

MODEL SARADNJE REPRO-CENTARA I LABORATORIJE ZA REPRODUKCIJU U KONTROLI KVALITETA SEMENA NERASTOVA

**Aleksandar Milovanović¹, Tomislav Barna¹,
Dubravka Milanov¹, Miodrag Lazarević²**

¹ Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

² Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Kratak sadržaj

U ovom radu su opisani postupak i rezultati kontrole kvaliteta semena nerastova u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ na osnovu kontinuirane saradnje sa farmskim centrima za proizvodnju semena nerastova. U analizi kvaliteta semena je korišćena kompjuterska analiza (CASA-computer assysted sperm analysis), protočna citometrija i cito-morfološki pregled. Odabrani parametri kvaliteta semena su upoređivani sa reproduktivnim parametrima krmača kao što su oprasivost, broj prasadi po leglu, odnos živorođene i mrtvorodne prasadi. Ocena kvaliteta semena na osnovu progresivne pokretljivosti, koncentracije spermatozoida, morfoloških odlika i oštećenja hromatina je korišćena za davanje preporuka o načinu pripreme semena, određivanje stepena razređenja ili sprovođenje eventualne terapije nerastova, odnosno, njihovog isključenja iz priploda. Ove analize semena se dopunjavaju sezonskim bakteriološkim pregledom i kontrolom u slučaju pada kvaliteta semena. Za svakog nerasta je otvorena kartoteka kvaliteta semena sa grafičkim prikazom i reproduktivnim pokazateljima, radi lakšeg praćenja. Kontinuirana sistematska analiza kvaliteta semena, kombinovana sa više savremenih metoda, dopunjena povremenim bakteriološkim pregledom, daje mogućnost pouzdane procene kvaliteta semena nerastova.

Ključne reči: nerastovi, reprodukcija, seme

MODEL FOR COOPERATION BETWEEN BOAR STUDS AND LABORATORIES FOR REPRODUCTION IN BOARS' SEMEN QUALITY CONTROL

Aleksandar Milovanović¹, Tomislav Barna¹,
Dubravka Milanov¹, Miodrag Lazarević²

¹ Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

² Faculty of veterinary medicine University of Belgrade

Abstract

In this article we presented procedures and results of boar semen quality control performed at the Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" based on continuous cooperation with the farms' centers for boar semen production. The data obtained by computer analysis (CASA-computer assisted sperm analysis), flow cytometry and cyto-morphologic examination were used for semen quality evaluation. The selected parameters were compared with the reproductive results in sows, such as: farrowing rate, number of piglets per litter, ratio of piglets born alive and stillborn piglets). Semen quality evaluation based on spermatozoa progressive motility, sperm concentration, morphological characteristics and chromatine structure damage were used to give recommendations for semen processing, dilution degree, prospective therapy of boars, or, at least, their culling. Analysis of semen was complemented with seasonal bacterial cultivation and controls in cases of sudden drop on semen quality. Separate files containing semen quality graphs and reproductive indicators for easier monitoring were created for every boar. Systematic semen analyses performed by the use of several modern methods, along with periodic bacteriological control, offer possibilities for reliable assessment of boars' semen quality.

Key words: sperm quality, boar, reproduction

Uzimanje sperme nerasta i proizvodnja semena za veštačko osemenjavanje krmača i nazimica vrši se u centrima za veštačko osemenjavanje, farmskim centrima, manjim reproduktivnim centrima u privatnom vlasništvu ili u vlasništvu udruženja (asocijacija) odgajivača svinja. Zastupljena je i proizvodnja semena od strane veterinarskih i paraveterinarskih službi, kao i nekontrolisani prirodni pripust. Sa stanovišta intenzivne proizvodnje, centri za v.o. i farmški centri dominantni su nosioci genetskog i tehnološkog napretka i po pravilu, iskazuju volju za primenu tehnoloških inovacija.

U našoj zemlji ne postoji definisan pravilnik o kvalitetu semena, obaveznoj

povremenoj eksternoj kontroli kvaliteta proizvedenih doza semena nerasta i obaveznoj proizvođačkoj deklaraciji na pakovanju semena nerastova.

Većina svinjarskih farmi ima zatvoren sistem proizvodnje i potrošnje semena u okviru svojih organizacionih jedinica. Analize se, i u ovim slučajju, uglavnom sprovode u eksczesnim situacijama, kada je kvalitet semena kod značajnijeg broja nerastova loš, a seme neupotrebljivo. Rukovodstvo na većini velikih komercijalnih svinjarskih farmi često nema jasnu viziju o značaju i potrebnim merama kako bi se obezbedila kvalitetna proizvodnja semena. Tako su objekti za nerastove, uglavnom, direktno povezani sa tovilištima, bukarištima, bez ograničavanja i kontrole ulaza radnika i nezaposlenih lica u centre. Probleme kvaliteta semena centri rešavaju novonabavljenim, skupim uvoznim nerastovima koji se smeštaju u prostorije sa priplodnim grlima iz sopstvene proizvodnje. Ova grla su često opterećena određenim infektivnim oboljenjima koja kod uvezenih grla nisu postojala. Upravo iz tog razloga, nerastovi iz uvoza za kratko vreme obole od domicilnih virusnih i bakterijskih bolesti, izazvanih bilo specifičnim ili ubikvitarnim mikroorganizmima. Unakrsna infekcija je praktično neizbežna. Oboljenja, po pravilu, dovode do smanjenja kvaliteta semena, plodnosti, a često i do isključenja iz dalje proizvodnje. Oscilacije u ishrani, plesniva hrana, prisustvo mikotoksina u proizvodnim šaržama za nerastove, nisu retkost na našim farmama.

