

Bedömning av spermimotoilitet i färsk, kyld samt selektad hingstsperma med Qualisperm™

Hanna Strutz

Handledare: Anne-Marie Dalin

Inst. för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion

Biträdande handledare: Jane Morrell

Inst. för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion

Biträdande handledare: Anders Johannisson

Inst. för anatomi, fysiologi och biokemi

Biträdande handledare: Heriberto Rodriguez-Martinez

Inst. för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	2
Summary.....	3
Inledning.....	4
Material och metoder	6
Hingstmaterial.....	6
Flödesschema	6
Koncentration.....	7
Selektion	7
Motilitetsbedömning.....	8
Statistik	9
Resultat.....	9
Analysresultat per hingst samt koppling till fertiliteten.	9
Spermahanteringens påverkan på motiliteten	12
Jämförelse mellan subjektiv och objektiv motilitet.....	14
Spermiekoncentrationens påverkan på resultatet från Qualisperm TM	15
Diskussion	15
Konklusion.....	18
Litteraturförteckning	19
Acknowledgements	21

SAMMANFATTNING

Detta EEF-projekt är en del av ett större projekt på SLU som genomförs vid avdelningen för reproduktion, institutionen för kliniska vetenskaper, vars syfte är att utvärdera och ta fram nya metoder för kvalitetssäkring av hingstsperma. Behovet av detta har uppstått då det under de senaste 10 åren skett en ökning av användandet av artificiell insemination med kyld transportsperma samtidigt som fölningsprocenten sjunkit. Detta delprojekts syfte var att utvärdera en objektiv metod för bedömning av motilitet med hjälp av Qualisperm, på färsk och kyld hingstsperma före och efter selektion genom centrifugering i kolloider.

Motiliteten bedöms idag subjektivt med hjälp av ljusmikroskop med faskontrast ute på hingststationerna, och flera tidigare studier har visat varierande samband vad gäller korrelationen mellan motilitet och fertilitet. Därför har metoder för mer objektiv mätning av motilitet tagits fram, ex CASA (Computer Assisted Semen Analysis) varav en ny variant är QualispermTM (Biophos AG, Switzerland) som bygger på en annan princip än tidigare CASA-maskiner. Då QualispermTM är både billigare och enklare att använda än tidigare CASA-maskiner lämpar den sig bättre för användning ute på hingststationerna. QualispermTM fotograferar spermerna och bestämmer sedan antal partiklar (spermier) som korsar olika fält och ger en regression algoritm av spermiehastighet, spermieantal och olika klasser av spermier (subpopulationer) efter typ av motilitet. Till skillnad från andra CASA-system som ofta analyserar ett par hundra spermier per prov analyseras här flera tusen spermier.

Detta delprojekt utfördes under tre veckor på Flyinge sommaren 2007. I studien ingick 10 hingstar. Från vardera hingsten undersöktes 3-4 ejakulat. Sperman analyserades för motilitet både på färska och kylda prover under tre dagar, samt både före och efter selektion genom centrifugering. Motiliteten bedömdes både subjektivt med ljusmikroskop och objektivt med QualispermTM, och dessa värden jämfördes sedan. Dessutom undersöktes hur motiliteten påverkades av rumstemperatur och selektion under 3 dagar.

Den statistiska analysen visade att det fanns en statistiskt signifikant korrelation mellan den subjektiva och den objektiva motiliteten. Det fanns också statistiskt signifikanta skillnader i motiliteten mellan de olika sätten att hantera sperman. Resultaten visade att motiliteten gynnades av selektion och förvaring i kylskåp. Även mellan de olika hingstarna fanns det skillnader i motilitet och hur länge spermerna överlevde beroende på förvaringstemperatur och selektion. Analys av spermier med avvikande typ av motilitet före och efter centrifugering visade att selektionen signifikant minskade andelen ”defekta” spermier.

Resultatet av studien visade att QualispermTM skulle kunna bli ett bra komplement ute på hingststationerna i framtiden. Dock finns fortfarande en viss subjektivitet inbyggd i analysmetoden i det att användaren själv väljer var i preparatet analysen skall ske, vilken bör arbetas bort. QualispermTM fungerar också bäst när användaren fått tillräckligt träning innan användning.

SUMMARY

This EEF-project is a part of a larger project at SLU, Division of Reproduction, Dept of Clinical Science, with the intention of developing and evaluating new methods for the assessment of stallion semen quality. Over the last 10 years there has been an increase in the use of artificial insemination with cooled semen in Swedish horse breeding. At the same time, foaling rates have decreased. This has led to a need for new and better methods of assessing the quality of stallion semen. This EEF-project was based on an objective method to calculate motility, with Qualisperm™, in fresh and cooled stallion semen, and after selection.

Today sperm motility evaluation is mainly done subjectively by visual assessment with a light microscope, and the correlation between these motility results and fertility have varied. Therefore, there have been a number of objective methods designed, for example CASA (Computer Assisted Semen Analysis) where Qualisperm™ (Biophos AG, Switzerland) is a new system based on different principles compared to earlier CASA-systems. While other CASA-machines takes a series of photographs and the trajectories are used to separate the sperm tracks into categories of different motility patterns, Qualisperm™ determines the number of particles (spermatozoa) crossing fields of view, yielding a regression fluctuation algorithm of sperm numbers and translation classes. Furthermore it analyzes thousands of spermatozoa per sample compared to other CASA-machines where often only a couple of hundred spermatozoa are measured. Qualisperm™ is also easier to use than other CASA-machines, which makes it more suitable for use out in the field.

This EEF-project was carried out on the national stud at Flyinge during three weeks in the summer of 2007. Three or four ejaculates /stallion from 10 stallions were analysed during 3 days for subjective and objective motility in fresh and cooled semen and after selection by centrifugation. The semen was kept both in room temperature and chilled at + 5 ° C, to study how the temperature would affect the motility.

The statistical analysis showed that there was a significant correlation between the subjective and objective motility. There was also a significant difference in motility depending on how the semen was handled (temperature and selection through colloid centrifugation). The results indicated that the motility was best preserved by selection and storage at + 5 ° C. There were also individual differences between stallions, concerning the time their spermatozoa kept their motility. Analysing spermatozoa with an atypical motility before and after centrifugation showed that this method effectively selected progressively moving spermatozoa

This study showed that Qualisperm™ could be a good complement to traditional methods in the field in the future, but some further development of the machine must first be done. There is still some subjectivness built in the method, since the user chooses the spot for the analyze, and there is also a need for training before using Qualisperm™.

INLEDNING

Inom dagens hästavel finns stor efterfrågan på åtkomlighet och bredd i det hingstmaterial som används. Ökad efterfrågan på populära hingstar har lett till en ökning av användandet av artificiell insemination (AI) och kyld transportsperma. Detta framgår av betäckningssiffror för AI-användande från Avelsförbundet för Svenska Varmblodiga Travhästen (ASVT) och Avelsförbundet för Svenska Varmblodiga Hästen (ASVH). År 1986 låg användningen av färsk sperma för artificiell insemination på 7 % hos halvblod och 54 % hos varmblodiga travhästar, av alla ston som betäcktes det året. Dessa siffror har sedan dess stigit fram till 2006, då motsvarande siffror för halvblod vad gäller AI var 25 % för färsk sperma, 63 % för kyld transportsperma och 4 % för fryst transportsperma. Detta innebär att endast 8 % av all betäckningar skedde naturligt. För varmblodstravarnas del användes 2006 45 % färsk sperma, 33 % av stona inseminerades med kyld transportsperma och 16 % med fryst sperma. Samtidigt som användandet av AI och kyld transportsperma har ökat har man sett att fölningsprocenten har sjunkit de senaste 10 åren. (Kareskoski et al 2006, Kuisma et al 2006). Till skillnad från exempelvis nöt-aveln, där man inriktar sig mycket mer på god fertilitet är hästaveln dessutom ffa prestationsbaserad (Colenbrander et al 2003). Sammantaget finns det därför inom hästaveln ett stort behov av bra metoder för kvalitetssäkring av hingstesperma, både för att kunna urskilja hingstar med nedsatt spermakvalitet som kanske inte lämpar sig för AI med exempelvis kyld sperma, men också för att i sig kunna förbättra spermans kvalitet.

