

Experiences with the calibration of colorimeter used for boar semen concentration assessment

Horváth András*^{1,2}
Lénárt Melinda³
Füleki Zsolt³
Lénárt Lea^{1,2}
Lang Zsolt⁴
Szenci Ottó^{1,2}

A. Horváth^{1,2}
M. Lénárt³
Zs. Füleki³
L. Lénárt^{1,2}
Zs. Lang⁴
O. Szenci^{1,2}

1. Állatorvostudományi Egyetem
Haszonállat-gyógyászati
Tanszék és Klinika
H-2225 Üllő, Dóra major

* e-mail: Horvath.Andras@univet.hu

2. MTA-SZIE Nagyállatklinikai
Kutatócsoport, Üllő

3. Állatorvostudományi Egyetem,
egyetemi hallgató, Budapest

4. Állatorvostudományi Egyetem
Biomatematikai és Számítástechnikai
Tanszék, Budapest

A sertésondó sejt koncentrációjának mérésére alkalmazott koloriméter kalibrálásával kapcsolatos tapasztalatok

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők vizsgálataikkal kimutatták, hogy a hímivarsejtek koncentrációjának mérésére alkalmazott kolorimétert kisszámú ($n = 15$) és szűk abszorbancia- (ABS-) tartományú ondómintákkal kalibrálva és közöttük lineáris összefüggés feltételezve az ejakulátumok kb. 5%-ban nagyon kicsi vagy negatív hígítási arány született. Nagyobb számú ondóminta ($n = 349$) ezt kiküszöbölte, de exponenciális összefüggés írta le legerősebben a koncentrációval való kapcsolatot. Továbbá minél nagyobb volt egy ondóminta ABSZ-tartománya, annál nagyobb lett a koloriméterrel számított és a két „gold standard”-kel (Makler kamra $n = 170$, CASA $n = 179$) mért koncentrációk közötti különbség, azaz csökkent a koloriméterrel számított koncentrációk pontossága.

SUMMARY

Background: The number of artificial insemination (AI) doses which can be obtained from an ejaculate of a single boar have major economic implications in porcine AI centres. This needs a quick and an acceptable precise concentration measurements which could be performed with different methods.

Objectives: The aim of this study was to compare the accuracy and calibration possibility of a colorimeter – which is a most commonly used method at the AI centre’s – to two laboratory concentration assessments as “gold standards” [Makler counting chamber and Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA)].

Materials and Methods: 349 ejaculates were involved in this study collected from 84 boars. Concentration were measured by means of colorimeter and Makler chamber ($n = 170$) or CASA ($n = 179$).

Results and Discussion: The recent colorimeter concentration measurement used a linear algorithm which was previously set up with small number of samples ($n = 15$) having narrow absorbances (ABS). This calculation form suggested negative or very low dilution ratio in 5% of the ejaculates but these results were not acceptable for practice. These miscalculations were avoidable if the calibrations were done with large number of samples with brighter ABS but the correlation between concentration and ABS was more exponential than linear by both methods. The colorimeter concentrations calibrated by CASA were consistently with 26% higher ($p < 0.05$) than by Makler. Furthermore, the higher were the ABS the differences between concentration calculated by colorimeter and measured by CASA or by Makler became larger. There was a tendency toward over- and underestimation – especially with very high ABS – in concentrations calculated by the colorimeter.

SERTÉS

A sertéstenyésztésben mesterséges termékenyítéssel gazdaságosabban és biztonságosabban lehet termelni, mint bűgatással. A gazdaságosság egyik mutatószáma az évente egy kocától választott malacok száma. Ez napjainkban – a fajtáktól és a technológiáktól függően – elér(het)i a 30–35 (!) malacot is. Ebben a malacszámban az apai oldal szaporodásbiológiai teljesítőképességének is jelentős szerepe van.

