkosamidy (linkomycin) (Althouse a kol., 2005). Dále se využívají i antibiotika dibekacin, amikacin, ceftiofur, enrofloxacin, ampicilin a kanamycin, ale ty jsou nákladnější. Mezi nejhojněji využívané antibiotikum obsažené v ředidlech kančího spermatu patří gentamicin (Smital, 2001). Dle studie Okazaki a kol. (2010) je možné využít i polykationické antibiotikum polymyxin B, které neutralizuje endotoxickou aktivitu lipopolysacharidů, protože se na ně naváže a tím zlepšuje kvalitu spermií (Sepúlveda a kol., 2014).

Evropská legislativa (norma 90/429/EEC) předepisuje antibiotickou kombinaci obsahující penicilin (500 IU/ml), streptomycin (500 IU/ml), linkomycin (150 µg/ml) a spektinomycin (300 µg/ml), protože má široké antibakteriální spektrum a aktivitu proti leptospíře a mykoplazmatům (90/429/EEC, 1990; Maes a kol., 2011).

Úplná eliminace mikroorganismů nemůže být zajištěna, protože některé bakterie jsou odolné na působení antibiotik, které jsou běžně využívány v ředidlech kančího spermatu. Proto je důležité pravidelné sledování bakteriální kontaminace v ředěném kančím spermatu (Sepúlveda a kol., 2014).

### **Citlivost vybraných mikroorganismů na antibiotika:**

Ve studii Habruna a kol. (2010) byla testována citlivost 256 kmenů *E. coli* na antibiotika. Kmeny byly izolovány z uhynulých selat, které zemřely následkem průjmového onemocnění. Dle této studie byly kmeny *E. coli* rezistentní na streptomycin, ampicilin, sulfamethoxazol/trimethoprim a tetracykliny. Nejvyšší citlivost byla zaznamenána na kolistin a cefotaxim. Vzrůstající rezistence byla prokázána u antibiotik neomycinu a gentamycinu. Řada kmenů *E. coli* vykazovala mnohočetnou rezistenci (Habrun a kol., 2010). Ve studii Yoo a kol. (2015) byla testována antibiotická rezistence 95 izolátů druhu *E. coli* získaných z fekálních vzorků domácích prasat. Dle této studie byly kmeny *E. coli* také ve vysoké míře rezistentní na streptomycin, ampicilin a tetracykliny (Yoo, 2015).

Schulze a kol. (2015) testovali citlivost vybraných bakterií kančího spermatu na antibiotika. V této studii byl druh *Proteus mirabilis* izolován z pěti reprezentativních vzorků a byla zjištěna rezistence na ampicilin, penicilin, gentamicin, neomycin, spektinomycin, tetracyklin, klindamycin, tylosin, sulfonamidy, trimethoprim/sulfonamid a polymixin. Ve studii je uvedeno, že *Proteus mirabilis* je citlivý na cefotaxim, amikacin a enrofloxacin.

Ve studii Schulze a kol. (2015) byla dále zjištěna citlivost kmenů *Klebsiella oxytoca* izolovaných ze sedmi vzorků. *Klebsiella oxytoca* je zde uvedena jako citlivá na cefotaxim, tetracyklin, enrofloxacin a polymixin B. Autoři uvádí rezistenci na ampicilin, penicilin, gentamycin, neomycin, amikacin, spektinomycin, klindamycin, tylosin, sulfonamid a trimethoprim/sulfonamid (Schulze a kol., 2015).

Citlivost dalších vybraných druhů bakterií kančího spermatu na antibiotika dle studie Schulze a kol. (2015) je uvedena v Tabulce 2.

**Tabulka 2: Citlivost některých mikroorganismů kančího spermatu na antibiotika (Schulze a kol., 2015)**

Bakterie	Testovaná antibiotika													
	AMP10	PG10	CTX30	CN10	N30	AK30	SH10	TE30	DA2	TY30	RL25	SXT25	ENR5	PB300
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	I	R
<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Koryneformní tyčinky	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	R	S	I	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>Enterococcus sp.</i>	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R
Gram negativní nefermentující	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S
<i>Leifsonia aquatica</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
<i>Myroides sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>Ralstonia pickettii</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
<i>Rhizobium radiobacter</i>	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S
<i>Rhodococcus sp.</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	S	S	S	R
<i>Staphylococcus spp.</i>	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>Streptococcus faecalis</i>	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
<i>Streptococcus sp.</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	S	S	I	I

**Legenda:**

- R (rezistence), S (citlivost), I (intermediální citlivost)
- AMP10 (ampicilin), PG10 (penicilin), CTX30 (cefotaxim), CN10 (gentamicin), N30 (neomycin), AK30 (amikacin), SH10 (spektinomycin), TE30 (tetracyklin), DA2 (klindamycin), TY30 (tylosin), RL25 (sulfonamid), SXT25 (trimethoprim/sulfonamid), ENR5 (enrofloxacin) a PB300 (polymixin B)

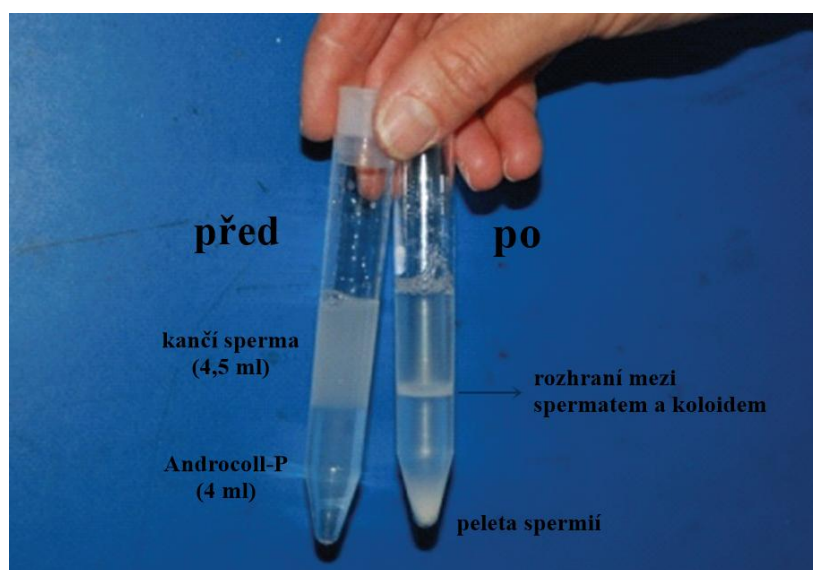
### 1.5.2 Koloidní centrifugace

Je snaha omezit využití antibiotik v ředidlech, kvůli vzrůstající antibiotické rezistenci a řadě nevýhod, které využití antibiotik s sebou nese. Využití antibiotik je obzvláště znepokojivé v prasečím průmyslu, kdy se využívá tekuté sperma více než sperma zmrazené. U čerstvého tekutého chlazeného sperma se zhoršuje bakteriální kontaminace během skladování a přepravy. Zmrazené sperma si uchovává svůj mikrobiologický profil během skladování, ale je náchylné na zhoršení bakteriální kontaminace během procesu rozmrazování (Morrell a kol., 2014).

Pro odstranění bakterií z kančího spermatu lze využít i fyzikální metody jako je koloidní centrifugace (Morrell, 2016). Jedná se o relativně jednoduchý postup, kdy se kančí spermie



oddělí od bakterií pomocí jednovrstvé centrifugace (SLC, Single layer centrifugation) (Morrell a kol., 2014). Téhož metodě předcházela centrifugace s hustotním gradientem (DGC, Density gradient centrifugation), ale metoda jednovrstvé centrifugace je účinnější, jednodušší, univerzálnější, méně časově náročná a je vhodná pro větší objemy (Morrell a kol., 2011a). Při jednovrstvé centrifugaci (viz obr. 5) se používá jedné vrstvy koloidu Androcoll-P, který je na bázi silanu potaženého oxidem křemičitým (Morrell a kol., 2011a; Morrell a kol., 2014). Koloid připravený k použití se nalije do centrifugační zkumavky a zředěné sperma se opatrně vrství na tento koloid. Pro optimální oddělení spermií by koncentrace spermatu neměla překročit přibližně  $100 \cdot 10^6$  spermií/ml, aby nedošlo k zatížení koloidu. Následně se provede centrifugace při 300x g po dobu 20 minut (Morrell a kol., 2014). Během centrifugace je nad koloidem obsažena semenná plazma a skrze koloid prochází pouze pohyblivé životaschopné spermie, vytvářející peletu na dně zkumavky (Morrell a kol., 2011a). Rozhraní mezi spermatem a koloidem se skládá ze spermií, které nebyly schopné proniknout do koloidu kvůli špatné pohyblivosti, abnormální morfologii nebo poškozenému chromatinu (Morrell a kol., 2011b). Po centrifugaci se odsaje supernatant a následně téměř veškerý koloid. Peleta spermií je obsažena ve zbývajícím koloidu, která je sterilní pipetou přenesena do čisté zkumavky obsahující sterilní ředidlo (Morrell a kol., 2014). Jednovrstevná centrifugace je používána hlavně z následujících důvodů: zlepšení kvality semenné dávky od „problémových“ kanců pro umělou inseminaci, prodloužení životnosti spermií, odstranění patogenů (viry, bakterie) a tím zlepšení biologické bezpečnosti semenné dávky, odstranění mrtvých a umírajících spermií před kryokonzervací a výběr spermií pro *in vitro* fertilizaci (Morrell a kol., 2011a).



Obrázek 5: Jednovrstevná centrifugace kančího spermatu (Morrell a kol., 2011b)

### 1.5.3 Přírodní látky

Léčebné účinky přírodních látek jsou známy po staletí. Jejich biologická aktivita zahrnuje antimikrobiální, antimykotické, antivirotické a antiparazitické účinky. Vědecké týmy se snaží najít přírodní látky, které by nahradily antibiotika v ředidlech kančího spermatu (Lustyková a kol., 2012). Znalosti o možnostech použití přírodních látek pro dekontaminaci kančího spermatu jsou ale malé. Některé přírodní látky se přidávají do kančího spermatu spíše pro své antioxidační vlastnosti ke snížení peroxidace lipidů, ale mimo to mají i antimikrobiální účinky. Jiné přírodní látky jako např. extrakty ze zeleného čaje, vitaminy C a E a lykopen se využívají jako složky ředidel pro jejich vysoký obsah polyfenolu, flavonoidů, vitamínů a minerálů (Akandi a kol., 2015).

Dlouhodobé uchovávání kančího spermatu bez negativního vlivu na jeho kvalitu vyžaduje skladování při teplotě 16 – 18 °C. Jedná se o poněkud drahou záležitost a to může být pro některé rozvojové země problém. Proto je nutné hledat alternativy ředidel pro dlouhodobé uchovávání kančího spermatu, které by se snadno vyráběly, skladování by bylo možné při pokojové teplotě a byly by cenově dostupné. Studie provedená v roce 2015 Akandi a kol. se zabývala uchováváním spermatu v ředidlech obsahující med, šťávu z cukrové třtiny, rajčatovou šťávu a ananasovou šťávu. Jedná se o látky cukerné povahy, které mají funkci energetického substrátu a tvoří tedy základ energie důležité pro motilitu spermií během skladování. Nejvyšší motilita spermií byla udržena v ředidle obsahující med. Med obsahuje přibližně 80 hm% cukrů (glukózu, fruktózu, sacharózu a maltózu) a mimo to má silnou antibakteriální aktivitu *in vitro*. Med obsahuje antimikrobiální peptid defensin-1. Při ředění medu vodou dochází k uvolňování methylglyoxalu a peroxidu vodíku. Podobným způsobem působí i šťáva z cukrové třtiny, která obsahuje sacharózu, fruktózu, glukózu a další fenolické sloučeniny a flavonoidy mající také antibakteriální účinek. U médií obsahující rajčatovou a ananasovou šťávu nebyly výsledky již tak příznivé (Akandi a kol., 2015).

Jednou z možných alternativ antibiotik mohou být přírodní látky s antimikrobiálními účinky jako je kyselina gallová a od ní odvozený methylgallát, ethylgallát, propylgallát, a oktylgallát a dále pak thymol, karvakrol a eugenol (Mazurová a kol., 2015).

Kyselina gallová je přirozeně vyskytující se sloučenina mající antioxidační, antibakteriální a antifugální vlastnosti. Zdrojem kyseliny gallové je habrová a dubová kůra, duběnka, zelený či černý čaj, chmel, granátové jablko a další. Může se vyskytovat buď jako volná molekula nebo konjugovaná v molekulách tříslovin (tanínů), kdy tvoří kyselina gallová estery

se sacharidy zejména s glukózou. Ve studii Mazurové a kol. (2015) byl prokázán účinek kyseliny gallové na kmeny *Pseudomonas aeruginosa* s hodnotami minimální inhibiční koncentrace (MIC) v rozmezí 300 – 1200 µg/ml. Dále byl prokázán účinek na *E. coli*, *Staphylococcus sp.* a *Enterococcus sp.* s hodnotami MIC v rozmezí 2400 – 4800 µg/ml.

Thymol je bílá krystalická látka, která svým ostrým zápachem připomíná kafr. U thymolu bylo popsáno, že způsobuje poškození cytoplazmatické membrány bakterií s následnou smrtí buňky, dále poškozuje bakteriální buněčnou stěnu a inhibuje některé bakteriální enzymy. Také má antioxidační vlastnosti, ale ve vyšších koncentracích může způsobovat podráždění kůže a sliznice. Karvakrol je hnědá viskózní kapalina. Karvakrol je regioizomer thymolu, a proto působí podobně. Ve studii Mazurové a kol. (2015) thymol a karvakrol vykazovaly hodnoty MIC 150 – 1200 µg/ml pro *E. coli*, *Staphylococcus sp.* a *Enterococcus sp.* při stanovení mikrodiluční metodou. Při působení thymolu a karvakrolu na *Pseudomonas aeruginosa* byla zjištěna MIC v rozmezí 300 – 2400 µg/ml. Při působení thymolu a karvakrolu nebyla v této studii ovlivněna biologická kvalita spermií. Potencionální kombinace těchto dvou látek by se mohla využít k dekontaminaci kančího spermatu, ale rozhodující je zde použitá koncentrace, aby nedocházelo k poškození buněk spermií.

Eugenol (kyselina hřebíčková) je derivát fenylypropanolu vykazující antimikrobiální, antioxidační a analgetické účinky. Zdrojem eugenolu je hřebíček, muškátový oříšek, skořice a bobkový list. Jedná se o nažloutlou tekutinu vonící po hřebíčku. Působí na funkci vnější bakteriální membrány a narušuje tak bakteriální metabolismus a proteosyntézu. Vyazuje širokospektrální antimikrobiální účinky proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Ve studii Mazurové a kol. (2015) byly pro *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus durans* stanoveny hodnoty MIC 1200 – 2400 µg/ml.

Využití přírodních látek pro dekontaminaci kančího spermatu může být omezeno toxicitou přírodních látek na spermie. Přírodní látky stejně jako antibiotika mohou negativně ovlivňovat motilitu a životaschopnost spermií (Mazurová a kol., 2015).

#### 1.5.4 Chemické látky

Při výrobě potravin živočišného původu se využívají hojně chemické látky jako antimikrobiální léčiva pro léčbu nebo kontrolu léčby infekčních onemocnění zvířat nebo jako dezinfekční přípravky k zabránění bakteriální kontaminace. Krmiva potravinářských zvířat (včetně prasat) jsou doplňována síranem měďnatým a/nebo chloridem zinečnatým, protože jejich účinek pravděpodobně inhibuje některé bakterie střevního traktu. Mezi nejčastěji

používané dezinfekční prostředky užívané pro veterinární účely patří formaldehyd, jód, sloučeniny chloru a síran měďnatý. V potravinářském průmyslu se nejčastěji využívají chloridové sloučeniny, kyseliny a alkoholy. Získaná rezistence na sloučeniny obsahující měď byla prokázána u enterokoků. Druh *Salmonella* je k síranu měďnatému méně citlivý. Naopak stafylokoky jsou na síran měďnatý citlivý (Aarestrup a kol., 2004).

Zinek je důležitým stopovým prvkem mnoha zvířat. Celkový obsah zinku ve spermatu je vysoký a je rozhodující pro spermatogenezi a koncentraci spermií. Jeho nedostatek může způsobovat neplodnost v důsledku špatného vývoje varlat a spermatogeneze. Zinek hraje důležitou roli ve stabilitě membrán a chromatinu buněk spermií a v jejich motilitě. (Dorostkar a kol., 2014). Zinek a vitamin C jsou velice důležité antioxidanty. Nedostatkem antioxidantů v kombinaci s tepelným stresem se zvyšuje výskyt abnormálních spermií v kančím spermatu (Horký a kol., 2016). Byla provedena studie Dorostkarem a kol. (2014) u buvolího spermatu, kde byl síran zinečnatý obsažen v ředidle. Výsledky této studie ukázaly, že 0,288 mg/l síranu zinečnatého zlepšuje kvalitu spermií (motilitu, životaschopnost, celistvost membrány a antioxidační účinky) při mražení spermatu. Přidáním vyšších koncentrací byl prokázán škodlivý účinek na spermie (Dorostkar a kol., 2014).

Bor má využití v mnoha oblastech. Je složkou hnojiv, insekticidů, pufrů, barviv a mnohých dalších. Sloučeniny boru jsou esenciálními mikroživinami pro mnoho organismů a hrají důležitou roli v životě rostlin. Avšak ve velkém množství může být bor pro živé buňky toxický. Nadbytečný bor negativně působí na syntézu proteinů, způsobuje mitochondriální dysfunkci a narušuje dělení a vývoj buněk. U mikroorganismů se bor podílí na quorum sensing, ale jeho zvýšenou koncentrací je naopak narušován. Bor je vyžadován pro zachování struktury a správné fungování buněčných membrán, ale nadbytek boru poškozuje membránovou funkci, integritu, konformaci a schopnost transportu. Bor je využíván pro své antiprotozoální vlastnosti. Jsou zkoumány antivirotické, antimykotické, antituberkulózní a antibakteriální účinky boru. O antibakteriálních účincích boru existují pouze omezené údaje. Deriváty boru mohou být efektivně používány k řešení beta-laktamové rezistence. V roce 2012 provedl Yilmaz studii, při které zjistil MIC a MBC (minimální baktericidní koncentraci) kyseliny borité a boraxu (tetraborát sodný) na druhy *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter septicus*, *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a jejich hodnoty si byly vzájemně podobné. Při působení kyseliny borité na *Staphylococcus aureus* a *Acinetobacter septicus* byly zjištěny hodnoty MIC a MBC 3,8 mg/ml a při působení na *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* hodnoty MIC a MBC 7,6 mg/ml. Byl prokázán účinek tetraboritu sodného na *Staphylococcus aureus*

a *Acinetobacter septicus* s hodnotami MIC a MBC 23,8 mg/ml a na *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* s hodnotami MIC a MBC 47,6 mg/ml (Yilmaz, 2012).

### 1.5.5 Kationické antimikrobiální peptidy

Vzhledem k narůstající bakteriální rezistenci na antimikrobiální látky, je nutné vyvinout nová činidla s různými aktivními mechanismy. V uplynulých několika desetiletích byla snaha vyvinout antimikrobiální peptidy pro klinickou medicínu. Využití antimikrobiálních peptidů pro management umělé inseminace jako aditivum pro ředěné sperma je novinkou. Pro konzervaci kančího spermatu musí antimikrobiální aditiva splňovat určité podmínky: musí mít široké spektrum antimikrobiálních účinků, nesmí být toxické pro spermie a nesmí ovlivňovat plodnost, musí být stabilní, musí mít vysokou aktivitu při běžných skladovacích teplotách spermatu, musí mít nízkou schopnost vyvolat rezistenci a musí splňovat vlastnosti snadného použití a ekonomické proveditelnosti.

Endogenní antimikrobiální peptidy jsou důležitými složkami vrozeného imunitního systému vyšších organismů. Jsou syntetizovány savčími organismy zejména v epiteliální tkáni, respiračním systému a v zažívacím a reprodukčním traktu. Tyto peptidy mají schopnost působit proti široké škále mikroorganismů, hub, virů a parazitů. Dále mají imunomodulační účinky, působí jako chemokiny, podporují hojení ran, modulují odpověď dendritických buněk v adaptivní imunitní odpovědi a podílejí se na proliferaci buněk a na angiogenezi.

Antimikrobiální peptidy jsou obecně složeny z krátkých aminokyselinových sekvencí (přibližně 10 – 50 aminokyselin), které jsou uspořádány do struktury  $\alpha$ -helixu či  $\beta$ -skládaného listu. Kationický náboj a amfipatický charakter jsou důležité vlastnosti antimikrobiálních peptidů poskytující základ pro selektivní účinek na bakteriální membrány. Protože je bakteriální buněčná membrána bohatá na negativně nabitě lipidy (fosfatidylglycerol, kardiolipin) a vnější membrána gramnegativních bakterií je složena z vysoce záporně nabitých lipopolysacharidů, tak dochází k elektrostatickým interakcím kationických peptidů s negativně nabitými membránami. Vazba na hlavní skupinu lipidů vyvolává konformační změny vedoucí k prostorové separaci kationických a hydrofobních zbytků. V důsledku hydrofobních interakcí s lipidovými acylovými řetězci jsou peptidy schopné proniknout do lipidové matrice a narušit tak lipidové uspořádání a bariérovou funkci bakteriální membrány. Absence aniontových lipidů a vysoký obsah cholesterolu snižuje tekutost lipidové dvojvrstvy a to je hlavní důvod nízkého cytolytického a cytotoxického účinku antimikrobiálních peptidů na eukaryotické hostitelské buňky. Nejběžněji zneškodňují

bakteriální buňky membránovou permeabilizací tvorbou pórů nebo odstraněním lipidů. Antimikrobiální peptidy mohou rozptýlit elektrochemický gradient membrány a umožnit tak pronikání větších molekul přes cytoplazmatickou membránu. Dochází k narušení membránové morfologie, včetně buněčné agregace, vezikulace, fragmentace a uvolňování DNA.

Mezi prominentní kationické antimikrobiální peptidy patří beta defensiny a katelikidiny. V savčím samčím reprodukčním systému jsou beta defensiny syntetizovány převážně v nadvarlatech během dozrávání spermií, kdy se vylučují z epididymálního epitelu do lumen a pak se objevují na povrchu spermií. Beta defensiny jsou důležité nejen pro své antimikrobiální účinky, ale také pro svůj funkční význam pro oplodnění.

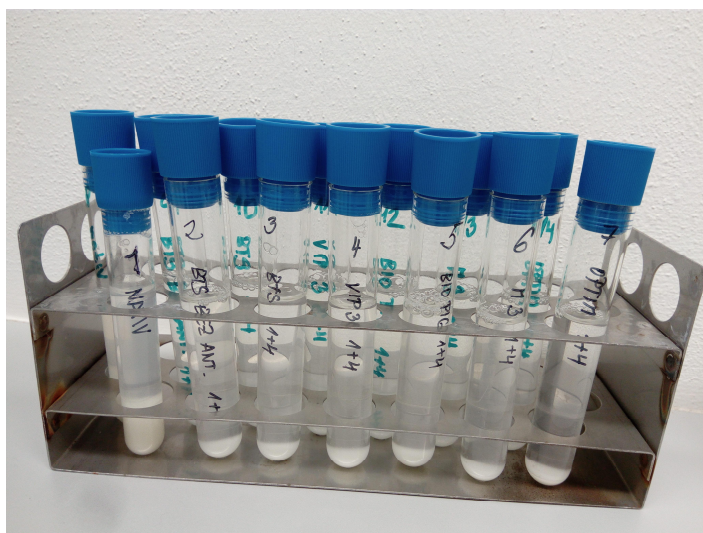
Pro konzervaci kančího spermatu se využívají hlavně helikální lineární peptidy. Cyklizace sekvencí obsahujících šest L-aminokyselin, hlavně arginin (R), tryptofan (W) a fenylyalanin (F), které jsou součástí některých přírodních látek, vedla k vytvoření vysoce aktivních hexapeptidických analogů c-WWW (c-RRRWWW) a c-WFW (c-RRRWFW). Jejich antimikrobiální účinky jsou dány elektrostatickými interakcemi mezi záporně nabitou lipidovou matrix bakterií a třemi pozitivně nabitými argininovými zbytky. To umožňuje peptidům narušovat povrch bakteriální membrány a vytvářet tak komplexy peptid-lipid, čímž dochází ke zničení celého fosfolipidového uspořádání.

Ve studii Schulze a kol. (2016) byla aktivita antimikrobiálních peptidů (c-WWW, c-WFW a MH5E) testována na třinácti bakterií izolovaných z kančího spermatu. Na většinu bakterií antimikrobiální peptidy vykazovaly inhibiční účinek, ale ne na *Proteus spp.* a *Staphylococcus aureus*. Výsledky studie naznačují, že antimikrobiální peptidy by mohli nahradit běžná antibiotika. Další výzkum by se měl zabývat snížením toxicity antimikrobiálních peptidů na spermie a použitím antimikrobiálních peptidů v kombinaci s jinými běžnými antibiotiky, čím by se potencionálně zesílil jejich účinek. Existuje pouze malý počet bakterií, které jsou na antimikrobiální peptidy rezistentní (Schulze a kol., 2016).

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Vyšetřovaný materiál

Vyšetřovaným materiálem byly vzorky čerstvě odebraného kančího spermatu dovážené oddělením chovu prasat Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. v Kostelci nad Orlicí. Tyto vzorky byly v nativním stavu a s přidavkem příslušných ředících látek (viz obr. 6). Ředícími látkami byla různá ředidla pro krátkodobé a dlouhodobé uchovávání. Ředidla obsahovala antibakteriální, přírodní či chemické látky. Byla testována účinnost těchto látek na inhibici mikroorganismů v kančím spermatu.



Obrázek 6: Vzorky kančího spermatu

### 2.2 Testované látky

U vzorků číslo 1 – 9 byly testovány tyto ředící látky: BTS bez antibiotik (Munitube, Německo, č. šarže 04032013), BTS s antibiotiky (Munitube, Německo, č. šarže 24020529201), tekutý koncentrát ředidla 1 a 2 (VUŽV v.v.i.; bez šarže), VIP 3 (Hema Malšice ČR, bez šarže), BIO PIG (Magapor, Španělsko; bez šarže), M III (Munitube, Německo, č. šarže 25020533101), OPTIM (Magapor, Španělsko; bez šarže) a SCP (IMV, Francie; bez šarže). Přesné složení ředících látek bylo známé pouze u některých z nich (viz tabulka 3).

**Tabulka 3: Složení testovaných ředidel**

Složení	Název ředidla						
	BTS	Tekutý koncentrát 1 a 2	VIP 3	BIO PIG	M III	OPTIM	SCP
glukóza	✓	✓	✓	složení neuveđeno	složení neuveđeno	složení neuveđeno	složení neuveđeno
fruktóza		✓					
citronan sodný	✓	✓	✓				
EDTA	✓	✓	✓				
NaHCO <sub>3</sub>	✓	✓	✓				
KCl	✓	✓	✓				
BSA							
kys. citronová		✓	✓				
kys. askorbová							
acetylcystein		✓	✓				
HEPES pufr		✓					
kys. hyaluronová			✓				
povidon 40			✓				
inositol			✓				
laktóza monohydrát			✓				
gentamycin sulfát	složení neuveđeno	směs antibiotik dle 90/429/EEC	✓	směs antibiotik dle 90/429/EEC	směs antibiotik dle 90/429/EEC	složení neuveđeno	složení neuveđeno
gentamycin							
amoxicilin			✓				
enrofloxacin							
neomycin sulfát							
polymixin							
apramycin							

Poznámka:

U tekutého koncentrátu 2 byla o 50 % vyšší navážka než u tekutého koncentrátu 1, jinak se jejich složení nelišilo. Složení ředidel je pouze orientační, na obalech nebylo uvedeno.