De metoder för kvalitetssäkring som idag används ute på svenska hingststationer är ffa baserade på bedömning av spermans koncentration och volym, vilket är objektiva metoder, samt subjektiv bedömning av motilitet med hjälp av ljusmikroskop (Malmgren 1997). Dock är dessa parametrar inte nödvändigtvis de bästa när det gäller att bedöma hingstens fertilitet. När det gäller motilitetens korrelation till fertiliteten finns det motstridiga resultat (Voss et al 1981, Dowsett and Pattie 1982, Amann 1989, Samper et al 1991, Malmgren 1997, Graham 2001, Nie et al 2002, Rota et al 2004) som till en del beror på att motiliteten bedöms subjektivt. Detta kan leda till att bedömningen av samma preparat kan skilja sig mycket mellan olika personer. En objektiv motilitetsbedömning skulle troligen bättre kunna svara mot fertiliteten. Man får heller inte glömma bort att hingstens fertilitet varierar naturligt med säsong, ålder och samlingsfrekvens (Dowsett and Pattie 1982, Kuisma et al 2006, Malmgren 1997, Rousset et al 1987, Sieme et al 2004). Detta leder självklart till ytterligare svårigheter när det gäller att bedöma hur väl motiliteten överensstämmer med fertiliteten.

Vi har idag ca 69 hingststationer i Sverige, vilka har tillstånd från Jordbruksverket att samla och hantera sperma. Dessa är av varierande storlek och verksamhet. Det finns ett behov av bedömningsmetoder som är lätta av använda och objektiva, vilket gör analysresultaten jämförbara mellan stationer. Detta är något som skulle gagna hästaveln i framtiden då det blir lättare för stoägaren att planera sin avel med mer och säkrare information om hingstarna. Metoderna skall också vara praktiskt tillämpbara och ekonomiskt hållbara för stationen, även för den mindre stationen.

För objektiv motilitetsbedömning har ett antal metoder arbetats fram de senaste åren. Bl.a. CASA (Computer Assisted Semen Analysis) där en ny produkt vid namn QualispermTM (Biophos AG, Switzerland) arbetats fram. Vanligen arbetar CASA genom att fotografera och analysera upp till 100-150 spermier per prov. Apparaturen togs fram för ca 20 år sedan och har sedan använts både på human- och djursidan. Med denna utrustning kan flera olika sorters spermieparametrar bedömas. (Verstegen et al 2002). Apparaturen är dock dyr och stor vilket gör den mindre lämplig att använda på hingststationer. QualispermTM är en annan typ av CASA-instrument som arbetar genom att bestämma antal partiklar (spermier) som korsar olika fält (som läggs som optiska fält vid låg förstoring) och ger därefter en regressionalgoritm av spermiehastighet, spermie antalet och olika klasser av spermier (sub-populationer) efter typ motilitet.

Flera tusen spermier analyseras på detta sätt, jämfört med tidigare CASA-system som ofta analyserar endast ett par hundra spermier per prov. QualispermTM är lättare att använda än tidigare CASA-maskiner och är därför mer lämplig ute på hingststationerna i Sverige, förutsatt att den får fram säkra motilitetsresultat.

SLU har sedan ett par år tillbaka ett projekt i samarbete med Flyinge AB för att ta fram nya och förbättra de idag befintliga kvalitetskontrollmetoderna för hingstesperma. Detta EEF-arbete är en del av detta projekt och koncentrerar sig kring en objektiv metod till motilitetsbedömning.

Syftet med detta delprojekt var att med hjälp av QualispermTM (Biophos AG, Switzerland) utvärdera färsk och kyld sperma före och efter selektering genom Single-Layer-Centrifugation och jämföra resultaten med den subjektiva metoden. Dessutom utvärderades hur hanteringssätt och koncentration påverkade motiliteten.

Förra året gjordes ett liknande delprojekt, av Jessika Pettersson, som också utvärderade QualispermTM på Flyinge. QualispermsTM programvara har sedan dess omarbetats en del, och dessutom används nu vanliga objektsglas istället för Maklerkammare vid analysen.

Hur sperman hanteras efter samling har stor betydelse för dess kvalitet (Graham 2001), och att hitta hanteringsmetoder som gör att sperman kan lagras längre med bibehållen kvalitet ökar möjligheten att utnyttja sperma från åtråvärda hingstar under längre tid. Idag späds sperman med Kenney's eller andra typer av spädningssvätska till 1:1 alt 1:2 (ibland till och med 1:3) ute på hingststationerna, innan den packas för transport. Spädningen har visat sig gynnsam för spermiernas överlevnad då man tillsätter näring, antibiotika och buffring (Malmgren 1997, Rota et al 2004, Rousset et al 1987). För transporten samt för längre hållbarhet måste sperman även nedkylas. Spermans hållbarhet påverkas nämligen även av omgivningstemperatur (Malmgren 1997). Bland annat såg Malmgren et al. (1994) en längre hållbarhet hos sperma lagrad vid 5 ° C än vid 20° C. Man har dock sett att fertiliteten varierar mellan hingstar vid användning av kyld transportsperma, vilket tyder på att alla hingstars sperma ej lämpar sig för detta (Pickett and Amann 1995, Katila 1997).

Selektion genom centrifugering genom en kolloid (Thys 2007) är något man hoppas kunna använda i framtiden för att få fram de mest vitala spermerna och på så sätt höja fertiliteten. Att ta bort seminalplasman genom centrifugering har också visat sig vara positivt för spermans överlevnad (MacPherson et al 2002, Sieme et al 2004, Kareskoski et al 2006) Man bör dock tänka på att selektion minskar koncentrationen, vilket kan leda till problem. En normal inseminationsdos brukar ligga kring 500 miljoner progressivt motila spermier (Nie et al 2002).

Genom att i detta delprojekt dela upp ejakulat efter olika hanteringssätt kunde man följa hur motiliteten påverkades av selektion och omgivningstemperatur. Då tidigare studier enligt ovan har visat att spermier i längden mår bäst av selektion och förvaring i kyla var detta något vi ville fortsätta utvärdera.

Syftet med detta delprojekt var att utvärdera hur väl motiliteten framtagen med hjälp av QualispermTM kunde korreleras till den subjektivt bedömda motiliteten i ljusmikroskop. Vi ville även studera om det fanns skillnader i resultaten beroende på hanteringen av sperman. Dessutom ville vi undersöka inom vilka koncentrationer QualispermTM gav bäst utvärdering av motiliteten.

