



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01326**

(22) Data de depozit: **06.12.2011**

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPI nr. **9/2012**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "OVIDIUS"
CONSTANȚA, BD. MAMAIA NR.124,
CONSTANȚA, CT, RO

(72) Inventatori:
• ZAMFIRESCU STELA FILOFTEIA,
BD.TOMIS, NR.267, BL.T4, SC.A, ET.1,
AP.6, CONSTANȚA, CT, RO;

• DOBRIN NICOLAE, ALEEA PAJUREI,
NR.9, BL.FE6, SC.A, ET.1, AP.7,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ANGHEL ANDREEA HORTANSE,
STR.FĂGETULUI, NR.29, CONSTANȚA, CT,
RO

(54) **PRODUS SEMINAL REFRIGERAT DE BERBEC ȘI ȚAP CU
VIABILITATE DE 5 ZILE**

(57) Rezumat:

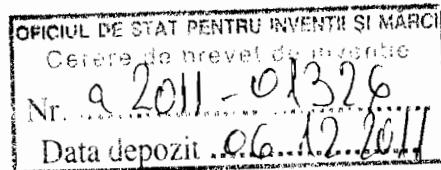
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs seminal refrigerat, provenind de la berbec și țap, cu viabilitate de 5 zile, cu utilizare în zootehnie și medicină veterinară. Procedeul conform inventiei constă din aceea că, într-o perioadă de maximum 15 min, materialul seminal colectat se diluează într-un mediu de diluție pe bază de citrat de sodiu, glucoză și gălbenuș de ou, din care rezultă două fracțiuni, la 32°C

și la 20°C, cea de-a doua conținând fracțiunea glicerinică, produsul rezultat fiind în final echilibrat, ambalat și transportat la rece, obținându-se un material seminal ce prezintă o fertilitate de 71% la 24 h după conservare, 68% după 48 h și, respectiv, 64 sau 53% după 72, respectiv, 94 h.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conjuinate în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Produs seminal refrigerat de berbec și țap cu viabilitate de 5 zile

Inventia se referă la un produs seminal refrigerat de berbec și țap conservat prin refrigerare până la 5 zile cu aplicabilitate în zootehnie și medicină veterinară, ca principal mijloc de difuzare a progresului genetic la rumegatoarele mici.

Obiectivul prezervării spermatozoizilor la temperaturi subambientale (21°C) este acela de a scădea metabolismul lor în scopul prelungirii viabilității. S-a constatat că o gamă largă de temperaturi din intervalul $+2\text{--}+15^{\circ}\text{C}$ asigură menținerea viabilității și fertilității celulelor. Sperma de berbec se diluează imediat după colectare în mediu salin, cu adăos de galbenus de ou și la țap diluarea se face numai după îndepartarea plasmei seminale prin spalare și centrifugare, după care concentratul de celule se diluează în același tip de mediu.

Metodele cunoscute de conservare pe durată scurtă a spermei de berbec și țap constau din prezervarea la $+12^{\circ}\text{C}$ - $+15^{\circ}\text{C}$ timp de 10 ore și refrigerarea la $+2^{\circ}\text{C}$ - $+5^{\circ}\text{C}$ timp de 24 de ore. Diluarea se face în mediul salin citrat de sodiu, glucoza și galbenus de ou la o rată de 1/15. Rezultatele fertilității după inseminare artificială la femele sunt variabile, de la 40% la 65%.

Soluțiile cunoscute din stadiul tehnicii pentru conservarea materialului seminal ovin prezintă dezavantajul că nu asigură perioadă adecvată de viabilitate a celulelor spermaticice.

Problema tehnică pe care o rezolvă inventia constă din elaborarea unor etape de procedeu pentru obținerea unui material seminal cu viabilitate îmbunătățită.

Produsul seminal refrigerat de berbec și țap, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că se obține din parcurgerea etapelor de selectare și pregătire a masculilor de la care se va colecta sperma, colectarea

materialului seminal la o temperatură de (33 °C), determinarea volumului ejaculatului și densității în spermatozoizi, după care se efectuează prediluția materialului seminal în raport de 1/1 cu diluant la o temperatură de 32 °C pe bază citrat 2,9g%, glucoză 0,8 g% și gălbenuș de ou 20%, evaluarea motilității, viabilității și a concentrației prin tehnici în sine cunoscute, calculul diluției finale a spermei, în raport de concentratie, pentru a se asigura 5×10^9 celule / ml, diluția finală (20 °C) prin adaugarea a 2-4 volume de diluant salin conținând glicerina 1% ca agent crioprotector, echilibrarea spermei diluate timp de 2,5 ore prin plasarea recipientului ce conține sperma diluată pe baie de apă, la frigider, pentru răcire la o temperatură de +4...+5°C, ambalarea în pachete de plastic de 0,25 ml și transportul la rece a materialului seminal diluat, astfel încât, produsul rezultat testat prezintă o fertilitate de 71 % la 24 de ore după conservare, 68 % după 48 de ore, de 64% și respectiv 53% după 72 și 94 de ore.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- colectarea și procesarea și difuzarea spermei din 5 în 5 zile,
- consecințele sunt de natură economică, deoarece sperma este transportată mai rar pe distanțe variante ;
- foloseste rational resursele umane;
- utilizează rational materialul biologic valoros din punct de vedere genetic;
- după inseminarea artificială a oilor și caprelor se obțin rezultate de fertilitate de 54%-71 % cu 9-15% mai mari, fata de sperma refrigerată fără glicerina și conservată prin refrigerare , doar 24 de ore;
- foloseste dilutii în rate mai mici, de 5-7, care asigură o concentratie în spermatozoizi de cel puțin 5×10^8 celule / ml de sperma la berbec și de 4×10^8 celule / ml la sperma de tap.

