



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00355

(22) Data de depozit: 22/06/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/12/2022 BOPI nr. 12/2022

(71) Solicitant:  
• STAȚIUNEA DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CREȘTEREA BOVINELOR DANCU-IAȘI,  
ȘOS.IAȘI-UNGHENI NR.9, DANCU, IS, RO

(72) Inventatori:  
• BORȘ SILVIU-IONUȚ, STR.DACIA, NR.9,  
SAT DANCU, COMUNA HOLBOCA, IS, RO

(54) METODĂ DE OBTINERE A SERULUI SANGUIN DE VACĂ  
ÎN SUPERESTRU

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a serului sanguin de vacă în superestru utilizat într-o tehnologie de fertilizare *in vitro* la taurine. Metoda, conform invenției, constă în etapele de: stimulare a vacii donatoare în zilele 9-12 după ziua estrului cu o doză amestec de câte 150, 125, 75, 50 UI hormon de stimulare a creșterii foliculare (FSH), respectiv, hormon luteinizant (LH), în ziua 13, evaluarea ecografică a ovarului privind foliculii ovarieni maturi, recoltarea sângelui prin puncție venoasă pentru obținerea serului sanguin în vacu-

tainere cu activator de coagulare, depozitarea vacu-tainerelor, imediat, la temperatura de 2...4°C, timp de 30 min, recoltarea serului sanguin și purificarea biologică a acestuia prin filtrarea cu filtru de 0,22 μm, rezultând serul sanguin de vacă în superestru, care prezintă eficacitate maximă dată de capacitatea de a determina *in vitro* selecția și dezvoltarea concomitentă a mai multor foliculii ovarieni maturi.

Revendicări: 2



## METODĂ DE OBTINERE A SERULUI SANGUIN DE VACĂ ÎN SUPERESTRU

### 1. DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la o biotehnologie de fertilizare *in vitro* (FIV) la taurine, în special prin producerea unui ser sanguin de vacă în superestru ce poate suplimenta mediile FIV de maturare și cultură celulară, în scopul îmbunătățirii acestora pentru creșterea cantitativă și calitativă a numărului de embrioni produși.

Se mai cunoaște o metodă de producere a serului fetal bovin ce este utilizat în mediile de maturare a complexelor ovocit-celule cumulus din cadrul programelor FIV, dar prezintă următoarele dezavantaje:

1. Acest ser este produs de firme specializate iar prețul de achiziție este mare;
2. Este foarte greu de produs acest ser deoarece trebuie recoltat de la fetusul ce se află în uterul vacii gestante.

Se mai cunoaște o metodă de producere a serului de vacă în estru ce este utilizat în mediile de maturare a complexelor ovocit-celule cumulus și de cultură a prezumtivilor zigoți din cadrul programelor FIV dar și această ser prezintă unele dezavantaje:

1. În unele studii utilizarea serului de vacă în estru pentru îmbunătățirea mediilor de maturare nu a avut efect asupra procesului de maturare a complexelor ovocit-celule cumulus, ci asupra ratei de fertilizare *in vitro* a acestora.
2. În alte studii utilizarea serului de vacă în estru nu a avut efect asupra programelor de fertilizare *in vitro* la taurine.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea serului sanguin de vacă în superestru (apărut ca urmare a dezvoltării concomitente a mai multor foliculi ovarieni maturi), filtrat, care crește eficiența programelor de fertilizare *in vitro* prin suplimentarea mediilor de maturare a complexelor ovocit-celule cumulus și de cultură a prezumtivilor zigoți.

Se cunoaște că una din problemele importante ale procesului de fertilizare *in vitro* la taurine este procesul de maturare a complexelor ovocit-celule cumulus. Prin adăugarea acestui ser sanguin de vacă în **superestru**, filtrat (filtru 0,22  $\mu$ m), se realizează o potențare a mediului de maturare și astfel crește șansa ca din complexele ovocit celule cumulus maturate în acest mediu să se dezvolte un număr mai mare de zigoți (prezumtiv embrioni). Totodată, utilizarea acestui ser sanguin în mediile de maturare a complexelor ovocite-celule cumulus dar și în mediile de cultură celulară a prezumtivilor zigoți ar reduce din costurile necesare pentru crearea lor determinând o creștere cantitativă și calitativă a producției de embrioni ce pot fi obținuți prin FIV la vacă.



Invenția se referă în primul rând la **obținerea serului sanguin de vacă în superestru** și filtrarea acestuia cu filtru de 0,22 μm pentru purificarea microbiologică. Pentru obținerea acestui ser sanguin se realizează stimularea vacii donatoare după protocolul prezentat în tabelul 1 în scopul producerii unui număr mare de foliculi ovarieni (terțiari) maturi (figura 1) ce determină starea de superestru. Se observă că eficacitatea serului sanguin este maximă dacă acesta este recoltat imediat înainte de declanșarea semnelor comportamentale specifice estrului, în ultima fază a proestrului și dacă pentru recoltare sunt utilizate juninci. Eficacitatea serului vacilor în superestru este dată de capacitatea acestuia de a determina *in vivo* selecția și dezvoltarea concomitentă a mai multor foliculi ovarieni maturi în comparație cu vacile în estru la care se produce selecția și dezvoltarea unui singur folicul ovarian matur.

