

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**MIKROORGANISMY VYSKYTUJÍCÍ SE VE SPERMATU**  
**CHOVNÝCH KANCŮ**  
**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE:** Kateřina Gančarčíková

**VEDOUCÍ PRÁCE:** RNDr. Petra Mosio, Ph.D.

**2017**

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Gančarčíková**

Osobní číslo: **C14264**

Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Zdravotní laborant**

Název tématu: **Mikroorganismy vyskytující se ve spermatu chovných kanců**

Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Charakterizujte vlastnosti kančího spermatu.
2. Zaměřte se na mikroorganismy, které jsou nejčastěji prokazovány ve vzorcích spermatu chovných kanců.
3. Uveďte, jaký mají mikroorganismy vliv na kvalitu kančího spermatu.
4. Shrňte možnosti, kterými lze ovlivnit mikroorganismy ve vzorcích spermatu.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Petra Mosio, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**28. listopadu 2016**

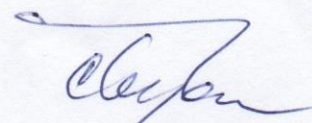
Termín odevzdání bakalářské práce:

**7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 22. 6. 2017

Kateřina Gančarčíková

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí bakalářské práce RNDr. Petře Mosio, Ph.D. za věnovaný čas mé práci, cenné rady a odborné vedení, které mi velice pomohlo při psaní této rešerše.

## **Anotace**

Bakalářská práce se zaměřuje na mikroorganismy, které se vyskytují v ejakulátech chovných kanců a na vliv těchto mikrobů na parametry spermií. Tato práce také shrnuje možné zdroje kontaminace ejakulátů. Dále uvádí postup po odběru vzorku, to znamená skladování spermií a přidávání látek, které chrání a vyživují ejakulát.

## **Klíčová slova**

bakterie, ejakulát, kontaminace, kanci

## **Title**

Microorganisms in semen of breeding boars

## **Annotation**

Bachelor work focuses on the microorganisms that occur in ejaculates of breeding boars and on the influence of these microbes on sperm parameters. This work also summarizes possible contamination sources of ejaculates. It also lists the procedures after sampling that is sperm storage and the addition of substances that protect and nourish the ejaculate.

## **Keywords**

bacteria, ejaculate, contamination, boars

## Obsah

Anotace .....	6
Seznam obrázků a grafů .....	10
Seznam zkratk .....	11
1 Úvod.....	13
2 Anatomie pohlavního ústrojí kance .....	14
2.1 Varlata .....	14
2.2 Šourek.....	14
2.3 Systém kanálků .....	14
2.4 Přídavné žlázy .....	14
2.4.1 Semenné včky .....	14
2.4.2 Prostata .....	14
2.4.3 Cowperovy žlázy .....	15
2.5 Penis .....	15
2.6 Nadvarlata .....	15
3 Ejakulát .....	16
3.1 Kvalita ejakulátu .....	16
4 Příklad odběru spermatu – postup.....	17
5 Skladování, přídavné látky.....	18
5.1 Skladování.....	18
5.2 Příklady přídavných látek.....	18
5.3 Kryokonzervace .....	19
6 Kontaminace .....	20
7 Mikrobiální analýza .....	22
7.1 Bakteriální izolace a identifikace .....	22
7.2 Celkový počet aerobních buněk .....	23
8 <i>Escherichia coli</i> .....	23

8.1	Obecně.....	23
8.2	Vliv <i>E. coli</i> na spermie.....	24
8.2.1	Aglutinace.....	24
8.2.2	pH .....	26
8.2.3	Životnost spermií .....	26
8.2.4	Pohyblivost spermií .....	27
8.2.5	Kontakt bakterie – spermie .....	27
8.2.6	Efekt <i>E. coli</i> na reprodukci .....	28
9	Chlamydie .....	29
9.1	Obecně.....	29
9.2	Životní cyklus.....	30
9.3	Vliv chlamydií na spermie .....	31
10	Klostridie.....	32
10.1	Obecně.....	32
10.2	Vliv klostridií na spermie .....	34
10.2.1	pH .....	34
10.2.2	Životaschopnost spermií.....	34
10.2.3	Pohyblivost spermií .....	35
10.2.4	Aglutinace a morfologie .....	36
10.2.5	Kontakt spermie – bakterie.....	37
11	<i>Pseudomonas</i> .....	37
11.1	Obecně.....	37
11.2	Vliv <i>P. aeruginosa</i> na spermie .....	38
11.2.1	Rychlost růstu v ejakulátu .....	38
11.2.2	pH .....	39
11.2.3	Motilita spermií .....	39
11.2.4	Životaschopnost spermií.....	41



11.2.5	Integrita akrozomu.....	41
12	Rod <i>Enterobacter</i> .....	42
12.1	Obecně.....	42
12.2	Vliv <i>Ent. cloacae</i> na spermie .....	42
12.2.1	Životaschopnost spermií.....	42
12.2.2	Integrita akrozomu.....	43
12.2.3	Osmotická rezistence spermií.....	43
12.2.4	Motilita spermií .....	43
12.2.5	Aglutinace a morfologie spermií .....	44
12.2.6	pH .....	45
13	Závěr .....	46
14	Použitá literatura .....	47

## Seznam obrázků a grafů

Obrázek 1: Reprodukční orgány kance (Hollandbeck, Foley, 1964).....	15
Obrázek 2: Odběr semene (Kozdrowski, Staroniewicz, Dubiel, 2005).....	22
Obrázek 3: Elektronový snímek <i>E. coli</i> (Duguid, Smith, Dempster, Edmunds, 1995) .....	23
Obrázek 4: <i>E. coli</i> na MacConkey agaru (Konidala, Nuvvula, Mohapatra, Nirmala, 2011) .....	24
Obrázek 5: Aglutinace pozorovaná 5 minut po smíchání spermií a <i>E. coli</i> (Wolff , Panhans, Stolz, Meurer, 1993) .....	26
Obrázek 6: Adheze <i>E. coli</i> na bičík spermie (Wolff , Panhans, Stolz, Meurer, 1993) .....	28
Obrázek 7: Životní cyklus chlamydií (Longbottom, Coulter, 2003) .....	31
Obrázek 8: <i>C. perfringens</i> na krevním agaru (Nowell, Kropinski, Songer, Macinnes <i>et al.</i> 2012) .....	33
Obrázek 9: Kolonie <i>P. aeruginosa</i> na CLED agaru (Mathesin, Weekes, Coggle, 2009)....	38
Obrázek 10: Spojení <i>Ent. cloacae</i> s lidskými epiteliálními buňkami (Keller, Pedroso, Ritchmann, Silva 1998).....	42
Graf 1: Závislost koncentrace <i>E. coli</i> na velikosti vrhu (Martín, Munoz, De Cupere, Van Driessche <i>et al.</i> 2010).....	29
Graf 2: Celkové procento pohyblivých spermií při koncentraci $10^2$ - $10^8$ CFU/ml <i>C.</i> <i>perfringens</i> (skladování 11 dní, 15 °C) (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013) .....	36
Graf 3: Celkové procento pohyblivých spermií při koncentraci $10^2$ - $10^8$ CFU/ml <i>C.</i> <i>perfringens</i> (skladování 96 hodin, 37 °C) (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013) .....	36
Graf 4: Dynamika růstu rozdílných koncentrací <i>P. aeruginosa</i> během 11 dní skladování při teplotě 15 - 17 °C (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).....	39
Graf 5: Efekt různých koncentrací <i>P. aeruginosa</i> na životaschopnost spermií (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet 2016) .....	41
Graf 6: Aglutinace spermií vlivem <i>Ent. cloacae</i> během 11 dnů skladování při teplotě 17 °C (Prieto-Martínez, 2014).....	44

## Seznam zkratek

ADP – adenosindifosfát (z angl. adenosindiphosphate)

AHP – ředidlo Androhep Plus

ALH – z angl. amplitude of lateral head displacement

ASP – ředidlo Androstar Plus

BCF – z angl. beating frequency

BTS – z angl. beltsville thawing solution

*C.* – rod *Clostridium*

CFU – z angl. colony forming units

CPE - *Clostridium perfringens* enterotoxin

*E.* – rod *Escherichia*

*Ent.* – rod *Enterobacter*

ETEC – enterotoxigenní *Escherichia coli*

*Ch.* – rod *Chlamydia*

*Chl.* – rod *Chlamydophila*

IVC – z angl. *in vitro* capacitation

LDL – z angl. low density lipoprotein

LIN – z angl. linearity index

LPS – lipopolysacharidy

ME-S – ředidlo modified extender short – term

*P.* – rod *Pseudomonas*

PLC – z angl. phospholipase C

PlcH – z angl. hemolytic phospholipase C

PlcN - z angl. non-hemolytic phospholipase C

PMOT – z angl. progressive motility

QS – z angl. Quorum sensing

ROS – z angl. reactive oxygen species

STR – z angl. straightness index

VAP – z angl. average path velocity

VCL – z angl. curvilinear velocity

VSL – z angl. straight-linear velocity

VTEC – verotoxigenní *Escherichia coli*

WOB – z angl. oscillation index

## 1 Úvod

Bakterie ve spermatu představují riziko pro plodnost jak samců, tak samic, a to se podílí na ekonomických ztrátách v chovech prasat. Proto je snaha správnými hygienickými postupy a přidáváním antibiotických a dalších pomocných látek snížit riziko kontaminace a zároveň zachovat ejakulát v co nejvyšší kvalitě, což vede k zefektivnění chovu. Samice se oplodňují uměle, aby byl tento proces co nejvíce pod kontrolou a eliminovalo se tak riziko kontaminace.

Nejdříve se budu zabývat anatomií pohlavních orgánů kance a její souvislostí s kontaminací ejakulátu. Dále se zaměřuji na parametry posuzující kvalitu ejakulátu a faktory, které tuto kvalitu ovlivňují. Shrnu možné cesty a zdroje kontaminace. Na závěr uvedu 5 vybraných mikroorganismů vyskytujících se v ejakulátu kanců a jejich účinky na různé parametry ejakulátu, jako například motilita, pH, životaschopnost, aglutinace. Vybrala jsem si *Escherichia coli*, chlamydie, klostridie, pseudomonády a enterobaktery.

## 2 Anatomie pohlavního ústrojí kance

Samčí pohlavní systém se skládá z šourku, varlat, nadvarlat, deferentních kanálků a přídatných žláz, které zahrnují dva semenné váčky, prostatu a dvě Cowperovy žlázy. Dále sem patří penis (kopulační orgán), tkáňový obal a močové trubice (viz obr. 1) (Bonet, Garcia, Sepúlveda, 2013; Hollandbeck, Foley, 1964). Hlavní funkcí samčího pohlavního systému je produkce a ejakulace spermií. Ejakulát se skládá z buněčné a nebuněčné frakce, tedy ze spermií a semenné tekutiny, která je tvořena ze sekretu varlat, nadvarlat a příslušných pohlavních žláz (Bonet, Garcia, Sepúlveda, 2013).

### 2.1 Varlata

Varlata jsou tubulární žlázy s endokrinní i exokrinní funkcí. Exokrinní funkcí je spermatogeneze, endokrinní funkcí pak produkce samčího pohlavního hormonu (Hollandbeck, Foley, 1964), který přispívá k sexuálnímu chování. Intersticiální, Leydigovy buňky varlat jsou zodpovědné za syntézu a sekreci androgenů (testosteronu). V semenotvorných kanálcích jsou Sertoliho buňky varlat, které jsou zodpovědné mimo jiné za syntézu aktivinu a inhibinu (Bonet, Garcia, Sepúlveda, 2013).

### 2.2 Šourek

Šourek je vak, ve kterém jsou mimo tělní dutinu uložena varlata. Mezi jeho funkce se řadí termoregulační a ochranná funkce. Teplota je regulována pomocí svalů, kterými je určována blízkost varlat k tělu.

### 2.3 Systém kanálků

Systém kanálků je určen pro průchod spermií, jejich uskladnění a dozrání.

### 2.4 Přídatné žlázy

#### 2.4.1 Semenné váčky

Semenné váčky největší přídatné žlázy, které produkují látku (Hollandbeck, Foley, 1964) jež obsahuje ionty, energetické substráty a proteiny (Bonet, Garcia, Sepúlveda, 2013). Tato plazma tvoří 15 – 25 % celkového objemu ejakulátu.

#### 2.4.2 Prostata

Prostata tvoří hustou kapalinu, která dodává ejakulátu charakteristický zápach a pomáhá udržet motilitu spermií.

### 2.4.3 Cowperovy žlázy

Cowperovy žlázy tvoří čirý sekret, který čistí močovou trubici od předešlé moči a lubrikuje vulvu před tím, než se začnou produkovat sekrety vulvy (Hollandbeck, Foley, 1964).

## 2.5 Penis

Penis je hlavní kopulační orgán, kterým se dostává ejakulát do samičího reprodukčního traktu. Kanci mají zřetelně spirálovitý žalud penisu, díky jehož funkci lépe vstoupí skrz vulvu a cervix (Bonet, Garcia, Sepúlveda, 2013). Kančí předkožka je unikátní, protože obsahuje divertikl. Kapacita divertiklu se může pohybovat v rozmezí od 20 do 100 ml. U průměrného kance je to obvykle 60 – 70 ml tekutiny. Tato tekutina může obsahovat velké množství moči, bakterií, staré epitelie a spermie, což může být zdrojem kontaminace ejakulátu (Althouse, Evans, 1994).

## 2.6 Nadvarlata

Primární funkce nadvarlat je dozrání, transport a uskladnění spermií až do ejakulace. Při ejakulaci se spermie z kaudální části nadvarlat mísí se sekrety z přídatných žláz. Tyto sekrety působí na spermie, poskytují energii, podílejí se na kapacitaci a působí jako imunomodulátory (Bonet, Garcia, Sepúlveda, 2013).

