



TRANSCERVICALNO OSJEMENJIVANJE KUJA

TRANSCERVICAL INSEMINATION IN BITCHES

Juraj Šavorić¹, Martina Lojkić¹, Nino Maćešić¹, Ivan Butković¹, Ivan Tomić¹

¹Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Klinika za porodništvo i reprodukciju, Zagreb, R. Hrvatska

Kratak sadržaj

Umjetno osjemenjivanje kuja donosi brojne prednosti u odnosu na prirodno parenje, osobito u suvremenom načinu života. Iako su prvi postupci opisani prije mnogo godina, kontinuirani napredak, potaknut željom za boljom stopom koncepcije, doveo je do razvoja različitih metoda za određivanje optimalnog vremena osjemenjivanja kuja, kao i različitih postupaka umjetnog osjemenjivanja. Svaka od opisanih metoda ima svoje prednosti i nedostatke, no trenutačno najpouzdanija i najraširenija metoda određivanja optimalnog vremena za umjetno osjemenjivanje jest određivanje razine progesterona u krvi. Od dostupnih metoda osjemenjivanja, vaginalno osjemenjivanje daje zadovoljavajuće rezultate u pogledu koncepcije, no bolji rezultati postižu se endoskopskim transcervikalnim osjemenjivanjem. Osim veće stope koncepcije, ta metoda omogućuje i korištenje duboko smrznutog sjemena, čime se znatno proširuju mogućnosti u odabiru mužjaka. Zbog dobroti kuja, korištenje kirurških metoda osjemenjivanja postaje sve upitnije, pa je transcervikalno osjemenjivanje jedina prihvatljiva metoda za primjenu smrznutog sjemena. Zahvaljujući tehnološkom napretku i rastućoj konkurenciji na tržištu, oprema potrebna za izvođenje endoskopskog osjemenjivanja postala je dostupnija nego ikada prije.

Ključne riječi: Optimalno vrijeme osjemenjivanja, progesteron, transcervikalno osjemenjivanje, umjetno osjemenjivanje

Summary

Artificial insemination of bitches offers numerous advantages compared to natural mating, particularly in modern lifestyles. Although the first procedures were described many years ago, continuous progress, driven by the desire for improved conception rates, has led to the development of various methods for determining the optimal time of insemination in bitches, as well as different artificial insemination techniques. Each of the described methods has its advantages and

disadvantages, but at present the most reliable and widely used method for determining the optimal time for artificial insemination is measuring blood progesterone levels. Among the available insemination methods, vaginal insemination provides satisfactory conception results, but better outcomes are achieved with endoscopic transcervical insemination. In addition to higher conception rates, this method also enables the use of deep-frozen semen, which significantly broadens the possibilities in male selection. Due to animal welfare considerations, the use of surgical insemination methods is becoming increasingly questionable, making transcervical insemination the only acceptable method for the application of frozen semen. Thanks to technological advances and growing market competition, the equipment required for endoscopic insemination has become more accessible than ever before.

Keywords: *Optimal insemination timing, progesterone, transcervical insemination, artificial insemination*

UVOD

Pojam umjetno osjemenjivanje označava prikupljanje ejakulata mužjaka i plasiranje istoga u ženku. Prvo uspješno umjetno osjemenjivanje učinio je Fr Abbe' Lazzaro Spallanzani u Italiji 1780 godine (Mason, 2018). Umjetno osjemenjivanje (UO) omogućava odsustvo fizičkog kontakta parnjaka, uporabu sjemena vrijednih pasa širom svijeta, izbjegavanje stresa povezanog s transportom životinja i križanja u srodstvu. Ono omogućuje i dobivanje potomstva kada fizičke abnormalnosti i poremećaji ponašanja u mužjaka i ženki sprječavaju prirodno parenje. (Maćešić i sur., 2020.) Također, sprečava širenje spolno prenosivih bolesti. To se postiže uporabom svježeg, ohlađenog ili duboko smrznutog sjemena pasa (Lojkić i sur., 2012).