MATERIAL OCH METODER

Hingstmaterial

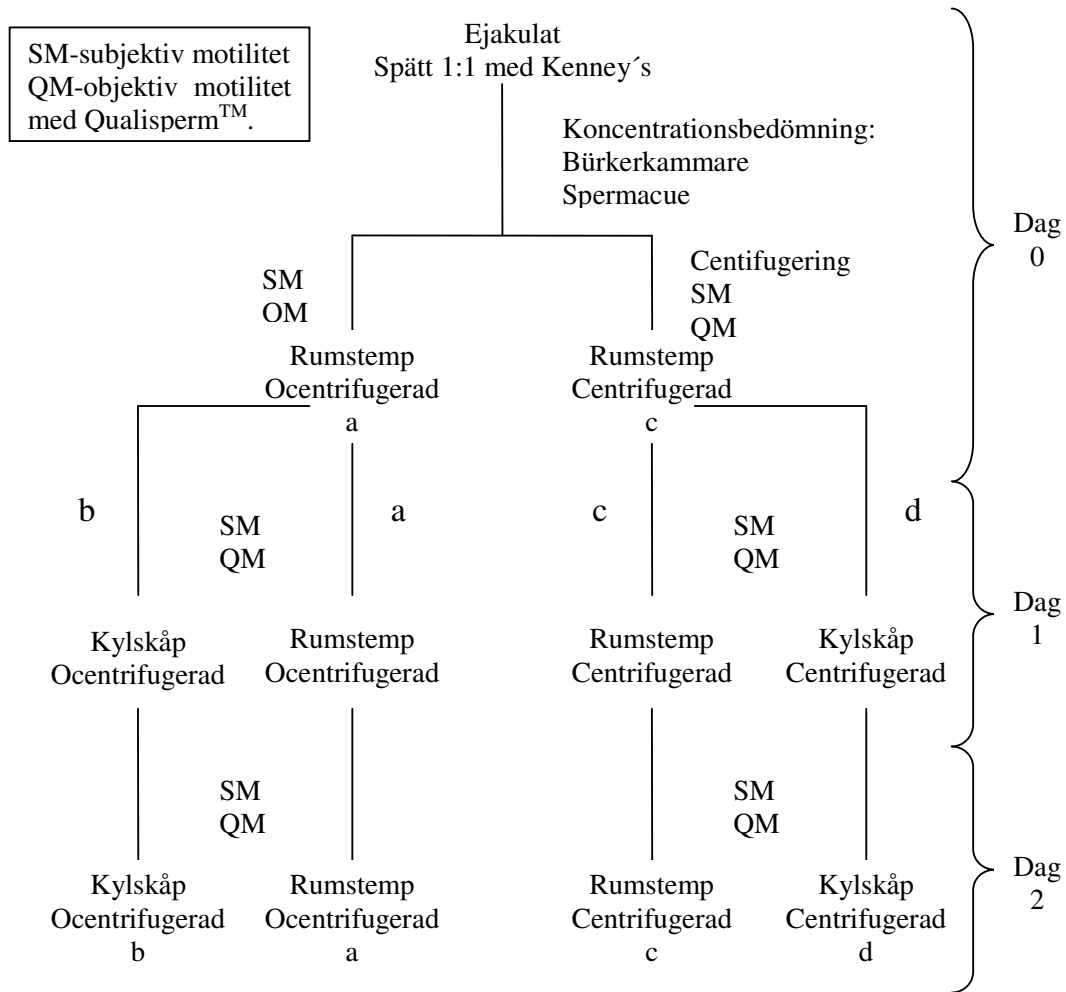
Hingstarna som ingick i studien bestod av 10 av Flyinges hingstar varav 9 var av halvblodstyp och en av ponnytyp. Hingstarna var mellan 4-24 år gamla. Sperman samlades med hjälp av en artificiell vagina av coloradotyp och analyserades på Flyinge hingststation under 3 veckor i juni 2007. Varje hingst samlades ungefär varannan dag och i studien ingick 3 till 4 ejakulat från vardera hingsten, vilket blev totalt 36 ejakulat. Vilka hingstar vi fick ejakulat från avgjordes på samlingsdagarna beroende på hur hårt bokade hingstarna var, dvs om det fanns sperma över till oss. Varje ejakulat analyserades under 3 på varandra följande dagar.

Flödesschema

Efter samling med artificiell vagina späddes sperman till 1:1 med Kenney's lösning vilken består av 4,9g glukos, 2,4g mjölkpulver, 0,15g dihydrostreptomycin och 0,15g penicillin vilket blandas i 100 ml sterilt vatten. Därefter analyserades koncentrationen med hjälp av Bürkerkammare och Spermacue.

Därefter kodades sperman vad gällde hingstens identitet och delades upp i ett a och ett c prov. C-provet centrifugerades och båda proverna förvarades sedan i rumstemperatur under 3 dagar (se figur 1).

Figur 1. Flödesschema för de olika beredningsformerna a, b, c och d under de 3 dagarna.



Koncentration

Spermiekoncentrationen räknades fram manuellt med hjälp av Bürkerkammare. 1 ml sperma späddes 1:100 med koksaltlösning och därefter lades en droppe från denna lösning i en Bürkerkammare med rutsystem. Antalet spermier räknades i ett fastställt antal rutor (25st) varefter koncentrationen spermier/ml räknades fram. Dessutom räknade Qualisperm™ fram ett koncentrationsvärde för varje prov som analyserades.

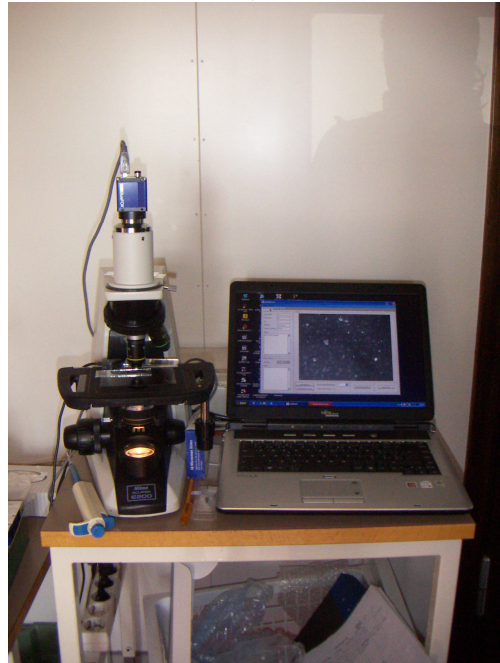
Selektion

Selektionen av spermerna skedde genom en "Single layer centrifugation" vilken utfördes av Jane Morrell. Detta innebär att 4 ml av en högdensitetskolloid pipetterades ner i ett centrifugrör. Därefter tillsattes 1,5 ml av sperman vilken innehöll ungefär 100 miljoner spermier per ml. Röret placerades i en centrifug och centrifugerades vid 300g i 20 minuter. Seminalplasman och gradientmaterialet sögs sedan bort och spermiepelletsen i botten späddes på nytt i 1 ml Kenney's lösning.