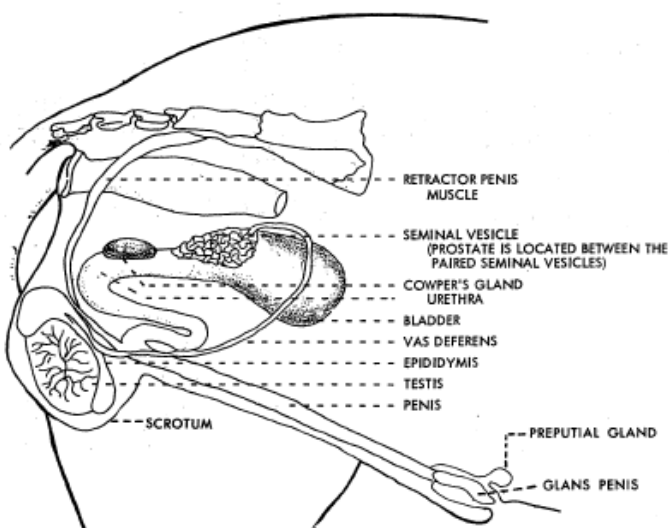


Figure 1. Diagram of the reproductive organs of the boar.

Obrázek 1: Reprodukční orgány kance (Hollandbeck, Foley, 1964)

### 3 Ejakulát

Ejakulát se skládá ze spermií a tekutin z přídatných žláz. Tyto tekutiny pomáhají, mimo již výše uvedené, k motilitě spermií, fungují jako transportní médium v samičím pohlavním traktu, srážejí a formují mechanické bariéry k zabránění ztrátě spermií ze samičího ústrojí (Hollandbeck, Foley, 1964).

Kančí ejakulát obsahuje jednoduché a složité cukry, které jsou důležité jako zdroj energie pro pohyb spermií. Energetické látky jsou umístěny buď ve spermiích, nebo v semenné tekutině, tudíž jsou přítomny dva energetické zdroje. Mezi hlavní zdroje energie patří fruktóza a glukóza. Glukóza představuje zdroj energie jak pro spermie, tak pro kontaminující mikroorganismy. Tyto mikroorganismy metabolizují glukózu, uvolňují kyseliny a tím mění hodnotu pH, což nakonec vede ke smrti spermií. Za normálních okolností je hodnota pH čerstvého ejakulátu 7,2 – 7,5. Pokud se hodnoty mění, znamená to, že spermie ztrácejí svou plodnost a životaschopnost, což vede ke snížení kvality ejakulátu (Ciornei, Runceanu, Drugociu, Rosca 2008).

Kanec produkuje málo koncentrované sperma ve velkém objemu. Objem kančího ejakulátu se pohybuje mezi 125 až 500 ml. Vzhledem k velkému objemu může být ejakulát vyčerpán, avšak do 24 až 48 hodin se obnoví (Hollandbeck, Foley, 1964). Objem ejakulátu závisí na mnoha faktorech jako například plemeno nebo věk. Ejakulát se dělí na tři frakce podle složení: prespermatická, spermatická a postspermatická (Bonet, Garcia, Sepúlveda, 2013).

#### 3.1 Kvalita ejakulátu

Kvalita ejakulátu, která ovlivňuje fertilitu kanců (Ciornei, Runceanu, Drugociu, Rosca, 2008), se hodnotí na základě stanovení objemu ejakulátu, koncentrace spermií, celkového počtu spermií na ejakulát, životaschopnosti spermií, pohyblivosti, aglutinace (Goldberg, Argenti, Faccin, Santi *et al.* 2013), morfologie spermií (Pinart, Puigmulé, 2013), schopnosti akrozomu reagovat a proniknout do oocytu a posouzení integrity plazmatické membrány. Plazmatická membrána zajišťuje zachování buněčné homeostázy, její integrita je zodpovědná za přežití spermií uvnitř samčího reprodukčního traktu a za zachování plodnosti, a proto je to jeden z klíčových parametrů v hodnocení kvality spermií. Jeden z hlavních znaků odlišující živé a mrtvé spermie je právě ztráta integrity plazmatické membrány a ztráta motility (Sutkeviciene, Riskeviciene, Januskauskas, Zilinskas *et al.* 2009). Dále se *in vitro* hodnotí barva (čirá, přítomnost krve, sraženin a další



neobvyklosti, které by mohly být indikátorem infekce reprodukčního traktu) a pach (typický, bez zápachu, pach moči a další) (Úbeda, Ausejo, Dahmani, Falceto *et al.* 2013). *In vivo* je plodnost kanců hodnocena na základě porodní frekvence a velikosti vrhu, který je vyjádřený jako celkový počet narozených selat, nebo celkový počet živě narozených selat. Reprodukční schopnosti kanců mohou být ovlivněny jak vnějšími, tak vnitřními faktory. Mezi vnitřní faktory patří například chov, věk a velikost varlat. Do vnějších faktorů patří teplota prostředí, fotoperioda, rytmus odběru ejakulátu, výživa a sociální prostředí (Pinart, Puigmulé, 2013).

Aby se co nejvíce zefektivnila účinnost umělého oplodnění, kanci se vybírají na základě velikosti varlat v prepubertálním věku. Velikost varlat totiž pozitivně koreluje s denní produkcí spermií, hladinou testosteronu, libidem a reprodukční dlouhověkostí. Reprodukční výkonost z hlediska kvality spermií, plodnosti a sexuálního chování vykazuje zřetelné sezónní změny. Vysoké teploty snižují funkci varlat, vyvolávají přechodné poruchy spermatogeneze a snižují tvorbu testosteronu. Optimální interval odběru spermií je 2 – 5 dnů. Pokud se tento interval zkrátí, sníží se i objem ejakulátu, koncentrace spermií a jejich pohyblivost (Pinart, Puigmulé, 2013). Ideální je testovat produkci ejakulátu v pravidelných intervalech, protože tento systém umožňuje sledovat aspekty této produkce pravidelně a zachytit případné změny, které mohou být zapříčiněny personálem, systémem čištění vody, dodržováním hygieny při odběru spermatu, pomůckami používanými pro odběr a zpracování. To vše se může odrazit ve výsledcích testovaných ejakulátů (Baracaldo, Ward, 2009).

#### **4 Příklad odběru spermatu – postup**

Ve studii Goldberga *et al.* (2013) byla nová zvířata během 30 denní izolace trénována na odběr spermatu s použitím odběrového fantomu. Zvířata byla zkoumána ve čtyřech stádech A, B, C a D. Ejakulát byl sbírán v rukavicích, ve speciální odebírací ohradě a po manuálním vyprázdnění předkožkového vaku. U kančích stád A, B a D se penis fixoval použitím všech prstů tlačících na špičku penisu s nataženým malíčkem, zatímco u stáda C se špička penisu vložila mezi palec a natažený ukazováček, zatímco ostatní prsty setrvaly na straně sběrné nádoby. K odběru spermatu byly použity jednorázové igelitové tašky uvnitř izolovaných nádob. Byl použit i speciální filtr pro zachování želatinové frakce z bulbouretrálních žláz. Každý odběr spermatu byl pozorován stejným kontrolorem, bez dalšího zásahu.

## 5 Skladování, přídavné látky

### 5.1 Skladování

Proces odběru, skladování a distribuce čerstvého kančího ejakulátu před inseminací hraje důležitou roli v bakteriálním růstu nebo stupni poškození spermií. Kančí ejakulát obohacený o přídavné látky je ideálním prostředím pro růst bakterií, které jsou rezistentní k antimikrobiálním látkám přidaným do ejakulátu (Kuster, Althouse, 2016). Poté, co je ejakulát shromážděn a vyfiltrován, je zředěn a jsou do něj přidána antibiotika. Nashromážděna je pouze druhá a třetí fáze ejakulátu, protože jsou bohaté na spermie. Takto ošetřené sperma je dáno do plastových vaků a ty jsou transportovány do laboratoře při teplotě  $\pm 17$  °C v transportním boxu. Kančí spermie jsou citlivé na poškození chladem, proto jsou uchovávány v kapalném stavu při této teplotě (Schulze, Dathe, Waberski, Müller, 2016). Hlavní zhodnocení a mikrobiologická analýza se obvykle dělá 2 až 3 dny po odběru (Úbeda, Ausejo, Dahmani, Falceto *et al.* 2013).

### 5.2 Příklady přídavných látek

Plniva jsou rozdělena podle jejich konzervační kapacity (1-2, 3-4 a 7-10 dní po odběru) do třech kategorií: krátkodobá, střednědobá a dlouhodobá. Dlouhodobá plniva vykazují lepší výsledky při hodnocení kvality kančího spermatu po třídním uchování spermatu při 17°C, a to ve srovnání s krátkodobými a střednědobými plnivými. Nicméně inseminační dávka, která se používá během dvou dnů po odběru, se ředí a ukládá pomocí střednědobého plniva, což vede k vyšší porodnosti a většímu počtu živě narozených selat ve srovnání s plnivými dlouhodobými (Karageorgiou, Tsousis, Boscus, Tassis *et al.* 2016).

Zde uvádím několik možností přídavných látek publikovanými v různých studiích. Jedná se například o: základní plnidlo BTS (beltsville thawing solution) (Pinart, Yeste, Bonet, 2016); X-cell plnidlo (antibiotikum, gentamicin sulfát) (Gączarzewicz, Udala, Piasecka, Blaszczyk *et al.* 2016); ME-S (modified extender short-term), obsahující amikacin sulfát a fruktózu; CRONOS, obsahující gentamicin a glukózu (Bresciani, Cabassi, Morini, 2014), tradiční penicilin a streptomycin (Schulze, Ammon, Rüdiger, Jung, 2015); Androhep (Frydrychová, Čerovský, Lustyková, Rozkot, 2010) a Modena (Namula, Sato, Kodama, Morigana, 2013).

Použití přídavných látek má i vliv na případné zamrazení kančího spermatu a na funkci spermií po rozmražení. Jedná se o rozdíly v pohyblivosti spermií, životaschopnosti,

mitochondriální funkci a integritě plazmatické membrány (Wasilewska, Zasiadczyk, Fraser, Mogielnicka-Brzozowska *et al.* 2016).

Podpůrné a alternativní strategie k běžným antibiotikům pro minimalizaci rozvoje bakteriální multirezistence jsou ve vývoji. Lze mezi ně zahrnout například automatizovaný odběr ejakulátů, podchlazené sperma skladované pod 15 °C, fyzické odstranění bakterií koloidním odstředováním a používání alternativních antimikrobiálních látek. Antibiotika jsou povinnou součástí plnidel pro kontrolu kontaminace a růstu bakterií, avšak jejich účinnost se celosvětově snižuje. Kationtové antimikrobiální peptidy představují hlavní skupinu alternativních antimikrobiálních přísad využitelných pro konzervaci kančího spermatu a první studie ukázaly slibné výsledky podporující jejich praktické využití v této oblasti (Schulze, Dathe, Waberski, Müller, 2016).

Pro uchování ejakulátu by antimikrobiální aditiva měla splňovat následující požadavky: široké spektrum antimikrobiálního působení, absence toxicity vůči spermii, nenarušení plodnosti, vysoká stabilita, vysoká aktivita při běžných teplotách a skladování spermatu, malý potenciál vyvolat rezistenci, snadné použití a finanční dostupnost (Schulze, Dathe, Waberski, Müller, 2016; Schulze, Ammon, Rüdiger, Jung, 2015).

### 5.3 Kryokonzervace

Ejakulát se skladuje při teplotě 15 – 20°C, protože teplota pod 15 °C by mohla narušit fluiditu membrány. Avšak ze studie Wasilewske *et al.* (2016) vyplývá, že kvalita ejakulátu po rozmražení je ovlivněna mnoha faktory, jako jsou například podmínky chlazení. Předběžné výsledky této studie ukázaly, že udržování ejakulátu obohaceného o přídatné dlouhodobé látky při 10 °C redukuje náchylnost spermií ke kryo-indukovanému poškození. Výsledky studie ukázaly, že udržování kančího ejakulátu v různých plnidlech pro různé doby skladování před zmrazením vykazují různé ochranné účinky na funkce spermií po rozmražení. Dále bylo zjištěno, že spermie držené v AHP (Androhep® Plus) a ASP (Androstar® Plus) plnidlech po dobu 24 hodin při teplotě 10 °C vykazovaly vyšší kryo-toleranci, která se projevuje vyšší pohyblivostí, mitochondriální funkcí, integritou plazmatické membrány a životaschopností. (Bailey, Lessard, Jacques, Breque *et al.*, 2008).

Jedna z výhod zmražení spermatu je zamezení přenosu některých patogenů, čímž by se chránil zdravotní stav stáda. Kromě toho by se tak mohly minimalizovat účinky náhlého vzplanutí nakažlivé nemoci. Navzdory těmto potenciálním výhodám dlouhodobého skladování spermatu, jsou prasečí spermie notoricky citlivé na nízké teploty.

Zmražení a rozmražení spermatu se běžně v reprodukci nepoužívá. Cílem laboratoří je vyvinout protokol pro efektivní uchování spermatu použitím kryokonzervace. Předpokládá se, že plazmatická membrána spermií je primární místo poškozované chladem, avšak posílení membrány molekulami, které mají určité vlastnosti, jako cholesterol, zlepšuje schopnost kančího spermatu odolávat nízkým teplotám (Bailey, Lessard, Jacques, Breque *et al.*, 2008).

## 6 Kontaminace

Pro hodnocení kvality zpracovaného ejakulátu je klíčová míra kontaminace čerstvého spermatu. Odběr spermatu má daleko od sterilní procedury, proto by mělo být hodnocení kvality ejakulátu základem k posouzení slabých míst v inseminaci (viz obr. 2) (Goldberg, Argenti, Faccin, Santi *et al.* 2013). Kontaminace může ovlivnit fertilitu, životaschopnost spermií, snížit pohyblivost, vyvolat buněčnou smrt anebo poškodit akrozom. Proto se musí zpracovávat a inseminovat sperma dle hygienických pravidel, přidávat antibiotika do ejakulátů na ochranu spermií a také je zapotřebí správně čistit a dezinfikovat laboratoř a její vybavení (Baracaldo, Ward, 2009).

Teplota skladování kolem 16 – 17 °C však může pomoci přežít bakteriím (Bresciani, Cabassi, Morini, 2014). Stejně tak jako látky, které jsou pro spermie bohaté na živiny, mohou být příznivé pro růst bakterií, a to také tím, že udržují kolísání osmolarity a udržují hodnoty pH mezi 6,8 a 7,2. Kromě původních choroboplodných zárodků v nativním spermatu, se zvyšuje potenciální riziko u zředěných ejakulátů s opožděným zchlazením, se zvýšenou teplotou při přepravě a skladování, při prodloužení doby skladování a v závislosti na složení plnidel (Schulze, Dathe, Waberski, Müller, 2016).