Produsul refrigerat de berbec și tap, necesită mai multe faze de procesare și anume: colectare , diluare, controlul calitatii spermei , echilibrare, ambalare și difuzare zilnică la utilizatorii.

Produsul seminal refrigerat de berbec și tap cu viabilitate de 5 zile realizat după procedeul propus de autori , prelungeste viabilitatea celulelor spermaticice și perioada de utilizare cu inca 4 zile. Viabilitatea și motilitatea celulelor din

momentul colectarii (mai mare de 80%) se mentine timp de 24 de ore dupa care, scade treptat cu 5% in fiecare zi. Cea mai miva viabilitate acceptata este de 60%. Aceasta viabilitate se mentine crescuta pe toata durata conservarii, datorita crioprotectiei fata de socul rece conferita de glicerina. Metoda de procesare a spermei de berbec si tap , mediile de diluare si timpii de realizare a fazelor de procesare sunt originali, stabiliți dupa o perioada lunga de experimentare “*in vitro*” si “*in vivo*”. Perioada de manipulare a spermei in vitro, de la colectare si pana la inceperea refrigerarii(echilibrare) este foarte scurta, respectiv de 15 minute.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a inventie:

Procedeul de obtinerea a produsului seminal refrigerat de berbec si tap cu viabilitate de 5 zile, conform inventiei, constă din următoarele etape:

- 1.selectarea și pregătirea masculilor de la care se va colecta sperma;
- 2.colectarea materialului seminal (33°C);
- 3. determinarea volumului ejaculatului și densitatii in spermatozoizi
- 4.prediluția materialului seminal în raport de 1/1 cu diluant (32°C)
pe bază citrat(2,9g%), glucoza (0,8 g%)si de gălbenuș de ou (20%)
- 5.evaluarea motilității, viabilității și a concentrației ;
- 6.calculul diluției finale a spermei, se face in raport de concentratie, pentru a asigura 5×10^9 celule / ml si
- 7.diluția finală (20°C) prin adaugarea a 2-4 volume de diluant salin ce contine glicerina 1%) și
- 8.echilibrarea spermei diluate 2,5 ore prin plasarea recipientului ce conține sperma diluată pe baie de apă, la frigider, pentru răcire (+4- $+5^{\circ}\text{C}$);
- 9.ambalarea în pachete de plastic de 0,25 ml si transportul la rece a materialului seminal diluat .

Conform inventiei, produsul seminal, este obținut prin parcurgerea a 9 etape principale:

1. Selectarea și pregătirea masculilor de la care se va colecta sperma în funcție de criteriile de sanatate, de valoarea lui genetica si de dresaul masculilor

pentru colectarea artificială a spermei. Dupa o perioada lungă de inactivitate sexuală, prin dresaj trebuie eliminate 15 ejaculate, favorizând spermatogeneza în noile condiții de exploatare și alimentație.

2. Colectarea materialului seminal se face cu vagina artificială individuală pentru fiecare individ, în pahare de colectare sterile, menținute în termostat la 37°C. De la fiecare animal se pot recolta 1-2 ejaculate, la interval de 5-10 minute..

3. Masurarea volumului ejaculatului se face prin citirea diviziunilor de pe paharul de colectare iar densitatea se apreciază în funcție de consistență(aspectul de smantana groasă corespunde unei densități mari , respectiv unei concentrații de 50×10^8 celule / ml, în timp ce ejaculatele cu aspect lăptos au sub 1×10^8 celule spermatiche. Volumele ejaculatelor mai mici de 0,5 ml și aspect aproape sunt aruncate

4. Prediluția sedimentului cu diluant ce conține gălbenuș de ou 20% (v/v), în raport de 1/1 (v/v), la 32 °C. Prediluția are rolul de a oferi suportul nutritiv și de protecție, menținând viabilitatea spermei la temperatura camerei cîteva ore.Datorita concentratiei mari de celule spermatiche într-un volum de plasmă foarte mic, spermatozoizii își consumă rapid rezervele nutritive în cîteva minute, acumulându-se acid lactic care acidifiază mediul și produce moarte celulară. Supraviețuirea spermatozoizilor în plasma seminală este limitată la cîteva yeci de minute, făcând necesară diluarea suspensiei de spermatozoizi într-o soluție capabilă să conserve capacitatea de fertilizare a spermatozoizilor pe timpul stocării "in vitro" la temperaturi joase. Pentru conservarea lichidă sperma trebuie diluată într-un mediu nutritiv care să susțină supraviețuirea în condiții de reducere a activității metabolice, când poate interveni atât o capacitate precoce, dar și moarte celulară. Stocarea prin refrigerare a materialului seminal la animalele de fermă are scopul de a reduce gradul fosforilării proteice endogene pentru a preveni capacitatea precoce

5. Evaluarea motilității, viabilității și a concentrației, precum și calculul diluției finale. Motilitatea, viabilitatea și concentrația probelor de spermă sunt analizate prin aceleași metode ca în cazul tehnologiei de conservare prin congelare.