Higijena držanja priplodnih nerastova i proizvodnja semena često nisu na zadovoljavajućem nivou. Neophodno je prilagođavanje tehnologije razređivanja i pakovanja semena u jednokratne, plastične bočice kako bi se naknadna kontaminacija svela na najmanju moguću meru. Priručne laboratorije na farmama ponekad nemaju opremu za određivanje broja spermatozoida (fotometri, denzitometri), tako da se razređenje sperme radi iskustveno, na osnovu subjektivne procene, neracionalno i nekvalitetno. Sve ove okonolosti zbirno dovode do toga da je prosečna oplodnja krmača ispod 80%, do malog broja oprasene prasadi po leglu, neujednačenih legala i povećanog broja mrtvorodne prasadi. Nerastovi bez kvalitetne kontrole sperme se uključuju u eksploataciju, pa tek nakon učestalih povodažanja krmača, manjeg broja prasadi u leglu i nakon dužeg perioda isključe iz priploda, mada su uvezeni kao elitna priplodna grla i skupo plaćeni.

Nasuprot ovome, progresivna rukovodstva farmi (tzv. „menadžment“), donose dugoročne planove i programske ciljeve za priplodne nerastove koji su iznad nominalnih zahteva važećih Pravilnika. Stroge higijenske mere i putevi kretanja ljudi i opreme su na ovim farmama deo standardne operativne prakse. Upravo su takve farme orijentisane ka daljem unapređenju poslovanja kroz bolju kontrolu kvaliteta semena koju pruža savremena laboratorijska dijagnostika.

Kontrola kvaliteta semena u veterinarskoj medicini ima dugu istoriju i evoluciju kroz brojne metode ispitivanja. Tradicionalne - klasične metode ispitivanja podrazumevaju određivanje progresivne pokretljivosti, vitalnosti, koncentracije i morfologije spermatozoida. Podaci iz literature (Graham i sar., (1980); Amann (1989); Quintero-Moreno i sar., (2004); Didion (2008)), ukazuju da su ovi parametri u različitoj korelaciji sa plodnošću, od $r=0,06$ do $r=0,86$, i da ni jedan od ovih testova nije u konzistentnoj korelaciji sa plodnošću. Amann (1989) je ove razloge grupisao: na nedostatak pouzdanih povratnih informacija o plodnosti nerastova, složenu fiziologiju semena, a delom i na netačnost *in vitro* analiza. Amann i Hammerstedt (1993) čak navode da se uključivanjem većeg broja testova dolazi do podataka o sve manjem procentu spermatozoida koji su u mogućnosti da oplode jajnu ćeliju. Juonala i sar. (1998) preporučuju da se veličina legla kod prvopraskinja ne uzima u obzir prilikom procene kvaliteta semena, usled brojnih sporednih uticaja na oprasivost.

Postoje Neki parametri kvaliteta semena koji se mogu kompenzovati povećanjem broja spermatozoida u dozi. Suprotno ovome, priplođnjaci sa ejakulatima slabije plodnosti kod kojih se nedostaci ne mogu kompenzovati ili poboljšati povećanjem broja spermatozoida u dozi, uglavnom se teže otkrivaju. Mehanizam njihove slabije plodnosti je verovatna posledica slabijeg vezivanja spermatozoida za jajnu ćeliju i/ili održivosti embriona tokom razvoja (Saacke i sar., 1994). Prema tome, potrebna su dalja istraživanja na ćelijskom i molekularskom nivou, kako bi se i takve jedinice uočile (Evans, 1999). Jedan od tih metoda odnosi se na test strukture hromatina (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA). On pruža informacije o statusu DNK i njegovom uticaju na plodnost (Evenson, 1999).

Dakle, za konzistentan i efikasan rad na tehnologiji proizvodnje sperme nerastova za veštačko osemenjavanje je potrebno više faktora: sofisticirana oprema, iskustvo, dovoljna frekvencija uzoraka na mesečnom (godišnjem) nivou kroz redovnu kontrolu semena, redovno atestiranje instrumenata, konstantna revizija plodnosti nerastova (povratne informacije), dobra saradnja laboratorije i terena, kao i upornost u iznalaženju konačnog rešenja aktuelnog problema.