Mezi hygienické faktory důležité pro odběr ejakulátu patří očista předkožky, udržování délky ochlupení na předkožce, čisté rukavice na každý odběr, správné upevnění penisu, vyřazení prvních proudů ejakulátu. Větší šance na získání ejakulátu s koloniemi > 220 CFU/ml je, když tekutina z předkožky steče po ruku odběratelů do ejakulátu, odběr ejakulátu delší než 7 minut, s chlupy na předkožce delšími jak 1 cm, špinavými odběrovými rukavicemi nebo u kanců starších 18 měsíců. Nižší míra kontaminace byla pozorována, když byli kanci očištěni 2 dny před odběrem, byla vyprázdněna a vysušena předkožka, použity rukavice, byla vyřazena první část ejakulátu a sperma bylo odebráno přímo do nádoby. Vyhodnocení účinků možných rizikových faktorů na stupeň znečištění ejakulátu se provádí po rozdělení ejakulátu do dvou skupin v závislosti na počtu jednotek

tvořících kolonie (CFU) pozorovaných při mikrobiologickém hodnocení: <220 CFU/ml a >220 CFU/ml aerobních mezofilů. Separace do těchto dvou skupin je založena na střední hodnotě CFU, tedy přibližně 50 % vzorků by mělo patřit do každé skupiny (Goldberg, Argenti, Faccin, Santi *et al.* 2013).

Dle studie Goldberga *et al.* (2013), zapříčinila technika držení penisu mezi palcem a nataženým ukazováčkem stékání předkožkové tekutiny do sběrné nádoby, 37,7 % ejakulátu bylo bez aerobních mezofilů oproti dalším stádům, kde to bylo 7,5 %, 3,6 % a 1,9 %. Kontaminace ejakulátu sbíraného déle jak 7 minut činila 34 %, přičemž při odběru, který trval méně jak 7 minut, kontaminace činila pouze 19 %. Cestou ke zkrácení času odběru je sbírat pouze frakce bohaté na spermie, což může být rozporuplné, neboť frakce chudá na spermie obsahuje hodně plazmy, která hraje roli v genitálním traktu samic a zředovacím poměru ejakulátu. Vyšší množství aerobních mezofilů v ejakulátu starších kanců může být spojeno s tím, že starší kanci mají širší předkožku. Větší množství aerobních mezofilů v ejakulátu u starších kanců je také kvůli většímu výskytu kapající tekutiny do kontejneru v porovnání s mladšími (30 % vs 16 %). Faktory ovlivňující kontaminaci závisí na odběrovém personálu, riziko se snižuje zkušenostmi a poučením personálu. Když se nechovají opatrně, 70 % vzorků ejakulátu má více jak 220 CFU/ml, a to kvůli špatnému postupu personálu. Procento ejakulátu s >220 CFU/ml bylo vyšší při odběru se špinavými rukavicemi a kapající tekutinou (100 %), než ve vzorku s čistými rukavicemi a bez kapající tekutiny do kontejneru (39,6 %).

Kontaminace může být zvířecího a nezvířecího původu. Mezi zvířecí zdroje kontaminace patří fekálie, předkožka, sekrety dýchacích cest, pokožka a chlupy. Do nezvířecích zdrojů řadíme například kontaminovanou vodu, nesterilizované rukavice a pomůcky pro odběr, špatné hygienické podmínky a kontaminace vzorku lidmi. U samců patří močová trubice do vylučovacího a zároveň rozmnožovacího systému, kontaminace tedy může být z obou soustav. Spermie je často kontaminováno typickými uropatogeny, avšak kvůli blízkosti intestinálního traktu jsou infekce vyvolané také kmeny, které patří do normální střevní mikroflóry (Martín, Munoz, De Cupere, Van Driessche *et al.* 2010). Pro předejití těmto problémům by měly být respektovány řádné hygienické procedury během odběru a laboratorního zpracování ejakulátu, a to především proto, že v poslední době bylo zdůrazňováno, že antimikrobiální látky obvykle používané k ředění spermatu proti růstu bakterií mají omezenou účinnost (Gączarzewicz, Udala, Piasecka, Blaszczyk *et al.* 2016), a to i když se do ejakulátu přidávají ve vysokých koncentracích. To potvrzuje studie, která

odhalila bakterie v 14,7 - 31, 2 % prasečího ejakulátu obohaceného o přídavné látky (Schulze, Ammon, Rüdiger, Jung, 2015).



Obrázek 2: Odběr semene (Kozdrowski, Staroniewicz, Dubiel, 2005)

## 7 Mikrobiální analýza

### 7.1 Bakteriální izolace a identifikace

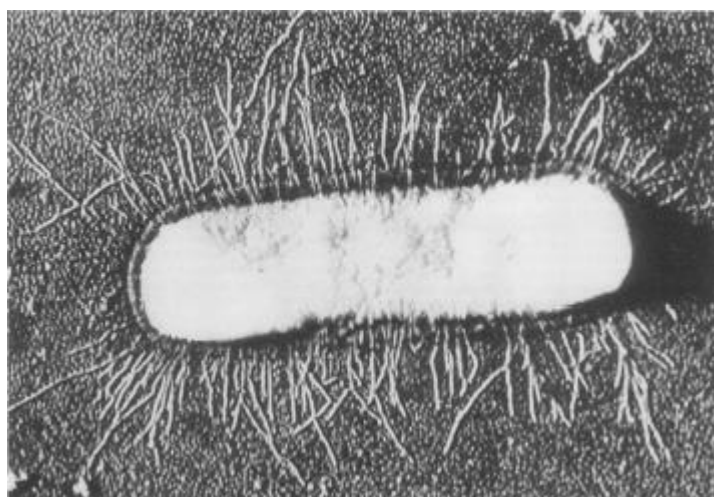
Část každého vzorku ejakulátu (čerstvého a s přídavnými látkami) se naočkuje na pevnou živnou půdu běžně používanou v bakteriologické diagnostice. Navíc se další část vzorku, která je obohacena o přídavné látky, pipetuje do tekuté živné půdy. Oba typy půd se inkubují při  $37 \pm 2$  °C za aerobních podmínek. Po 24 hodinách se pevné živné půdy vizuálně kontrolují kvůli růstu bakterií, a pokud není přítomen žádný růst, odpovídající tekutá půda je nanesena na Columbia agar s ovčí krví. Poté se pevná živná půda dále inkubuje po dobu 5 dní při pokojové teplotě. Během této inkubace se agar kontroluje každých 24 hodin. Každý odlišný typ bakteriální kolonie se subkultivuje na Columbia agar s ovčí krví a identifikuje buď klasickými biochemickými testy, nebo příslušným komerčním setem, např. Api® (Schulze, Ammon, Rüdiger, Jung, 2015).

Izolované bakterie se standardně určují hodnocením růstových vlastností a charakteristikou kolonií, Gramovým barvením, hodnocením morfologie buněk, reakcí katalázy a oxidázy, koagulačním testem a produkcí hemolyzinu (Bresciani, Cabassi, Morini, 2014).

## 7.2 Celkový počet aerobních buněk

Pro každý vzorek se provede série ředění solným roztokem ke stanovení bakteriální kontaminace (vyjádřené jako jednotky tvořící kolonie na mililitr, CFU/ml). Část každého zředěného vzorku se naočkuje na 2 živné půdy a inkubuje při 37 °C za aerobních podmínek. Po kontrole kultur se po 24 a 48 hodinách zaznamená bakteriální růst (Schulze, Ammon, Rüdiger, Jung, 2015). Agary, které se mohou použít, jsou například MacConkey agar, Mueller – Hintonův agar, Pseudomonas agar, Chapman médium, médium pro redukci dusičnanů (Gączarzewicz, Udala, Piasecka, Blaszczyk *et al.* 2016).

## 8 *Escherichia coli*



Obrázek 3: Elektronový snímek *E. coli* (Duguid, Smith, Dempster, Edmunds, 1995)

### 8.1 Obecně

*Escherichia (E.) coli* je nejčastěji izolovaná bakterie, která je přítomná ve více jak 50 % kontaminovaných vzorků ejakulátu (Bresciani, Cabassi, Morini, 2014; Martín, Munoz, De Cupere, Van Driessche *et al.* 2010). *E. coli* je jedním z ekonomicky nejdůležitějších patogenů v chovech prasat. Může vyvolávat průjemové stavy, infekce močových cest, mastitidu, artritidu a meningitidu jak u lidí, tak u zvířat (Schierak, Walk, Reiter, Weyrauch *et al.* 2007). Produkuje solubilní faktory (cytotoxiny), které indukují v mitochondriích tvorbu ROS (z angl. reactive oxygen species) vedoucí k lipidové peroxidaci plazmatické membrány (Pinart, Yeste, Bonet, 2016; Murphy, 2009). Výsledek tohoto procesu je, že se redukuje motilita a životnost spermií. Navíc solubilní imobilizační faktor produkovaný *E. coli* působí také jako spermicidní činidlo. Tato Gramnegativní bakterie během svého života produkuje lipopolysacharidy (LPS). Tyto substance jsou části

bakteriální stěny, které působí jako endotoxiny, váží bičík a potlačují jeho motilitu (Pinart, Yeste, Bonet, 2016). Přítomnost faktorů uvolňovaných bakteriemi jako je  $\alpha$ -hemolyzin, shiga-like toxin, LPS, peptidoglykanové fragmenty, mohou mít významně škodlivé účinky na spermie (Bussalleu, Yeste, Sepúlveda, Torner *et al.* 2011). Dva kmeny *E. coli*, enterotoxigenní (ETEC) a verotoxigenní (VTEC), způsobují průjemy a v důsledku toho velké ekonomické ztráty. Faktory virulence ETEC jsou fimbriální adheziny (viz obr. 3), termostabilní a termolabilní enterotoxiny. VTEC může produkovat verotoxiny VT1, VT2 nebo obojí (Bussalleu, Yeste, Torner, Bonet *et al.* 2012).

Kolonie, typické pro *E. coli*, jsou dále charakterizovány pomocí Gramova barvení a kombinací biochemických testů (viz obr. 4), které umožňují identifikaci této bakterie, tj. oxidáza, indol, sulfan, utilizace citrátu, hydrolýza lyzinu, methylové červeně, ureázy a testy Voges – Proskauer (Martín, Munoz, De Cupere, Van Driessche *et al.* 2010).



Obrázek 4: *E. coli* na MacConkey agaru (Konidala, Nuvvula, Mohapatra, Nirmala, 2011)

## 8.2 Vliv *E. coli* na spermie

### 8.2.1 Aglutinace

*E. coli* adheruje na všechny části spermie pomocí silné adhezivní síly, která je zprostředkována manózou. Tato interakce způsobuje aglutinaci v kontaminovaných vzorcích. Navíc je tato adheze spojována s ultrastrukturálním poškozením plazmatické membrány spermií, což vede k jejich perturbaci. Výsledek studie Althouse *et al.* (2000) naznačuje, že infekce genitálního traktu *E. coli* může hrát důležitou roli v některých



případech samčí a samičí neplodnosti. Toto tvrzení je podloženo studií Wolffa *et al.* (1993), kteří uvádějí, že aglutinované spermie nedosáhnou k vajíčku.

### ***Aglutinační test s izolovanými buňkami E. coli***

Martín *et al.* (2010) prováděli aglutinaci při pokojové teplotě na mikroskopických sklíčkách smícháním 20  $\mu$ l spermií s 20  $\mu$ l *E. coli* s použitím sérového ředění převzatého z mikrotitračních destiček. Aglutinace byla nejdříve pozorována po 15 minutách, pouhým okem, jako malé bílé hrudky a poté ověřena pomocí světelného mikroskopu (viz obr. 5).

Pohyblivost spermií byla proměnlivá a to v rozmezí od 55 do 85 %. Ejakulát byl zbarven od mléčně bílé až do nažloutlé barvy a pach většiny vzorků byl normální. Ve všech ejakulátech měly spermie v průměru méně jak u 1 – 2 % zkroucené bičíky, morfologické abnormality akrozomu byly pozorovány u 5 – 10 % buněk a cytoplazmatické kapičky byly pozorovány u 3 – 5 % spermií. Hlavní problém, který byl zjištěn u 72 vzorků ze 115 (63 %), byl výskyt určitého stupně aglutinace spermií, které v některých případech dosáhl obecně povolenou hranici 23 % shluklých buněk. *E. coli* bylo možné izolovat z 63 z nich (55 %) (Martín, Munoz, De Cupere, Van Driessche *et al.* 2010).

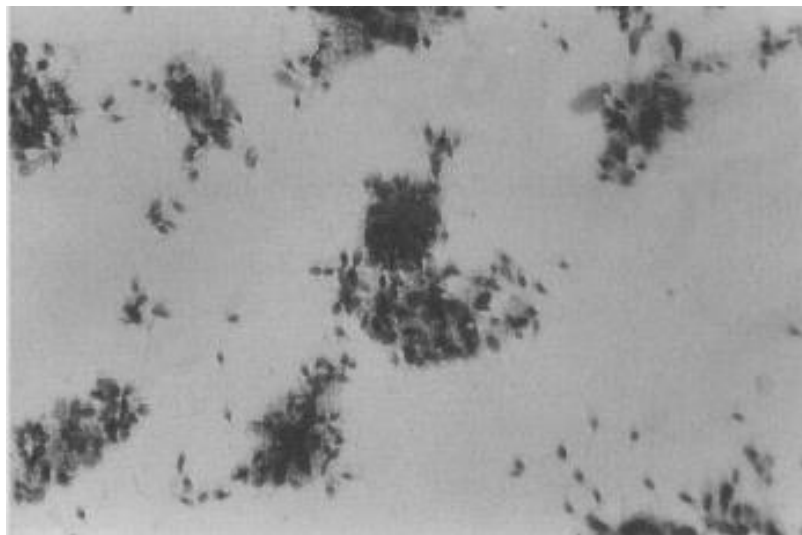
Naopak Pinart *et al.* (2016) pozorovali aglutinaci u vzorku kontaminovaného  $10^1$  a  $10^2$  CFU/ml. Ve vzorcích kontaminovaných  $10^3$  CFU/ml byla mírná aglutinace znát 9. den. Ve vzorcích s koncentrací *E. coli* od  $10^4$  do  $10^5$  se aglutinace vyskytovala od 5. dne skladování, v mírné intenzitě až do konce skladování. Vzorky kontaminované *E. coli* v koncentracích  $10^6$  a  $10^7$  CFU/ml vykazovaly aglutinaci první den od zchlazení s tím, že aglutinace u koncentrace  $10^6$  byla nízká od 1 – 4 dne a mírná 5 – 9 den a u koncentrace  $10^7$  byla nízká 1 den, mírná 2 – 5 den a kritická 7 – 9 den.

