

Titar antitela protiv antigena spermatozoida bika u krvnom serumu krava i junica sa različitim brojem osemenjavanja

Aleksandar Milovanović,^{1*} Rad je delimično finansiran od strane MNT Republike Srbije po osnovu zadatka iz projekta ON 111998. Miodrag Lazarević,² Danijela Kirovski,² Milovan Jovičin,¹ Tomislav Barna¹

¹Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad

²Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Kratak sadržaj

U okviru ovog rada prikazani su rezultati dobijeni određivanjem titra antitela IgA i G klase protiv antigena spermatozoida i razređivača za spermu bikova metodom indirektno imunofluorescencije u krvnom serumu krava i junica. Za izvođenje testa korišćeni su spermatozoidi pripremljeni za veštačko osemenjavanje suspendovanjem u TRIS-žumančanom i biljnom razređivaču „Biociphos+”. Ispitivane plotkinje su bile podeljene u četiri grupe na osnovu ukupnog broja osemenjavanja tokom života: neosemenjene junice; krave i junice osemenjene 1-5 puta; 6-10 puta i grla koja su za života osemenjene više od 10 puta. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da postoji sistemski humoralni odgovor imunološkog sistema plotkinja na spermatozoide i/ili sastojke razređivača. Titar ukupnih antispermalnih antitela raste sa brojem osemenjavanja. Ovaj porast posledica je povećanja titra antispermalnih antitela IgA klase. Antitela protiv spermatozoida klase IgG, po svemu sudeći nemaju značajniji efekat u ovom smislu.

Ključne reči: spermatozoidi, antitela, junice, krave, plodnost

* e-mail: aca@niv.ns.ac.yu

Antibody titer against spermatozoal antigens of bulls in blood sera of cows and heifers with different number of insemination

Aleksandar Milovanović,¹ Miodrag Lazarević,² Danijela Kirovski,² Milovan Jovičin,¹ Tomislav Barna¹

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20.

²Faculty of Veterinary Medicine, Belgrad

Abstract

In this paper are presented the results obtained by determining antibody titer of IgA and IgG class against spermatozoal antigens and extenders for bull's semen using the method of indirect immunofluorescence in blood sera of cows and heifers. Spermatozooids, prepared for artificial insemination, were suspended in TRIS egg yolk and herbal „Biociphos+” extender. Animals were divided in four groups according to the number of total inseminations in their life: virgin heifers; cows and heifers inseminated 1-5 times; 6-10 times inseminated cows and cows inseminated more than 10 times. The obtained results clearly point that there is a system humoral response of the immune system towards spermatozooids and/or semen extender. Titers of total antisperm antibodies increase with the number of inseminations. This increase is a consequence of increased titer of antisperm antibodies of the IgA class. Obviously, antibodies against spermatozooids of the IgG class have no important influence.

Key words: spermatozooids, antibodies, heifers, cows, fertility

UVOD

Krave sa asimptomatskim sterilitetom su jedinke koje nisu ostale steone nakon tri i više uzastopna osemenjavanja, pri čemu ispoljavaju normalne intervale između estrusa, imaju najmanje jedno teljenje kako bi se isključile eventualne anomalije na genitalnom traktu, mlađe su od 10 godina, nemaju znakove kliničkih promena niti patološki iscedak prilikom rektalnog pregleda genitalnih organa (Tanabe i Casida, 1949). Grla koja povrađaju, nesumnjivo postavljaju najzahtevniju kauzalnu analizu za stručnjake iz oblasti reprodukcije. Uzroci povrađanja mogu biti posledica nesinhronizovanosti hormona, povećane stope abnormalnih embriona, patologije materice sa histološki vidljivim lezijama, teškoće u otkrivanju estrusa (Youngquist i Bierschwal, 1985).

