

DOI 10.7251/VETJSR2201080V

UDK 636.2.082.454.2:591.463.1

Originalni naučni rad**ANALIZA KVALITETA SEKSIRANOG SEMENA BIKOVA
KOMPJUTERSKI ASISTIRANOM ANALIZOM SEMENA-CASA****Slobodanka VAKANJAC^{1*}, Goran PANTIĆ², Ljubomir JOVANOVIĆ¹,
Vladimir MAGAŠ¹, Danijela KIROVSKI¹**¹ Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Republika
Srbija² Privatna veterinarska ambulanta Radičević, Kragujevac, Republika Srbija

* Korespondentni autor: Slobodanka Vakanjac, vakanjac@vet.bg.ac.rs

Sažetak

Kvalitet ejakulata određuje se ispitivanjem makroskopskih (volumen, gustina, boja, miris) i mikroskopskih svojstava sperme (koncentracija spermatozoida u 1 ml i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, morfologija, vitalnost, pokretljivost spermatozoida i integritet akrozomalne membrane). Kompjuterizovana analiza sperme (CASA - computer assisted semen analysis) je automatizovani sistem kojim se mere pokretljivost, kinetika i koncentracija spermatozoida. Neki sistemi imaju modifikacije za procenu morfoloških karakteristika spermatozoida. Procena morfoloških osobina spermatozoida se može izvršiti mikroskopskim pregledom (zastupljenost normalnih i patoloških spermatozoida, integritet ćelijske membrane spermatozoida i abnormalnosti akrozoma). Metodom po Blomu se određuje vitalnost semena, a ono predstavlja bojenje razmaza sperme eozinom i nigrozinom. U savremenom govedarstvu se sve više koristi seksirano seme bikova (seme iz koga će se najverovatnije proizvesti muško ili žensko tele). Analiza seksiranog semena a posebno poređenje njegovog kvaliteta sa konvencionalnim semena je sve češći zahtev na tržištu govedarske proizvodnje. Cilj rada bio je da se ispita kvalitet 15 uzoraka seksiranog semena bikova, poreklom iz uvoza. Ispitivanja su obuhvatila utvrđivanje koncentracije i kinetike CASA sistemom, kao i procenu vitalnosti i morfoloških osobina bojenjem po Blomu. Prosečna koncentracija spermatozoida u 15 uzoraka bila je $19,61 \times 10^6$ /ml ejakulata. Ukupna pokretljivost iznosila je 39,42%, dok je nepokretnih spermatozoida u uzorcima bilo 60,58%. Broj morfološki normalnih spermatozoida je varirao od $2,91 \times 10^6$ do $6,11 \times 10^6$, a procenat patoloških spermatozoida od 8% do 28%. Uzimajući u obzir dobijene rezultata i odsustvo standarda vezanih za seksirano seme u trenutno važećem Pravilniku o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o

производnji sperme, kao i uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta (Službeni glasnik Republike Srbije, 38/14), neophodno je češće sprovođenje analiza seksiranog semena CASA metodom a da bi se dobili normativi koji bi postali sastavni deo Pravilnika i time olakšali manipulaciju seksiranim semenom na tržištu.

Ključne reči: seksirana sperma bikova, CASA, kvalitet sperme.

UVOD

Jedan od ključnih ciljeva govedarske proizvodnje jeste poboljšanje reproduktivnih parametara stada i postizanje maksimalne eksploatacije reproduktivnih kapaciteta. Ključno u ostvarivanju ovih ciljeva jeste implementacija savremenih biotehnoških procedura, ali i metoda za kontrolu i obezbeđenje kvaliteta semena.

Kompjuterizovana analiza sperme (CASA - computer assisted semen analysis) je metod analize semena, koji se stalno razvija i poboljšava, omogućava uvid u svojstva kvaliteta ejakulata, značajnih za njihovu fertilnu sposobnost, kako konvencionalog, tako i seksiranog semena. CASA je metoda koja se smatra objektivnom i pouzdanom, ali relativno skupom, pa se najčešće koristi u velikim centrima za veštačko osemenjavanje, odnosno pri proizvodnji inseminacionih doza od genetski superiornih bikova (Maes i sar., 2011). CASA koristi analizu slike, na osnovu koje određuje broj, odnosno koncentraciju spermatozoida. Tačnost ovog sistema zavisi od optičkih svojstava i podešenosti instrumenata i softvera, ali isključuje greške nastale kao posledica subjektivnosti analitičara (Amann i Waberski, 2014; Finelli i sar., 2021).