Postupak kontrole kvaliteta semena nerasta kontinuiranim laboratorijskim nadzorom (ugovornom saradnjom farme sa Institutom)

Farme sa kontinuiranim nadzorom kvaliteta semena treba da dostavljaju uzorke na analizu u intervalima od 1,5-2 meseca. Uzorci se dopremaju u frižider x-xtorbi na $+17^{\circ}\text{C}$, u kome se čuvaju do kraja analize (1-7 dana). Po dopremanju, uzorci se evidentiraju na prijemnom odeljenju kroz jedinstveni

broj protokola, usaglašava se stanje uzoraka sa zahtevom za ispitivanje i oni se usmeravaju na ispitivanje, u zavisnosti od potreba. Status uzoraka (da li je ispitivanje završeno) može se prekontrolisati i na elektronskoj stranici Instituta upisom broja protokola.

U Laboratoriji za reprodukciju za rutinski pregled semena koji se radi u sklopu kontinuiranog nadzora kvaliteta, odabrane su sledeće tehnike:

- kompjuterska analiza semena (ISAS / - Integrirani sistem za analizu semena, Proiser, Španija) kojom se određuje koncentracija, ukupna i progresivna pokretljivost spermatozoida, progresivna i neprogresivna pokretljivost, udeo brzih, srednje brzih, sporih i nepokretnih spermatozoida (% i koncentracija spermatozoida u 1 ml i njihov broj u dozi);
- protočna citometrija (Guava Milipore-IMV, SAD) na test integriteta membrane akrozoma i membrane spermatozoida (kombinacija fluorometrijskih boja PNA-FITC i propidijum jodida) i ispitivanje strukture hromatina (SCSA, sa akridin narandžastim);
- citološko-morfološki pregled supravitalno obojenog razmaza semena eozin-nigrozinom po Blomu obuhvata odnos živih i mrtvih, nalaz intaktnih akrozoma, protoplazmatskih kapljica i ukupnih patoloških formi spermatozoida.

Seme se na osnovu citološko-morfološke klasifikacije prema Jovičinu i sar. (1997), oštećenja hromozoma prema Evensonu i sar. (2002) i na osnovu interne klasifikacije prema broju progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi (CASA) svrstava u I, II, III klasu ili „van klase“.

Doze se odbacuju (ocenjene kao „van klase“) u sledećim situacijama: CASA parametri / - ukupna pokretljivost spermatozoida <60%, progresivna pokretljivost ispod 30%, aglutinirani – slepljeni spermatozoidi preko 40%); protočna citometrija-integritet membrane <30%, oštećenje akrozoma >30%); i parametri dobijeni prilikom citološko-morfološkog pregleda - ukupno živi spermatozoidi <60%, živi spermatozoidi sa intaktnim akrozomom <40%, oštećen akrozom >30%, protoplazmatska kapljica (>25%*10%?) ili ukupno abnormalnih formi spermatozoida >40%). U pojedinim slučajevima savetuje se kompenzacija lošeg kvaliteta semena povećanjem broja spermatozoida u dozi. * Althouse G. C. (1998): **Cytoplasmic droplets on boar sperm cells** *Swine Health and Production*, 6, 3, 128. (<http://www.aasp.org/shap.html>).

Značaj pojedinačnih ocena je različit i o tome treba voditi računa pri formiranju konačne ocene i izradi konačnog razređenja. Dobijene vrednosti su upoređene u odnosu na oprasivost, broj prasadi u leglu, odnos živorođene i mrtvorodene prasadi, prema vremenskim blokovima koji su najpribližniji intervalima analize. Time je olakšan rad na ispitivanju uticaja promene kvaliteta semena i sezone na reproduktivne pokazatelje plotkinja.

Suštinski pokazatelj kvaliteta semena odnosi se na broj spermatozoida u dozi koji može da se svrsta u pul spermatozoida sposobnih da svojom kinetikom doputuju do jajnih ćelija, da ih oplode i obezbede normalan razvoj embriona. Zbog toga je korekcija u stepenu razređenja koristan pokazatelj kako za racionalnu proizvodnju semena, tako i za kontrolu postupka razređivanja semena na farmi. Ukoliko je progresivna pokretljivost spermatozoida zadovoljena, onda morfološki pokazatelji određuju dalju kvalifikaciju semena. Prisustvo malformacija u većem procentu („knobbed“ tzv. „dugmasti“ akrozom, nuklearne vakuole, blago-jednostavno savijen spojni deo, protoplazmatične kapljice, pogotovo proksimalne), dokazani su indikatori koji nepovoljno utiču na kvalitet semena i oplodnu sposobnost (Thundathil i sar., 2000; Kopp i sar., 2008; Thundathil i sar., 2001).

