

Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů  
Katedra obecné zootechniky a etologie

# **Inseminace fen**

Bakalářská práce

Autor práce: Michaela Součková

Vedoucí práce: doc. Ing. Lukáš Jebavý, CSc.

2012

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Inseminace fen“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 07. 03. 2012

.....  
Michaela Součková

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat panu doc. Ing. L. Jebavému, CSc., jako vedoucímu mé bakalářské práce za odborné vedení, MVDr. A. Lázničkovi za cenné rady, čas a poskytnutí literatury a především mé a rodině za trpělivost a pochopení.

Michaela Součková

## Souhrn

Inseminace ve světě lidí i zvířat je stále více používanou metodou. Na inseminaci fen se názory různí, a to jak z řad veterinárních lékařů, genetiků tak v neposlední řadě samotných chovatelů. Přesto, že by inseminace neměla v žádném případě nahradit ve větší míře přirozené krytí mezi psem a fenou, byla by škoda nevyužít řady možností, která tato metoda nabízí. Inseminace umožňuje zajištění kvalitního genetického materiálu ze vzdálených zemí, takže může oživit jak chovatelskou základnu v původní zemi, tak značně zpřístupní tuto možnost i po finanční stránce. Vzhledem k tomu, že například u mraženého spermatu je doba skladování mnoho let, můžeme využít genetického materiálu psa, který již nežije, a přesto chceme jeho geny do populace vrátit. Za zvážení stojí i podstatné snížení přenosu pohlavních či jiných infekčních chorob.

Samotné inseminaci předchází vyšetření feny i psa. U feny jde především o určení nejvhodnějšího termínu pro provedení zákroku. Nejlepší diagnostickou metodou při monitoringu pohlavního cyklu je progesteronový test. Další metodou vyšetření je poševní cytologie, či vaginoskopie. U psa se kontroluje celkový zdravotní stav. Oba musí být nezaměnitelně označení – čip, tetování.

K získání ejakulátu se používají tři způsoby, masturbace pyje, pomocí umělé pochvy a pomocí elektroejakulace.

V současnosti jsou popsány 3 základní metody umělého oplodnění, čerstvým spermatem, chlazeným spermatem a zmraženým spermatem, které může být uchováno až desítky let. Při reprodukci psů je několik variant inseminačních technik. O použití té které metody rozhoduje na základě posouzení vhodnosti lékař, který inseminaci provádí.

V České republice se umělým oplodněním zabývá hned několik veterinárních lékařů a klinik a i u nás jsou spermobanky pro dlouhodobé uchování spermatu, jejich využití zatím není tak hojné, ale jistě i tato doba brzy přijde. Jisté omezení zapříčiňuje ČMKU, které povoluje první krytí pomocí inseminace podmínkou: „Výjimku může udělit národní kynologická organizace, aby se zlepšilo zdraví plemene, rozšířil se genetický materiál plemene nebo fena neutrpěla újmu při krytí.“

Je předpoklad, že s využitím umělého oplodnění u fen se budeme v budoucnu v ČR setkávat čím dál více a tím se obohatí a zkvalitní chov psů u nás, což by měl být společný cíl jak lékařů, chovatelů tak organizací zabývajících se kynologií.

Klíčová slova: inseminace – sperma – pes – fena - oplodnění

## Summary

Insemination is a method ever more frequently used in the world of humans and animals. Opinions concerning dog insemination vary among veterinarians, geneticists and not least among breeders themselves. Despite the fact that artificial insemination should not replace natural mating between a dog and a bitch to a greater degree, it would be a pity not to take advantage of a range of options offered by this method. Artificial insemination enables to get a genetic material of high quality from a distant country so that the breeding base can be revived as well as it makes this option financially accessible. Owing to the fact that for example frozen semen can be stored for many years, the genetic material of a dog that is no longer alive can be used in order to return his genes into the dog population. We should also consider a substantial reduction of transmission of sexual or other infectious diseases. Prior to the actual insemination both the dog and the bitch have to be examined. Concerning the bitch, it is necessary to determine the most suitable time for insemination. The best method for monitoring the sexual cycle is a progesterone test. Vaginal cytology or vaginoscopy are other useful methods. Concerning the dog, his overall health status is examined. Both the bitch and the dog have to have an unmistakable identification - a chip or a tattoo. There are three methods how to collect ejaculate: manual stimulation of the penis, using an artificial vagina or by electroejaculation.

At present, there are three basic methods of artificial insemination: using fresh semen, chilled semen or frozen semen that can be stored for many years. For dog reproduction, there are several options of insemination techniques. The suitability of a particular method is evaluated and decided on by a veterinarian who is going to do the insemination.

In the Czech Republic, several veterinarians and veterinary clinics do artificial insemination. There are also sperm banks for a long-term storage of the semen the use of which is not as frequent but certainly their time will come soon. There are some restrictions made by ČMKU, that allow first mating by artificial insemination only on condition: "An exception may be granted by a national canine organization in order to improve the health of the breed, to spread the genetic material of the breed or when a bitch has suffered an injury during mating." It is assumed that using artificial insemination in bitches in the future will be much more frequent in the Czech Republic and thereby the quality of a dog breed will be improved. This should be a common objective of all, veterinarians, breeders and cynology associations.

Keywords : insemination - semen - dog - bitch - fertilization

## Obsah:

1.	Úvod.....	1
2.	Cíl bakalářské práce.....	2
3.	Anatomie pohlavních orgánů .....	3
	3.1 Anatomie pohlavních orgánů psa.....	3
	3.2 Anatomie pohlavních orgánů feny.....	4
4.	Pohlavní cyklus feny, říjový cyklus.....	4
	4.1 Proestrus.....	5
	4.2 Estrus.....	6
	4.3 Metestrus.....	7
	4.4 Konec říje má dvě možné varianty dalšího vývoje.....	8
	4.5 Anestrus.....	8
	4.6 Ovulace.....	8
5.	Nejvhodnější doba krytí.....	9
	5.1 Poševní cytologie.....	10
	5.2 Vaginoskopie.....	10
	5.3 Progesteronový test.....	12
	5.4 Ultrasonografická folikulometrie.....	13
6.	Inseminace .....	13
	6.1 Indikace pro inseminaci.....	15
	6.2 Gynekologické vyšetření feny.....	16
	6.3 Vyšetření psa, analýza spermatu .....	16
	6.4 Odběr spermatu.....	17
	6.5 Přehled jednotlivých skupin inseminačních technik.....	20
	6.5.1 Inseminace podle charakteru spermatu.....	20

6.5.2 Inseminace podle místa aplikace spermatu.....	20
6.5.3 Inseminace podle způsobu přenosu.....	21
6.5.4 Inseminace podle použitého instrumentaria.....	21
6.5.5 Inseminace podle frakce spermatu.....	21
6.6 Čerstvé sperma.....	21
6.7 Chlazené sperma.....	23
6.8 Mražené sperma.....	24
6.9 Aplikace spermatu.....	28
6.9.1 Čerstvé sperma.....	29
6.9.2 Chlazené sperma.....	30
6.9.3 Hluboce zmražené sperma.....	31
7. Inseminace a legislativa v ČR.....	32
8. Závěr.....	35
9. Použitá literatura.....	36

## 1. Úvod

Inseminace, čili umělé oplodnění je přenos pohlavních buněk samce do pohlavního ústrojí samice jinou cestou než přirozenou, tedy namísto přirozené kopulace.

Díky stále rozvíjejícím se metodám je dnes možné využít genetický materiál vynikajících psů jednak ze zahraničí, čímž odpadá nutnost dalekého cestování, nebo dokonce využití psa, který již nežije a tím se otvírají další možnosti pro chovatelské záměry. Za zvážení stojí i zdravotní stránka – snížení rizika přenosu pohlavních a dalších infekčních chorob.

Inseminace má své výhody i nevýhody a je na ní pohlíženo z mnoha úhlů i pohledů. V současnosti jsou popsány 3 základní metody umělého oplodnění, čerstvým spermatem, chlazeným spermatem a zmraženým spermatem, které může být uchováno až desítky let.



## **2. Cíl bakalářské práce**

Cílem mé bakalářské práce je zaměřením se na výhody a nevýhody umělého oplodnění u psů, poukázat na nejčastější postupy, které se v této oblasti používají a získat pohled na umělé oplodnění jak z pohledu veterinárního, tak z pohledu legislativy a chovatelů.

### **3. Anatomie pohlavních orgánů**

Pohlavní orgány jsou jediné orgány jedince, které neslouží zachování jedince, nýbrž slouží zachování druhu. Rozeznáváme samčí a samičí pohlavní ústrojí, jejichž hlavními funkcemi jsou: produkce pohlavních buněk a hormonů, zprostředkování spojení těchto buněk (oplození), k němuž dochází pohlavním stykem (pářením), a umožnění vývoje nového jedince v těle matky. (Červený a kol., 1999)

Hlavní funkcí pohlavního ústrojí je plození potomstva, a tím i reprodukce druhu. Rozdílné pohlavní orgány jsou základem tzv. pohlavního dimorfizmu psa a feny, který umožňuje rozlišit podle vnějších znaků. (Procházka, 2005)

Pro tyto funkce jsou orgány upraveny a v průběhu pohlavního cyklu, u samic také v období vývoje nového jedince (březosti), procházejí určitými změnami. Pohlavní ústrojí se vyvíjí z indiferentních základů, které se od konce embryonálního období rozlišují na orgány samčí a samičí, četné útvary jsou homologické. (Červený a kol., 1999)

#### **3.1 Anatomie pohlavních orgánů psa**

K samčímu pohlavnímu ústrojí patří pohlavní žlázy zvané testes – varlata. (Červený a kol., 1999) Varle (testis) – párová varlata slouží k tvorbě spermií. (Červený a kol., 1999) Velikost varlat je rozličná v závislosti na velikosti plemene, průměrně jsou velká 3x2x1,5 cm. (Kvapil, 2007) Epidydimides – nadvarlata, funiculum spermaticus – semenný provazec, glandulae genitales accessoriae – přídatné pohlavní žlázy – a partes genitales masculine externae – zevní pohlavní ústrojí, tj penis et urethra – pyj s močovou trubicí, uložený v kožní duplikatuře, nazývané preputium – předkožka.