Morfološki nepromenjenih spermatozoida, u ejakulatima bikova koji se koriste za veštačko osemenjavanje, treba da bude najmanje 70% (Menon i sar., 2011). Sperma sa lošom morfologijom spermatozoida daje slabije rezultate veštačkog osemenjavanja, kao posledica smanjene oplodne sposobnosti sperme sa povećanim brojem abnormalnih spermatozoida. Različite anomalije morfologije spermatozoida, ćelijske membrane i akrozoma mogu se ustanoviti histološkim metodama bojenja. Najčešće je u upotrebi metoda bojenja po Blom-u (eozin-nigrozín bojenje), na osnovu kojeg se mogu odrediti živi i mrtvi, odnosno morfološki promenjeni spermatozoidi (WHO, 2010). Integritet akrozomalne membrane koja pokriva 2/3 glave spermatozoida i sadrži enzime potrebne za penetraciju kroz oocit tokom procesa oplodnje, značajan je pokazatelj oplodne sposobnosti spermatozoida. Zbog toga, dobri ejakulati moraju imati više od 51% spermatozoida sa normalnim akrozomom (Vincent i sar., 2012). Anomalije građe akrozoma se mogu ispitivati primenom različitih metoda bojenja i pregledom

takvih preparata fazno-contrastnom mikroskopijom (Maes i sar., 2011) ili protočnom citometrijom (Vincent i sar., 2012). Duboko zamrzavanje može značajno da poveća broj živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (Ugur i sar., 2019).

Prosečna brzina spermatozoida bika iznosi oko 100 μm u sekundi, odnosno 4-7 mm u 1 minutu. Ovom brzinom kretanja spermatozoid u jajovod krave stiže za dva sata. Kretanje se odvija rotacijom oko produžene ose s leva na desno, frekvencijom od 3 do 15 rotacija u sekundi i sa 9 udara repom u vidu talasa. Rotacija glave i repa se odvija u tri dimenzije uz istovremeno kretanje spermatozoida unapred – progresivno kretanje (Miljković i Veselinović, 2005).

Pod seksiranim semenom se podrazumeva ejakulat koji je izdvojen tako da sadrži spermatozoide koji će najverovatnije proizvesti željeni pol potomstva (Seidel, 2014; Dragin i sar., 2016). Ograničavajući faktori za primenu seksiranog semena je manji broj spermatozoida u dozi kojih u seksiranom semenu ima prosečno 2 miliona u odnosu na 20 miliona koliko ih ima u konvencionalnom semenu. Neki autori beleže smanjenje stope koncepcije primenom seksiranog semena, kao posledicu niskog broja spermatozoida u dozi, ali i potencijalnih fizičkih oštećenja, kao i grešaka u radu prilikom sortiranja (Frijters i sar., 2009).

Osim navedenog, nedostaci upotrebe seksiranog semena su i visoki troškovi nabavke i održavanja opreme, neophodna kvalifikovana radna snaga, spor proces u kome se dobija mali broj spermatozoida u dozi i manji broj doza u jedinici vremena (7-10 doza / sat), visok udeo sperme sa neodređenim polom (samo 30% sperme je pravilno seksirano) i na kraju veća cena seksiranog semena (Frijters i sar., 2009; Seidel, 2014).

Prednosti primene seksiranog semena su pre svega postizanje željenog pola jedinice u visokom procentu. Navodi se da je odnos polova kod mlečnih rasa goveda 85-90% ženske naspram 10-15% muške teladi. Značajni su potencijali za poboljšanje genetskog trenda u stadu, odabirom roditelja najboljih proizvodnih potencijala i dobijanje ženske teladi od najboljih krava u stadu. Takođe, zabeleženo je i smanjenje pojave teških teljenja i pratećih reproduktivnih problema (Seidel, 2014).

Steele i sar. (2020) su opisali analizu seksiranog semena CASA metodom ($n = 5$ bikova) koja je pokazala značajno smanjene procenta progresivne pokretljivosti brzih i sporih spermatozoida u poređenju sa konvencionalnim semenom (25,6% i 4,3% u odnosu na 60,8% i 13,3%, pojedinačno). Isti autor navodi da je procenat nepokretnih spermatozoida značajno povećan kod seksiranog semena i iznosi 64,3% u odnosu na 18,4% iste klase spermatozoida kod konvencionalnog.

