VÚVeL VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v. v. i.

SEMINÁŘ

JAK DOCÍLIT ÚSPĚŠNÉ REPRODUKCE U DOJENÉHO SKOTU – VÚVeL Fest V

Hotel FABRIKA, Humpolec
25. dubna 2019

Jak docílit úspěšné reprodukce u dojeného skotu – VÚVeL Fest V

- **Výživa užitkových dojnic v tranzitním období ve vztahu k reprodukci**
  Ing. Petr Brabenec, nezávislý poradce ve výživě

- **Puerperium – klíčové období reprodukčního cyklu**
  MVDr. Antonín Vinkler, CSc., veterinární lékař, specialista na reprodukci

- **Řízení reprodukce v chovech skotu, praktické zkušenosti**
  Ing. Jaromír Nedvěd, poradce akreditovaný MZe

- **Reprodukční biotechnologie - současné možnosti**
  Ing. Marie Machatková, CSc., VÚVeL Brno

Výživa užitkových dojnic v tranzitním období ve vztahu k reprodukci

Ing. Petr Brabenec
nezávislý poradce ve výživě

Ing.Petr Brabenec
2019

Managment a výživa užitkových stád dojnic

Česká republika

OBSAH

- ÚČINNÉ LÁTKY TRANZITNÍHO OBDOBÍ
- ÚČINNÉ LÁTKY LAKTACE
- Program tranzitního období
- Socialní vztahy a Welfare tranzit období

PROKAZATELNĚ ZVYŠUJÍCÍ VÝKON DOJNIC

Cíle : FARMA 500 DOJNIC

- ***15 – 17 000 kg mléka / den 33-35l/ustájená***
- ***3,3 bílkovina***
- ***3,8 tuk***
- ***SB do 250***
- ***25 – 30 zaměstnanců celkem***
  500 telat do chovu za rok
- ***Věk při prvním otelení 24 měsíců (560-600 kg***
- ***Brakace prvotelek do 10 %***
- ***35 ks březích krav /měsíc***

Únor 2019

- Z 25 holštýnských farem
- 90 % nad 30 l/ustájená
- 7 farem 33 – 35 l/ ustájená

Agronova	34,4	Puclice	33
Keblov	33,7	Jesenice	32,3
Úněšov	33	Novák	33
Luka	35,7	ZEM	32
Černov	32	Petrovice	33
Č.Janovice	32,7	Louňovice	30

- Neztrácejte čas s obchodním marketingem
- Věnujte pozornost studiím (2014 – 2017)
- Z čeho vycházíš „kolego“
- Můžeš ukázat konkrétní příklad

Kvalita pícnin pro vysokoužitková mléčná stáda: klíčové indikátory užitkovosti

Randy Shaver, Ph.D., PAS, ACAN
Dairy Science Department

THE UNIVERSITY of WISCONSIN MADISON

UW Extension

DEPARTMENT OF DAIRY SCIENCE University of Wisconsin-Madison

Mention of companies, labs, trade names, products or assays solely for the purpose of providing specific information or examples and does not imply recommendation, endorsement or exclusion.

- V.E.Cabrera

Univercity of Wisconsin – Madison Dairy Science

- Dr.Gordie Jones

Managing Partner Central Sands Dairy,LLC

VÝŽIVA TELAT

Program krmení mléka
Rozvoj bachoru
Postupy odstavu
Zdraví telat

Robert Van Saun, DVM, MS, PhD
Department of Veterinary & Biomedical Sciences
Penn State University

Aditiva a účinné látky zvyšující výkon dojnic

- Aditiva tranzitního období
- Aditiva laktace
- Aditiva senážování

Česká republika

- 75 firem s produkty
- 4 600 registrovaných produktů
- Jak se orientovat
- **Rozhodne účinná látka !**

Výběrové řízení

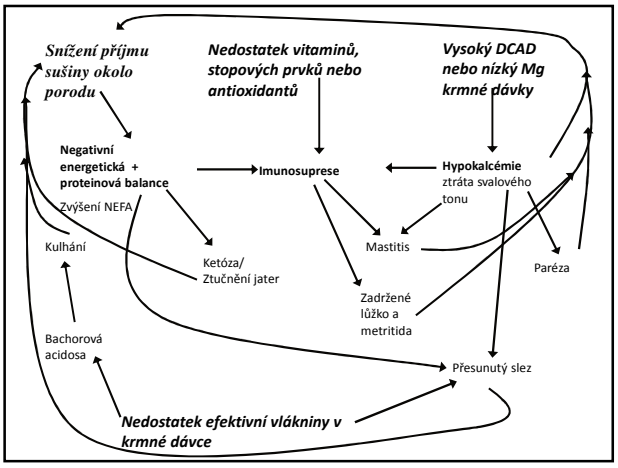
- Neslouží pouze k dorovnání cen produktu
- Určit a stanovit obsah a složení účinné látky v produktu
- Kvalitu účinné látky
- Zdroj a stravitelnost účinné látky

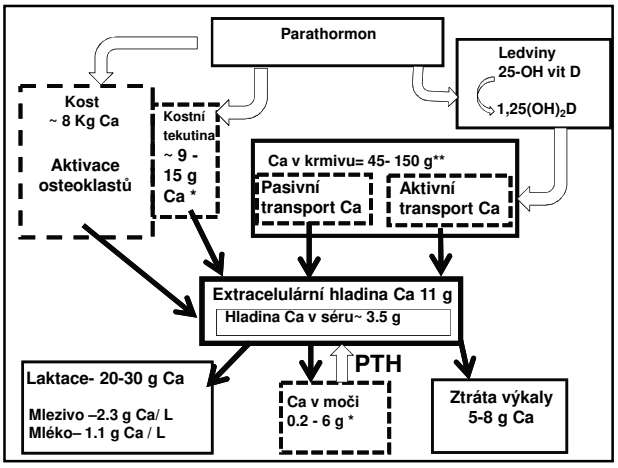
Aditiva v tranzitním období sucho a porod

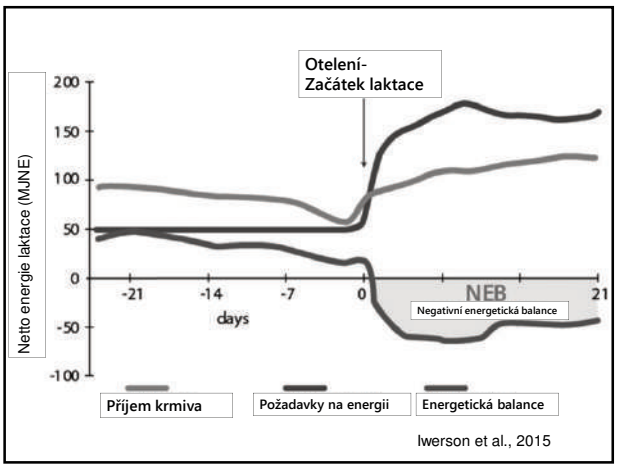
- Kvasinky Sacharomyces Cerevisae
- Chráněný cholin a niacin
- Zdroj Mg + anionty
- Obdukovaná močovina
- Kvasnice
- Hladina vitaminu E , A , D , Se

PROČ SUCHÉ KRÁVY

- VZOREC LAKTACE JE DÁN
- OD 50 DL UŽ TOHO MOC NESPRAVÍTE
- PERZISTENCE LAKTACE A SLOŽKY
- REPRODUKCE
- VÝSKYT ZDRAVOTNÍCH PORUCH V LAKTACI
- ROZHODUJE O BRAKACI NEJLEPŠÍCH DOJNIC







Kontrolní body

Doba stání na sucho	45-60 dní	> 60 dní
Tělesná kondice před otelením	Udržet kondici od 3.0 do 3.75	> 3.75 nebo < 3.0
% klinických mastitid po otelení	< 2%	> 2%
% kulhajících krav	< 10%	> 10%
Doba příjmu předporod. mixu	3 týdny	< 3 týdny
Porodna	>nebo = 1místo pro suchostojnou krávu	< 1místo
	Plocha ležení > nebo = 10 m2 na krávu	Plocha ležení < 10 m2 na krávu
	Oddělené jalovice od krav	Jalovice společně s kravami
Ležení	Čisté a suché	Znečištěné výkaly
Příjem sušiny před otelením	2% tělesné váhy	< 2%

Imunosuprese okolo porodu

1. Vysoký výskyt mastitid. 25% případů koliformních mastitid se vyskytne v prvních týdnech laktace.
2. Klinická manifestace chronických onemocnění; paratuberkulosa, salmonelosa po porodu.
3. ZADRŽENÉ LŮŽKO, METRITIDA, ENDOMETRITIDA Z DŮVODU ŠPATNÉ FUNKCE IMUNITY!!

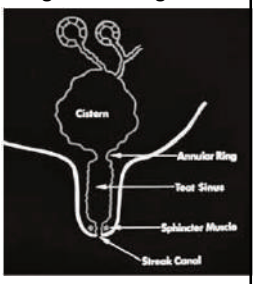
Guidry, et al. 1976. *Am J Vet Res*. 37:1195; Newbould. 1976. *Can J Comp Med*. 40:111; Wells, et al. 1977. *Clin Exp Immunol*. 29:159: Hill. 1981. *Res Vet Sci*. 31:107; Manak. 1982. *J Reprod Immunol*. 4:263; Kashiwazaki, et al. 1985. *Jpn J Vet Sci*. 47:337; Ishikawa. 1987. *Jpn J Vet Sci*. 49:469.