Směs antibiotik dle normy 90/429/EEC: streptomycin (500 IU/ml), penicilin (500 IU/ml), linkomycin (150 µg/ml) a spektinomycin (300 µg/ml)

U vzorků číslo 10 – 13 byly testovány účinky těchto přírodních a chemických látek přidávaných do ředidla BTS: síran zinečnatý (Lachema Brno, č. šarže 47543/0776), thiosíran sodný heptahydrát (Lachema Brno, č. šarže 40024/0291), směs koloidního zinku a vitamínu C (Pharma Activ Czech s.r.o., bez šarže), kyselina gallová (Sigma Aldrich, č. šarže 126284451107322), karvakrol (Sigma-Aldrich, č. šarže 1146094) a thymol (bez známého výrobce a šarže).

U vzorků číslo 14 byl testován účinek BTS bez antibiotik a BTS bez antibiotik obsahující thiosíran sodný heptahydrát v různých navážkách a při použití různého ředění.



U vzorků číslo 15 a 16 byl testován účinek ředidla BTS bez antibiotik a BTS bez antibiotik obsahující síran měďnatý (Lachema Brno, č. šarže 4205961), kyselinu boritou (Lachema Brno, č. šarže 60481/0389) a borax - tetraboritan sodný (Lachema Brno, č. šarže 151/963). Byly testovány různé poměry ředění kančího spermatu tímto ředidlem a různé navážky těchto chemických látek.

### **2.3 Přístroje, chemikálie a pomůcky**

Laminární box (MSC 12 Jouan biohazard, Francie), počítadlo kolonií (Start Count STC-1000; VWR International BVBA Švýcarsko), termostat skříňový (17 °C; Lovibond TC135S), chladnička a mraznička (4 °C a -20 °C; AEG Santo 70402 KG8, Španělsko), třepačka Vortex (V1-plus bioSan, No. 010203-1204-0766, EU), biologický termostat (37 °C, O<sub>2</sub>; inkubátor Memmert INE 500), zákaloměr (McFarland densitometer MG-Units bioSan, Lotyšsko), světelný mikroskop (Nikon Eclipse H600L 80i; Japonsko), digitální váhy (440-43, KERN; Německo) plynový kahan (Bunsen Z1), reader a analyzátor inhibičních zón BACMED (Aspiag s.r.o., ČR), sterilizátor skla (Sterimat HS202A, BMT Medical Technology s.r.o.; ČR), parní sterilizátor plastů (PS20A, Chirana, ČR) a horkovzdušný sterilizátor půd (Sterilab, BMT Medical Technology s.r.o., ČR).

Jednokanálové pipety (0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl a 500-5000 µl; Santorius family Biohit, Německo), špičky (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl a 5000 µl) a filtry (Santorius family Biohit, Německo), skleněné L-hokejky, sterilní plastové Petriho misky (Ø 9 cm), bakteriologické kličky, skleněné zkumavky a kovové zátky, stojany na zkumavky, skleněné lahve se šroubovacím závitem 500 ml (Fisher Scientific, spol. s.r.o., ČR), Erlenmayerovy baňky 500 ml (Scientific, spol. s.r.o., ČR) a skleněná podložní sklíčka.

Fyziologický roztok, krevní agar, Mueller Hintonův agar, biochemické testy Mikrolatest (Erba Lachema, s.r.o.), činidla pro biochemické testy, disky pro testování antimikrobiální náchylnosti (OXOID, UK), peroxid vodíku 3%, krystalová violet, karbolfuchsin, Lugolův roztok, imerzní olej, parafinový olej, destilovaná voda a etanol 70%.

## 2.4 Příprava kultivačních médií a roztoků

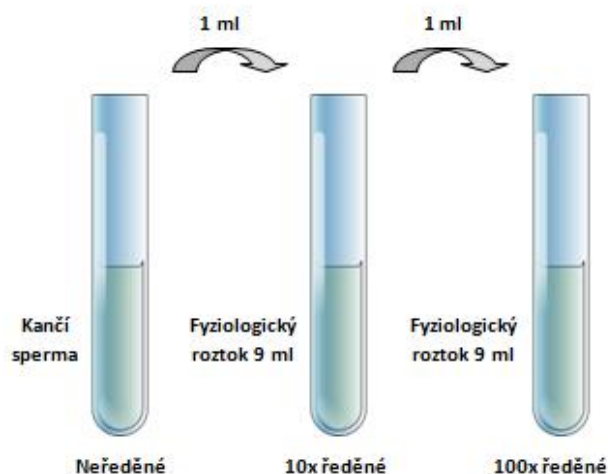
**Fyziologický roztok:** Fyziologický roztok byl připraven navážením 4,25 g NaCl (PENTA s.r.o., č. šarže 1801310113) do skleněné lahve se šroubovacím závitem a tato navážka byla rozpuštěna v 500 ml destilované vody. Připravený roztok byl sterilizován v parním sterilizátoru po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Po vychladnutí byl sterilní fyziologický roztok skladován v chladničce.

**Krevní agar (KA):** Krevní agar byl připraven navážením 17 g Blood Agar Base No. 2 (HiMedia Laboratories, č. šarže 0000259824) do Erlenmayerovy baňky a navážka byla rozpuštěna ve 400 ml destilované vody. Takto připravený agarózový základ byl sterilizován v parním sterilizátoru po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Po vychladnutí agarózového základu na teplotu přibližně 50 °C bylo přidáno za stálého míchání 20 ml defibrilované beraní krve. Takto připravený krevní agar byl naléván na sterilní plastové Petriho misky, které byly ihned zakrývány víčkem. Po vychladnutí a ztuhnutí byl krevní agar skladován v chladničce při teplotě 4 °C. Maximální doba takto připraveného krevního agaru je 3 týdny.

**Mueller Hintonův (MH) agar:** Mueller Hintonův agar (HiMedia Laboratories, č. šarže 0000118687) byl připraven navážením 7,6 g (38 g/1000 ml) do Erlenmayerovy baňky a navážka byla rozpuštěna ve 200 ml destilované vody. Připravený agarový základ byl sterilizován v parním sterilizátoru 15 minut při 121 °C. Po vychladnutí agarózového základu na teplotu přibližně 50 °C byl Mueller Hintonův agar ihned naléván na sterilní plastové Petriho misky, které byly ihned zakrývány víčkem. Po vychladnutí a ztuhnutí byl Mueller Hintonův agar skladován v chladničce při teplotě 4 °C.

## 2.5 Stanovení účinnosti inhibičních látek

Čerstvě odebrané kančí sperma bylo transportováno při cca 17 °C. Po transportu do laboratoře bylo ihned zpracovááno. Všechny kroky byly prováděny za sterilních podmínek v prostředí laminárního boxu. Nejprve byla připravena ředící řada roztoků (viz obr. 7), kterou byly získány 10x a 100x naředěné vzorky kančího spermatu. Vzorky kančího spermatu byly před použitím důkladně homogenizovány na vortexu. Pro 10x naředěné vzorky byl k 9 ml fyziologického roztoku ve skleněné zkumavce přidáván 1 ml kančího spermatu a řádně promícháno na vortexu. Pro 100x naředěné vzorky byl k 9 ml fyziologického roztoku přidáván 1 ml 10x naředěného vzorku a opět promícháno na vortexu.



**Obrázek 7: Postup přípravy ředící řady**

Pro inokulaci bylo použito vždy 100  $\mu$ l vzorku a inokulace se provedla pomocí roztěru L-hokejkou po celé ploše krevního agaru na Petriho misce. Na krevní agar s 5% defibrilovanou beraní krví bylo vždy inokulováno neředěné, 10x naředěné a 100x naředěné kančí sperma a to vždy v doubletu. Pro jeden vzorek bylo tedy získáno 6 misek krevního agaru s inokulovanými vzorky.

Po vsáknutí vzorku do krevního agaru byly Petriho misky umístěny do termostatu s kyslíkem udržujícím teplotu 37 °C. Vzorky bylo nutné nechat inkubovat 48 hodin, protože inkubace 24 hodin byla nedostačující pro růst mikroorganismů.

Po 48 hodinách inkubace byl zjišťován počet kolonií bakterií vyrostlých na jednotlivých miskách obsahující krevní agar. Pro usnadnění počítání kolonií byla použita počítačka kolonií. Následně byl stanoven celkový počet mikroorganismů v jednotkách CFU/ml dle vzorce:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2) \cdot d}$$

kde:

- N - počet kolonie tvořících jednotek (CFU) na 1 ml vzorku
- $\sum C$  - součet všech kolonií spočítaných na vybraných miskách
- V - součet inokula v ml
- $n_1$  - počet misek použitých pro výpočet z prvního použitého ředění
- $n_2$  - počet misek použitých pro výpočet z druhého použitého ředění
- d - faktor prvního pro výpočet použitého ředění

Do výpočtu je nutné zohlednit použité ředění spermatu příslušným ředidlem (1:2, 1:4 nebo 1:8).

Pro identifikaci vybraných mikroorganismů obsažených ve vzorcích kančího spermatu byly připraveny čisté kultury mikroorganismů. Tyto kultury byly následně identifikovány dle vzhledu kolonií na kultivačním médiu, morfologie buněk mikroorganismů pozorovaných ve světelném mikroskopu po obarvení dle Grama a podle výsledků biochemických testů. Některé kmeny, které se nepodařilo identifikovat, byly dourčeny metodou MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem).

Vzorky kančího spermatu byly inokulovány dle potřeby ve většině případů v den odběru a následně třetí a sedmý den od odběru. Některé vzorky byly inokulovány tři po sobě jdoucí dny, tedy v den odběru a druhý a třetí den.

## **2.6 Stanovení citlivosti vybraných mikroorganismů na antibiotika**

Vybrané bakteriální kmeny, které odolaly působení inhibičních látek obsažených v ředidlech kančího spermatu, byly testovány na citlivost na příslušnou sestavu antibiotik pomocí diskové difúzní metody.

Sestava antibiotik obsahovala:

- Ampicilin (AMP)
- Amoxicillin - klavulanová kyselina (AMC)
- Cefuroxim (CXM)
- Sulfamethoxazol (SXT)
- Doxycyklin (DOX)
- Cefadroxil (CFR)

Mueller Hintonův agar byl inokulován bakteriální suspenzí o hustotě 0,5 stupně McFarlanda vatovým tampónem po celé ploše agaru. Poté byly na inokulovaný agar aplikovány disky napuštěné vybranými antibiotiky z příslušné sestavy antibiotik vhodné pro daný kmen bakterie. Inokulovaný agar s antibiotickými disky byl inkubován v termostatu po dobu 24 hodin při 37 °C.

Po 24 hodinové inkubaci byly změřeny inhibiční zóny analyzátozem BACMED. Dle velikosti inhibičních zón byla u jednotlivých mikroorganismů vyhodnocena citlivost na příslušná antibiotika.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V nativních vzorcích kančího spermatu byl zjištěn celkový počet bakterií řádově  $10^3$  až  $10^5$  CFU/ml nebo byl počet bakterií v těchto vzorcích velmi často nepočitatelný. Sepúlveda a kol. (2016) uvádí, že se bakteriální kontaminace čerstvého kančího spermatu pohybuje v rozmezí  $10^3$  až  $10^5$  CFU/ml, ale hodnoty mohou kolísat a dosahovat až hodnot  $10^9$  CFU/ml.

V námi testovaných vzorcích kančího spermatu se nejčastěji vyskytovaly tyto druhy mikroorganismů: *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus equi subsp. zooepidermicus*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum*, *Staphylococcus cohnii subsp. cohnii*, *Staphylococcus simulans*, *Kocuria kristinae*, *Corynebacterium sp.* a *Bacillus sp.*

Mazurová a kol. (2015) uvádí, že v kančím spermatu jsou nejhojněji nalézány bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, hlavně rody *Escherichia*, *Enterobacter* a *Proteus*. V kančím spermatu můžeme nalézt i enterokoky, stafylokoky a *Pseudomonas aeruginosa*. Většina z těchto bakterií jsou oportunní metabolicky aktivní patogeny schopné zhoršovat kvalitu kančího spermatu. Dle Morrella (2016) se bakterie jako streptokoky a stafylokoky dostávají do kančího spermatu z kůže a sliznice, anebo ze střevního a respiračního traktu kance. Martín a kol. (2010) také uvádí, že hlavním kontaminantem kančího spermatu je *E. coli*, ale může být kontaminováno i rody *Proteus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Pseudomonas*.

Po působení inhibičních látek nejčastěji přežívali v testovaných vzorcích bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* a to hlavně druhy *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* a *Klebsiella oxytoca* a u vybraných kmenů bylo provedeno testování citlivosti na antibiotika.

### 3.1 Testování účinnosti ředidel pro krátkodobé a dlouhodobé uchovávání

Byla testována ředidla **BTS bez antibiotik, BTS, tekutý koncentrát 1 a 2, VIP 3, BIO PIG, M III, OPTIM a SCP**. Kromě ředidla SCP, což je ředidlo pro dlouhodobé uchovávání, se ve všech případech ředících látek jedná o ředidla pro krátkodobé uchovávání. Působení těchto ředících látek (viz tabulka 4) bylo testováno na 3 sadách vzorků kančího spermatu (vzorky č.1, 2 a 3). Kromě vzorku nativního kančího spermatu (bez obsahu ředidla), byly všechny ředící látky přidávány v poměru 1 : 4 (1 díl spermatu + 4 díly ředidla). Působení ředidel bylo testováno vždy v den odběru a třetí a sedmý den od odběru kančího spermatu.

Tabulka 4: Ředění vzorků kančího spermatu č. 1, 2 a 3

Číslo vzorku	Obsah vzorku	Poměr (sperma:ředidlo)
1	BTS bez antibiotik	1 : 4
2	BTS	1 : 4
3	koncentrát 1	1 : 4
4	koncentrát 2	1 : 4
5	VIP 3	1 : 4
6	BIO PIG	1 : 4
7	M III	1 : 4
8	OPTIM	1 : 4
9	SCP	1 : 4
10	nativní vzorek	---

#### 3.1.1 Vzorky kančího spermatu č. 1

Při testování vzorků v den odběru (první den) kančího spermatu obsahoval nativní vzorek kančího spermatu č. 1 řádově  $10^4$  CFU/ml. U nativního vzorku je zřejmé, že docházelo ke vzrůstu počtu kolonií v čase. Třetí den obsahoval nativní vzorek již řádově  $10^5$  CFU/ml a sedmý den již nativní vzorek obsahoval nepočitatelné množství bakterií. V nativním vzorku docházelo postupem času k potlačení ostatních bakterií hlavně druhem *E. coli* (viz obr. 8), kdy sedmý den je možné pozorovat souvislý nárůst této bakterie po celé ploše krevního agarů na Petriho misce.



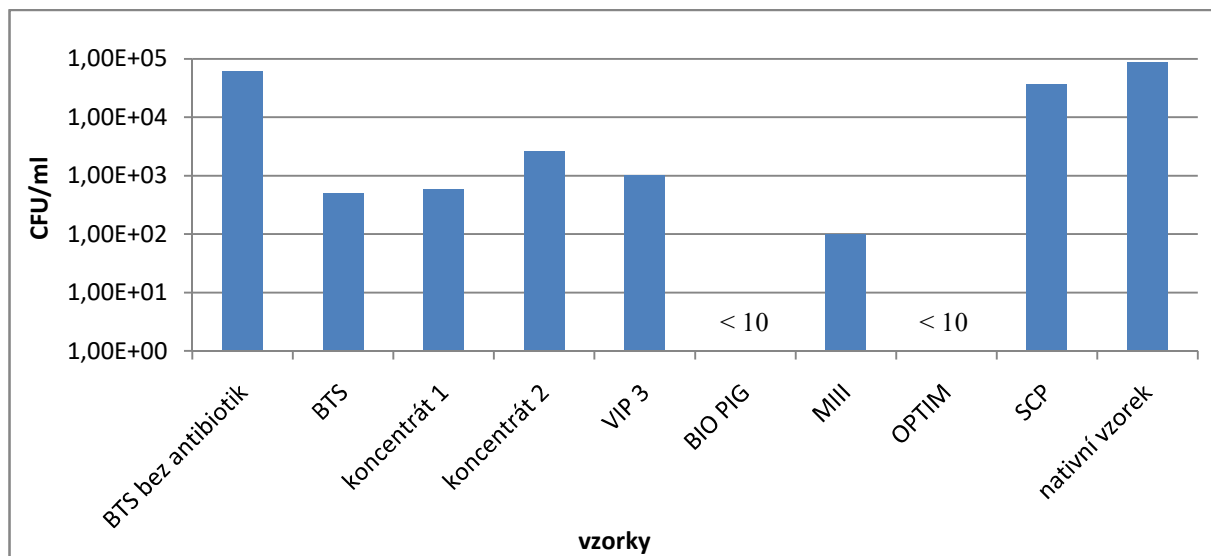
Obrázek 8: Kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 1 (KA, 48 h, 37 °C)

První den (viz graf 1) byla pozorována úplná inhibice bakterií kančího spermatu při působení ředidel BIO PIG a OPTIM. Dále dobře působilo i ředidlo M III a vzorek ředěný tímto ředidlem obsahoval  $1 \cdot 10^2$  CFU/ml. Naopak největší nárůst bakterií byl pozorován při působení BTS bez antibiotik a ředidla SCP, u kterých byl počet bakterií řádově shodný s nativním vzorkem ( $10^4$  CFU/ml). Ve vzorku kančího spermatu ředěném BTS bez antibiotik bylo možné pozorovat druh *Streptococcus equi subsp. zooepidermicus*.

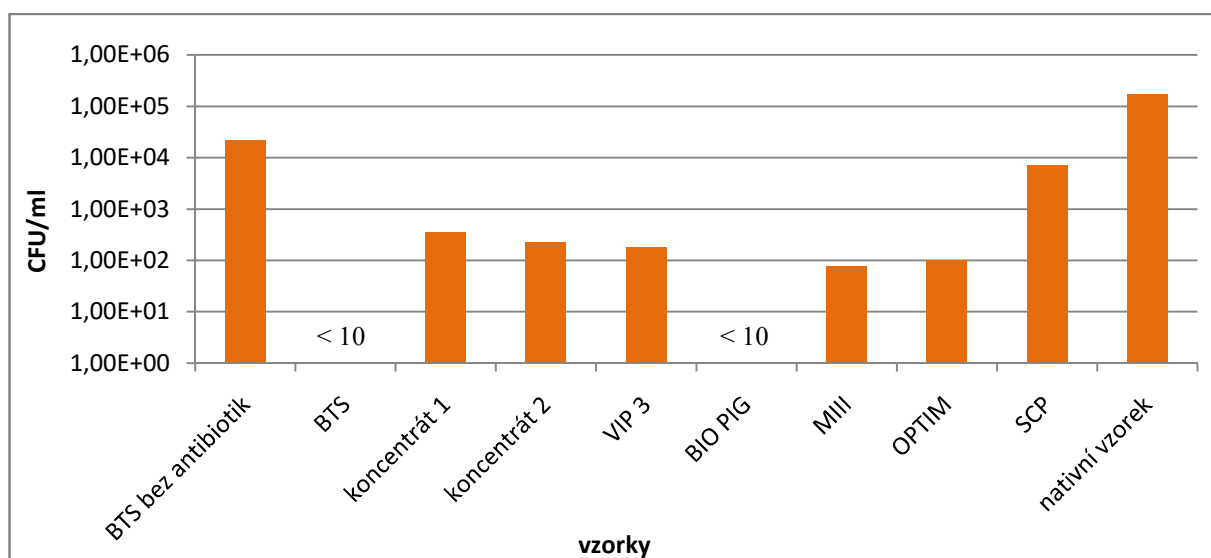
Třetí den od odběru (viz graf 2) byla pozorována úplná inhibice bakterií po působení ředidel BTS s antibiotiky a BIO PIG. Velice dobře také působila ředidla OPTIM a M III. Tyto vzorky obsahovaly celkový počet bakterií přibližně  $10^2$  CFU/ml, což je o tři řády méně než u nativního vzorku.

Sedmý den nebylo možné objektivně hodnotit celkový počet bakterií ve vzorcích z důvodu kontaminace krevního agaru.

**Graf 1: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 1 - 1. den**



**Graf 2: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 1 - 3. den**



### 3.1.2 Vzorky kančího spermatu č. 2

První den testování nebylo možné objektivně zhodnotit počet bakterií ve vzorcích z důvodu kontaminace krevního agarů.

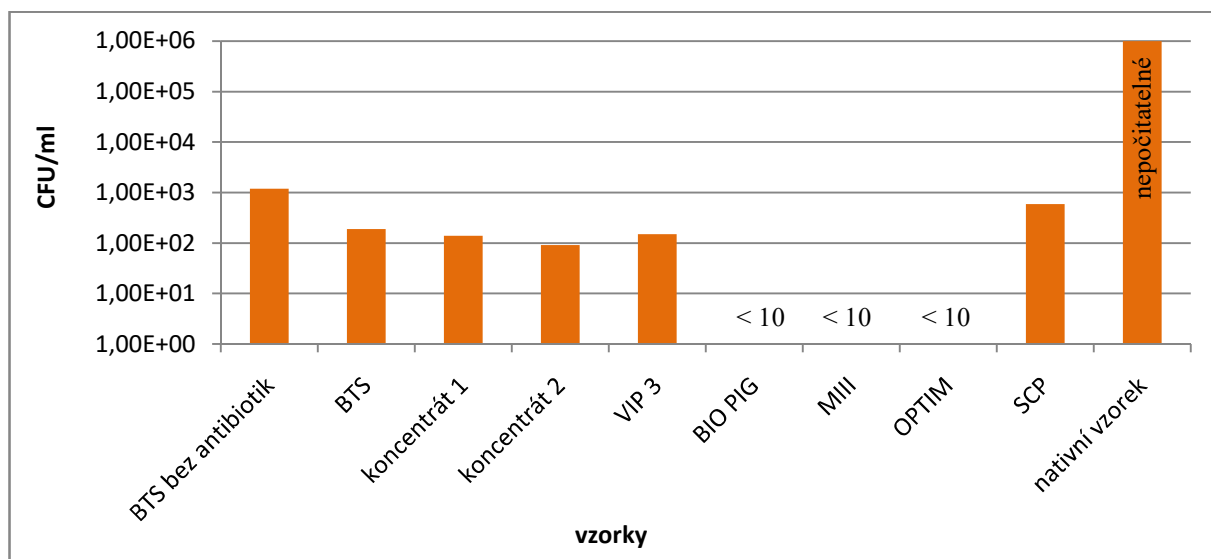
Nativní vzorek kančího spermatu č. 2 obsahoval třetí i sedmý den nepočítatelné množství bakterií. Bylo možné vidět souvislý bakteriální nárůst po celé ploše krevního agarů na Petriho misce tvořený hlavně druhem *E. coli*.



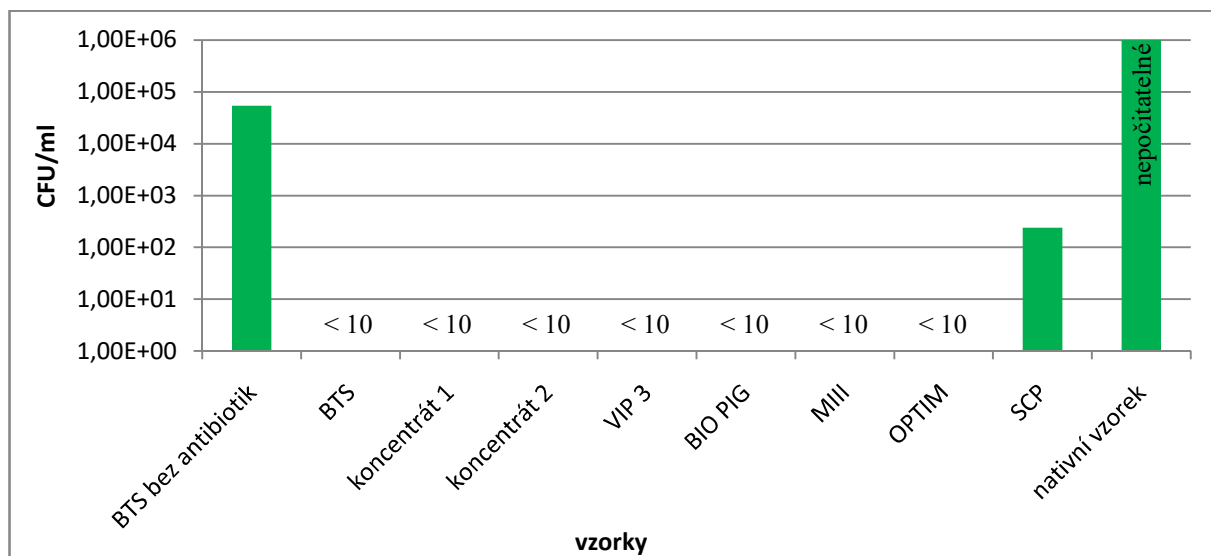
Třetí den (viz graf 3) docházelo k úplné inhibici bakterií působením ředidel BIO PIG, M III a OPTIM. Po působení ostatních ředidel byl počet kolonií řádově  $10^2$  CFU/ml.

Sedmý den (viz graf 4) došlo k úplné inhibici bakterií u vzorků ředěných BTS s antibiotiky, koncentrátem 1 a 2, VIP 3, BIO PIG, M III a OPTIM. I přesto že tyto ředidla jsou pro krátkodobé uchovávání, působila lépe než jediné ředidlo pro dlouhodobé uchovávání SCP, u kterého docházelo k nárůstu bakterií v řádech  $10^2$  CFU/ml.

**Graf 3: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 2 - 3. den**



**Graf 4: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 2 - 7. den**



### 3.1.3 Vzorky kančího spermatu č. 3

U nativního vzorku kančího spermatu č. 3 docházelo opět ke vzrůstu celkového počtu bakterií v časovém intervalu. První den obsahoval nativní vzorek  $7,6 \cdot 10^3$  CFU/ml a bylo v něm prokázáno velké množství druhu *Staphylococcus simulans*. Třetí a sedmý den byl počet kolonií v nativním vzorku již nepočítatelný tvořený směsí druhů *E. coli* a *Proteus sp.*

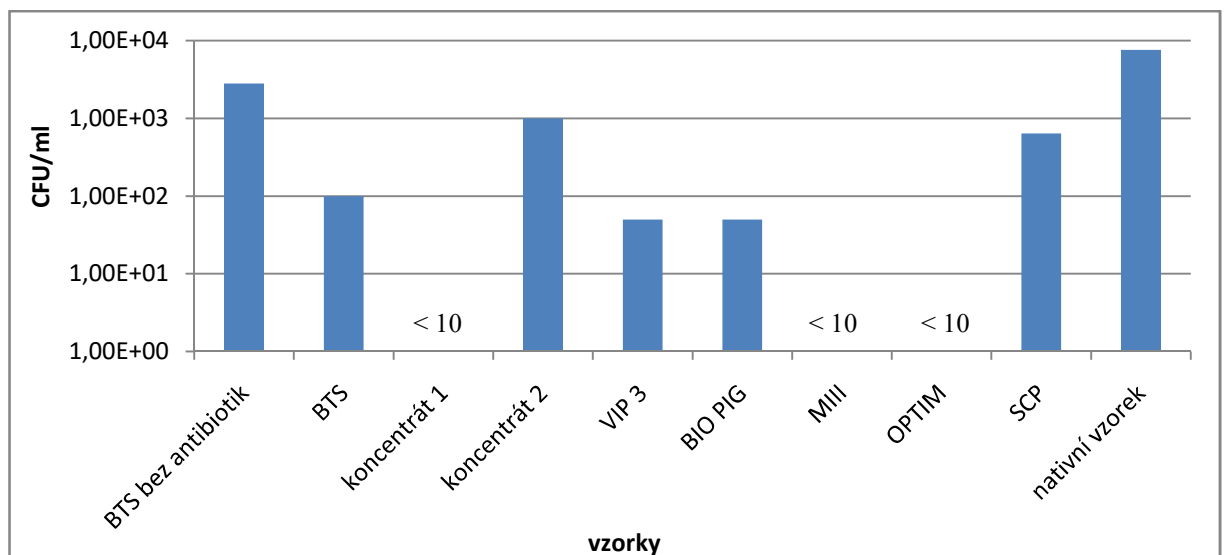
Ředidlo BTS bez antibiotik podporuje růst bakterií. Vzorky ředěné tímto ředidlem obsahovaly kolem  $10^3$  až  $10^4$  CFU/ml.