A sertéstenyésztésben mesterséges termékenyítéssel gazdaságosabban és biztonságosabban lehet termelni, mint bűgatással

Egy kantól akár több ezer vagy több tízezer malac is születhet (14, 15). Ilyen termelési mutatók mellett elkerülhetetlen, hogy a kanoktól elvárható termékenyítőképességet – a kocákhoz hasonlóan – gazdaságossági szempontból is megvizsgáljuk. A gazdaságos szaporodásbiológiai menedzsment alatt értjük azt, hogy hogyan lehet egy ejakulátumból a legnagyobb számú termékenyítő adagot előállítani úgy, miközben az egyes termékenyítési adagokban az elfogadható vemhesülési arányhoz (85–95%) és almonkénti malacszámhoz szükséges hímivarsejtek száma biztosított (pl. friss-hűtött ondót alkalmazó termékenyítések során: cervikális $2\text{--}3 \times 10^9$ ondósejt/term., intrauterin 1×10^9 ondósejt/term., mély intrauterin $0,05\text{--}0,2 \times 10^9$ ondósejt/term.) (5, 9, 12, 13, 14, 17).

Egy átlagos kan heréjének egy gramm csíraszövege naponta $\sim 23 \times 10^6$ spermiumot termel, a kettő here tömege ~ 750 gramm. Ez kb. 17×10^9 összes hímivarsejt-termelést jelenthet naponta. Az egyes ejakulátumokban lévő összes sejtszám a spermavételek gyakoriságával változtatható. A mesterséges termékenyítésben rutinszerűen (2–3×/hét) használt kan $\sim 45 \times 10^9$ ondósejt termelésére képes alkalmanként. Ez az ondóvételek gyakoriságával jelentősen csökkenthető (2×/nap $\rightarrow \sim 5 \times 10^9$ /ejakulátum) vagy emelhető (1×/hét $\rightarrow \sim 125 \times 10^9$ /ejakulátum). Ez az összes sejtszám – egyéb *in vitro* paraméterektől (motilitás, morfológia), termékenyítési technológiáktól (cervikális, intrauterin, mély intrauterin) és termékenyítő adagtípusoktól (friss-hűtött, mélyhűtött) függően – határozza meg az egy ejakulátumból elkészíthető termékenyítő adagok számát, de nem tudjuk mérni, csak közvetett értéként kiszámolni. Az összes sejtszámot az ejakulátum térfogatának (ml) és a spermiumok koncentrációjának szorzatával kapjuk. Az ejakulátum térfogata pontosan és egyszerűen a tömeg alapján mérhető (~ 1 g/ml), de a koncentráció méréséhez különböző eszközök állnak rendelkezésre. Ezeknek az eszközöknek a mérési pontossága határozza meg végső soron az összes sejtszám nagyságát (17, 18). A koncentráció mérése közvetlen és közvetett mérőmódszerekkel lehetséges. A közvetlen mérőmódszerek közé soroljuk mindazokat, amelyekkel a spermiumok a vizsgáló szem számára láthatóak (pl. hemocitóméterek: Makler, Bürker-kamra) vagy egy digitális kiértékelő szoftver számára láttathatóak (pl. Computer Assisted Sperm Analyzer – CASA, Hamilton Thorne Analyzer). A közvetett módszerek leggyakrabban alkalmazott formája a koloriméter, amellyel az ondóminta abszorbanciáját (fényelnyelés, ABSZ) lehet mérni, és ebből a sejtkoncentrációt lehet kiszámolni (1, 2, 8, 10, 17). Az ilyen típusú méréseknek háttere az a fizikoptikai tapasztalati összefüggés, amely szerint a fény abszorpciója és a közeg tulajdonságai között – amelyben a fény terjed – lineáris kapcsolat van. Napjainkban ez Lambert–Beer-törvényként ismert (nevezik Bouguer–Lambert–Beer-törvénynek is, de az irodalomban megtalálható a három név szinte minden variációja) (7). Vizsgálatunk célja az volt, hogy telepi körülmények között az egyik legszélesebb körben alkalmazott koloriméter (WPA CO7500, Biochrom, Cambridge, England) kalibrálását és mérési pontosságát vizsgáljuk nagyszámú ondóminta alapján két közvetlen ún. „gold standard” módszerrel (SpermVision™ version 3.5, Minitube, Tiefenbach, Germany; Makler counting chamber, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel).