Problem prisustva specifičnih antitela u cervikalnoj sluzi i krvnom serumu krava je nedovoljno istražen, a često zanemaren u veterinarskoj medicini. Kanchev i sar. (1993) i Max (1990) saopštavaju da je 3,3%, odnosno 4,5% krava neplodno zbog prisustva visokog titra ASA (antispermatozoalnih antitela). Wang i Xie (1990) su ispitali 119 neplodnih krava dokazali prisustvo ASA kod 43 krave (36%), u odnosu na 3,8% kod gravidnih krava. Ovi autori su zaključili da se visok titar ASA može dokazati i kod steonih krava ali je očigledno da se samo kada je titar ASA visok i u serumu i u lokalnom tkivu ispoljava negativan uticaj na plodnost. Seshagiri i sar. (1987) su utvrdili ASA kod 59,4% krava koje ponovo dolaze u ciklus (povađaju) i 14,5% kod krava sa normalnom plodnošću. U ispitivanjima Farahanija i sar. (1981) je utvrđeno da se u serumu krava koje su povađale, steonih krava i steonih junica zastupljenost ASA nalazi u 26%, 32%, odnosno 0%.

Poznato je da se pojedine komponente iz sastava razređivača tako čvrsto vezuju za membranu spermatozoida da se praktično ne mogu kasnije odvojiti (Cookson i sar., 1984). Antitela protiv antigena razređivača dovode do smanjenog fertiliteta kod eksperimentalnih životinja i kod goveda (Hunter i Alsum, 1969; Swanson i Hunter, 1969; Griffin i sar., 1974; Coulter i sar., 1976). Dokazano da se kod svega 3% krava sa normalnim reproduktivnim pokazateljima u serumu nalaze antitela protiv antigena žumančanog razređivača, dok je u grupi krava koje povađaju taj procenat 29%. U istoj studiji utvrđeno je da 67% jedinki koje povađaju ima antitela na antigene razređivača u cervikalnoj sluzi (Coulter i sar., 1976).

Imunski odgovor u ženskom genitalnom traktu

Sekretorna antitela klase A su osnovni imunoglobulini u suzama, pljuvački i kolostrumu, kao i u sekretima respiratornog, gastrointestinalnog i reproduktivnog trakta. Lokalni sekretorni sistem postoji u ženskom reproduktivnom traktu što dokazuje i prisustvo plazma ćelija koje proizvode IgA u jajovodu, cerviksu i vagini (Kutteh i Mestecky, 1996). U sekretu iz lumena materice dominira nalaz imunoglobulina klase G, a u vagini IgA. Samo se deo od ukupnih IgG₁ koji se nalaze u materičnoj sluzi sintetiše lokalno u endometriјumu, a preostali deo IgG₁ kao i ukupan IgG₂ pristiže iz lokalnog krvotoka materice (Chacin i sar., 1990).

Postoji veliki broj podataka koji ukazuju na lokalnu proizvodnju ASA u genitalnom traktu, iako antitela nisu prisutna u krvi. Pre svega nastaju imunoglobulini klase A (Bronson, 1999). Kutteh i sar. (1988, 1990) ukazuju da će, ukoliko se sprovode samo serološka ispitivanja u dijagnostici imuniteta protiv spermatozoida, rezultati imati pogrešna tumačenja u velikom procentu slučajeva. Danas preovlađuje stanovište da prisustvo humoralnih antitela protiv spermatozoida nije relevantan pokazatelj poremećaja plodnosti, sve dok se ne dokaže prisustvo antitela u reproduktivnom traktu.

Lazarević i sar. (1996) su ispitivali titar spermaglutinina u serumu i cerviko-vaginalnoj sluzi kod 29 junica i 35 krava crno-bele šarene rase metodom aglutinacije u želatinu (eng. Kibrick-Belding-Meril test - KBM). U krvnom serumu,

od ispitanih 29 krava, kod 14 (48,2%) zabeležen je titar spermaglutinina 1:1024, dok je u istoj grupi to bilo kod svega 8,5% junica. Slični rezultati su dobijeni ispitivanjem cerviko-vaginalne sluzi, gde je broj junica sa nultim titrom bio značajno veći nego kod krava (9 junica i jedna krava), dok je 9 krava (31%) imalo titar spermaglutinina 1:16, u poređenju sa 5 junica (14,3%). Očigledno je da kod krava u toku ponovljenih osemenjavanja postoji tendencija povećanja titra spermaglutinina, ali se imunski subfertilitet ne može procenjivati samo na osnovu ovog parametra.