První den testování (viz graf 5) došlo k úplné inhibici bakterií kančího spermatu pouze u vzorků ředěných koncentrátem 1, M III a OPTIM. Naopak špatnou inhibiční schopnost bylo možné pozorovat u ředidla SCP ( $6,4 \cdot 10^2$  CFU/ml) a koncentrátu 2 ( $1 \cdot 10^2$  CFU/ml). Rozdílné působení koncentrátu 1 a 2 bylo tedy dáno jejich odlišnou navázkou. Působení zbylých ředidel (BTS, VIP 3 a BIO PIG) snížilo počet bakterií pod  $10^2$  CFU/ml.

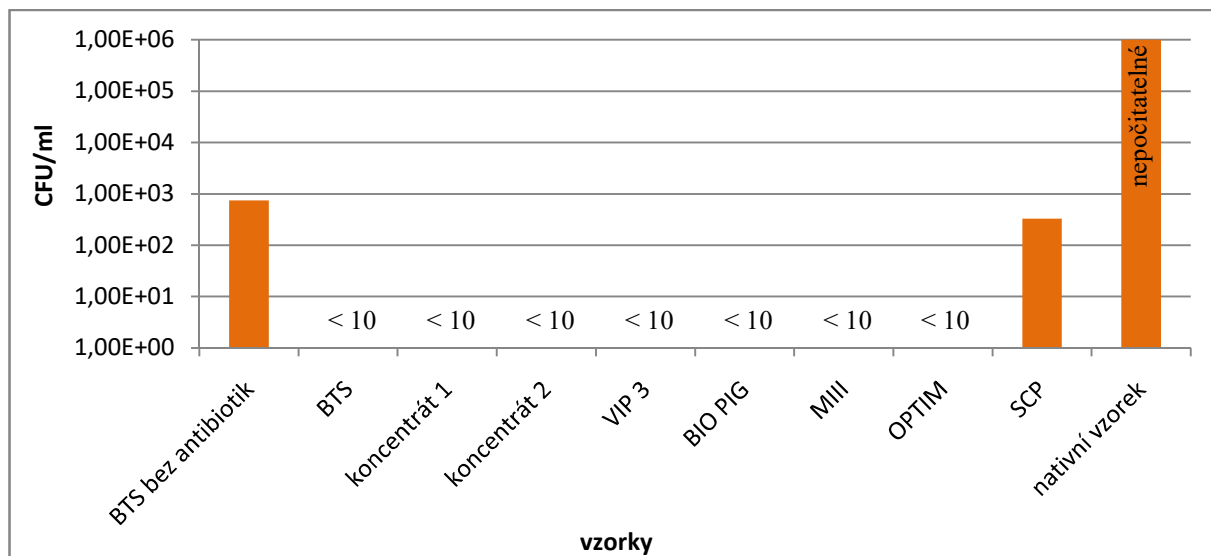
Třetí den (viz graf 6) byla již většina ředidel s výjimkou působení SCP ( $10^2$  CFU/ml) úspěšná v úplné inhibici bakterií obsažených v kančím spermatu.

Sedmý den testování (viz graf 7) docházelo opět k horší inhibici bakterií kančího spermatu působením SCP ale také u koncentrátu 1, kdy vzorky obsahovaly  $5 \cdot 10^1$  CFU/ml. Ostatní ředící látky způsobovaly úplnou inhibici bakterií.

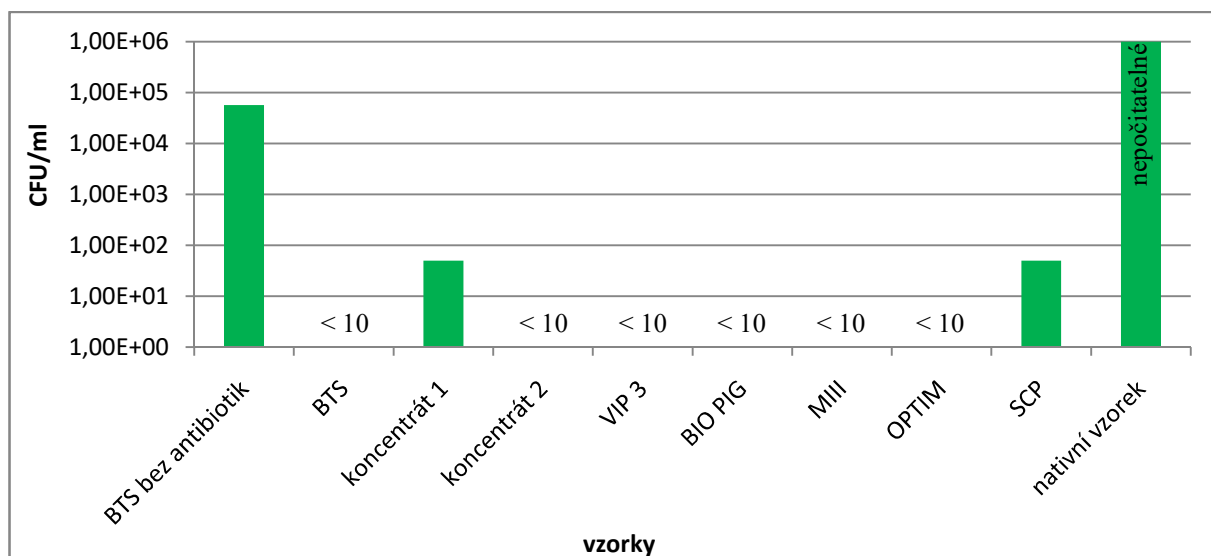
Graf 5: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 3 - 1. den



**Graf 6: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 3 - 3. den**



**Graf 7: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 3 - 7. den**



### 3.2 Testování účinnosti ředidel pro krátkodobé uchování

Jako krátkodobá ředidla byla testována ředidla **BTS bez antibiotik**, **BTS**, **VIP 3**, **BIO PIG**, **M III** a **OPTIM**. Působení těchto ředidel (viz tabulka 5) bylo testováno na 6 sadách vzorků kančího spermatu (vzorky č. 4 – 9). Všechny ředící látky byly opět přidávány v poměru 1 : 4. Testování těchto krátkodobých ředidel probíhalo první a třetí den.

Tabulka 5: Ředění vzorků kančího spermatu č. 4 - 9

Číslo vzorku	Obsah vzorku	Poměr (sperma:ředidlo)
1	nativní vzorek	---
2	BTS bez antibiotik	1:4
3	BTS	1:4
4	VIP 3	1:4
5	BIO PIG	1:4
6	M III	1:4
7	OPTIM	1:4

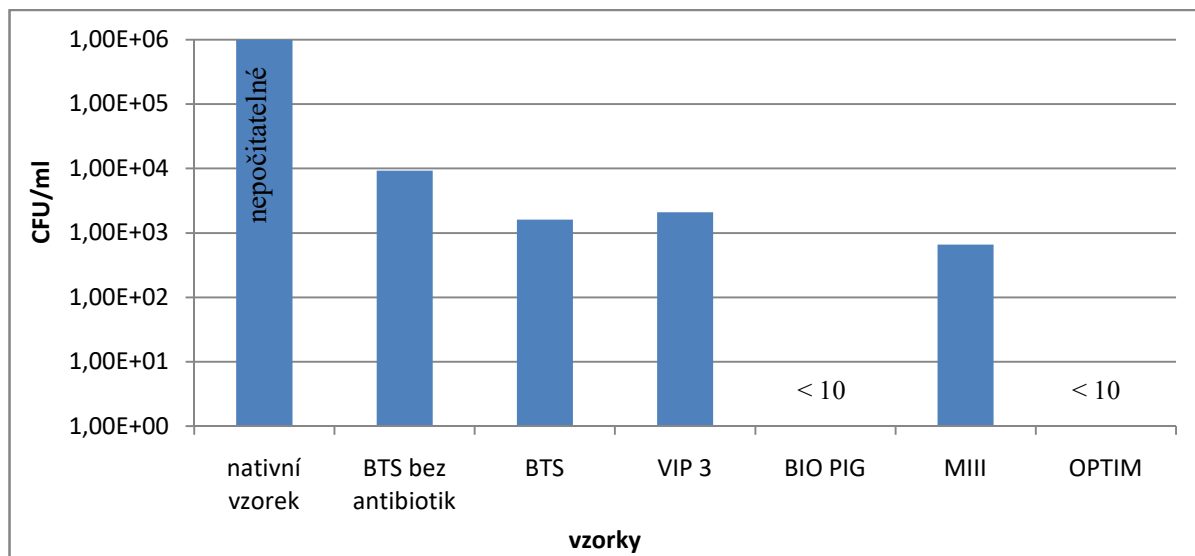
#### 3.2.1 Vzorky kančího spermatu č. 4

Vzorek nativního kančího spermatu č. 4 obsahoval oba dny testování nepočítatelné množství bakterií s převahou druhu *E. coli*. První den testování byly v nativním vzorku prokázány korynebakterie. Ředidlo BTS bez antibiotik podporovalo růst bakterií a vzorky obsahovaly oba dny testování více než  $10^3$  CFU/ml.

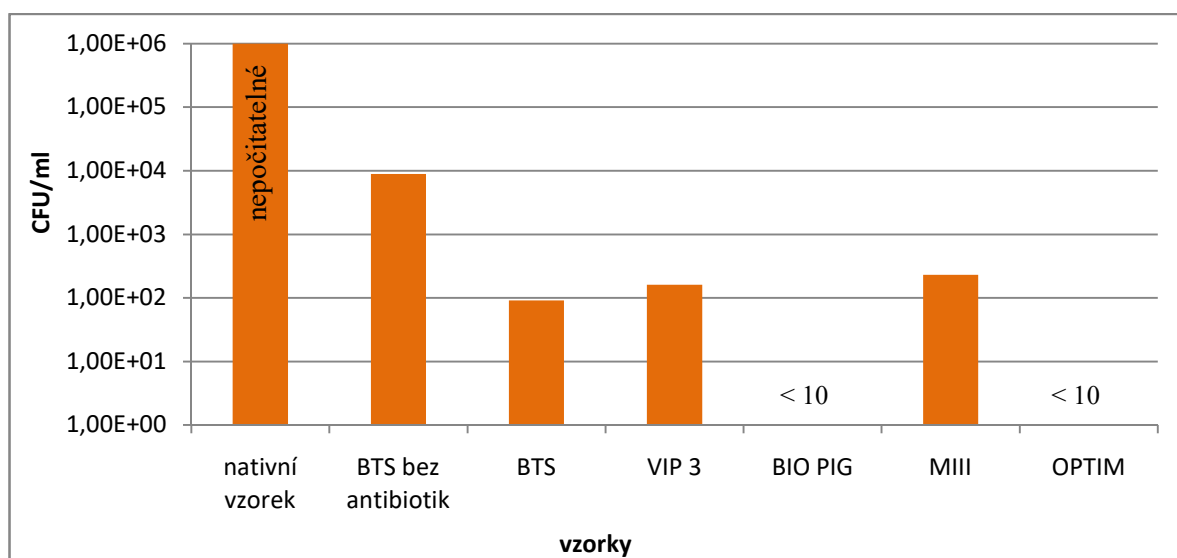
První den testování (viz graf 8) došlo k úplné inhibici bakterií kančího spermatu působením ředidel BIO PIG a OPTIM. Vzorky obsahující ředidla BTS s antibiotiky, VIP 3 a M III obsahovaly kolem  $10^3$  CFU/ml. Ve vzorku ředěném ředidlem VIP 3 byl prokázán druh *Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum*.

Třetí den (viz graf 9) bylo možné pozorovat snížení počtu kolonií u ředidel BTS s antibiotiky a VIP 3 o jeden řád, tedy vzorky obsahující tyto ředidla obsahovaly přibližně  $10^2$  CFU/ml.

**Graf 8: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 4 - 1. den**



**Graf 9: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 4 - 3. den**

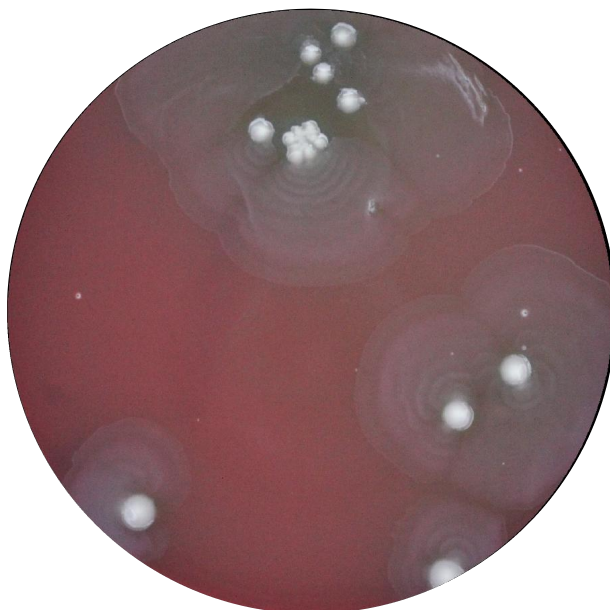


### 3.2.2 Vzorky kančího spermatu č. 5

Nativní vzorek kančího spermatu č. 5 první den testování obsahoval  $10^4$  CFU/ml a třetí den byl obsah kolonií již nepočítatelný. V nativním vzorku převažovaly druhy *E. coli* a *Proteus vulgaris*, které potlačovaly růst ostatních druhů bakterií hlavně třetí den od odběru. První den testování obsahoval nativní vzorek mimo jiné i enterokoky. Ředidlo BTS bez antibiotik podporuje růst bakterií a oba dny testování vzorky obsahovaly hodnoty CFU/ml blízké nativnímu vzorku.

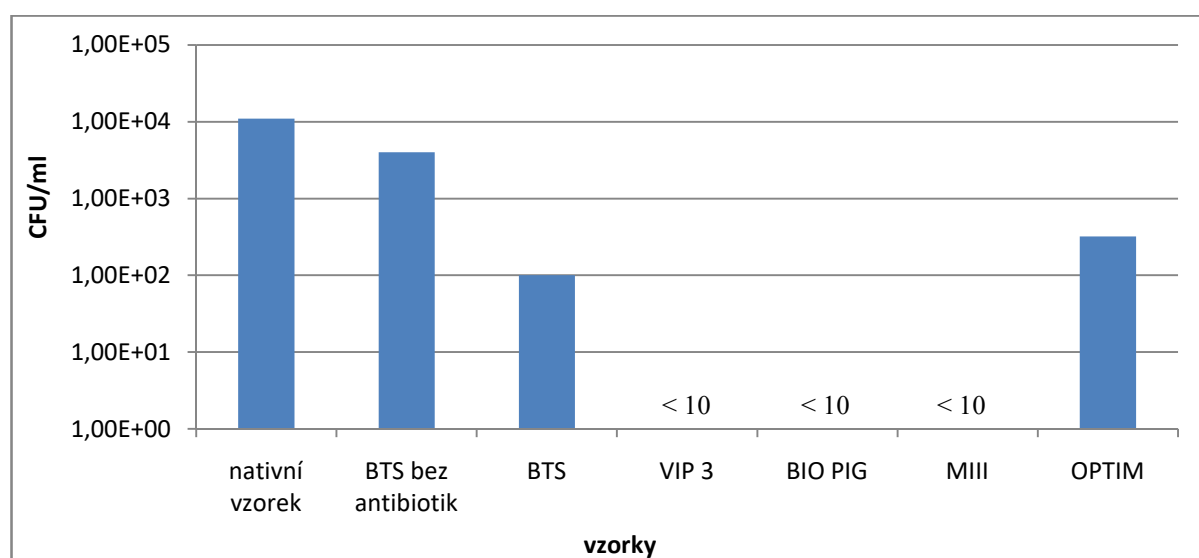
První den (viz graf 10) docházelo k naprosté inhibici bakterií působením ředících látek VIP 3, BIO PIG a M III. Ředidla BTS s antibiotiky a OPTIM snížila počet bakterií na hodnotu řádově  $10^2$  CFU/ml.

Třetí den (viz graf 11) došlo ke zřetelnému zlepšení působení ředidel BTS s antibiotiky a OPTIM, kdy byla pozorována úplná inhibice bakterií. Naopak k bakteriálnímu nárůstu došlo u vzorku ředěného VIP 3 na  $1 \cdot 10^3$  CFU/ml. Bylo prokázáno, že ředidlo VIP 3 nepůsobilo inhibičně na bakterii *Proteus vulgaris* (viz obr. 9).

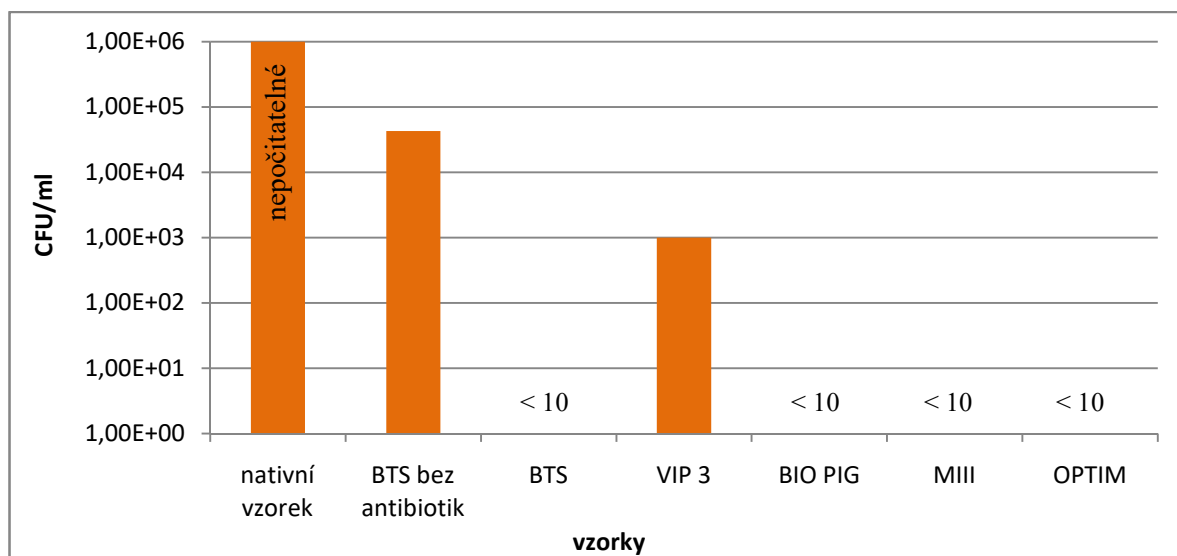


Obrázek 9: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 5 ředěného ředidlem VIP 3 (3. den; KA, 48 h, 37 °C)

Graf 10: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 5 - 1. den



**Graf 11: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 5 - 3. den**

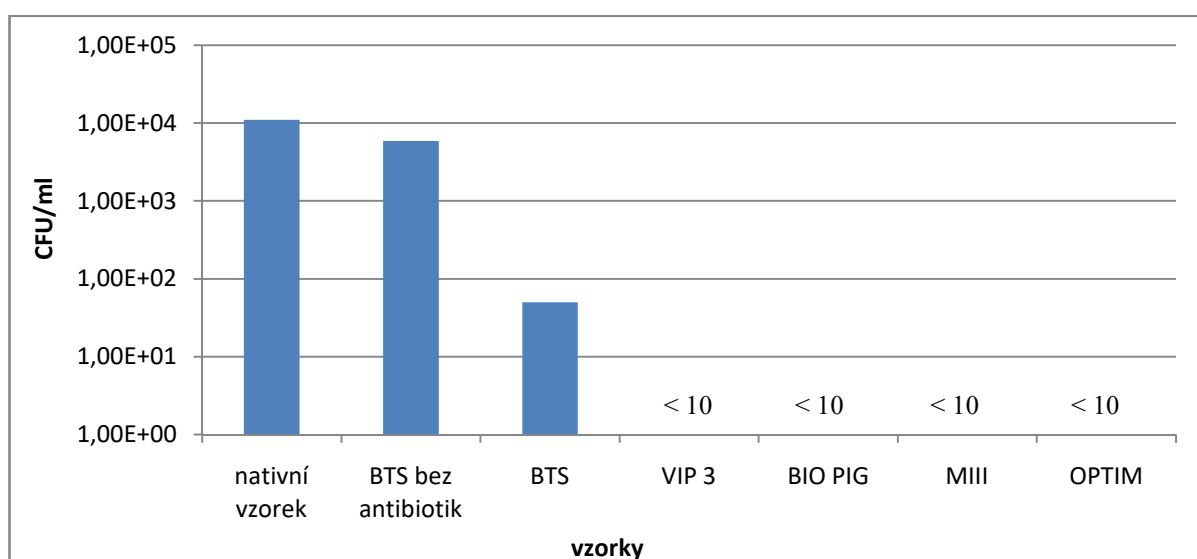


### 3.2.3 Vzorky kančího spermatu č. 6

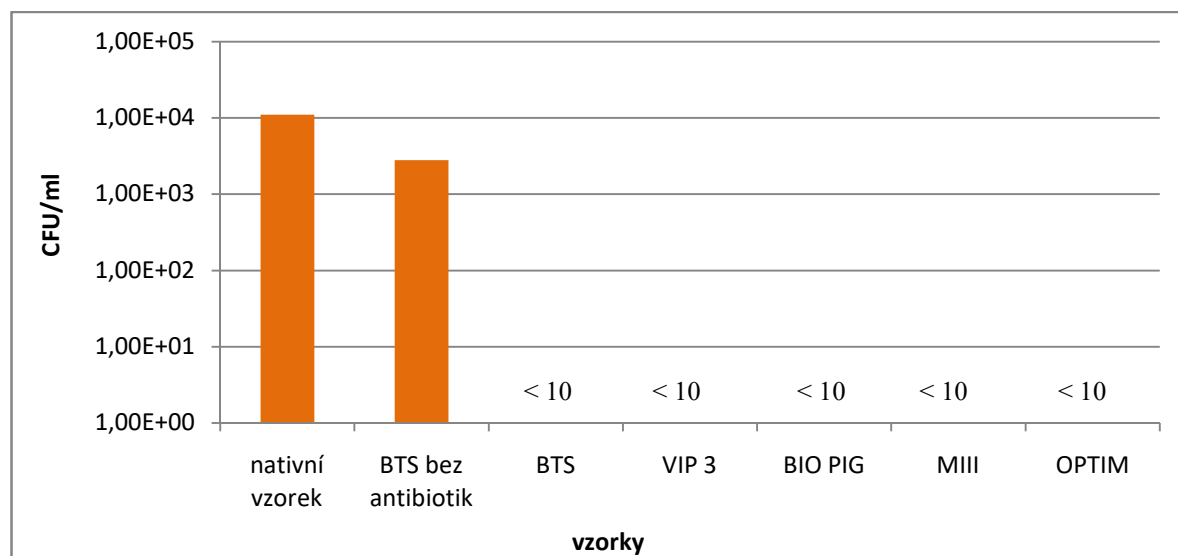
Nativní vzorek kančího spermatu č. 6 obsahoval oba dny testování celkový počet bakterií  $10^4$  CFU/ml. Vzorky ředěné BTS bez antibiotik obsahovaly oba dva dny testování více než  $10^3$  CFU/ml.

První den testování (viz graf 12) ředidla VIP 3, BIO PIG, M III a OPTIM zcela inhibovala bakterie kančího spermatu. BTS s obsahem antibiotik snížilo celkový počet bakterií na hodnotu nižší než  $10^2$  CFU/ml bakterií. Třetí den (viz graf 13) způsobovalo toto ředidlo již úplnou inhibici bakterií.

**Graf 12: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 6 - 1. den**



**Graf 13: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 6 - 3. den**

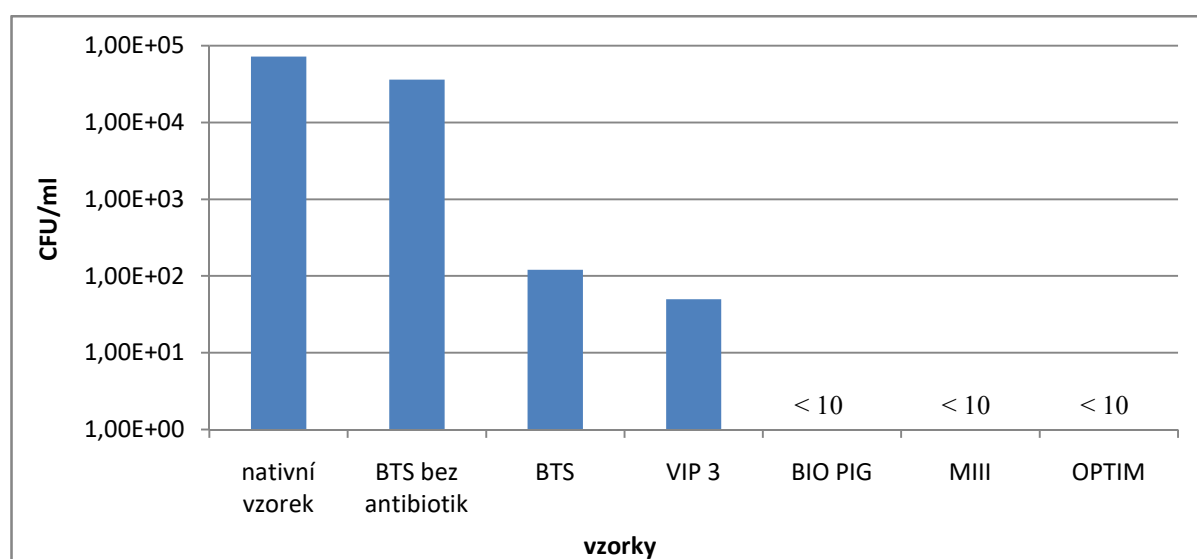


### 3.2.4 Vzorky kančího spermatu č. 7

Nativní vzorek kančího spermatu č. 7 obsahoval první den testování  $10^4$  CFU/ml, ale třetí den obsahoval již nepočitatelné množství bakterií. Vzorky ředěné BTS bez antibiotik obsahovaly také kolem  $10^4$  CFU/ml.