Egy átlagos kan heréje naponta $\sim 17 \times 10^9$ db hímivarsejtet termel

Az ejakulátum hímivarsejt-koncentrációjának méréséhez különböző eszközök állnak rendelkezésre

A szerzők egy széles körben alkalmazott koloriméter kalibrálását végezték el

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatunkhoz 8 fajtakörbe tartozó, 84 sertéskantól származó ejakulátumot ($n = 349$) használtunk. Az ejakulátumok koncentrációjának mérését elsőként – a mindennapi gyakorlatnak megfelelően – a sertéstelep spermaborjában végezték



1. ÁBRA. A koloriméter az ejakulátumok sejtkoncentrációjának mérésére legszélesebb körben alkalmazott mérőmódszer telepi körülmények között

FIGURE 1. The colorimeter is the most widely used method for sperm concentration assessment in the field

A különböző mérések eredményeit statisztikai módszerekkel elemezték

koloriméterrel, majd az ejakulátumok koncentrációját ismét megmértük az Állatorvostudományi Egyetem (korábban SZIE ÁOTK) Haszonállat-gyógyászati Tanszék és Klinika Andrológiai Laboratóriumában CASA-val ($n = 179$) vagy Makler-kamrával ($n = 170$).

KONCENTRÁCIÓMÉRÉS KOLORIMÉTERREL

Az ejakulátumokból és sperma hígítóból 1 : 1 hígítást készítettek, amit még tovább hígítottak (200 μ l az 1 : 1 hígításból + 4,8 ml 0,9%-os NaCl-oldat). Ezeknek az ejakulátummintáknak az abszorbancaértékét 520 nm hullámhosszúságú fényrel mérték. Ebből az abszorbancaértékből egy lineáris egyenlettel – $C = 2235,4 \times \text{ABSZ} - 914,4$ – határozták meg a sejtkoncentrációt (C , $10^6/\text{ml}$) (1. ábra).

KONCENTRÁCIÓMÉRÉS CASA-RENDSZERREL

Az ejakulátumokból hígítást készítettünk (200 μ l hígítatlan ondó + 2 ml 3 % NaCl-oldat), amit Makler-féle sejtszámláló kamrába töltöttünk (10 μ m rétegvastagság). A Makler-kamra részét képezte annak a CASA-rendszernek (Makler-kamra + negatív fáziskontraszt mikroszkóp (Olympus BX30, UPlan FINH 20X/0.5 Ph1, Olympus, Japan) + digitális kamera + szoftver), ami a hígított mintákról 10 folytatódólagos fényképet készített, amiből a szoftver sejtkoncentrációt számolt (2. ábra).

KONCENTRÁCIÓMÉRÉS MAKLER-FÉLE SEJTSZÁMLÁLÓ KAMRÁVAL

A minták előkészítése a CASA-mérésekhez hasonlóan történt (200 μ l hígítatlan ondó + 2 ml 3% NaCl-oldat). Ezekben az esetekben is a Makler-kamrát és azonos negatív fáziskontraszt-mikroszkópot használtuk, de a spermiumokat szemmel a kamra 100 négyzetében (1 négyzet = $100 \times 100 \mu\text{m}$)

egyenként számoltuk meg. A négyzetekben megszámlált sejtek összege – a hígítás mértékét (1 : 10) figyelembe véve – adta a végső sejtkoncentrációt ($106/\text{ml}$) (3. ábra).

Az adatok elemzéséhez az R statisztikai szoftvert használtuk. Az összehasonlító tanulmány során a fix és random hatásokat tartalmazó kevert ANCOVA-módszert alkalmaztuk. Az ABSZ és a koncentrációk közötti kapcsolatot Pearson-féle korrelációval (R^2) vizsgáltuk. A szignifikanciaszint minden esetben $p < 0,05$ volt.