Prvi znaci pogoršanja kvaliteta sperme uočavaju se na citološko-morfološkom pregledu i na osnovu njih se može predvideti razvoj kasnijih promena u pokretljivosti i oplodnoj sposobnosti. Procenat oprasivosti ne mora biti u korelaciji sa brojem spermatozoida i jasnim odrazom kvaliteta semena, ukoliko se koristi veći broj spermatozoida (preko 5 milijardi/dozi, odnosno, progresivno pokretljivih od 2,5 milijardi, Milovanović i sar., 2011), Ovim čime se može prevazići veći deo problema u kvaliteta semena. Za dobijanje validnih podataka o plodnosti koji su u korelaciji sa laboratorijskim rezultatima kod veštačkog osemenjavanja, neophodno je da se koristi „kritičan broj spermatozoida“. Ovaj izraz podrazumeva ukupan broj spermatozoida koji dozi daje prepoznatljiv kvalitet ili kombinaciju kvaliteta koji će biti podložni menjanju usled delovanja drugih faktora koji nisu vezani za koncentraciju (Amann, 1986). Npr., uticaj kvaliteta spermatozoida u manjim dozama, od 1-1,5 milijardi spermatozoida pri plitkom, cervikalnom uvođenju katetera kod osemenjavanja je znatno izraženiji, jer je kompenzacija viškom spermatozoida u dozi manje izražena.

Detekcija oštećenja membrane i akrozoma spermatozoida protočnom citometrijom daje preciznije vrednosti za ocenu njihove strukture u odnosu na citološko-morfološku analizu. Akrozomi su osetljivije strukture u odnosu na membranu spermatozoida kod nerastova (obrnut slučaj je kod bikova). Nerastovi sa „osetljivim“ akrozomom prepoznaju se po većem stepenu oštećenja akrozoma na protočnoj citometriji, te se takvi nerastovi nalaze na posebnoj listi (tzv. „lista nerastova osetljivog akrozoma“), koja služi personalu na farmi da vrši razređenja u više koraka, što postepenije.

Sledeći nivo ispitivanja odnosi se na određivanje strukture hromatina (SCSA), koji ukazuje na nepotpuno sazrevanje spermatozoida. Ono može biti posledica postojanja niza fizioloških ili faktora spoljašnje sredine (Martinez, 2005). U poslednjoj dekadi, prikupljeni su podaci o rezultatima plodnosti semena ljudi i životinja koji ukazuju da fragmentacija-degeneracija DNK sper-

matozoida ima negativni uticaj na plodnost i broj potomaka kod pluriparih životinja (Evenson i sar., 2002). Ovaj pokazatelj nije povezan sa pokretljivošću spermatozoida. U humanoj andrologiji, SCSA se navodi kao jedini metod koji je demonstrirao jasne i klinički korisne granične vrednosti za oplodnu sposobnost spermatozoida čoveka. SCSA je standardizovan test i vrši se u skladu sa strogim protokolom, određenim posebnim softverom za analizu i obradu podataka sa protočnog citometra (SCSA-Soft). Srednje SCSA vrednosti u analizi 40 mladih nerastova ukazale su na relativno visok stepen oštećenja hromatina, pri čemu je 20% priplodnjaka imalo više od 15% spermatozoida sa oštećenim hromatinom (Milovanović i sar., 2012). Waberski i sar., (2011) su analizirali 692 uzorka semena od 79 nerastova i to na dan uzimanja. Prosečna vrednost oštećenja hromatina je iznosila 2,6%, sa oscilacijama od 0,2 do 48,8%. Boe-Hansen i sar., (2008) tvrde da oštećenja hromozoma preko 2,1% već ispoljavaju negativne efekte na broj živorođene prasadi, dok oštećenja od preko 20% daju legla sa najviše 6,4 prasadi. Prema tome, oštećenje hromozoma u blažem stepenu, ukazuje na mogućnost smanjenja broja oprašene prasadi ali ne na uspeh koncepcije, što je za napredne farme od izuzetnog značaja.

Kvalitet semena se na kraju, određuje na osnovu broja pokretljivih i progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi. U zavisnosti od tehnologije rada na farmi, načina osemenjavanja, broja osemenjavanja po proizvodnoj seriji, vrste i kvaliteta razređivača, dužine čuvanja doze i higijene proizvodnje semena, za pojedinačne farme se podešavaju granične, „sigurnosne“ vrednosti za broj spermatozoida u dozi (Prikaz parametara u Tabeli 1.). Po potrebi se rade i kontrola kvaliteta semena u dugotrajnim razređivačima.