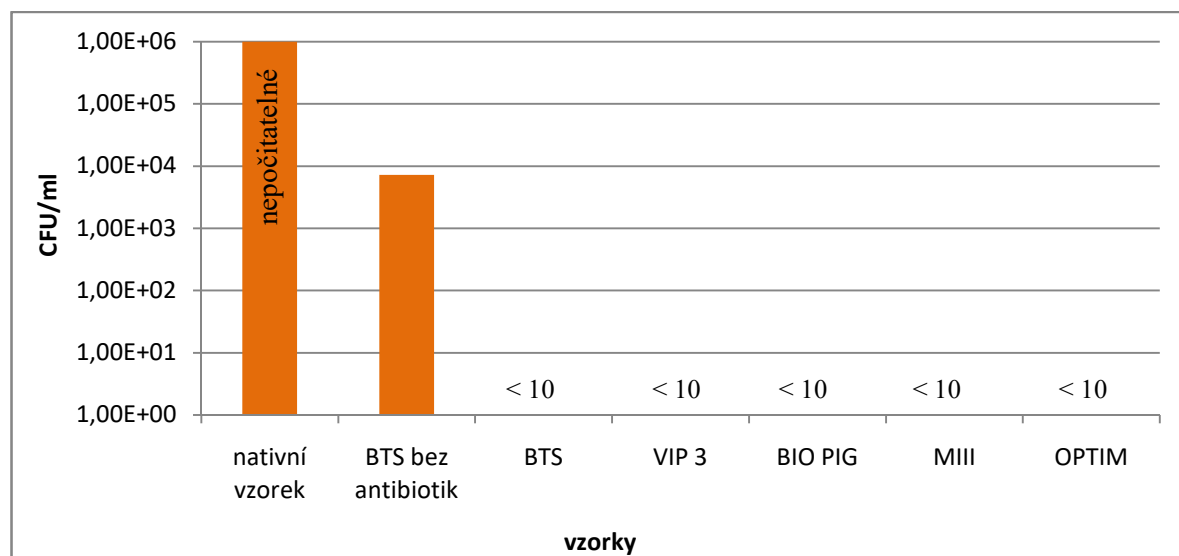
První den (viz graf 14) nejlépe inhibičně působila ředidla BIO PIG, M III a OPTIM, která způsobovala úplnou inhibici bakterií. Ředidla BTS s antibiotiky a VIP 3 snížila počet bakterií na  $10^2$  CFU/ml. Ve vzorku s ředidlem VIP 3 byly první den působení prokázány druhy *Staphylococcus cohnii subsp. cohnii* a *Kocuria kristinae*. Tyto druhy byly však po 48 hodinové inkubaci již zcela inhibovány. Třetí den (viz graf 15) působila inhibičně i ředidla BTS s antibiotiky a VIP 3.

**Graf 14: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 7 - 1. den**





**Graf 15: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 7 - 3. den**



### 3.2.5 Vzorky kančího spermatu č. 8

Nativní vzorek kančího spermatu č. 8 obsahoval první den  $10^4$  CFU/ml. Vedle bakterií *E. coli* a *Proteus sp.* obsahoval nativní vzorek kančího spermatu například i druh *Staphylococcus sciuri*. Třetí den již obsahoval nepočítatelné množství bakterií.

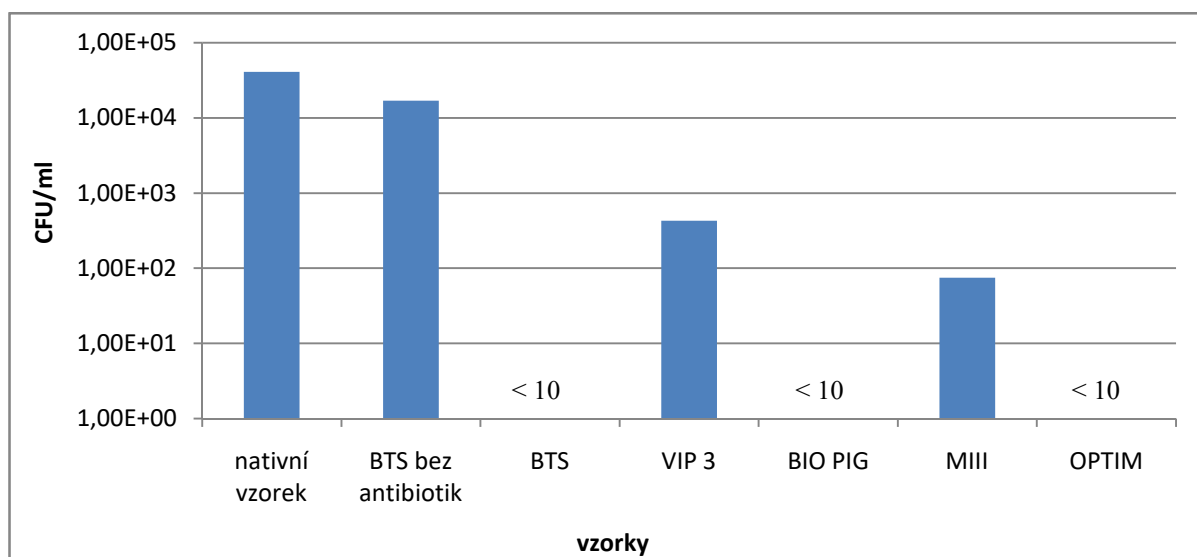
První den (viz graf 16) nejlépe inhibičně působila ředidla BTS s antibiotiky, BIO PIG a OPTIM, kdy došlo k úplné inhibici bakterií kančího spermatu. Naopak ke špatné inhibici docházelo u ředidel VIP 3 a M III, kdy vzorky obsahovaly kolem  $10^2$  CFU/ml. Ve vzorku obsahující ředidlo VIP 3 nedocházelo k inhibici bakterie *Proteus mirabilis* (viz obr. 10).

Třetí den testování (viz graf 17) úplnou inhibici způsobovala pouze ředidla M III a OPTIM. Dobře působilo i ředidlo BTS s antibiotiky, kde docházelo k bakteriálnímu nárůstu  $10^1$  CFU/ml. Tento den docházelo k částečné inhibici bakterií u vzorků obsahující ředidla VIP 3 ( $2 \cdot 10^2$  CFU/ml) a BIO PIG ( $5 \cdot 10^1$  CFU/ml).

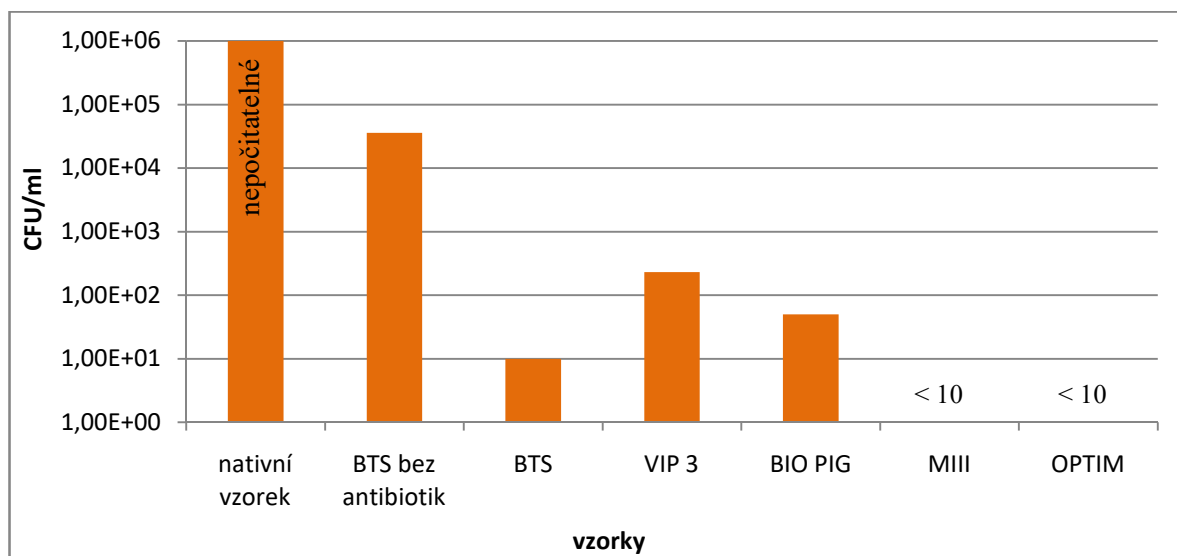


Obrázek 10: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 8 s ředidlem VIP 3 - 1. den (KA, 48 h, 37 °C)

Graf 16: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 8 - 1. den



Graf 17: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 8 - 3. den

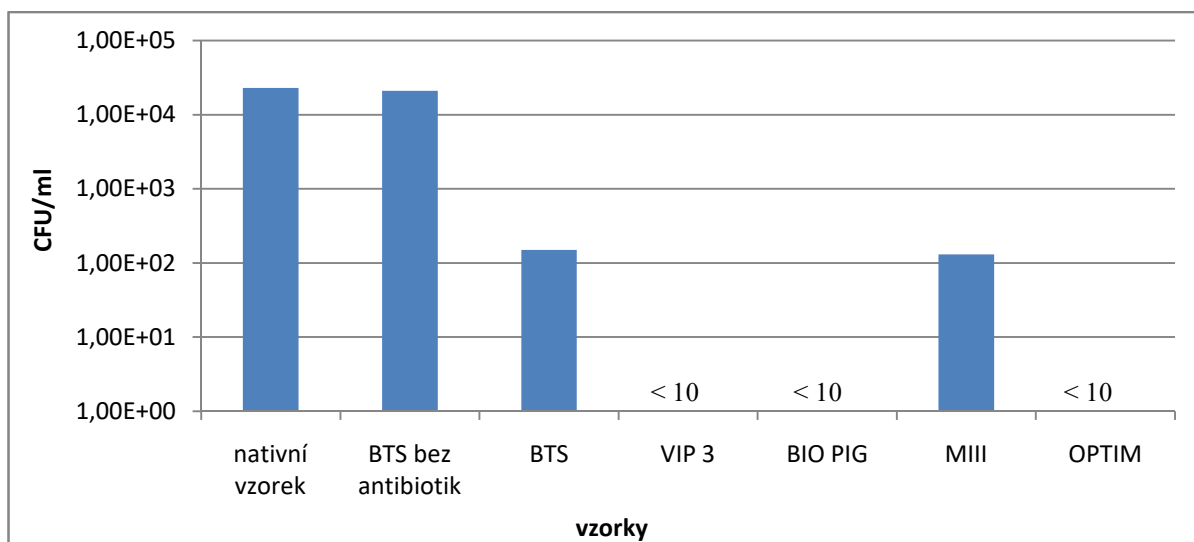


### 3.2.6 Vzorky kančího spermatu č. 9

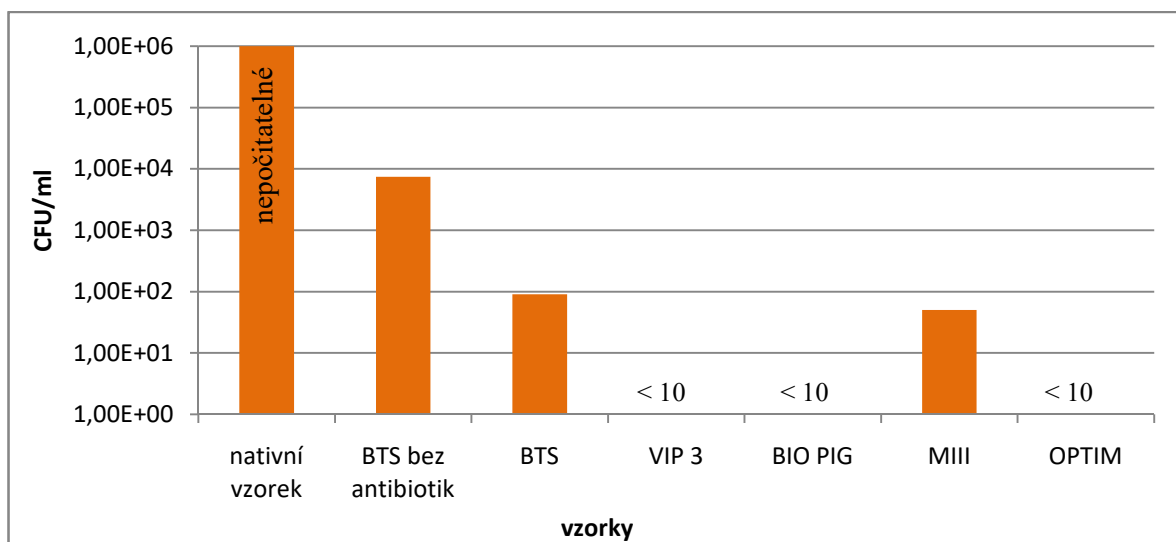
Nativní vzorek obsahoval první den testování více než  $10^4$  CFU/ml. V nativním vzorku kančího spermatu byly první den nalezeny bakterie *Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum* a *Streptococcus equi subsp. zooepidermicus*. Třetí den obsahoval nativní vzorek nepočítatelné množství bakterií s převahou druhu *E. coli*. Vzorek ředěný BTS bez antibiotik obsahoval kolem  $10^4$  CFU/ml oba dny testování.

Oba dny testování (viz graf 18 a 19) došlo k úplné inhibici bakterií u vzorků obsahující ředidla VIP 3, BIO PIG a OPTIM. Naopak k inhibici nedocházelo u vzorků obsahující ředidla BTS s antibiotiky a M III. První den testování byly zjištěny počty bakterií  $10^2$  CFU/ml u ředidel BTS s antibiotiky a M III. Třetí den testování byly u těchto ředidel zjištěny počty bakterií vyšší než  $5 \cdot 10^1$  CFU/ml.

Graf 18: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 9 - 1. den



Graf 19: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 9 - 3. den



### 3.2.7 Shrnutí účinnosti testovaných ředidel pro krátkodobé uchovávání

Účinnost ředidel pro krátkodobé uchovávání (BIO PIG, OPTIM, M III, VIP 3 a BTS s antibiotiky) byla testována celkem na 9 sadách vzorků kančího spermatu (vzorky č. 1 – 9). Nativní vzorky kančího spermatu obsahovaly celkový počet bakterií od  $10^4$  CFU/ml do nepočítatelného množství. V nativních vzorcích byly nalézány převážně tyto druhy bakterií: *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus sciuri*, *Kocuria kristinae* a *Streptococcus equi subsp. zooepidermicus*.

U všech testovaných vzorků došlo třetí den k úplné inhibici bakterií v kančím spermatu při působení ředidel BIO PIG a OPTIM a převážně tomu tak bylo i první den testování. Pouze u vzorku kančího spermatu č. 1 třetí den testování došlo působením ředidla OPTIM ke snížení celkového počtu bakterií na  $10^2$  CFU/ml. U vzorku kančího spermatu č. 8 došlo třetí den působením ředidla BIO PIG ke snížení celkového počtu bakterií na  $10^1$  CFU/ml.

U šesti kanců bylo pozorováno dobré inhibiční působení ředidla M III. První den došlo k úplné inhibici působením tohoto ředidla u vzorků kančího spermatu č. 3, 5, 6 a 7. U vzorků kančího spermatu č. 2, 3, 5, 6, 7 a 8 došlo třetí den k úplné inhibici bakterií působením tohoto ředidla.

Výsledek působení ředidla VIP 3 byl v porovnání s ostatními ředidly odlišný. Úplnou inhibici bakterií v kančím spermatu způsobovalo toto ředidlo u vzorků č. 5, 6 a 9 při testování první den a u vzorků č. 3, 6, 7 a 9 při testování třetí den. V ostatních vzorcích ředidlo VIP 3 způsobovalo snížení počtu bakterií na hodnoty od  $10^2$  do  $10^3$  CFU/ml. Bylo prokázáno, že ředidlo VIP 3 nepůsobí inhibičně na tyto druhy bakterií: *Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* a *Kocuria kristinae*.

U některých vzorků bylo pozorováno dobré inhibiční působení ředidla BTS s antibiotiky. Při testování první den ředidlo BTS s antibiotiky způsobilo úplnou inhibici pouze u vzorků kančího spermatu č. 8 a u ostatních vzorků došlo ke snížení počtu bakterií na  $10^2$  CFU/ml. Třetí den byla pozorována úplná inhibice již u vzorků kančího spermatu č. 1, 3, 5, 6 a 7.

Vzorky ředěné BTS bez antibiotik obsahovaly hodnoty celkového počtu bakterií blízké hodnotám zjištěným u vzorků nativního spermatu.

Odlišné působení ředidel ve vzorcích spermatu kanců může být dáno testováním v různém ročním období. Vzorky kančího spermatu č. 1, 2 a 3 byly testovány na jaře (březen/duben) a vzorky č. 4, 5, 6, 7, 8 a 9 byly testovány na podzim (říjen/listopad). Může se zde projevat

sezónní vliv a s tím spojený vliv teploty na rozdílné bakteriální zastoupení v kančím spermatu. Dále může být mikrobiální zastoupení ovlivněno odlišným zdravotním stavem kanců popřípadě rozdílnými podmínkami chovu. Dále může vznikat rozdílná bakteriální zátěž kančího spermatu při nedodržení hygienických podmínek při jeho odběru či zpracování.

Zjištění sezónního vlivu na morfologii spermií kančího spermatu bylo předmětem studie provedené Lipenským a kol. v roce 2010. Bylo prokázáno negativní působení letních měsíců (vyšší tepelný stres) na spermie, které vedlo ke vzniku protoplazmatických kapek.

Při výběru ředidla rozhoduje předpokládaná délka skladování spermatu a to je tedy čas, za který chceme použít naředěné sperma pro umělou inseminaci. Gadea (2003) uvádí, že použití různědobých ředidel nemá vliv na kvalitu či úspěšnost zabřeznutí v případě, že jsou vzorky spermatu použity do tří dnů. Jediný rozdíl je v ceně. Karageorgiou a kol. (2016) ve své studii porovnávali různědobá ředidla kančího spermatu. Jako krátkodobé použili BIO PIG, střednědobé OPTIM-I-A a jako dlouhodobé ředidlo DURAGEN. Dospěli k závěru, že dlouhodobé ředidlo je účinnější pro zachování kvality kančího spermatu uchovávaného po dobu 3 dnů při 17 °C ve srovnání se středně a krátkodobým ředidlem. Ale v případě použití kančího spermatu do dvou dnů od odběru pro inseminaci je vhodnější využít ředidlo OPTIM, protože vede k vyššímu počtu narozených selat. Vliv ředidla na inhibici mikroorganismů nebyl v této studii sledován. Kaeoket a kol. (2010) uvádí, že krátkodobé ředidlo Merc-III (M III) udržuje uspokojivou motilitu spermií po dobu 4 dnů a následně dochází k jejímu poklesu. Vliv na inhibici mikroorganismů kančího spermatu nebyl uveden.

### 3.3 Testování účinnosti vybraných přírodních a chemických látek

Bylo testováno působení těchto chemických látek přidávaných k ředidlu BTS bez antibiotik: **síran zinečnatý**, **thiosíran sodný** a **koloidní zinek ve směsi s vitamínem C**. Z přírodních látek byla testována **kyselina gallová**. Inhibiční účinek těchto přírodních a chemických látek byl testován na dvou sadách vzorků kančího spermatu (vzorky č. 10 a 11). Bylo testováno různé množství těchto látek v ředidle BTS bez antibiotik jak je uvedeno v tabulce 6. Kančí sperma bylo ředěno v poměru 1:4.

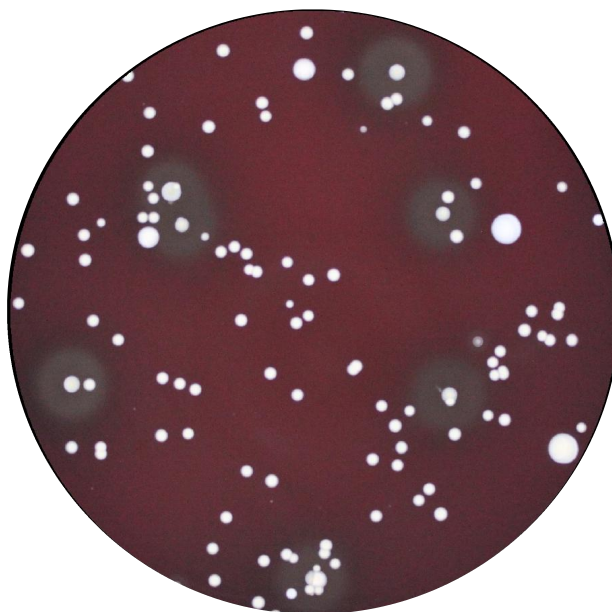
Tabulka 6: Složení vzorků kančího spermatu č. 10 a 11

Číslo vzorku	Obsah vzorku	Množství	Poměr (sperma:ředidlo)
1	nativní vzorek	---	---
2	BTS bez antibiotik	---	1:4
3	BTS + síran zinečnatý a	0,025 g / 30 ml BTS	1:4
4	BTS + síran zinečnatý b	0,03 g / 30 ml BTS	1:4
5	BTS + síran zinečnatý c	0,0375 g / 30 ml BTS	1:4
6	BTS + thiosíran sodný a	0,105 g / 70 ml BTS	1:4
7	BTS + thiosíran sodný b	0,14 g / 70 ml BTS	1:4
8	BTS + thiosíran sodný c	0,175 g / 70 ml BTS	1:4
9	BTS + koloidní zinek + vitamin C	0,1 ml / 10 ml BTS	1:4
10	BTS + koloidní zinek + vitamin C	0,2 ml / 10 ml BTS	1:4
11	BTS + kys. gallová a	0,03 g / 10 ml BTS	1:4
12	BTS + kys. gallová b	0,035 g / 10 ml BTS	1:4
13	BTS + kys. gallová c	0,04 g / 10 ml BTS	1:4

Legenda: U vzorků obsahujících směs koloidního zinku a vitamínu C testované množství 0,1 ml obsahovalo 0,1708 mg síranu zinečnatého heptahydrátu a 2,0138 mg vitamínu C. Testované množství 0,2 ml obsahovalo 0,3416 mg síranu zinečnatého heptahydrátu a 4,0276 mg vitamínu C.

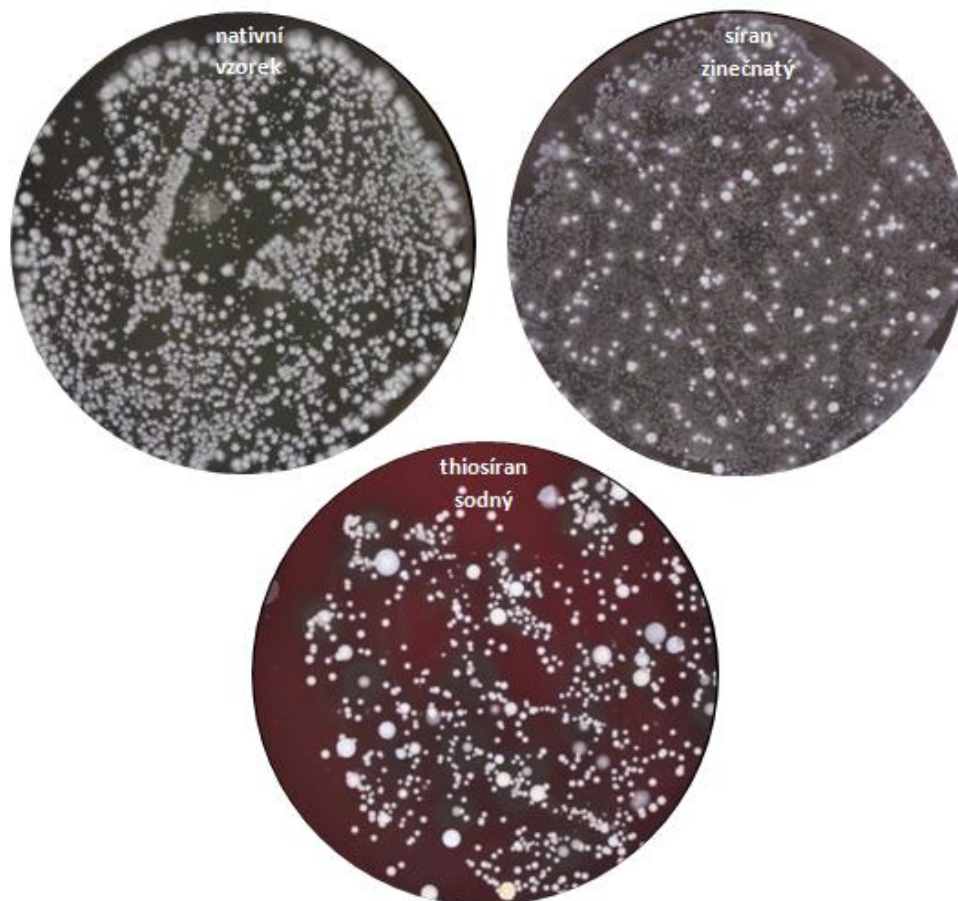
### 3.3.1 Vzorky kančího spermatu č. 10

První den testování (viz graf 20) bylo prokázáno téměř ve všech vzorcích, včetně vzorku nativního,  $10^5$  CFU/ml bakterií. Snížení počtu bakterií o jeden řád v porovnání s nativním vzorkem bylo zaznamenáno pouze u vzorku obsahující kyselinu gallovou s navázkou 0,035g. První den testování byly v nativním vzorku (viz obr. 11) identifikovány druhy *Aerococcus viridans* a *Corynebacterium glucoronolyticus*. Dále vzorky obsahovaly převážně druhy *E. coli* a *Proteus sp.*



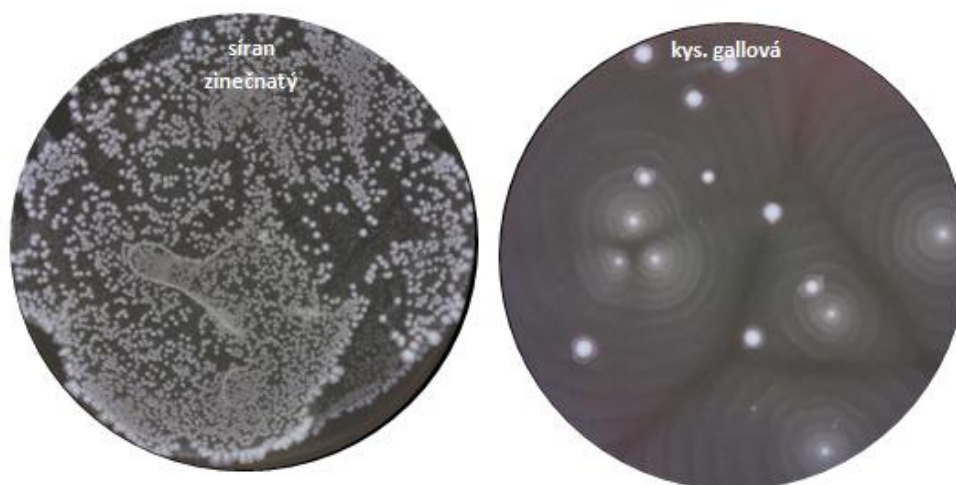
**Obrázek 11: Kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 10 (1. den, 100x ředěný; KA, 48 h, 37 °C)**

Třetí den testování (viz graf 21) nativní vzorek kančího spermatu č. 10 obsahoval nepočítatelné množství bakterií (viz obr. 12). U vzorků obsahujících síran zinečnatý nedocházelo k téměř žádné inhibici bakterií kančího spermatu (viz obr. 12). Další testované látky, což byly thiosíran sodný (viz obr. 12), koloidní zinek ve směsi s vitamínem C a kyselina gallová v porovnání s nativním vzorkem nepatrně snížily počet bakterií na hodnotu kolem  $10^5$  CFU/ml. Výsledný účinek testovaných látek je srovnatelný s výsledkem počtu bakterií zjištěných u vzorku ředěného BTS bez antibiotik. Testované přírodní a chemické látky nesnížily počet bakterií ve vzorcích kančího spermatu v porovnání se vzorky obsahující ředidla s antibiotiky.