Spolni ciklus kuja

Spolni ciklus kuja podijeljen je u četiri faze: Proestrus, estrus, diestrus i anestrus. Proestrus traje od tri do 27 dana, najčešće oko devet dana, a karakteriziraju ga otečenost stidnice, pojava serosangvinoznog iscjetka iz stidnice. Ženke privlače mužjake, međutim ne dozvoljavaju parenje. Estrus u prosjeku traje devet dana, no može trajati od tri do 21 dan. Smanjuje se edem stidnice i iscjedak iz stidnice, te kuje dozvoljavaju parenje. Također, kada je kuja spremna za parenje, prisutni su i spolni refleksi: dizanje repa, širenje nogu i podizanje stidnice. Kuja stoji mirno kada ju pas zaskoči i odmiče rep pri njuškanju stidnice (Cergolj i Samardžija, 2006). Tijekom diestrusa potpuno izostaje iscjedak, kuje ne dozvoljavaju parenje i traje od 50 do 80 dana u negravidnih jediniki, dok u gravidnih završava 62-64 dana od ovulacije. Anestrus traje od jednog do osam mjeseci (nakon poroda 135 dana) tijekom kojih nema vanjskih znakova reproduktivne aktivnosti (Root Kustritz, 2012).

ODREĐIVANJE OPTIMALNOG VREMENA PARENJA

Klinički pregled

Prema opisanim promjenama tijekom spolnog ciklusa možemo prema vanjskim znakovima i kliničkom pregledu zaključiti u kojoj fazi ciklusa se kuja nalazi. Međutim, opisana metoda je subjektivna i budući da ne iskazuje svaka jedinka opisane promjene jednakim intenzitetom, metoda je podložna krivoj procjeni i valja je koristiti samo kao nadopunu ostalim metodama. (Skliarov i sur., 2022)

Vaginalna citologija

Vaginalna citologija je brza i povoljna dijagnostička metoda određivanja optimalnog vremena umjetnog osjemenjivanja, a može se koristiti zajedno s ostalim metodama. Vrlo je korisna u određivanju faze spolnog ciklusa, budući da se stanice mijenjaju ovisno o razini estrogena. Tijekom proestrusa razina estrogena je visoka, zbog kojeg dolazi do edema i hiperplazije sluznice rodnice. Superficialne stanice se odmiču od krvožilja u submukozi, te dolazi do smanjene oksigenacije i smrti stanica. Ovaj proces vidi se na promjenama u stanicama u vidu njihovog povećanja, promjeni u odnosu omjera citoplazma:jezgra, piknozi jezgre i orožnjavanju stanica. Izvodi se sa sterilnim štapićem za bris, koji se na aseptičan način uvađa u rodnicu i uzima obrisak stijenke rodnice. Vrh štapića se potom naslanja i prevlači preko predmetnice, boja (najčešće koristeći Diff-Quick metodu bojanja) i promatra na mikroskopu. Na razmazu vaginalnog citološkog brisa mogu se razlikovati četiri tipa površinskih stanica: parabazalne, intermedijalne, superficialne i anuklearne stanice. Parabazalne naliježu uz bazalnu membranu, male su i okrugle sa izraženom jezgrom i malim omjerom citoplazma/jezgra. Ovaj tip stanica je uvijek prisutan u rodnici. Kada su prisutne intermedijalne stanice, one naliježu na parabazalne stanice. Iako su slične morfologije, razlikuju se po tome što su veće od parabazalnih i imaju veći omjer citoplazma/jezgra. Ova dva tipa stanica ubrajaju se u neorožnjale stanice. Superficialne stanice su velike, često nepravilnog oblika s velikim omjerom citoplazma:jezgra. Dije se na one sa i na one bez jezgre koje nastaju u ranom estrusu. Obje spadaju u orožnjale stanice. Od ostalih stanica, prisutne su polimorfonuklearne stanice odnosno neutrofili, eritrociti i bakterije. (Root Kustritz, 2020) Početkom estrusa u razmazu brisa prevladavaju orožnjale stanice (50%), dok tijekom plodnog perioda njihov postotak prelazi 90% od ukupnih stanica na predmetnici. Otprilike šest dana nakon ovulacije dolazi do povrata neutrofila i parabazalnih stanica, s naglim padom kornificiranih epitelnih stanica, čime se označava kraj plodnog perioda. Mana opisane metode je ta da se ne može potvrditi ovulacija, nego porast i pad razine estrogena, te je subjektivna. (Jeffcoate i Lindsay, 1989; Mason, 2018).