Vliv ketosy na funkci buněk imunitního systému

1. Tuková infiltrace jater může snížit proteiny akutní fáze
2. Neschopnost produkce glukosy nezbytné jako palivo pro imunitní odpověď.
3. Ketolátky, volné mastné kyseliny v krvi

VLIV HYPOKALCEMIE A POPORODNÍ PARÉZY NA ODOLNOST VŮČI ONEMOCNĚNÍ

1. Snížený příjem krmiva➔ zhoršení negativní energetická balance
2. Nedostatečné svalové kontrakce
   - zhoršují uzavření strukového svěrače
   - nedostatečné vypuzení děložního obsahu po otelení



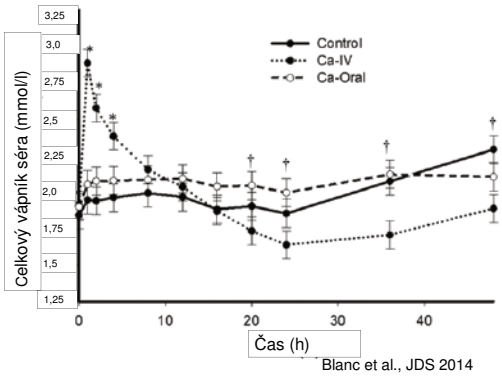
3. Snížení odpovědi imunitních buněk na podněty
   - vápník je „druhý posel“ imunitních buněk

Zdroje Ca per os

- Chlorid hořečnatý
- Ca – propionát
- Mravenčan vápenatý
- Glycinát vápenatý

(chlorid vápenatý leptá sliznici)

Pravidelné používání IV vápníku při telení může způsobovat více subklinických hypokalcemií 1-2 dny po aplikaci



Blanc et al., JDS 2014

Niacin a cholin

- Funkce a regenerace jater
- Omezení ketozy
- Tlumení jaterní steatozy

Sacharomyces cerevisae

- Stabilita a pufrace bachoru
- Produkce mléka
- Tuk mléka
- Snížit aciditu bachoru

Samovolný nápoj při porodu

1. Propylen glykol
2. Zdroj cukru
3. Voda
4. Ostatní je omáčka

PREVENCE KETOZY A NEB

- Per oralně 300 ml propylen 4 a 10 DL
- Monenzin
- Niacin cholin
- Podpora žravosti
- Vybalancovaná TMR

FIXACE

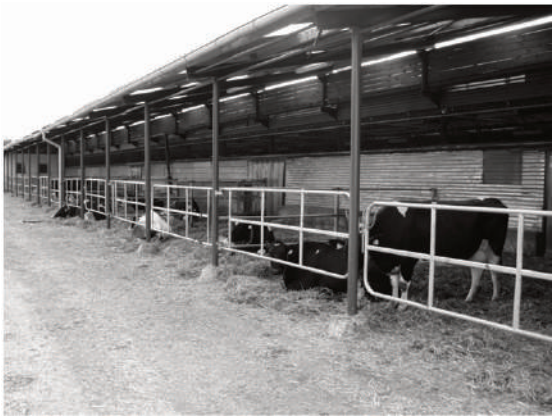
Aktivita

Výběh pro suché - pastva

ODČERVIT , ODBLEŠIT !!!

Vybavení poroden

- ***Čisté dezinfikované porodní provázky včetně hlavového***
- ***Dezinfektor na pupky - ponoření***
- ***Kladka na vyvěšení telete***
- ***Termobox pro rychlé osušení telete***
- ***Zdroj pitné vlažné vody pro rychlou přípravu dobrovolného nápoje po otelení***



Sociální faktory

Kráva potřebuje 1 týden na vytvoření dominantních vztahů ve skupině

Krávy žerou za soumraku & úsvitu

Krávy rády dělají věci společně

Krávy nemají rády jalovice

Krávy potřebují prostor

Jakákoli změna je špatná změna (2-5% snížení produkce mléku při přesunu)

Vliv přesunu do jiného kotce

Ne méně než 21 dní před otelením

Oddělit jalovice a krávy

Jakýkoli přesun vyžaduje 5-7 dní na přizpůsobení se nové skupině

Jakýkoli přesun vede k výraznému snížení příjmu sušiny (DMI)

Plocha na hluboké podestýlce

Skupina	Plocha na zvíře
Suché na po zasušení	9,3 – 11,2 m²
Suché před přípravou	7,4 – 9,3 m²
Příprava porod	11,6 – 13,9 m²
Rozdoj-otelené	16,3 – 18,6 m²
Produkční skupiny	11,6 – 13,9 m²

VLIV HYPOKALCEMIE A POPORODNÍ PARÉZY NA ODOLNOST VŮČI ONEMOCNĚNÍ

1. Snížení příjmu krmiva➔ zhoršení negativní energetické balance
2. Nedostatečné svalové kontrakce
   - zhoršují uzavření strukového svěrače
   - nedostatečné vypuzení obsahu děložního po otelení
3. Snížení odpovědi imunitních buněk na podněty
   - vápník je „druhý posel“ imunitních buněk

Hořčík

Dospělí přežvýkavci vstřebávají Mg přes stěnu bachoru! Mg nerozpustný při pH bachoru NENÍ využitelný.

- ***Aktivní transport*** účinný s dietou o nízkém obsahu Mg ALE PŘESTÁVÁ FUNGOVAT POKUD JE-LI V KRMNÉ DÁVCE VYSOKÝ OBSAH DRASLÍKU A DUSÍKU
- Existuje druhý systém- ***pasivní transport***, ale vyžaduje vysoké koncentrace ionizovaného Mg v bachorové tekutině

V krmné dávce před porodem a brzy po porodu udržujte obsah Mg na 0.4% ,abyste získali výhodu pasivního transportu Mg přes bachorovou stěnu

UJISTĚTE SE, že zdroj Mg je pro krávy VYUŽITELNÝ. Jemně mletý, nepřepálený!

Hypomagnesemie

Mg v krvi < 0,8mmol/l v období 12 hodin okolo porodu ukazuje na nedostatečné vstřebávání Mg z krmiva.

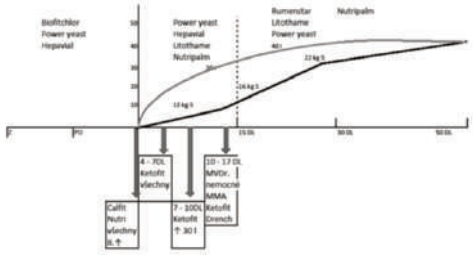
Druhotná hypokalcemie když je Mg pod 0,7mmol/l

Snížený příjem krmiva, snížená bachorová fermentace (Ammerman, et.al., 1971)

-Tetanie u pasoucích se dojných krav pod 0,5mmol/l

Aditiva laktace

- Obdukovaná močovina
- Kvasinky Sacharomyces
- Propylen glykol rozdoj
- Ca rozdoj per orálně
- Tuk palmit – mikrovločka
- Účinnější pufry v laktaci

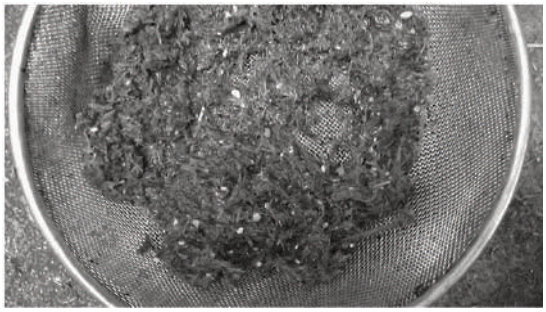


Pufry mořských řas a živočichů

- Prodlužuje dobu pufrace
- Zdroj minerálů a mikroprvků o vysoké stravitelnosti
- Vyšší efekt než soda za stejnou cenu
- Pufrace sody pro bachor je minimální

Tuky

- Ca – tuk
- Palmit
- Palmit - mikrovločka



Proč tuk - mikrovločka

- Zvýšit koncentraci NEL v TMR
- Nakrmit dojnice 50 l a více
- Snížit ztráty tuku ve výkalech
- Snížit NEB

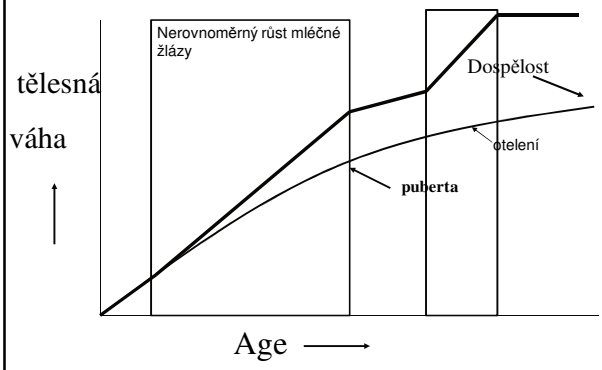
Kdy krmit chráněnou močovinu

- Tranzitní období
- Separace TMR
- Kombinace
- Hrubá struktura DOVP (KKS)
- Chybí NPN v TMR