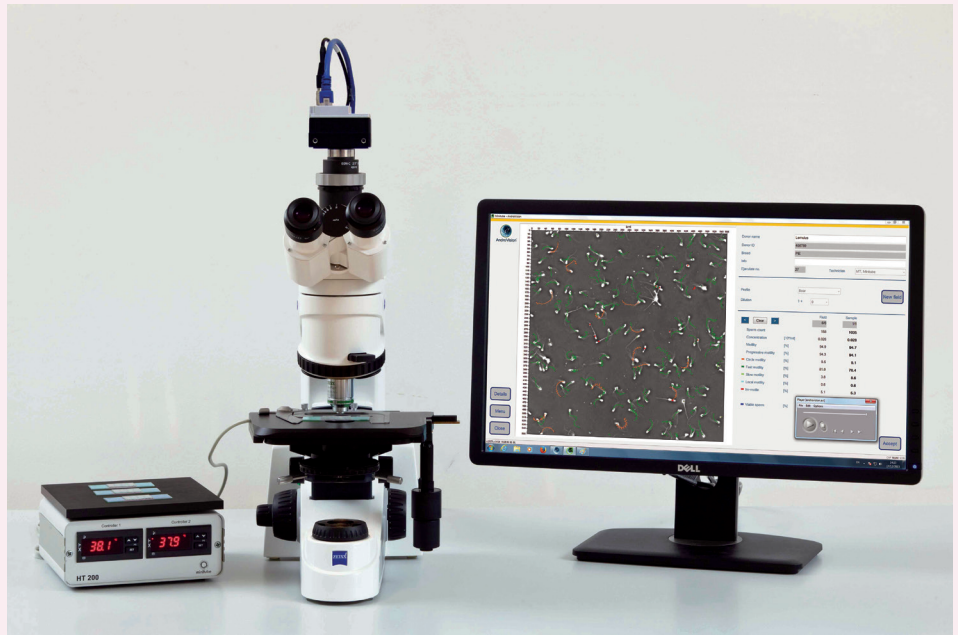
EREDMÉNYEK

A sertéstelepen a sejtkoncentrációkat egy korábban, kisszámú ($n = 15$) és szűk abszorbanca tartományba eső (ABSZ: 0,62–1,17) ondómintákból felállított lineáris egyenlettel számolták ($C = 2235,4 \times \text{ABSZ} - 914,4$) (4. ábra).

Ez azt eredményezte, hogy az ejakulátumok 2,5%-ban ($\text{ABSZ} \leq 0,4$) a számított koncentrációértékek negatív tartományba estek és további 2,5%-ban ($\text{ABSZ}: 0,4-0,46$) kisebbek lettek, mint $120 \times 10^6/\text{ml}$ (a sejtkoncentráció elfogadható alsó határa a sertés mesterséges termékenyítésben), habár mikroszkópos vizsgálattal ezekben az ejakulátumokban is értékelhető számban voltak jelen a spermiumok. Ebből adódóan ez az egyenlet csak a 0,46-nál nagyobb abszorbancajú ejakulátumok esetén adott a felhasználó számára elfogadható koncentrációértéket. Ezek a megfigyelések vezettek arra, hogy a kolorimétert nagyobb

2. ÁBRA. A CASA az ejakulátumkoncentrációk mérésére is alkalmas automatizált, digitális mérőrendszer (www.minitube.de)

FIGURE 2. The computer assisted sperm analysis (CASA) is an automatic method for sperm concentration assessment (www.minitube.de)