Vaginalna endoskopija

Vaginalna endoskopija može biti upotrebljena za određivanje plodnog perioda, ali ne omogućava određivanje točnog vremena ovulacije. Zahtijeva iskustvo u izvedbi i opremu, a ponekad i sedaciju. Korisna je metoda u dijagnostici anatomskih abnormalnosti koje mogu utjecati na uspješnost oplodnje. (Payan-Carreira i sur., 2011). Najčešće upotrebljavamo rigidne endoskope sa optičkim vlaknom, a mogu nam poslužiti i fleksibilni endoskopi. Zbog povećane koncentracije estrogena, poveća se broj nabora sluznice. U proestrusu su nabori okrugli, izbočeni, vlažni, svijetlog izgleda i između nabora se primjećuje bistar krvavi iscjedak. U kasnoj fazi proestrusa, kada nivo estrogena pada dolazi do dehidracije sluznice, gubitka edema, a sluznica poprima naborani izgled (Wilson, 2005). U početku estrusa, nabori sluznice su stisnuti i više ne ispunjavaju lumen vagine. Sluznica postaje izrazito blijeda. U kasnijoj fazi estrusa nabori su potpuno stisnuti i angularnog oblika. Lumen vagine je vidljiv u potpunosti (Folnožić i sur., 2009; Wilson, 2005). U diestrusu su na sluznici vagine vidljiva difuzna područja hiperemije, iscjedak je oskudan, nabori sluznice ponovo imaju okrugao profil, ali ostaju niski i neizraženi (Wilson, 2005). Tijekom anestrusa, vaginalna sluznica je relativno ravna, suha i ružičaste boje (Maćešić i sur. 2020.)

Mjerenje razine hormona u serumu

Određivanje razine progesterona (P4) u serumu vrlo je korisna i pouzdana metoda određivanja optimalnog vremena umjetnog osjemenjivanja. P4 raste od vala luteinizirajućeg hormona (LH) i koristi se kao indirektni pokazatelj ovulacije. Koncentracija P4 raste kroz estrus i rani diestrus kada se cerviks zatvara djelovanjem P4 (Mason, 2018). Uzorkovanje se provodi svakih dva do tri dana. Razina od dva nanograma u mililitru (ng/mL) obično pokazuje nastanak LH vala, a ovulacija započinje razinom od četiri do osam ng/mL, a završava s razinama većim od 10 ng/mL. (Farstad, 2010). U današnje vrijeme, koncentracija P4 se određuje iz seruma metodom kemoluminiscencije. Uzimanje krvi za P4 najbolje je učiniti na tašte. Uzorke ne treba pohranjivati u hladnjak 2 sata od uzimanja zato što će izmijeniti koncentraciju P4, odnosno treba odvojiti serum ukoliko uzorak pohranjujemo u hladnjak unutar 2 sata od uzimanja (Volkmann, 2006).

TEHNIKE UMJETNOG OSJEMENJIVANJA

Vaginalno umjetno osjemenjivanje

Vaginalno osjemenjivanje najčešće se koristi pri upotrebi svježeg ili ohlađenog ejakulata i nije prikladno za upotrebu duboko smrznutog sjemena, zbog toga što vaginalno osjemenjivanje zahtijeva dovoljnu pokretljivost spermija tijekom dužeg vremena, kako bi sjeme moglo proći kroz cerviks i stići do jajovoda. (Suzuki i sur., 2022) Transvaginalno se osjemenjuje upotrebom plastičnog katetera (npr. goveđi uterini kateter odrezan na određenu dužinu) na koji je pričvršćena jed-