Výživa telete okolo odstavu a jalovice

Jud Heinrichs

Růst zvířete

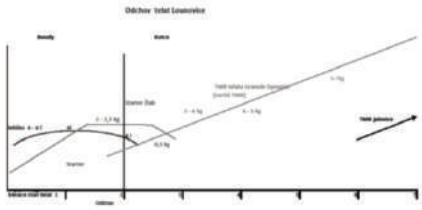


Vliv příjmu jádra na užitkovost je větší, než vliv příjmu mléka

Analýza ukazuje, že příjem jádra je důležitější

- 0.09kg zvýšení přírůstku z mléka/mléčné náhražky = o 65 kg více mléka
- 0,09kg zvýšení přírůstku z jádra = o 266kg více mléka
- Zvýšení průměrného představovalo <3 % variability

Gelsinger et al., 2016



Požadavky na mléko

- Tuk - 17 – 18 %
- Protein - 22 – 23 %
- 100 % mléčný zdroj
- Sušené mléko
  Syrovátka částečně delaktozovaná
- Žádný pšeničný lepek,škrob z brambor,soja…

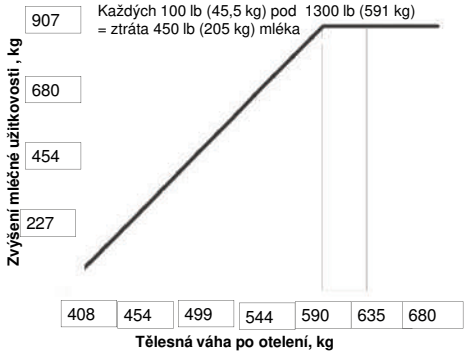
Tabulka – vliv příjmu mléčné náhražky a startéru na 305 denní užitkovost, tuk a protein na první laktaci u všech krav (n = 2880)

položka	R^2	proměnná	odhad	SE	P-value
Mléko 305d	0.10	náhražka	9.89	12.42	0.4261
		startér	8.21	2.53	0.0012
Tuk 305 d	0.28	náhražka	0.52	0.53	0.3332
		startér	0.36	0.10	0.0002
Protein 305 d	0.17	náhražka	0.29	0.35	0.4115
		startér	0.33	0.07	<0.0001

- **Každé zvýšení příjmu sušiny startéru o kg ve věku 8 týdnů mělo za následek vyšší 305 denní užitkovost na první laktaci o 8,21 kg(SE = 2,53kg)**

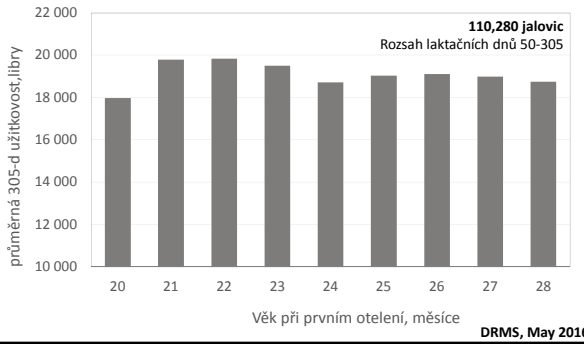
Chester-Jones et al., 2017

Jalovice otelené ve váze mezi 1300 lb (591 kg) a 1375 lb (625 kg)mají nejvyšší užitkovost na první laktaci



From Keown and Everett, 1986

Průměrná 305-d užitkovost u prvotelek v PA dle stáři při otelení



DRMS, May 2016

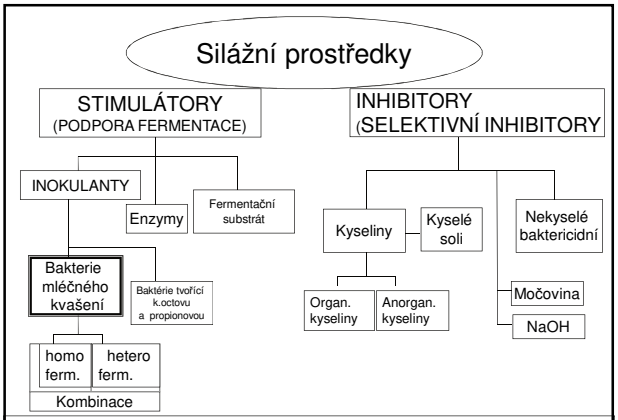
Aditiva senážování

- Nezvyšujte organické kyseliny
- Odpovídající fermentace
- Reagujte na sušinu
- Lactobacilus plantarum
- Pediococus acidillaktici

(sušina hmoty 28 – 38 %)

Senážování Vojtěška + jetel

Ø sušina %	*Ø délka řezanky (cm)*	*Dávkování konzervant*	*Doba zavadání + konzervant*	*Dusání + naskladnění (cm /hod)*	*Doba fermentace*
40 – 45 %	3 - 4	Max. 1 den biologie + sorban draselný	Nad 2 dny biologie +heterofer. + sorban	30 cm/hod	Minimálně 2 měsíce
35 – 40 %	4 - 5	Max. 2 dny BIO	Nad 2 dny BIOLOGIE	30 – 50 cm/hod	6 týdnů
30 – 35 %	5 - 6	Max. 2 dny BIO	Nad 2 dny BIOLOGIE	50 – 70 cm/hod	4 – 6 týdnů
25 – 30 %	6 - 7	Max. 2 dny Chemie Min.2 l mravenčí/tunu	Nad 2 dny Chemie Min. 3 l mravenčí/tunu	Do 100 cm/hod Omezit dusání!!	4 týdny



Kombinované preparáty (Biochemické přípravky)

BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

VÝZNAMNÉ PRO SILÁŽOVÁNÍ

Homofermentativní	Heterofermentativní
Rod *Lactobacillus*	
L. acidophilus	*L. brevis*
L. casei	*L. buchneri*
L. curvatus	*L. fermentum*
L. plantarum	
Rod *Streptococcus*	
S. faecalis	
S. faecium	
S. lactis	
Rod *Leuconostoc*	
	L. dextranicum
	L. mesenteroides
Rod *Pediococcus*	
P. acidilactici	
P. cerevisiae	
P. pentosaceus	

Homofermentativní kvašení: glukosa (C_6) → 2 kys. mléčná (C_3)

Heterofermentativní kvašení: (méně účinné, spotřebuje pro stejný konzervační účinek více cukrů = pohotové energie)
glukosa (C_6) → kys. mléčná (C_3) + kys. octová či ethanol (C_2) + CO_2

Biochemie silážování

- Mléčné kvašení

- **Homofermentativní**
- **Glukóza nebo fruktóza+2 ADP+2 Py=>2 Kys. Mléčná+ 2 ATP +**
- **2 H20**
- **Ztráty: sušina 0 %, energie 0,7 %**

- **Heterofermentativní**
- **Glukóza + ADP + Py = Kys. Mléčná+Etanol+CO2+ATP+H2O**
- **Ztráty: Sušina 24%, energie 1,7%**

- **3 Fruktóza+2 ADP+2Pi=Kys. Mléčná+Kys. Octová+2 Manitol+2 CO2+2 ATP+H2O**
- **Ztráty: sušina 4,8 %, energie 1.0 %**

McDonald et al. 1991

61

Opatření na farmě v období mléčné krize

- Cena mléka poklesne pod 6,50 Kč/l
- Nikdy nešetřete na dojnicích v tranzitním období!!
- Managment zbytků TMR, VBJ, ztráty jáma
- Vytvořte skupinu neefektivních krav (stanovte kriteria)
- Nikdy nešetřete na dojnicích do 200 DL!!
- Selekce neefektivních krav

Mléčná krize – II.fáze laktace

- Užitkovost a den laktace
- Vyřazené dojnice nad 200 DL
- Nemocné dojnice
- Kondice 4 BCS a více

Děkuji vám za pozornost a nashledanou PB

Puerperium – klíčové období reprodukčního cyklu

MVDr. Antonín Vinkler, CSc.
veterinární lékař, specialista na reprodukci

Puerperium - klíčové období reprodukčního cyklu.

Doc. MVDr. Antonín VINKLER, CSc.

Úvodem je třeba připomenout, že pohlavní orgány a jejich funkce mají poněkud zvláštní postavení. Nejsou nezbytné pro existenci jedince, jsou nezbytné pro zachování živočišného druhu. V zátěžových situacích se organizmus brání – prvně tlumí pohlavní funkce. Podíváme-li se na celý reprodukční cyklus je jasné, že relativně stabilní délku má říjový cyklus, vlastní říje, období gravidity i období porodu. Největší variabilitu v délce trvání má období puerperia, které se vyznačuje velkými změnami v organizmu plemenice. Z toho vyplývá, že

puerperium je klíčovým obdobím reprodukce. Končí jeden reprodukční cyklus, vytvářejí se předpoklady pro úspěšný nástup do dalšího reprodukčního cyklu, vytvářejí se předpoklady pro nástup a výši laktace.

Z hlediska tzv. ekonomických zájmů je preferován rychlý nástup vysoké laktace, který nemusí být vždy v souladu s potřebami plemenice pro rychlé ukončení puerperia. Plemenice je v tomto období vystavena vysoké zátěži, která vyplývá z vrcholící gravidity, průběhu porodu, změn hormonálního profilu a činnosti orgánových systémů v souvislosti s porodem i z reparačních pochodů nastupujícího puerperia. Je vysoké riziko oslabení imunitního systému a zvýšené riziko infekcí.

