



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **06/12/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/04/2016** BOPI nr. **4/2016**

(41) Data publicării cererii:
28/09/2012 BOPI nr. **9/2012**

(73) Titular:
• UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN
CONSTANȚA, BD.MAMAIA NR.124,
CONSTANȚA, CT, RO

(72) Inventatori:
• ZAMFIRESCU STELA FILOFTEIA,
BD.TOMIS NR.267, BL.T 4, SC.A, ET.1,
AP.6, CONSTANȚA, CT, RO;
• DOBRIN NICOLAE, ALEEA PAJUREI
NR.9, BL.FE 6, SC.A, ET.1, AP.7,
CONSTANȚA, CT, RO;
• ANGHEL ANDREEA HORTANSE,
STR.FĂGETULUI NR.29, CONSTANȚA, CT,
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
FLORIN VARO GHIURU, IOAN LADOȘI,
IULIAN ROMAN, ANDREA HETTIG,
MARIUS ZĂHAN, VASILE MICLEA,
"ANTIOXIDANT MEDIUM FOR
MANGALITA BOAR SEMEN
CRYOPRESERVATION", BULLETIN
UASVM ANIMAL SCIENCE AND
BIOTECHNOLOGIES, 67 (1-2), 2010;
MARIUS ZĂHAN, VASILE MICLEA,
FLORIN GHIURU, IULIAN ROMAN,
ALEXANDRU RUSU, ILEANA MICLEA,
MANUEL MIHĂILESCU, "THE INFLUENCE
OF FREEZING ON SOME RARE BREEDS
BOAR SEMEN CRYOPRESERVATION",
BULLETIN UASVM ANIMAL SCIENCE AND
BIOTECHNOLOGIES, 67 (1-2), 2010

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNUI PRODUS SEMINAL
REFRIGERAT DE BERBEC ȘI ȚAP ȘI PRODUSUL OBTINUT
PRIN ACEST PROCEDEU**



RO 127804 B1

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

5 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
7 temperaturi din intervalul +2...+15°C asigură menținerea viabilității și fertilității celulelor. Sperma
de berbec se diluează imediat după colectare în mediu salin, cu adaos de gălbenuș de ou, iar
9 la țap diluarea se face numai după îndepărtarea plasmei seminale prin spălare și centrifugare,
după care concentratul de celule se diluează în același tip de mediu.

11 Metodele cunoscute de conservare pe durată scurtă a spermei de berbec și țap constau
din prezervarea la +12...+15°C, timp de 10 h, și refrigerarea la +2...+5°C, timp de 24 h. Diluarea
13 se face în mediul salin citrat de sodiu, glucoză și gălbenuș de ou, la o rată de 1/15. Rezultatele
fertilității după inseminare artificială la femele sunt variabile, de la 40% la 65%.

15 Documentul **Florin Varo Ghiuru, Ioan Ladosi, Iulian Roman, Andrea Hettig, Marius**
Zăhan, Vasile Miclea, "Antioxidant Medium for Mangalita Boar Semen Cryopreservation",
17 **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 67(1-2)/2010** se referă la stabilirea
condițiilor tehnice ale crioconservării indispensabile a spermei de vier, pentru ameliorarea
19 eficienței porcului nativ de Mangalița. Obiectivul acestui studiu a fost de a determina dacă acidul
ascorbic este capabil să îmbunătățească semnificativ calitatea spermatozoizilor crioconservați,
21 din porci de Mangalița. Ejaculatul de la porcul de Mangalița și PIC (ca comparație) spermă de
porc congelată într-un extender suplimentat cu 200 μM acid ascorbic (vitamina C), 400 μM
Trolox® (o vitamina E hidrosolubilă analog), 200 + 400 μM vit. C + vit. E, 200 + 200 μM vit. C
23 + vit. E sau fără suplimentare a fost decongelat și apoi a fost evaluată motilitatea
spermatozoizilor. Tratatamentul cu 200 + 400 μM vit. C + vit. E are efectul cel mai benefic asupra
25 motilității spermatozoizilor de Mangalița după congelate-decongelare printre concentrațiile
testate ($P < 0,05$), iar documentul **Marius Zăhan, Vasile Miclea, Florin Ghiuru, Iulian Roman,**
27 **Alexandru Rusu, Ileana Miclea, Manuel Mihăilescu, "The Influence of Freezing on Some**
Rare Breeds Boar Semen Cryopreservation", Bulletin UASVM Animal Science and
29 **Biotechnologies, 67(1-2)/2010** se referă la cercetări în crioconservarea materialului seminal
de vier, aplicarea de îngheț-dezghet (FT) a materialului seminal în programe de inseminare
31 artificială comercială (AI) este încă limitată. Principalele surse de material seminal utilizate în
AI sunt păstrarea materialului seminal la temperatura camerei (RT) și, uneori, a materialului
33 seminal proaspăt (F). Cu toate acestea, utilizarea germoplasmei de mascul din genebank pe
unele rase rare este legată de capacitatea de a folosi material seminal congelat. Scopul acestui
35 studiu a fost de a evalua efectul metodei de conservare a materialului seminal și, în special,
influența congelării pe Mangalița Roșu și crioconservarea materialului seminal de vier de Bazna.