K zevnímu ústrojí také patří vychlípenina břišní dutiny – scrotum - šourek, v němž jsou uložena varlata. (Červený a kol., 1999) Šourek je kožní vak, ve kterém je uloženo varle, nadvarle a semenný provazec. (Marvan, 2007). Během vývoje plodů vzniká základ varlat v dutině břišní a s tímto stavem se štěňata i rodí. Po kratší nebo delší době teprve varlata sestupují tříselnými kanály do šourku. Tak se varlata dostávají do prostředí, ve kterém je teplota o 4 až 5 °C nižší, než byla v dutině břišní, ta je nezbytná ke správnému vývoji spermií. Nedojde-li k tomuto sestoupení varlat do šourku štěňat - psíků, jedno nebo obě zůstávají vězet

bud' v dutině břišní, nebo v tříselném kanálu, vzniká stav zvaný kryptorchismus (jednostranný nebo oboustranný). (Procházka, 2005)

### **3.2 Anatomie pohlavních orgánů feny**

Reprodukční funkce u samic zajišťují produkci vajíček a poskytují prostředí pro růst a vývoj plodu, který se vyvíjí po oplození zralého vajíčka spermíí. Samice tak plní svoji základní roli – porodit ve správném čase živé mládě a laktací zajišťovat jeho výživu. (Reece, 1998)

Samičí pohlavní ústrojí tvoří pohlavní žlázy zvané ovaria – vaječníky, (Červený a kol., 1999) ve kterých se vytvářejí vajíčka a pohlavní hormony. Vaječníky se nacházejí v dutině břišní v blízkosti páteře, těsně za ledvinami, asi v oblasti 3 - 4 bederního obratle. Vaječníky mají vejčitý tvar (délka 1 až 2 cm, průměr 1,5 cm) a jsou zcela ukryty ve vaječnickovém vaku. Zvláštností je, že u většiny fen levý vaječník je těžší než pravý a obsahuje také více preovulačních folikulů. Vaječníky novorozených fen obsahují asi 700 000 vajíček, v dospělosti tento počet klesá na 350 000. Ve věku 5 let jich je jen 33 000 a v 10 letech jen 500. (Kvapil, 2007), dále tuba uterina – vejcovod, uterus – děloha, vagina – pochva – a partes genitales externae – zevní samičí pohlavní ústrojí, kam patří vestibulum vaginae – poševní předsíň, urethra – močová trubice a vulva – (ochod, vateň) (Červený a kol., 1999)

### **4. Pohlavní cyklus feny, říjový cyklus**

Hárání: pod pojmem hárání jsou zahrnuty dvě fáze pohlavního cyklu - proestrus a estrus. Celková délka zevního projevu hárání se u většiny fen pohybuje mezi 14 až 21 dny, při maximálním fyziologickém rozpětí 7 - 30 dní. (Láznička, 2012)

Pohlavní dospělost feny, provázená anatomickým a sekreторickým rozvojem pohlavních orgánů feny, se projevuje vnějšími a vnitřními změnami, které se ve svém souboru nazývají říje nebo též hárání feny (fena hárá, méně vhodné je označení, že se běhá). Tyto změny jsou podmíněny složitým mechanismem působení hormonů podvěsku mozkového (hypofýzy), brzlíku a vaječnicků. Gonadotropní hormony hypofýzy vyvolávají u fen rozvoj ovariálního cyklu zpravidla dvakrát do roka, fena se tak řadí mezi diestrická zvířata. (Procházka, 2005)

Definice říjového cyklu je poměrně složitá. Pohlavní cyklus můžeme definovat jako koordinovaný sled změn na vaječnicích, pohlavních orgánech (děloha, pochva) a v chování změn, které se objevují u všech savců, tedy i u psů. (Kvapil, 2007)

Asi 30 až 40 dní před říjí se začínají zvětšovat vaječníky feny a nastupuje přípravné stadium říje bez výrazných vnějších příznaků. Říje sama se pak podle morfologických i sekretorických změn dělí na čtyři od sebe málo ohraničené fáze. (Procházka, 2005)

Termín „estrální cyklus“ označuje rytmické změny pozorované v chování u všech savců, které zahrnují pravidelné, ale omezené periody svolnosti k páření (estrus=říje). (Reece, 1998)

Jeden interval cyklu je definován jako čas od začátku jednoho cyklu říje (svolnosti k páření) k dalšímu (ovulační interval). (Reece, 1998)

Délka říje 8-14 dnů, říje se opakuje 1x za půl roku, doba ovulace 10.-13. den říje, doba vhodná pro zapuštění nebo inseminaci – 9.-11. den (Marvan, 2007)

Fena má neobvykle dlouhou periodu ovariální inaktivity, která nemá vztah k fotoperiodě nebo k výživě. Estrální cyklus se může vyskytnout v průběhu celého roku. Stadia estrálního cyklu se liší od ostatních druhů v délce trvání. (Reece, 1998)

#### **4.1 Proestrus**

Celý říjový cyklus začíná stádiem proestru. Toto stádium následuje po období sexuálního klidu. (Kvapil, 2007) Počínaje od prvních příznaků vulvy otoků a krevních zbarvený výtoků a končí, když je připuštěn pes. (Christiansen, 1984)

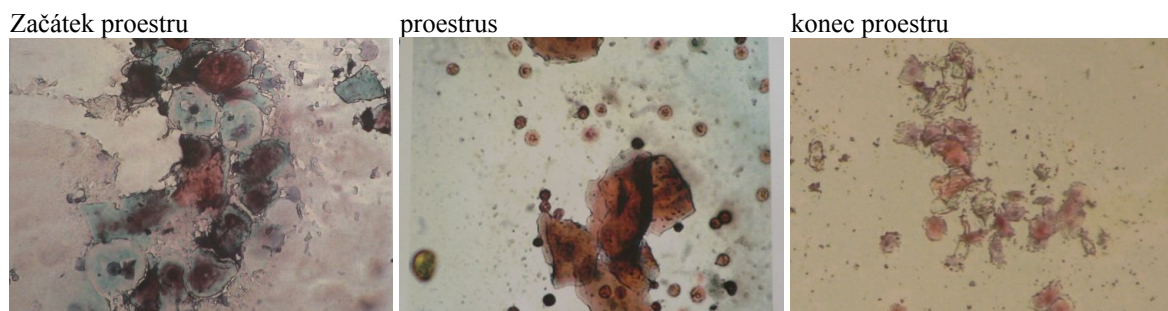
V první fázi hárání, proestru, dochází k přesmyku sekrece GnRH v hypotalamu na tzv. cyklický rytmus, který je impulzem pro spuštění sekrece FSH v hypotalamu. FSH se váže na receptory folikulárních buněk a aktivuje zde sekreci estrogenů.

Pod vlivem estrogenů dochází k aktivaci mitotického dělení folikulárních buněk, začínají růst folikuly. Současně s tím se začíná zvyšovat počet buněčných vrstev v pochvě, vytváří se nové subserózní kapiláry, cévy dilatují, zvyšuje se proces transudace, pohlavní orgány se překrví a edematózně zduří. Zvýší se citlivost dělohy k oxytocinu a ve směru od apikálního konce děložních rohů k děložnímu krčku probíhají peristaltické stahy. Naopak děložní krček se vlivem estrogenů relaxuje. V perianální a vulvární oblasti se začínají vylučovat feromony.

Estrogeny zvyšují počet vazebných míst v pohlavním aparátu pro progesteron. Tento fyziologický děj se odráží na zevních příznacích v podobě častějšího a slabého močení

(značkování), častého olizování přezky (čištění se), zduření přezky a především v krvavém výtoku. Výtok z pohlavních cest bývá nejintenzivnější asi kolem 3. až 5. dne hárání. Do konce prvního týdne hárání se stává výtok řídkým, lakově červeným. Intenzita výtoku ustává mezi 9. až 14. dnem hárání. V této době se fena stává velmi atraktivní pro psy, sama začíná být neposlušná, utíká, vyhledává a láká psy na krytí. (Láznička, 2012)

U fen během proestru, kdy se zvyšuje hladina estrogenu, chybí svolnost k páření, i když jsou pro samce sexuálně atraktivní. Pouze, když se blízko ovulace dostaví vlna LH, dostaví se i svolnost k páření. (Reece, 1998)

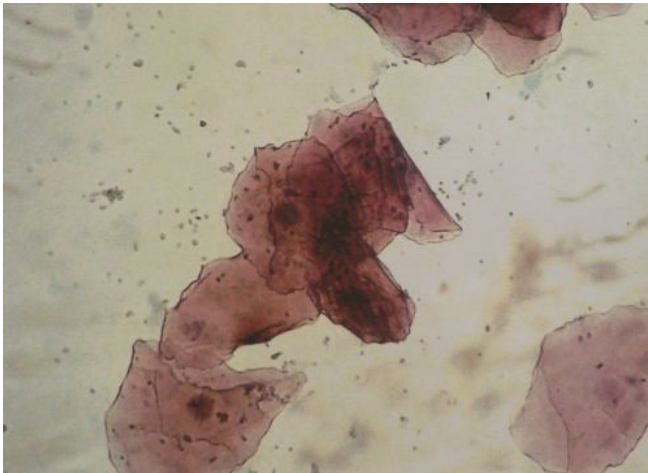


Obr. 1.-3. Proestrus (Canine Reproduction, 2010)