Utvrđeni broj spermatozoida po dozi seksiranog semena iznosi $2,1 \times 10^6$. Ova količina je značajno niža od broja spermatozoida u konvencionalnoj dozi semena

bikova koja iznosi u proseku oko 20×10^6 . Junice, kao i krave rase holštajn rase imaju isti procenat začeća kada su osemenjene seksiranim semenom od 2×10^6 ili konvencionalnim semenom od $3,5 \times 10^6$ spermatozoida po dozi, međutim, ne samo kod junica već i kod krava, postoji povećan procenat začeća kada se osemene sa konvencionalnim semenom u dozi od 15×10^6 spermatozoida (Macedo i sar., 2013).

Procenat nepokretnih spermatozoida kod seksiranog semena 3 bika holštajn rase i jednog angusa odmah posle otapanja kretala se 33%, 30%, 47% i 50% ispitano CASA metodom, da bi posle tri sata procenat nepokretnih spermatozoida bio 53%, 71%, 77% kod holštajn rase bikova i 82% kod angusa (Brogliatti i sar., 2003). Isti autor navodi da je procenat progresivno pokretnih spermatozoida odmah posle otapanja iznosio $23,1 \pm 4,9\%$ a posle tri sat procenat je smanjen na $3,7 \pm 3,2\%$.

Minimalne uslove u pogledu kvaliteta semena bikova propisuje član 5. Pravilnika o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta (Propis, 2014). Navedeni propis ne reguliše pojam seksiranog semena i ne propisuje uslove dobijanja, kao ni zahteve kvaliteta koje mora da ispuni seksirano seme u prometu. Zahtevi savremenog tržišta, na kome je seksirano seme komercijalno dostupno nameću potrebu za zakonskom regulativom koja će definisati proizvodnju, promet, kao i uslove kvaliteta i bezbednosti ovog proizvoda.

Cilj ovog rada jeste da se ispita kvalitet seksiranog semena bikova iz uvoza kompjuterski asistiranom analizom semena CASA.

MATERIJALI I METODE

Analiza uzoraka seksiranog semena CASA metodom i bojenje uzoraka po Blomu

Ispitano je 15 uzoraka seksiranog semena, poreklom iz uvoza. Ispitivanja su izvršena na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Koncentracija spermatozoida, njihova pokretljivost i brzina utvrđeni su CASA (Computer Assisted Semen Analysis) sistemom. Za potrebe CASA korišćen je poduzorak od 5 μ l koji se nanosi na leje-komorice (Proiser D4C20, Valensija, Španija), duboke 20 μ m, postavljene na grejnoj ploči mikroskopa. Nakon prestanka pasivnog kretanja spermatozoida, izvršeno je slikanje na svih 7 definisanih polja komorice. Broj analiziranih spermatozoida po uzorku iznosio je od 1500-5000, odnosno 150-250 spermatozoida po snimku. Program je podešen na analizu

25 slika u sekundi, sa ekspozicijom snimka od 2 sekunde (ukupno 50 slika). Nakon obrade slike dobijeni su sledeći parametri:

- koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ u ml i u dozi);
- procentualnu zastupljenost pojedinih klasa spermatozoida prema pokretljivosti (progresivno pokretni, neprogresivno pokretni i nepokretni), kao i prema brzini (brzi, srednje brzi, spori i statični spermatozoidi).

Morfološke analize semena su sprovedene u cilju utvrđivanja odnosa živih i mrtvih spermatozoida, nalaza intaktnih i oštećenih akrozoma, protoplazmatskih kapljica, kao i primarnih, sekundarnih i ukupno patoloških formi spermatozoida specifičnim supravitalnim bojenjem po Blomu.

Određivanje ukupnog broja živih aerobnih mikroorganizama u duboko zamrznutom semenu bikova

Ukupan broj živih aerobnih mikroorganizama određivan je standardnom metodom ISO/TR 8607 (ISO, 1991).

Statistička obrada podataka

Normalna raspodela podataka je testirana koristeći D'Agostino & Pearson test normalnosti. Pošto su podaci bili normalno distribuisani ($p > 0,05$) za poređenje statistički značajnih razlika između dve grupe korišćen je *t*-test za nezavisne uzorke. Statistička obrada eksperimentalnih podataka je izvršena pomoću softvera GraphPad Prism verzija 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

REZULTATI

Rezultati ispitivanja koncentracije i pokretljivosti ispitanih uzoraka semena utvrđeni CASA metodom prikazani su Tabeli 1.