Tabela 1. Prikaz mogućih vrednosti za klasiranje razređenog semena nerastova

Ispitivana () karakteristika	Moguće vrednosti:		
	I klasa	II klasa	III klasa
Ukupan broj spermatozoida u dozi (109)	³ 5,0	4,9-3,0	2,9-2,0
Ukupan broj pokretljivih spermatozoida u dozi (109)	³ 3,5	3,4-2,5	2,4-1,5
Ukupan % pokretljivih spermatozoida	³ 90%	80-89%	60-79%
% progresivno pokretljivih (pp) spermatozoida	³ 50%	49-40%	30-39%
Ukupan broj p.p. spermatozoida u dozi (109)	³ 2,5	2,4-1,5	1,4-1,0

Na dvomesečnom nivou napravljena je rang lista nerastova na osnovu kvaliteta semena. Sperma nerastova prve klase „trpe” veća razređenja, u komercijalnoj proizvodnji, dok se za visokovredne nerastove slabog kvaliteta native sperme posebno podešava režim razređivanja i korišćenja.

Svaki nerast treba da ima otvoren karton sa svim analiziranim parametrima kvaliteta semena (Slika 1.). U karton se unose i podaci o osemenjavanju nazimica i krmača (oprasivost, veličina legla, broj živih i mrtvih prasadi po leglu). Svaku analizu prati kratak komentar operatera na farmi, ocena iz laboratorije Instituta, nalaz, sugestija, androloški nalaz i prognoza. Komentar se pojavljuje nanošenjem kursora na polje za komentar. Karton prati i grafički prikaz pokretljivosti spermatozoida i grafikon o koncentraciji spermatozoida u dozi (ukupan broj, broj pokretljivih i broj progresivno pokretljivih spermatozoida, Slika 2.).

Kartoni se, nakon svake završene analize, elektronskom poštom razmenjuju sa farmom, tako da su stalno ažurirani (od strane Instituta sa podacima o kvalitetu semena, od strane farme sa podacima o oprasivosti).

U slučaju pada vrednosti parametara kvaliteta semena (pre svega CASA i citološko-morfoloških), pristupa se bakteriološkoj kontroli native sperme i razređenog semena. Utvrđuje se broj izraslih kolonija u 1 ml (cfu/ml), vrši se tipizacija bakterija i određuje osetljivost na antibiotike. Podaci o nativej spermi ukazuju da li je nerast primarni uzrok bakterijske kontaminacije, dok broj bakterija u razređenom semenu ukazuje na tehnologiju proizvodnje, na mogućnost naknadne kontaminacije kao i na eventualnu rezistenciju bakterija iz razređenog semena na antibiotike razređivača. Po potrebi, može se ispitati destilovana voda, uzeti bris sa laboratorijskog posuđa, pa i sa ruku radnika, radi utvrđivanja izvora kontaminacije. (nov red, čitav pasus ide napred, posle tri pasusa bakteriologije)

Morfološke promene na spermatozoidima mogu da ukažu da li su patološke forme nastale kao posledice problema stvaranja spermatozoida (u toku spermatogeneze, testisi) ili u toku maturacije (spermiogeneza, epididimis). Kristalografija seminalne plazme (fern test), njen hemijski sastav i pH mogu ukazati da li se radi o upali akcesornih polnih žlezda.

Uzorci za bakteriologiju se kultivišu na Columbia agaru obogaćenom sa 5% eritrocita ovna (Oxoid, Basingstoke, UK), MacConkey agaru (Oxoid, Basingstoke, UK) i Sabouraud dekstroza agaru (Torlak, Srbija). Ploče se inkubiraju tokom 72h na 37°C pod aerobnim uslovima.

Određivanje broja bakterija u mililitru (cfu/mL) određuje se brojanjem izraslih kolonija nakon serija desetostrukih razređenja. Osetljivost bakterijskih izolata određuje se disk difuzionom metodom na Mueller-Hinton agaru (Oxoid, Basingstoke, UK).

Obimna kontaminacija saprofitskim bakterijama ukazuje na neophodnost promene pojedinih postupaka u tehnologiji uzimanja i pripreme semena. Ukoliko je izvor kontaminacije iz polnih organa nerastova i ukoliko je morfologija semena očuvana ili su promene blažeg oblika, preporučuje se kratkotrajna antibiotska i potporna terapija, kao i promena razređivača, koji svojim sastavom i kvalitetom omogućuje bolju i dugoročniju kontrolu bakterijske kontaminacije i produženje vitalnosti semena (Suwimonteerabutr i sar., 2011; Dahmani i sar., 2012) ili se sugeriše kratkotrajno čuvanje semena (1-2 dana).

U krajnjem ishodu, ukoliko je nutritivna, vitaminsko-mineralna potpora i antibiotska terapija dovela do nedovoljnog pomaka u kvalitetu native sperme, sugeriše se blagovremena zamena nerasta. U slučaju nalaza visokog stepena degenerativnih promena, potreba za dugom i neizvesnom terapijom, zamena nerastova predstavlja razumno rešenje.