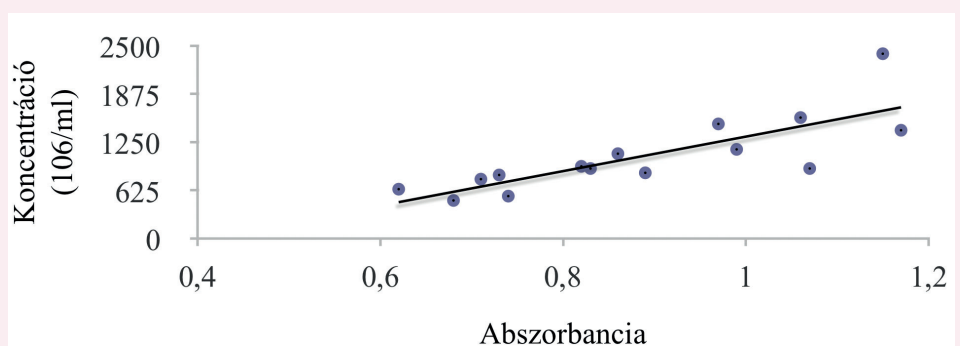
3. ÁBRA. A hígítatlan humán ondó sejt koncentrációjának mérésére alkalmas Makler-féle sejtszámláló kamara

FIGURE 3. The Makler counting chamber is a device for human sperm concentration assessment from undiluted specimen



4. ÁBRA. A koncentráció számolása – kis számú ($n = 15$) mintával – az abszorbanciák alapján

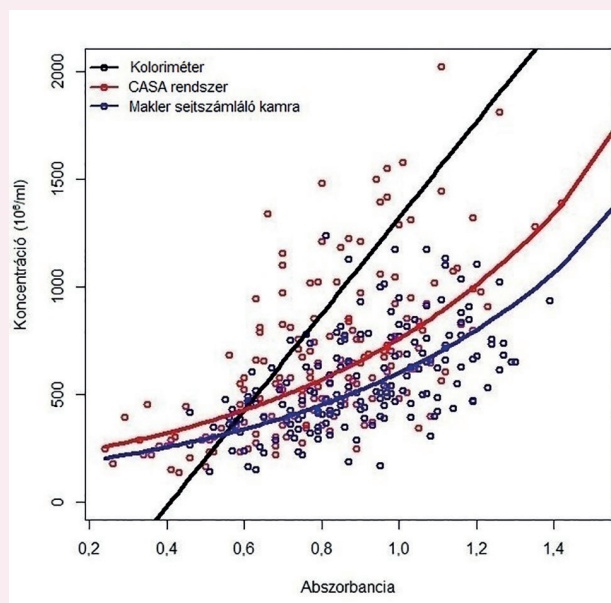
FIGURE 4. Concentration assessment – with the small number ($n = 15$) of samples – based on absorbances



TÁBLÁZAT. A koloriméterrel mért abszorbanciák és a CASA-val vagy Makler-féle sejtszámláló kamrával mért koncentrációk közötti kapcsolat

TABLE. The Makler counting chamber is a device for human sperm concentration assessment from undiluted specimen

| Koncentráció-mérés | Mintaszám | ABSZ-tartomány | ABSZ és koncentráció kapcsolata | ABSZ és koncentráció közötti korreláció (R^2) |
|--------------------|-----------|----------------|---------------------------------|---|
| CASA | 15 | 0,62–1,17 | lineáris | 0,64 |
| CASA | 132 | 0,62–1,17 | lineáris | 0,12 |
| Makler | 132 | 0,62–1,17 | lineáris | 0,22 |
| CASA | 179 | 0,24–1,77 | lineáris | 0,39 |
| Makler | 170 | 0,44–1,39 | lineáris | 0,31 |
| CASA | 179 | 0,24–1,77 | exponenciális | 0,46 |
| Makler | 170 | 0,44–1,39 | exponenciális | 0,34 |



5. ÁBRA. A koloriméter sejtkoncentráció számítása – nagyobb számú minta alapján – a koncentrációk pontjaira (CASA vagy Makler-féle sejtszámláló kamra) illesztett exponenciálisan illeszkedő vonalakkal