Martín *et al.* (2010) označují *E. coli* izolovanou z kontaminovaného ejakulátu jako vyvolávač velmi silné aglutinace spermií. Aglutinace negativně ovlivňuje motilitu spermií, životnost, fertilitu stáda a velikost vrhu. Nižší počet mláďat se začíná projevovat, pokud kontaminace ejakulátu *E. coli* přesáhne hodnotu  $3,5 \times 10^3$  CFU/ml, takový ejakulát by neměl být použit pro umělé oplodnění.

Jak ETEC tak VTEC mohou přežít v ejakulátu. Bussalleu *et al.* (2011) si vybrali tyto 2 kmeny kvůli jejich virulenci a jejich převahu na farmách. V prvním experimentu (skladování při 37 °C, po dobu 96 hodin) bylo pozorováno významné zvýšení míry aglutinace s vyšší koncentrací po prvních 24 hodinách inkubace. Na druhou stranu

v druhém experimentu (skladování při 15 °C, po dobu 11 dní) se projevila zvýšená míra aglutinace po 5 dnech skladování až do konce pokusu.

Vysoká míra aglutinace spermií může být vysvětlována přítomností vnějších adhezinů, jako jsou fimbrie typu 1 a P – fimbrie, které se váží na specifické receptory na vnější části spermie, jak na hlavičku, tak na bičík. Interakce *E. coli* a spermie se odehrává ve 2 fázích, a to v adhezi a následném rozrušení plazmatické membrány (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).



Obrázek 5: Aglutinace pozorovaná 5 minut po smíchání spermií a *E. coli* (Wolff , Panhans, Stolz, Meurer, 1993)

### 8.2.2 pH

V kontrolních vzorcích se pH zvyšovalo denně, ale toto zvýšení nebylo statisticky významné. Podobné schéma změn pH bylo pozorováno u vzorků ejakulátů inokulovaných od  $10^1$  do  $10^6$  CFU/ml *E. coli*. Rozdíly nebyly významné ani mezi ředěním a kontrolními vzorky během 9 dnů skladování. Avšak vzorky kontaminované  $10^7$  CFU/ml *E. coli* měly významně nižší pH od druhého dne až do konce skladování, než vzorky kontaminované od  $10^1$  do  $10^6$  CFU/ml *E. coli* (Pinart, Yeste, Bonet, 2016). Jakmile se sníží pH ejakulátu, pozoruje se snížení jak metabolismu, tak motility spermií v důsledku snížení vnitřního pH. Toto je mechanismus používaný k prodloužení životnosti spermií během skladování (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).

### 8.2.3 Životnost spermií

U vzorků kontaminovaných *E. coli* při koncentraci v rozmezí od  $10^1$  do  $10^6$  CFU/ml se od 4. dne významně snížila životnost spermií. Na konci pokusu procento mrtvých spermií bylo kolem 35 %, životaschopné spermie s pozměněným akrozomem

20 % a životaschopných spermií s pozměněným mitochondriálním obalem pod 10 %. Vzorke kontaminované *E. coli* 10<sup>7</sup> CFU/ml měly výrazný pokles životaschopných spermií již 4. den skladování (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).

#### 8.2.4 Pohyblivost spermií

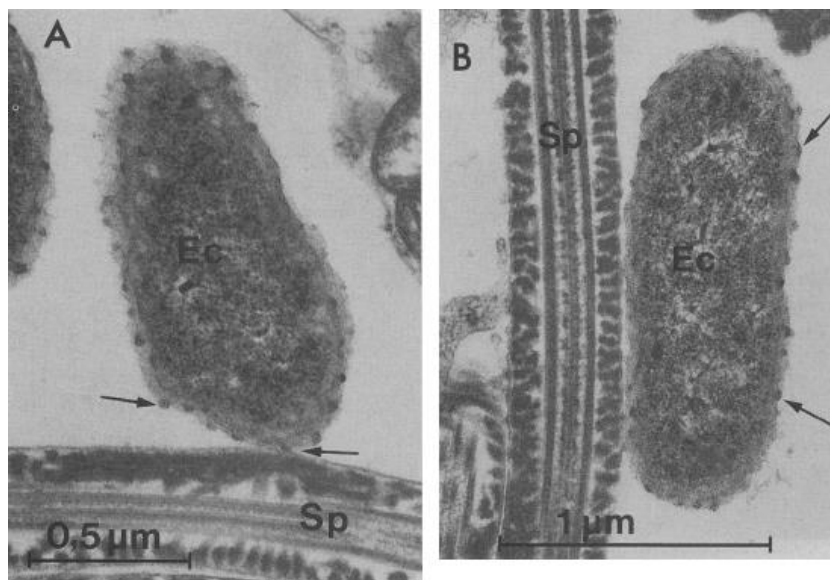
Výrazné snížení motility po 24 hodinové inkubaci při 37 °C bylo pozorováno u vzorku obsahujícího 10<sup>8</sup> CFU/ml ve srovnání se vzorky, které obsahovaly *E. coli* v koncentraci 10<sup>7</sup> až 10<sup>2</sup> CFU/ml, a negativní kontrolou. Navíc byl detekován výrazný rozdíl mezi vzorky inokulovanými koncentracemi od 10<sup>7</sup> do 10<sup>3</sup> CFU/ml, vzorkem s koncentrací 10<sup>2</sup> CFU/ml a negativní kontrolou. Podobné výsledky byly pozorovány 48 hodin po infekci, i když procento motility bylo již nižší (Bussalleu, Yeste, Sepúlveda, Torner *et al.* 2011).

Studie Pinarta *et al.* (2016) se zabývala procentem celkového počtu pohyblivých spermií ve vzorcích kontaminovaných *E. coli* 10<sup>7</sup> CFU/ml. Motilita byla výrazně nižší, než u kontrol a vzorků, které byly kontaminovány *E. coli* v koncentraci od 10<sup>1</sup> do 10<sup>6</sup> CFU/ml. Procento pohyblivých spermií se nelišilo od kontrol a dalších bakteriálních zátěží ve dnech 0 – 2, ale bylo výrazně nižší ve dnech 3 – 9.

Čím větší koncentrace bakterií je, tím více se snižuje procento progresivních, pohyblivých spermií (Bussalleu, Yeste, Sepúlveda, Torner *et al.* 2011).

#### 8.2.5 Kontakt bakterie – spermie

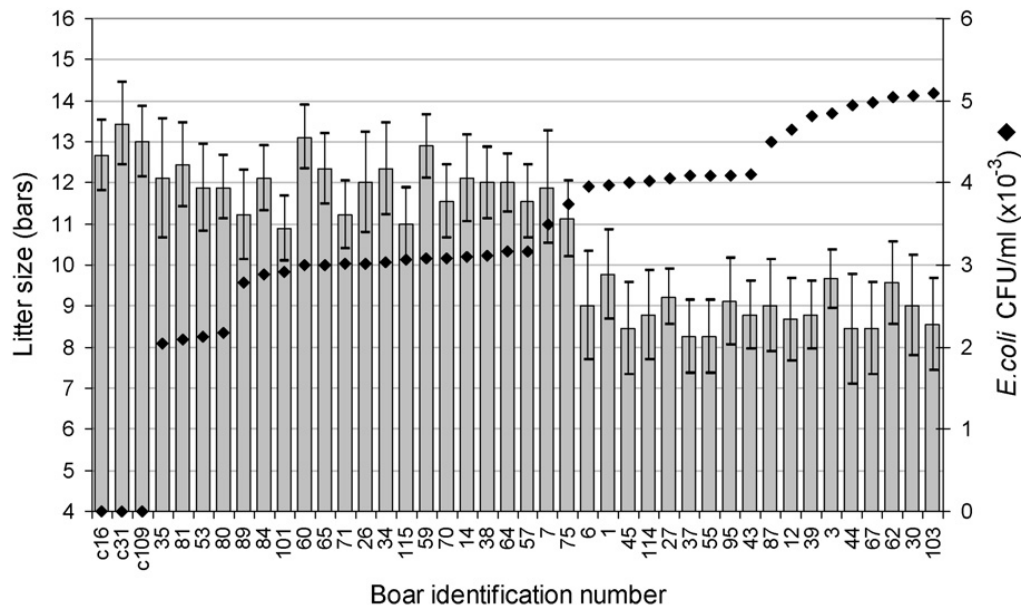
Procento spermií, které je v kontaktu s bakteriemi, záleží na kmenu, infekční dávce a dnu skladování. Většina spermií (okolo 90 %) interaguje s 1 – 3 bakteriemi hned první den, bez ohledu na infekční dávku a kmen. V průběhu zkoušky procenta spermií v kontaktu s bakteriemi byly výrazně vyšší ve vzorcích kontaminovaných *E. coli* o koncentraci 10<sup>7</sup> CFU/ml, než ve vzorcích s nižším množstvím CFU. Záleží to také na době skladování, čím více dní, tím vyšší je kontakt. Procento bakterií, které přilnou k hlavičkám spermií je 20,89 % ± 6,81 % a procento bakterií, které přilnou k bičíku je 78,11 % ± 6,81 %, bez ohledu na bakteriální zátěž a den skladování (viz obr. 6) (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).



Obrázek 6: Adheze *E. coli* na bičík spermie (Wolff , Panhans, Stolz, Meurer, 1993)

### 8.2.6 Efekt *E. coli* na reprodukci

Martín *et al.* (2010) hodnotili kvalitu ejakulátu 42 kanců. Spermatem každého kance bylo uměle oplodněno 9 prasnic. Možný vliv kontaminace ejakulátu obsahujícího *E. coli* na reprodukci byla vyhodnocena spočítáním velikosti získaného vrhu, přičemž všechny prasnice porodily alespoň 2 vrhy před touto studií. Jako rutinní postup obdržely 2 inseminační dávky obsahující  $3 \times 10^9$  spermií na 100 ml ejakulátu po 12 a 24 hodinách po začátku říje, která byla zkontrolována hodinu před oplodněním u všech prasnic. Sperma kanců používaných jako kontrola neobsahovaly žádnou bakteriální kontaminaci, zatímco u „problémových kanců“ byla kontaminace buď samotné *E. coli*, nebo v kombinaci s *Proteus*, *Serratia* nebo *Enterobacter*. Autoři zjistili, že existuje pozitivní korelace mezi koncentrací *E. coli* ve vzorku ejakulátu a aglutinací spermií a negativní korelace mezi velikostí vrhu a aglutinací spermií, která souvisí s koncentrací *E. coli* (viz graf č. 1).



Graf 1: Závislost koncentrace *E. coli* na velikosti vrhu (Martín, Munoz, De Cupere, Van Driessche *et al.* 2010)

## 9 Chlamydie

### 9.1 Obecně

Zástupci čeledě *Chlamydiaceae* jsou obligátní intracelulární bakterie, blízké Gramnegativním. Jsou odpovědné za širokou škálu nemocí jak u zvířat, tak u člověka (Schautteet, Vanrompay, 2011). Chlamydie se šíří kontaktem, nebo prostřednictvím aerosolu a k přenosu nevyžadují vektor (Everett, Bush, Andersen, 1999).

Chlamydie, které byly zaznamenány u prasat, jsou například: *Chlamydia (Ch.) suis*, *Chlamydomphila (Chl.) psittaci*, *Chl. abortus*, a *Chl. pecorum* (Schautteet, Vanrompay, 2011; Teankum, Pospischil, Janett, Burgi, 2006).

Jsou považovány za méně významné patogeny, protože prasečí chlamydióza není tak častá jako jiné infekce a navíc testy na ně nejsou běžně prováděné a jsou nalezeny spíše ve spojení s jinými patogeny, které lze odhalit snadněji. Nicméně i tak se vyskytují dost na to, aby byly z ekonomického pohledu důležité (Schautteet, Vanrompay, 2011).

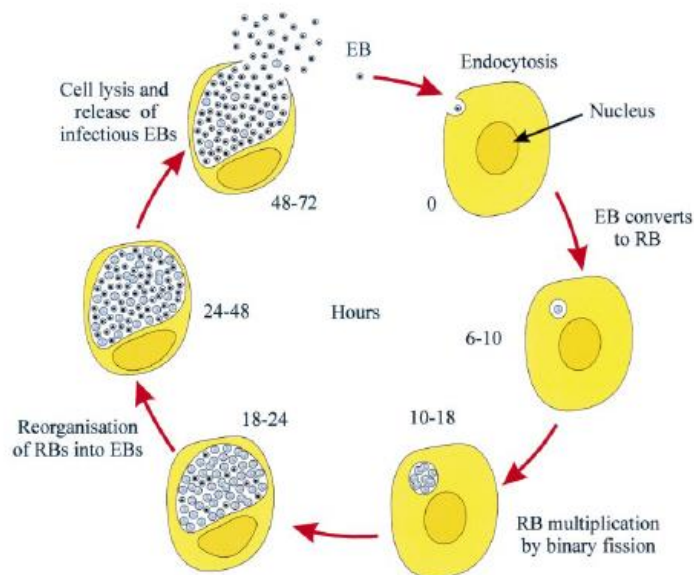
Kauffold *et al.* (2006) uvádí, že chlamydiová infekce je velmi rozšířená a že vyšší procento pozitivních samic bylo nalezeno ve stádě s vysokým výskytem opakovaně oplodňovaných prasnic. Chlamydie se velmi často vyskytují ve stolici nebo ve střevěch, což potvrzuje všeobecný názor, že střevní trakt prasat je přirozeným rezervoárem chlamydií. Studie potvrdila, že *Ch. suis* je pravděpodobně převládající druh intestinálního traktu, zatímco *Chl. psittaci* se častěji vyskytuje v pozitivním ejakulátu. *Chl. psittaci* byla

zjištěna ve vejcovodu, děloze domácích prasat a v různých tkáních divokých prasat. Je málo pravděpodobné, aby se našly chlamydie ve spermatu v důsledku fekální kontaminace, avšak různé části urogenitálního traktu mohou být kolonizovány, a tak mohou potencionálně přispět ke kontaminaci ejakulátu. Externí kontaminace se však také nemůže kompletně vyloučit.