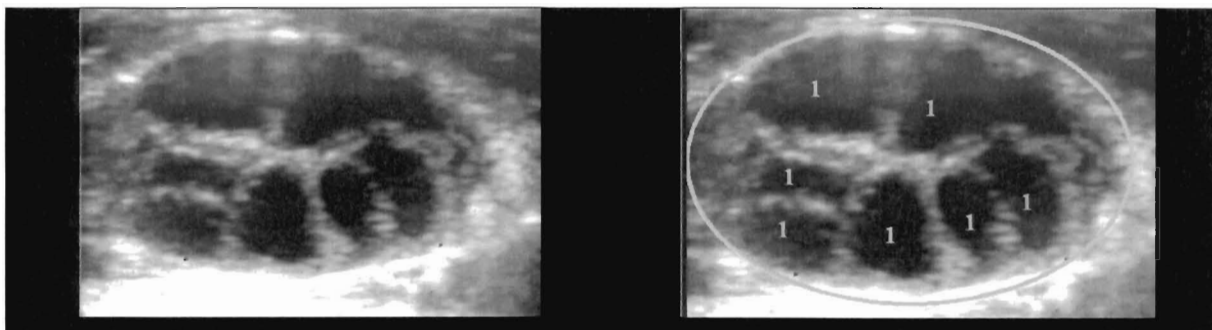
Tabel 1

**Protocol hormonal utilizat pentru inducerea stării de superestru la vaci în scopul recoltării sângelui prin puncție intravenoasă**

<b>Ziua ciclului sexual (ziua 0 = ziua estrului)</b>	<b>Ora tratamentului hormonal</b>	<b>Doza hormonală injectată intramuscular</b>
<b>Ziua 9</b>	8:00 am 20:00 pm	150 UI FSH + 150 UI LH; 150 UI FSH + 150 UI LH;
<b>Ziua 10</b>	8:00 am 20:00 pm	125 UI FSH + 125 UI LH; 125 UI FSH + 125 UI LH;
<b>Ziua 11</b>	8:00 am 20:00 pm	75 UI FSH + 75 UI LH; 75 UI FSH + 75 UI LH;
<b>Ziua 12</b>	8:00 am 20:00 pm	50 UI FSH + 50 UI LH; 50 UI FSH + 50 UI LH;
<b>Ziua 13</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Evaluare ecografică a ovarului cu privire la numărul de foliculi ovarieni (terțiari) maturi (figura 1);</li> <li>2. Recoltarea sângelui pentru obținerea serului sanguin în vacutainere cu activator de coagulare, prin puncție intravenoasă, realizată în ziua 13 la ora 8.00 am;</li> <li>3. Depozitarea vacutainerelor, imediat, la temperatura de 2 - 4°C, pentru aproximativ 30 minute;</li> <li>4. Recoltarea serului sanguin de vacă în superestru.</li> </ol>	

FSH – hormon de stimulare a creșterii foliculare;

LH – hormon luteinizant.



**Figura 1.** Imagine ecografică cu ovarul de vacă aflată în starea de superestru. În stânga este prezentă imaginea brută a ovarului iar în dreapta se evidențiază foliculii ovarieni maturi (sondă ecografică transrectală convexă de 5 MHz, adâncime 8 cm); 1: Foliculi ovarieni (terțieri) maturi. Se observă prezența într-un singur ovar, într-o singură secțiune ecografică, a 7 foliculi ovaieni (terțieri) maturi.

Sângele recoltat în vacutainere cu activator de coagulare este centrifugat la 3000 rot/minut timp de 15 minute. După centrifugare, cu ajutorul unei seringi sterile se recoltează serul sanguin ce este separat de celulele roșii. Serul sanguin de vacă în superestru este apoi depozitat în tuburi eppendorf și congelat la  $-25^{\circ}\text{C}$  în vederea utilizării ulterioare. După decongelare se realizează filtrarea serului sanguin de vacă în superestru cu filtru de  $0,22\ \mu\text{m}$  pentru a produce sterilizare lui în vederea reducerii riscului de contaminare microbiologică a mediilor destinate FIV la taurine. Acest ser sanguin steril determină o creștere cantitativă și calitativă a numărului de embrioni produși atunci când este utilizat în programele de fertilizare *in vitro* la taurine. Menționăm că pentru utilizare, mostre din serul sanguin se evaluează cu privire la gradul de contaminare microbiologică.

Conservarea serului sanguin poate fi realizată la  $-25^{\circ}\text{C}$  până la utilizare.

Mostrele de ser sanguin de vacă în superestru trebuie filtrate cu filtru de  $0,22\ \mu\text{m}$  înainte de utilizare pentru purificarea microbiologică a acestuia.

Metoda de obținere a serului sanguin de vacă în superestru prezintă următoarele avantaje:

1. Nu necesită costuri ridicate pentru realizare;
2. Este ușor de utilizat;
3. Serul de vacă în superestru, produs prin această metodă, este natural și ecologic;
4. Serul de vacă în superestru, produs prin această metodă, are capacitate de stimulare a programele de fertilizare *in vitro* prin creșterea cantitativă și calitativă a numărului de embrioni ce pot fi produși prin biotehnica FIV.

## 2. Revendicări

1. Serul sanguin de vacă în superestru **se caracterizează prin aceea că** este obținut de la vaci aflate în **stare de superestru** ca urmare a prezenței concomitente a mai multor foliculi maturi în ambele ovare.
2. Serul sanguin de vacă în superestru, conform revendicării 1, **se caracterizează prin aceea că** are potențial crescut de stimulare a programelor de fertilizare *in vitro* la taurine dacă este recoltat de la vaci stimulate pentru **a produce mai mulți foliculi ovarieni (terțiari) maturi în același timp.**