FIGURE 5. Concentration measurement of colorimeter – based on the large number of samples – with an exponential line drawn among the concentration points (CASA or Makler counting chamber)

számú minta alapján újralibráljuk két közvetlen vizsgálómódszerrel: CASA-val és Makler-féle sejtszámláló kamrával. Ha továbbra is szűk – a korábbi kalibrációhoz hasonló – ABSZ-tartományban, de nagyobb számú CASA- és Makler-koncentrációval is lineáris kapcsolatot feltételezve végeztük a kalibrálást, akkor az ABSZ és a koncentrációk közötti összefüggés továbbra is pozitív maradt, de jelentősen csökkent (0,12–0,22). Ha valamennyi ondóminta CASA- és Makler-koncentrációját alkalmaztuk a kalibráláshoz – továbbra is linearitást feltételezve az ABSZ-k és koncentrációk között –, akkor a kapcsolat mindkettő esetben erősebb (0,39–0,31) lett. Ez kismértékben még tovább emelkedett (0,46–0,34), ha exponenciális összefüggéssel vizsgáltuk az értékek közötti kapcsolatot (1. táblázat).

A nagyszámú minta esetén nem lineáris, hanem exponenciális egyenletek (CASA: $C = 181,8 \times 4,17^{ABSZ}$ vagy Makler: $C = 144,2 \times 4,17^{ABSZ}$) adták meg legpontosabban egy ABSZ-ből számított koncentráció nagyságát. Ezek – bizonyos ABSZ-tartományokban – jelentősen eltértek attól, amit a korábban kis mintaszám alapján felállított lineáris egyenlettel kaphattunk volna (5. ábra, fekete vonal). A CASA alapján kalibrált koloriméter koncentrációi – átlagosan kb. 26%-kal – szignifikánsan nagyobbak ($p = 0,0001$) voltak, mint a Makler-kamrával kalibrált koloriméter koncentrációi. Továbbá minél nagyobb volt egy ondóminta ABSZ-tartománya, annál nagyobb lett a koloriméterrel számított és CASA-val vagy Maklerrel mért koncentrációk közötti különbség, azaz csökkent a

koloriméterrel számított koncentrációk pontossága. Ez a különbség egyes esetekben akár a –65,2%-t vagy +168,4%-t is elérte (5. ábra).

KÖVETKEZTETÉSEK

A mesterséges termékenyítő állomások, az állattartó telepek és az andrológiai laboratóriumok rendszeresen vizsgálják a hímvarsejtek különböző tulajdonságait (pl. koncentráció, motilitás, morfológia stb.). Ezek között az egyik legfontosabb – különösen a sertéságazat számára – a sejtkoncentráció. A koncentráció, az összes sejtszám, majd az ebből elkészíthető termékenyítési adagok száma

A hagyományos sejt-számláló módszerek hátrányait próbálják kiküszöbölni az automatizált rendszerek, ahol a feldolgozást szoftver végzi

A koloriméterek a fényelnyelés mértéke alapján számolnak, egy ismert koncentrációjú hígítási sort használva

A vizsgálatok alapján nem lineáris, hanem exponenciális egyenlet adta a legpontosabb koncentrációt