Odhaduje se, že efekt chlamydií na stádo se pravděpodobně více projeví jako individuální idiopatické reprodukční selhání nebo snížení výkonu, a to dělá tuto infekci zákeřnou. V poslední době se *Ch. suis* prokázala i u pracovníků jatek, tudíž jsou i zaměstnanci vystaveni vyššímu zdravotnímu riziku. Navíc není k dispozici žádná vakcína, stejně tak jako u lidských chlamydií. Byla pouze snížena rychlost přenosu mezi prasnicí a seletem, když byla prasnice experimentálně léčena probiotiky. I když se antibiotiky léčí chlamydiové infekce efektivně, jejich použití v živočišném zemědělství nepředstavuje účinné dlouhodobé řešení v zábraně šíření infekce ve stádě, a proto jejich použití vede k dalšímu podrobnému zkoumání. Dodržováním přísné biologické bezpečnosti se dosáhne nejlepší ochrany před chlamydiemi, avšak i přes tuto bezpečnost, je stále výskyt chlamydií vysoký (Hamon, Pasternak, Käser, Meurens *et al.* 2016).

## 9.2 Životní cyklus

Bakterie se vyskytuje ve 2 formách, které se střídají mezi extracelulární, ale metabolicky inaktivní infekční formou nazývanou elementární tělísko, a intracelulární metabolicky aktivní a reprodukční formou nazývanou retikulární tělísko, která používá intracelulární aparát hostitelské buňky pro reprodukci (Eley, Hosseinzadeh, Hakimi, Geary, 2005). Elementární tělísko se endocytózou dostane do eukaryotní buňky a je umístěno uvnitř cytoplazmatické inkluze, kde je transformováno do vegetativní formy a replikováno binárním dělením. Jakmile se buňka zaplní retikulárními tělisky, dochází k jejich transformaci zpět do metabolicky inaktivní, infekční formy a jsou uvolňovány z hostitelské buňky buď prasknutím, nebo fúzí inkluze a plazmatické membrány (viz obr. 7) (Everett, Bush, Andersen, 1999).



Obrázek 7: Životní cyklus chlamydií (Longbottom, Coulter, 2003)

### 9.3 Vliv chlamydií na spermie

Chlamydie byly izolovány z respiračního, intestinálního a genitálního traktu (Hamonic, Pasternak, Käser, Meurens *et al.* 2016), proto chlamydiové infekce prasat zahrnují respirační onemocnění, zánět spojivek, zánět tenkého střeva, poruchy reprodukce (Hamonic, Pasternak, Käser, Meurens *et al.* 2016; Teankum, Pospischil, Janett, Burgi, 2006), zánět osrdečníku, zánět děložní sliznice (Kauffold, Melzer, Henning, Schulze, 2006), zánět prostaty, zánět varlat, zúžení kanálkového systému, zánět vejcovodu, který může vést k zablokování vejcovodů (Eley, Hosseinzadeh, Hakimi, Geary, 2005), vaginální výtok (Schautteet, Vanrompay, 2011). Patogeneze vede přes akutní zánětlivou reakci spojenou s infekcí, což přispívá k trvalým jizvám a funkčnímu poškození infikovaných sliznic (Eley, Hosseinzadeh, Hakimi, Geary, 2005). Teankum *et al.* (2006) ve své studii uvádí, že 3,6 % potratů je způsobeno právě chlamydiemi. Chlamydie tudíž přímo ovlivňují reprodukční systém a jsou významným původcem sexuálně přenosných chorob (Martín, Munoz, De Cupere, Van Driessche *et al.* 2010).

Co se týče vlivu chlamydií na sperma, není žádné výrazné zvýšení akrozomální reakce, které by bylo pozorováno při skladování chlamydií během 7 dní. A také nebyl pozorován ani žádný výrazný rozdíl v přežití spermií kontaminovanými chlamydiemi při koncentracích od  $5 \times 10^4$  do  $5 \times 10^5$  *suis/ml* v porovnání s kontrolními vzorky. Pouze chlamydiová koncentrace od  $6,25 \times 10^5$  *suis/ml* zapříčinila mírný významný vzrůst v počtu mrtvých spermií, který byl pozorován od 7 dne skladování. Výsledky studie ukazují, že

*Ch. suis* nemá významný vliv na životaschopnost spermií v čerstvém ejakulátu obohaceném o přídatné látky, a proto se její přítomnost v kančím ejakulátu rutinně nesleduje. Ačkoliv byl pozorován významný spermicidní efekt vysokých koncentrací *Ch. suis* po 7 dnech skladování, došlo pouze k 10% zvýšení oproti kontrolním vzorkům. Navíc tak vysoké koncentrace *Ch. suis* nejsou v přírodě běžné (Hamon, Pasternak, Käser, Meurens *et al.* 2016).

I když je převážná většina gelové frakce ejakulátu odebrána během ejakulace před hodnocením a doplněním přídatných látek do ejakulátu, malé množství v konečné dávce zůstane. Když byl ejakulát obohacený o přídatné látky inkubován s *Ch. suis* a potom se podrobil fluorescenční mikroskopii, zjistilo se, že částice gelové frakce se více váží k chlamydiím a ty jsou pak pozorovány ve formě malých fluorescenčních ložisek uvnitř částic gelu. Naproti tomu nebyla pozorována žádná specifická interakce mezi spermií a *Ch. suis*. Sperma zůstává tudíž infekční, a to i po přidání antibiotik (Hamon, Pasternak, Käser, Meurens *et al.* 2016). Kontaminovaný ejakulát může být tedy jednou z možných cest přenosu chlamydií na prasnice během umělého oplodnění (Teankum, Pospischil, Janett, Burgi, 2006).

Eley *et al.* (2005) uvádí, že *Ch. trachomatis* může vyvolat předčasnou smrt spermií, a to apoptózou zprostředkovanou kaspázou.

## 10 Klostridie

### 10.1 Obecně

*Clostridium (C) perfringens* je Grampozitivní, sporulující, anaerobní bakterie (Li, Sayeed, Robertson, McClane, 2011), která je široce rozšířená jak v okolním prostředí, tak v intestinální flóře lidí a zvířat. Tato bakterie může působit jako oportunní patogen vyvolávající různé choroby. Je velmi rozšířena v celém chovu prasat, proto je možné, že během procesu odběru může dojít ke kontaminaci ejakulátu (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013). *C. perfringens* spolu s *C. difficile* jsou spojené s průjmem novorozenečích selat, což je důsledek nekrotické enteritidy, která může vést k nízké hmotnosti, mortalitě a jsou tak ekonomickým problémem v chovu prasat. Spory klostridií mohou přetrvávat v prasečích výkalech, což způsobuje, že se šíření těchto bakterií z prasnic na selata obtížně kontroluje. Klostridiální infekce se obvykle vyskytuje u selat v prvních 7 dnech po



narození a mohou být spojeny s nerozvinutou normální mikroflórou a podáváním antibiotik (Baker, Davis, Rehberger, Rosener, 2010).

Virulence této bakterie lze z velké části připsat její schopnosti exprimovat nepřehledné množství toxinů. Nicméně zatímco *C. perfringens* může produkovat 15 různých toxinů, jednotlivé další druhy produkují pouze některé z těchto toxinů. Proto jsou na základě 4 toxinů klostridie klasifikovány do 5 skupin (Li, Sayeed, Robertson, McClane, 2011). Čtyři toxiny, na kterých je založena klasifikace jsou alfa (viz obr. 8), beta, epsilon, ióta (Baker, Davis, Rehberger, Rosener, 2010). *C. perfringens* produkuje toxiny alfa, beta, epsilon a CPE (z angl. *Clostridium perfringens* enterotoxin) (Liang, Kang, Chen, Guan, 2017; Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013), které interagují s buněčnou membránou a vyvolávají její narušení nebo tvorbu pórů. Ióta toxin však působí intracelulárně katalýzou ADP – ribosylace aktinových monomerů, což vede k buněčné smrti (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013).

*C. perfringens* typu A (alfa) a typ C (alfa + beta) jsou známy jako typy, které infikují prasata, ačkoliv jiné typy mohou infikovat celou řadu dalších zvířecích druhů včetně člověka. Onemocnění způsobené *C. perfringens* typu C byla kontrolována vakcinací v prasečích stádech v minulých letech, avšak mechanismus virulence *C. perfringens* typu A není dobře znám (Baker, Davis, Rehberger, Rosener, 2010).



Obrázek 8: *C. perfringens* na krevním agaru (Nowell, Kropinski, Songer, Macinnes *et al.* 2012)

## 10.2 Vliv klostridií na spermie

### 10.2.1 pH

Bez ohledu na bakteriální zátěž se hodnota pH vzorků ejakulátu kontaminovaných *C. perfringens* významně nelišila od kontrol v průběhu dnů 0 - 4. Nicméně při koncentraci  $10^1 - 10^7$  CFU/ml se pH vzorků významně zvýšilo od 5. do 9. dne skladování při 15 °C, na rozdíl od kontrolních vzorků (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).

### 10.2.2 Životaschopnost spermií

U bakteriálního zatížení od  $10^1$  do  $10^6$  CFU/ml ve dnech 0 – 3 nebyly pozorovány žádné významné rozdíly od kontrolních vzorků v procentech životaschopných spermií s netknutým akrozomem a mitochondriálním pláštěm. Nicméně ve dnech 4 – 9 měly stejně kontaminované vzorky nižší procento životaschopných spermií s neporušeným akrozomem a mitochondriálním pláštěm. Na druhou stranu, i když toto procento bylo vysoké při koncentraci  $10^7$  CFU/ml ve dnech 0 – 1, od druhého dne se výrazně snížilo až do konce skladovací doby. Studie pozorovala pokles životaschopnosti spermií ve vzorcích kontaminovaných *C. perfringens* o koncentraci  $10^7$  CFU/ml spíše kvůli změnám v integritě plazmatické membrány, než kvůli poruchám v akrozomu a mitochondriálním plášti. To může být způsobeno uvolněním proteinových toxinů, které ovlivňují plazmatickou membránu, buď zvýšením propustnosti, nebo indukci tvorby pórů. Nízká pohyblivost spermií může být dávana do souvislosti s přítomností toxinů, které ovlivňují aktinový cytoskelet (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).

Při jiném experimentu (skladování při 15°C a po dobu 11 dní) se významně snížila životnost spermií již 24 hodin po inokulaci, a to při největší bakteriální zátěži  $10^8$  CFU/ml, po 3 dnech skladování byl zaznamenán i pokles při koncentraci  $10^7$  CFU/ml, ale i tak to byl nižší pokles, než při koncentraci  $10^8$  CFU/ml. Na konci experimentu zůstalo přibližně 10 % životaschopných spermií (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013).

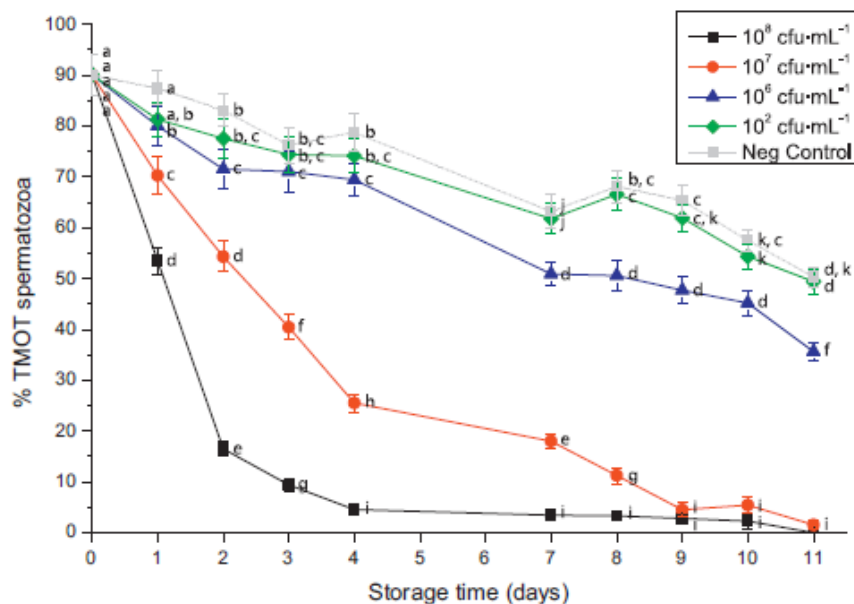
Při druhém pokusu (skladování při 37 °C a po dobu 4 dní) se jako nejvíc škodlivá ukázala koncentrace  $10^8$  a poté  $10^7$  a  $10^6$  CFU/ml, ostatní byly podobné negativní kontrole. Až na konci experimentu, po 96 hodinách, se prakticky nevyskytovaly životaschopné spermie (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013).

### 10.2.3 Pohyblivost spermií

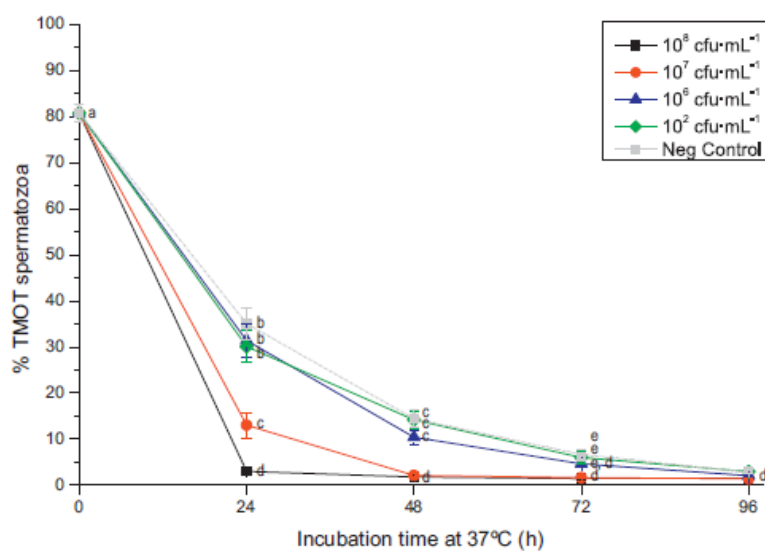
Ve vzorcích ejakulátu kontaminovaných *C. perfringens* s koncentrací  $10^1 - 10^6$  nebylo procento celkových progresivně pohyblivých spermií jiné, než u kontrolních vzorků během celého devítidenního období. Na rozdíl od procenta celkových pohyblivých spermií ve vzorcích ejakulátu s koncentrací *C. perfringens*  $10^7$  CFU/ml. Procento při této koncentraci bylo výrazně nižší již po 2 dnech skladování při teplotě  $15\text{ }^\circ\text{C}$  (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).