Tabela 1 Parametri koncentracije i pokretljivosti semena utvrđeni CASA metodom

Broj uzorka	Con ($\times 10^6$ /ml)	Con D ($\times 10^6$ /dozi)	UP (%)	PP (%)	BS (%)	SS (%)	LP (%)	N (%)	C (%)
1	15,43	3,85	34,47	28,14	18,50	9,51	6,34	65,53	0,13
2	16,72	4,18	36,14	30,41	10,76	19,65	5,73	63,86	0,00
3	17,81	4,45	40,40	34,80	24,70	10,10	5,60	59,60	0,00
4	21,72	5,43	31,41	22,59	13,14	9,45	8,82	68,59	0,00
5	12,90	3,22	34,85	31,82	24,24	7,58	3,03	65,15	0,00
6	19,75	4,93	45,54	42,57	21,78	20,79	2,97	54,46	0,00
7	15,40	3,85	44,44	38,10	23,17	14,92	6,35	55,56	0,00
8	19,65	4,91	45,51	42,47	21,58	20,59	2,91	54,36	0,00
9	17,30	4,32	41,13	36,27	28,81	7,46	4,86	58,87	0,00
10	20,61	5,15	56,52	52,73	39,29	13,36	3,79	43,48	0,08
11	24,28	6,08	42,42	35,03	18,39	16,51	7,38	57,58	0,13

12	23,46	5,86	35,00	27,02	13,33	13,57	7,98	65,00	0,12
13	21,06	5,25	33,70	25,53	15,97	9,29	8,17	66,30	0,28
14	28,44	7,11	44,23	37,66	22,31	15,13	6,57	55,77	0,23
15	19,59	4,89	25,55	19,36	12,28	7,09	6,19	74,45	0,00

Legenda: Con – koncentracija spermatozoida u mL; Con D – koncentracija spermatozoida u dozi; UP – ukupna pokretljivost; PP – progresivna pokretljivost; BS – brzi spermatozoidi; SS – spori spermatozoidi; LP – lokalno pokretljivi spermatozoidi; N – nepokretni; C – cirkularni ili spermatozoidi koji se kreću u krug;

Nakon statističke analize gore navedenih uzoraka seksiranog semena dobijeni su sledeći rezultati: ispitivanjem koncentracije spermatozoida u 15 uzoraka seksiranog semena utvrđena je prosečna koncentracija od $19,61 \pm 3,958 \times 10^6$ /ml ejakulata (Tabela 2). Najniža utvrđena koncentracija bila je $12,9 \times 10^6$ /ml, a najviša $28,44 \times 10^6$ /ml. Najniža koncentracija spermatozoida u dozi iznosila je $3,22 \times 10^6$ /doza, a najveća $6,08 \times 10^6$ /doza.

Tabela 2 Deskriptivne statističke vrednosti analize parametara seksiranog semena - koncentracija spermatozoida u mL [10^6 /ml]

Koncentracija semena	n	\bar{x}	SD	SE	X min	X max	CV (%)
	15	19,61	3,958	1,022	12,9	28,44	20,18

Ispitivanjem pokretljivosti spermatozoida u 15 uzoraka seksiranog semena, utvrđena je ukupna pokretljivost od $39,42 \pm 7,528\%$, a procenat spermatozoida koji su bili nepokretni u uzorcima je bio $60,58 \pm 7,528\%$ (Tabela 3).

Tabela 3 Deskriptivne statističke vrednosti analize parametara seksiranog semena [%]

Parametar	n	\bar{x}	SD	SE	X min	X max	CV (%)
Ukupna pokretljivost	15	39,42	7,528	1,944	25,55	56,52	19,10
Progresivna pokretljivost	15	33,64	8,659	2,236	19,36	52,73	25,74
Brzi spermatozoidi	15	20,56	7,389	1,908	16,47	24,66	35,93
Spori spermatozoidi	15	13,01	4,844	1,251	7,09	20,79	37,23
Lokalna pokretljivost	15	5,783	1,927	0,4975	2,97	8,82	33,32
Nepokretni	15	60,58	7,528	1,944	43,48	74,45	12,43
kružna pokretljivost	15	0,065	0,094	0,0242	0,00	0,28	145,05

Progresivna pokretljivost je varirala od 19,36% do 52,73%, a prosečne vrednosti su iznosile $33,64 \pm 8,659\%$, procenat brzih spermatozoida u uzorku u proseku se kretao $20,56 \pm 7,389\%$ (od 10,75% do 39,29%), a procenat sporih spermatozoida u proseku je bio $13,01 \pm 4,844\%$ (od 7,09% do 20,79%). Prosečan procenat spermatozoida koji se kreću u krug ispitanih uzoraka iznosio je $0,065 \pm 0,094\%$, a

lokalno pokretljivih spermatozoida odnosno titranje u mestu bilo je u proseku $5,783 \pm 1,927\%$.