nokratna plastična brizgalica (Farstad, 2010). Pipeta se uvodi u rodnicu dok kuja stoji i umeće se pažljivo do baze paracerviksa, pazeći da se izbjegne ulaz u uretru. Sjeme se aplicira duboko intravaginalno. Pipetu treba navlažiti ejakulatom ili razrjeđivačem te nježno uvesti u vaginu po dorzalnoj stjenki. Pritom je preporučljivo pipetu rotirati lagano lijevo – desno. Smjer uvlačenja je prvo dorzokranijalan, a poslije usporedan sa kralježnicom. Kada prilikom guranja osjetimo čvršći otpor, prestanemo s guranjem i počnemo sa polaganom aplikacijom sjemena. Ako je pipeta na pravom mjestu i kuja spremna na osjemenjivanje, negativan tlak pomagat će istjecanju sjemena (Cergolj i Samardžija, 2006.) Izvodi se sa plastičnim kateterom ili sa komercijalnim kateterom u savitljivoj cijevi od lateksa sa balonom na napuhavanje pri vrhu (engl. cuff), koji sprečava povrat sjemena prilikom polaganja. (Linde Forsberg, 2005; Farstad, 2010. Dostupno je nekoliko prilagođenih balon katetera za vaginalno osjemenjivanje kuja. Osiris kateter (IMV technologies, Francuska) je rigidni kateter sa balonom za napuhavanje blizu distalnog otvora. Dužine je oko 25 cm i 5 mm u promjeru. Kateter je prikladan za osjemenjivanje malih i srednjih pasmina kuja. Mavic kateter (MOFA Global, Verona, WI) je plastični kateter sa stiletom u sredini i balonom za napuhavanje na distalnom kraju. U istu svrhu može se primijeniti i Foley kateter koji je fleksibilan sa balonom za napuhavanje na distalnom dijelu te je dostupan u različitim veličinama (Mason, 2018). Tijekom umjetnog osjemenjivanja, poželjno je kuji držati stražnji dio tijela u zraku, pri tome ne pritiskajući abdomen, pri kutu od 45-60 stupnjeva, kako bi bio što manji povrat sjemena. U navedenom položaju potrebno je držati kuju od pet do 20 minuta nakon UO. (Payan-Carreira i sur., 2011; Pinto i sur., 1998)

TRANSCERVIKALNO UMJETNO OSJEMENJIVANJE (TCI)

Slijepo TCI s norveškim kateterima

Norveški kateteri upotrebljavaju se za transcervikalno umjetno osjemenjivanje. Sastoje se vanjskog sloja najlona s unutarnjim metalnim stiletom, te ima zaobljen distalni kraj. Potrebna oprema se sastoji metalnog katetera (tri različite veličine) i zaštitne navlake. Metoda zahtjeva preciznu palpaciju i fiksaciju cerviksa maternice preko trbušne stijenke u kaudalnom dijelu trbuha i precizno uvlačenje katetera kroz cervikalni kanal. Sjeme se polaže u maternicu (Linde Forsberg, 1991). Koristeći se ovom metodom moguće je osjemeniti široki spektar pasmina iako velike i pretile pasmine mogu predstavljati problem (Folnožić i sur., 2009). Postupak je brz i jednostavan, relativno jeftin, a može se upotrijebiti svježi, ohlađeni ili duboko smrznuti ejakulat. Mana metode je dugotrajno usavršavanje metode i nemogućnost provjere točnog mjesta plasiranja sjemena (Duboko intravaginalno ili intrauterino.). (Mason, 2018).

Endoskopsko TCI

Endoskopsko transcervikalno osjemenjivanje (TCI) je razvijeno kao alternativna tehnika norveškom kateteru. Endoskopska metoda osigurava vizualizaciju

cerviksa i prolaz plastičnog katetera kroz cervikalni kanal (Wilson, 2003). Mali je izbor opreme koja odgovara specifičnim zahtjevima potrebnim za transcervikalno osjemenjivanje. Za potrebe TCI koristi se humani produženi cistoureteroskop (Karl Storz Veterinary Endoscopy – America Inc.) ili Minitube TCI endoskop (Minitube of America, Inc., Verona, WI, USA), hladni izvor svjetla, TCI kateter (Minitube TCI kateter promjera 3, 4 i 5 Fr, dužine do 56 cm), kamera i monitor (Romagnoli i Lopate, 2014; Folnožić i sur., 2009) navode da kateterizaciju cerviksa izvodimo urinarnim kateterom 6-8 Fr. Endoskop uvodimo kroz dorzalnu komisuru stidnih usana kako bi izbjegli klitoris koji se nalazi unutar ventralnih komisura. Karakteristični nabori potvrđuju poziciju cistoureteroscopa unutar vagine (Folnožić i sur., 2009). Ulaz u područje paracerviksa potvrđuje nam nalaz dorzalnog medijalnog nabora i polumjesečasti vaginalni lumen. Cervikalni tuberkul je posebna struktura na kranijalnom dijelu dorzalnog medijalnog nabora, odvojena od njega transverzalnim naborem. Cervikalna os nije odmah uočljiva zbog njezinog ventralnog položaja (Folnožić i sur., 2009). Endoskop na ovoj poziciji treba okrenuti za 40-60° prema gore u odnosu na horizontalnu liniju. U visini forniksa, endoskop treba pomaknuti kaudalno 1-2 cm kako bi se lakše vizualizirala cervikalna os (Lopate, 2012). Pronalazak cervikalne osi ponekad olakšava praćenje izlaska krvavog iscjetka ili zračnih mjehurića iz nje. Jednom kad je locirana, vrh katetera uvodimo u os zajedničkom manipulacijom cistoureteroscopa i katetera. (Folnožić i sur., 2009; Makloski, 2012). Sjeme se polako aplicira kroz kateter prateći istjecanje iz cervikalne osi (Mason, 2017) uz masažu stidnice kako bi se potaknule kontrakcije maternice (Mason, 2018). Kuja u estrusu, koja pokazuje uobičajeno ponašanje odlično podnosi zahvat, bez potrebe za sedacijom (Wilson, 2003; Folnožić i sur., 2009). Mnoge prepreke koje se pojavljuju tijekom usavršavanja tehnike moguće je nadići strpljivošću i praksom, a krajnji rezultat, preteći uspješnost koncepcije, može biti usporediv sa kirurškom tehnikom inseminacije. Nadalje, višekratne inseminacije doprinose veličini legla (Makloski, 2012). Metoda TCI je prikladna za svježe, ohlađeno i duboko smrznuto sjeme. Iako se metodom vaginalnog osjemenjivanja kuja postižu zadovoljavajući rezultati koncepcije, bolji rezultati postižu se TCI metodom. Metoda TCI ima veću stopu koncepcije u odnosu na laparoskopsku ili laparotomijsku metodu intrauterinog osjemenjivanja zbog izostanka stresa uzrokovnog kirurškim zahvatom i anestezijom, prisutnosti kontrakcija maternice te izostanka mogućih upala i komplikacija zacjeljivanja rane.