Další experiment, který se prováděl po dobu 11 dní při teplotě  $15\text{ }^\circ\text{C}$  o různých koncentracích bakterií, ukázal, že 24 hodin po inokulaci byl pozorován významný pokles v procentech celkové pohyblivosti spermií při koncentracích  $10^8$  a  $10^7$  CFU/ml v porovnání s nižšími koncentracemi a negativní kontrolou. Po 48 hodinách při koncentraci  $10^8$  CFU/ml byl pokles drastický a na konci experimentu nebyly u této koncentrace pozorovány žádné pohyblivé spermie. U dalších koncentrací platilo, že čím nižší bakteriální zátěž, tím nižší procento nepohyblivých spermií (viz graf č. 2). Při experimentu, který se prováděl při teplotě  $37\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 4 dní, se ukázalo, že nejvyšší koncentrace bakterií ( $10^8$  CFU/ml) způsobila významný pokles motility spermií po 24 hodinách, kdy zůstalo méně než 5 % pohyblivých spermií. Ostatní koncentrace měly v závislosti na jejich výši různý počet pohyblivých spermií. Po 72 hodinách nebyly žádné pohyblivé spermie v žádné koncentraci bakterií, ani v negativní kontrole (viz graf č. 3) (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013).

Bakteriální zatížení klostridiami  $10^8$  CFU/ml bylo prokázáno jako velmi škodlivé kančímu spermatu, ale obvykle se ve vzorcích ejakulátu nenachází (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).



Graf 2: Celkové procento pohyblivých spermií při koncentraci  $10^2$  -  $10^8$  CFU/ml *C. perfringens* (skladování 11 dní, 15 °C) (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013)



Graf 3: Celkové procento pohyblivých spermií při koncentraci  $10^2$  -  $10^8$  CFU/ml *C. perfringens* (skladování 96 hodin, 37 °C) (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013)

#### 10.2.4 Aglutinace a morfologie

Aglutinace spermií nebyla pozorována během období chlazení ejakulátu při bakteriální zátěži v mezích od  $10^1$  do  $10^3$  CFU/ml. Avšak nízká míra aglutinace spermií byla pozorována ve vzorcích kontaminovaných  $10^4$  –  $10^5$  CFU/ml o sedmém dni, ve

vzorcích kontaminovaných  $10^6$  CFU/ml od pátého dne a ve vzorcích kontaminovaných  $10^7$  CFU/ml již od třetího dne (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).

V dalších experimentech byla pozorována vysoká míra aglutinace spermií za obou podmínek ( $15^\circ\text{C}$ , 11 dní;  $37^\circ\text{C}$ , 4 dny), a to zejména ve vzorcích s nejvyšší bakteriální zátěží inkubovaných při  $37^\circ\text{C}$  po 24 hodinách od inokulace. Co se týče morfologie spermií, nedošlo k žádným výrazným změnám (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2013).

### 10.2.5 Kontakt spermie – bakterie

Procento spermií, které je v kontaktu s bakteriemi, záleží na kmenu, infekční dávce a dnu skladování. V případě *C. perfringens* jde o dávky kontaminované koncentrací  $10^7$  CFU/ml, které vykazují významné zvýšení kontaktu mezi spermii a bakteriemi. Nižší koncentrace vykazují malé změny po celou dobu skladování. Většina spermií (okolo 90 %) interagují s 1 – 3 bakteriemi hned první den, bez ohledu na infekční dávku a kmen. Průměrné procentní přilnutí bakterie k hlavičce spermie je  $17,27\% \pm 5,78\%$  a přilnutí k bičíku spermie je  $82,83\% \pm 5,78\%$  (Pinart, Yeste, Bonet, 2016).

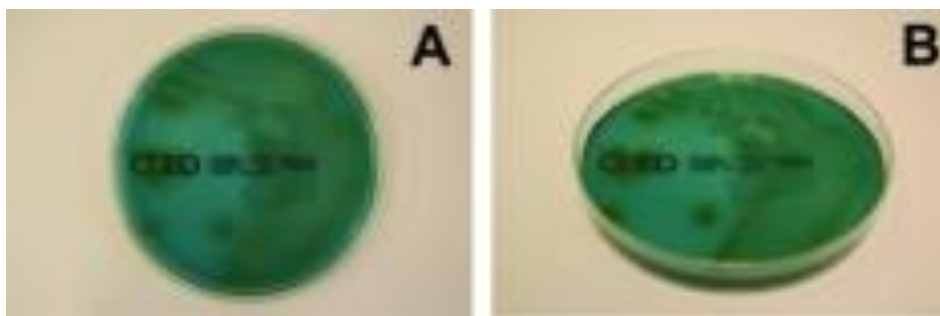
## 11 *Pseudomonas*

### 11.1 Obecně

Pseudomonády jsou Gramnegativní bakterie patřící do čeledě *Pseudomonadaceae*. Tato podmíněně patogenní bakterie je v přírodním prostředí hojně rozšířena, především ve vodě a půdě (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014), kde může přetrvávat měsíce (Smole, Thomann, Frey, Perreten 2010). Všudypřítomný výskyt v prostředí je způsoben několika faktory, včetně schopnosti kolonizovat více environmentálních nik a využívat mnoho zdrojů životního prostředí jako zdroje energie (Lyczak, Cannon, Pier, 2000). Tato bakterie má fimbrie, které fungují jako kolonizační faktory a přispívají k adhezenci k hostitelským buňkám. Přítomnost bičíku umožňuje uniknout hostitelské imunitní odpovědi a vytvářet biofilm (Barbieri, 2000).

*P. aeruginosa* produkuje řadu faktorů virulence, které se vyskytují buď na povrchu buňky anebo jsou sekretovány. Tyto faktory mají specifické i nespecifické účinky a často vyvolávají patologické účinky vzdálené od místa infekce. Vylučované faktory virulence zajišťují živiny pro růst, zvyšují invazivní potenciál nebo přímo poškozují hostitelskou tkáň. Komponenty povrchu buňky umožňují kolonizovat místo infekce, rozvrátit hostitelovu vrozenou a získanou imunitu a replikovat se v něm. Vnější membrána obsahuje

endotoxin, který není tak silný jako u enterobakterií, ale dokáže vyvolat zánětlivou odezvu. Také produkuje alginát, což je exogenní polysacharidová kapsule. Vytváří několik proteáz, včetně LasA a LasB. Produkuje dva siderofory, pyoverdín a pyochelin, které dočasně odejmou železo z hostitelských zdrojů. Dále produkuje bakteriální exotoxin A, který se váže na receptor podobný LDL a vstupuje do buněk endocytózou (Barbieri, 2000). Další syntetizovanou látkou je pigment pyocyanin (viz obr. 9) (Lyczak, Cannon, Pier, 2000). *P. aeruginosa* mimo již výše uvedené exprimuje dvě homologní extracelulární fosfolipázy C (PLC), hemolytickou PLC (PlcH) a nehemolytickou PLC (PlcN). V eukaryotických buňkách je zřejmé, že PLC mají vliv na širokou škálu hlavních signálních procesů, včetně apoptózy, onkogeneze a zánětu (Barker, Vasil, Filloux, Ball, Wilderman *et al.* 2004).



Obrázek 9: Kolonie *P. aeruginosa* na CLED agaru (Mathesin, Weekes, Coggle, 2009)

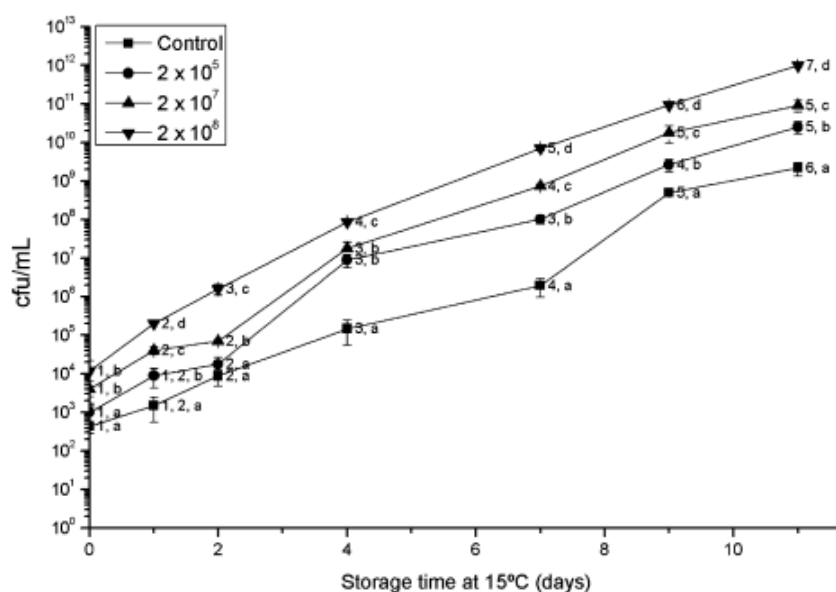
Působení této bakterie závisí nejen na přímém kontaktu se spermatem, ale také na velkém počtu buněčných a extracelulárních faktorů, což jí umožňuje přizpůsobit se různým prostředím. Elastáza, kterou produkuje, způsobuje poškození tkáně a má spermicidní účinky. Také uvolňuje LPS, což jsou komponenty vnější bakteriální stěny, které se přímo váží na spermie, čímž potlačují jejich motilitu. Kromě těchto faktorů virulence je obecně známo, že *P. aeruginosa* využívá Quorum sensing (QS) k regulaci fyziologických aktivit, včetně patogenity. QS molekuly mohou mít škodlivé účinky na spermie a mohou vyvolat exocytózu akrozomů (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).

## 11.2 Vliv *P. aeruginosa* na spermie

### 11.2.1 Rychlost růstu v ejakulátu

Autoři studie pozorovali rychlost růstu *P. aeruginosa* v ejakulátu během 11 dní skladování při teplotě 15 – 17 °C. Vzorky se skládaly z inokulovaných vzorků, kde se

koncentrace bakterie pohybovala od  $2 \times 10^8$  do  $2 \times 10^4$ , a negativní vzorků, do kterých se bakterie neinokulovala. Dvacet čtyři hodin po inokulaci až do konce experimentu byly ve srovnání s negativní kontrolou rozdíly ve všech koncentracích, s výjimkou vzorků s koncentrací  $2 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  CFU/ml ve 2. dni. Pro koncentrace  $2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  CFU/ml se růst bakterií zvyšoval již od prvního dne inkubace, u ostatních koncentrací se začal zvyšovat až od druhého. Zajímavé je, že druhý den u vzorků s koncentracemi  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  CFU/ml se neprojevil výrazný rozdíl oproti srovnání s hodnotami získanými první den. Pravděpodobně se předpokládá, že růst byl zrovna v adaptační, nebo lag fázi. Proto se dle těchto výsledků může vyvodit, že růstová dynamika *P. aeruginosa* je závislá na čase a koncentraci (viz graf č. 4) (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).



Graf 4: Dynamika růstu rozdílných koncentrací *P. aeruginosa* během 11 dní skladování při teplotě 15 - 17 °C (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014)

### 11.2.2 pH

Nebyly zjištěny žádné změny v pH jak v závislosti na době skladování, tak v závislosti na koncentraci bakterií (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).

### 11.2.3 Motilita spermií

#### *Celková motilita*

Po 24 hodinách skladování při teplotě 15 – 17 °C nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi inokulovanými vzorky a negativní kontrolou. Druhý den se od negativní kontroly odlišovala pouze koncentrace  $2 \times 10^8$  CFU/ml. Od 4. do 9. dne byly procenta celkových pohyblivých spermií ve vzorcích o koncentracích  $2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  menší, než v negativní

kontrole a v dalších vzorcích. Nicméně na konci experimentu (11. den) nebyly pozorovány významné rozdíly mezi inokulovanými vzorky a negativní kontrolou (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).

### *Progresivní motilita*

Od druhého dne jsou viditelné rozdíly mezi negativní kontrolou a zkumavkou obsahující  $2 \times 10^8$  CFU/ml. Tato klesavá tendence v procentu progresivně pohyblivých spermií byla udržována až do 9. dne. Koncentrace  $2 \times 10^7$  CFU/ml se také odlišovala od negativní kontroly, ale pouze od 4. do 7. dne. Avšak na konci experimentálního období (11. den) nebyly mezi jednotlivými vzorky zaznamenány rozdíly. Jako nejvíce škodlivá se projevila bakteriální koncentrace  $2 \times 10^8$  CFU/ml (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).

Jiná studie se zabývala účinky různých koncentrací *P. aeruginosa* na parametry motility po *in vitro* kapacitaci (IVC). Spermie musí projít biochemickými a fyziologickými změnami, známými jako kapacitace spermií, aby dokázaly proniknout do vajíčka. Kapacitace spermií zahrnuje změny fosfolipidů v plazmatické membráně, efluxu cholesterolu, aktivují se iontové kanály a zvyšuje se hladina intracelulárního vápníku a cAMP, stejně tak, jako se mění flagelární aktivita a fosforylace proteinů (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet 2016).