Na posletku, saradnja nerastovskih reprodukcijских centara i laboratorije za reprodukciju podrazumeva i usluge koje se odnose na testiranje mladih, uvoznih nerastova neposredno nakon izlaska iz karantina, s obzirom na njihovu cenu i povećanu osetljivost u periodu aklimatizacije (Jovičin i sar., 2003.; Jovičin i sar., 2008; Milovanović i sar., 2012). Životinje se uvoze u pubertetu kada oplodnu sposobnost njihove sperme nije moguće utvrditi. Nakon procedura ispitivanja u karantinu, nerastovi ulaze u eksploataciju, pa se tek tada može proceniti njihova oplodna sposobnost. Potrebno je izvršiti najmanje 3 uzastopne kontrole sa razmakom od po 1,5 mesec (50 dana traje ciklus spermatogeneze), kako bi se mladi nerast mogao validno oceniti, odnosno uložiti reklamacija. Na osnovu izvršenih analiza i priložene dokumentacije moguće je izvršiti reklamaciju nerastova čija nativna sperma/razređeno seme ne zadovoljava tehnološke normative. Uvozniku se dostavljaju uniformisani CASA izveštaji na srpskom i engleskom jeziku kao i druge potrebne laboratorijske izveštaje (foto dokumentacija, film o pokretljivosti spermatozoida).

ZAKLJUČAK

Napredak kompjuterske tehnike i njeno uvođenje u andrologiju omogućava automatizam u radu sa semenom, analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu, isključenje subjektivnosti metode, veliku brzinu ispitivanja, visoku ponovljivost i analitičnost. Kompjuterska analiza pokretljivosti spermatozoida ocenjuje kinetiku spermatozoida na veoma sofisticiran način.

Protočnom citometrijom je moguće analizirati integritet membrane akrozoma i membrane spermatozoida, strukturu hromatina i status fosfolipidne ovojnice, kao i morfološko i funkcionalno stanje membrana organela i prisustvo odvojenih odeljaka (*»kompartmana«*).

Sistematska analiza semena sa primenom većeg broja metoda, dopunjena povremenim bakteriološkim pregledom, daje mogućnost pouzdane procene kvaliteta semena nerastova.

Jasno je da usvajanje, usavršavanje i standardizacija laboratorijskih metoda za kontrolu oplodne sposobnosti sperme treba da predstavljaju prioritet savremenih laboratorija za andrologiju. Proizvođači semena, bilo da proizvode seme za internu upotrebu ili za prodaju trećem licu, dužni su da obezbede seme sa tehnološki prihvatljivim i unapred definisanim parametrima kvaliteta i predvidljive (očekivane) oplodne sposobnosti.



НАУЧНИ ИНСТИТУТ ЗА ВЕТЕРИНАРСТВО
"НОВИ САД"
21000 NOVI SAD, Ручемачки пут 20
☎ 021-4895-318, 4895-319, факс: 021-518-544; E-mail: niv@niv.v.s.rs