Motilitetsbedömning

Bedömare av den subjektiva motiliteten var ffa Jane Morrell de första dagarna under Flyingevistelsen och sedan Hanna Strutz, beroende på vem som hade mest tid. Den subjektiva motiliteten bedömdes genom att en droppe av den spädda sperman lades på ett objektglas med täckglas över. Objektglaset lades på en värmeplatta (38°C) i ett ljusmikroskop vartefter motiliteten bedömdes. Motiliteten bedömdes i % (0-100 %). Därefter togs ca 1 ml från a-provet och döptes till b och 1 ml från c-provet och döptes till d. Dessa prover förvarades i kylskåp (+ 5 ° C). Det innebar att det fanns fyra olika beredningsformer av sperman att analysera. Dag 0, dvs. samlingsdagen, analyserades a och c prover med Qualisperm™. Dag 1 och 2 analyserades förutom a- och c- dessutom b- och d-proverna. När den subjektiva motiliteten låg på ≤ 10 % räknades provet som "ej analyserbart" pga för låg motilitet, och analyserades inte vidare med Qualisperm™. Dessa prover räknades som "döda" följande dagar.

Qualisperm™ består av ett dataprogram samt en kamera (MV-D640-48-U2-10 Photon Focus Camera) kopplad till ett mikroskop (NikonE200) med faskontrastoptik. Apparaten tar 12 bilder per sekund av ett inprogrammerat optiskt fält i låg förstoring i 7 sekunder som sedan analyseras av programmet. Programmet räknar fram motilitet och koncentration och delar upp spermerna i olika subpopulationer. Detta sker genom att partiklarna (spermerna) emitterar ljus i faskontrast som registreras av programmet. Därefter beräknar programmet en algoritm av fluktuationer i ljusintensitet och en regressionsalgoritm tas fram, varifrån partiklarna ges olika hastigheter och delas in i subpopulationer efter typ av motilitet.



Vid analysen med Qualisperm™ tillsattes 5 μ l sperma till ett föruppvärmt objektglas (38 grader) och täcktes med ett täckglas. Provet studerades för att välja ut det mest representativa området att analysera vartefter analysen startades. Varje prov analyserades på 3-4 olika områden på objektglaset för att få fram ett så representativt värde som möjligt. Ibland behövde analysen upprepas när programmet haft svårt att bedöma bilderna. Detta hade med bildernas kvalitet att göra – ex för ljus/för mörkt, att sperman inte låg still (flöden kan uppstå i sperman när ett täckglas läggs på), för täta prov där spermerna låg i klumpar samt för låg koncentration. När bilderna var registrerade gav datorn andel spermier (%) som hamnat i respektive subpopulation samt koncentrationen. Subpopulation 1 och 2 bestod av spermier som låg still och gungade resp. snurrade i en cirkel. Hingst spermier har ett ovalt huvud och rör sig naturligt i stora vida cirklar, det är därför viktigt att apparaturen är inställd för rätt djurslag för att skilja på naturligt

cirklande och defekt cirklande i små snäva cirklar. I detta projekt har vi lagt störst tyngdpunkt på subpopulation 3 vilket är de spermier som har en snabb progressiv motilitet. Detta motilitetsvärde jämfördes sedan med det subjektiva motilitetsvärdet. Koncentrationen för varje motilitetsvärde antecknades också, för att om möjligt få fram inom vilka koncentrationer Qualisperm™ arbetar bäst.

Då motilitetsbedömningen gjordes på färska och kylda prov samt efter selektion av sperman kunde man följa hur motiliteten förändrades av selektion och omgivningstemperatur. I denna studie har tyngdpunkten dock lagts på hur väl Qualisperm™ kan arbeta med de olika formerna.

Statistik

Analysresultat från den subjektiva och objektiva motilitetsbedömningen, samt koncentrationen framtagen med Qualisperm har bearbetats statistiskt av docent Nils Lundeheim med hjälp av SAS (Statistical Analysis Systems package, version 9.1 SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA, 1989). För objektiv och subjektiv motilitetsbedömning samt för koncentrationen framtagen med Qualisperm räknades medelvärden och variationskoefficiens ut. Korrelationer mellan subjektiv och objektiv motilitet samt koncentrationen räknades fram med hjälp av Spearman (CORR Procedure), och variansanalysen för dessa tre värden när det gäller olika dagar och beredningsformer har räknats fram med Mixed Procedure.

Under hösten har vi även fått ta del av fertilitetsresultat från Flyinge, både totalt över säsongen 2007 samt för den perioden vi var på Flyinge. Dessa värden har använts för att jämföra med motsvarande motilitetsvärden.

RESULTAT

Analysresultat per hingst samt koppling till fertiliteten.

Antal analyserade ejakulat var 36 stycken uppdelade i 258 prover. En del prover (77st) föll bort pga. för låg motilitet ($\leq 10\%$). Fördelningen av prover för varje beredningsform och dag kan utläsas i tabell 1. Här framgår hur mycket de olika beredningsformerna minskade i antal med tiden. Minskningen i antal berodde alltså på bortfall av prover vars motilitet sjunkit under 10% . Den beredningsform med störst minskning i antal och därmed också den där motiliteten sjönk mest drastiskt var prov a, d.v.s. ocentrifugerade spermier förvarade i rumstemperatur. Det fanns även individuella skillnader mellan de olika hingstarna, vad gällde deras motilitet (tabell 2)

Tabell 1. Antal analyserade prover samt fördelning över dag och beredningsform

Analyserade Prover – totalt 258					
Beredningsform					
Dag	a	b	c	d	
0	36	*	36	*	a-ocentrifugerad, rumstemp
1	15	34	35	36	b-ocentrifugerad, kyld, + 5°C
2	1	11	18	36	c-centrifugerad, rumstemp
					d-centrifugerad, kyld, + 5°C

* - analyserades inte dag 0

Tabell 2 visar både subjektiv (SM) och objektiv motilitet (OM) för varje hingsts a-prov dag 0, angivet som medelvärde \pm SD (a-provet motsvarar här råsperman). Dessutom finns resultat från Flyinges språngrullor, vilket anger antal dräktigheter/antal inseminerade brunster under perioden 2/6-19/6 (både AI och kyld transportsperma). Här framgår att motiliteten varierade mellan hingstarna, både vad gäller subjektiv och objektiv bedömning. Hingst V är den hingst där det skiljde mest mellan subjektiv och objektiv motilitet och detta var också en hingst som QualispermTM verkade ha svårt att analysera bilderna ifrån. Här fick analysen upprepas flera gånger för varje ejakulat. Tabellen visar att den objektiva motiliteten generellt hade större variation inom hingst än den subjektiva. Dock ger Qualisperm resultat inom snävare intervaller (ibland med decimal) medan den subjektiva motiliteten ges med 5 % intervaller. Detta bidrar till att den objektivt bedömda motiliteten varierade mer än den subjektivt bedömda motiliteten. Högst objektiv och subjektiv motilitet hade hingsten L, men endast 4 av 10 ston blev dräktiga. Ingen statistisk analys har dock gjorts mellan hingstarnas motilitets- och fertilitetsresultat.

Tabell 2. Jämförelse av objektiv och subjektiv motilitet per hingst för a-prover dag 0, samt dräktighetsresultat från antal inseminerade brunster under perioden 2/6-19/6.