V závěru gravidity je pohybový aparát plemenice zatížen celkovým zvýšením hmotnosti o 123 až 135 kg při uvolnění pánevních vazů a křížokyčelních kloubů – zhoršená pohyblivost. Vlastní porod zátěž plemenice prohlubuje. Intensivní svalová činnost myometria, břišních a hrudních svalů, zvýšená srdeční činnost i zátěž dechového systému vedou k vysílení plemenice.

Průběh porodu i uspořádání placenty jsou příznivé pro průnik bakterií do pohlavních orgánů, jejich pomnožení a vznik zánětlivých stavů. Při ztíženém porodu a poranění porodních cest je vysoké riziko vzniku hnisavých zánětů, které mohou končit vznikem abscesů v pánevní dutině a zasahovat až do břišní dutiny Proto je bezpodmínečně nutné věnovat zvířatům v období porodu i v poporodním období zvýšenou pozornost, sledovat odchod lůžka, charakter očistek, celkový zdravotní stav s využitím kontroly teploty po dobu 5 až 10 dnů p. p. Krátkodobé teploty do 39,5 C, lze tolerovat, při vyšších teplotách je nutné zjistit příčinu a podle dg zahájit léčbu.

Regresivní procesy jsou velmi rychlé. Děloha, která má v době porodu hmotnost 8-12kg, se v průběhu 5-6 dnů zmenší o 2/3. Klinická involuce je ukončena mezi 20. až 24. dnem p. p., histologická přestavba endometria a ukončení puerperia 35. den, u vysokoprodukčních dojnic 42 – 45. den. S morfologickými změnami souvisí i výtok a charakter očistek. Postupně jich ubývá, zahušťují se a světlají. K určitému zvýšení dochází mezi 7. až 10. dnem p. p. Po 12. dnu p. p. se stávají zcela hlenovité, čiré, s ojedinělými hnisavými vločkami. Mezi 18. až 25. dnem p. p. se v důsledku ovariální aktivity objevuje opět výtok sekretu z pohlavních orgánů - má být čirý, hlenovitý.

Aby probíhala involuce dělohy, musí být v organizmu plemenice v dostatečném množství biologicky účinné látky s uterotonickým účinkem (oxytocin, PGF2alfa), musí být zachována citlivost myometria k těmto látkám (receptory aktivované estrogeny) a musí být v organizmu také dostatek pohotové energie a vápníku, aby svalové buňky myometria mohly reagovat.

V organizmu plemenice jsou v době porodu vysoké hladiny estrogenů vytvořené placentou a přetrvávají po dobu 4 dnů, pokud nejsou rychle odbourány nastupujícími metabolickými poruchami. Zcela chybí přirozená stimulace vylučování oxytocinu z hypofýzy saním telete(6 až 8x denně) nebo častějším dojením.Pro dočištění dělohy je nezbytná růstová vlna folikulů, která vrcholí mezi 8. až 10. dnem p. p. Jestli dojde k rychlému odbourání estrogenů p. p., je nedostatek pohotové energie a vápníku a není nastartována první růstová vlna folikulů vlivem stresové zátěže, děloha zůstává atonickou, hromadí se v ní sekret, dochází k mikrobiální infekci, pomnožení zárodků a vzniku zánětlivých změn.

Involuce dělohy nepokračuje, dochází k narušení zdravotního stavu v důsledku zánětu a rezorbce toxinů z dělohy. Náplň v děloze inhibuje tvorbu PGF2alfa v endometriu a celý proces se postupně dostává do chronického stavu.

Nezvládnuté puerperium vede k prodloužení intervalu, SP, mezidobí a v konečném důsledku k vysokým ekonomickým ztrátám.

Pro úspěšné zvládnutí puerperia je třeba vytvořit vhodné podmínky. Ty předpokládají zvládnutí stání na sucho, přípravu k porodu, kdy kondiční stav plemenice by měl být na úrovni 3,5 až 3,75 bodu (jsou vidět poslední 3 žebra). V žádném případě nesmí překročit stupeň 4, který již znamená nástup poruch v průběhu puerperia. Vzhledem k riziku zavlečení bakterií do porodních cest a jejich pomnožení v děloze je nezbytně nutné na porodně udržovat hygienicky čisté prostředí. Porod má probíhat pod kontrolou, aby v případě komplikací mohla být včas poskytnuta rodícímu zvířeti odborná pomoc. Zvířatům s komplikovaným porodem a zadrženým lůžkem je v prvních 10 dnech po porodu nutné věnovat zvýšenou pozornost.

Protože pro sníženou pohyblivost po uvolnění křížokyčelních kloubů a širokých vazů pánevních v průběhu porodu i vzhledem k výrazným hormonálním změnám jsou plemenice méně průbojné a nechávají se odstrčit od žlabu, je nezbytné minimálně 10 dnů,lépe 20 dnů p.p. zajistit plemenicím po porodu oddělené ustájení od zvířat, která jsou delší dobu po porodu. Toto opatření se týká především prvotelek.

V okoloporodním a poporodním období je třeba zajistit výživu tak, aby nedocházelo k metabolickým poruchám, které vedou k rychlé ztrátě tělesné kondice, s kterou úzce souvisí poruchy v průběhu involuce dělohy i obnovení ovariálních funkcí a nástup plnohodnotného říjového cyklu. Pro zdárný průběh porodu i involuce pohlavních orgánů je nutná průběžná kontrola dostatku pohotové energie a pohotového vápníku. Součástí péče v tomto období je i dostatek světla a vody i omezení účinku tepelného stresu.

Objektivní obraz o průběhu puerperia dá kontrola a vyšetření zvířat v období kolem 10.dne, ale především kolem 20.dne po porodu, kdy má být ukončena klinická involuce dělohy. Kontrola mezi 30.-40.dnem je zaměřena na zjištění příznaků nástupu říjového cyklu(CL nebo F). Zvířata, u kterých

tyto příznaky nebyly zjištěny, nejsou použitelná pro systémy využívající indukci a synchronizaci říje a ovulace, spojené s provedením tzv. frontální inseminace.

K ovlivnění a stabilizaci průběhu puerperia lze využít uterotonika, tj látky podporující kontrakce myometria a tím rychlou evakuaci očistek z dělohy. První 3 až 4 dny po porodu přetrvávají v organizmu plemenice vysoké hladiny estrogenů, které způsobují citlivost myometria na oxytocin. Jeho aplikací v den porodu, 2.den, případně 3.den v dávce 30-35 m.j. intramuskulárně lze zabránit případné atonii dělohy a lze dosáhnout vypuzení očistek a urychlení involuce dělohy.
V odůvodněných případech lze využít dražší depotocin, který má protrahovaný účinek. V pozdějším období lze ke stimulaci využít ergometrin(v současné době jen pro humánní účely) nebo čistý PGF2alfa ve specialitách Dinolytic nebo Enzaprost. Účinné množství PGF2alfa pro plemenice skotu je v 5 ml. Tyto preparáty podle situace v chovu je možné aplikovat kolem 10. případně 20. dne po porodu, jinak při zjištění abnormálních náplní dělohy.

Pokud je nedostatek pohotové energie a vápníku a nedochází k uvolnění endogenních uterotonik častějším sáním telete nebo častějším dojením může docházet k atonii dělohy. Bezprostředně po porodu může být příčinou výhřezu dělohy, v pozdějším období dochází k hromadění obsahu v děloze, pomnožení bakterií a vzniku zánětlivých stavů, rezorbci endotoxinů. Důsledkem je zpožděná involuce dělohy, zpomalení až zastavení obnovy ovariálních funkcí a tím i nástup říjového cyklu. Celý proces přechází do chronického stavu. První příznaky říjové aktivity se neobjevují v období mezi 18.-24.dnem po porodu, ale mezi 60.-70.dnem a jsou provázeny hnisavým výtokem.

Pozdě řešené, případně nedořešené zánětlivé stavy mohou být příčinou neadekvátního prostředí pro pasáž spermií i přežívání raného embrya po sestupu do dělohy. Důsledkem je nízké zabřezávání, nepravidelné přebíhání, postservisní anestrus, vysoký podíl jalových zvířat při RDG. Tyto stavy opět zvyšují podíl reprodukčně ztrátových dnů a vedou k prodloužení SP a mezidobí, projevující se též nízkou čistou natalitou. Ekonomická efektivita podniku se opět výrazně snižuje. Stavy jsou potencovány negativní energetickou bilancí a dalšími zátěžovými faktory ovlivňujícími říjovou aktivitu zvířat.

Klinická involuce dělohy musí být zvládnuta dříve, než se plemenice dostane do negativní energetické bilance.

Více či méně úspěšné zvládnutí puerperia je ukázkou vyspělosti chovatele a jeho schopnosti a ochoty věnovat zvířatům odpovídající péči a zajistit přijatelné podmínky a pohodu. Je též ukázkou vyspělosti biologických služeb a jejich pracovníků, které si chovatel přizval k řešení problémů, které se v průběhu puerperia v daném chovu vyskytují a narušují nejen jeho fyziologický průběh, ale výrazně se negativně promítají do ekonomiky celého chovu.