Usled unakrsnih reakcija sa obiljem mikroflore, pogotovo kod preživara, očekuje se postojanje „prirodnih” ASA koje, po svemu sudeći, nemaju uticaj na reprodukciju, osim ukoliko su prisutne u serumu u visokom titru i dospeju u cervikalni sekret, kada mogu da spreče koncepciju kod krava i junica (Bratanov i sar., 1975). Kod većine jedinki se očekuje porast titra ASA sa povećanjem broja osemenjavanja, sve do postizanja nivoa koji bi mogao da ugrozi plodnost. Svakako da dokaz ASA u serumu ili čak u genitalnom traktu ne podrazumeva sigurnu neplodnost, ali su mogućnosti za oplodnju smanjene. Imunitet na spermatozoide ne funkcioniše po mehanizmu „sve ili ništa” (Schumacher, 1988), pa ga treba prihvatiti kao relativni, a ne kao apsolutni uzrok steriliteta.

Cilj ovog rada je da se kod većeg broja plotkinja holštajn-frizijske rase (oko 200) utvrdi korelacije između titra antispermatozoalnih antitela klasa IgA i IgG u uzorku krvnog seruma protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču i „Biociphos+” (IMV, Francuska), u zavisnosti od ukupnog broja osemenjavanja.

MATERIJAL I METODE RADA

Našim ispitivanjima je bilo obuhvaćeno 181 krava i 20 junica holštajn-frizijske rase. Krave i junice su bile locirane na tri govedarske farme koje su u proseku imale po 600 grla. Uzorkovanje krvi punkcijom *v. jugularis* vršeno je na dan osemenjavanja. Krvni serum čuvani su na -20°C do momenta ispitivanja. Titar je određivan metodom indirektno imunofluorescencije po Noel-u i sar. (1974), a za izvođenje testa su korišćeni spermatozoidi iz pajeta za VO prethodno suspendovani u TRIS-žumančanom razređivaču i razređivaču „Biociphos+” (IMV, Francuska). Većina plotkinja od kojih su uzimani uzorci za ova ispitivanja je već imala kontakt sa spermatozoidima suspendovanim u obe vrste razređivača.

Za dokazivanje prisustva antispermatozoalnih antitela IgG klase korišćena su komercijalna antiantitela (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA; Cat. ¹ 654 421), konjugovana fluorescein izotiocijanatom (Fluorescein S Isothiocyanate - FITC Conjugated, Sigma; Cat. ¹ 222-042-0). Za dokazivanje prisustva antispermatozoalnih antitela IgA klase korišćena su komercijalna antiantitela (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA; Cat. ¹ 641 751).

Očitavanje uzoraka vršeno je na fluorescentnom mikroskopu (Olympus, BX-40, Japan) sa B-2A filterom i uvećanjem od 400×. Pojava izražene fluorescencije glave, vrata ili repa smatrana je pozitivnim rezultatom. U slučaju pozitivne reakcije sa

antiantitelima klase G, fluorescencija je obično vidljiva na akrozomu, dok je kod antiantitela klase A fluorescencija izražena na vratu i repu spermatozoida. Vrednosti titra antispermatozoalnih antitela su izražene kao $-\log_2 n$ ($1:2 = 1$, $1:4 = 2$ itd.) prema Sjurin-u i sar. (1984). Stepenn statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti je određivan Mann-Whitney i LSD testom pomoću statističkog programa Statistica 5 (Poljoprivredni fakultet, Novi Sad).

REZULTATI I DISKUSIJA

U tabeli 1, 2, 3. i 4. prikazani su prosečan titar ASA IgG i IgA klase protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (T) i „Biociphos+” (B) u krvnom serumu junica i krava, u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja. Statistička ocena značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti prikazana je u Grafikonu 1 i 2.