Objektiv (OM) och subjektiv (SM) motilitet per hingst prov a dag 0 samt dräktighetsresultat				
Hingst	Antal ejakulat	OM Medel \pm SD	SM Medel \pm SD	dräktigheter/inseminerade brunster 2/6-19/6
G	3	44,3 \pm 18,7 %	46,7 \pm 2,9%	5/12
H	3	53 \pm 11,5 %	45 \pm 0%	13/22*
J	3	42,3 \pm 7,8 %	48,3 \pm 1,2%	0/5
K	3	48,7 \pm 3,8 %	61,7 \pm 17,6%	15/41
L	4	73,3 \pm 5,2 %	77,5 \pm 8,7%	4/20
P	4	42,3 \pm 21,0 %	51,3 \pm 7,5 %	6/21
R	4	49,5 \pm 7,2 %	52,5 \pm 9,6 %	4/11
S	4	42,5 \pm 17,6 %	56,3 \pm 9,5 %	3/14
V	4	22,8 \pm 14,0%	56,3 \pm 13,2 %	8/41 *
Y	4	54,5 \pm 4,0 %	66,3 \pm 11,8 %	1/12

OM – objektiv motilitet, SM – subjektiv motilitet, SD – standardavvikelse, , * - ett sto hade resorberat.

Tabell 3 visar medelvärdet samt standardavvikelser för a- och c-värden när det gäller motiliteten för QualispermTM i subpopulation 1 och 2 dag 0, d.v.s. före (a) och efter (c) selektion. Subpopulation 2 bestod av spermier som snurrade i cirkel och subpopulation 1 av spermier som låg stilla men med rörlig svans, dvs. ”fastklistrade” huvuden på objektsglasat. Medelvärdet sjönk signifikant ($<0,0001$) efter selektion vid jämförelse av a och c för båda subpopulationerna. Detta torde tyda på att centrifugeringen effektivt selekterade bort spermier med en icke önskvärd typ av motilitet. Ur tabellen framgår även variationen mellan hingstarna vad gäller fördelning av spermier i de båda subpopulationerna.

Tabell 3. Medelvärde för subpopulation 1 och 2 samt standardavvikelse, a- och c-värden dag 0, d.v.s. före och efter selektion

Subpopulation 1 och 2 - a och c prover dag 0				
Hingst	Subpopulation 2 snurrar		Subpopulation 1	”fastnat” på glaset
	a ± SD	c ± SD	a ± SD	c ± SD
G	27,9 ± 3,8	23,5 ± 15,0	27,8 ± 15,3	19,6 ± 2,9
H	20,6 ± 11,7	4,9 ± 2,5	26,5 ± 0,8	10,4 ± 7,7
J	22,7 ± 10,0	9,7 ± 16,8	26,5 ± 0,8	15,3 ± 7,6
K	25,0 ± 6,0	6,5 ± 7,3	26,3 ± 7,2	18,3 ± 7,3
L	13,0 ± 6,1	1,9 ± 2,2	14,1 ± 3,9	5,0 ± 0,4
P	24,2 ± 13,2	9,8 ± 9,5	33,7 ± 27,8	17,0 ± 9,7
R	21,7 ± 5,2	10,2 ± 6,4	29,0 ± 7,2	19,3 ± 14,5
S	17,3 ± 4,1	15,4 ± 11,6	40,4 ± 19,9	31,6 ± 17,1
V	25,4 ± 14,7	13,9 ± 8,1	42,3 ± 19,5	25,1 ± 7,7
Y	22,3 ± 5,0	5,7 ± 6,5	23,2 ± 3,7	8,0 ± 6,5

Tabell 4 visar hur väl varje hingsts sperma bibehöll sin motilitet efter förvaring i kylskåp i upp till 2 dagar utan att vara centrifugerad (prov b). Bortfall av prover berodde alltså på för låg motilitet ($\leq 10\%$). Detta motsvarar den sperma som används vid transportsperma för artificiell insemination -TAI. Här framgår individuella skillnader i de olika hingstarnas kvalitet. Hingst P och S hade prover som föll bort redan efter ett dygn, dvs b-prover som inte överlevde första natten i kylskåp. Dräktighetsresultaten för TAI totalt över säsongen låg ändå någorlunda högt för dessa två hingstar (Tabell 4). Efter 2 dagar hade alla b-prover hos hingstarna G, K, P och R fallit bort pga för låg motilitet. Hingstarna R och J hade 100 % i dräktighetsresultat, men dessa hingstar hade väldigt få ston för TAI under säsongen. Lågst dräktighetsprocent har hingsten Y för vilken 75 % av proverna överlevt till dag 2, men hingsten hade heller inte fått särskilt många ston vilken ökar osäkerheten i dräktighetsbedömningen. Hingsten L hade återigen (jämför med tabell 2) relativt låga dräktighetsresultat trots att han hade relativt många av sina b-prover kvar jämför med övriga hingstar.

Tabell 4. Antal analyserade b-prover (ocentrifugerade, förvarade i kylskåp) per hingst och dag samt hur många prover som var kvar varje dag, samt totala dräktighetsresultatet för TAI säsongen 2007.

Hingst/antal ejakulat	Dag 1		Dag 2		Dr % * TAI tot	Antal ston
	Antal	prov kvar	Antal	prov kvar		
G/3	3	100%	0	0 %	76,9	26
H/3	3	100%	2	66 %	77,5	40
J/3	3	100%	1	33 %	100	2
K/3	3	100%	0	0 %	78,1	73
L/4	4	100%	2	50 %	65,9	44
P/4	2	50 %	0	0 %	74,2	31
R/4	4	100 %	0	0 %	100	3
S/4	3	75 %	1	33 %	82,8	29
V/4	4	100 %	1	25 %	76,5	51
Y/4	4	100%	3	75 %	54,5	11

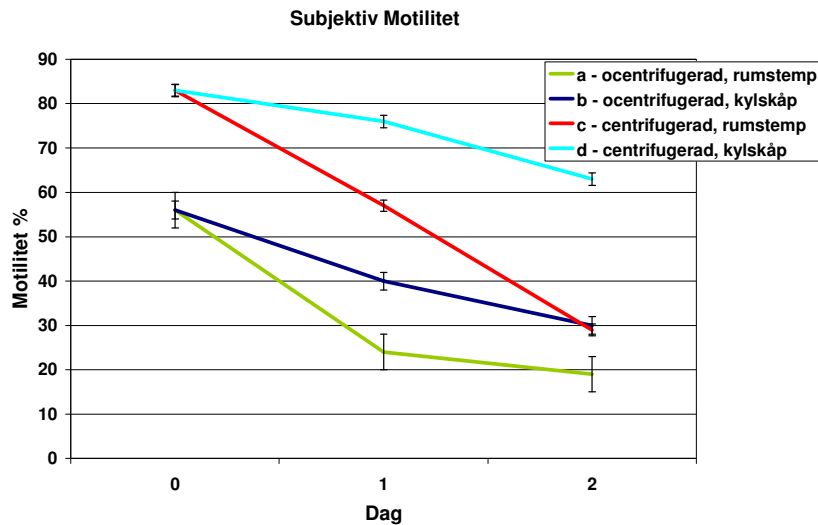
* - totalt dräktighetsresultat för TAI säsongen 2007.

Spermahanterings påverkan på motiliteten

Figur 2 visar hur den subjektiva motiliteten förändrades beroende på beredningsform och dag. Kurvorna representerar medelvärdet för alla värden i respektive beredningsform. Motiliteten sjönk från dag 0 till 2. De med Single Layer Centrifugation selekterade proverna, dvs. c och d, hade vid alla tillfällen en högre motilitet än oselecterade prover som förvarades i jämförbar temperatur. B- och d-proverna togs från prov a respektive c under dag 0 och analyserades först dag 1 efter en natt i kylskåp. Deras motilitet dag 0 har därför satts till samma värde som det ursprungliga provet. På så vis åskådliggörs tydligt hur motiliteten sjönk mycket mindre över natten i kylskåpstemperatur (+ 5°C) än i rumstemperatur. Högst motilitet hade d-provet, det selekterade provet som förvarades i kylskåp. Dag 2 låg d-provet kvar på en motilitet kring i medeltal 65 %, vilket kan jämföras med a-provet som då hade under 20 %. Detta torde alltså vara den mest gynnsamma beredningen för bibehållen motilitet, även över tid.