Řízení reprodukce v chovech skotu, praktické zkušenosti

Ing. Jaromír Nedvěd
poradce akreditovaný MZe

„ŘÍZENÍ REPRODUKCE V CHOVECH SKOTU – praktické zkušenosti“

Humpolec 25.4.2019

Ing. Jaromír Nedvěd

Ekonomické hodnocení farem

- Výsledky 5-7 let
- Ukazatele ohodnoceny – mají cenu
- Reprodukce-výrazný podíl na zisku farmy

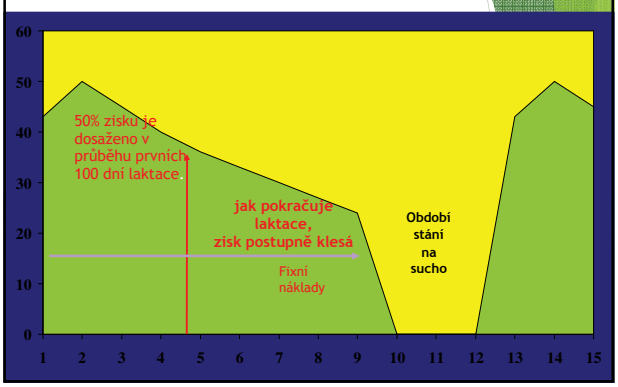
Úspěšný reprodukční program

- Zvyšuje pravděpodobnost setrvání zvířete ve stádě – minimalizuje reprodukční brakaci
- Zvyšuje podíl života dojnice v ziskové části laktace
- Zvyšuje podíl jalovic ve stádě

Vlivy reprodukce na ziskovost farmy

- Prodloužené mezidobí:
  - Nižší počet narozených telat
  - Nižší denní produkce mléka
- Zvýšený věk při 1. Otelení
- Zvýšené procento brakace
  - Omezení ostatních možností selekce

Příklad laktační křivky



Průměrný den laktace

- Průměr = 220-240
- Nadprůměr = 180-200
- Výborné = 160-180

- 10 dní laktace 1-1,5 l mléka
- 1000 krav-1000 l x 8,5Kč x 365 = 3 mil.Kč

Počet březích krav

- Průměr = zabřezlo měsíčně 5% krav tj. na 1000 krav 50 březostí měsíčně
- Nadprůměr = zabřezlo měsíčně 6% krav tj. na 1000 krav 60 březostí měsíčně
- Výborné = zabřezlo měsíčně 7% krav tj. na 1000 krav 70 březostí měsíčně

Cena jedné březosti je 6-8 tis.Kč

+240 březostí za rok = 1,4 mil.Kč

Skutečná spotřeba dávek na březí kus

- Průměr = 4-5 dávek na březí krávu a 1,8-2 na březí jalovici
- Dobré = 2,5-3 dávky na březí krávu a 1,6-1,8 na březí jalovici
- Výborné = 2-2,5 dávky na březí krávu a 1,3-1,6 na březí jalovici

Cena spotřebované inseminační dávky je 700-800Kč

1000 krav-1100 březostí-úspora1ID-1100 x 700 = 800 tis.Kč

Skutečný náklad na březí kus

- veškeré veterinární náklady související s reprodukcí
- veškeré plemenářské náklady na reprodukci:

  -náklad na všechny spotřebované dávky včetně reinseminací

  -náklad na všechny inseminační úkony včetně re

  -náklad na vyšetření březosti,sono

Skutečný náklad na březí kus

- Průměr = 4-5 dávek = 2800-3500 Kč
- Dobré = 2,5-3 dávky =1800-2100 Kč
- Výborné = 2-2,5 dávky = 1400-1800 Kč

Nejdůležitější součásti reprodukčního programu

- 1.Připustit správnou krávu ve správném čase
- 2.Efektivní odchov telat a jalovic a jejich přechod do stáda
- 3.Správná brakace v době kdy zařazená prvotelka přinese maximální efekt

Reprodukční program dojnic

- Cílem je co nejrychlejší zabřeznutí plemenice v předem stanoveném čase
- „Dobrovolná čekací doba“ - oddálení inseminace-dle dat
- Včasná identifikace jalových krav a jejich znovuzapuštění

Program odchovu telat a jalovic

- Snížení věku při 1.otelení, tím snížíme náklady na odchov
- Jako optimální se jeví věk při prvním otelení 23-24 měsíců a tudíž průměrný věk při zabřeznutí 14-15 měsíců - Paul M. Fricke, PhD
- Měsíc odchovu = 1500Kč/jalovici

400 zařazených jalovic x 1500 = 600 tis.Kč

Efektivní brakace

- Záleží na kvalitě vyřazované krávy právě tak jako na kvalitě prvotelky, která ji má nahradit
- Brakace příliš brzy-nízká návratnost nákladů na odchov
- Brakace příliš pozdě-efekt prvotelek ve stádě je málo viditelný

Reprodukce-klíčová úloha dat

„Pokud něco nemůžu změřit,nemůžu o tom rozhodnout !"

Tradiční reprodukční ukazatele

- Tradiční časové intervaly:
  - Mezidobí
  - Interval
  - Servis perioda
  - Procento zabřezávání
  - Inseminační index
- Historická data
- Nedynamická
- Nezohledňují reprodukční brakaci
- Chybí- **efektivita detekce říje**

Program Pcdart-DRMS

- 1.Produkce - přepočet na 150 dnů laktace
- 2.Mastitidy - linearní skore SB
- 3.Reprodukce - pregnancy rate
- 4.Zdraví,obrat stáda a brakace
- 5.Genetika
- 6.Velké množství sestav dle přání chovatele

Faktory ovlivňující úspěšnou reprodukci

- Přesná detekce říje a synchronizační protokoly
- Efektivita inseminace
- Diagnostika březosti
- Nové technologie
- Zvládnutí okoloporodního období
- Negativní energetická bilance
- Nemoci
- Ustájení, pohodlí, tepelný stres

Důvody špatné detekce říje

- Zaměstnanci
- Komfort krav
- Kulhavost
- Povrch podlahy

Přesnost

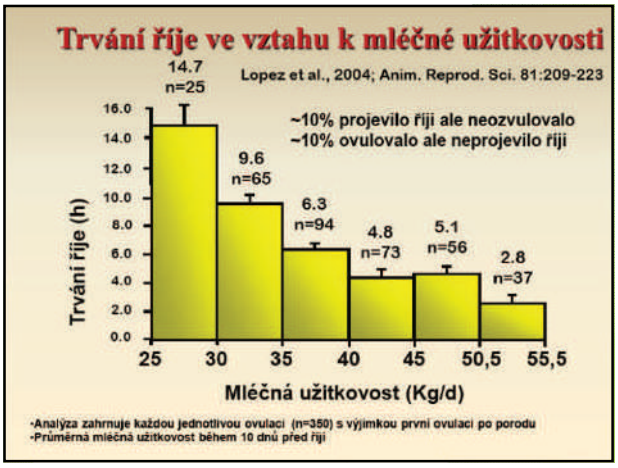
- 5-30% inseminací se provede v nevhodném čase cyklu

Senger et al 1988

Délka říje (hod.)

Nebel, Bame and Jobst,VirginiaTech,2000

	Hammond 1927	Trimberger 1948	Nebel 2000
Krávy	19.3	17.8	7.6
Jalovice	16.1	15.3	11.5
Rozpětí	6 - 30	2.5 - 28	0.5 - 42



Načasování inseminace-praktické shrnutí

- Školte a motivujte pracovníky na farmě k rozpoznání příznaků říje
- Není nutné trvat na pravidle dopoledne/odpoledne
- Krávy v říje je lépe inseminovat okamžitě než čekat 12hodin

Synchronizační protokoly

- Striktně dodržujte postupy synchronizačních programů nebo zapomeňte na jejich používání !!!

Synchronizační protokoly

- Zvýšený počet březostí ve stádě
- Zvýšená rychlost zabřezávání dojnic díky zvýšení intenzity detekce říje
- Ekonomicky výhodné – levnější
- Úplně bez synchronizací to nejde

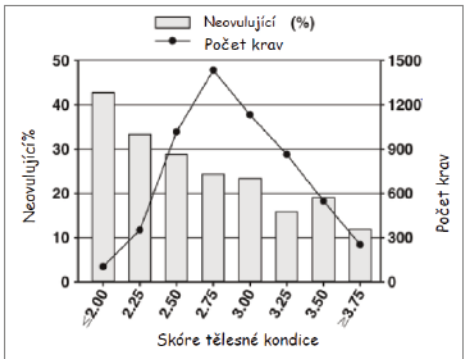


Figure 1. Observed prevalence of anovulation (bars) and number of cows (line) by category of BCS. An additional 118 records without BCS had 13.6% prevalence.

Neovulující krávy

Bamber R. L., G. E. Shook, M. C. Wiltbank, J. E. P. Santos, and P. M. Fricke.

Genetic parameters for anovulation and pregnancy loss in dairy cattle.