**Obrázek 12: Porovnání kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 10 s kultivacemi vzorků s obsahem síranu zinečnatého a thiosíranu sodného – 3. den (KA, 48 h, 37 °C)**

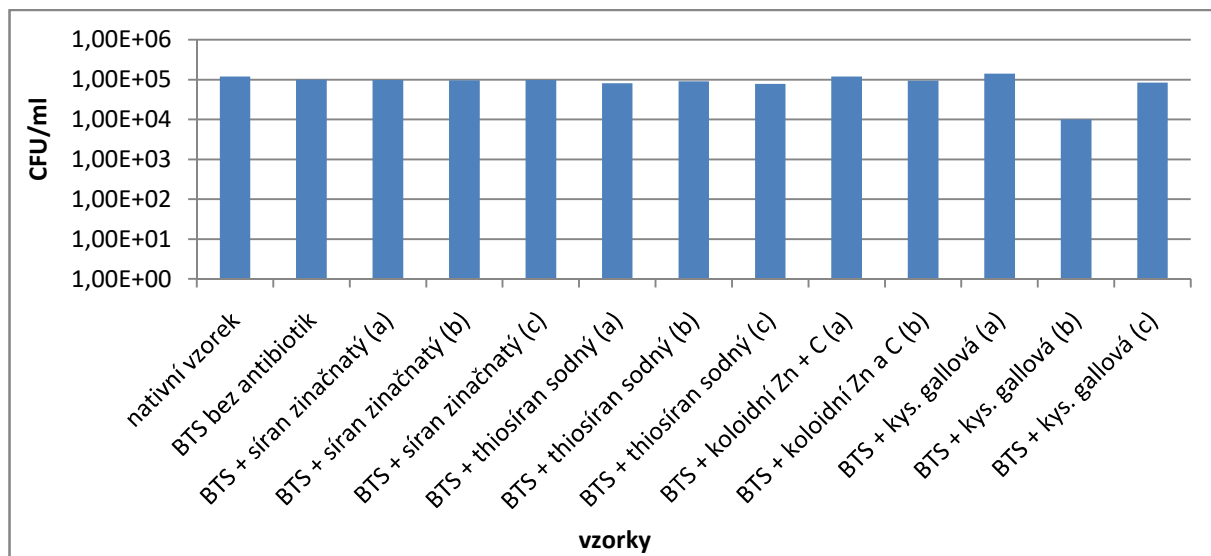
Sedmý den (viz graf 22) bylo možné pozorovat podobné inhibiční působení testovaných látek jako třetí den. Ve vzorcích byly přítomny převážně druhy *E. coli* (viz obr. 13 vlevo), *Proteus vulgaris* (viz obr. 13 vpravo) či *Enterococcus faecalis*.



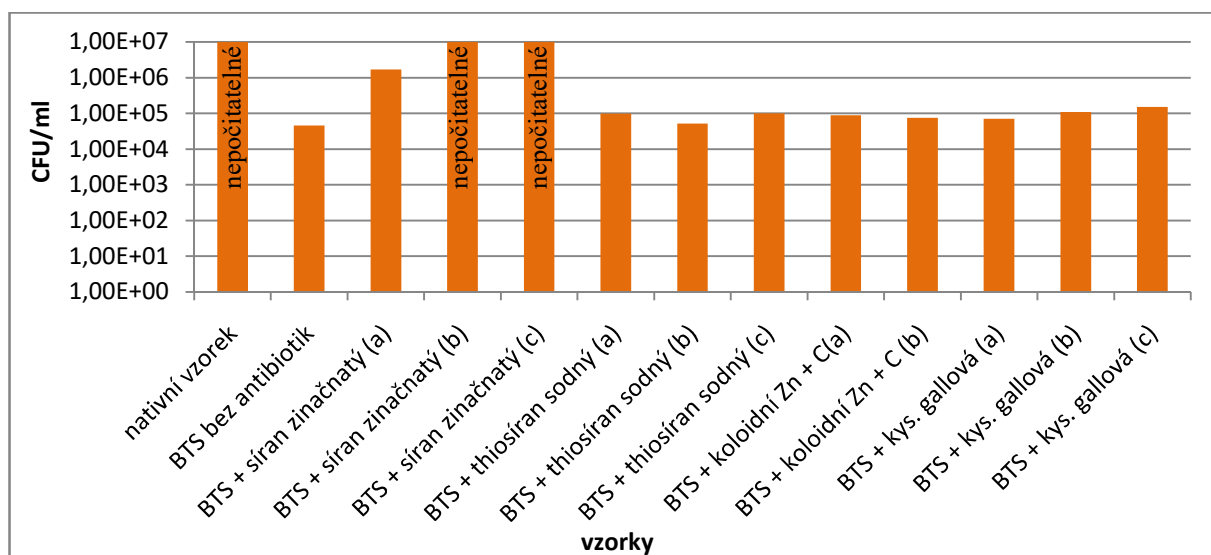
**Obrázek 13: Kultivace vzorků kančího spermatu č. 10 s obsahem síranu zinečnatého a kys. gallové – 7. den (KA, 48 h, 37 °C)**



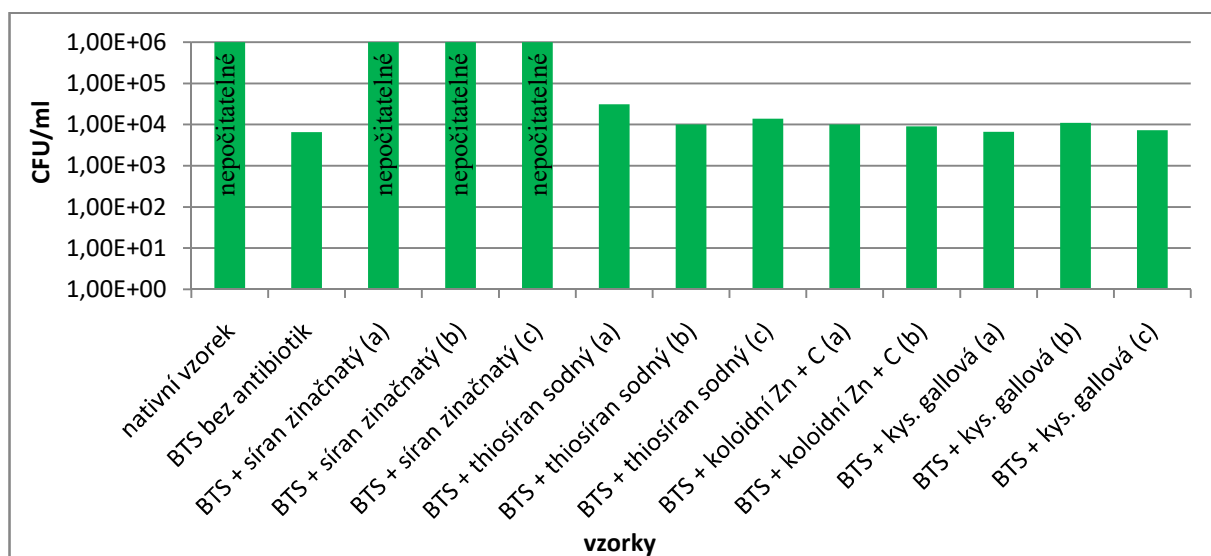
Graf 20: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 10 - 1. den



Graf 21: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 10 - 3. den

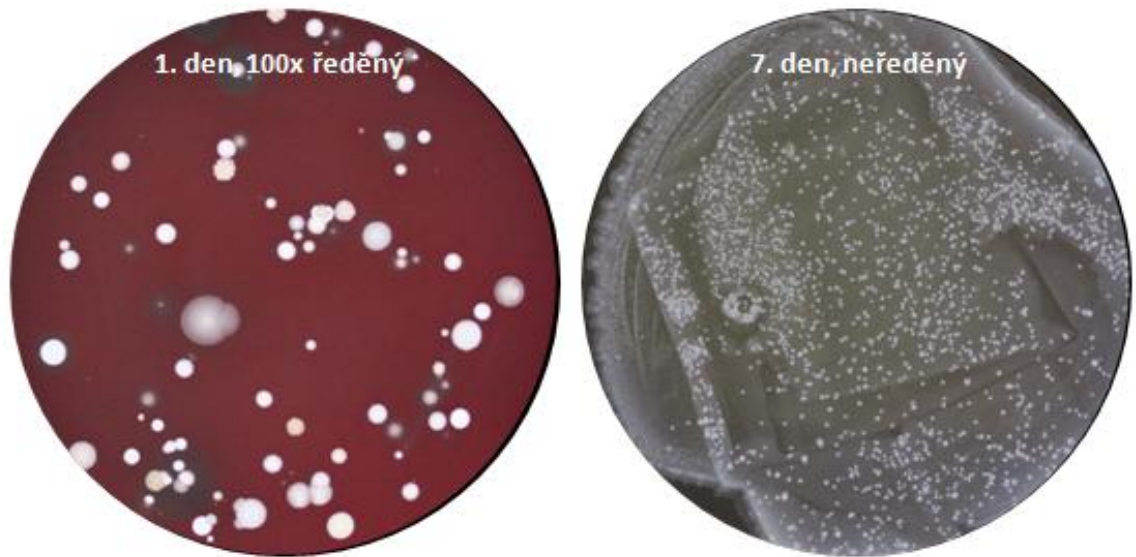


Graf 22: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 10 - 7. den



### 3.3.2 Vzorky kančího spermatu č. 11

Nativní vzorek kančího spermatu č. 11 obsahoval první den téměř  $10^5$  CFU/ml. Třetí a sedmý den obsahoval nativní vzorek již nepočítatelné množství bakterií. V nativním vzorku (viz obr. 14) byla zjištěna přítomnost druhu *E. coli*. Druhy *E. coli* a *Proteus sp* postupem času utlačily růst ostatních druhů bakterií.



Obrázek 14: Kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 11 – 1. a 7. den (KA, 48 h, 37 °C)

První den testování (viz graf 23) nedošlo ke zřetelné inhibici bakterií kančího spermatu způsobené testovanými látkami. Všechny vzorky obsahovaly kolem  $10^5$  CFU/ml bakterií. Ve vzorcích byla prokázána přítomnost druhů *E. coli*, *Proteus sp.*, *Kocuria kristinae*, *Aerococcus viridans* a *Corynebacterium glucoronolyticus*

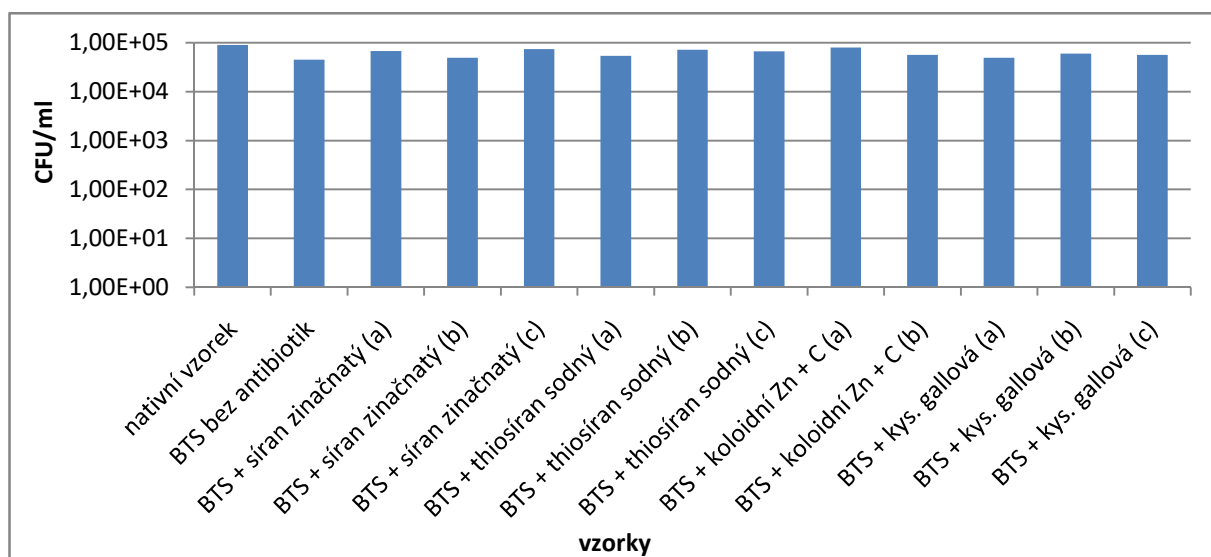
Nepatrnou inhibici bakterií vzorků kančího spermatu bylo možné pozorovat třetí den (viz graf 24). Opět nedocházelo k inhibici bakterií u vzorků obsahující síran zinečnatý, které obsahovaly stejně jako nativní vzorek kančího spermatu nepočítatelné množství bakterií. Ostatní testované látky způsobovaly snížení počtu bakterií na hodnotu kolem  $10^4$  CFU/ml. Jak je zřejmé z grafu 24, tak hodnoty počtu bakterií se různí dle množství testované látky v ředidle BTS bez antibiotik. Ve vzorcích testovaných třetí den bylo prokázáno velké množství bakterie *Klebsiella pneumoniae* (viz obr. 15), ale také byla prokázána přítomnost druhu *Vibrio metschnikovii*.



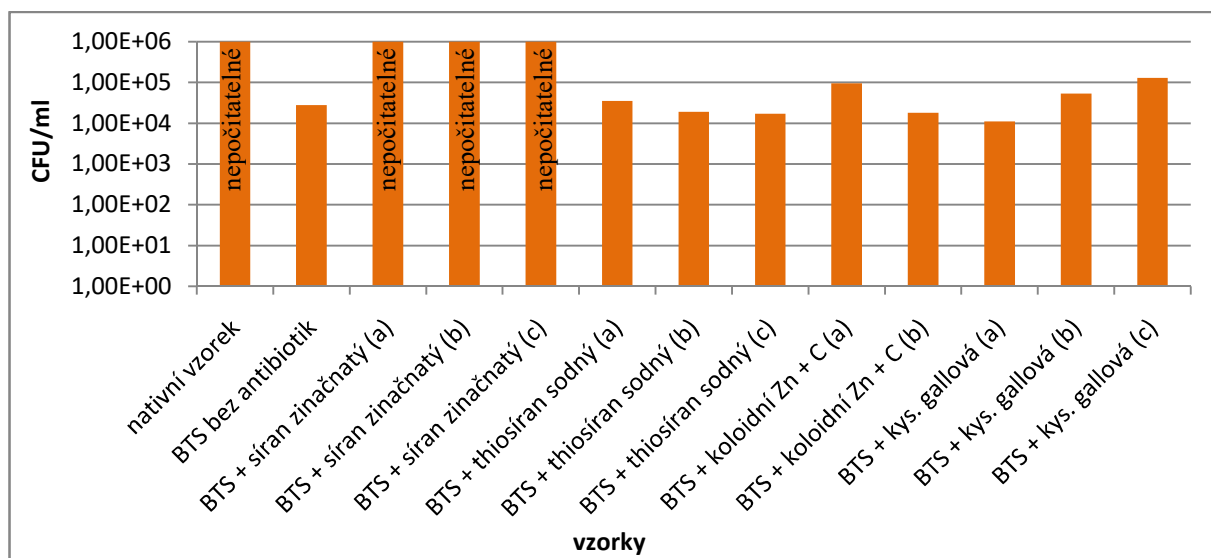
**Obrázek 15: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 11 s obsahem kys. gallové - 3. den, 10x ředěný (KA, 48 h, 37 °C)**

Sedmý den (viz graf 25) u těchto vzorků nedošlo k žádnému inhibičnímu účinku testovaných látek. Všechny vzorky obsahovaly nepočítatelné množství bakterií. Vzorky obsahovaly souvislý bakteriální nárůst po celé ploše krevního agaru na Petriho misce způsobený hlavně druhy *E. coli* a *Proteus vulgaris*.

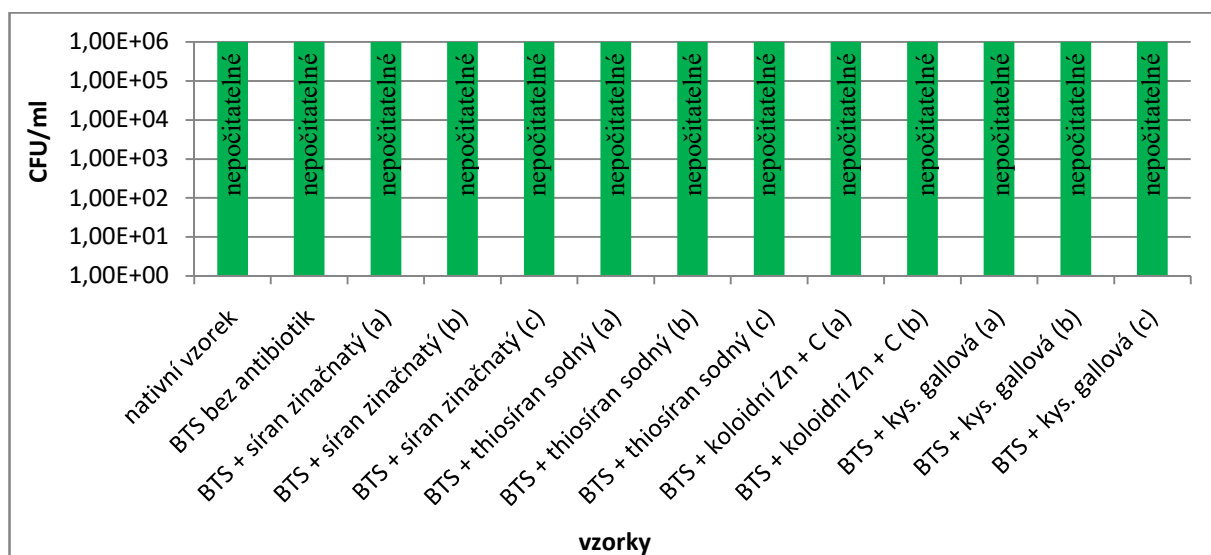
**Graf 23: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 11 - 1. den**



Graf 24: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 11 - 3. den



Graf 25: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 11 - 7. den



Bayan a kol. (2013) uvádí, že kyselina askorbová (vitamin C) výrazně inhibuje růst druhu *Staphylococcus aureus* a také *E. coli*. V této práci byla testována účinnost vitaminu C ve směsi s koloidním zinkem na bakterie kančího spermatu a u většiny vzorků nedošlo k inhibici druhu *E. coli* ani jiných druhů bakterií.

Faiz a kol. (2011) uvádí, že zinek má vynikající baktericidní účinky na střevní patogeny způsobující průjemová onemocnění (*Shigella sp.*, enteropatogenní *E. coli*, *Vibrio cholerae* a *Salmonella sp.*), kdy způsobuje úplnou inhibici jejich růstu (Faiz a kol., 2011). Bylo zjištěno, že k inhibici růstu těchto bakterií je zapotřebí koncentrace síranu zinečnatého mezi 1,2 a 1,8 mg/ml (Surjawidjaja a kol., 2004). Bylo potvrzeno, že při působení síranu

zinečnatého je antibakteriálním činidlem pouze zinek, sulfátová část je neaktivní (Faiz a kol., 2011). Účinnost síranu zinečnatého obsaženého v našich testovaných vzorcích na inhibici bakterií (včetně druhu *E. coli*) kančího spermatu nebyla prokázána žádný den testování. Mohlo to být způsobeno nižšími koncentracemi síranu zinečnatého (0,1718 mg a 0,3416 mg).

U kyseliny gallové byly prokázány antioxidační, antibakteriální i antifungální účinky. Dle studie Mazurové a kol. (2015) je kyselina gallová velmi dobře účinná na kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 300 až 1200 µg/ml). Dále byl prokázán její inhibiční účinek na druhy *E. coli*, *Staphylococcus sp.* a *Enterococcus sp.* (MIC v rozmezí 2400 až 4800 µg/ml). Kyselina gallová velice dobře působí i na methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus cereus* či *Salmonella sp.* Nižší inhibiční účinek byl prokázán při působení kyseliny gallové na *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus acidophilus* s hodnotami MIC kolem 8000 µg/ml (Mazurová a kol., 2015). V této práci byly testované tři koncentrace kyseliny gallové obsažené v ředidle BTS bez antibiotik: 3000 µg/ml, 3500 µg/ml a 4500 µg/ml. Žádná z těchto koncentrací nezpůsobila významné snížení počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu.

Nebyly nalezeny žádné vědecké studie, které by se zabývaly inhibičním působením thiosíranu sodného na bakterie. Zjištěné výsledky tedy nebylo možné porovnat s žádnou dostupnou literaturou.

### 3.4 Testování účinnosti vybraných ředidel pro krátkodobé uchování a účinnosti karvakrolu a thymolu

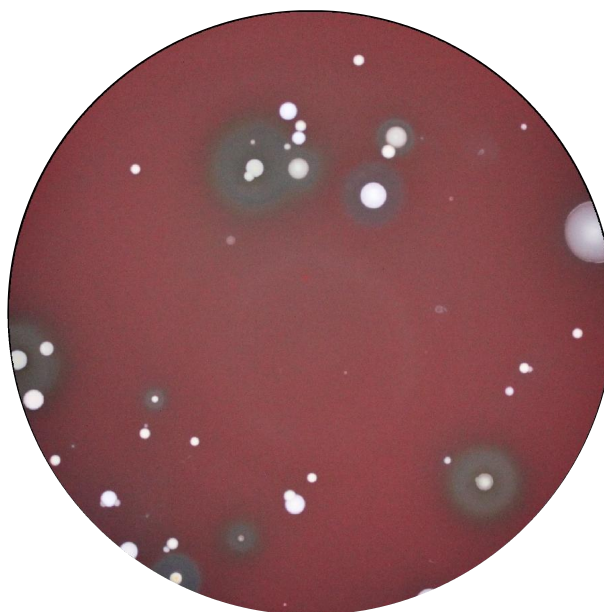
Vzorky kančího spermatu č. 12 a 13 byly naředěny ředidlem VIP 3, BTS bez antibiotik a BTS bez antibiotik doplněným o karvakrol a thymol (viz tabulka 7). Vzorky byly ředěny v poměru 1:4. Vzorek obsahující karvakrol/thymol byl připraven rozpuštěním navážky 0,006 g karvakrolu/thymolu v 200  $\mu$ l 24% etanolu a následným převedením do 40 ml ředidla BTS bez antibiotik.

Tabulka 7: Ředění vzorků kančího spermatu č. 12 a 13

Číslo vzorku	Obsah vzorku	Poměr (sperma:ředidlo)
1	nativní vzorek	---
2	VIP 3	1:4
3	BTS bez antibiotik	1:4
4	BTS bez antibiotik + karvakrol	1:4
5	BTS bez antibiotik + thymol	1:4

#### 3.4.1 Vzorky kančího spermatu č. 12

Nativní vzorek kančího spermatu č. 12 obsahoval první den více než  $10^4$  CFU/ml (viz obr. 16). Třetí a sedmý den obsahoval již nepočítatelné množství kolonií.



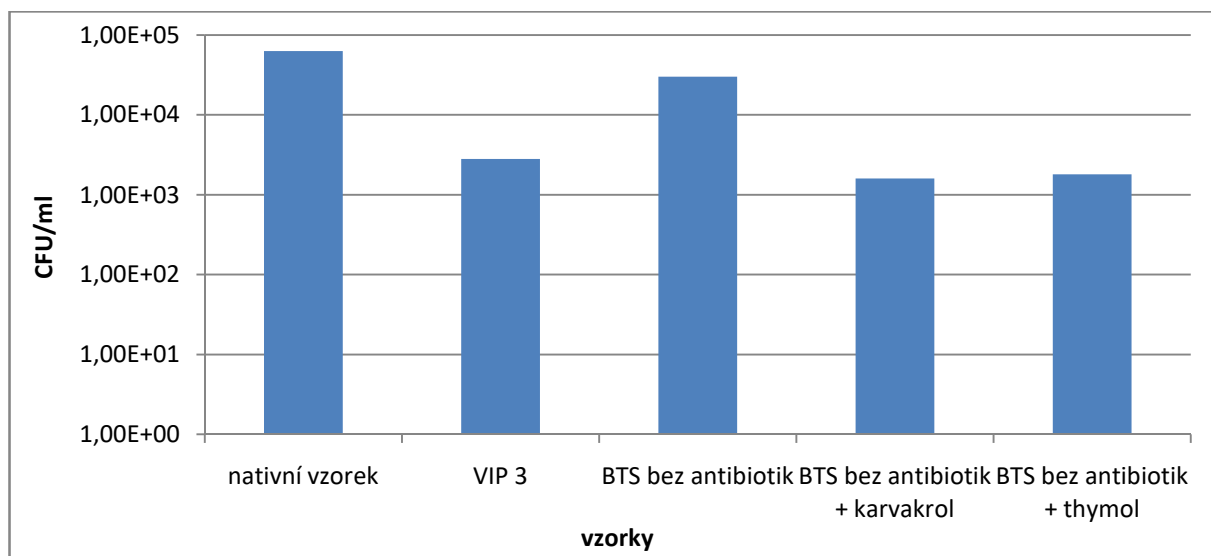
Obrázek 16: Kultivace nativního vzorku kančího spermatu č. 12 - 1. den, 100x ředěný (KA, 48 h, 37 °C)

První den (viz graf 26) bylo zjištěno podobné působení ředidla VIP 3 a ředidla BTS bez antibiotik obsahující karvakrol a thymol. Tyto vzorky obsahovaly řádově  $10^3$  CFU/ml a došlo u nich k mírnému snížení počtu bakterií oproti nativnímu vzorku. Vzorek ředěný ředidlem BTS bez antibiotik obsahoval více než  $10^4$  CFU/ml. Ve vzorku kančího spermatu s ředidlem VIP 3 byla prokázána bakterie *E. coli*. Ve vzorku kančího spermatu ředěném BTS bez antibiotik byla vedle druhů *E. coli*, *Aerococcus viridans* a *Corynebacterium sp.* zjištěna přítomnost i druhu *Globicatella sanguinis*.

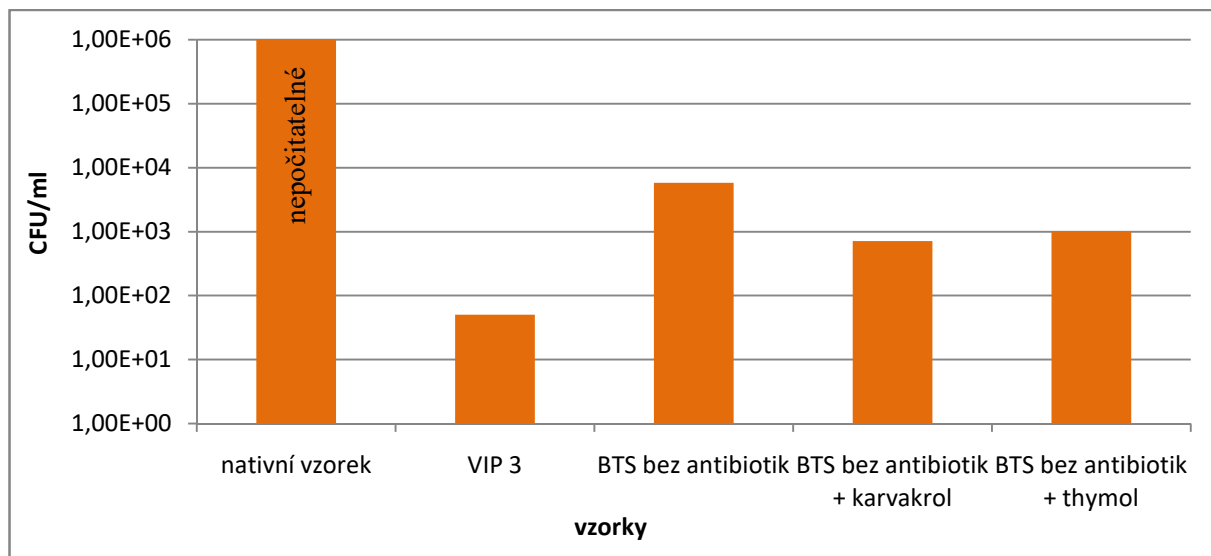
Třetí den testování (viz graf 27) došlo ke snížení počtu bakterií kančího spermatu u vzorku obsahující ředidlo VIP 3 na méně než  $10^2$  CFU/ml. Mírný pokles počtu bakterií byl zaznamenán u vzorku obsahující BTS bez antibiotik, kdy tento vzorek obsahoval méně než  $10^4$  CFU/ml. Inhibiční působení BTS bez antibiotik obsahující thymol a karvakrol se zlepšilo nepatrně. Ve vzorku kančího spermatu obsahující ředidlo VIP 3 byla prokázána bakterie *Klebsiella oxytoca*.