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

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

41 Procedeu de obținere a produsului seminal refrigerat de berbec și țap, conform invenției,
elimină dezavantajele menționate prin aceea că se obține prin parcurgerea etapelor de
43 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 a densității în
45 spermatozoizi, după care se efectuează prediluția materialului seminal în raport de 1/1 cu
diluante, la o temperatură de 32°C, pe bază citrat 2,9 g%, glucoză 0,8 g% și gălbenuș de ou
47 20%, evaluarea motilității, viabilității și a concentrației prin tehnici în sine cunoscute, calculul

RO 127804 B1

diluției finale a spermei, în raport de concentrație, pentru a se asigura 5×10^9 celule/ml, diluția finală (20°C) prin adăugarea a 2...4 volume de diluant salin, conținând glicerină 1% ca agent crioprotector, echilibrarea spermei diluate timp de 2,5 h, prin plasarea recipientului ce conține sperma diluată pe baie de apă, la frigider, pentru răcire la o temperatură de +4...+5°C, ambalarea în paiete de plastic de 0,25 ml și transportul la rece al materialului seminal diluat, astfel încât produsul rezultat testat prezintă o fertilitate de 71% la 24 h după conservare, 68% după 48 h, de 64% și, respectiv, 53% după 72 și 94 h. 1
3
5
7

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- colectarea, procesarea și difuzarea spermei din 5 în 5 zile; 9
- consecințele sunt de natură economică, deoarece sperma este transportată mai rar pe distanțe variate; 11

- folosește rațional resursele umane; 11
- utilizează rațional materialul biologic valoros din punct de vedere genetic; 13
- după inseminarea artificială a oilor și caprelor, se obțin rezultate de fertilitate de 54...71%, cu 9...15% mai mari, față de sperma refrigerată fără glicerină, și conservată prin refrigerare, doar 24 h; 15

- folosește diluții în rate mai mici, de 5...7, care asigură o concentrație în spermatozoizi de cel puțin 5×10^8 celule/ml de spermă la berbec, și de 4×10^8 celule/ml la spermă de țap. 17

Produsul refrigerat de berbec și țap necesită mai multe faze de procesare, și anume: 19
colectare, diluare, controlul calității spermei, echilibrare, ambalare și difuzare zilnică la utilizatori.

Produsul seminal refrigerat, de berbec și țap, cu viabilitate de 5 zile, realizat după 21
procedeul propus de autori, prelungeste viabilitatea celulelor spermatice și perioada de utilizare cu încă 4 zile. Viabilitatea și motilitatea celulelor din momentul colectării (mai mare de 80%) se 23
menține timp de 24 h, după care scade treptat cu 5% în fiecare zi. Cea mai mică viabilitate acceptată este de 60%. Această viabilitate se menține crescută pe toată durata conservării, 25
datorită crioprotecției față de șocul rece, conferită de glicerină. Metoda de procesare a spermei de berbec și țap, mediile de diluare și timpii de realizare a fazelor de procesare sunt originali, 27
stabiliți după o perioadă lungă de experimentare *in vitro* și *in vivo*. Perioada de manipulare a spermei *in vitro*, de la colectare și până la începerea refrigerării (echilibrare), este foarte scurtă, 29
respectiv, de 15 min.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției. 31

Exemplu

Procedeul de obținere a produsului seminal refrigerat, de berbec și țap, cu viabilitate de 33
5 zile, conform invenției, constă din următoarele etape:

- selectarea și pregătirea masculilor de la care se va colecta sperma; 35
- colectarea materialului seminal (33°C);
- determinarea volumului ejaculatului și densității în spermatozoizi; 37
- prediluția materialului seminal în raport de 1/1 cu diluant (32°C) pe bază citrat (2,9 g%), glucoză (0,8 g%) și gălbenuș de ou (20%); 39

- evaluarea motilității, viabilității și a concentrației;
- calculul diluției finale a spermei se face în raport de concentrație, pentru a asigura 41
 5×10^9 celule/ml;

- diluția finală (20°C) prin adăugarea a 2...4 volume de diluant salin ce conține glicerină 43
(1%);

- echilibrarea spermei diluate 2,5 h, prin plasarea recipientului ce conține sperma diluată 45
pe baie de apă, la frigider, pentru răcire (+4...+5°C);

- ambalarea în paiete de plastic de 0,25 ml, și transportul la rece al materialului seminal 47
diluat.