J. Dairy Sci. 2009; 92:5739-5753.

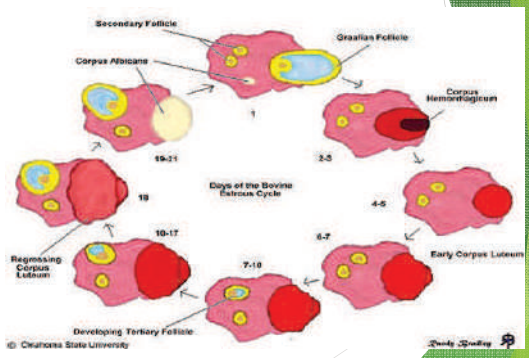
Ovsynch

- 1.Nejvyšší účinnost při zařazení všech prvních inseminací do OVSYNCH protokolu
- 2.Načasovat začátek OVSYNCH mezi **5.-12. den cyklu**
- 3.Dodržet postup-každé zvíře musí dostat správnou injekci ve správný čas-**chyby se násobí** !

  např.90% správných jednotlivých aplikací znamená:

  0,90 x 0,90 x 0,90 = 0,73 – **pouze 73%** správnost ovsynch protokolu
- 4.Zamezit stresování zvířat při aplikaci injekcí
- 5.Inseminovat všechna zvířata zařazená do OVSYNCH protokolu bez předchozího vyšetření

DNY ESTRÁLNÍHO CYKLU



Efektivita inseminace

- Šetrné zacházení s dávkami a práce technika
- Striktní dodržení inseminačních manuálů
- Platba za březí kus

Diagnostika březosti

- Zjistěte brzy,které krávy jsou po inseminaci jalové

(ale ne příliš brzy!)

Proč použít ranou dignostiku březosti

Klíčem k rané diagnostice březosti je spojit:

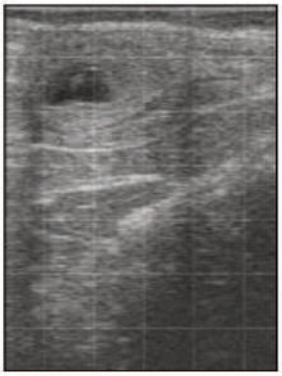
1) **Identifikaci jalových krav se**
2) **Strategii pro rychlý návrat těchto krav zpět do reprodukce a jejich inseminace**

Přesnost transrektální ultrasonografie 29 d po načasované inseminaci u laktujících dojných krav

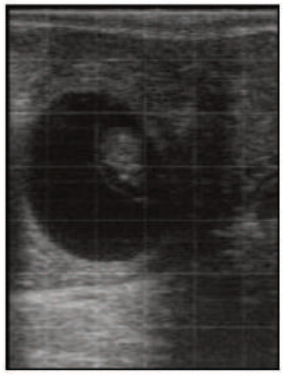
Giordano et al., preliminary data

	Březí	
položka	**Embryo bylo vidět**	**Embryo nebylo vidět**
Březost (%) Den 29	70% (768/1095)	30% (327/1095)
Březost (%) Den 39	67% (738/1095)	25% (270/1095)
Ztráta (%) 29 až 39	4% (30/768)	17% (57/327)

25 DCC



32 DCC



Chemické testy březosti

- **Byly vyvinuty tři komerční sady pro zjištění březosti u krav založené na měření PSPB** (Sasser *et al.*, 1986) **a PAG's** (Zoli *et al.*, 1991, Green *et al.*, 2005) **v krvi matky.**

bioPRYN a division of BioTracking

IDEXX LABORATORIES

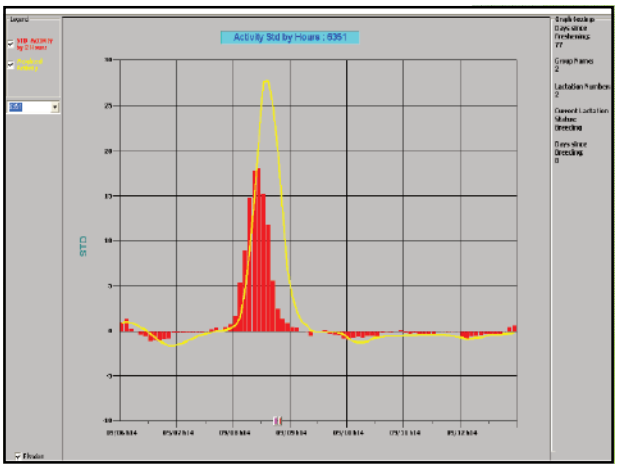
DG29™ Bovine Pregnancy Results on Demand

Nové technologie-aktivometry

Akcelerometrické systémy

SELECT DETECT advanced estrus detection technology

SCR PRECISE DAIRY FARMING Heatime



Aktivometry

- Výborný pomocník pro zvýšení efektivity detekce říje
- Cena 2-5 tis.na krávu
- Doporučení na 50% krav
- Nutno přendavat

Praktické shrnutí :

1. Inseminujte krávy ve správný čas vzhledem k říji nebo ovulaci
2. Zlepšete efektivitu inseminace
3. Striktně dodržujte postupy synchronizačích protokolů nebo zapomeňte na jejich používání
4. Zjistěte brzy,které krávy jsou po inseminaci jalové (ale ne příliš brzy)
5. Znovu agresivně inseminujte jalové krávy
6. Nové technologie

Okoloporodní období

- Kvalitní výživa a management krav v období stání na sucho předchází nemocem a zdravotním problémům
- Prevence inf. onemocnění končetin a špárování březích jalovic a krav při zaprahu
- Příprava na porod = základ budoucího zdraví a úspěšné reprodukce stáda!!!
- Bezstresový porod-prostor, vzduch, světlo
- Včasná léčba všech zdravotních poruch na začátku laktace

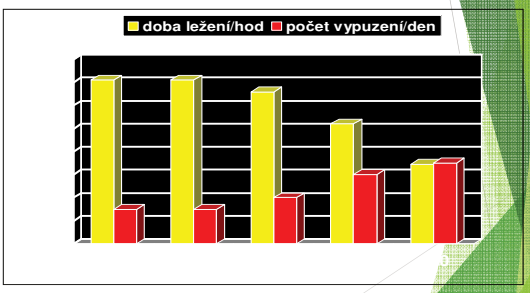
Plocha na hluboké podestýlce

Graves, Penn State Agricultural Engineering

Skupina	Plocha na zvíře
Suché na po zasušení	9,3 - 11,2 m^2
Suché před přípravou	7,4 - 9,3 m^2
Příprava porod	11,6 - 13,9 m^2
Rozdoj-otelené	16,3 - 18,6 m^2
Produkční skupiny	11,6 - 13,9 m^2

Přeplnění a doba ležení

Friend, et. Al.,1977



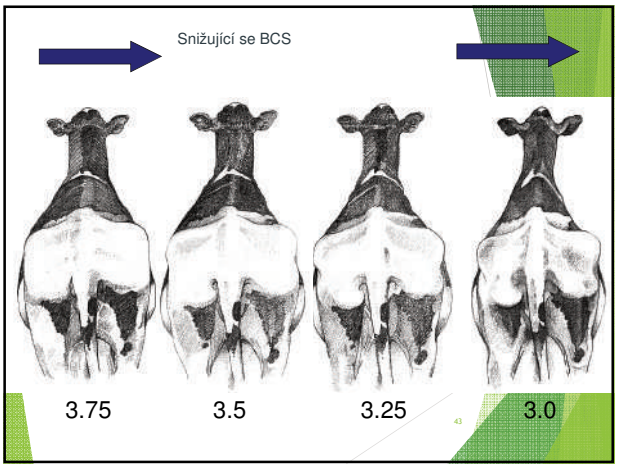
Negativní energetická bilance

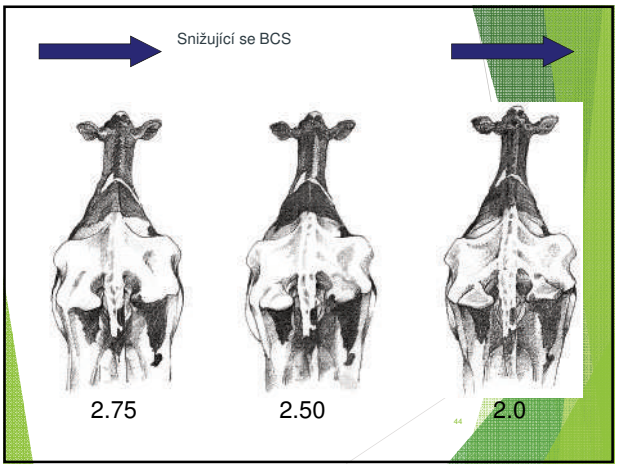
Celková ztráta by nikdy neměla přesáhnout 1 bodBCS

-Snížení BCS o více než 1 bod má za následek výrazné snížení procenta březosti po 1. inseminaci

Nikdy nenechte ztloustnout krávu nad BCS 4.25

-Obézní krávy jsou ve vyšším riziku metabolických problémů, laminitidy a zůstanou pravděpodobně jalové dlouhou dobu