## 4.2 Estrus

V druhé fázi hárání, estru, po vysycení vazebných míst v hypotalamu estrogenu, dochází k přesmyku v uvolňování GnRH z cyklického na tonický rytmus. V hypofýze se z důsledku toho začne vylučovat LH, který se váže na folikulární buňky, kde způsobuje enzymatický přesmyk ve steroidogenezi a nastupuje proces tzv. luteinizace. Folikuly začínají tvořit progesteron. Změna v hormonální sekreci vyvolává výraznou změnu v sexuálním chování feny, ta se stává svolnou k páření. V tomto období se mění i charakter výtoku. Slábne, je hlenovitý a špinavě růžový. Změnu výtoku zpravidla do 2-3 dní následuje uvolňování vajíček – ovulace. (Láznička, 2012)

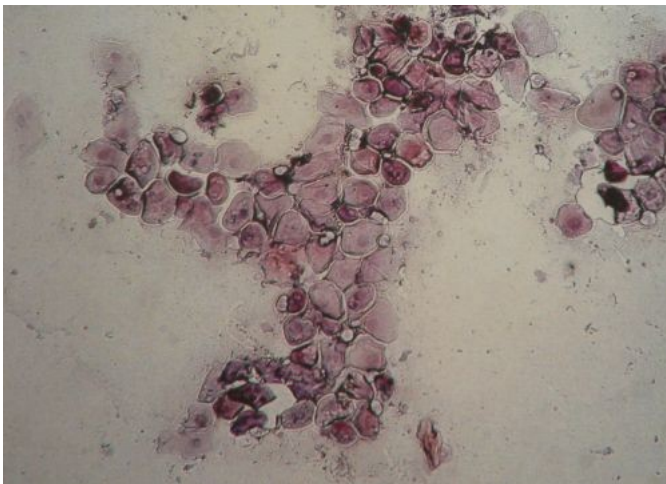
Přezka je nejvíce oteklá a zvětšená. Je to období, kdy je fena nejvíce atraktivní pro psy, podbízí se jim, při vzeskoku psa stojí s ocasem zvednutým na stranu. (Kvapil, 2007)



Obr.4 Estrus (Canine Reproduction, 2010)

### 4.3 Metestrus

Toto stádium vzniká u nenakrytých fen. (Kvapil, 2007) Otok přezky poměrně rychle zmenšuje a mizí, zmenšuje se vaginální výtok. Fena se stává klidná a uvolněná a přitažlivost psů brzy se snižuje" (Christiansen,1984). Ustupuje překrvení pohlavních orgánů, ustává výtok hlenu, uzavírá se kanál děložního krčku a zvíře se uklidňuje. (Kvapil, 2007)



Obr.5. Metestrus (Canine Reproduction, 2010)

#### 4.4 Konec říje má dvě možné varianty dalšího vývoje

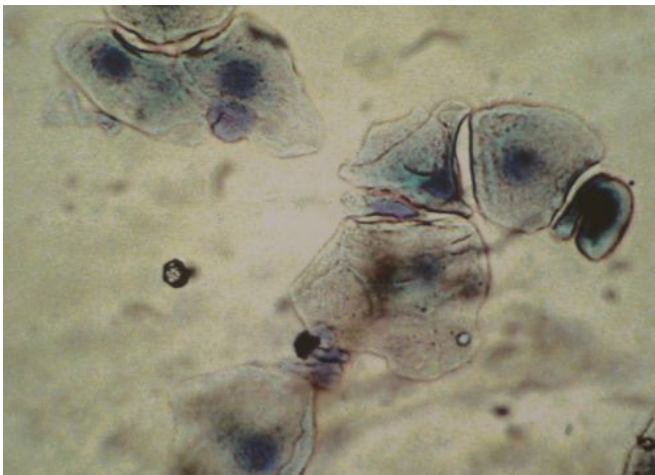
a) po oplodnění vajíček vzniká březost (gravidita), při které žluté tělísko přetrvává a oplodněná vajíčka se uchycují na sliznici dělohy

b) při neoplození nastává diestrus, během kterého dochází ke vstřebání žlutého tělíska, děložní sliznice se uklidňuje a říje přechází do celkového klidu, zvaného anestrus. (Procházka, 2005)

#### 4.5 Anestrus

Před proestrem se vyskytuje dlouhá perioda sexuální inaktivity (anestrus), během které je hladina progesteronu nízká nebo nulová. (Červený a kol., 1999)

Toto období je v průměru 125 dní ovariální nečinnosti, během kterého není výtok z pochvy. (Christiansen, 1984)



Obr.6. Anestrus (Canine Reproduction, 2010)

#### 4.6 Ovulace

Ovulace u feny probíhá spontánně, nezávisle na její vůli a je řízena hypofyzárními a ovariálními hormony. Růst folikulů je podmíněn také zmnožením folikulární tekutiny, čímž se uvnitř folikulů zvýší tlak, který je odpovědný za vaskulární reakci na pólu folikulu. Kromě toho dochází k enzymatickému narušení stěny folikulů. Stěna folikulů praská a vajíčka i s folikulární tekutinou jsou zachycena a nasáta do nálevky vejcovodu. U feny ovuluje obvykle 4-6 folikulů, přičemž v každém folikulu mohou být až 3 vajíčka. Proto počet folikulů na vaječnicích nemusí odpovídat počtu vajíček a následně počtu štěňat. Ovulace u feny je

déletrvající proces, může trvat několik hodin při stresových stavech i dny, nejčastěji se udává interval 12-72 hodin. Co se týče zahájení ovulace ve vztahu k délce hárání, nejčastěji k ní dochází 2 dny před až 7 dní po zahájení estru. Obvykle k ovulaci dochází 1-3 dny po projevení se prvního zájmu feny o psa. Mezi chovateli tradovaná zkušenost o vhodnosti krytí mezi 10.-14. dnem od začátku krvavého výtoku platí jen asi pro 60% fen. Počátek ovulace je rovněž ovlivněn věkem feny. Mladší feny zpravidla ovulují dříve. (Láznička) ZRÁNÍ VAJÍČEK - Vajíčka jsou ovulována ještě nezralá, tzn. neoplozeníschopná. K jejich dozrání, druhému meiotickému dělení, dochází v ampule vejcovodu do 24-96 hodin po ovulaci. Poté již oplozeníschopná vajíčka setrvávají ve vejcovodu kde v průběhu další 48 hodinách dojde k oplození nebo následně degenerují a jsou rozložena a vstřebána. (Láznička, 2012)

## 5. Nejvhodnější doba krytí

### STANOVENÍ PLODNÉHO OBDOBÍ U FEN

Ke stanovení plodného období u fen lze využít celou řadu různě složitých testů, které by však měly být vždy zhodnoceny vždy s ohledem na klinické projevy hárání a chování feny.

Vhodnost posouzení jednotlivých chovatelských parametrů  
pro stanovení oplodného období u fen

Parametr	Plodné období
Chování feny:	
první projevy zájmu o psa	o 3-5 dnů později
první projevy svolnosti ke krytí	o 2-3 dny později
dávání ocasu na stranu	žádný vztah
stupeň dávání ocasu na stranu	žádný vztah
Klinické nálezy:	
objevení se krvavého výtoku	o 10-14 dní později
objevení se slámového výtoku	o 2-3 dny později
stupeň zduření přezky	žádný vztah
barva sliznice poševní	žádný vztah

(Láznička, 2012)

Někteří majitelé určují připravenost feny ke krytí tak, že jí podrbou pod zádí, na což k oplodnění připravená fena zpravidla zareaguje zdvižením ocasu a jeho vytočením do strany.



Tato metoda však není příliš spolehlivá, některé ženy totiž takto reagují během celého období barvení. (Verhoef, 2005)

## **5.1 Poševní cytologie**

Nejběžnější metodou využívanou při stanovení plodného období žen je poševní cytologie. Její spolehlivost může u žen dosáhnout i více než 70%. Poševní cytologie zpřesňuje posouzení úrovně hormonální aktivity vaječníků a reakce pohlavních orgánů na tyto hormony. (Kvapil, 2007)

Princip poševní cytologie spočívá v reakci poševní sliznice na estrogeny, které jsou v maximálním množství vylučovány během proestru. V této době dochází ke zmnožení buněčných vrstev poševní sliznice a ke změně charakteru poševních buněk. Tyto buňky tím, jak jsou odtláčovány od bazální membrány a ztrácejí zdroj výživy postupně odumírají a mění se jejich tvar i barvitelnost. Dalšími ukazateli, které v poševním stěru hodnotíme, jsou přítomnost či nepřítomnost buněčných jader, červených a bílých krvinek, bakterií a hlenu.

Poševní obraz v době optimální plodnosti je tvořen jednotlivými nebo v malých shlucích uspořádanými povrchovými buňkami, většinou bezjadernými, barvicími se ve spektru eosinofilních barviv.