Procenat živih spermatozoida kretao se kod ispitivanih uzoraka seksiranog semena od 34% do 60%. Procenat promena na glavi i repu spermatozoida kretao se od 2% do 12%, a promena na srednjem delu spermatozoida bilo je manje i iznosio je od 2% do 6%. Broj morfološki normalnih spermatozoida u uzocima seksiranog semena je varirao od $2,91 \times 10^6$ do $6,11 \times 10^6$, a procenat patoloških spermatozoida od 8% do 28% (Tabela 4).

Tabela 4 Vrednosti citomorfoloških parametara semena, metodom po Blomu

Broj uzorka	Živi/mrtvi %	Promene na glavi %	Promene na srednjem delu %	Promene na repu %	Ukupan broj patoloških formi %	Broj morfološki normalnih spermatozoida u dozi ($\times 10^6$)
1	44 / 56	4	/	4	8	3,55
2	40/60	4	4	8	16	3,51
3	48/52	4	2	8	14	3,83
4	60/40	8	/	4	12	4,78
5	52/48	2	2	6	10	2,91
6	58/42	/	/	12	12	4,35
7	52/48	2	/	6	8	3,39
8	58/42	/	/	12	12	4,32
9	56/44	4	2	8	14	3,73
10	60/40	8	/	12	20	3,50
11	44/56	8	6	8	22	4,61
12	48/52	8	2	6	16	3,55
13	40/60	6	2	2	10	4,73
14	52/48	6	2	6	14	6,11
15	34/66	12	4	12	28	3,53

DISKUSIJA

Utvrđeni broj spermatozoida po dozi seksiranog semena u našem radu iznosi u proseku $4,9 \times 10^6$, što je za 57% više nego što opisuju u svom radu Macedo i sar. (2013) gde ona iznosi $2,1 \times 10^6$. Brogliatti i sar. (2003) navode da je procenat progresivno pokretljivih spermatozoida odmah posle otapanja iznosio $23,1 \pm 4,9\%$, a posle tri sata procenat je smanjen na $3,7 \pm 3,2\%$ dok smo mi u našim istraživanjima dobili progresivnu pokretljivost odmah nakon otapanja uzorka $33,64 \pm 8,659\%$. Seidel i sar. (1997) su ustanovili radom na terenu sa seksiranim semenom da doze za osemenjavanje junica u rasponu od 1×10^6 do $2,5 \times 10^6$ spermatozoida daju zadovoljavajuću stopu začeca koja iznosi od 35% do 48%.

Steele i sar. (2020) su utvrdili da je procenat progresivno pokretljivih brzih i sporih spermatozoida iznosio 25,6% i 4,3%, dok smo mi u našem radu utvrdili da je procenat brzih spermatozoida iznosio $20,56 \pm 7,389\%$ i sporih spermatozoida $13,01\% \pm 4,844\%$. Dakle, u našem radu je bio mnogo veći procenat sporih

spermatozoida nego što je utvrdio gore navedeni autor. Isti autor navodi da je procenat nepokretnih spermatozoida kod seksiranog semena iznosio 64,3%, što je slično našim rezultatima ovog parametra kvaliteta semena ($60,58 \pm 7,528$). Za razliku od naših rezultata dobili su mnogo manji procenat nepokretnih spermatozoida kod seksiranog semena i on je iznosio 33%, 30% i 47% kod tri bika rase holštajn i 50% kod bika rase angus.