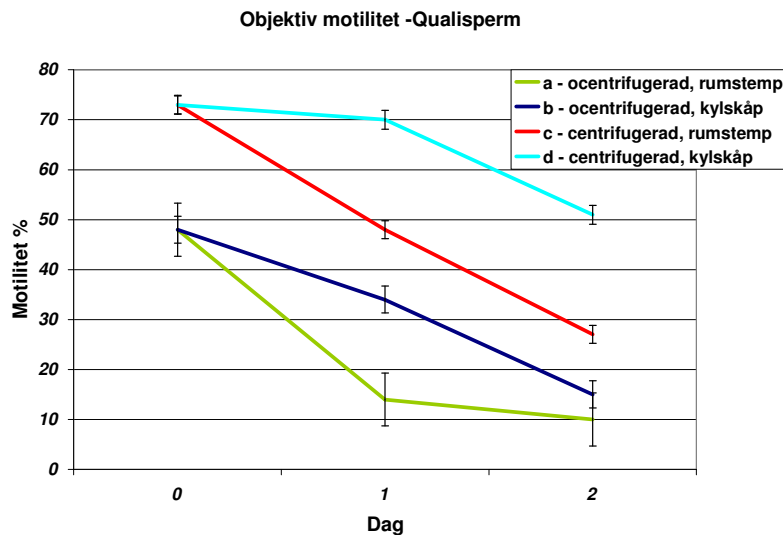
Det var en stor signifikant skillnad (< 0,0001) i motilitet mellan a- och c-prover dag 0 och mellan samtliga värden dag 1. Dag 2 förelåg en hög signifikant skillnad (< 0,0001) mellan samtliga värden utom mellan a och d där signifikansen var lägre (<0,05) samt mellan b och c där ingen signifikant skillnad förelåg.

Antal prover minskade med tiden pga. för låg motilitet ($\leq 10\%$), detta gällde ffa de oselecterade prover förvarade i rumstemperatur, dvs. prov a. Detta förklarar den lägre signifikansen i skillnaden mellan a och d dag 2.



Figur 2. Den subjektiva motiliteten (medel \pm SD) för de olika beredningsformerna a, b, c och d, samt hur den varierade mellan dagarna.

Figur 3 visar hur den objektivt bedömda motiliteten förändrades i de olika beredningsformerna över tid. Även här ser man att motiliteten gynnades av selektering och förvaring i kylskåp. Här saknades dock statistiskt signifikant skillnad mellan a och b dag 2, vilken fanns vid den subjektiva bedömningen av motiliteten. Dag 2 hade skillnaden a och d samt d och b en signifikans på $<0,05$. I övrigt var det samma signifikans som för subjektiv motilitet. För att närmare jämföra korrelationen mellan subjektiv och objektiv motilitet – se tabell 5.



Figur 3. Den objektiva motiliteten (medel \pm SD) framtagen med Qualisperm, för de olika beredningsformerna a, b, c och d, samt hur den varierade mellan dagarna

Jämförelse mellan subjektiv och objektiv motilitet.

För att jämföra den subjektiva och den objektiva (QualispermTM) motiliteten räknades korrelationen fram för dessa värden, vilket framgår i tabell 5. Här presenteras korrelationen för varje dag, dvs. dag 0, 1 och 2, samt för de olika beredningsformerna a, b, c och d totalt. Sedan anges korrelationen för kombinationen av beredningsform och dag. Bruna värden visar en statistisk signifikans på $< 0,0001$ och grå värden $< 0,05$. Det fanns en hög korrelation, vilken var statistiskt signifikant, mellan subjektiv och objektiv motilitet vad gäller dag och beredningsform totalt. När man sedan följer beredningsformerna per dag varierade korrelationen mer. Det var svårast att analysera a-proverna med QualispermTM. Detta berodde på att antalet prover sjönk drastiskt från dag till dag och dag 2 saknades a-proverna helt (fanns bara 1 värde, se tabell 1) eftersom motiliteten hade sjunkit under 10 %. Flest korrelationer fanns vid analys av prov-d, vilket också var det prov som överlevde längst. Betänkas bör dock att den objektiva motiliteten bedöms inom snävare marginaler (med minst en decimal) medan den subjektiva motiliteten bedöms med 5 % marginal.

Tabell 5. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM) och objektiv motilitet framtagen med QualispermTM (OMQ).

Samtliga korrelationer	
Beh och dag	SM-OMQ
a*	0,72
b*	0,70
c*	0,79
d*	0,66
Dag 0*	0,68
Dag 1*	0,83
Dag 2*	0,72
Dag 0 a	0,30
Dag 1 a	0,56
Dag 2 a	-
Dag 1 b	0,76
Dag 2 b	0,21
Dag 0 c	0,26
Dag 1 c	0,65
Dag 2 c	0,49
Dag 1 d	0,55
Dag 2 d	0,60

*-samtliga prover, brun färg – $p = < 0,0001$. grå färg – $p = < 0,05$.

Spermiekoncentrationens påverkan på resultatet från Qualisperm™

För att undersöka hur koncentrationen på provet påverkade Qualisperm™ 's säkerhet delades koncentrationen framtagen med Qualisperm™ upp i 3 grupper. Centrifugering medförde nämligen att koncentrationen sjönk från de 100 milj spermier/ ml man utgick ifrån. Grupp 1 var alla prover med koncentrationer mellan 0-12 miljoner spermier/ml, grupp 2 12-40 milj/ml och grupp 3 40-70 milj/ml. Därefter analyserades korrelationen mellan subjektiv och objektiv motilitet fram för dessa grupper, vilket presenteras i tabell 6. Korrelationen för grupp 2 och 3 var högre än för grupp 1, vilket tolkas som att Qualisperm™ har högre säkerhet vid koncentrationer över 12 milj/ml. Detta kan förklara en del av det varierande resultatet av korrelationen vid analys av selekterade preparat som generellt låg något lägre i koncentration (varierade mellan 17-123 milj/ml, medelvärde $44,3 \pm 23,5$) Detta kan jämföras med oselekterade preparat vars koncentration varierade mellan 41 – 169 milj/ml, medel $105,3 \pm 30,4$. Alla tre korrelationer hade dock en statistisk signifikans på $<0,0001$.

Tabell 6., Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM) och objektiv motilitet framtagen med Qualisperm (OMQ) vid olika koncentrationer framtagna med Qualisperm.

Koncentration	Korrelation
	SM-OMQ
Grupp 1	0,69
Grupp 2	0,84
Grupp 3	0,88

Vad gäller korrelationen mellan koncentrationen manuellt framräknad i Bürkerkammare och framtagen med Qualisperm™ låg den på 0,4 (statistisk signifikans på $<0,05$). Qualisperm™ koncentration låg generellt lägre. Qualisperm™ räknar bara fram koncentrationen i det område som bilderna tas, medan i Bürkerkammaren bedöms ett större material, vilket kan bidra till skillnaden mellan resultaten.