V průběhu hárání se tedy cytologický obraz mění z původního malobuněčného - shluky malých buněk nižších vrstev s velkými jádry doprovázenými červenými a bílými krvinkami, do obrazu velkých povrchových buněk bez přítomnosti krevních elementů. Po odeznění hárání se obraz opět mění zpět k malobuněčnému. (Láznička, 2012)

Odběr nátěrů k cytologickému vyšetření, jeho fixace, barvení a příprava k mikroskopické prohlídce jsou základním předpokladem pro kvalitní výsledky, a proto nesmírně důležité. (Nykliček, 1970)

## **5.2 Vaginoskopie**

Základní diagnostickou metodou v monitorování fáze pohlavního cyklu u žen je vaginoskopie. Samotné posouzení vzhledu poševní sliznice zrakem nám dává představu o fázi pohlavního cyklu neboť s přibývajícím estrogenizací organismu dochází k charakteristické změně

slizničních řas pochvy. Ty se mění z původně balónovitých, vlhkých a růžového zabarvení, což je příznačné pro proestrus, do řas zřetelně svaštělých, jakoby suchých a světle růžových až bělavých v období estru. Diagnostická hodnota této změny pro určení fáze plodnosti fen je však velmi malá. Proto nám vaginoskopie spíše slouží ke zrakové kontrole místa odběru cytologického vzorku. (Láznička, 2012)

Vyšetření se provádí zavedením spekula nebo endoskopu do pochvy feny a zrakem se posoudí změny na sliznici pochvy. (Kvapil, 2007)



foto Michaela Součková 2012  
ordinace MVDr. Aloise Lázničky

Obr.7.Endoskop (ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)

### 5.3 Progesteronový test

Diagnostickou metodou s nejvyšší vypovídavostí při monitorování pohlavního cyklu u fen je progesteronový test.

Úspěšnost krytí a inseminací vedených pomocí poševní cytologie a progesteronového testu dosahuje až 95%. Navíc se předpokládá, že přesnost termínování krytí je tak vysoká, že může zvyšovat i počet štěňat ve vrhu.

Progesteronový test je založen na principu předovulačního zvýšení hladin krevního progesteronu, jež se děje v důsledku přesmyku steroidogeneze v buňkách obalu folikulů - membrana granulosa a theca interna pod vlivem zvýšení hladin hypofyzárního LH.

(Láznička, 2012)

V testu se využívá vysoce konstantní dynamiky růstu progesteronu. To umožnilo stanovit v průběhu hárání několik diagnostických úrovní:

<b>1. úroveň</b>	do 1 ng/ml	- <b>proestrus</b>
<b>2. úroveň</b>	okolo 2,5 ng/ml	- <b>časný estrus</b> do 2 dní proběhne ovulace
<b>3. úroveň</b>	okolo 5 ng/ml	- <b>vrchol estru</b> ovulace
<b>4. úroveň</b>	5-10 ng/ml	- <b>vrchol estru</b> zrání vajíček
<b>5. úroveň</b>	10-25 ng/ml	- <b>vrchol estru</b> oplozeníschopnosti vajíček
<b>6. úroveň</b>	nad 25 ng/ml	- <b>pozdní estrus</b>

Progesteronový test je jedinou metodou, která je schopna s velmi vysokou pravděpodobností potvrdit ovulaci. Přitom vyšetření krevního progesteronu je dnes při dobrém přístrojovém vybavení humánních a veterinárních laboratoří poměrně jednoduché a cenově dostupné. (Láznička, 2012)

## 5.4 Ultrasonografická folikulometrie

Ultrazvuková folikulometrie je neinvazivní vyšetření, při kterém je stanovována velikost folikulu. K vyšetření se používá speciální vaginální sonda o průměru 15 – 20 mm a k zaručení naprosté sterility je na sondu před každým vyšetřením navlečen prezervativ. Vyšetření je nebolestivé v délce několika minut. Vaginální sondou je možno zobrazit folikuly již od velikosti 2-3 mm. Většinou je toto vyšetření provedeno 2 - 3krát před ovulací a ještě po ovulaci, pro kontrolu, zda folikul pukl a ovulace skutečně proběhla. (Řežábek, 2004)

Diagnostika fáze pohlavního cyklu pomocí pohlavního cyklu pomocí ultrazvuku je u fen poměrně novou monitorovací technikou. Přestože se jedná o jedinou přímou metodu, která je schopna odhalit dynamické změny v činnosti vaječníků přímou vizualizací jejich struktur, její využití v klinické praxi nenašlo doposud své místo. (Láznička, 2011)

## 6. Inseminace

Inseminace představuje přenos pohlavních buněk samčích do pohlavního ústrojí samičího jinou cestou, než jejich přirozeným pohlavním stykem – pářením. (Láznička, 2011)

**Metody asistované reprodukce u psů** – první asistovanou reprodukci nebo reprodukční biotechnologii provedl u savců Ital Abbé Lazzaro Spallanzani v roce 1784, kdy popsal inseminaci právě u psů. I když to tehdy byl velmi významný začátek nové technologie v reprodukci zvířat, muselo se počkat zhruba 170 let, než se uplatnila i v chovu psů. Dnes je popsáno mnoho metod inseminace čerstvě odebraným semenem, chlazeným semenem pro krátkodobou konzervaci či zmrazeným semenem pro dlouhodobou konzervaci, u nejrůznějších druhů zvířat, včetně psů a objem nových poznatků v tomto oboru roste každým dnem. Biotechnologie rozmnožování u psů nezaostala experimentálně ani v oblasti in vitro dozrávání oocystů, in vitro fertilizace (oplození), přenosu embrií a klonování, i když tyto techniky jsou spíše na počátku výzkumu u psů než pro praktické využití. (Dostál, 2007)

I přesto, že bylo právě u psů, kdy byla použita inseminace nejdříve ze všech druhů zvířat, první štěňata po inseminaci mrazeným semenem popsal až Seager (1969). Pak již začal rychlý rozvoj této metody u psů. Dnes jsou chovatelé psů na celém světě schopni využít tuto metodu k použití vynikajících psů pro své chovatelské záměry. A to jak získáním semene ze

vzdálených zemí, tak konzervací semene svého vlastního vynikajícího jedince pro použití za mnoho, i desítek let. V mnoha zemích právě chovatelské organizace mají pod kontrolou jak odběr a přesnou identifikaci dávek semene, tak jejich využití. Například francouzská kynologická organizace SSC (obdoba naší ČMKU) vlastní banku semene psů, do které jsou ukládány inseminační dávky vynikajících psů všech plemen v době, kdy jsou ještě poměrně mladí a dávají kvalitní semeno, vhodné pro uložení. Pokud se později prokáže, že takový pes nedal v budoucnosti vynikající potomstvo po přirozeném krytí, nebo pokud jeho potomstvo mělo vylučující vady, trpělo dědičnými chorobami či defekty, je jeho semeno z banky odstraněno a doslova vylito, aby nemohlo být nikdy použito. Pokud však dává potomstvo požadované kvality, je takové semeno uchováno do té doby, než chovatelský klub nebo jeho majitel rozhodne o jeho využití. (Dostál, 2007)

Inseminace se volí především jako metoda terapeutická při řešení reprodukčních obtíží, tj. při neplodnosti ze strany psa nebo feny. Druhá méně častá indikace je preventivní, kdy se k užití metody přistupuje z důvodu snížení rizika přenosu infekčních onemocnění mezi psem a fenou. Velmi často jako jakási ochrana krycích psů. (Láznička, 2011)

Výhodou inseminace je možnost mikroskopického vyšetření semene psa a zhodnocení jeho kvality. Inseminaci může provádět pouze specializovaný veterinární lékař, který je též oprávněn o tomto úkonu provádět záznam na krycím listě. Umělá inseminace je za těchto podmínek uznávána chovatelskými předpisy za rovnocennou přirozenému krytí feny. (Procházka, 2005)

Třetí nejméně využívanou indikací je zvýšení genetického potenciálu psů. To znamená, že z jednoho odběru spermatu lze v průměru zhotovit inseminační dávky až pro 5 inseminací.

Před každou inseminací je nezbytné zjištění důvodu jejího vedení, případně správnost použití. (Láznička, 2011)

Výhody používání inseminačních dávek v plemenitbě:

- možnost uchovat fertilizační schopnost spermií po delší dobu
- oproti krytí získáte z jednoho odběru semene více inseminačních dávek
- snížení rizika transferu pohlavně přenosných nemocí
- možnost získat genetický materiál samců z celého světa bez nutnosti přepravy zvířat

- zamrazené semeno lze skladovat neomezeně dlouho a použít i po smrti dárce (<http://www.frozendogs.com/>, 2012 )
- použití na konzervaci nohrožených druhů a také řešení problémů neplodnosti u samců (Barbas a Mascarenhas)

## 6.1 indikace pro inseminaci

Důvody, pro které je umělá inseminace vyžadována, je možno rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny patří případy, kdy nelze uskutečnit přirozené krytí jak ze strany psa, tak i feny. Do druhé skupiny se řadí případy výzkumné, ekonomické (převoz na velké vzdálenosti) apod. Po dokonalém vyřešení dlouhodobé konzervace lze očekávat i širší využití inseminace z plemenářsko-chovatelských důvodů. (Gamčík, Kozumplík a kol. 1992)

Rozhodujícím momentem pro vedení inseminace je zjištění příčiny proč se daný pár nemůže nakrýt. (Láznička, 2012)

Fena:

- různé vrozené nebo získané abnormality.
- úzké pochvy u mladých fen vedoucí k bolesti a dokonce i odmítnutí páření
- zjizvená tkáň z předchozího porodu
- nervózní fena, problémy v chování, odmítání se pářit
- (Christiansen,1984)

Pes

- snížené libido psa
- onemocnění pánevních končetin
- agresivita feny
- velikostní rozdíl psa a feny
- nezkušenost chovatele
- snížená kvalita spermatu
- anomálie pohlavních cest (Láznička, 2012)
- riziko infekčního onemocnění (Christiansen,1984)
- chovný pes má vysokou genetickou hodnotu a chceme i nadále používat geny po jeho smrti pro reprodukci, a který byl vybrán z genetických důvodů

- v případě rizika předčasné smrti (loveckých nebo záchranářských psů), nebo když existuje riziko sterility po lékařském zákroku či úrazu. (Pierson, P. a kol., 2010)

Některé z výše uvedených indikací jsou pouze teoretické zájmu, a v takových případech by oplodnění nelze provést. (Christiansen, 1984)

## **6.2 Gynekologické vyšetření feny**

Toto vyšetření kromě běžné kontroly zdravotního stavu je také vyšetření velikosti, utváření a průchodnosti pohlavních cest. Pomocí poševní cytologie, případně progesteronového testu se bezprostředně před inseminací určí nebo vyloučí příslušný den jako termín vhodný k jejímu vedení. (Láznička, 2011)

Fena se vyšetří, v jakém je stádiu říje a zda je bakteriálně čistá. Když je ve vrcholu, udělá se krevní vyšetření. Dále se postupuje podle použité metody inseminace. Když je to čerstvým spermatem, tak se inseminuje 5 nanogramů na mililitr, u mraženého nad 10 nanogramů.