Страна: 1 од 1

РЕЗУЛТАТИ ПРЕГЛЕДА СЕМЕНА НЕРАСТА И РЕЗУЛТАТИ ОСЕМБЕЊАВАЊА

Фарма: "Напредак" А.Д. Место: Стара Пазова Адрес: Голубиначки пут 66

Теговир број нераста: 2591 DD

Раса: DD Датум рођења: 27.05.2010. године

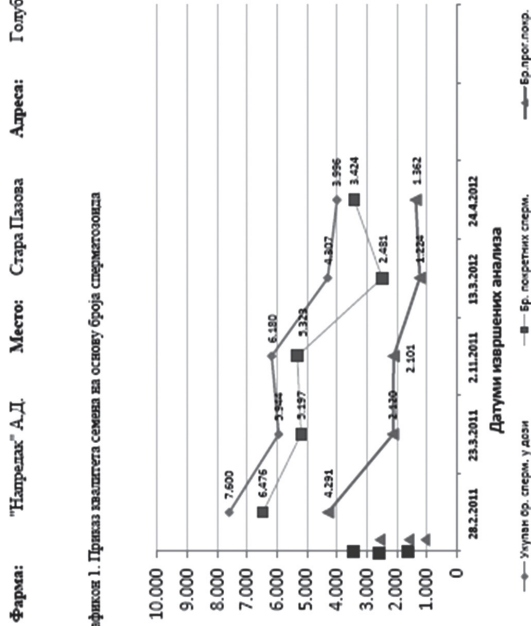
Датуми (изгрепи контроле семена)	Запам ејаксу- лага	Број прова дола	% прова (лап)	% ЖИВ (лап)	% ОА (лап)	% ЦиФ	Број сперм. дола	Број сперм. (лап)	Број репак (лап)	Укупна бр. покр. сп. (лап)	Укупна бр. прова прог. покр. (лап)	Класа семена	Препор. бр. дола	Коментар	Репродуктивни показатељи код: К-хрмата; Н-назопа			
															Бр. В.О. К. и Н	Бр. опр- шних К. и Н (%)		
28.2.2011	184.0	22.0	6.6	83.0	76.0	7.899,6	64,8	61,765	85,29%	42,9	4.280,7	1. класа	37,8		олажен	К-#####	Н-#####	
29.2.2011	834,0	10,2	1,8	98,2	85,7	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	1. класа	18,5			К-#####	Н-#####	
29.3.2011	148,0	7,7	1,5	98,5	89,7	5,944,0	52,0	5,197,3	87,4%	31,2	2.129,3	1. класа	14,5			К-#####	Н-#####	
до 02.11.11	3138,1	10,5	1,9	98,1	86	5	5	5	5	5	5	1. класа	8,7		ОК	К-#####	Н-#####	
2.11.2011	138,0	16,0	0,6	70,6	61,8	6.179,9	83,2	5.232,4	86,1%	21,0	2.100,9	1. класа	13,4		ОК	К-#####	Н-#####	
до 12.03.12	2895,3	10,6	1,3	98,7	88	7	7	7	7	7	7	1. класа	8,7			К-#####	Н-#####	
13.3.2012	146,0	20,0	4,0	83,6	43,1	4.306,9	24,8	2.480,7	57,6%	28,4%	12,2	III класа	9,8		спорова	К-#####	Н-#####	
до 23.04.11	178,5	12,7	1,3	98,7	85	49	2	15	27	1	28	1. класа	5,7		П класа	К-#####	Н-#####	
24.4.2012	114,0	18,0	4,8	79,5	40,0	3.996,3	34,2	3.423,8	85,7%	34,1%	13,6	III класа	9,8		Dobol	К-#####	Н-#####	
до 28.08.11	1.552,8	14,8	1,5	98,5	88	78	3	7	3	3	3	1. класа	7,6			К-#####	Н-#####	
до 28.08.11	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####
до 28.08.11	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####
Просек:	148,0	13,6	6,6	78,5	56,1	5.605,3	45,8	4.580,3	80,4%	37,7%	22,2	2219,6	17,0			К-#####	#DIV/0!	
Просек:	2528,8	#####	#####	9,6	86	72	1	8	7	0	9	#####	9,9			Н-#####	#DIV/0!	

Испитивна вредност	Метода испитивања	Испитивна карактеристика	Метрија вредности:			Испитивна карактеристика	Метода испитивања	Метрија вредности:		
			1. класа	II класа	III класа			1. класа	II класа	III класа
Испитивна помоћу CASA система (Comline Assisted Sperm Analysis)	Број сперматозоида у дози (у милијардама)	Укупна бр. покретних сперм. у дози (у милијардама)	≥ 2,0	4,9-3,0	2,9-2,0	Национални стандарди	Национални стандарди	≥ 90%	80-89%	60-79%
			≥ 2,5	3,4-2,5	2,4-1,5			≥ 80%	66-79%	40-45%
			≥ 29%	80-89%	60-79%			≥ 60%	46-59%	40-45%
Испитивање проточном цитометријом	Процент мобилних сперматозоида са осетљивим хромозомима	≥ 2,5	4,9-4,0	3,0-3,8%	Национални стандарди	Национални стандарди	≥ 10%	11-20%	21-30%	
		≥ 2,5	2,4-1,5	1,4-1,0			≥ 10%	11-20%	21-30%	
		≥ 20%	50-69%	30-46%			≥ 5%	6-10%	11-15%	
Испитивање проточном цитометријом	Процент мобилних сперматозоида са осетљивим хромозомима	≥ 1,9%	11-20%	21-30%	Национални стандарди	Национални стандарди	≥ 5%	6-10%	11-15%	
		≥ 1,9%	16-24%	25-30%			≥ 5%	6-10%	11-15%	
		≥ 1,9%	16-24%	25-30%			≥ 5%	6-10%	11-15%	

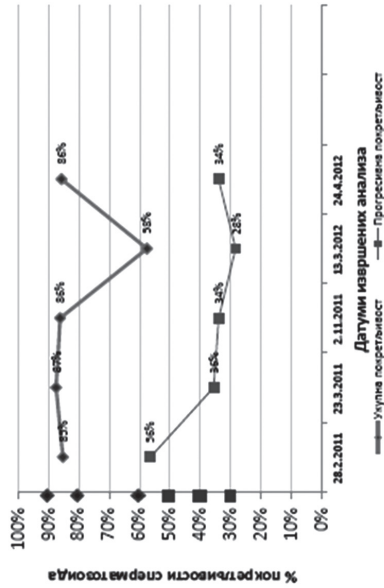
Slika 1. Karton nerasta sa analiziranim parametrima kvaliteta semena i граничним vrednostima za pojedine ocene

 <p>Страна: 1 од 1</p>	<p>НАУЧНИ ИНСТИТУТ ЗА ВЕТЕРИНАРСТВО "НОВИ САД" 21000 NOVI SAD, Руменачки пут 20 ☎ 021/4895-318, 4895-319, Факс: 021/518-544, Е-mail: niv@niv.ns.ac.rs</p>
	<p>РЕЗУЛТАТИ ПРЕГЛЕДА СЕМЕНА НЕРАСТА И РЕЗУЛТАТИ ОСЕМЕЊАВАЊА</p> <p>Фарма: "Напредак" А.Д. Место: Стара Палова Адрес: Голубиначки пут 66</p> <p>Тетовир број нераста: 2591 DD Раса: DD Датум рођења: 27.05.2010. године</p>