DISKUSSION

Syftet med detta delprojekt var att i hingstsperma utvärdera hur väl Qualisperm™, vilket är en objektiv analysmetod, bedömer motiliteten, jämfört med den subjektiva visuella metoden. Vi har också undersökt hur motiliteten förändras över tid, samt beroende på förvaringstemperatur och om spermerna var selekterade eller ej.

Det finns få studier avseende hingstsperma gjorda på Qualisperm™. Förra året gjordes ett examensarbete (Pettersson, 2006), men programvaran är omarbetad sedan dess. På övriga djurslag finns det vad vi känner till inte heller några studier publicerade, då företaget (Biophos AG, Schweiz) fortfarande själva håller på att utvärdera och omarbete produkten i samarbete med bl.a. SLU. Tidigare använda objektiva motilitetsbedömningsmetoder är bl.a. CASA. Denna apparatur skiljer sig från Qualisperm™ i det att den analyserar färre antal spermier, och det krävs en del erfarenhet av att hantera apparaturen för att få fram tillfredställande resultat. CASA togs från början fram för att kunna analysera en rad olika

spermieparametrar (Verstegen et al, 2002), men är så stor och dyr att den ej är så lämplig att använda ute på hingststationerna.

Detta projekt visade att det fanns statistiskt signifikanta korrelationer mellan den subjektivt bedömda och den objektivt bedömda motiliteten, både var gäller dag och beredningsform. Högst korrelation framkom när a, b, c och d samt dag 0, 1 och 2 analyseras för sig. När proverna delas upp efter beredningsform per dag sjönk korrelationen. Detta torde bero på att det på så vis blev färre prover att analysera, och variationer mellan prov påverkade därmed resultatet mer. Antalet prover statistiskt analyserade minskade också när motiliteten sjönk under 10 % eftersom QualispermTM då inte användes. De ocentrifugerade spermerna förvarade i rumstemperatur var svårast analysera med QualispermTM, då spermerna i dessa prover dog snabbast. Bland d-proverna (centrifugerade och förvarade i + 5 ° C) fanns flest prover och därmed flest korrelationer, och de överlevde också längst, vilket kan jämföras med Malmgren (1994) som visade en längre hållbarhet vid förvaring vid + 5 ° C.

De osäkerhetsfaktorer som finns med QualispermTM kan bero på att det trots allt fortfarande finns en viss subjektivitet inbyggd i analysmetoden. Att användaren själv väljer område i preparatet att analysera ger möjlighet att styra resultatet. Detta innebär också att det krävs träning för att hantera apparaturen och kunna bedöma var det mest representativa området för hela preparatet finns. Att QualispermTM dessutom ibland har svårt att analysera tagna bilder varvid analysen måste göras om, bidrar också till osäkerheter i analysen. Problem uppstår då QualispermTM inte alltid kan analysera det område användaren bedömer som mest representativt. I denna studie fanns det en hingst vars spermier var svåranalyserade för QualispermTM.

Motiliteten minskade med tiden beroende på beredningsform. Sämst för motiliteten var helt klart oselekerad sperma som förvarades i rumstemperatur (prov a). Här sjönk motiliteten snabbt ner under 10 %, och dag 2 fanns endast ett a-prov kvar som gick att analysera med QualispermTM. Högst motilitet hade selekterad sperma som förvarades i kylskåp. Här låg motiliteten kvar på ca 65 % dag 2, och skulle således fortfarande kunna användas för insemination. Näst bäst motilitet hade selekterad sperma förvarad i rumstemperatur. Här sjönk motiliteten ner till ca 30 % dag 2. Oselekerat sperma förvarad i kylskåp hade en lägre motilitet än selekterad sperma (prov c) från början men de båda proverna slutade kring ungefär samma motilitet dag 2, dock sjönk den oselekerade sperman inte lika brant som prov c. Slutsatsen man kan dra av detta är att motiliteten hos hingstesperma bäst bevaras genom att centrifugera sperman samt förvara den i kylskåp. Det är dock inte alltid praktiskt genomförbart med dagens transportsystem av sperma från hingststation ut till seminestation. Selekerad sperma har initialt bättre motilitet än oselekerad (jämför prov c och b), och kylskåp finns på de flesta hingststationer. Selektion skulle kunna vara ett alternativ för hingstar med dålig hållbarhet på sin kylda sperma (motsvarande b-prover). Förhoppningsvis får vi snart se studier med selekterad sperma, där man utvärderar dess påverkan på fertiliteten.

Den subjektivt och objektivt bedömda motiliteten varierade i rå sperma dag 0 mellan hingstarna. Detta kan jämföras med tidigare studier med liknande resultat vad gäller skillnader i motilitet mellan hingstar (Sieme et al 2004). Det var svårt

att se något tydligt mönster i motiliteten och antal ston som blivit dräktiga under perioden. Detta samband har i denna studie inte heller analyserats statistiskt pga för litet material. Hingstarna har dessutom fått för få ston (bör helst vara 100 ston) för att man ska kunna dra några säkra slutsatser kring fertiliteten.

För att vidare belysa skillnader mellan hingstarna gjordes en individuell fördelning av b-prover dag 1 och 2 för varje hingst. Detta var prover som förvarades i kylskåp och var oselekerade, vilket bäst motsvarar den sperma som skickas som transportsperma för AI. Vissa hingstar hade en väldigt låg överlevnad (25-50%) redan dag 1. Detta torde tyda på att dessa hingstar var mindre lämpliga för transportsperma, då motiliteten sjönk fort, även vid förvaring i kylskåp. Pickett och Amann (1995), och Katila (1997), har gjort studier som visade hur fertiliteten varierade mellan olika hingstar efter inseminering med kyld transportsperma. Det är också viktigt att komma ihåg att fertiliteten kan variera över säsong, ålder, samlingsfrekvens och hantering av sperman (Dowsett and Pattie 1982, Rousset et al 1987, Sieme et al 2004, Quintero-Moreno et al 2003). I denna studie har hingstar av olika ålder använts, men det gick inte att i denna studie dra några slutsatser av hingstarnas ålder. Hingstarnas ålder har inte angetts individuellt då det inte skall gå att identifiera de olika hingstarna i studien. Alla ejakulat är dock samlat under en 3 v lång period i början av juni. Hingstars fertilitet påverkas dessutom även stoet i hög grad.