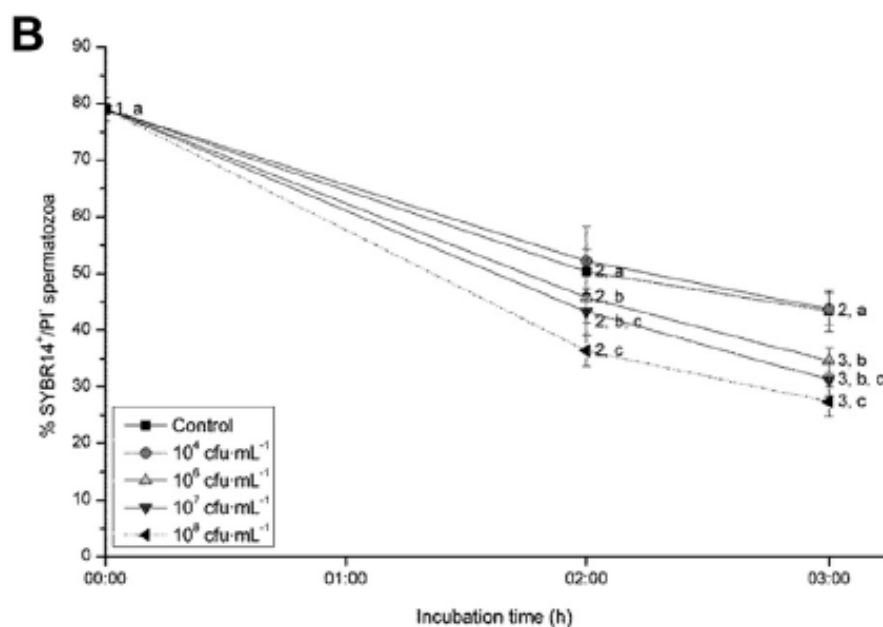
Po 2 hodinách od IVC procentuální hodnoty progresivně pohyblivých spermií (PMOT), VSL (z angl. straight-linear velocity), VCL (z angl. curvilinear velocity), VAP (z angl. average path velocity) hodnocené ve vzorcích s koncentracemi *P. aeruginosa* od  $10^4$  do  $10^8$  CFU/ml byly významně odlišné od hodnot pozorovaných v kontrolní zkumavce. Čím vyšší byla koncentrace vzorku, tím výraznější rozdíl od kontrolního vzorku byl pozorován. V případě PMOT tendence přetrvávala i po 3 hodinách (s výjimkou koncentrace  $10^4$  CFU/ml). U VSL, VCL a VAP se v tomto časovém bodě od kontrolního vzorku lišila pouze nejvyšší koncentrace -  $10^8$  CFU/ml. Podobně dopadly hodnoty STR (z angl. straightness index) a WOB (z angl. oscillation index). Hodnota LIN (z angl. linearity index) se lišila pouze v nejvyšší koncentraci  $10^8$  CFU/ml. Hodnoty BCF (z angl. beating frequency) a ALH (z angl. amplitude of lateral head displacement) měly nižší hodnoty po 2 hodinách u koncentrace  $10^8$  CFU/ml a po 3 hodinách v koncentracích  $10^7$  a  $10^8$  CFU/ml. Bakteriální kontaminace ovlivňuje parametry pohyblivosti spermií kanců po IVC v závislosti na koncentraci (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet 2016).



### 11.2.4 Životaschopnost spermií

Po 24 a 48 hodinách skladování při 15 – 17 °C bylo procento životaschopných spermií ve vzorcích s nejvyšší koncentrací bakterií ( $2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  CFU/ml) menší, než v negativní kontrole a tato tendence byla pro koncentraci  $2 \times 10^8$  CFU/ml udržována až do konce experimentálního období. U koncentrace  $2 \times 10^7$  CFU/ml se procento také snižovalo, ale ne tolik, jako u koncentrace vyšší. Jiné koncentrace se od negativní kontroly během prvních 2 dnů nelišily (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).

Při sledování životaschopnosti spermií po IVC byly devastující účinky *P. aeruginosa* patrné 2 hodiny po začátku, a to u koncentrací  $10^6$ ,  $10^7$  a  $10^8$  CFU/ml. Při těchto koncentracích bylo výrazně nižší procento životaschopných spermií oproti koncentraci  $10^4$  CFU/ml a kontrolní zkumavce. Účinky byly opět závislé na čase a koncentraci, čím delší doba účinku a vyšší koncentrace, tím nižší procento životaschopných spermií (viz graf č. 5) (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet 2016).



Graf 5: Efekt různých koncentrací *P. aeruginosa* na životaschopnost spermií (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet 2016)

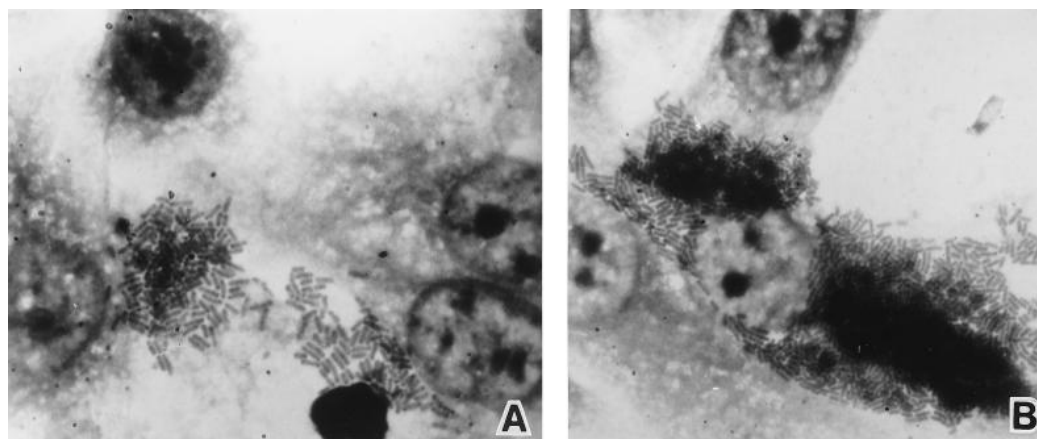
### 11.2.5 Integrita akrozomu

Dvacet čtyři hodin po inokulaci byly pozorovány rozdíly mezi koncentrací  $2 \times 10^8$ , negativní kontrolou a jinými koncentracemi, tato tendence byla dodržována až do konce skladování, ale největší pokles byl zaznamenán do 7. dne. U koncentrace  $2 \times 10^7$  byly také zaznamenané rozdíly, ale ne tak vysoké, jako u koncentrace vyšší (Sepúlveda, Bussalleu, Yeste, Bonet, 2014).

## 12 Rod *Enterobacter*

### 12.1 Obecně

Rod *Enterobacter* patří do čeledě *Enterobacteriaceae*, které kolonizují tenké a tlusté střevo a zahrnují jak nepatogenní (komezální), tak patogenní mikroorganismy. *Ent. cloacae* je pohyblivá, Gramnegativní, krátká tyčinka (Wang, Mori, Komori, Sasatsu *et al.* 1989) s fimbriemi typu 1 (viz obr. 10) (Prieto-Martínez, Bussalleu, Garcia-Bonavila, Yeste, 2014), která je negativní na oxidázu a na nitrát reduktázu pozitivní (Wang, Mori, Komori, Sasatsu *et al.* 1989). Fermentuje glukózu a laktózu s produkcí kyseliny a plynu. Kyselina citronová a soli kyseliny citronové se využívají jako jediný zdroj uhlíku (Hormaeche, Edwards, 1960).



Obrázek 10: Spojení *Ent. cloacae* s lidskými epiteliálními buňkami (Keller, Pedroso, Ritchmann, Silva 1998)

### 12.2 Vliv *Ent. cloacae* na spermie

#### 12.2.1 Životaschopnost spermií

Prieto-Martínez *et al.* (2014) zkoumali vzorky spermatu obohacené o přídavné látky ze sedmi zdravých postpubertálních kanců, které byly uměle kontaminovány bakterií *Ent. cloacae* v různých poměrech (2:1, 1:1, 1:5, 1:10). Poměr 1:0 (neinokulovaný) sloužil jako negativní kontrola. Vzorky se skladovaly 11 dní při teplotě 17 °C.

Autoři nezaznamenali žádné významné rozdíly po jednom a dvou dnech skladování mezi vzorky a negativní kontrolou. Třetí den bylo procento životaschopných spermií u nejvyšších poměrů bakterie ke spermatu (1:5, 1:10) významně nižší, než na počátku pokusu. Čtyři dny po inokulaci se procento životaschopných spermií u poměru 1:10 ještě snížilo, v tento den bylo snížení pozorováno i u poměrů 1:5 a 1:1. Sedmý den se toto procento výrazně snížilo ve všech vzorcích v porovnání s počátečními hodnotami. Pouze

poměr 1:10 vykazoval významně nižší procento životaschopných spermií oproti negativní kontrole. Kromě poměru 2:1, se zvětšovaly rozdíly mezi vzorky a negativní kontrolou až do konce skladování. Na konci experimentu byly významné rozdíly mezi jednotlivými poměry a u nejvíce kontaminovaného vzorku (1:10) se projevilo dramatické snížení procenta životaschopných spermií.

### **12.2.2 Integrita akrozomu**

Od prvního do devátého dne od inokulace byly zjištěny významné rozdíly, když byly poměry 1:1, 1:5, 1:10 porovnávány s poměrem 2:1 a s negativní kontrolou. Poslední 2 dny experimentu vykazovaly všechny poměry rozdíl oproti negativní kontrole. Na druhou stranu bylo zjištěno, že procento nepoškozených akrozomů bylo po 48 hodinách výrazně sníženo ve srovnání s počátečními hodnotami, kromě negativní kontroly. Avšak od 4. dne do konce experimentu vykazovaly všechny vzorky, včetně negativní kontroly, významně nižší procento spermií s neporušeným akrozomem oproti počátku experimentu.

### **12.2.3 Osmotická rezistence spermií**

Až 7. den se snížila osmotická rezistence u poměrů 1:5 a 1:10 oproti poměrům 2:1, 1:1 a negativní kontrole. Od 8. dne od inokulace až do konce experimentu se snížila osmotická rezistence u všech poměrů ve srovnání s počátečními hodnotami. Na konci experimentu měly všechny poměry, kromě 2:1, významně sníženou osmotickou rezistenci oproti negativní kontrole. Schopnost reagovat na osmotický stres souvisí s funkčností buněk a je obecně uznávaná jako dobrý indikátor fyziologického stavu.

### **12.2.4 Motilita spermií**

#### ***Celková motilita spermií***

Významné rozdíly v procentech pohyblivých spermií byly nalezeny, když poměry 1:1, 1:5 a 1:10 byly srovnány s negativní kontrolou po 24 a 48 hodinách od inokulace. Třetí den se snížilo procento pohyblivých spermií u poměrů 1:5 a 1:10. Další den byl pozorován rozdíl mezi negativní kontrolou a poměry 1:1, 1:5 a 1:10. Sedm dnů po začátku experimentu vykazovaly pouze poměry 1:5 a 1:10 významné snížení procenta pohyblivých spermií oproti negativní kontrole. Osmý den byl pozorován rozdíl mezi poměrem 1:1 a negativním vzorkem. Devátý den měly všechny poměry nižší procento pohyblivých spermií oproti negativní kontrole, i když mezi poměry 2:1 a 1:1 a poměry 1:5 a 1:10 rozdíly nebyly. Desátý a jedenáctý den měly všechny poměry nižší procento pohyblivých spermií, oproti negativní kontrole.

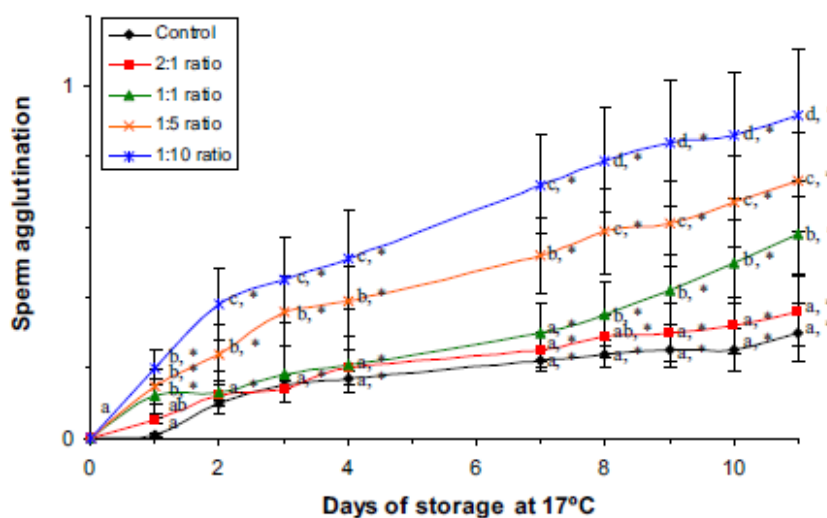
### Progresivní motilita spermíí

Po 24 hodinách od inokulace se ukázal rozdíl mezi poměry 1:1, 1:5, 1:10 a negativní kontrolou. Dva dny po začátku experimentu měly všechny poměry nižší procento progresivně pohyblivých spermíí, než negativní kontrola. V tomto dni také narostl rozdíl mezi jednotlivými poměry, kromě poměrů 2:1 a 1:1. Další dny klesalo procento pouze u poměrů 1:5 a 1:10, sedmý den začalo klesat procento i u poměru 1:1 a devátý den všechny poměry vykazovaly nižší procento progresivně pohyblivých spermíí oproti negativní kontrole. Na konci experimentu nebyly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými poměry.

### 12.2.5 Aglutinace a morfologie spermíí

V průběhu experimentu byla pozorována zvýšená míra aglutinace, zejména u nejkontaminovanějších vzorků (1:5, 1:10). Až do konce doby skladování poměry 1:1, 1:5 a 1:10 vykazovaly významně zvýšenou tvorbu aglutinace oproti poměru 2:1 a negativní kontrole. Jediným vhodným vysvětlením pro zvýšenou míru aglutinace spermíí je přítomnost fimbrií typu 1. Tyto fimbrie zprostředkovávají specifické propojení bakterie a hostitelských buněk.

Procento morfologicky normálních spermíí byl pozorován pro všechny poměry a po celou dobu skladování (viz graf č. 6) (Prieto-Martínez, Bussalleu, Garcia-Bonavila, Yeste, 2014).