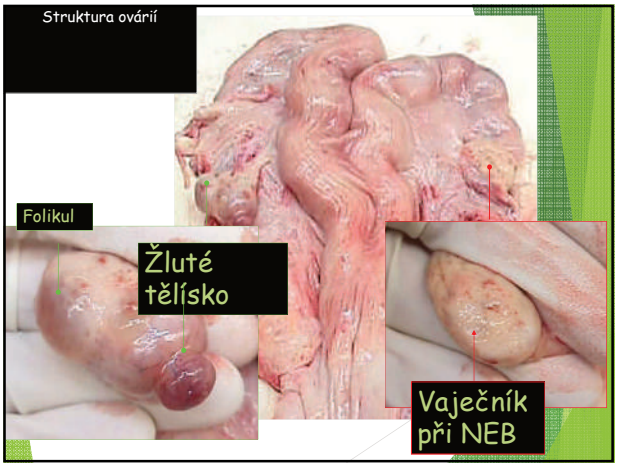




Dopad ztráty BCS na začátku laktace

	BCS ztráta v 1. 5ti týdnech laktace		
	< 0.5	0.5 - 1.0	> 1.0
Dny do 1.ovulace	27	31	42
Days to 1st Estrus	48	41	62
Dny do 1.inseminace	68	67	79
Březost po 1.inseminaci	65%	53%	17%

Cíl : Ne větší ztráta než 1 BCS



Reprodukční nemoci

- Cysty na vaječnících
- Pyometra, Endometritida
- Zadržená placenta
- Jiné infekční nemoci:
  - Reprodukční a respiratorní virozy
  - IBR, BVD, BRSV

Závěr

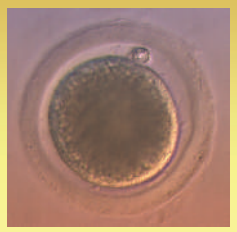
- Kvalitní data
- Zajistit podmínky pro zabřeznutí
- Reprodukční program

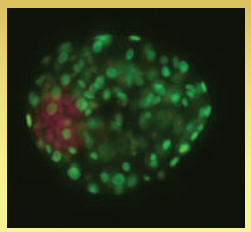
Reprodukční biotechnologie - současné možnosti

Ing. Marie Machatková, CSc.
VÚVeL Brno

VÚVeL - Fest V

Jak docílit úspěšné reprodukce u dojeného skotu





Humpolec, duben 2019

Reprodukční biotechnologie - současné možnosti

Laboratoř reprodukčních biotechnologií
oddělení Genetiky a reprodukce

Mgr.Kateřina Hanzalová
Ing. Ivona Trávníčková
Ing. Marie Machatková CSc

Současné reprodukční biotechnologie (RB)

- Získávání embryí pomocí programu MOET(multiple ovulation and embryo transfer)
- Ovum pick up (OPU), produkce embryí v systému in vitro (IVP) a embryotransfer (OPU/IVP/ET)
- Selekce rodičů na základě jejich genomického hodnocení
- Získávání a kryokonzervace spermatu pomocí konvenčních technik
- Sortování X a Y spermií metodou průtokové cytometrie

Využití metody MOET v Evropě

Počet výplachů donorek (n)	22 316
Počet přenosuschopných embryí (n)	143 458
Průměrný počet embryí na donorku (x)	6,4
Počet přenesených embryí (n)	99 703
Podíl zmrazených z přenesených (%)	54,5

(A.E.T.E. Nantes 2018)

Využití metody IVP/ET v Evropě

Počet získaných oocytů (n)	211 097
Počet získaných embryí (n)	51 971
Podíl vyvíjejících se embryí (%)	24,6
Počet přenesených IVP embryí (x)	49 177
Podíl přenesených IVP embryí *z celkového počtu ET*	33,0

(A.E.T.E. Nantes 2018)

Využití metody OPU/IVP v Evropě

Počet OPU session (n)	18 684
Podíl stimulovaných OPU (%)	49,0
Průměrný počet oocytů/ OPU (x)	11,3
Podíl oplozených sexovanými spermiemi (%)	35,8
Průměrný počet embryí/OPU (x)	2, 7

(A.E.T.E. Nantes 2018)

Produkce embryí in vitro

- Metoda fertilizace in vitro (IVF) umožňuje produkovat embrya in vitro (IVP) od geneticky cenných rodičů. Hlavním zdrojem oocytů pro přípravu embryí jsou oocyty získané od vysokoprodukčních krav buď v průběhu života technikou transvaginální aspirace (OPU) nebo post mortem, po vyřazení matek z chovu z důvodu neplodnosti nebo jiných poruch zdraví.
- Z celkového počtu embryotransferů každoročně provedených v Evropě představují přenosy OPU-IVF embryí více než třetinu, více než polovina z embryí byla před přenosem konzervována.
- V chovatelsky vyspělých zemích EU, jako jsou Holandsko, Francie, Německo nebo Itálie, je metoda OPU-IVF úspěšně kombinována s metodou hormonální superovulace dárkyní (Merton 2008).

Současný stav

- Na rozdíl od embryí produkovaných pro experimentální účely je produkce embryí požadovaného genotypu pro ET stále méně efektivní. Také kryotolerance těchto embryí je relativně nižší.
- V současnosti jsou pro produkci geneticky cenných embryí používány oocyty s velmi odlišnou meiotickou a vývojovou kompetencí, které jsou získávány bez ohledu na stádium folikulogeneze od donorek. I z tohoto důvodu je počet oocytů izolovaných od vysokoužitkových krav nízký, kvalita oocytů vysoce variabilní a příprava embryí i jejich konzervace méně efektivní.
- Zisk a kryotolerance přenosuschopných embryí jsou vždy závislé na množství a kvalitě získaných oocytů.
- Nedostatek vývojově kompetentních oocytů a nízký vývoj IVP embryí po kryokonzervaci limitují další rozvoj reprodukčních biotechnologií v chovech skotu.

Vývojová kompetence oocytů

- Pro zvýšení efektivnosti reprodukčních biotechnologií je nezbytné zvýšit podíl oocytů s vyšším vývojovým potenciálem (Smidt et Niemann, 1999; Merton et al., 2003).
- Bylo prokázáno, že oocyty izolované v pozdní fázi folikulárního růstu/stagnace, mají po oplození vyšší vývojový potenciál než oocyty izolované z ovárií v ostatních fázích folikulogeneze (Machatková et al. 2004).
- Současně bylo potvrzeno, že relativně vysoká vývojová kompetence získaných oocytů se pozitivně projeví jak v zisku, tak i ve vyšší kryotoleranci produkovaných embryí (Machatková et al. 2006, 2008).

Současný vývoj RB

- Hlavními záměry ve vývoji RB je zvýšit zisk bovinních oocytů, vyprodukovat z nich progresivně se vyvíjející a kvalitní embrya pro kryokonzervaci a zlepšit vývoj rozmrazených embryí po transferu do synchronizovaných příjemkyní.
- Finálním cílem je komplexní postup odběru oocytů s vysokou meiotickou a vývojovou kompetencí a přípravy kryotolerantních, embryí od geneticky cenných donorek.

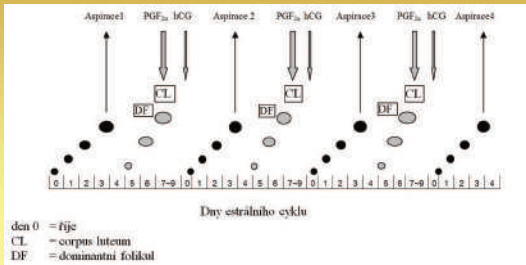
Výběr donorek

- Pro transvaginální aspiraci oocytů (OPU) je možno použít cyklující krávy, kdykoliv v průběhu jejich života, mimo 2. a 3. trimestr březosti.
- Pro aspiraci oocytů mohou být použity také časně postpubertální jalovice, krávy bez odezvy na hormonální stimulaci a krávy v 1. trimestru gravidity. U acyklických krav je nutno ovariální cyklus nejdříve stimulovat 2-3 předcházejícími aspiracemi.
- Jako donorky oocytů *post mortem* jsou využívány vysokoužitkové krávy vyřazené z chovu pro neplodnost, jiné závažné poruchy zdraví nebo vysoké stáří.

Příprava donorek

- Před odběrem oocytů je nutno ověřit reprodukční status donorky sonografickým vyšetřením. Indukovat říji aplikací jedné nebo dvou dávek Oestrophanu v intervalu 11 dnů. Využít lze i spontánní říji. Nástup říje potvrdit rutinní kontrolou, ovulaci a růst folikulární vlny ověřit sonograficky.
- Třetí až čtvrtý den po říji, v pozdním stadiu folikulární vlny, lze na ováriích lokalizovat průměrně 12-14 folikulů, z nichž 75 % je vhodných pro punkci.
- Pokud nedojde k aspiraci oocytů, selektuje se na ováriích spontánně dominantní folikul, který mezi 5.-7. dnem cyklu vyvolá atresii podřízených folikulů, sníží výtěžnost aspirace a zhorší morfologickou kvalitu a vývojovou kompetenci získaných oocytů.