Tabela 1. Prosečan titar IgG antitela protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (IgG-T) u krvnom serumu junica i krava, u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja

Broj veštačkih osmenjavanja - VO		Ig G-T u krvnom serumu ($-\log_2 n$)					
		N	\bar{x}	SD	S_x	CV%	I.V.
(J)	VO 0	20	2,15	1,09	0,24	50,67	0-4
(K)	VO 1- 5	69	2,72	1,96	0,24	72,01	0-8
(K)	VO 5,1 - 10	60	2,22	1,50	1,50	67,52	0-5
(K)	VO 10,1 i >	52	2,46	1,71	0,24	69,42	0-6

J - junice; K - krave

Srednja vrednost titra IgG protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (T) najniža je kod junica ($2,15 \pm 1,09$), a najviša kod krava koje su osemenjene od 1-5 puta ($2,75 \pm 1,96$). Može se uočiti da su standardne devijacije u svim grupama plotkinja niske (1,09-1,96). Primenom Mann-Withney testa nisu uočene statistički značajne razlike titra ASA klase IgG u krvnom serumu ($p > 0,05$) junica i krava, kada su za izvođenje reakcije korišćeni spermatozoidi bikova prethodno suspendovani u TRIS-žumančanom razređivaču.

Tabela 2. Prosečan titar IgG protiv spermatozoida u krvnom serumu junica i krava, suspendovanih u „Biociphos+” razređivaču (IgG-B) u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja

Broj veštačkih osmenjavanja - VO		Ig G-T u krvnom serumu (-log ₂ n)					
		N	\bar{x}	SD	S_x	CV%	I.V.
(J)	VO 0	20	2,50	0,95	0,21	37,84	0-4
(K)	VO 1- 5	69	2,25	1,69	0,20	75,35	0-6
(K)	VO 5,1- 10	60	2,07	1,58	0,20	76,57	0-5
(K)	VO 10,1i >	52	2,10	1,83	0,25	87,23	0-6

J - junice; K - krave

Srednje vrednosti titra IgG protiv spermatozoida suspendovanih u razređivaču „Biociphos+” najviše su kod junica ($2,50 \pm 0,95$), a najniže kod krava koje su osemenjavane 5,1-10 puta ($2,07 \pm 1,83$). Sve izračunate srednje vrednosti za ovaj parametar kretale su se u uskom opsegu od 2,07-2,50, tako da je standardna devijacija 0,95-1,83. Takođe se i ovde, primenom Mann-Withney testa nisu uočene statistički značajne razlike titra ASA.

Tabela 3. Prosečan titar IgA protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (IgA-T) u krvnom serumu junica i krava, u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja

Broj veštačkih osmenjavanja - VO		Ig G-T u krvnom serumu (-log ₂ n)					
		N	\bar{x}	SD	S_x	CV%	I.V.
(J)	VO 0	20	2,60	1,19	0,27	45,68	0-4
(K)	VO 1- 5	69	4,30	2,69	0,32	62,40	0-12
(K)	VO 5,1- 10	60	4,70	2,83	0,37	60,22	0-12
(K)	VO 10,1i >	52	5,23	2,91	0,40	55,59	0-10

J - junice; K - krave

Srednje vrednosti titra IgA u krvnom serumu protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (T) pokazuju tendenciju konstantnog rasta sa povećanjem broja osemenjavanja. Najniže vrednosti su zabeležene u krvnom serumu junica koje nisu osemenjavane ($2,60 \pm 1,19$), a najviše kod krava koje su osemenjene više od 10 puta ($5,23 \pm 2,91$).

Ustanovljena je visoko statistički značajna razlika kada se uporede junice sa kravama koje su osemenjene 1-5 puta (p 0,01), dok je razlika vrlo visoko statistički značajna između neosemenjenih junica i krava koje su osemenjene 5,1-10 i krava osemenjenih više od 10 puta (p 0,001). Najmanja statistički značajna razlika postoji između grupa krava koje su osemenjene 1-5 puta i više od 10 puta (p 0,05).

Tabela 4. Prosečan titar IgA protiv spermatozoida suspendovanih u razređivaču „Biociphos+” (IgA-B) u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja u krvnom serumu junica i krava