QualispermTM fungerar bäst vid koncentrationer över 12 miljoner spermier/ml, även om det fanns en statistiskt signifikant korrelation mellan subjektiv och objektiv motilitet även vid låga koncentrationer. Detta skulle kunna innebära problem med selekterade preparat, som generellt har relativt låg koncentration. Detta är logiskt då en låg koncentration innebär färre spermier att analysera, varvid värdena spretar mer och ger en lägre säkerhet. Man bör också ha i åtanke att det mänskliga ögat i sin tur ger säkrast resultat vid låga koncentrationer, vilket skiljer sig från QualispermTM. Normalkoncentrationen på råsperma ligger kring 120-150 miljoner spermier/ml. Denna siffra kan jämföras med de 100 miljoner/ml som man utgår ifrån vid centrifugering. Efter centrifugering sjunker koncentrationen ytterligare. Skillnaden i koncentration mellan selekterad och oselekerad sperma kan således bli ganska stor. Andra orsaker till svårigheter för apparaturen att analysera bilderna kan vara ljusstyrka, flöden i sperman samt för hög koncentration. Det är därför viktigt att den som sköter apparaturen har träning i att använda den för att bäst kunna avgöra var i provet QualispermTM kan analysera bilder. Den koncentration QualispermTM tog fram i denna studie låg generellt lägre än koncentrationen framtagen med Bürkerkammare. Detta beror antagligen på att QualispermTM endast analyserar ett litet område i preparatet (där spermerna inte bör ligga för tätt, annars kan programmet inte läsa bilderna)

QualispermTM kan dessutom ge spännande information om sperman genom att den delas upp i olika subpopulationer efter motilitet. Detta projekt har koncentrerat sig på progressiv motilitet, men har ändå visat hur motiliteten i de två andra subpopulationerna skiljer sig åt mellan de olika hingstarna. Vi såg också hur selektionen minskade andelen spermier som hamnade i subpopulation 1 och 2. Det vore intressant med framtida studier av fördelningen mellan övriga subpopulationer kopplade till fertilitet i mer omfattande försök. Detta skulle kunna ge ännu mer information om hingstens spermakvalitet, vilket kan underlätta för att avgöra hur hingsten skall användas. Genom att veta hur man ska

skraddarsy hanteringen och användningen för varje hingsts sperma ökar möjligheten att öka dess fertilitet maximalt.

Sammantaget visade delprojektet att Qualisperm™ skulle kunna bli ett bra komplement för seminestationer som vill satsa på säker och objektiv kvalitetsbedömning av sperma. Dock finns fortfarande en del utvecklingsarbete kvar på utrustningen, så som att komma till rätta med problemet att användaren själv väljer området som skall analyseras. Kanske kan det lösas genom rutsystem/andra sätt att dela upp sperman och sedan standardisera var analysen skall utföras. Förra året (Pettersson, 2006) användes till exempel en Maklerkammare istället för vanligt objektsglas. En annan lösning vore att arbeta fram en metod där hela provet analyseras. Det nu enligt uppgift nu tagits fram en ny version av programmet, där flera fält analyseras efter varandra. På så vis kan mätningen automatiseras och ett medelvärde tas fram. Kanske kan ett sådant system även ge ett mer representativt koncentrationvärde än det system som använts i denna studie. Qualisperm™ är billigare och mindre än tidigare CASA-maskiner och är därför mer lämpad för arbetet ute på hingststationerna. Det är dock viktigt att användaren får god träning i att använda utrustningen först.

Korrelationen mellan subjektiv och objektiv motilitet kan också tolkas som att den subjektiva motilitetsbedömningen fungerar lika bra som den objektiva. Varför i så fall investera i dyr utrustning, när man kan bedöma motiliteten lika bra själv? Man bör dock komma ihåg att det är lättare att kvalitetssäkra en objektiv bedömningsmetod, vilket säkerställer överensstämmelse med andra hingststationer i landet. När stoägaren väljer hingst från de olika hingststationerna i Sverige kan stationschefen då garantera ett säkert och objektivt omdöme av "sin" hingst.

KONKLUSION

Qualisperm™ skulle väl kunna fylla behovet av objektiv motilitetsbedömning ute på hingststationerna, förutsatt att apparaturen sköts av någon med adekvat träning, samt efter visst utvecklingsarbete för att ta bort viss subjektivitet i bedömningsmetoden, vilket man strävat efter i den nya versionen som nyligen tagits fram.

Fler studier med Qualisperm™ vore önskvärda, bland annat för att vidare undersöka fördelningen av subpopulation 1 och 2 och dess betydelse för hingstens fertilitet. I dessa studier bör fertilitetsresultat från hingstar med fler ston användas för att kunna säkerställa det statistiska sambandet.

Enligt motilitetsresultaten ökade spermans hållbarhet signifikant med förvaring i kylskåp och efter selektion genom kolloid. Även här vore det intressant med fortsatta studier, för att utvärdera spermiselektionens påverkan på hingstens fertilitet. Samma sak gäller här, hingstarna måste ha fler ston för att resultaten skall bli säkerställda.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Amann, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J. Androl.* 1, 89-98.
- Colenbrander, B., Gadella, B.M. and Stout, T.A.E. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 305-311.
- Dowsett, K.F and Pattie, W.A. 1982. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert.*, Suppl 32, 1-8.
- Graham, J.K. 2001. Assessment of sperm quality. *AAEP Proceedings.* 47, 302-305.
- Kareskoski, A.M., Reilas, T., Andersson, M. and Katila, T. 2006. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 33-38.
- Katila, T. 1997. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* 48.7. 1217-1227.
- Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E. and Katila, T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 48:14.
- Macpherson, M.L., Blanchard, T.L., Love, C.C., Brinsko, S.P. and Varner, D.D., 2002. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology.* 58, 317-320.
- Malmgren, L., Op den Kamp, B., Wöckener, A., Boyle, M. and Colenbrander, B. 1994. Motility, velocity, and acrosome integrity of equine spermatozoa stored under different conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 29, 469-476.
- Malmgren, L. 1997. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology* 48, 523-530.
- Nie, G.J., Wenzel, J.G.W. and Johnson, K.E. 2002. Comparison of pregnancy outcome in mares among methods used to evaluate and select spermatozoa for insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 69, 211-222.
- Pickett B.W. and Amann R.P. (1987). Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. *Equine Veterinary Science* 7: 289-302.
- Quintero-Moreno, A., Miro, J., Teresa Rigau, A. and Rodriguez-Gil, J.E. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology.* 59, 1973-1990.
- Rota, A., Furzi, C., Panzani, D. and Camillo, F. 2004. Studies in motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 103-109.
- Rousset, H., Chanteloube, Ph., Magistrini, M. and Palmer, E. 1987. Assessment of fertility and semen evaluations of stallions. *J. Reprod. Fert.* 35, 25-31.
- Samper, J.C., Hellander, J.C. and Crabo, B.G. 1991. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44, 107-114.
- Sieme, H., Katila, T. and Klug, E. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology.* 61, 769-784.
- Thys, M., Vandaele, L., Morrell, J.M., Mestach, J., Van Soom, A., Hoogewijs, M. and Rodriguez-Martinez, H. 2007. In vitro fertilising capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (glycerolpropylsilane, GS) silane-coated silica colloidal centrifugation. *Reprod. Dom. Anim.* In press

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. and Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.

Voss, J.L., Pickett, B.W. and Squires, E.L. 1981. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *JAVMA* 1, 287-289.

ACKNOWLEDGMENTS

Jag vill tacka personalen på Flyinge hingstdepå för ett gott bemötande och samarbete under vår tid på Flyinge. Även ett stort tack till Jane Morrell för all hjälp och stöd under arbetets gång, och även tack till Hanna Björk för trevligt sällskap under många svettiga timmar bland pipetter och mikroskop.

Jag vill också tacka personalen på spermalaboratoriet på OG för all hjälp med träning inför studien.

Till slut ett stort tack till min handledare Prof. Anne-Marie Dalin för stort engagemang och mycket hjälp för att ro det här projektet i hamn. Jag vill också rikta ett tack till mina biträdande handledare Doc. Anders Johannisson, Dr Jane Morrell och Prof. Heriberto Rodriguez-Martinez som hjälpt till med förberedelser och stort kunnande. Till sist ett tack till Doc. Nils Lundeheim för all hjälp med statistiken.