Грaфикон 1. Приказ квалитета семена на основу броја сперматозоида



Грaфикон 2. Приказ квалитета семена на основу покретљивости



Слика 2. Картон нераста са графичким приказом покретљивости сперматозоида и концентрација сперматозоида у дози (укупан број, број покретних и број прогресивно покретних сперматозоида)

Знања ауторитетне: др. сав. вет. мед. Александар Димитријевић и др. вет. - специј. Голубиначки Бурга

LITERATURA

1. Amann P.R.: Potential of a Seminal Sample Be Predicted Accurately? *J Androl*, 10, 2, 89-98, 1989.
2. Amann R.P., Hammerstedt R.H.: In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, 14, 397-406, 1993.
3. Amann R.P.: Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ Health Perspect*, 70, 149-58, 1986.
4. Boe-Hansen G.B., Christensen P., Vibjerg D.: Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology* 69 728-36, 2008.
5. Didion B.A.: Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenology*, 70, 1374-6, 2008.
6. Dahmani Y., Ausejo R., Malo C., Ubeda J.L.: New medium for bacterial contamination control of porcine ejaculated, *Reprod Dom Anim* 47, Suppl. 3, 90-123, 2012.
7. Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K.: Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques, *J Androl*, 23, 25-43, 2002.
8. Graham E.F., Schmehl K.L., Nelson D.S.: Problems with laboratory assays. In: *Proc 8th Tech Conf AI and Reprod. Milwaukee, Wis: NAAB*, 1980
9. Jovičin M., Nemeš Ž., Boroš I., Jakovljević G., Kašić M., Salma J., Glavonić L.: Steonost krava u zavisnosti od citološkog i mikrobiološkog kvaliteta zamrznutog semena bikova, *Zbornik naučnih radova PKB Agroekonomik*, 329-39, 1997.
10. Saacke R.G., Nadir S., Nebel R.L.: Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41, 45-50, 1994.
11. Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O.P., Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic, *Hum Reprod*, 14, 4, 1039-49, 1999.
12. Jovičin M., Milovanović A., Stančić B., Došen R., Barna T.: Uticaj aklimatizacije i životnog doba na kvalitet sperme uvoznih nerastova. *Arhiv veterinarske medicine*, 69-83, 2008,
13. Jovičin M., Stančić B., Đisalov D., Milanov D., Milovanović A., Došen R.: Značaj bakteriološke i citološko-morfološke analize sperme uvoznih i domaćih nerastova. U: *Zbornik radova i kratkih sadržaja 15. Savetovanje veterinarara Srbije, Zlatibor 09-13.09.2003*, 358, 2003.

14. Juonala T., Lintukangas S., Nurttila T., Andersson M.: Relationship Between Semen Quality and Fertility in 106 AI-Boars, *Reprod Dom Anim*, 33, 155-8, 1998,
15. Kopp C., Sironen A., Ija R., Taponen J., Vilkki J., Sukura A., Andersson M., Infertile Boars with Knobbed and Immotile Short-tail Sperm Defects in the Finnish Yorkshire Breed, *Reprod Dom Anim* 43, 690-95, 2008.
16. Martínez F.A.: Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract, doktorska teza, Univerzitet veterinarske medicine, Hanover, Nemačka, 2005.
17. Milovanović A., Barna T., Vasiljević T., Milanov D., Bošković N.: Uvoz nerastova- kontrola semena i mogućnost reklamacije U: 10 savetovanje zdravstvene zaštite, selekcije i reprodukcije svinja, *Srebrno jezero*, 79-87, 2012.
18. Quintero-Moreno A., Rigau T. & Rodriguez-Gil J.E.: Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*, 61, 673-90, 2004.
19. Suwimonteerabutr J., Thuwanut P., Singlor J., Chatdarong K., Tummaruk P.: Effect of Collection Extender (Dicol®) on Cold-stored Boar Sperm Viability and Bacterial Contamination, *Thai J Vet Med, Suppl.* 41, 173-174, 2011.
20. Thundathil J., Meyer R., Palasz A.T., Barth A.D., Mapletoft R.J.: Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production, *Theriogenology*, 54,921-34, 2000.
21. Thundathil J., Palasz A.T., Barth A.D., Mapletoft R.J.: The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets, *Anim Reprod Sci*, 65 181-92, 2001
22. Waberski D., Schapmann E., Henning H., Riesenbeck A., Brandt H.: Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI, *Theriogenology*, 75, 337-45, 2011.

Primljeno: 06.11.2012.

Odobreno: 08.05.2013.