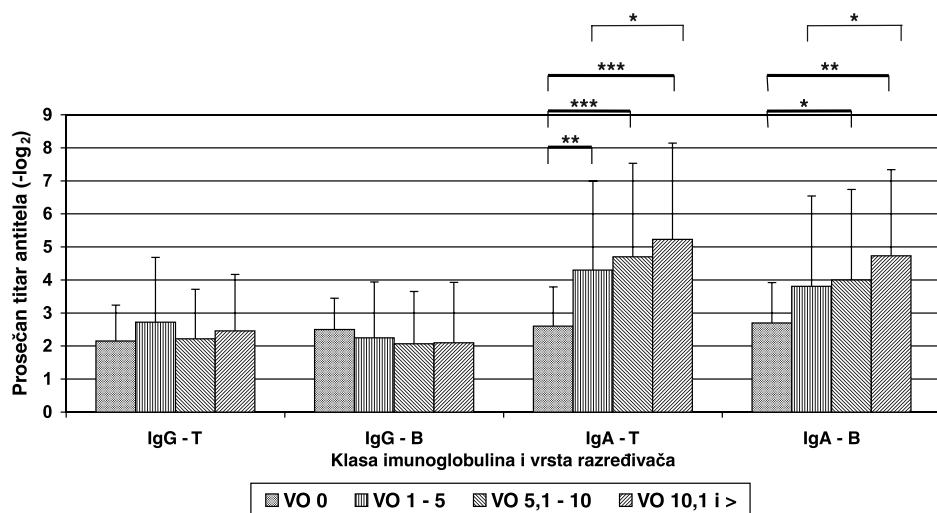
Broj veštačkih osmenjavanja - VO		Ig G-T u krvnom serumu (-log ₂ n)					
		N	\bar{x}	SD	S _x	CV%	I.V.
(J)	VO 0	20	2,70	1,22	0,27	45,12	0-4
(K)	VO 1- 5	69	3,81	2,73	0,33	71,61	0-11
(K)	VO 5,1 - 10	60	4,00	2,74	0,35	68,43	0-12
(K)	VO 10,1 i >	52	4,73	2,61	0,36	55,08	0-9

J - junice; K - krave

Srednje vrednosti titra IgA u krvnom serumu protiv spermatozoida suspendovanih u „Biociphos+” pokazuju istovetnu tendenciju povećanja titra sa brojem osemenjavanja, kao u slučaju spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (T) (tabela 4.). Najniže vrednosti su zabeležene u krvnom serumu junica koje nisu osemenjavane ($2,70 \pm 1,22$), a najviše kod krava koje su osemenjene više od 10 puta ($4,73 \pm 2,61$).

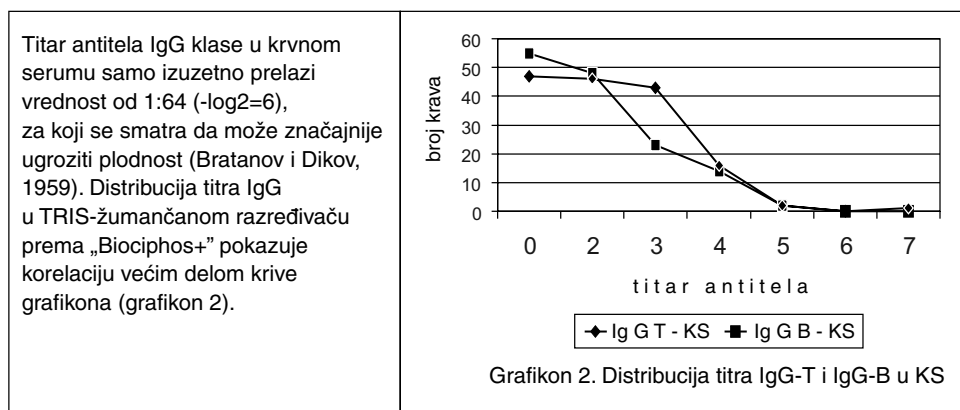
Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima titra ustanovljena je između neosemenjenih junica i krava koje su osemenjene od 5,1-10 ($p < 0,05$), kao i kod grupe krava osemenjenih 1-5 puta i krava sa 10,1 osemenjavanja, dok je ova razlika visoko statistički značajna kada se uporede junice sa kravama osemenjenim 1-5 puta ($p < 0,01$).

Na grafikonu 1 prikazani su rezultati dobijeni ispitivanjem prosečnog titra antitela IgG i IgA klase protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom (T) i „Biociphos+” (B) razređivaču u krvnom serumu junica i krava, u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja.