Motilitatea minim admisă pentru sperma ce va fi supusă diluării în vederea refrigerării este de 80%.

Concentrația (densitatea) este o caracteristică importantă de care depinde diluția ulterioară. Sperma acceptată pentru diluare-procesare trebuie să conțină minim 1,5 miliarde spermaticice /ml.

6.Calculul diluției finale de spermatozoizi în doza ce va fi însămânțată:

-în general se însămânțează o doză de 0.25 ml spermă ce trebuie să conțină în jur de $300-400 \times 10^6$ spz, adică o concentrație finală C_f de aproximativ $1-1.6 \times 10^9$ spz/ml.

-se notează V_0 volumul inițial, C_0 concentrația inițială și N numărul de spermatozoizi inițial

-volumul final V_f va fi dat de raportul N/C_f

Volumul de diluant ce urmează a fi adăugat va fi dat de relația

$$V = V_f - V_0 \text{ (volumul initial)} - V_0 \text{ (adăugat la prediluție)}$$

7. Diluția finală se face prin adăugarea restului de diluant ce conține glicerina 2 % ,gălbenuș de ou, la temperatură de 20°C .

8. Echilibrarea flacoanele cu spermă diluată sunt introduse la frigider, pe baie de apă, pentru a se asigura scăderea progresivă a temperaturii până la $+5^\circ\text{C}$, temperatura de stocare. La această temperatură are loc scăderea metabolismului bazal al spermatozoizilor, asigurându-se menținerea viabilității pentru o perioadă mai mare de timp comparativ cu sperma menținută la temperaturi mai mari. Deoarece celula spermatică este foarte sensibilă la şocul rece, scăderea temperaturii trebuie să se facă încet și progresiv.

9.Ambalarea in paie de plastic de 0.25 ml este preferabilă deoarece permite o bună identificare și ușurința în transport și manipulare în cazul inseminării artificiale. Ambalarea se face în camera frigorifica la temperatură de $+2^\circ\text{C}$ în paie sau flacoane de sticlă , individualizate iar transportul este obligatoriu să se facă în termos cu gheăță , suficientă care să mențină temperatura de $+4^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C}$.

Calitatea spermei refrigerate este mai mare în condițiile realizării fazelor 1-7 , în 15 minute iar echilibrarea durează 2,5 . Sperma se inseminează la

06-12-2011

19

femele în estru indus sau natural în doză de 0,25 ml și o concentrație de 12×10^7 celule/doză. Astfel motilitatea și viabilitatea celulelor se menține nemodificată de la colectare și după echilibrare, iar după pastrare prelungită sub forma refrigerată.

Dupa 48 de ore motilitatea scade cu 5 % in a 3-a zi de pastrare la +4 °C, și cu 9% și 18% după 72 ore și respectiv 96 ore de conservare la rece.

Testarea in vivo a spermei refrigerate a asigurat o fertilitate de 71 % la 24 de ore după conservare , 68 % după 48 de ore , de 64% și respectiv 53% după 72 și 94 de ore.

Produs seminal refrigerat de berbec și tap cu viabilitate de 5 zile

Revendicari

1. Produs seminal refrigerat de berbec și tap conservat prin refrigerare pâna la 5 zile cu utilizare în zootehnie și medicină veterinară **caracterizat prin aceea că** se obține din parcurgerea etapelor de selectare și pregătire a masculilor de la care se va colecta sperma, colectarea materialului seminal la o temperatură de (33 °C), determinarea volumului ejaculatului și densității în spermatozoizi, după care se efectuează prediluția materialului seminal în raport de 1/1 cu diluant la o temperatură de 32 °C pe bază citrat 2,9g%, glucoză 0,8 g% și gălbenuș de ou 20%, evaluarea motilității, viabilității și a concentrației prin tehnici în sine cunoscute, calculul diluției finale a spermei, în raport de concentratie, pentru a se asigura 5×10^9 celule / ml, diluția finală (20 °C) prin adaugarea a 2-4 volume de diluant salin conținând glicerina 1% ca agent crioprotector, echilibrarea spermei diluate timp de 2,5 ore prin plasarea recipientului ce conține sperma diluată pe baie de apă, la frigider, pentru răcire la o temperatură de +4...+5°C, ambalarea în pachete de plastic de 0,25 ml și transportul la rece a materialului seminal diluat, astfel încât, produsul rezultat testat prezintă o fertilitate de 71 % la 24 de ore după conservare, 68 % după 48 de ore, de 64% și respectiv 53% după 72 și 94 de ore.