KIRURŠKO UMJETNO OSJEMENJIVANJE – LAPAROTOMSKO ILI LAPAROSKOPSKO OSJEMENJIVANJE

Laparotomsko umjetno osjemenjivanje

Klasična kirurška inseminacija je trenutačno najčešća tehnika jer je mjesto reza maleno sa minimalnom manipulacijom, a pas se nakon nekoliko sati otpušta kući. Kuju za ovaj po stupak treba uvesti u opću anesteziju, smjestiti na leđa te se u bijeloj liniji dužinom oko 3 cm učini rez. Maternica i maternični rogovi se izoliraju te se postavi sterilni hipodermalni kateter na materničnom tijelu ili na oba mater-

nična roga. Nakon toga se aplicira sjeme kroz postavljeni kateter u maternicu, a maternica se pritisne iznad cerviksa palcem i kažipstom da se spriječi istjecanje prema rodnici (Mason, 2018). Trbušna stjenka i koža se rekonstruira i životinja se budi iz anestezije te nakon oporavka otpušta kući (Brittain i sur., 1995; Makloski, 2012).

Laparoskopsko umjetno osjemenjivanje

Laparoskopsko osjemenjivanje ne koristi se često u praksi zbog visokih troškova, potrebnog znanja i iskustva, a i zbog manjka prednosti u odnosu na ostale metode osjemenjivanja. (Mason, 2018). Sjeme se aplicira u maternični rog kroz venski kateter a maternica se vizualizira laparoskopom spojenim na izvor svjetla i kameru. Maternični rogovi se podižu sa hvatalicom i približavaju abdominalnoj stijenci kako bi se mogao uvesti kateter. Postupak također zahtjeva opću anesteziju, uzrokuje manju trauma tkiva nego laparotomski zahvat stoga je brži oporavak. (Silva i sur., 1995).

ZAKLJUČAK

Metodom vaginalnog osjemenjivanja kuja postižu se zadovoljavajući rezultati koncepcije, ali su oni bolji TCI metodom. Metoda TCI ima veću stopu koncepcije u odnosu na laparoskopsku ili laparotomsku metodu intrauterinog osjemenjivanja zbog izostanka stresa uzrokovanog kirurškim zahvatom i anestezijom, prisutnosti kontrakcija maternice te izostanka mogućih upala i komplikacija zacjeljivanja rane. Osim smanjene stope koncepcije, problem etičnosti laparotomske intrauterine inseminacije (anestezija, kirurški zahvat, protuspermijska antitijela) daje prednost TCI nad kirurškom metodom osjemenjivanja.

Vlasnike treba upoznati sa svim dostupnim metodama osjemenjivanja te koja je metoda najprikladnija za njihovu životinju.