Graf 6: Aglutinace spermíí vlivem *Ent. cloacae* během 11 dnů skladování při teplotě 17 °C (Prieto-Martínez, 2014)

### 12.2.6 pH

Významný rozdíl mezi poměrem 1:10 a dalšími poměry byl pozorován od 4. dne po inokulaci. V tento den vykazoval nižší pH i poměr 1:5 oproti negativní kontrole a poměrům 2:1 a 1:1 (Prieto-Martínez, Bussalleu, Garcia-Bonavila, Yeste, 2014).

## 13 Závěr

V této rešerši jsem se věnovala mikroorganismům vyskytujícím se v kančím ejakulátu a jejich dopadům na spermie. Je několik možností, jak se během umělé inseminace kontaminuje sperma. Tyto možnosti se dají rozdělit na zvířecí a nezvířecí faktory. Do nezvířecího původu se řadí kontaminovaná voda, nesterilizované pomůcky na odběr ejakulátu, špatné hygienické podmínky a kontaminace vzorků lidmi. Do zvířecích zdrojů patří fekálie, sekrety dýchacích cest, pokožka, chlupy a divertikl v předkožce, který obsahuje moč, epitelie a bakterie, a je tak významným rizikovým faktorem pro kontaminaci, proto se před odběrem ejakulátu musí vyčistit. Po odběru se do ejakulátů dávají přídavné látky, jedná se například o antibiotika, která brání přežití bakterií ve vzorcích, nebo látky vyživující spermie, které mohou zároveň vyživovat i bakterie.

Nejčastěji izolovaná bakterie z ejakulátu je *E. coli*, která způsobuje aglutinaci spermií v kontaminovaných vzorcích, snižuje pH ejakulátu, zkracuje životaschopnost spermií a snižuje jejich motilitu. Dále jsem se zaměřila na chlamydie, které nejsou tak významnými patogeny, ale i tak se vyskytují dost na to, aby byly z ekonomického pohledu důležité. Chlamydie způsobují záněty, které vedou ke snížené reprodukční výkonnosti, avšak přímo na spermie významný dopad nemají. Klostridie mají při vyšších koncentracích vliv na pH ejakulátu, životaschopnost spermií, pohyblivost a způsobují zvýšenou aglutinaci spermií. Pseudomonády mají vliv na pohyblivost, životaschopnost spermií a integritu akrozomu. Na tyto parametry mají vliv i po IVC. Poslední vybrané bakterie, enterobaktery, ovlivňují také hodnotu pH ejakulátu, životaschopnost, aglutinaci, motilitu, integritu akrozomu a také osmotickou rezistenci spermií.

Vzhledem k prokázaným negativním vlivům je důležité se vyvarovat kontaminaci ejakulátu jeho správným odběrem, manipulací, skladováním a přidáváním účinných antibiotických látek při jeho ředění. Tak se dosáhne vyšší kvality inseminačních dávek a tím pádem efektivnějšího chovu prasat.

## 14 Použitá literatura

ALTHOUSE, G. C., C. E. KUSTER, S. G. CLARK a R. M. WEISIGER. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 2000, **53**(5), 1167 - 1176.

ALTHOUSE, G. C. a L. E. EVANS. Closed resection of the preputial diverticulum in the boar. *Agri-Practise*. 1994, **15**(9), 18-21. Dostupné z doi: 10.13140/RG.2.1.3163.1526

BAKER, A. A., E. DAVIS, T. REHBERGER a D. ROSENER. Prevalence and diversity of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* among swine herds in the midwest. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, **76**(9), 2961 - 2967. Dostupné z doi: 10.1128/AEM.02459-09

BAILEY, J. L., Ch. LESSARD, J. JACQUES, Ch. BREQUE, I. DOBRINSKI, W. ZENG a H. L. GALANTINO-HOMER. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*. 2008, **70**(8), 1251-1259. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.014

BARACALDO, M. aj. WARD. Quality control of extended boar semen. *The Pig Site* [online]. 2009 [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <http://www.thepigsite.com/articles/2596/quality-control-of-extended-boar-semen/>

BARBIERI, J. T. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *International Journal of Medical Microbiology*. 2000, **290**, 381 - 387.

BARKER, A. P., A. I. VASIL, A. FILLOUX, G. BALL, P. J. WILDERMAN a M. L. VASIL. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Molecular Microbiology*. 2004, **53**(4), 1089 - 1098. Dostupné z doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04189.x

BONET, S., E. GARCIA a L. SEPÚLVEDA. The boar reproductive system. BONET, S., I. CASAS, W. V. HOLT a M. YESTE. *Boar Reproduction*. Berlin: Springer, 2013, s. 65-107. ISBN 978-3-642-35049-8.

BRESCIANI, C., C. S. CABASSI, G. MORINI, *et al.* Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. *Italian Journal of Animal Science*. 2014, **13**, 83 - 87.

BUSSALLEU, E., M. YESTE, L. SEPÚLVEDA, E. TORNER, E. PINART a S. BONET. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli*

on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2011, **127**(3-4), 176-182. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.07.018

BUSSALLEU, E., M. YESTE, E. TORNER, S. BONET, M. BRIZ a S. SANCHO. A PCR technique to detect enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* in boar semen samples. *Research in Veterinary Science*. 2012, **93**(1), 31-33. Dostupné z doi: 10.1016/j.rvsc.2011.07.012

CIORNEI, S. G., L. RUNCEANU, D. DRUGOCIU a P. ROSCA. Research and corelation between microbiological spermogram and biological parametres value extended of boar semen. *Veterinary Medicine*. 2008, **65**(2), 114 - 118. ISSN 1843-5270.

DUGUID, J. P., Isabel W. SMITH, G. DEMPSTER a P. N. EDMUNDS. Non-flagellae filamentous appendages ("fimbriae") and hemagglutinating activity in bacterium coli. *Bacteriology Department, University of Edinburgh*. 1955, **70**, 335-348.

ELEY, A., S. HOSSEINZADEH, H. HAKIMI, I. GEARY a A. A. PACEY. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Human Reproduction*. 2005, **20**(9), 2601-2607. Dostupné z doi: 10.1093/humrep/dei082

EVERETT, K. D. E., R. M. BUSH a A. A. ANDERSEN. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999, **49**, 415-440.

FRYDRYCHOVÁ, S., J. ČEŘOVSKÝ, A. LUSTYKOVÁ a M. ROZKOT. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*. 2010, **55**(4), 160-166.

GĄCZARZEWICZ, D., J. UDALA, M. PIASECKA, B. BLASZCZYK a T. STANKIEWICZ. Bacterial contamination of boar semen and its relationship to sperm quality preserved in commercial extender containing gentamicin sulfate. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2016, **19**(3), 451-459. Dostupné z doi: 10.1515/pjvs-2016-0057

GOLDBERG, A. M. G., L. E. ARGENTI, J. E. FACCIN, M. SANTI, M. L. BERNARDI, L. LINCK a M. R. I. CARDOSO. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Research in Veterinary Science*. 2013, **95**(2) 362-367. Dostupné z doi: 10.1016/j.rvsc.2013.06.022



HAMONIC, G., J. A. PASTERNAK, T. KÄSER, F. MEURENS a H. L. WILSON. Extended semen for artificial insemination in swine as a potential transmission mechanism for infectious *Chlamydia suis*. *Theriogenology*. 2016, **86**(4) 949-956. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.018

HOLLANDBECK, R. a C. M. FOLEY. Reproductive organs of boar and sow. *Animal Sciences Department: Cooperative Extension Service Purdue University Lafayette, Indiana*. 1964.

HORMAECHE, E. a P. R. EDWARDS. A proposed genus *Enterobacter*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 1960, **10**(2), 71-74.

KARAGEORGIU, M. A., G. TSOUSIS, C. M. BOSCO, P. D. TASSIS, I. A. TSAKMAKIDIS a E. D. TZIKA. A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. *Acta Veterinaria Brno*. 2016, **85**, 23-31. Dostupné z doi: 10.2754/avb201685010023

KAUFFOLD, J., F. MELZER, K. HENNING, K. SCHULZE, C. LEIDING a K. SACHSE. Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology*. 2006, **65**(9), 1750-1758. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.10.010

KELLER, R., M. Z. PEDROSO, R. RITCHMANN a R. M. SILVA. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infection and Immunity* [online]. 1998, **66**(2), 645-649 [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC113501/>

KONIDALA, U., S. NUVVULA, A. MOHAPATRA a S. V. S. G. NIRMALA. Efficacy of various disinfectants on microbially contaminated toothbrushes due to brushing. *Contemporary Clinical Dentistry* [online]. 2011, **2**(4), 302-307 [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3276857/>

KOZDROWSKI, R., Z. STARONIEWICZ a A. DUBIEL. Bacterial flora of semen of wild boar and their hybrids with domestic pig. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* [online]. 2005, **8**(2) [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue2/art-08.html>

KUSTER, C. E. a G. C. ALTHOUSE. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology*. 2016, **85**(1), 21-26. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.049

LI, J., S. SAYEED, S. ROBERTSON a B. A. MCCLANE. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type D strain CN3718. *PLoS Pathogens*. 2011, **7**(12). Dostupné z doi: 10.1371/journal.ppat.1002429

LIANG, Z., X. KANG, H. CHEN a W. GUAN. Effect of *Clostridium perfringens* enterotoxin on gastric cancer cells SGC7901 which highly expressed claudin-4 protein. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2017, **9**(4), 153-159. Dostupné z doi: 10.4251/wjgo.v9.i4.153

LONGBOTTOM, D. a L. J. COULTER. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*. 2003, **128**, 217-244. Dostupné z doi: 10.1053/jcpa.2002.0629

LYCZAK, J. B., C. L. CANNON a G. B. PIER. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*. 2000, **2**(9), 1051-1060.

MACINNES J. a F. PRESCOTT. Genome sequencing and analysis of a type A *Clostridium perfringens* isolate from a case of bovine clostridial abomasitis. *PLoS One* [online]. 2012, **7**(3) [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3297601/>

MARTÍN, L. O. M., E. C. MUNOZ, F. DE CUPERE, E. VAN DRIESSCHE, D. ECHEMENDIA-BLANCO, J. M. M. RODRÍGUEZ a S. BEECKMANS. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*. 2010, **120**(1-4), 95-104. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.03.008

MATHESIN, N., M. WEEKES a S. COGGLE. Skier's toe: traumatic onycholysis complicated by *Pseudomonas chloronychia*. *BMJ Case Reports* [online]. 2009 [cit. 2017-06-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3027736/>

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 2009, **417**. Dostupné z doi: 10.1042/BJ2008138

NAMULA, Z., Y. SATO, R. KODAMA, K. MORINAGA *et al.* Motility and fertility of boar semen after liquid preservation at 5°C for more than 2 weeks. *Animal Science Journal*. 2013, **84**(8), 600-606. Dostupné z doi: 10.1111/asj.12049

NOWELL, V. J., A. M. KROPINSKI, J. G. SONGER, Janet I. PINART, E., M. PUIGMULÉ. Factors affecting boar reproduction, testis function, and sperm quality. BONET, S., I. CASAS, W. V. HOLT a M. YESTE. *Boar Reproduction*. Berlin: Springer, 2013, s. 109-202. ISBN 978-3-642-35049-8.

PINART, E., M. YESTE a S. BONET. A comparative study of the effects of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* upon boar semen preserved in liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 2016, **177**, 65-78. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.12.007

PRIETO-MARTÍNEZ, N., E. BUSSALLEU, E. GARCIA-BONAVILA a M. YESTE. Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Animal Reproduction Science*. 2014, **148**(1-8), 72-82. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.05.008

SEPÚLVEDA, L., E. BUSSALLEU, M. YESTE a S. BONET. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2014, **150**(3-4), 96-106. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.09.001

SEPÚLVEDA, L., E. BUSSALLEU, M. YESTE a S. BONET. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on sperm capacitation and protein phosphorylation of boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2016, **85**(8), 1421-1431. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.12.025

SEPÚLVEDA, L., E. BUSSALLEU, M. YESTE a S. BONET. How do different concentrations of *Clostridium perfringens* affect the quality of extended boar spermatozoa? *Animal Reproduction Science*. 2013, **140**(1-2), 83-91. Dostupné z doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.04.013

SCHAUTTEET, K. a D. VANROMPAY. *Chlamydiaceae* infections in pig. *Veterinary Research*. 2011, **42**.

SCHIERACK, P., N. WALK, K. REITER, K. D. WEYRAUCH a L. H. WIELER. Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs. *Microbiology*. 2007, **153**(Pt 11), 3830-3837. Dostupné z doi: 10.1099/mic.0.2007/010173-0

SCHULZE, M., C. AMMON, K. RÜDIGER a M. JUNG. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*. 2015, **83**(3), 430-437. Dostupné z doi: /10.1016/j.theriogenology.2014.10.004

SCHULZE, M., M. DATHE, D. WABERSKI a K. MÜLLER. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 2016, **85**(1), 39-46. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.016

SMOLE, I., A. THOMANN, J. FREY a V. PERRETEN. Repression of common bull sperm flora and *in vitro* impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa*

introduced by contaminated lubricant. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010, **45**(4), 737-742. Dostupné z doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01319.x

SUTKEVICIENE, N., V. RISKEVICIENE, A. JANUSKAUSKAS, H. ZILINSKAS a M. ANDERSSON. Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2009. Dostupné z doi: 10.1186/1751-0147-51-53

TEANKUM, K., A. POSPISCHIL, F. JANETT, E. BURGI *et al.* Detection of *chlamydiae* in boar semen and genital tracts. *Veterinary Microbiology*. 2006, **116**(1-3), 149-157. Dostupné z doi: 10.1016/j.vetmic.2006.03.021

ÚBEDA, J. L., R. AUSEJO, Y. DAHMANI, M. V. FALCETO, A. USAN, C. MALO a F. C. PEREZ-MARTINEZ. Adverse effects of members of the *Enterobacteriaceae* family on boar sperm quality. *Theriogenology*. 2013, **80**(6), 565-570. Dostupné z doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.05.022

WANG, P., T. MORI, K. KOMORI, M. SASATSU, K. TODA a H. OHTAKE. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, **55**(7), 1665-1669.

WASILEWSKA, K., L. ZASIADCZYK, L. FRASER, M. MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA a W. KORDAN. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*. 2016, **51**(5), 791-799. Dostupné z doi: 10.1111/rda.12751

WOLFF, H., A. PANHANS, W. STOLZ a M. MEURER. Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertility and Sterility*. 1993, **60**(1).