Aspirační schema



Příprava donorek

- Pokud je třeba aspirovat oocyty opakovaně, je možno folikuly punktovat 5 - 6 krát, vždy v 10 denním intervalu.
- Před každou punkcí je však nutné vyvolat říji, pomocí Oestrophanu (PGF2α) injikovaného vždy 4. den po provedené aspiraci a stimulovat ovulaci pomocí Pregnylu (hCG, 1.500 I.U. Organon) aplikovaného v den nástupu říje.
- U březích krav jsou využívány folikulární vlny vznikající na ováriích spontánně v 1. trimestru, především mezi 60. - 90. dnem březosti, kdy lze aspirovat oocyty v 5 denním intervalu.
- Pokud mají být oocyty získány z ovárií *post mortem*, je pohlavní cyklus donorky synchronizován stejným způsobem tak, aby v době porážky byla donorka ve vhodném stadiu vývoje folikulů, to je 3. až 4. den po říji.

Odběr oocytů metodou OPU

- Folikuly ≥ 5mm jsou punktovány jemným kmitavým pohybem jednorázovou jehlou typu 25 x 1,1 mm, 19 G1, short bevel . Jehla je vedena pod povrchem ovariálního cortexu, vždy z apikálních částí ována do ekvatoriální roviny.
- Oocyty jsou odsáty s folikulární tekutinou do aspirační zkumavky s ekvilibrovaným Tyrodovým médiem s heparinem (10 I.U./ml) pomocí ruční vakuové pumpy, při průtoku 15-20 ml/min. Oocyty jsou transportovány do laboratoře co nejrychleji při teplotě minimálně 30°C.

Odběr oocytů post mortem

- Vaječníky jsou transportovány do laboratoře v termosce, při teplotě mezi 30 - 33°C tak, aby oocyty mohly být izolovány do 2 hodin od porážky zvířete.
- Ována jsou dekontaminována opakovaným oplachem sterilní redestilovanou vodou a následně fyziologickým roztokem PBS-Dulbecco.
- Folikuly jsou otevřeny pomocí totální disekce ovariálního kortexu v Petriho misce s manipulačním médiem.

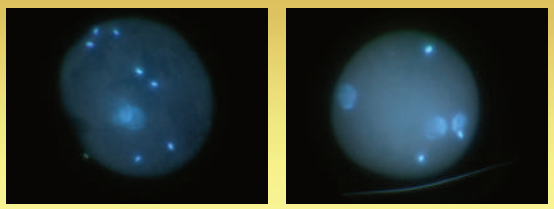
Testace býků v penetračním testu

- Izolovat nezralé oocyty jatečných krav
- Oocyty zrát v médiu po dobu 24 hodin
- Inseminovat je spermiemi testovaných býků separovanými z inseminační dávky
- Vyhodnotit účinnost oplození fluorescenčním vyšetřením oocytů

Predikce fertility býků

Penetrace inseminovaných oocytů (po 6h)	$Index_{IVF}$	Plodnost býka v prostředí in vitro
> 60%	> 18	Produkce blastocyst > 25%
40%-60%	10-18	Produkce blastocyst 15-25%
< 40%	< 10	Produkce blastocyst < 15%

Oplozené oocyty

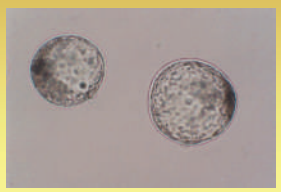


* hodnoceno 18 hpi

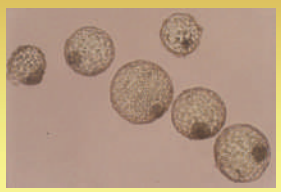
Příprava embryí

- Oocyty zachycené na filtru jsou přeneseny do izolačního média. Pro zrání jsou použity všechny oocyty s ukončeným růstem o velikosti 130 µm, obklopené vrstvou corony radiaty a alespoň jednou vrstvou kumulárních buněk.
- Oocyty každé z donorek jsou přeneseny do jamek mikroplotny a ve zracím médiu jsou kultivovány při teplotě 38,5°C v atmosféře 5% CO^2 po dobu 24 hodin.
- Po rozmrazení je sperma býka podvrstveno pod médium ve zkumavce. Motilní spermie jsou izolovány metodou „swim up“ při teplotě 38,5°C po dobu 1 hodiny Pro oplození oocytů je použito fertilizační médium obsahující $1x10^6$ spermií/ml a 10 µg/ml heparinu jako kapacitační stimulans.
- Za 18 - 20 hodin po oplození jsou z oocytů odstraněny kumulární buňky a zygoty jsou přeneseny na monolayer stabilní buněčné linie,na kterém se vyvíjejí do přenosuschopných stádií, to je do časné až vyspělé blastocysty, po dobu 7- 8 dnů.

IVP embrya skotu



a) stádium blastocysty 7. dpi



b) stádium hatchingu 9. dpi

Enzymatické ošetření embryí

- Progresivně se vyvíjející a morfologicky kvalitní embrya, která dosáhnou 7. den po oplození stádia časné nebo 8. den stádia vyspělé blastocysty, je vhodné před kryokonzervací enzymaticky ošetřit v médiu Hanks-BSS s 0,25% trypsinu.
- Metodika pro ošetření embryí vychází z doporučení International Embryo Transfer Society publikovaných v roce 1998.
- Tímto způsobem jsou embrya před kryokonzervací zbavena nejen zbytků kumulárních buněk a adherovaných spermií, ale především potencionálních virových nebo bakteriálních patogenů, z nichž některé se mohou vázat na zonu pellucidu.

Standardní konzervace embryí

- Po ošetření lze embrya konzervovat bez ztráty jejich vývojové schopnosti standardními zmrazovacími postupy.
- Před kryokonzervací jsou embrya nejdříve ekvilibrována ve zmrazovacím médiu s glycerolem při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.
- Následně jsou zchlazena rychlostí -5°C/min do teploty -7°C, kdy je po 10 minutové ekvilibraci navozena krystalizace zmrazovacího média.
- Po další 10 minutové ekvilibraci jsou embrya zmrazena rychlostí -0,3 °C/min do teploty -35°C, při které jsou pejety ponořeny do tekutého dusíku.

Konzervace embryí vitrifikací

- Embrya jsou nejdříve ekvilibrována v médiu TCM - 199 s 10 % estrálního séra a 10 % glycerolu při laboratorní teplotě po dobu 7 minut.
- Následně jsou přenesena do vitrifikačního média TCM-199 s 20 % estrálního séra a 30 % glycerolu na dobu 90 s, během kterých jsou umístěna na kryoháčky.
- Kryoháčky s embryi jsou přitisknuty na kryoblok vychlazený ze 2/3 v tekutém dusíku na dobu 5 s, přeneseny do pejet a ponořeny do tekutého dusíku.
- Po vyjmutí z dusíku jsou pejety otevřeny, kryoháčky vyjmuty a kryoprotektivum je vymyto z embryí dvoustepově; ponořením do média I (TCM - 199 s 10% estrálního séra a 1M sacharózy) a média II (TCM - 199 s 10% estrálního séra a 0,5M sacharózy) vždy na dobu 5 minut.

Embryotransfer

- Pejety s embryi jsou nejdříve rozmrazeny na vzduchu po dobu 10 s a následně ve vodní lázni při teplotě 30°C po dobu 15 s.
- Kryoprotektivum je z embryí odstraněno třístepově, pomocí vymývacího média se snižující se koncentrací glycerolu a stabilní koncentrací sacharózy.
- Bezprostředně po morfologické kontrole jsou embrya přenesena do příjemkyň synchronizovaných na 7. den pohlavního cyklu. Gravidita je odečtena sonograficky nebo palpačně 56. nebo 90. den po přenosu
- Po přenosu čerstvých embryí produkovaných in vitro lze dosáhnout průměrně 57,1% březosti, po přenosu konzervovaných embryí je průměrná úspěšnost 47,8%.

Závěry

- Pomocí metody transvaginální aspirace oocytů je možno v relativně krátké době 40 dnů provést u jedné donorky až 5 OPU, získat průměrně 25 použitelných oocytů a připravit až 8 embryí.
- U neplodných donorek *post mortem* lze izolovat až dvojnásobný počet použitelných oocytů na donorku (20,4 vs 11,7), s vyšší vývojovou schopností (21,8% vs 10,5% embryí z oocytů)
- To umožňuje získat signifikantně vyšší počet přenosuschopných embryí na donorku (4,3 vs 1,0)
- Vývoj u těchto oocytů je akcelerován, což pozitivně ovlivňuje jak kvalitu embryí, tak i jejich kryotoleranci.
- Embrya lze úspěšně konzervovat klasickými zmrazovacími postupy ale i rychlou metodou - vitrifikace, která je pro provozní podmínky chovů metodicky jednodušší a finančně méně náročná.

Využití RB u v chovu skotu

- Metoda produkce kryotolerantních embryí skotu in vitro byla prakticky ověřena v rámci spolupráce Laboratoře RB s chovateli dojeného i masného skotu.
- Je určena především specializovaným pracovištím, která jsou oprávněna produkovat embrya skotu v systému in vitro.
- Je využitelná také pro subjekty, které poskytují chovatelům služby v oblasti reprodukce a šlechtění, včetně embryotransferu a současně i pro špičkové chovatele, kteří mají reálné předpoklady využívat reprodukčních biotechnologie pro své šlechtitelské záměry.

Děkuji za pozornost

Copyright:

Výzkumný ústav veterinárního
lékařství, v. v. i. Brno
Hudcova 296/70, 621 00

Tel.:+420 773 756 631
E-mail: vf-registrace@vri.cz

http://vri.cz/cz/vuvel_fest