LITERATURA

1. Brittain D, PW Concannon, JA Flanders, 1995, Use of surgical intrauterine insemination to manage infertility in a colony of research German shepherd dogs, *Lab Anim Sci*, 45, 404 –7.
2. Cergolj M, M Samardžija, 2006, *Veterinarska andrologija*, Odabrana poglavlja, Medicinska naklada, Zagreb, 15, 66, 139-42, 169-94.
3. Farstad WF, 2010, Artificial insemination in dogs, England G, von Heimendahl A, editors, *BSAVA Canine and Feline Reproduction and Neonatology*, 80 – 9.
4. Folnožić I, T Karadjole, G Bačić, N Maćešić, M Lojkić, M Samardžija, I Getz, 2009, Vaginoskopija kuja, *Vet Stn*, 40, 27 – 36.
5. Jeffcoate IA, FEF Lindsay, 1989, Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches, *J Reprod Fert*, 39, 277-287.
6. Linde Forsberg C, 1991, Achieving Canine Pregnancy by using Frozen or Chilled extended Semen, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 21, 467-485.
7. Linde Forsberg C, 2005, Artificial Insemination, ESAVS-EVSSAR Course Reproduction in companion, exotic and laboratory animal, Nantes 12th-17th September 2005.

8. Lojkić M, N Maćešić, G Bačić, T Karadjole, M Samardžija, I Getz, I Folnožić, M Cergolj, T Dobranić, B Škrilin, Z Vrbanac, 2012, Uporaba duboko smrznute i ohlađene pseće sperme na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zbornik radova 5. hrvatskog veterinarskog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet, 423-9.
9. Lopate C, 2012, Transcervical endoscopic procedures in the Bitch, *Clin Theriogenology*, 4, 213–24.
10. Maćešić N, G Bačić, T Karadjole, M Samardžija, N Prvanović Babić, S Vince, M Efendić, I Butković, J Šavorić, M Lojkić, 2020, Endoskopsko osjemenjivanje kuja, 11, Naučni simpozijum reprodukcija domaćih životinja, zbornik predavanja, 33-41.
11. Makloski CL, 2012, Clinical techniques of artificial insemination in dog, *Vet Clin Small Anim*, 42, 439-44.
12. Mason SJ, 2017, A retrospective clinical study of endoscopic-assisted transcervical insemination in the bitch with frozen-thawed dog semen, *Reprod Domest Anim*, 52, 275–80.
13. Mason SJ, 2018, Current Review, Artificial Insemination in Dogs, *Vet Clin Small Anim*, 48, 567-80.
14. Payan-Carreira R, S Miranda, W Nizanski, 2011, Artificial Insemination in Dogs, *Artificial Insemination in Farm Animals*, InTech, 51-61.
15. Pinto CR, BE Eilts, DL, Paccamonti, 1998, The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches, *Theriogenology* 50, 301-305.
16. Romagnoli S, C Lopate, 2014, Transcervical Artificial Insemination in Dog and Cats: Review of the Technique and Practical Aspects, *Reprod Dom Anim*, 49, 56-63.
17. Root Kustritz MV, 2020, Vaginal Cytology in the Bitch and Queen, *Veterinary Cytology SHARKEY et al, ed., John Wiley & Sons, Inc.* pp. 552-558.
18. Root Kustritz MV, 2012, Managing the reproductive cycle in the bitch, *Vet Clin Small Anim*, 42, 423-437.
19. Silva LD, K Onclin, F Snaps, J Verstegen, 1995, Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch, *Theriogenology* 43, 615-623.
20. Skliarov P, O Holubiev, R Mylostyvyi, 2022, Determining the optimal insemination time of bitches, *FAVE, Secc Cienc ve*, 21.
21. Suzuki H, H Watanabe, Y Abe, 2022, Assisted reproductive techniques for canines: preservation of genetic material in domestic dogs, *J Reprod Dev*, 68, 1–11.
22. Volkmann DH, 2006, The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentrations, *Theriogenology*, 66, 1583–6.
23. Wilson MS, 2003, Endoscopic Transcervical Insemination in the Bitch, Concannon PW, England G, Verstegen JP, Linde Forsberg C, editors, *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 1-6.
24. Wilson MS, 2005, Vaginoscopy and Endoscopic Transcervical Insemination in the Bitch, Timothy C, McCarthy, editors, *Veterinary endoscopy for the Small Animal Practitioner*, Elsevier Saunders, 413-23.