RO 127804 B1

- 1 Conform invenției, produsul seminal este obținut prin parcurgerea a 9 etape principale:
- 3 1. selectarea și pregătirea masculilor de la care se va colecta sperma, în funcție de
5 criteriile de sănătate, de valoarea lui genetică și de dresajul masculilor pentru colectarea
7 artificială a spermei. După o perioadă lungă de inactivitate sexuală, prin dresaj trebuie eliminate
9 15 ejaculate, favorizând spermatogeneza în noile condiții de exploatare și alimentație;
 - 11 2. colectarea materialului seminal se face cu vagina artificială individuală, pentru fiecare
13 individ, în pahare de colectare sterile, menținute în termostat la 37°C. De la fiecare animal se
15 pot recolta 1...2 ejaculate, la interval de 5...10 min;
 - 17 3. măsurarea volumului ejaculatului se face prin citirea diviziunilor de pe paharul de
19 colectare, iar densitatea se apreciază în funcție de consistență (aspectul de smântână groasă
21 corespunde unei densități mari, respectiv, unei concentrații de 50×10^8 celule/ml, în timp ce
23 ejaculatele cu aspect lăptos au sub 1×10^8 celule spermaticice. Volumele ejaculatelor mai mici
25 de 0,5 ml și aspect apos sunt aruncate;
 - 27 4. prediluția sedimentului cu diluant ce conține gălbenuș de ou 20% (v/v), în raport de
29 1/1 (v/v), la 32°C. Prediluția are rolul de a oferi suportul nutritiv și de protecție, menținând
31 viabilitatea spermei la temperatura camerei câteva ore. Datorită concentrației mari de celule
33 spermaticice într-un volum de plasmă foarte mic, spermatozoizii își consumă rapid rezervele
35 nutritive, în câteva minute, acumulându-se acid lactic ce acidifică mediul și produce moarte
37 celulară. Supraviețuirea spermatozoizilor în plasma seminală este limitată la câteva zeci de
39 minute, făcând necesară diluarea suspensiei de spermatozoizi într-o soluție capabilă să
41 conserve capacitatea de fertilizare a spermatozoizilor pe timpul stocării *in vitro* la temperaturi
43 joase. Pentru conservarea lichidă, sperma trebuie diluată într-un mediu nutritiv care să susțină
45 supraviețuirea în condiții de reducere a activității metabolice, când poate interveni atât o
47 capacitate precoce, cât și moartea 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 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 minimum 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 x 10⁶ spz, adică o concentrație finală C_f de aproximativ $1...1,6 \times 10^9$ spz/ml;
 - se notează V_o volumul inițial, C_o 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:
$$V = V_f - V_o \text{ (volumul inițial) } - V_o \text{ (adăugat la prediluție);}$$
 7. diluția finală se face prin adăugarea restului de diluant ce conține glicerină 2%,
gălbenuș de ou, la temperatura 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°C, temperatura de stocare.
La această temperatură are loc scăderea metabolismului bazal al spermatozoizilor, asigu-
rându-se menținerea viabilității pentru o perioadă mai mare de timp, comparativ cu sperma
menținută la temperaturi mai mari. Pentru că celula spermatică este foarte sensibilă la șocul
rece, scăderea temperaturii trebuie să se facă încet și progresiv;

RO 127804 B1

9. ambalarea în paiete de plastic de 0,25 ml este preferabilă deoarece permite o bună identificare și ușurință în transport și manipulare, în cazul inseminării artificiale. Ambalarea se face în camera frigorifică la temperatura de + 2°C, în paiete sau flacoane de sticlă, individualizate, iar transportul este obligatoriu să se facă în termos cu gheață suficientă, care să mențină temperatura de +4...+5°C.

Calitatea spermei refrigerate este mai mare în condițiile în realizării fazelor 1...7 în 15 min, iar echilibrarea durează 2,5 h. Sperma se inseminează la 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 mențin nemodificate de la colectare și după echilibrare, și după păstrare prelungită, sub formă refrigerată.

După 48 h motilitatea scade cu 5%, în a 3-a zi de păstrare la + 4°C, și cu 9% și 18% după 72 h și, respectiv, 96 h de conservare la rece.

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

Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a unui produs seminal refrigerat, de berbec și țap, **caracterizat prin aceea că** se colectează materialul seminal la o temperatură de 33°C, pe o perioadă de maximum 15 min, se diluează într-un raport de 1/1 la temperatura de 32°C, într-un mediu de diluție pe bază de citrat de sodiu 2,9% în greutate, glucoză 0,8% în greutate și gălbenuș de ou 20% în greutate, se evaluează motilitatea, viabilitatea și concentrația, se calculează diluția finală a spermei în raport de concentrație, pentru a se asigura 5×10^9 celule/ml, se realizează diluția finală la 20°C, prin adăugarea a 2...4 volume de diluant salin conținând glicerină 1%, ca agent crioprotector, se echilibrează sperma diluată timp de 2,5 h, prin plasarea recipientului ce conține sperma diluată pe baie de apă la + 4...+ 5°C, se ambalează în paiete de plastic de 0,25 ml și se transportă la rece.

13

2. Produs seminal refrigerat, de berbec și țap, obținut prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** prezintă o fertilitate de 71% la 24 h după conservare, 68% după 48 h și, respectiv, 64% sau 53% după 72, respectiv, 94 h.

15