határozza meg egy kanállomás gazdaságos működését (19). Az andrológiai laboratóriumok többsége a hímivarsejtek koncentrációjának mérésére többségében valamilyen közvetlen módszert, pl. számlálókamrát alkalmaz. Ezek között találjuk a vérsejtek vizsgálatára, de a spermiumok számolására is alkalmas Bürker-, Thoma-kamrát, valamint elsőként a humán spermiumok hígítás nélküli számolására kifejlesztett Makler-kamrát. Ezeknek a sejt-számlálóknak a használata időigényes, mivel az előlt spermiumokat mikroszkóp alatt számos négyzettrácsban kell végigszámolni, hogy a lehető legpontosabb koncentrációértéket kapjuk. További probléma, hogy egy ondóminta koncentrációja különböző lehet, ha az eredmény különböző kamrákkal végzett és/vagy különböző vizsgálótól származik, de befolyásoló tényező lehet a pipetta típusa, a hígítás mértéke és a sperma viszkozitása is. Pl. a Makler-kamrával végzett mérések következetesen nagyobb koncentrációértéket adtak, mint más kamrák (Bürker, Leja) (2, 3, 11). Habár ezek a megfigyelések megnehezítik a laboratóriumok között az egyes koncentrációk összehasonlíthatóságát, a sejt-számláló kamrák, pl. a Bürker, napjainkban még „gold standard”-ként a kalibrálásra elfogadott mérőmódszer (20). A fentiekben említett módszerek hátrányait próbálják kiküszöbölni az automatizált rendszerek pl. a CASA. A CASA – a sejt-számláló kamrákhoz hasonlóan – sejtek képi megjelenítését teszi lehetővé, de a feldolgozást a szoftver végzi. Ez a módszer kizárja a sejt-számlálás során a szubjektivitást, azonban költséges, ami korlátozza telepi használatát (1, 4). A koloriméterek telepi körülmények között az egyik legszélesebb körben elterjedt koncentrációt vizsgáló eszközök. Ez az analitikai technológia a fényelnyelésen alapul. A koncentrációszámolás alapja az a Lambert-Beer-törvény, ami egyenes arányosságot állapít meg az oldott anyagok koncentrációja – jelen esetben a spermiumok – és a fényelnyelés mértéke között (7). Ezeket a készülékeket nem kizárólagosan spermiumok, hanem oldott anyagok koncentrációjának mérésére fejlesztették ki. Ezért a koloriméterekhez általában nem csatolnak „spermium koncentrációmérés használati utasítást”, hanem a felhasználóknak kell kalibrálni (6). A kalibrálás egyik lehetséges módja, hogy egyetlen egy ejakulátumból nyolclépcsős hígítási sort kell készíteni (1 : 1 → 1 : 64), amiknek az ABSZ-értékeit koloriméterrel, a hozzá tartozó koncentrációikat sejt-számláló kamrával kell mérni (17). Így a minták között lesznek kellően alacsony ABSZ-értékek, amivel elkerülhető, hogy kisebb ABSZ-értéknél – pl. a korábbi lineáris egyenletünkkel 0,4 ABSZ alatt ($C = 2235,4 \times \text{ABSZ} - 914,4$) – a gyakorlat számára nehezen értelmezhető negatív hígítási arányt kapjunk. Telepi körülmények között a hígítási sor készítése gyakorlatias, mivel jelentősen rövidebb ideig tart, de a kalibrálás alapja nem az ondóminta száma, hanem egy minta több hígítása. A vizsgálatunkban alkalmazott nagyszámú ejakulátum (Makler: $n = 170$ és CASA: $n = 179$) alapján elvégzett kalibrálás időigényes, de számos új észrevétellel vezetett, amelyek alacsonyabb mintaszám esetén nem jutnak a vizsgáló tudomására. Habár nagy mintaszámmal szintén széles ABSZ-tartománnyal lehetett számolni, de – a Lambert-Beer-törvénnyel ellentétben – nem lineáris, hanem exponenciális egyenlet adta a legpontosabb koncentrációt. A válasz valószínűleg az ejakulátumok sajátosságaiban keresendő. A kolorimétereket elsőként nem összetett biológiai rendszerek – pl. spermium – koncentrációjának mérésére alkalmazták, hanem kisebb molekulákra (pl. bilirubin, glükóz), ahol teljesült a törvény alkalmazhatóságának néhány feltétele. Az abszorbeáló részecskének egymástól függetleneknek kell lenniük, és az abszorbeáló közeg eloszlásának egyenletesnek kell lennie. Ezek a feltételek egy ejakulátummal kapcsolatban több formában is sérülhetnek, mivel pl. a spermiumok összecsapódhatnak, hímivarsejt nagyságú részecskék (szennyeződés) lehetnek jelen, a spermiumok különböző mértékben és formában mozognak (2, 10). Ezek valamennyien hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a Lambert-Beer-törvény alapján feltételezett lineáritás a spermiumokkal kapcsolatban inkább exponenciális. A spermiumok és