Na osnovu Pravilnika o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta (Propis, 2014), koji propisuje oplodnu sposobnost semena bikova nakon odmrzavanja, progresivna pokretljivost spermatozoida treba da bude najmanje 50%, što ne ispunjava četrnaest uzoraka seksiranog semena u našem radu, tako da se procenat progresivne pokretljivosti kod uzoraka kretao u proseku $33,64 \pm 8,659$. Samo je jedan uzorak imao progresivnu pokretljivost veću od 50% (52,73%). Stav 2. Pravilnika propisuje da procenat morfološki promenjenih spermatozoida treba da bude do 30%, što svi uzorci u našem radu ispunjavaju i on iznosi manje od 28%. Stav 4. Pravilnika propisuje da broj progresivno pokretnih i morfološki normalnih spermatozoida u dozi posle odmrzavanja treba da bude najmanje 10 miliona, što nije moguće ispuniti kod seksiranog semena, jer njihova koncentracija u dozi iznosi od 3,22 do $7,11 \times 10^6$, dok je broj morfološki normalnih spermatozoida u uzorcima seksiranog semena varirao od $2,91 \times 10^6$ do $6,11 \times 10^6$. Svi uzorci semena su bili bakteriološki i mikološki negativni, što je u skladu stavom 5. istog Pravilnika koji propisuje da ukupan broj bakterija u uzorku mora da bude do 500 CFU/ml.

ZAKLJUČAK

Važeći Pravilnik o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta (Službeni glasnik Republike Srbije, 38/14) ne propisuje parametre kvaliteta seksiranog semena. Uzimajući u obzir trend povećane upotrebe seksiranog semena od strane farmera neophodno je češće sprovođenje analiza seksiranog semena CASA metodom a u cilju dobijanja normativa koji bi postali sastavni deo Pravilnika. Time bi se olakšala manipulacija seksiranim semenom na tržištu i utvrdili standardi za procenu kvaliteta seksiranog semena.

Zahvalnica

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022-14/200143).

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Amann R., Waberski D. (2014): Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81:5-17.
- Brogliatti G. M., Barreiro G., Larraburu G., Laborde A. (2003): 10 CASA evaluation of sexed and non-sexed frozen bull semen. *Reproduction Fertility and Development*, 16(2):127-128
- Dragin S., Stančić I., Jotanović S. (2016): Biotehnologija u reprodukciji životinja. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Finelli R., Leisegang K., Tumallapalli S., Henkel R., Agarwal A. (2021): The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Translational Andrology and Urology*, 10(7):3069-3079.
- Frijters A. C, Mullaart E., Roelofs R. M., van Hoorne R. P., Moreno J. F., Moreno O., Merton J. S. (2009): What affects fertility of sexed bull sperm more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*, 71:64-67.
- ISO. (1991): Artificial insemination of animals – Frozen semen of breeding bulls – Enumeration of living aerobic micro-organisms. International organisation for standardisation, ISO/TR 8607.
- Macedo G. G., de Sá Filho M. F., Sala R. V., Mendanha M. F., de Campos Filho E. P., Baruselli P. S. (2013): The Use Of Sex-Sorted Sperm For Reproductive Programs In cattle. In Success in Artificial Insemination – Quality of semen and Diagnostics Employed. Ed. A. Lemma, InTechOpen.
- Maes D., Lopez Rodriguez A., Rijsselaere T., Vyt P., Van Soom A. (2011): Artificial insemination in pigs. In Artificial insemination in farm animals. Ed. M. Manafi, In-TechOpen.
- Menon A. G., Thundathil J. C., Wilde R., Kastelic J. P., Barkema H. W. (2011): Validating the assessment of bull sperm morphology by veterinary practitioners: brief communications. *Canadian Veterinary Journal*, 52:407-408.
- Miljković V., Veselinović S. (2005): Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja, VI dopunjeno izdanje. Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
-

- Propis, (2014): Pravilnik o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta. Službeni glasnik Republike Srbije, 38/14.
- Seidel G. E. A. C., Allen H., John L. A., Holland M. D., Brink Z., Welch G. R., Graham J. K., Cattell M. B. (1997): Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 48:1255-1264.
- Seidel Jr G. E. (2014): Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 1:160-4.
- Steele H., Makri D., Maalouf W. E., Reese S., Kölle S. (2020): Bovine Sperm Sexing Alters Sperm Morphokinetics and Subsequent Early Embryonic Development. *Scientific Reports*, 10(1):6255.
- Thomas J., Locke J., Vishwanath R., Hall J., Ellersieck M., Smith M., Patterson D. (2017): Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology* 98:88-93.
- Ugur M. R., Abdelrahman A. S., Evans H. C., Gilmore A. A., Hitit M., Arifiantini R. I., Purwantara B., Kaya A., Memili E. (2019): Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 6:268.
- Vincent P., Underwood S. L., Dolbec C., Bouchard N., Kroetsch T., Blondin P. (2012): Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction*, 9(3):153-165.
- WHO. (2010): WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5th edition, World Health organisation, WHO Press.

Rad primljen: 14.05.2022.

Rad prihvaćen: 24.08.2022.