Nejlepší inhibiční účinek karvakrolu a thymolu obsažených v ředidle BTS bez antibiotik bylo zjevné až sedmý den (viz graf 28), kdy byly hodnoty počtu bakterií okolo  $10^2$  CFU/ml. Naopak inhibiční působení ředidla VIP 3 se tento den zhoršilo o jeden řád na téměř  $10^3$  CFU/ml. Počet bakterií ve vzorku obsahující BTS bez antibiotik byl od třetího dne neměnný.

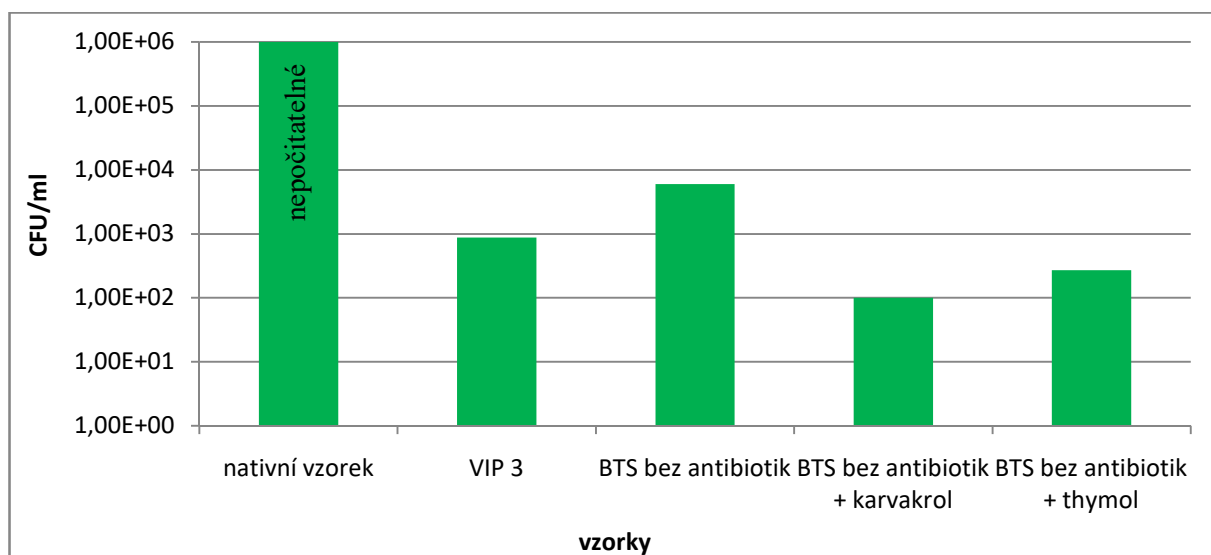
**Graf 26: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 12 - 1. den**



**Graf 27: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 12 - 3. den**



**Graf 28: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 12 - 7. den**



### 3.4.2 Vzorky kančího spermatu č. 13

Nativní vzorek kančího spermatu č. 13 obsahoval první den testování více jak  $10^4$  CFU/ml bakterií. Další dva dny testování byl již obsah bakterií v nativním vzorku nepočítatelný.

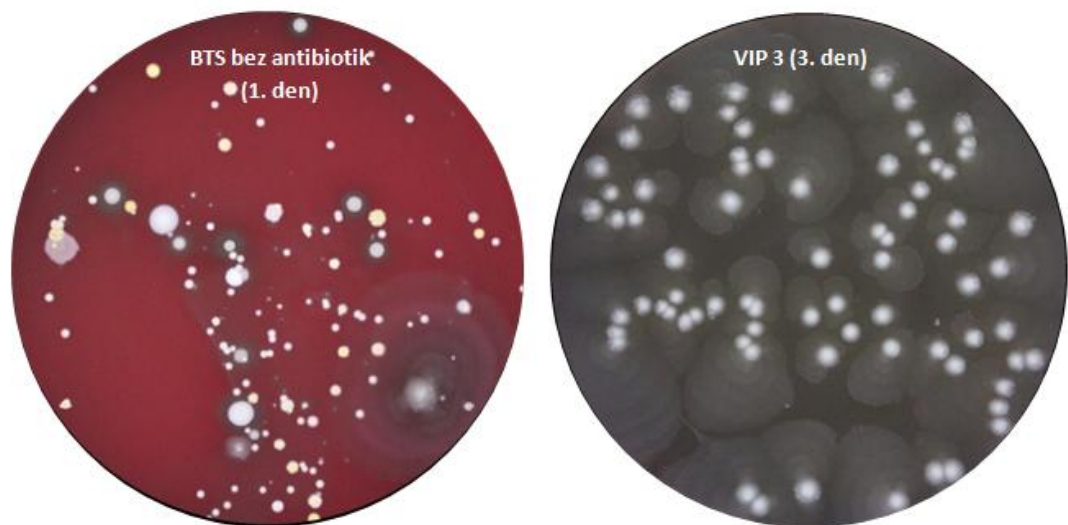
Bylo zjištěno velmi dobré působení ředidla BTS bez antibiotik obsahující thymol a karvakrol a to hlavně třetí a sedmý den (viz graf 30 a 31). V těchto vzorcích byly bakterie zcela inhibovány působením přírodních látek nebo byl jejich počet nižší než  $10^2$  CFU/ml.

Naopak snížené inhibiční účinky byly prokázány u ředidla VIP 3, u kterého docházelo ke zvyšování počtu bakterií v časovém intervalu (viz grafy 29, 30 a 31). První den byl zjištěn



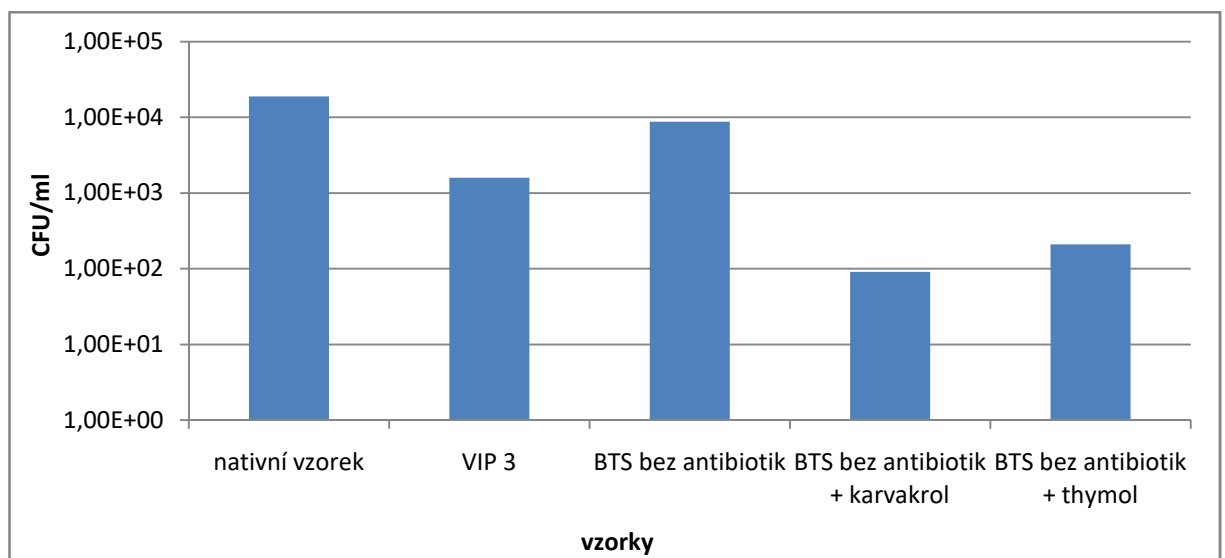
u vzorku s VIP 3 celkový počet bakterií  $3 \cdot 10^3$  CFU/ml, třetí den  $10^5$  CFU/ml a sedmý den byl již počet bakterií ve vzorku nepočitatelný. Ve vzorcích ředěných ředidlem VIP 3 (viz obr. 17 vpravo) byly prokázány druhy *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* a *Bacillus sp.*

Ve vzorcích ředěných BTS bez antibiotik byl celkový počet bakterií první den  $10^3$  CFU/ml, třetí den  $10^4$  CFU/ml a sedmý den bylo již množství bakterií v tomto vzorku nepočitatelné. Ve vzorcích ředěných ředidlem BTS bez antibiotik (viz obr. 17 vlevo) byly prokázány druhy *Proteus vulgaris*, *Aerococcus viridans*, *Klebsiella oxytoca* a *Corynebacterium sp.*

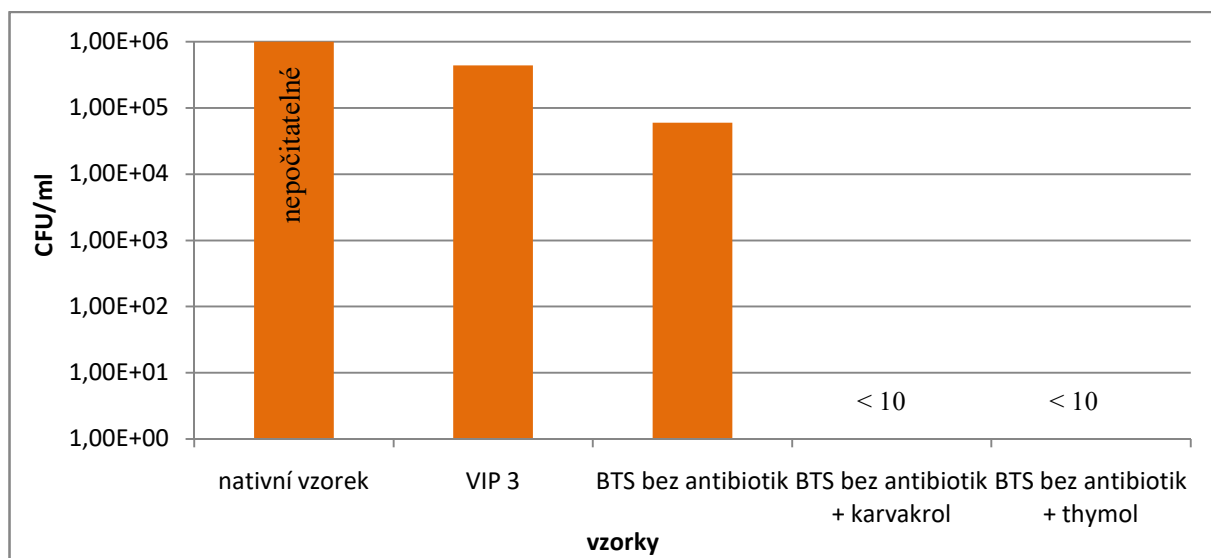


Obrázek 17: Kultivace vzorků kančího spermatu č. 13 ředěných BTS bez antibiotik a VIP 3 (KA, 48 h, 37 °C)

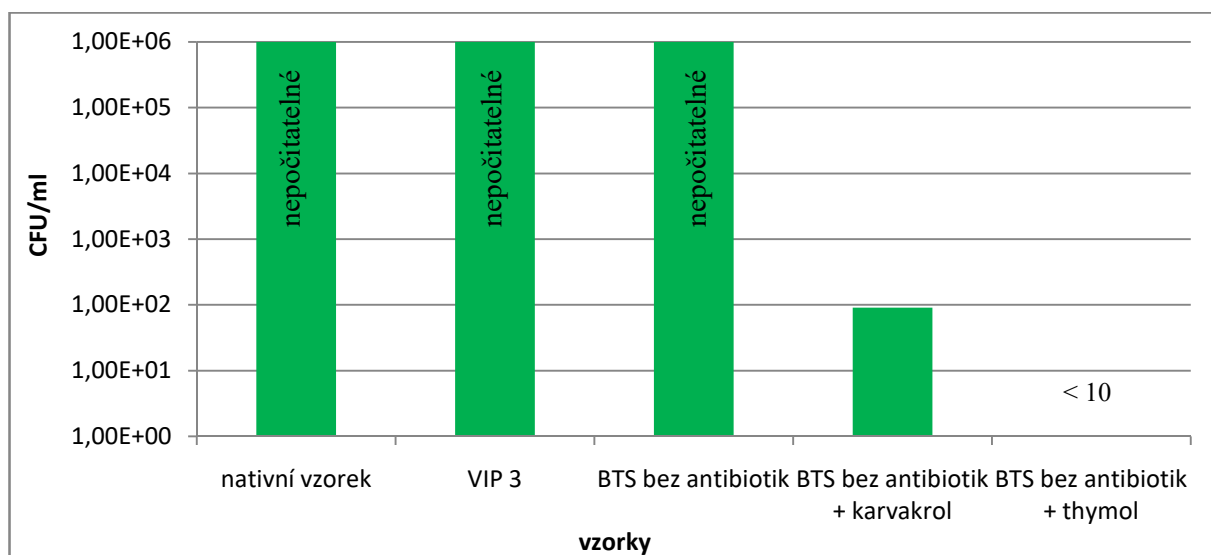
Graf 29: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 13 - 1. den



**Graf 30: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 13 - 3. den**



**Graf 31: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 13 - 7. den**



Mazurová a kol. (2015) uvádí, že karvakrol a thymol mají široké spektrum antimikrobiálních účinků působící proti bakteriím, kvasinkám a houbám. Velice dobře působí tyto dvě látky v kombinaci a to jak na grampozitivní tak i na gramnegativní bakterie. Dobře působí na *E. coli*, *Staphylococcus sp.* a *Enterococcus sp.* (MIC 150 až 1200 µg/ml). Na *Pseudomonas aeruginosa* působí samostatně thymol i karvakrol s MIC v rozmezí od 300 do 2400 µg/ml. V kombinaci thymol s karvakrolem působí na *Pseudomonas aeruginosa* mnohem lépe s MIC od 75 do 300 µg/ml. Tato kombinace je vhodná i pro enterokoky s MIC 37,5 – 300 µg/ml. Důležité je zmínit, že využití karvakrolu a thymolu pro dekontaminaci

kančího spermatu může být omezeno jejich možnými toxickými účinky na buňky spermií. Mohou negativně ovlivnit jejich motilitu a životaschopnost.

Dle studie Xu a kol. (2008) karvakrol a thymol jakožto hlavní složky esenciálního oleje z oregana dobře působí na inhibici *E. coli*. Při koncentraci karvakrolu a thymolu 200 mg/l nedocházelo k úplné inhibici *E. coli*. Ve studii Olasupo a kol. (2003) byla stanovena MIC karvakrolu a thymolu na *E. coli*. Karvakrol působí na *E. coli* v MIC 1,5 mmol/l a thymol v MIC 1,2 mmol/l.

V této práci byla použita koncentrace 150 µg/ml (1 mmol/l) karvakrolu/thymolu. Využití karvakrolu a thymolu v ředidlech kančího spermatu k inhibici bakterií mělo dobré výsledky oproti využití např. thiosíranu sodného, síranu zinečnatého, koloidního zinku ve směsi s vitamínem C či kyseliny gallové, kde hodnoty počtu bakterií neklesly pod  $10^3$  CFU/ml. Dle dostupné literatury by bylo vhodné zjistit inhibiční účinek karvakrolu a thymolu na bakterie přítomné v kančím spermatu ve vyšších koncentracích popřípadě ve směsi. Nevýhodou těchto látek je však negativní účinek na motilitu spermií, ale to již nebylo předmětem této diplomové práce.

### 3.5 Testování účinnosti thiosíranu sodného

Bylo provedeno testování působení ředidla BTS bez antibiotik v různém poměru ředění v porovnání s působením BTS bez antibiotik s obsahem thiosíranu sodného s různými navážkami a v různém poměru ředění (viz tabulka 8). Ředění kančího spermatu příslušným ředidlem bylo v poměrech 1:2 (1 díl spermatu + 2 díly ředidla), 1:4 (1 díl spermatu + 4 díly ředidla) nebo 1:8 (1 díl spermatu + 8 dílů ředidla). Testování bylo provedeno na vzorcích kančího spermatu č. 14, kdy byly vzorky inokulovány v den odběru (první den) a následující dva dny (druhý a třetí den).

Tabulka 8: Složení vzorků kančího spermatu č. 14

Číslo vzorku	Obsah vzorku	Množství	Poměr (sperma:ředidlo)
1	nativní vzorek	---	---
2	BTS bez antibiotik	---	1:2
3	BTS bez antibiotik		1:4
4	BTS bez antibiotik		1:8
5	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný a	0,105 g/70 ml BTS	1:2
6	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný a		1:4
7	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný a		1:8
8	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný b	0,14 g/70 ml BTS	1:2
9	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný b		1:4
10	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný b		1:8
11	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný c	0,175 g/70 ml BTS	1:2
12	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný c		1:4
13	BTS bez antibiotik + thiosíran sodný c		1:8

#### 3.5.1 Vzorky kančího spermatu č. 14

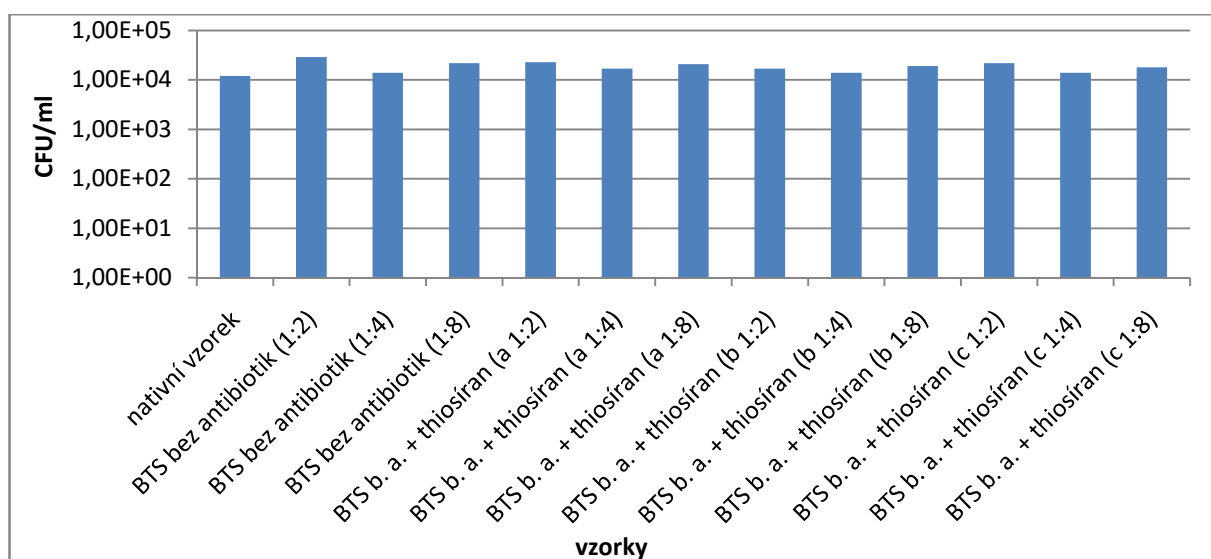
První den testování (viz graf 32) obsahovaly všechny vzorky, včetně vzorku nativního, celkový počet bakterií  $10^4$  CFU/ml. Působení thiosíranu sodného bylo ve všech vzorcích o různých navážkách a různém poměru ředění téměř shodné.

Druhý den testování (viz graf 33) opět všechny vzorky, včetně vzorku nativního, obsahovaly celkový počet bakterií kolem  $10^4$  CFU/ml. V nativním vzorku byl prokázán druh *Klebsiella oxytoca*, který byl v ostatních vzorcích inhibován. Ve vzorcích ředěných nedocházelo k inhibici převážně grampozitivních bakterií (např. *Staphylococcus cohnii subsp. cohnii*, *Aerococcus viridans*, *Corynebacterium sp.* a dalších), a proto by bylo vhodné thiosíran

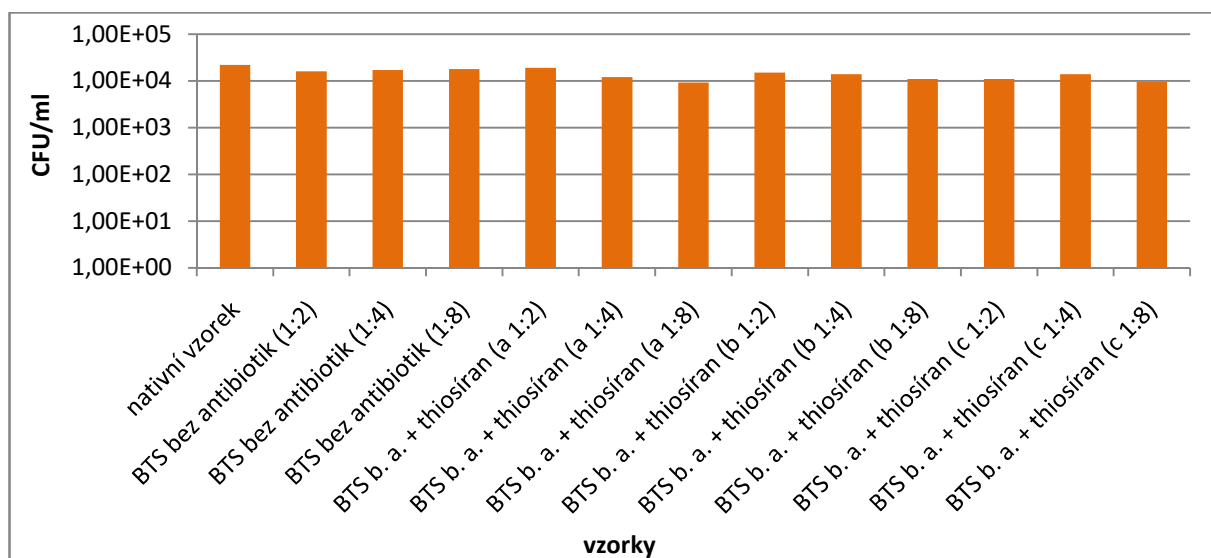
sodný používat v kombinaci s jinými látkami, které působí inhibičně právě na grampozitivní bakterie.

Třetí den testování (viz graf 34) došlo k nárůstu počtu bakterií v nativním vzorku kančího spermatu na  $1,1 \cdot 10^5$  CFU/ml. Ve vzorcích ředěných BTS bez antibiotik s obsahem thiosíranu sodného byl pozorován mírný inhibiční efekt. Působení thiosíranu sodného udrželo celkový počet bakterií na původní hodnotě, tedy  $10^4$  CFU/ml a oproti nativnímu vzorku došlo ke snížení o jeden řád. K největšímu snížení počtu bakterií došlo u vzorku kančího spermatu ředěného BTS bez antibiotik s thiosíranem sodným o navážce 0,175 g (c) a poměru ředění 1:4. Tento vzorek obsahoval celkový počet bakterií  $6 \cdot 10^3$  CFU/ml. Vzorky obsahovaly stejné druhy bakterií, ale v menším počtu.

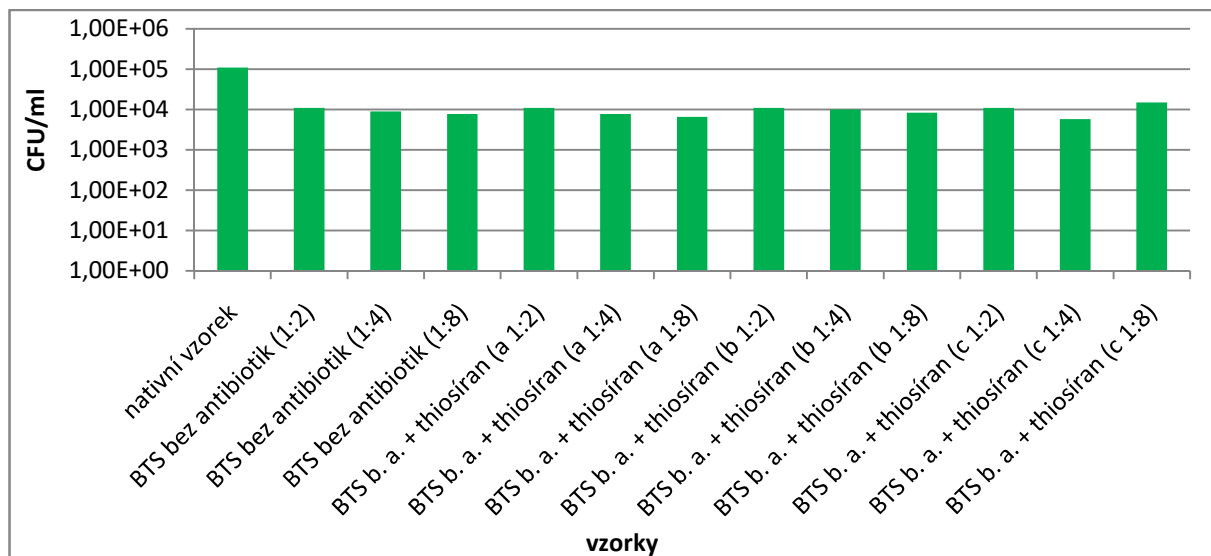
**Graf 32: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 14 - 1. den**



**Graf 33: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 14 - 2. den**



**Graf 34: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 14 - 3. den**



Nebyly nalezeny žádné vědecké studie, které by se zabývaly inhibičním působením thiosíranu sodného na bakterie. Zjištěné výsledky tedy nebylo možné porovnat s žádnou dostupnou literaturou.

### 3.6 Testování účinnosti vybraných chemických látek

U vzorků č. 15 a 16 bylo testováno působení ředidla BTS bez antibiotik a účinnost chemických látek v tomto ředidle (viz tabulka 9 a 10) na inhibici bakterií kančího spermatu. Jako chemické látky byly testovány **síran měďnatý**, **kyselina boritá** a **tetraborát sodný (borax)**. Kančí sperma bylo ředěno v poměru 1:2, 1:4 a 1:8. Testování vzorků bylo provedeno v den odběru a následující dva dny (první, druhý a třetí den).