Grafikon 1. Prosečan titar antitela IgG i IgA klase protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom (T) i „Biociphos+” (B) razređivaču u zavisnosti od broja ukupnog osemenjavanja u krvnom serumu junica i krava

Iz podataka prikazanih na grafikonu 1 zapaža se da ne postoje statistički značajne razlike u srednjim vrednostima titra ASA klase IgG u krvnom serumu ($p > 0,05$) junica i krava, kada su za izvođenje reakcije korišćeni spermatozoidi bikova prethodno suspendovani u TRIS-žumančanom i „Biociphos+” razređivaču.



Međutim, razlike u srednjim vrednostima titra ASA klase IgA u krvnom serumu na spermatozoide suspendovane u TRIS-žumančanom razređivaču su visoko statistički značajne kada se uporede virgilne (još neosemenjene) junice sa kravama koje su osemenjene 1-5 puta ($p > 0,01$), dok je razlika vrlo visoko statistički značajna između neosemenjenih junica i grupe krava koje su osemenjavane 5,1-10 puta, kao i između neosemenjenih junica i krava koje su osemenjene više od 10 puta ($p > 0,001$).

Razlike su statistički manje izražene između grupa kada se razmotre vrednosti pri upotrebi spermatozoida bikova prethodno suspendovanih u „Biociphos+” razređivaču. Statistička značajnost je ustanovljena između virgilnih junica i krava koje su osemenjene od 5,1-10 puta i krava sa 1-5 i 10,1 i više osemenjavanja ($p > 0,05$). Ova razlika je visoko statistički značajna kada se uporede junice sa kravama osemenjenim 10,1 i više puta ($p > 0,01$). Najniže vrednosti titra ($-\log_2 n$) su zabeležene u krvnom serumu junica koje nisu osemenjavane ($2,70 \pm 1,22$), a najviše kod krava koje su osemenjene više od 10 puta ($4,73 \pm 2,61$).

Posmatrajući sa aspekta da je kritična koncentracija ASA koja može da ugrozi uspeh oplodnje i razvoj zametka viša od 1:64 ($-\log_2=6$); (prema Bratanovu i Dikovu, 1959), izvršena je trijaža krava na osnovu visine ASA IgA klase protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču i „Biociphos+” u krvnom serumu (Milovanović, 2005). Visoka statistička značajnost razlika postojala je u dužini servis perioda. Grla sa nižim titrom imala su prosečnu dužinu servis perioda od $185,18 \pm 107,35$ dana, u odnosu na krave sa titrom većim od 1:64, gde je servis period iznosio $243,64 \pm 126,21$ dan (TRIS-žumančani razređivač, $p > 0,05$). Slične vrednosti su dobijene za dužinu servis perioda kada su korišćeni spermatozoidi suspendovani u

razređivaču „Biociphos+”. Razlika u broju osemenjavanja u poslednjem ciklusu je visoko statistički značajna između ove dve grupe ($2,33 \pm 1,46$: $3,84 \pm 2,46$; p 0,01), a vrlo visoko statistički značajna prema broju osemenjavanja po steonosti ($3,65 \pm 2,14$: $4,40 \pm 2,04$; p 0,001) i ukupnom broju osemenjavanja ($7,85 \pm 5,22$: $10,36 \pm 5,16$; p 0,001), kada su se kao antigeni koristili spermatozoidi suspendovani u TRIS-žumančanom razređivaču.

Jačević i sar. (1999) koji su utvrdili da se stepen aglutinacije spermatozoida antitelima iz krvnog seruma i cervikalne sluzi junica i krava u većini uzoraka značajno smanjuje kada se za izvođenje testa upotrebe spermatozoidi prethodno suspendovani u razređivač pod komercijalnim nazivom „Biociphos+”. Plotkinje od kojih su uzimani uzorci za ova ispitivanja bile su isključivo osemenjavane spermatozoidima suspendovanim u TRIS-žumančanom razređivaču. U našem ispitivanju većina plotkinja je imala kontakt sa spermatozoidima suspendovanim u obe vrste razređivača. Jasnija saznanja o uticaju vrste razređivača na visinu stvorenih antitela postigla bi se formiranjem grupa plotkinja koje bi bile osemenjavane samo spermatozoidima suspendovanim u pojedinim razređivačima.