U inseminace mraženým spermatem se vyšetřuje děloha ultrazvukem, měří se folikuly, zda je fena v ovulaci. (Láznička, 2012)

Zabřezávání fen a velikost vrhu je spíš závislá na odhadu nejvhodnější doby pro inseminaci než na ukazatelích kvality semene. Samozřejmě, je-li kvalitasemene nízká, ani pak nemůžeme očekávat příliš velké úspěchy. (Dostál, 1995)

## **6.3 Vyšetření psa, analýza spermatu**

Andrologické vyšetření psa – stejně jako fena musí projít základními vyšetřeními. Kontroly zdravotního stavu a vyšetření velikosti a utváření pohlavních orgánů. (Láznička, 2011)

Pes musí být klinicky zdravý.

Pes musí být nezaměnitelně označený a identifikovatelný – čip, tetování (ideální je kombinace obou těchto způsobů označení)

Pes musí mít vyšetření na DNA, BRUCELOZU, LEPTOSPIROZU (pouze v některých zemích). (Pašek, 2007)





## 6.4 Odběr spermatu

Vyvolání reflexu erekce a ejakulace u psa je relativně snadné, když v blízkosti psa jako stimulátor působí hárající fena. Ejakulát psa je možno získat třemi způsoby: masturbací pyje, pomocí umělé pochvy a pomocí elektroejakulace. (Gamčík, Kozumplík a kol. 1992)

Velmi vhodný odběr semene u psů je v přítomnosti háravé feny. To pak psi dávají semeno velmi husé, které je možné velmi dobře ředit a které je zárukou úspěšného zmrazení. Obecně platí, že velcí psi dávají větší objem semene, které je možné naředit na větší počet inseminačních dávek, kdežto psi malých plemen dávají semena méně, z něhož je vyroben menší počet inseminačních dávek. (Dostál, 2007)

Pokud není shledána závažná překážka k uskutečnění inseminace, provede se odběr ejakulátu. (Láznička, 2011)

Vyvolání reflexu erekce a ejakulace u psa je relativně snadné, když v blízkosti psa jako stimulátor působí hárající fena. (Gamčík, Kozumplík a kol. 1992)

Odběr semene masáží pyje (masturbace) je způsob poměrně spolehlivý a nenáročný na vybavení, protože mimo sběrače semene nevyžaduje žádné další pomůcky. (Gamčík, Kozumplík a kol. 1992)

Odběr semene pomocí umělé pochvy – umělá pochva je založena na stejném principu jako úpochva pro býka, pouze délka kolísá od 150 do 200 mm a někdy se doporučuje i použití pulsátoru. Teplota umělé pochvy kolísá mezi 40-42 °C a tlak se přizpůsobuje velikosti pyje psa. Sběrač semene má být chráněn před chladem prostředí. Semeno se odebírá tak, že po vzeskoku psa na hárající fenu se pyj zavede do umělé pochvy, držené po pravé straně feny. (Gamčík, Kozumplík a kol. 1992)

Odběr semene stimulací elektrickým proudem (elektroejakulace) se doporučuje u psa výjimečně. (Gamčík, Kozumplík a kol. 1992)



Obr.8. Ejakulator  
(ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)



Obr.9.Sběrače semene  
(ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)



Obr.10.Výhřevný stolek na práci se spermatem – je třeba udržovat stálou teplotu 37 °C  
(ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)

### **frakce spermatu**

Semeno je ejakulováno ve třech frakcích. Celkový objem semene i jeho hodnoty se různí podle metody odběru, velikosti psa, věku apod.

Objem celého ejakulátu kolísá od 2 do 50 cm<sup>3</sup>. Nejčastěji se odběr ejakulátu přeruší po získání frakce bohaté na spermie (0,5 až 4 cm<sup>3</sup>). Barva semene je šedobílá až bílá a to v

závislosti na koncentraci spermií, která určuje i jeho konzistenci. Pach semene je typicky psí nebo nevýrazný. Koncentrace spermií kolísá mezi 5 – 500 000 v 1mm<sup>3</sup> a je v přímé závislosti na objemu ejakulátu. Počet morfologicky změněných spermií nemá přesáhnout hranici 20% a progresivní pohyb vpřed musí vykazovat nejméně 70%.

Přežitelnost spermií v neředěném spermatu se pohybuje kolem 8 hodin, je –li semeno přechováváno při pokojové teplotě. Přechovává-li se jen druhá frakce spermatu (pouze spermatická frakce), prodlouží se jeho přežitelnost na 24hodin, stejně tak při postupném ochlazení spermatu na 4 °C. (redakce MUJPES.CZ, 20.08.2008)

Plné sperma – 3 frakční

Nekompletní sperma

1 frakční (spermatická frakce)

2 frakční (spermatická a postspermatická frakce) (Láznička, 2011)

## **6.5 Přehled jednotlivých skupin inseminačních technik**

V rámci reprodukce psů existuje široká škála variant inseminačních technik. Každá z těchto technik má svá pozitiva a negativa. A prakticky individuálně podle posouzení vhodnosti té které metody pro daného psa či fenu by se měli sestavovat a příslušně využívat. (Láznička, 2011)

### **6.5.1 Inseminace podle charakteru spermatu**

Čerstvé do 30 minut

Krátkodobě konzervované do 2 hod a 2 dnů

Dlouhodobě konzervované – roky (Láznička, 2012)

### **6.5.2 Inseminace podle místa aplikace spermatu**

Intravaginální (do pochvy)

Intrauterinní (do dělohy)

### 6.5.3 Inseminace podle způsobu přenosu

Klasickou metodou

Operativně – laparoskopicky (otevřením dutiny břišní)

laparoskopicky (bez otevření dutiny břišní)

### 6.5.4 Inseminace podle použitého instrumentaria

Rigidní katetry – plastové, skleněné, kovové

Flexibilní plastové katetry – s balónkem, bez balónku

### 6.5.5 Inseminace podle frakce spermatu

- Plné sperma – 3 frakční
- Nekompletní sperma
  - 1 frakční (spermatická frakce)
  - 2 frakční (spermatická a postspermatická frakce)

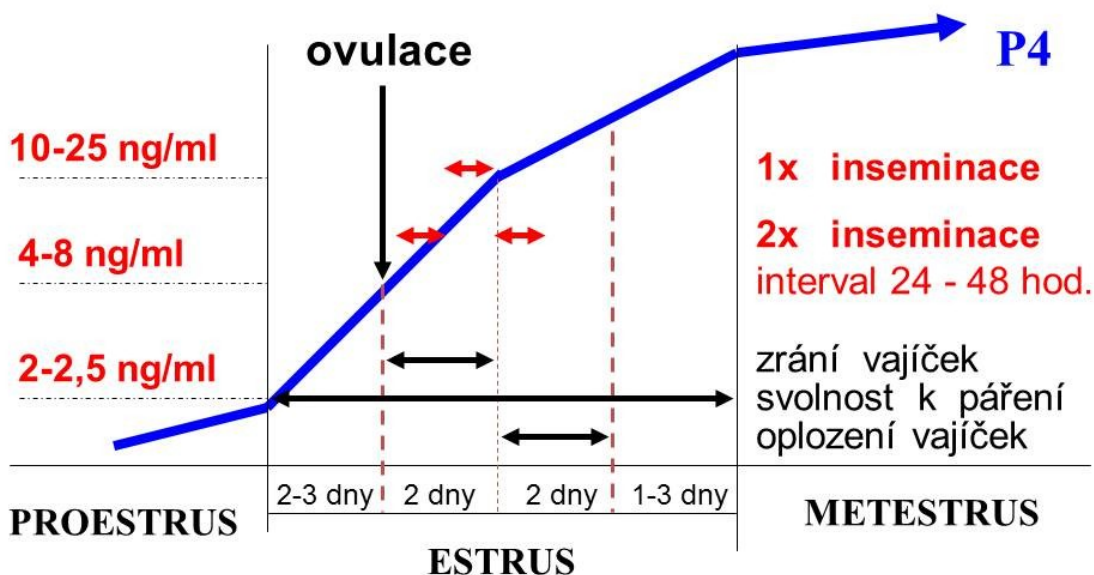
(Láznička, 2011)

## 6.6 Čerstvé sperma

**Čerstvé sperma** Čerstvé sperma pro inseminaci může být použito buď neředěné nebo zředěné. Neředěné čerstvé sperma: poté co je ejakulát ochlazen ve vodní lázni a uskladněn při teplotě 5-10 °C, spermie přežívají v nezředěném ejakulátu pouze krátkou dobu, maximálně 21 hodin. (Christiansen,1984)

Inseminace čerstvým spermatem úspěšnost zabřezávání – 60-75% Příčiny vedení inseminace – 99% porucha plodnosti fen, 1% poruchy plodnosti psa (Láznička, 2012)

# TERMÍN INSEMINACE ČERSTVÝM SPERMATEM



(Láznička, 2012)

Charakter inseminační dávky:

- Normo až oligospermie
- Motilita spermií min. 35-40%
- Min. 20% morfologicky normálních spermií
- Množství celý ejakulát 5-35ml
- 2 a 3 frakce ejakulátu 2-10ml
- Spermatická frakce 0,5-1,5ml
- Použitelnost v pohlavním aparátu fen 24-72 hod.