Tabulka 9: Složení vzorků kančího spermatu č. 15

Číslo vzorku	Obsah vzorku	Množství	Poměr (sperma:ředidlo)
1	Nativní vzorek	---	---
2	BTS bez antibiotik	---	1:2
3	BTS bez antibiotik		1:4
4	BTS bez antibiotik		1:8
5	BTS bez antibiotik + síran měďnatý	0,002 g/130 ml BTS bez antibiotik	1:2
6	BTS bez antibiotik + síran měďnatý		1:4
7	BTS bez antibiotik + síran měďnatý		1:8
8	BTS bez antibiotik + kys. boritá	0,13 g/130 ml BTS bez antibiotik	1:2
9	BTS bez antibiotik + kys. boritá		1:4
10	BTS bez antibiotik + kys. boritá		1:8
11	BTS bez antibiotik + borax	0,097 g/130 ml BTS bez antibiotik	1:2
12	BTS bez antibiotik + borax		1:4
13	BTS bez antibiotik + borax		1:8

Tabulka 10: Složení vzorků kančího spermatu č. 16

Číslo vzorku	Obsah vzorku	Množství	Poměr (sperma:ředidlo)
1	nativní semeno	---	---
2	BTS bez antibiotik	---	1:2
3	BTS bez antibiotik		1:4
4	BTS bez antibiotik		1:8
5	BTS bez antibiotik + síran měďnatý	0,004 g/130 ml BTS bez antibiotik	1:2
6	BTS bez antibiotik + síran měďnatý		1:4
7	BTS bez antibiotik + síran měďnatý		1:8
8	BTS bez antibiotik + kys. boritá	0,097 g/130 ml BTS bez antibiotik	1:2
9	BTS bez antibiotik + kys. boritá		1:4
10	BTS bez antibiotik + kys. boritá		1:8
11	BTS bez antibiotik + borax	0,065 g/130 ml BTS bez antibiotik	1:2
12	BTS bez antibiotik + borax		1:4
13	BTS bez antibiotik + borax		1:8

### 3.6.1 Vzorky kančího spermatu č. 15

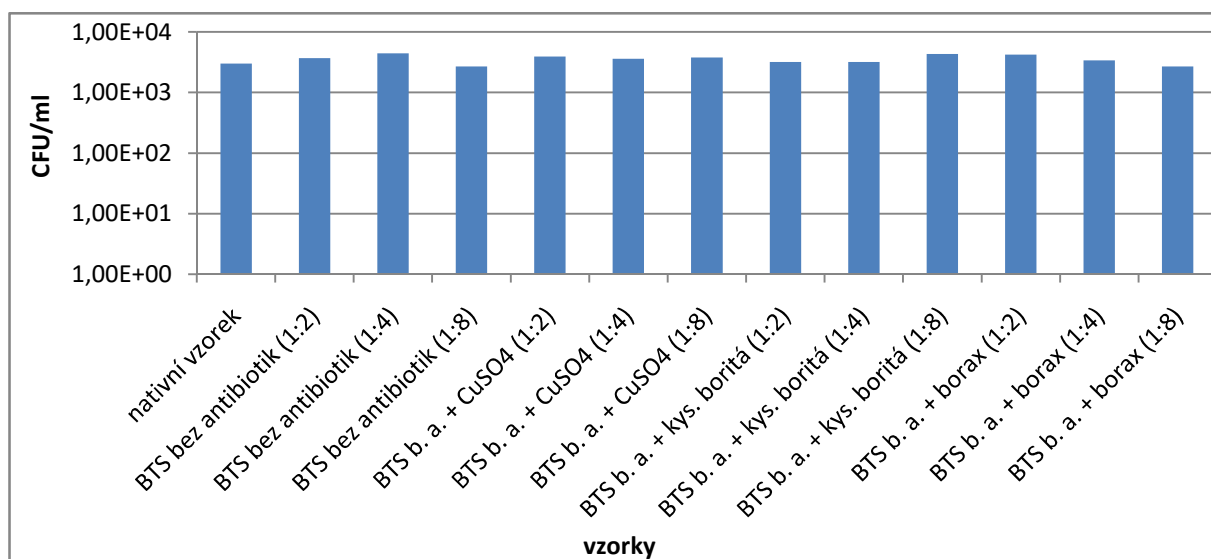
První den testování (viz graf 35) vzorky obsahovaly celkový počet bakterií v rozmezí  $2,7 \cdot 10^3$  -  $4,4 \cdot 10^3$  CFU/ml. Nativní vzorek kančího spermatu č. 15 obsahoval celkový počet bakterií  $3 \cdot 10^3$  CFU/ml bakterií. Při použití všech testovaných látek nedošlo první den testování k téměř žádné inhibici bakterií kančího spermatu.

Druhý den (viz graf 36) nativní vzorek obsahoval  $3,2 \cdot 10^3$  CFU/ml bakterií. U všech testovaných vzorků došlo ke snížení počtu bakterií pod  $3 \cdot 10^3$  CFU/ml, ale u žádného nedošlo k výraznějšímu snížení počtu bakterií.

Třetí den testování (viz graf 37) bylo možné pozorovat nejvýraznější inhibici bakterií kančího spermatu v testovaných vzorcích oproti nativnímu vzorku kančího spermatu. U nativního vzorku došlo ke zvýšení počtu bakterií o jeden řád, tedy na hodnotu  $3,4 \cdot 10^4$  CFU/ml bakterií. U všech ředěných vzorků byl pozorován celkový počet bakterií  $10^3$  CFU/ml. Působením těchto chemických látek tedy nedochází ke snižování počtu bakterií, ale k udržení původních koncentrací. To je zřejmé z toho, že celkový počet bakterií v nativním vzorku stoupá, ale u vzorku ředěných je tato hodnota neměnná.

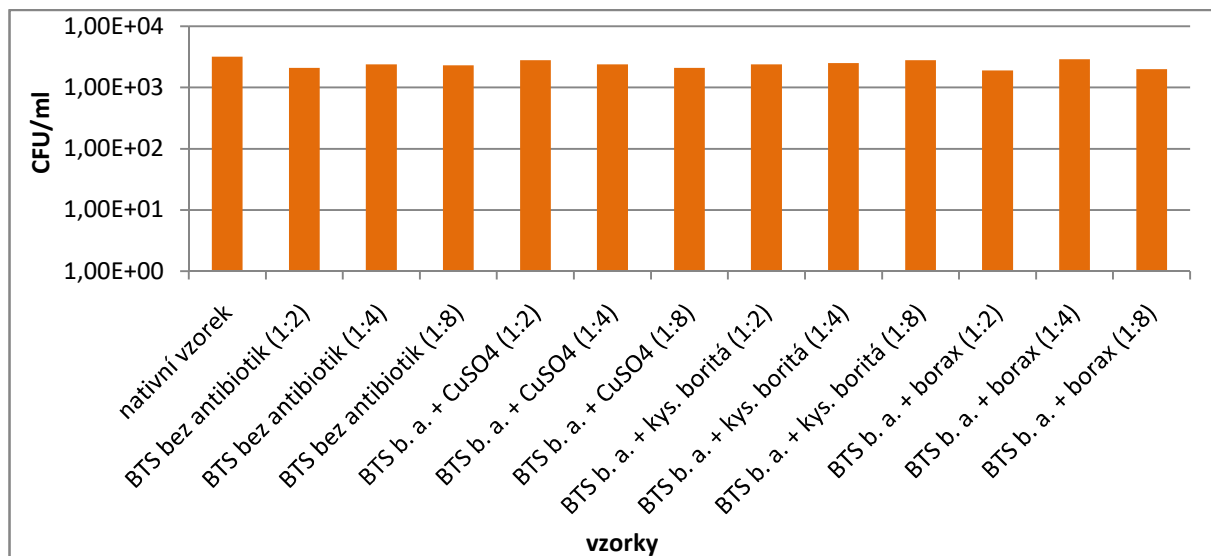
Bakteriální zastoupení v průběhu celého testování bylo obdobné. Ve vzorcích byly prokázány různé druhy stafylokoků (*Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus capitis subsp. capitis* a *Staphylococcus haemolyticus*). Dále byla zjištěna přítomnost například *Streptococcus porcinius* a *E. coli*. Výskyt *E. coli* byl pozorován hlavně ve vzorcích nativního kančího spermatu.

Graf 35: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 15 - 1. den

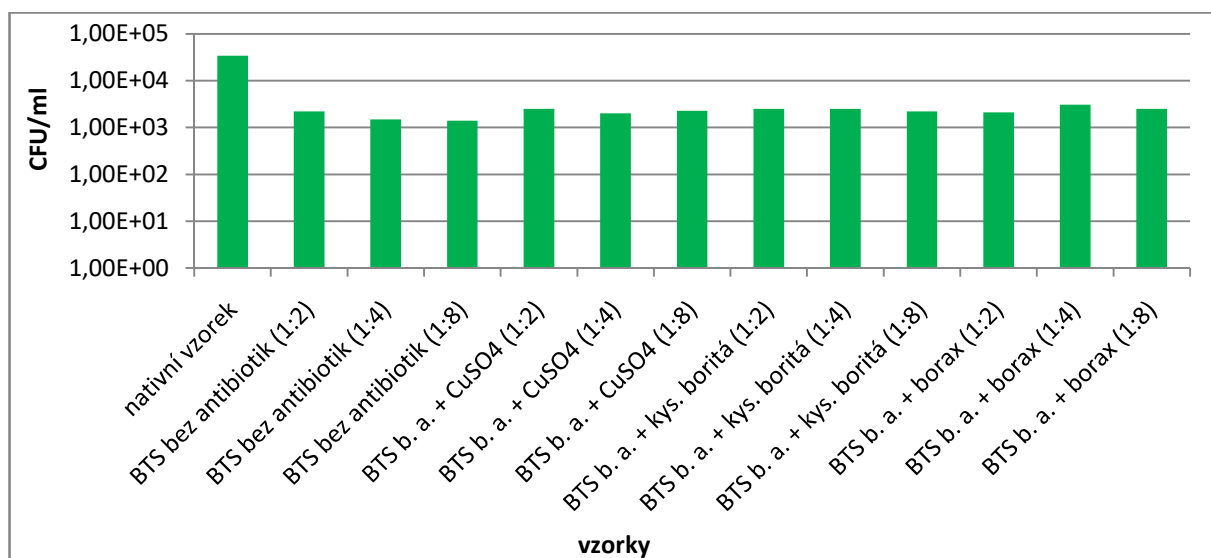




**Graf 36: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 15 - 2. den**



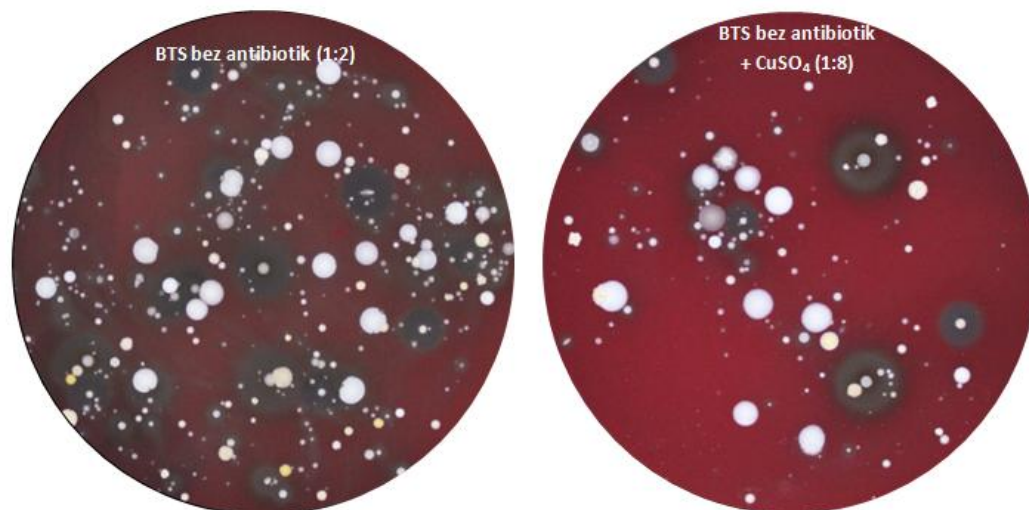
**Graf 37: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 15 - 3. den**



### 3.6.2 Vzorky kančího spermatu č. 16

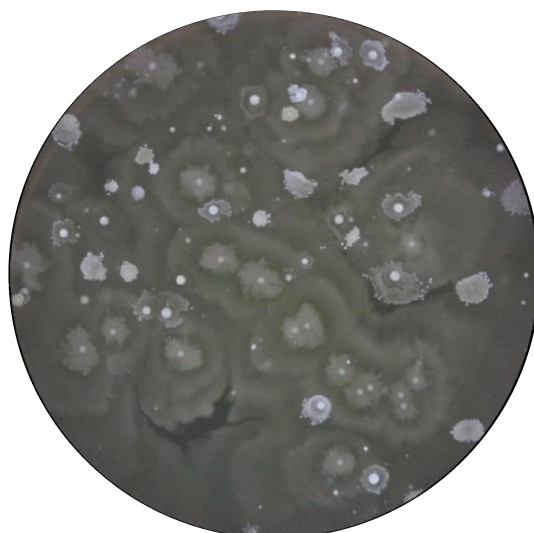
Bakteriální složení těchto testovaných vzorků bylo obdobné jako u vzorků kančího spermatu č. 15. Byl zde prokázán výskyt stafylokoků (*Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum*, *Staphylococcus simulans*), streptokoků (*Streptococcus porcinus*) a *Aerococcus viridans* (viz. obr. 18). V nativním vzorku byla první den převaha těchto druhů, ale druhý a třetí den byly tyto druhy potlačeny druhy *E. coli* a *Proteus mirabilis* (viz obr. 19). Na počty kolonií ve všech vzorcích měla velký vliv hlavně přítomnost druhu *Proteus mirabilis*, který potlačoval růst ostatních druhů bakterií (viz obr. 20).

První den (viz graf 38) byl v nativním vzorku kančího spermatu č. 16 celkový počet bakterií  $2,7 \cdot 10^4$  CFU/ml. Všechny testované vzorky obsahovaly celkový počet bakterií kolem  $10^4$  CFU/ml.



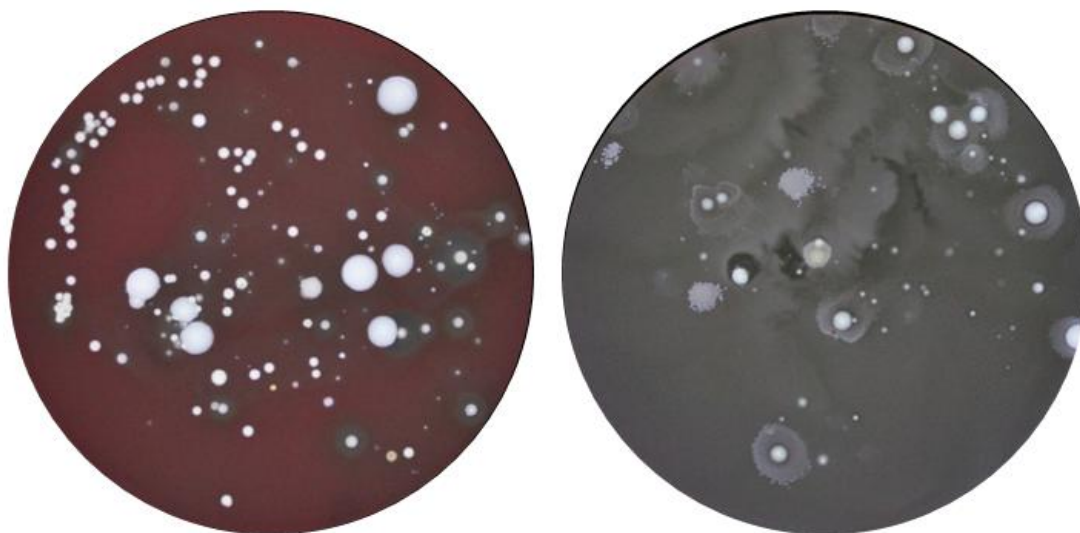
**Obrázek 18:** Kultivace vzorků kančího spermatu č. 16 ředěných BTS bez antibiotik (1:2) a BTS bez antibiotik s obsahem síranu měďnatého (1:8) – 1. den (KA, 48 h, 37 °C)

Druhý den (viz graf 39) nativní vzorek kančího spermatu obsahoval  $1,3 \cdot 10^4$  CFU/ml. U všech testovaných ředěných vzorků došlo ke snížení počtu bakterií pod tuto hodnotu. Vzorky obsahovaly více než  $3 \cdot 10^3$  CFU/ml. K největšímu snížení počtu bakterií došlo u vzorků ředěných samotným BTS bez antibiotik, kdy vzorky ve všech ředění obsahovaly pod  $5 \cdot 10^3$  CFU/ml. Na určení celkového počtu bakterií měl velký vliv druh *Proteus sp.*, který potlačoval růst ostatních druhů bakterií.



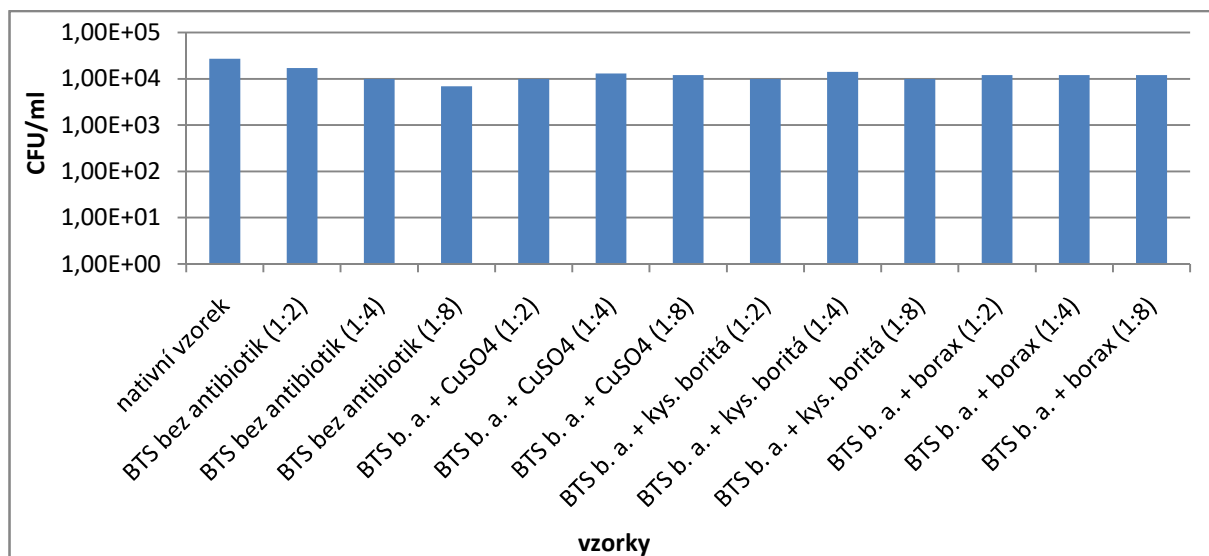
**Obrázek 19:** Kultivace vzorku kančího spermatu č. 16 ředěného BTS bez antibiotik s obsahem síranu měďnatého (1:2) - 2. den (KA, 48 h, 37 °C)

Třetí den (viz graf 40) bylo pozorováno v nativním vzorku kančího spermatu nepočítatelné množství kolonií. Ve všech testovaných vzorcích bylo zjištěno méně než  $10^4$  CFU/ml. K největšímu snížení počtu bakterií došlo u vzorku ředěného BTS bez antibiotik v poměru 1:4 ( $1,3 \cdot 10^3$  CFU/ml). U ředěných vzorků tedy dochází k udržení počáteční koncentrace bakterií oproti nativnímu vzorku, kde dochází k narůstání této koncentrace.

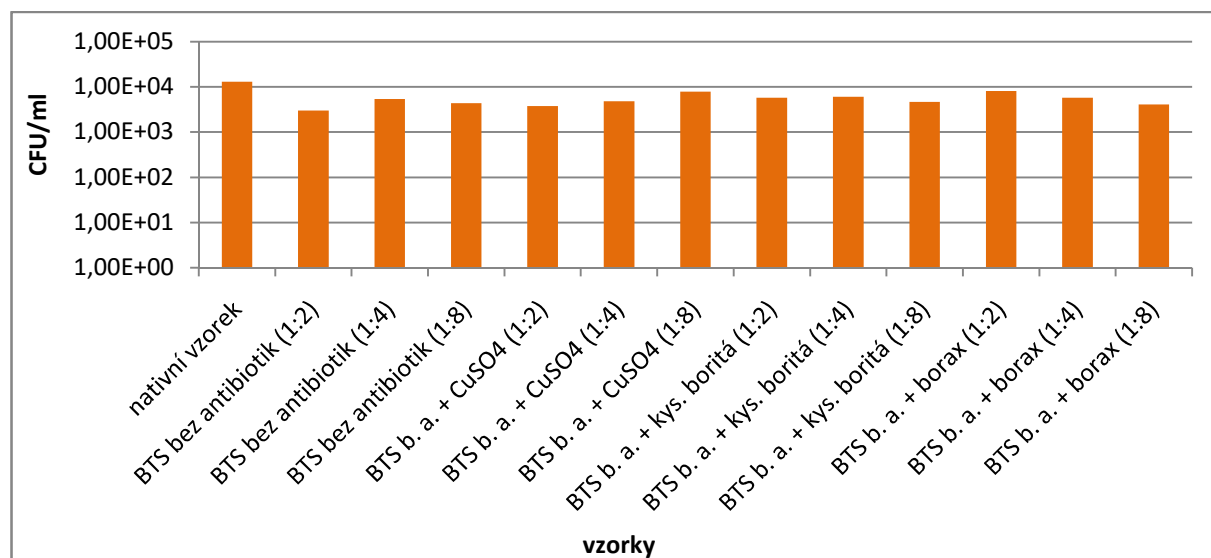


Obrázek 20: Kultivace vzorku kančího spermatu č. 16 ředěného BTS bez antibiotik s boraxem (1:4) - 3. den (KA, 48 h, 37 °C)

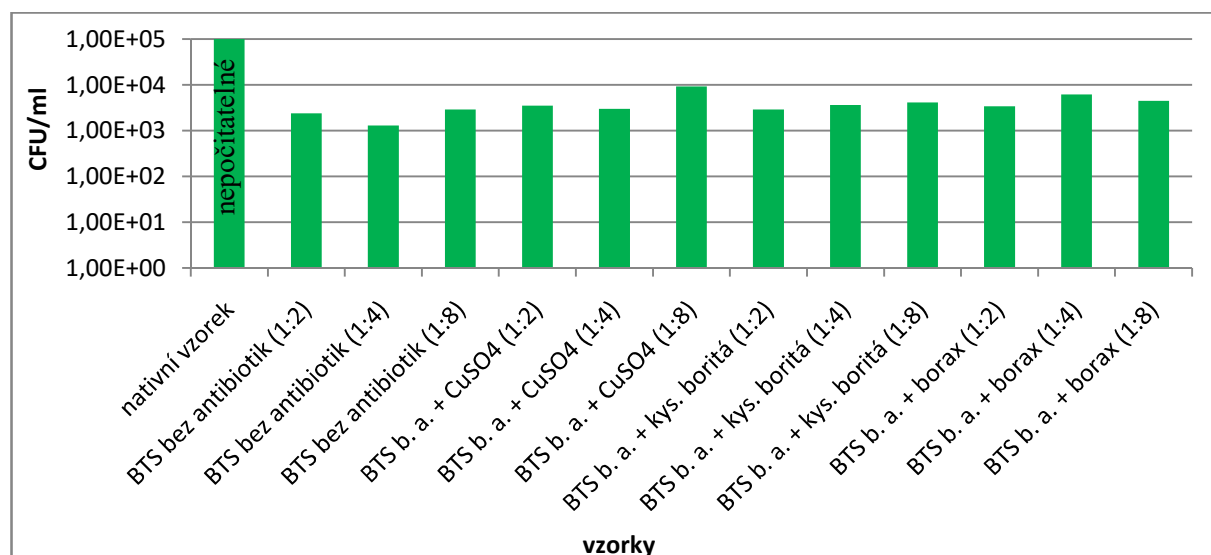
Graf 38: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 16 - 1. den



Graf 39: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 16 - 2. den



Graf 40: Stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích kančího spermatu č. 16 - 3. den



Aerestrup a kol. (2004) uvádí, že síran měďnatý je přidáván do krmiv potravinářských zvířat, protože jeho účinek pravděpodobně inhibuje některé bakterie střevního traktu. U druhu *Enterococcus* je prokázána získaná rezistence na sloučeniny obsahující měď. Naopak na síran měďnatý jsou citlivé stafylokoky a méně citlivý druh *Salmonella*.

Existuje několik studií o antivirotických, antimykotických, antituberkulózních a antibakteriálních účincích boru. V roce 2012 provedl Yilmaz studii, při které zjistil MIC a MBC kyseliny borité a boraxu (tetraborát sodný) působící na některé mikroorganismy (*Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter septicus*, *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa*) a jejich hodnoty si byly vzájemně podobné. Při působení kyseliny borité na *Staphylococcus aureus*

i *Acinetobacter septicus* byly zjištěny hodnoty MIC i MBC 3,8 mg/ml a pro *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byly zjištěny hodnoty MIC a MBC 7,6 mg/ml. Při působení boraxu na *Staphylococcus aureus* a *Acinetobacter septicus* byly zjištěny hodnoty MIC i MBC 23,8 mg/ml a pro *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byly zjištěny hodnoty MIC a MBC 47,6 mg/ml.

V této práci byly u síranu měďnatého použity koncentrace 15,4 µg/ml (vzorky č. 15) a 31 µg/ml (vzorky č. 16). U kyseliny borité byly použity koncentrace 1 mg/ml (vzorky č. 15) a 0,75 mg/ml (vzorky č. 16) a u tetraboritanu sodného byly použity koncentrace 0,75 mg/ml (vzorky č. 15) a 0,5 mg/ml (vzorky č. 16). U námi testovaných vzorků na účinnost síranu měďnatého, kyseliny borité a tetraborátu sodného nedošlo k významné inhibici bakterií kančího spermatu. Ve vzorcích se nejhojněji vyskytovali stafylokoky, streptokoky a druhy *E. coli* a *Proteus mirabilis*.

### 3.7 Testování citlivosti vybraných mikroorganismů na antibiotika

Testování citlivosti mikroorganismů kančího spermatu na antibiotika bylo prováděno u mikroorganismů odolných na působení antibiotik, přírodních či chemických látek obsažených v ředidlech kančího spermatu. Mikroorganismy, které po působení těchto látek nejčastěji přežily, byly hlavně z čeledi *Enterobacteriaceae* a to konkrétně druhy *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* a *Klebsiella oxytoca*. Testování citlivosti vybraných mikroorganismů na antibiotika bylo prováděno diskovou difúzní metodou.

Všechny výsledky byly hodnoceny dle hodnot breakpointů, které jsou uvedeny v tabulce breakpointů pro interpretaci MIC a průměrů inhibičních zón verze 8.0 z roku 2018 dle Evropského výboru pro testování citlivosti na antimikrobiální látky (EUCAST).

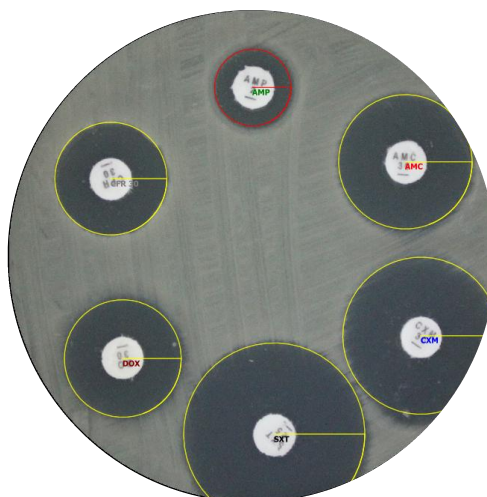
#### Citlivost *Escherichia coli* na antibiotika

Byl testován jeden kmen *E. coli*. Po 24 hodinové inkubaci (37 °C) kmene *E. coli* na Mueller Hintonově agaru s antibiotickými disky (viz obr. 21) byly změřeny inhibiční zóny analyzátozem BACMED a výsledky vyhodnoceny dle normy EUCAST. Bylo zjištěno (viz tabulka 11), že *E. coli* je rezistentní na ampicilin a intermediálně citlivá na amoxicillin-klavulanovou kyselinu, cefuroxim, sulfomethoxazol, doxycyklin a cefadroxil.

Tabulka 11: Výsledky testování citlivosti *Escherichia coli* na antibiotika

disk	inhibiční zóna (mm)	break point	výsledek
AMP	12,16	15 – 22	R
AMC	21,28	18 – 24	I
CXM	24,89	20 – 26	I
SXT	28,88	23 – 29	I
DOX	18,62	18 – 24	I
CFR	17,86	14 - 20	I

Legenda: AMP – ampicilin, AMC – amoxicillin-klavulanová kyselina, CXM – cefuroxim, SXT – sulfomethoxazol, DOX – doxycyklin, CFR – cefadroxil, R – rezistence, I – intermediální citlivost



**Obrázek 21: Testování citlivosti *Escherichia coli* na antibiotika (MH agar, 24h, 37 °C)**

Ve studii Habruna a kol. (2010) byla zjištěna citlivost 256 kmenů *E. coli* izolovaných ze selat. V této studii byl druh *E. coli* vyhodnocen jako rezistentní na ampicilin, což se shoduje s námi získaným výsledkem. Dále byla u kmenů *E. coli* prokázána Habrunem a kol. (2010) rezistence na streptomycin, tetracykliny a sulfamethoxazol/trimethoprim a často byly také rezistentní na více antibiotik najednou. Námi testovaný kmen byl na doxycyklin a sulfomethoxazol intermediálně citlivý.