Ovi rezultati jasno ukazuju da postoji sistemski humoralni odgovor imunološkog sistema plotkinja na spermatozoide i/ili sastojke razređivača. Porast vrednosti ASA u krvnom serumu proporcionalan je broju VO, što je u saglasnosti sa drugim autorima (Griffin i sar., 1973; Vukotić, 1986; Jačević, 1998; Lazarević i sar., 2003). Na osnovu rezultata naših ispitivanja može se zaključiti da je ovaj porast posledica povećanja titra ASA IgA klase. Antitela protiv spermatozoida klase IgG, po svemu sudeći nemaju značajniji efekat u ovom smislu.

Kako titar ASA raste sa povećanjem broja osemenjavanja i narušavanjem plodnosti, uspostavlja se „začarani krug”. Iz tog razloga, Zralý i sar. (2003) savetuju da se plotkinje osemenjavaju tek nakon potpunog izlečenja puerperalnih oboljenja i saniranja endometrijalnih lezija. Grla koja su bila uključena u naš ogled su u proseku imala visok indeks osemenjavanja, produžen servis period, sa dosta rutinskih tretmana u vidu ispiranja materica. Ovo su predisponirajući faktori koji kod izvesnog broja plotkinja sa znatno produženim servis periodom omogućavaju ulazak u „začarani krug”, gde sa srazmerno većim brojem osemenjavanja nalazimo signifikantno viši titar ASA IgA u krvnom serumu.

ZAKLJUČCI

1. Između grupa neosemenjenih junica, krava i junice osemenjenih 1-5 puta, krava osemenjenih 6-10 puta i krava, koja su za života osemenjene više od 10 puta, tehnikom IIF nisu uočene statistički značajne razlike u titru ASA IgG klase protiv spermatozoida suspendovanih u obe vrste razređivača (TRIS-žumančanom i „Biociphos+”). Titar antitela IgG klase uglavnom ne prelazi vrednosti od 1:64, za koje se smatra da potencijalno mogu ugroziti plodnost stada. Antitela protiv spermatozoida klase IgG, po svemu sudeći, nisu od značaja u ovom smislu.

2. Analiza titra ASA IgA klase u krvnom serumu između ispitanih grupa krava jasno ukazuje na postojanje sistemske reaktivnosti imunskog sistema plotkinja protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom i „Biociphos+” razređivaču.
3. Između visine titra ASA IgA klase i broja osemenjavanja postoji direktna zavisnost i sa povećanjem broja osemenjavanja povećava se statistička značajnost razlika u visini titra ASA IgA klase u krvnom serumu plotkinja.
4. Titar ASA IgA klase u krvnom serumu virgilnih junica je značajno manji u odnosu na grupe krava sa različitim brojem ukupnih osemenjavanja i postoji jasan porast titra ASA IgA klase sa brojem ukupnih osemenjavanja, bez obzira na vrstu korišćenog razređivača.

LITERATURA

1. Bratanov K, Dikov V.: Research on spermagglutination in connection with fertility in cows. U: Proc Word Cong Fert Ster, 1959, 923 - 928.
2. Bratanov K, Torniyov A, Hristova-Koleva M: Studies on the immunoglobulins in secretion of the female reproductive tract. U: Third Int Symp Immunol Reprod, Varna, Abstracts, 1975, p. 68.
3. Bronson R.: Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines, *Journal of Reproductive Immunology*, 45, 159-83, 1999.
4. Chacin M.F.L, Hansen P.J, Drost M.: Effects of stage of the estrous cycle and steroid treatment on uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle, *Theriogenology*, 34, 1169-84, 1990.
5. Cookson A.D., Thomas A.N, Foulkes I.A.: Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa, *Journal Fert Reprod*, 70, 599-604, 1984.
6. Coulter G.H., Foote R.H., Sehaiavo J.J., Brava R.K.: Antibodies to egg-yolk in blood serum of rabbits and cattle and cervical mucus inseminated artificially, *Theriogenology*, 6, 5, 585-7, 1976.
7. Farahani J.K, Tompkins W, Wagner W.C.: Reproductive status of cows and incidence of antisperm antibodies, *Theriogenology*, 15, 605-12, 1981.
8. Griffin J.F.T, Hartigan P.J., McGilligan C.A., Nunn W.R.: Antibodies to semen diluent and infertility in rabbits, *Theriogenology*, 1, 2, 55-61, 1974.
9. Hunter A.G., Alsum D.J.: Immunological suppression of fertility in rabbits inseminated with egg-yolk citrate extender, *J Dairy Sci*, 52, 6, 922, 1969.
10. Jačević Vesna: Spermaglutinini u krvnom serumu i cervikalnoj sluzi junica i krava sa različitim indeksom osemenjavanja, magistarski rad, Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 1998.
11. Kanchev L, Pavlova S, Danev A.: Assesment of circulating agglutinating antisperm antibodies in buffalo cows with unexplained infertility and attempt to identify buffalo sperm isoantigens, *Am J Reprod Immun*, 29, 62-8, 1993.