Minél nagyobb volt egy ondóminta ABSZ-értéke, annál nagyobb lett a koloriméterrel számított és CASA-val vagy Maklerrel mért koncentrációk közötti különbség

környezete közötti kapcsolat eredményezhette azt is, hogy minél nagyobb volt egy ondóminta ABSZ-értéke, annál nagyobb lett a koloriméterrel számított és CASA-val vagy Maklerrel mért koncentrációk közötti különbség. Különösen nagy ABSZ-k esetén a koncentrációk koloriméterrel elkerülhetetlenül nagyobbra vagy kisebbre lettek értékelve. Ez a különbség egyes esetekben akár a -65,2%-t vagy +168,4%-t is elérhette. További kérdés a vizsgáló számára, hogy a Makler-kamrát vagy a CASA-rendszert vehetjük-e alapul egy koloriméter kalibrálásához, hiszen a CASA-val kalibrált koloriméter koncentrációi következetesen 26%-kal nagyobbak ($p < 0,05$) voltak, mint Makler-kamrával. Véleményünk szerint bármelyik módszer alkalmazható, mert a vemhesülést és elfogadható malac/alom nagyságot széles határok között változó összes sejtszámmal ($1-3 \times 10^9$ spermium) is el lehet érni (16). Tapasztalataink alapján sokkal fontosabbnak tartjuk azt, ha egy sertéstelep – az egyes módszerek eltérő pontossága ellenére – alkalmazzon bármilyen koncentrációmérést, így a hígítások mértékét nem a „lombik nagysága vagy a termékenyítéshez szükséges adagok száma” határozza meg.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A közleményben ismertetett vizsgálatok az OTKA K 108571 projekt támogatásával készültek.

IRODALOM

- AMANN, P. R. – KATZ, F. D.: Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.*, 2004. 25. 317–325.
- BAILEY, E. – FENNING, N. et al.: Validation of sperm counting methods using limits of agreement. *J. Androl.*, 2007. 28. 367–373.
- CHRISTENSEN, P. – STRYHN, H. et al.: Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, 2005. 63. 992–1003.
- DAVIS, R. O. – KATZ, D. F.: Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.*, 1993. 14. 385–394.
- HORVÁTH A. – PRIBENSZKY C. – SZENCI O.: A sertésondó mélyfagyasztása II. A mélyfagyasztott sertésondó használata telepi körülmények között. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2014. 136. 141–147.
- <http://www.biochrom.co.uk>
- <https://hu.wikipedia.org>
- JOHNSON, J. – BOONE, W. – BLACKHURST, D.: Manual versus computer-automated semen analysis. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertil. Steril.*, 1996. 65. 150–155.
- KRUEGER, C. – RATH, D.: Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2000. 17. 113–117.
- MAES, D. – RIJSSELAERE, T. et al.: Comparison of five different methods to assess the concentration of boar semen. *Vlaams Diergen. Tijds.*, 2010. 79. 42–47.
- MAHMOUD, A. – DEPOORTER, B. et al.: The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil. Steril.*, 1997. 68. 340–345.
- MARTINEZ, E. A. – VAZQUEZ, J. M. et al.: Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reprod.*, 2002. 123. 163–170.
- MARTINEZ, E. A. – VAZQUEZ, J. M. et al.: Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reprod.*, 2002. 122. 289–296.
- RATH, D.: Low dose insemination in the sow—a review. *Reprod. Dom. Anim.*, 2002. 37. 201–205.
- ROCA, J. – VÁZQUEZ, J. M. et al.: Challenges in pig artificial insemination. *Reprod. Dom. Anim.*, 2006. 41. 43–53.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.: Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Dom. Anim.*, 2003. 38. 312–318.
- RUTH, C.: *The swine AI book*. Veterinary Practice Publishing Company. Santa Barbara, CA, USA, 1994.
- SENGER, P. L.: *Pathways to pregnancy and parturition*. Corrent Conceptions, Inc. Pullman USA, 2003. 233–234.
- VYT, P. – MAES, D. et al.: Semen handling in porcine AI centers: the Belgian situation. *Vlaams Diergen. Tijds.*, 2007. 76. 195–200.
- World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. 4th Edition, Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom, 1999.

Közlésre ér.: 2016. jún. 1.