### **Citlivost *Proteus vulgaris* na antibiotika**

Dva kmeny *Proteus vulgaris* byly testovány diskovou difúzní metodou na MH agaru (viz obr. 24). Dle výsledných velikostí inhibičních zón (viz tabulky 12 a 13) byla vyhodnocena citlivost kmenů *Proteus vulgaris* na příslušná antibiotika.

První kmen *Proteus vulgaris* (viz obr. 22 vlevo a tabulka 12) byl vyhodnocen jako intermediálně citlivý na sulfamethoxazol a doxycyklin a citlivý na ampicilin, amoxicillin-kavulanovou kyselinu, cefuroxim a cefadroxil.

**Tabulka 12: Výsledky testování citlivosti *Proteus vulgaris* na antibiotika 1**

<b>disk</b>	<b>inhibiční zóna (mm)</b>	<b>break point</b>	<b>výsledek</b>
AMP	7,98	14	S
AMC	24,91	19	S
CXM	21,27	19	S
SXT	15,2	13 -16	I
DOX	12,18	12 - 16	I
CFR	14	12	S

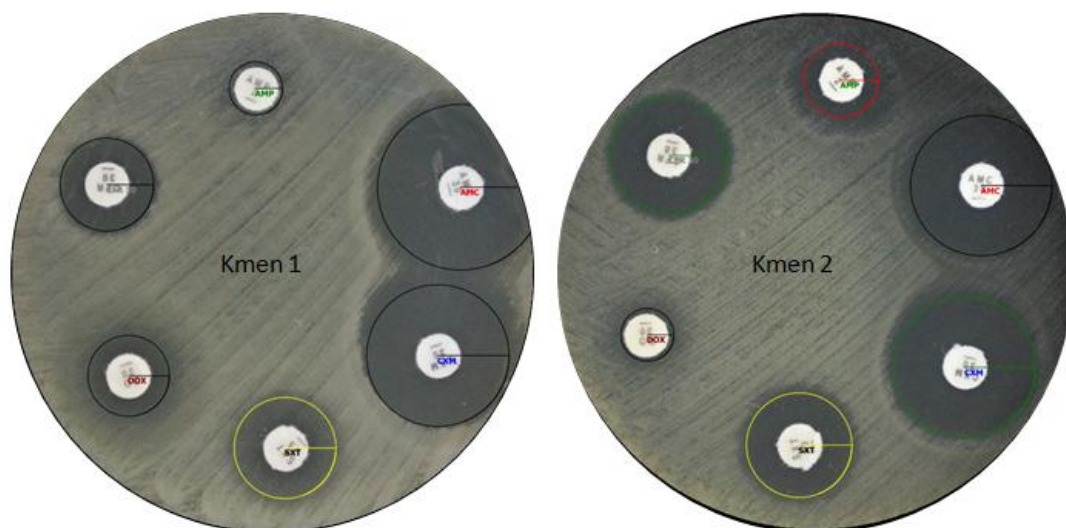
Legenda: AMP – ampicilin, AMC – amoxicillin-klavulanová kyselina, CXM – cefuroxim, SXT – sulfomethoxazol, DOX – doxycyklin, CFR – cefadroxil, I – intermediální citlivost, S – citlivost

Druhý testovaný kmen *Proteus vulgaris* (viz obr. 22 vpravo a tabulka 13) byl vyhodnocen jako citlivý na amoxicillin-klavulanovou kyselinu, cefuroxim, sulfamethoxazol a cefadroxil. Rezistentní byl při tomto testování na ampicilin a doxycyklin.

**Tabulka 13: Výsledky testování citlivosti *Proteus vulgaris* na antibiotika 2**

disk	inhibiční zóna (mm)	break point	výsledek
AMP	11,97	14	R
AMC	22,42	19	S
CXM	22,42	19	S
SXT	17,01	13 -16	S
DOX	8,34	12 - 16	R
CFR	18,05	12	S

Legenda: AMP – ampicilin, AMC – amoxicillin-klavulanová kyselina, CXM – cefuroxim, SXT – sulfomethoxazol, DOX – doxycyklin, CFR – cefadroxil, R – rezistence, S – citlivost



**Obrázek 22: Testování citlivosti *Proteus vulgaris* na antibiotika (MH agar, 24h, 37 °C)**

Dle studie provedené Yániz a kol. (2010), ve které byly testovány kmeny izolované z beraního spermatu, byl *Proteus vulgaris* citlivý na ampicilin, gentamycin, streptomycin, ceftiofur a trimethoprim/sulfonamid. *Proteus vulgaris* byl rezistentní na penicilin, polymixin B, spectinomycin, erytromycin a oxytetracyklin.



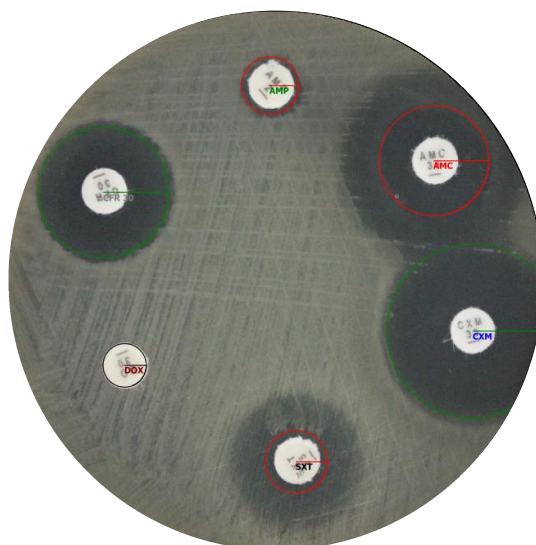
## Citlivost *Proteus mirabilis* na antibiotika

Jeden kmen *Proteus mirabilis* (viz obr. 23) byl testován stejným postupem a metodou. Dle vzniklých inhibičních zón byla vyhodnocena citlivost toho kmene na antibiotika (viz tabulka 14). *Proteus mirabilis* byl citlivý na cefuroxim a cefadroxil, ale rezistentní na ampicilin, amoxicillin-klavulanovou kyselinu, sulfamethoxazol a doxycyklin.

Tabulka 14: Výsledky testování citlivosti *Proteus mirabilis* na antibiotika

disk	inhibiční zóna (mm)	break point	výsledek
AMP	8,27	13 - 14	R
AMC	15,87	18 - 19	R
CXM	25,08	17 - 18	S
SXT	9,03	13 - 16	R
DOX	6,27	12 - 16	R
CFR	18,81	11 - 12	S

Legenda: AMP – ampicilin, AMC – amoxicillin-klavulanová kyselina, CXM – cefuroxim, SXT – sulfomethoxazol, DOX – doxycyklin, CFR – cefadroxil, R – rezistence, S – citlivost



Obrázek 23: Testování citlivosti *Proteus mirabilis* na antibiotika (MH agar, 24h, 37 °C)

Dle studie Schulze a kol. (2015) testující kmeny z kančího spermatu byl *Proteus mirabilis* rezistentní na ampicilin, což se shoduje s naší studií. Dále byl rezistentní na penicilin, gentamicin, neomycin, spektinomycin, tetracyklin, klindamycin, tylosin, sulfonamidy, polymixin a trimethoprim/sulfonamid. *Proteus mirabilis* byl dle této studie citlivý na cefotaxim, amikacin a enrofloxacin.

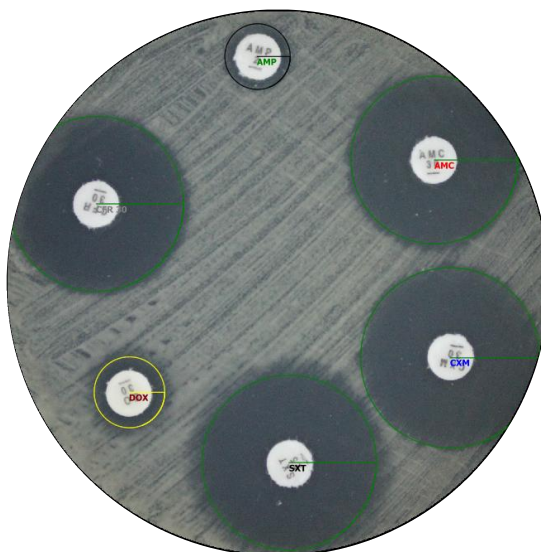
## Citlivost *Klebsiella oxytoca* na antibiotika

Byly změřeny inhibiční zóny (viz obr. 24) antibiotik u kmene *Klebsiella oxytoca* a citlivost tohoto kmene na antibiotika byla vyhodnocena (viz tabulka 15). *Klebsiella oxytoca* byla citlivá na amoxicillin-klavulanovou kyselinu, cefuroxim, sulfamethoxazol a cefadroxil, intermediálně citlivá na doxycyklin a rezistentní na ampicilin.

Tabulka 15: Výsledky testování citlivosti *Klebsiella oxytoca* na antibiotika

disk	inhibiční zóna (mm)	break point	výsledek
AMP	9,71	14	R
AMC	24,04	18 - 19	S
CXM	25,84	17 - 18	S
SXT	25,08	13 – 16	S
DOX	10,17	10 – 14	I
CFR	25,08	11 - 12	S

Legenda: AMP – ampicilin, AMC – amoxicillin-klavulanová kyselina, CXM – cefuroxim, SXT – sulfamethoxazol, DOX – doxycyklin, CFR – cefadroxil, R – rezistence, I – intermediální citlivost, S – citlivost



Obrázek 24: Testování citlivosti *Klebsiella oxytoca* na antibiotika (MH agar, 24h, 37 °C)

Dle studie Schulze a kol. (2015) byly kmeny *Klebsiella oxytoca* rezistentní na ampicilin, což se shoduje s námi získaným výsledkem. Dále studie uvádí rezistenci kmenů na penicilin, gentamycin, neomycin, amikacin, spektinomycin, klindamycin, tylosin, sulfonamid a trimethoprim/sulfonamid. Kmeny *Klebsiella oxytoca* byly dle této studie citlivé na cefotaxim, tetracyklin, enrofloxacin a polymixin B.

## ZÁVĚR

Testováno bylo celkem 16 vzorků kančího spermatu od března roku 2017 do března roku 2018. Testována byla účinnost různých inhibičních látek na mikroorganismy vyskytující se ve spermatu chovných kanců. Vzorky byly odebírány a zpracovány na oddělení chovu prasat ve Výzkumném ústavu živočišné výroby, v.v.i. v Kostelci nad Orlicí.

Vzorky kančího spermatu byly testovány vždy v den odběru vzorků a následně 2., 3. nebo 7. den uchovávání v závislosti na druhu inhibiční látky. Vzorky kančího spermatu byly očkované na krevní agar metodou roztěru L-hokejkou. Bylo očkováno vždy 100  $\mu$ l vzorku. Kultivační média byly inkubovány 48 hodin při 37 °C.

Bylo zjištěno, že nativní vzorky kančího spermatu obsahovaly celkový počet bakterií řádově  $10^3$  až  $10^5$  CFU/ml. Tento počet se zvyšoval v závislosti na době uchovávání. Sedmý den uchovávání byl počet bakterií většinou již nepočitatelný. Na době uchovávání záviselo i složení mikroflóry. Ve většině případů byla sedmý den uchovávání většina mikroorganismů kančího spermatu potlačena druhy *E. coli* a *Proteus sp.*

Z výsledků experimentální části je zřejmé, že účinek ředidel pro krátkodobé uchovávání BTS, VIP 3, BIO PIG, M III a OPTIM na bakteriální kontaminaci kančího spermatu je vyšší v porovnání s účinkem jediného testovaného ředidla pro dlouhodobé uchovávání SCP. Nejlepší inhibiční působení bylo pozorováno u ředidel BIO PIG, OPTIM a M III.

I přes snahu získání alternativ antibiotik v ředidlech kančího spermatu bylo zjištěno, že na inhibici bakterií kančího spermatu jsou nejvíce účinná komerčně dodávaná ředidla s obsahem antibiotik (BIO PIG, OPTIM, M III, VIP 3 a BTS). Testování účinnosti vybraných přírodních (kyselina gallová) a chemických (síran zinečnatý, thiosíran sodný, koloidní zinek ve směsi s vitamínem C, síran měďnatý, kyselina boritá, borax) látek neprokázalo významnou inhibici bakterií kančího spermatu. Pouze v případě testování karvakrolu a thymolu došlo k výraznému snížení počtu bakterií kančího spermatu č. 13.

Po působení inhibičních látek v testovaných vzorcích nejčastěji přežívali bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* a to hlavně druhy *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* a *Klebsiella oxytoca*. U vybraných kmenů bylo provedeno testování citlivosti na antibiotika. Kmen *E. coli* byl vyhodnocen jako rezistentní na ampicilin a intermediálně citlivý na amoxicillin-klavulanovou kyselinu, cefuroxim, sulfomethoxazol, doxycyklin a cefadroxil. Oba testované kmeny *Proteus vulgaris* byly citlivé na amoxicillin-kavulanovou kyselinu, cefuroxim

a cefadroxil. Druh *Proteus mirabilis* byl citlivý na cefuroxim a cefadroxil, ale rezistentní na ampicilin, amoxicillin-klavulanovou kyselinu, sulfamethoxazol a doxycyklin. Kmen *Klebsiella oxytoca* byl vyhodnocen jako citlivý na amoxycillin-klavulanovou kyselinu, cefuroxim, sulfamethoxazol a cefadroxil, intermediálně citlivý na doxycyklin a rezistentní na ampicilin.

V navazujících studiích by bylo vhodné pokračovat ve zjišťování citlivosti mikroorganismů kančího spermatu na antibiotika především u těch kmenů, které nejčastěji odolávají působení inhibičních látek. Experimentální část této práce se nezabývala účinkem testovaných látek na spermie. Bylo by vhodné v následujících studiích spojení poznatků o působení inhibičních látek na mikroorganismy kančího spermatu a jejich vlivu na spermie.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] 90/429/EEC. Council Directive of 26 June 1990 laying down the animal health requirements applicable to intra-Community trade in and imports of semen of domestic animals of the porcine species. Official Journal of the European Communities, 1990.
- [2] AARESTRUP, F. M. a H. HASMAN. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary Microbiology*. 2004, 100 (1-2), 83 - 89. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.01.013. ISSN 03781135. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113504000495>
- [3] AKANDI, A., S. O. UGWU a N.S. MACHEBE. Survivability of boar sperm stored under room temperature in extenders containing some natural products. *Open access animal physiology*. 2015, 7, 57 - 64.
- [4] ALTHOUSE, G. C. a K. G. LU. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 2005, 63 (2), 573-584. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.031. ISSN 0093691x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X0400322X>
- [5] ALTHOUSE, G. C. a K. ROSSOW. The Potential Risk of Infectious Disease Dissemination Via Artificial Insemination in Swine. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011, 46 (2), 64-67. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01863.x. ISSN 09366768. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2011.01863.x>
- [6] BAYAN, M. A. G. Effects of ascorbic acid, citric acid, lactic acid, NaCl, potassium sorbate and Thymus vulgaris extract on Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *African Journal of Microbiology Research*. 2013, 7 (1), 7 - 12. DOI: 10.5897/AJMR12.042. ISBN 10.5897/AJMR12.042. ISSN 1996-0808. Dostupné také z: <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/E65678B11951>
- [7] BOE-HANSEN, G. B., A. K. ERSBØLL, T. GREVE a P. CHRISTENSEN. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*. 2005, 63, 2006-2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X04002948>

- [8] BONET, S., I. CASAS, W. V. HOLT a M. YESTE. *Boar reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. New York: Springer, 2012. ISBN 978-3-642-35048-1.
- [9] BUSSALLEU, E., M. YESTE, L. SEPÚLVEDA, E. TORNER, E. PINART a S. BONET. Effects of different concentration of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2011, 127, 176 - 182.
- [10] BUSSALLEU, E., E. PINART, M. YESTE, M. BRIZ, S. SANCHO, E. TORNER a S. BONET. A PCR technique to detect enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* in boar semen samples. *Research in Veterinary Science*. 2012, 93(1), 31-33. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.07.012. ISSN 00345288. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528811002645>
- [11] ČEŘOVSKÝ, J., S. FRYDRYCHOVÁ, A. LUSTYKOVÁ a M. ROZKOT. Changes in boar semen with a high and low level of morphologically abnormal spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science*. 2005, 50 (7), 289-299.
- [12] DOROSTKAR, K., S. M. A. SHOUSHARI a A. KHAKI. Effects of In Vitro Zinc Sulphate Additive to The Semen Extender on Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa before and after Freezing. *International Journal of Fertility and Sterility*. 2014, 8 (3), 325 - 332.
- [13] FAIZ, U., T. BUTT, L. SATTI, W. HUSSAIN a F. HANIF. Efficacy of zinc as an antibacterial agent against enteric bacterial pathogens. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. 2011, 23 (2), 18 - 21.
- [14] FRASER, L., J. STRZEZEK, K. FILIPOWICZ, M. MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA a L. ZASIADCZYK. Age and seasonal-dependent variations in the biochemical composition of boar semen. *Theriogenology*. 2016, 86, 806-816.
- [15] FRUNZĂ, I., H. CERNESCU a G. KORODI. Physical and chemical parameters of boar sperm. *LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ*. TIMISOARA, 2008, 41, 634 - 640.
- [16] GADEA, J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2003, 1 (2), 17-27.

- [17] GOLDBERG, A. M. G., L. E. ARGENTI, J. E. FACCIN, L. LINCK, M. SANTI, M. L. BERNARDI, M. R. I. CARDOSO a F. P. BORTOLOZZO. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Research in veterinary science*. 2013, 95, 362-367.
- [18] GONZÁLEZ-CADAVID, V., J. A. M. MARTINS, F. B. MORENO, T. S. ANDRADE, A. C. L. SANTOS, A. C. O. MONTEIRO-MOREIRA, R. A. MOREIRA a A. A. MOURA. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology*. 2014, 82, 297-707.
- [19] HABRUN, B., G. KOMPES, Ž. CVETNIC, S. ŠPIČIĆ, M. BENIC a M. MITAK. Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from diagnostic samples from large pig breeding farms in Croatia. *Veterinarski arhiv*. 2010, 80 (5), 571 - 583. ISSN 0372-5480.
- [20] HEMA MALŠICE s.r.o.. *Ředidla kančího spermatu VIP*. Malšice: Hema Malšice s.r.o., 2014. Dostupné také z:  
<http://www.hema.cz/foto/navody/Navod%20VIP%20redidla%20detalni.pdf>
- [21] HORKÝ, P., L. ZEMAN, J. SKLÁDANKA, P. NEVRKLA a P. SLÁMA. Effect of selenium, zinc, vitamin C and E on boar ejaculate quality at heat stress. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2016, 4 (64), 1167 - 1172.
- [22] CHUTIA, T., R. K. BISWAS, M. K. TAMULI, B. C. DEKA, S. SINHA, J. GOSWAMI, S. BANIK a R. B. KAYASTHA. Effect of holding of semen and washing of seminal plasma on quality and fertility of Hampshire boar semen preserved at liquid state. *Animal Reproduction Science*. 2014, 145, 141 - 149.
- [23] IBĂNESCU, I., P. ROȘCA a D. DRUGOCIU. Short-term versus long-term extenders for boar semen: differences in preserving the kinetic parameters within seven days of storage. *Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară*. 2015, 58, 217 - 225.
- [24] JOHNSON, L.A., K.F. WEITZE, P. FISER a W.M.C. MAXWELL. Storage of boar semen. *Animal reproduction science*. 2000, 62, 143 - 172.

- [25] KAEOKET, K., T. SRISOWANNA, U. WICHAIDIT, P. CHANAPIWAT a S. MANEE-IN. Comparative Study on Six Different Long Term Commercial Extenders for Fresh Boar Semen. *Thai J. Vet. Med.* 2010, 40 (3), 257 - 263.
- [26] KARAGEORGIU, M. A., G. TSOUSIS, C. M. BOSCO, E.D. TZIKA, P. D. TASSIS a I. A. TSAKMAKIDIS. A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. *Acta Veterinaria Brno.* 2016, 85 (1), 23-31. DOI: 10.2754/avb201685010023. ISSN 0001-7213. Dostupné také z: <http://actavet.vfu.cz/85/1/0023/>
- [27] KARUNAKARAN, M., E. B. CHAKURKAR, U. RATNAKARAN, P. K. NAIK, M. MONDAL, A. MONDAL a N. P. SINGH. Characteristics of boar semen preserved at liquid state. *Journal of Applied Animal Research.* 2016, 45 (1), 217-220. DOI: 10.1080/09712119.2016.1150848. ISSN 0971-2119. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09712119.2016.1150848>
- [28] KNOX, R. V. Semen processing, extending and storage for artificial insemination in swine. *Department of animal sciences University of Illinois.* 2006, 1-7.
- [29] KUSTER, C. E. a G. C. ALTHOUSE. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology.* 2016, 85, 21 - 26.
- [30] LIPENSKÝ, J., A. LUSTYKOVÁ a J. ČEŘOVSKÝ. Effect of season on boar sperm morphology. *Journal of Central European Agriculture.* 2010, 11(4), 465 - 467.
- [31] LIPENSKÝ, J., A. LUSTYKOVÁ, S. FRYDRYCHOVÁ, M. ROZKOT a E. VÁCLAVKOVÁ. Influence of different extenders, dilution rate and storage time on boar sperm progressive motility. *Research in pig breeding.* 2013, 7 (2), 38 - 42.
- [32] LIPENSKÝ, J., A. LUSTYKOVÁ, S. FRYDRYCHOVÁ, E. VÁCLAVKOVÁ, M. ROZKOT a J. ČEŘOVSKÝ. Seminal plasma zinc concentration in relation to sperm quality parameters in boars. *Research in pig breeding.* 2014, 8 (1), 29-31.
- [33] LUSTYKOVÁ, A., S. FRYDRYCHOVÁ, E. VÁCLAVKOVÁ, J. LIPENSKÝ a L. OPLETAL. Effect of natural substances added to semen extender on the boar semen survival time. *Research in pig breeding.* 2012, 6 (1).
- [34] MAES, D., A. LOPEZ RODRIGUEZ, T. RIJSSELAERE, P. VYT a A. VAN SOOM. Artificial Insemination in Pigs. *Artificial Insemination in Farm Animals.* InTech, 2011, 79 - 94. DOI: 10.5772/16592. ISBN 978-953-307-312-5. Dostupné také



z: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-in-pigs>

- [35] MARTÍN, L. O. M., E. C. MUNOZ, F. D. CUPERE, E. V. DRIESSCHE, D. ECHEMENDIA-BLANCO, J. M. M. RODRÍGUEZ a S. BEECKMANS. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*. 2010, 120, 95 - 104.
- [36] MAZUROVÁ, J., R. KUKLA, M. ROZKOT, A. LUSTYKOVÁ, E. SLEHOVÁ, R. SLEHA, J. LIPENSKÝ a L. OPLETAL. Use of natural substances for boar semen decontamination. *Veterinární Medicína*. 2016, 60 (5), 235-247. DOI: 10.17221/8175-VETMED. ISSN 03758427.
- [37] MORRELL, J. M. a M. WALLGREN. Colloid Centrifugation of Boar Semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011a, 46 (2), 18-22. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01866.x. ISSN 0936-6768. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2011.01866.x>
- [38] MORRELL, J. M., M. WIENEN a M. WALLGREN. Single Layer Centrifugation Can Be Scaled-Up Further to Process up to 150 mL Semen. *ISRN Veterinary Science*. 2011b, 1-6. DOI: 10.5402/2011/183412. ISSN 2090-4452. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/archive/2011/183412/>
- [39] MORRELL, J. M. a M. WALLGREN. Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. *Pathogens*. 2014, 3 (4), 934-946. DOI: 10.3390/pathogens3040934. ISSN 2076-0817. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2076-0817/3/4/934/>
- [40] MORRELL, J. M. Antimicrobials in boar semen extenders - a risk/benefit analysis. *Journal of Antimicrobial Agents*. 2016, 2 (1), DOI: 10.4172/2472-1212.1000107. ISSN 24721212. Dostupné také z: <https://www.omicsonline.org/open-access/antimicrobials-in-boar-semen-extenders--a-riskbenefit-analysis-antimicro-1000107.php?aid=68711>
- [41] OKAZAKI, T., T. MIHARA, Y. FUJITA, S. YOSHIDA, H. TESHIMA a M. SHIMADA. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology*. 2010, 74 (9), 1691-1700. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.05.019. ISSN 0093691x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X10002736>

- [42] OLASUPO, N. A., D. J. FITZGERALD, M. J. GASSON a A. NARBAD. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*. 2003, 36, 448 - 451. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x. ISBN 10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x>
- [43] OLIVERAS, M. Y. *New insights into boar sperm function and survival from integrated laboratory and field studies*. Girona: Universitat de Girona, 2008. ISBN 978-846-9214-497.
- [44] PINART, E., E. DOMÉNECH, E. BUSSALLEU, M. YESTE a S. BONET. A comparative study of the effects of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* upon boar semen preserved in liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 2017, 177, 65 - 78.
- [45] PRIETO-MARTÍNEZ, N., E. BUSSALLEU, E. GARCIA-BONAVILA, S. BONET a M. YESTE. Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Animal Reproduction Science*. 2014, 148, 72 - 82.
- [46] ROZEBOOM, K. J. Evaluating boar semen quality. *Animal Science Facts: Extension Swine Husbandry*. North Carolina, 2000.
- [47] SEPÚLVEDA, L., E. BUSSALLEU, M. YESTE a S. BONET. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2014, 150, 96 - 106.
- [48] SEPÚLVEDA, L., E. BUSSALLEU, M. YESTE a S. BONET. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on sperm capacitation and protein phosphorylation of boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2016, 85, 1421 - 1431.
- [49] SCHULZE, M., C. AMMON, K. RÜDIGER, M. JUNG a M. GROBBEL. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*. 2015, 85, 430-437.
- [50] SCHULZE, M., M. DATHE, D. WABERSKI a K. MÜLLER. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 2016, 85, 39 - 46.

- [51] SCHULZE, M., C. AMMON, J. SCHAEFER, A. M. LUTHER, M. JUNG a D. WABERSKI. Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. *Animal Reproduction Science*. 2017, 182, 138-145.
- [52] SMITAL, J. Ředění a konzervace kančího spermatu pro účely inseminace. *Náš chov* [online]. 2001 [cit. 2017-11-27]. Dostupné z: <http://naschov.cz/redeni-a-konzervace-kanciho-spermatu-pro-ucely-inseminace/>
- [53] SURJAWIDJAJA, J. E., Aa HIDAYAT a M. LESMANA. Growth Inhibition of Enteric Pathogens by Zinc Sulfate: An in vitro Study. *Medical Principles and Practice*. 2004, 13 (5), 286-289. DOI: 10.1159/000079529. ISSN 1423-0151. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/79529>
- [54] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>.
- [55] ÚBEDA, J. L., R. AUSEJO, Y. DAHMANI, M. V. FALCETO, C. MALO a F.C. PEREZ-MARTINEZ. Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology*. 2013, 80, 565-570.
- [56] XU, J., F. ZHOU, B. P. JI, R. S. PEI a N. XU. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, 47 (3), 174-179. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x. ISSN 02668254. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>
- [57] YÁÑIZ, J. L., M. A. MARCO-AGUADO, J. A. MATEOS a P. SANTOLARIA. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Animal Reproduction Science*. 2010, 122, 142 - 149.
- [58] YILMAZ, M. T. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *TÜBİTAK*. 2012, 42 (2), 1423 - 1429. DOI: 10.3906/sag-1205-83.
- [59] YOO, S. J., S. y. SUNWOO, S. w. SEO a Y. S. LYOO. Comparison of antibiotic resistance profiles for *Escherichia coli* isolated from wild boar and domestic pig fecal samples. *Korean J. Vet. Res.* 2015, 55 (1), 41 – 46.