Ze všech možných komplikací výše uvedených inseminačních technik se v České republice používá v 99,9% přenosy čerstvého plného spermatu odebraného masturbací při aplokaci klasickou metodou, tj. do pochvy za použití plastových rigidních katetrů. Úspěšnost zabřezávání fen po inseminaci čerstvým spermatem se pohybuje v závislosti na použité technice a zkušenosti ošetřujícího lékaře kolem 50-65%. (Láznička, 2012)

Pokud nemůže být sperma použito hned po odběru životaschopnost spermií lze prodloužit zředěním ejakulátu. Poměr zředění se pohybuje v rozmezí od 1:3 do 1:8 v závislosti na původní hustotě spermií v ejakulátu. Po zředění může být sperma uchováno po několik hodin, aniž by došlo k výraznému poklesu oplozovací schopnosti. Stejná míra úspěšnosti zabřeznutí byla zaznamenána u fen inseminovaných zředěným spermatem hned po odběru jako u fen oplodněných zředěným spermatem skladovaným 24 hodin při teplotě 5 °C. Zředěné sperma dovezené z Anglie na Nový Zéland a použité pro inseminaci 2 dny po odběru vedlo k zabřeznutí feny. Maximální doba pro skladování zředěného semene je 4-5 dní. Přežití spermií je závislé na použitém ředidle stejně jako na délce skladování. Pro zředění spermatu mohou být použita různá ředidla, a pokud je potřeba, lze přidat i antibiotika. (Christiansen,1984)

Umělé oplodnění s použitím čerstvého spermatu může mít vynikající výsledky, alespoň ve výši rovnající se přírodními krytí, mnohdy jsou výsledky mnohem lepší. (Pierson a kol., 2010)

## **6.7 Chlazené sperma**

Po odběru a zpracování se semeno prostřednictvím konvečních metod a laboratorních postupů ochladí na požadovanou teplotu. Nedochází k inaktivaci spermií – jen ke zpomalení fyziologických aktivit, uložení je časově omezené (48 hodin). Vhodné hlavně na rychlý transport a následnou inseminaci. (Pašek, 2007)

Použití chlazeného semene

Výhody oproti zmrazenému semeni psa

- menší poškození spermií než při použití zmrazování (fertilizační schopnost a délka přežití se blíží hodnotám čerstvého semene)
- levnější doprava
- levnější výroba dávky
- dávky lze úspěšně inseminovat vaginálně, což je metoda, která nevyžaduje zvláštní postupy ani medikaci a lze ji snadno opakovat

## Nevýhody oproti mrazenému semeni psa

- semeno nelze skladovat dlouhodobě
- nutný rychlý přesun semene při teplotě cca 5 až 10°C a následná inseminace (ideálně do 5 dnů od vyhotovení dávky). (<http://www.froendogs.com/>, 2012)



Obr.11.Ředidlo na chlazené sperma  
(ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)



Obr.12.Přepravní box na chlazené sperma  
(ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)



Obr.13.Kontejner na chlazené sperma  
(ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)

## 6.8 Mražené sperma

Úspěšnost zabřezávání 80-90%.

Podmínky vedení inseminace:

- plodná fena a pes
- dobrý zdravotní a výživný stav
- průběh hárání dle reprodukčního modelu (Láznička, 2012)

**Hluboce zmražené sperma** - pokud je sperma zmraženo, může být skladováno po mnoho let, aniž by došlo ke ztrátě oplodovací schopnosti; k zabřeznutí došlo po inseminaci spermatem, které bylo hluboce zmražené po dobu 35 měsíců. Stejně míry zabřeznutí lze dosáhnout jak při použití čerstvého tak při použití hluboce zmraženého semene. Pouze nepatrné snížení pohyblivosti spermií bylo zaznamenáno při skladování semene při teplotě -196 °C po dobu 8 let. Důležité je odebírat ejakulát ve frakcích, protože v první frakci jsou spermie poškozeny při zmrazování a výměšky prostaty jsou nežádoucí. (Christiansen,1984)

Nejllepších výsledků je dosahováno s ředidly obsahujícími TRIS. (Gamčík, Kozumplík a kol. 1992)

Semeno se zředí buď ředidlem TRIS-egg (TRIS-vejce), které obsahuje 8 % glycerinu a 20 % vaječného žloutku; TRIS-egg ředidlem obsahujícím 20 % vaječného žloutku zkombinovaného s TRIS-egg ředidlem obsahujícím 16 % glycerinu a 20 % vaječného žloutku, ředidlem z vaječného žloutku-laktózy-glycerinu obsahujícím 11 % laktózy, 4 % glycerinu a 20 % vaječného žloutku nebo koncentrátem Triladyl s podobnými konzervačními schopnostmi. Obě látky glycerin a dimetylsulfoxid (DMSO) mají schopnost ochrany při nízkých teplotách, ale u glycerinu je tato schopnost lepší než u DMSO. Glycerin by měl být přidáván do spermatu spíše při teplotě 5 °C než při teplotě 25 °C. Antibiotika mohou být k ředidlu přidána, např. 0,1 g/100 ml dihydrostreptomycinu nebo penicilin a streptomycin. (Christiansen,1984)

Poměr ředění (1:3 až 1:8) je závislý na hustotě spermatu, která by měla být po naředění 100-150 milionů pohyblivých spermií na 1 ml. (Christiansen,1984)

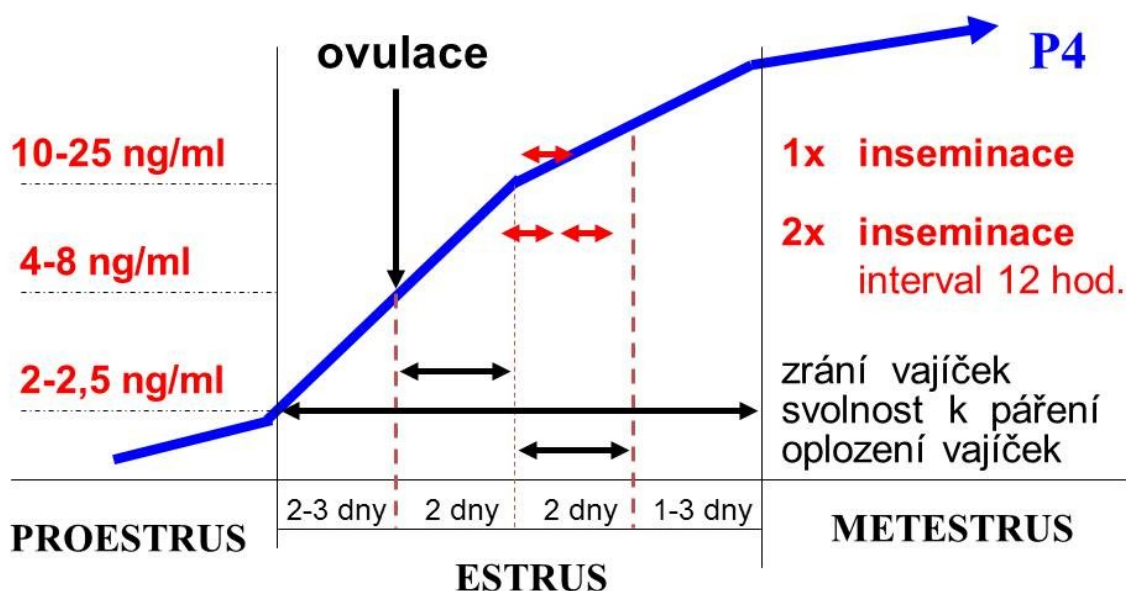
Sperma může být zamraženo v ampulích, pejetách (brčko) nebo peletách (tableta). Hluboce zmražené sperma se označí iniciály psa, od kterého bylo odebráno (Salamon a Maxwell, 2000)



Sperma se zkládá zmrzlé, v 0,5 ml stébla ponořených v kapalném dusíku (10 min při -120 °C) a následným ponořením do tekutého dusíku. (Luvoni, G.a kol., 2002)

Chceme-li získat úspěšné výsledky se zmrazeným spermatem je důležité načasování ovulace (Jeffcoate a Lindsay, 1989) to má zásadní význam vzhledem k omezenému času spermií po rozmrazení. (Salamon, L.,2007)

## TERMÍN INSEMINACE MRAZENÝM SPERMATEM



Charakter inseminační dávky

- min. 10mil. spermií v inseminační dávce
- motilita spermií po rozmrazení min. 40%
- nad 20% morfologicky normálních spermií
- objem inseminační dávky 0,5-1,5 ml
- přežitelnost v pohlavním aparátu fen 12-24 hod.