12. Kutteh W.H, Blackwell R.E, Gore H, Kutteh C.C, Carr B.R, Mestecky J.: Secretory immune system of the female reproductive tract, II: Local immune system in normal and infected fallopian tube, *Fertil Steril*, 54, 51-5, 1990.
13. Kutteh W.H, Hatch K.D, Blackwell R.E, Mestecky J.: Secretory immune system of the female reproductive tract, In: Immunoglobulin and secretory component-containing cells, 1988.
14. Kutteh W.H, Mestecky J.: The concept of mucosal immunity, In: Bronson R.A, Alexander N.J, Anderson D, Branch D.W, Kutteh W.H (Eds.), *Reproductive Immunology*, Cambridge, MA: Blackwell Science, 1996, 28-51.
15. Lazarević M: Lokalni imunitet i neplodnost, Zbornik radova 4. savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja, *Clinica veterinaria*, 155-162, 2003.
16. Lazarević M, Jačević Vesna, Žderić M, Jakovljević G.: Spermaglutinini u krvnom serumu i cerviko-vaginalnoj sluzi junica i krava, U: Zbornik kratkih sadržaja radova, 9. savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor, 10-14 decembar, 1996, 59-61.
17. Max A.: Analysis of causes of ineffective insemination of cows based on clinical, hormonal and immunological examinations, *Med Weter*, 46, 352-4, 1990.
18. Milovanović A., Lazarević M., Kirovski D., Jovičin M., Barna T.: Antispermalna antitela u cervikalnoj sluzi junica i krava i njihov uticaj na reproduktivne pokazatelje U: 5. simpozijum Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda, Banja Kanjiža, 4.-7. jul 2007.godine, urednik Horea Šamanc, Beograd: Veterinarska komora Srbije, 2007, str.189-195.
19. Milovanović A.: Određivanje antitela protiv antigena spermatozoida u krvnom serumu i cervikalnoj sluzi junica i krava metodom indirektno imunofluorescencije : magistarska teza. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, Katedra za fiziologiju i biohemiju, 2005.
20. Seshagiri V.N, Pattabiraman S.R, Krishnan A.R.: Incidence of sperm agglutinating antibody in regular and repeat breeding cross bred cows, *Chetron*, 16, 152-4, 1987
21. Schumacher G.F.B, Immunology of spermatozoa and cervical mucus, *Human Reproduction*, Vol. 3, No. 3, pp. 289-300, 1988.
22. Tanabe T. Y., Casida L. E.: The nature of reproductive failures in cows of low fertility, *J. Dairy Sci.* 32,237, 1949.
23. Youngquist R.S., Bierschwal C.J, Clinical Management of Reproductive Problems in Dairy Cows, *Journal of Dairy Science* Vol. 68, No. 10, 1985.
24. Wang G.L, Xie C.X.: The relationship between antisperm antibodies and progesterone in the serum of infertile dairy cows, *Acta Vet Zootec Sinica*, 21, 126-30, 1990.
25. Zral? Z, Čanderle J, Diblíková I, Vecová D, Mašková J, Kummer V.: Antisperm Antibodies in Cows as Related to Their Reproductive Health, *Acta Vet, Brno*, 72, 27-32, 2003.

Primljeno: 12.02.2009.

Odobreno: 03.03.2009.