(Láznička, 2012)



foto Michaela Součková 2012, ordinace MVDr. Aloise Lázničky

Obr.14.Mrazící boxy s dusíkem na mražené sperma  
(ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)



foto Michaela Součková 2012, ordinace MVDr. Aloise Lázničky

Obr.15.Mrazící boxy s dusíkem na mražené sperma  
(ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)



foto Michaela Součková 2012, ordinace MVDr. Aloise Lázničky

Obr.16.Ředidla na mražené sperma (ordinace MVDr.A.Lázničky, foto M.Součková, 2012)

Využití zmrazeného semene pro inseminaci fen se v naší republice datuje od roku 1998 s dobrými výsledky. Rovněž semeno vynikajících psů je takto zpracováno pro využití v zahraničí s výbornými výsledky u různých plemen psů. Snad nejúspěšněji je využíváno hlubokozmrazené sperma u českých fousků v USA, kde je používají k inseminaci fen zejména proto, že jde o metodu podstatně levnější než nákup vhodných a osvědčených chovných psů ke krytí přirozeným způsobem. (Dostál, 2007)



Obr.17. Pejety na mražené sperma (ordinace MVDr.A.Lázníčky, foto M.Součková, 2012)

## 6.9 Aplikace spermatu

Odpovídá-li sperma požadované kvalitě je sterilním netoxickým katetrem přeneseno hluboko do pochvy. (Lázníčka, 2012)

### Technika přenosu:

#### Intavaginální

- flexibilní katetr
- flexibilní katetr s balónkem
- rigidní katetr

#### Intauterinní

- transcervikální
- peroperativní

(Lázníčka, 2012)



Obr.18. Inseminační katetr (ordinace MVDr. A. Lázničky, foto M. Součková, 2012)

### 6.9.1 Čerstvé sperma

Inseminační nástroje se skládají z plastového katétru poloviční délky než je běžné, ke kterému se flexibilní gumovou spojkou připojí injekční stříkačka na jedno použití, dále vaginoskop a lubrikační gel. (Christiansen, 1984)

K umytí poševní oblasti se použije solný roztok, poté se oblast vysuší. Dezinfekce by se neměla používat, jelikož může ovlivnit životaschopnost spermií.

Fenu položíme na odpovídající stůl s protiskluzovým povrchem a přidržíme ocas na stranu tak, aby byl přístupný vstup do pochvy. Velká fena může zůstat stát na zemi se zvednutými zadními končetinami pod úhlem cca 60°. Hlava a krk je zafixován koleny asistenta, který zpřístupní poševní vstup tím, že roztáhne feně zadní končetiny a přidrží ocas na jedné straně.

Nejprve je potřeba do injekční stříkačky natáhnout 1 ml vzduchu, poté pomalu nasajeme sperma. Tím se zajistí, že celkový objem nasátého semene bude deponován do dělohy. Malé množství lubrikačního gelu se nanese na inseminační katétr, který se buď pomocí vaginoskopu zasune do pochvy nebo se zasune podél ukazováčku potřeného lubrikačním gelem. Ukazováček je zasunut do pochvy dorzálně přes okraj pánve. Když je katétr mimo okraj pánve, mírně se zatlačí ke krčku, kam se pomalu deponuje semeno. Pokud fena stojí,

tento poslední pohyb je horizontální, kdežto pokud má fena zvednuty zadní končetiny, tento pohyb je téměř vertikální. Oblast krčku se nachází cca 12-14 cm od pochvy u středně vysokých plemen,  $\pm 4$  cm u vysokých či nízkých plemen. Poté co vyjmeme katétr, nadzvedneme zadní končetiny na 4 až 6 minut abychom zabránili vytečení spermatu; vytečení spermatu lze rovněž zabránit vsunutím prstu do pochvy. Po inseminaci je nutné nenechat fenu po nějakou dobu močit ani zvedat se na zadní nohy. (Christiansen,1984)

Podle Knause se upřednostňuje deponace spermatu do děložního krčku kvůli přítomnosti mikroorganismů v pochvě. (Christiansen,1984)

K inseminaci se běžně používá pouze druhá frakce ejakulátu, zředěná nebo nezředěná. Velikost dávky je závislá na velikosti feny a pohybuje se od 1,5 do 10 ml. Třetí frakce ejakulátu byla úspěšně použita jako ředidlo pro získání optimální velikosti dávky. Počet pohyblivých spermií v čerstvém spermatu určeném k inseminaci se pohybuje od  $60 \times 10^6$  do optimálního množství  $200 \times 10^6$ . Při použití  $50 \times 10^6$  pohyblivých spermií, byla míra úspěšnosti zabřeznutí 20 %, zatímco při použití  $200 \times 10^6$  pohyblivých spermií byla míra úspěšnosti zabřeznutí 80 %. (Christiansen,1984)

### **6.9.2 Chlazené sperma**

Semeno je odebíráno metodou manuální masturbace, bezbolestně a bez jakékoli medikamentózní intervence.

Přítomnost hárající feny u odběru je výhodou, není však nutně vyžadována.

Během cca 1h je připravena zchlazená dávka, kterou lze dále transportovat. Pro transport nabízíme speciální boxy se zásobníky ledu, které udrží vnitřní konstantní teplotu (5 až 10°C) po dobu až 45 hodin. Toto platí v případě, že okolní teplota nepřevyšuje 25°C. Pokud ano, doba udržení konstantní teploty se zkracuje.

Z jednoho odběru semene jsou pro jednu fenu připraveny 2 dávky pro opakovanou inseminaci. Dávku lze inseminovat intravaginálně. Fena musí být k inseminaci správně načasovaná, doporučuje se terminování krytí pomocí progesteronového testu. (<http://www.frozendogs.com/2012>)

### 6.9.3 Hluboce zmražené sperma

Technika přenosu:

- Intravaginální – rigidní katetr
- Intrauterinní – transcervikální, peroperativní (Láznička, 2012)

Důležité je, aby rozmazování bylo rychlé. Nejlepší obnovovací schopnost má sperma uložené v peletách rozmražených v 2,5 ml fyziologického solného roztoku o teplotě 37 °C. Podobných výsledků bylo dosaženo při rozmražení pejet ve vodě při teplotě 37 °C po dobu 30 sekund. Avšak jiní výzkumníci preferují rychlé rozmražení při vysoké teplotě. Dobrých výsledků bylo dosaženo při rozmrazování středně dlouhých pejet po dobu 6,5 sekundy a malých pejet po dobu 5 sekund při teplotě vody 75 °C.

Velikost dávky semene by měla být 1,5 ml a měla by obsahovat 150 milionů spermií, z nichž alespoň 50-70 % musí být pohyblivých. Toto je v souladu s postupy Andersona a Seagera a spol..

Inseminace by se měla provádět hned po rozmražení semene, protože doba přežití spermií ve zkumavce po zmražení a rozmražení je kratší. Jelikož není známa doba přežití spermií v živém organismu, je doporučeno provádět inseminaci denně po dobu 3-4 dnů.

Při inseminaci mraženým semenem lze použít stejné nástroje jako při inseminaci čerstvým semenem. Feně se zvednou zadní končetiny pod úhlem 60° a sperma je deponováno do dělohy, končetiny musí zůstat zvednuté ještě následujících 5 minut po inseminaci. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití nitroděložní inseminace. Avšak tento postup je technicky obtížný kvůli špatnému přístupu do dělohy přes krček (přední část pochvy je velmi zúžená a v této části je na stropu pochvy podélná řasa, která pochvu zcela ucpává, přičemž vlastní krček je až za touto řasou). Díky tomu je zavedení katétru obtížné a může být použit speciální kovový inseminační katétr s plastovým zrcátkem. Zrcátko se vsune podél zadní stěny pochvy, dokud nedosáhne zadní části děložního krčku, která je zafixována tlakem prstů přes břišní stěnu. Katétr se poté vsune zrcátkem a přes vstup do krčku a krátkým cervikálním kanálem do dělohy, kde je deponována celá dávka spermatu. Zákrok se provádí s pomocí prstů přes břišní stěnu. U některých nervózních či podrážděných fen je nutné při zavádění katétru použít sedativa. Inseminační katétr byl navržen tak, aby zafixoval děložní krček, je-li správně umístěn při ruční manipulaci přes břišní stěnu. (Christiansen,1984)

## 7. Inseminace a legistavita v ČR:

### UMĚLÉ OPLODNĚNÍ

Vyjádření F.C.I. (Mezinárodní chovatelský řád Fédération Cynologique Internationale (FCI) je závazný pro všechny členské země a smluvní partnery) V MEZINÁRODNÍM CHOVALESKÉM ŘÁDU F.C.I. v bodě 13 je uvedeno: Psi by měli být schopni se rozmnožovat přirozenou cestou. Umělé oplodnění by nemělo být používáno u zvířat, která se dosud nerozmnožovala přirozenou cestou. Výjimku může udělit národní kynologická organizace, aby se zlepšilo zdraví plemene, rozšířil se genetický materiál plemene nebo fena neutrpěla újmu při krytí.

U umělého oplodnění feny musí zvěrolékař, který psovi odebral sperma, potvrdit správci plemenné knihy, ve které se budou štěňata zapisovat, že čerstvé nebo zmražené sperma psa pochází od dohodnutého psa. Dále musí majitel, eventuálně držitel, psa poskytnout majiteli feny zdarma informace uvedené pod článkem 8, písmena a) - g) Náklady spojené s odebráním spermatu a provedením inseminace jdou k tíži majitele feny. Zvěrolékař, který inseminaci provádí, potvrzuje plemenné knize, že fena byla oplodněna semenem vybraného psa. V tomto osvědčení musí být uvedeno místo a doba umělého oplodnění, jméno a číslo zápisu plemenné knihy feny a jméno a adresa majitele feny.

Majitel psa, jemuž bylo odebráno semeno, je povinen majiteli feny vystavit osvědčení o krytí, dodatečně k veterinárnímu osvědčení.

Mezinárodní chovatelský řád FCI Překlad © ČMKU 2011

Vývoz semene:

Dokumentace spojená s vývozem semene záleží na zemi, do které se semeno vyváží. Podmínky dovozu si vždy stanovuje daná země. Pokud jde o státy bez povolení dovozu a bez zvláštních podmínek, tak se vyplňuje pouze protokol o kvalitě odebraného semene a připravených dávek a dále zdravotní certifikát (o klinickém vyšetření a vakcinaci proti vzteklině).

Většina zemí, která si určuje podmínky dovozu je podrobně popisuje, ale předepsané formuláře často na všechno nemají. Součástí potřebné dokumentace bývá doklad o sérologickém vyšetření dárce, doklad o jeho vakcinaci, o dezinfekci či novosti transportního kontejneru (letecky lze převážet semeno pouze v kontejnerech charakteru Dry Vapour Shipper, tzn. nádobe s absorbční stěnou, která nasákne tekutý dusík a udrží potřebnou teplotu

po několik dní. Jen takový kontejner splňuje požadavky na bezpečnost IATA special Provision A152.). Velká Británie např. požaduje mimo jiné doklad podepsaný od Krajské veterinární správy o zdravotním stavu v chovu slepic, ze kterého pochází vejce použité při výrobě ředidel. Austrálie má velmi přísné podmínky dovozu, nad vším pak musí dohlížet státní veterinář a zdravotní certifikát stvrdit podpisem a kulatým razítkem a na kontejner poskytnout plombu.

Dovoz semene:

Pro dovoz ze zemí EU SVS žádné zvláštní podmínky nestanovuje. Min. 15 dní předem dnem předpokládaného dovozu je nutné podat na SVS ČR žádost o sdělení dovozních podmínek (resp. o vydání dovozního povolení). Žádosti se přijímají na adrese [epodatelna@svscr.cz](mailto:epodatelna@svscr.cz). Žádost musí obsahovat tyto informace:

- 1) Plemeno psa dárce
- 2) Zda se jedná o chlazené nebo zmrazené sperma
- 3) Počet dávek spermatu
- 4) Místo odeslání příp. i místo odběru spermatu
- 5) Místo určení v České republice
- 6) Jméno a adresa žadatele včetně případné korespondenční adresy
- 7) Účel dovozu

S dovozním povolením od SVS obdržíte také **veterinární osvědčení**, které musí zásilku při dovozu doprovázet, a které potvrzuje úřední veterinární lékař vyvážející země. ČR požaduje serologické vyšetření dárce na *Brucella canis* a doklad o vakcinaci proti *Leptospira* spp. či serologické vyšetření.

Psí sperma podléhá při dovozu v místě vstupu do EU pohraniční veterinární kontrole na pohraniční veterinární stanici (PVS). V ČR se nachází pouze jedna PVS na letišti Praha-Ruzyně. Pohraniční veterinární stanici musíte informovat předem o příchodu zásilky.

(Přinosilová, P. 2012)



Orientační ceny účtované v ČR.

odběr, vyšetření semene a vystavení certifikátu o kvalitě semene	500 Kč
odběr, vyšetření semene a příprava chlazené inseminační dávky	1100 Kč
cena transportního boxu pro chlazené dávky semene	500 Kč
odběr, vyšetření semene a příprava zmrazených inseminačních dávek (v případě opakovaných odběrů 10 až 20% sleva)	3000 Kč
skladování 1 zmrazené inseminační dávky v tekutém dusíku po dobu 1 roku	200 Kč
cena nevratného transportního boxu s tekutým dusíkem "CRYODRUM" pro zmrazené dávky semene	2500 Kč
pronájem vratného transportního kryokontejneru Voyager 2l pro zmrazené dávky semene	1000 Kč
asistence při intrauterinní inseminaci zmrazeným semenem (rozmrazení dávky a posouzení její kvality)	500 Kč

pozn.: ceny jsou orientační (<http://www.froendogs.com/>, 2012)

## 8. Závěr

Na inseminaci u fen jsou názory různé. Ať už z řad veterinárních lékařů, genetiků či chovatelů. Inseminace by neměla být náhražkou za přirozené páření, přesto nesporně poskytuje mnoho výhod, které by bylo škoda nevyužít. Inseminace nabízí možnosti zajištění kvalitního genetického materiálu z navzájem sobě vzdálených zemí (širší využití zahraničního krytí – finanční zpřístupnění zahraničního krytí), stejně tak zachování genetického materiálu po úhynu kvalitního krycího psa, též eliminuje možnost přenosů pohlavních či jiných infekčních chorob a je jen na nás lidech, jak s možnostmi naložíme a zda budou maximálně využity v tom pozitivním slova smyslu.

V současnosti jsou popsány 3 základní metody umělého oplodnění, čerstvým spermatem, chlazeným spermatem a zmrazeným spermatem, které může být uchováno až desítky let. Každá z metod má své pro i proti a je třeba zvážit všechny aspekty, které od umělého oplodnění očekáváme. V České republice se umělým oplodněním zabývá hned několik veterinárních lékařů a klinik a i u nás naleznem spermobanky pro dlouhodobé uchování spermatu, jejich využití zatím není tak hojné, ale jistě i tato doba brzy přijde. Jisté omezení zapříčiňuje ČMKU, které povoluje první krytí pomocí inseminace podmínkou „Výjimku může udělit národní kynologická organizace, aby se zlepšilo zdraví plemene, rozšířil se genetický materiál plemene nebo fena neutpěla újmu při krytí.“

Přesto se domívám, že s využitím umělého oplodnění u fen se budeme v budoucnu v ČR setkávat čím dál více a tím se obohatí a zkvalitní chov psů u nás, což by měl být společný cíl jak lékařů, chovatelů tak organizací zabývajících se kynologií.

## 9. Použitá literatura

- Barbas, J.P. and Mascarenhas, R.D.. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Volume 10, Number 1, 49-62, DOI: 10.1007/s10561-008-9081-4
- Dostál, J. 2007. Genetika a šlechtění plemen psů. Dona. České Budějovice. ISBN 978-80-7322-104-1
- Dostál, J. 1995. Chov psů - Genetika v kynologické praxi. Dona. České Budějovice. ISBN: 80-85463-58-X
- Farsad, W., Meyreys-Wallend a Linde-Forsberg, C, 1993. Andrology, semen evaluation and artificial insemination. Journals of Reproduction & Fertility Ltd. Printed in Great Britain. 279
- Gamčík, P., Kozumplík, J. a kolektiv. 1992. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda a.s. Bratislava SK. ISBN 80-07-00540-4
- Christiansen, Ib J. 1984. Reproduction in the Dog and Cat. British Library Cataloguing in Publication Data. London. 116-121. ISBN 0-7020-0918-0
- Kvapil, R., Kvapilová R. 2007. Průvodce psí reprodukci. ISBN 978-80-86177-21-2
- Kolektiv autorů, 1999. Koldův atlas veterinární anatomie. Grada Publishing, spol. s r.o. Praha. 324-337. ISBN 80-7169-352-9
- Láznička, A. 2011 Seminář 13.11.2011 - Krytí, inseminace a reprodukce v souvislostech, Praha
- Láznička, A. 2012 ústní sdělení, Veterinární ordinace Poříčí nad Sázavou
- Láznička, A. 1992. Poševní cytologie v diagnostice reprodukčních stavů fen, Veterinární a farmaceutická univerzita
- Luvoni, G.C., M. Beccaglia, P. Anastasi, Freezing of canine semen in an animal-free protein extender, Volume 33, Supplement 1, 77-80, DOI: 10.1007/s11259-009-9249-9
- Marvan, F. 2007. Morfologie hospodářských zvířat. ISBN 978-80-213-1658-4
- Nyklíček, O. 1970. Gynekologická hormonální cytologie. 735-21-08/19, 08-088-70
- Pašek, I. 2007. Zborník abstraktov, Komora veterinárných lekárov, Demänovská dolina, 23
- Pierson, P., Bassu, G., Brau, S., Casseleux, G 2010, Canine Reproduction, France Paris B 432 538 882
- Procházka, Z. 2005. Chov psů. ISBN 80-7185-768-8

- Přinosilová, P. 2012. Laboratoř spermatologie a andrologie. Ústní a písemné sdělení. <http://www.frozendogs.com/>
- Reece, W.O. 1998. Fyziologie domácích zvířat. Praha. Grada Publishing spo.. s r.o. .ISBN 80-7169-547-5
- redakce MUJPES.CZ, 20.08.2008, informační portál
- Salamon, L., Cremonesi, F., Gropetti, D. and Pecile, 2007. A Results of a Single Transcervical Endoscopic Insemination Using Frozen Semen in the Bitch. Volume 29, Supplement 2, 187-189, DOI: 10.1007/s11259-005-0039-8
- Verhoef, E. 2005. Chov psů. ISBN 80-7234-400-5
- Wachtel, H. 1998. Chov psů v roce 2000, Dona. České Budějovice. ISBN 80-86136-29-9
- [www.cmku.cz/index2.php?stranka=rady\\_a\\_predpisy#k\\_19](http://www.cmku.cz/index2.php?stranka=rady_a_predpisy#k_19). ČMKU – řády a předpisy, 2001. str.4. Mezinárodní chovatelský řád F.C.I.
- Yoshinori, S., Yasuyuki, A., Dong, S.L., Yanagimoto, Y.. Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donors in the Labrador Retriever. Volume 8, Number 3, 125-129, DOI: 10.1007/s12522-009-0019-8