

Effekter av spädningvätska och selektion på motilitet och fertilitet hos hingstsperma

En jämförelse av subjektiv motilitetsbedömning och Qualisperm™

Kaisa Ryytty

Handledare: Jane Morrell
Inst. för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion
Biträdande handledare: Anne-Marie Dalin
Inst. för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion
Biträdande handledare: Anders Johannisson
Inst. för anatomi, fysiologi och biokemi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	3
Summary.....	5
Inledning	7
Material och Metoder	10
Hingstmaterial	10
Flödesschema	10
Koncentration.....	12
Selektion	12
Motilitetsbedömning.....	12
Statistik	13
Resultat	14
Analysresultat per hingst avseende motilitet samt koppling till fertiliteten	14
Analysresultat avseende motilitet samt dräktighetsresultat för AI och TAI.....	17
Analysresultat avseende spermiehastighet och dräktighetsresultat.....	17
Inverkan av spädningvätska och selektion på spermimotilitet	17
Korrelationer mellan subjektiv, objektiv och progressiv motilitet.....	21
Variansanalys	24
Diskussion.....	24
Konklusion.....	27
Tack.....	28
Litteraturförteckning	29
Hemsidor.....	30
Övrigt.....	31

SAMMANFATTNING

Vid SLU pågår sedan tre år tillbaka ett projekt för att vidareutveckla och utvärdera metoder för kvalitetsbedömning av hingstesperma. Detta examensarbete är en del i ovan nämnda projekt. Examensarbetet har fokuserats kring effekterna av två olika spädningvätskor på motilitet och fruktsamhet hos hingstespermier. Samtidigt har effekterna av selektion genom centrifugering genom en kolloid studerats. I studien har en objektiv analysmetod använts och utvärderats genom samtidig jämförelse med subjektiv motilitetsbedömning. Syftet med delprojektet har således varit att få ökad kunskap om hur motilitet och fruktsamhet hos hingstesperma påverkas av olika spädningvätskor och av selektion och på så sätt om möjligt bidra till att kvalitetskontrollen av hingstesperma utvecklas.

Bakgrunden till projektets uppkomst är den ökade användningen av kyld transportsperma för artificiell insemination samtidigt som fölningsprocenten har minskat (Kareskoski et al, 2006, Kuisma et al, 2006). Användningen av kyld transportsperma har ökat på grund av ökad efterfrågan på hingstmaterial.

På hingststationerna i Sverige används i dagsläget subjektiv bedömning av motilitet som ett mått på potentiell fruktsamhet. Sambandet mellan motilitet och fertilitet är dock inte säkert och bedömningen av motilitet kan variera mycket mellan olika personer. För att komma till rätta med detta har objektiva metoder för motilitetsbedömning utvecklats. I detta delprojekt har Qualisperm™ (Biophos AG, Switzerland) använts och utvärderats. Qualisperm™ är en vidareutveckling av CASA (Computer Assisted Semen Analysis) som är lämplig att använda på hingststation då det är en relativt enkel och billig metod. Qualisperm™ består av ett dataprogram kopplat till en kamera i ett faskontrastoptikmikroskop. Tusentals spermier kan analyseras genom att Qualisperm™ fotograferar spermerna då de rör sig genom olika fält. Bilderna digitaliseras och med hjälp av dessa data kan Qualisperm™ analysera spermiekoncentration, motilitet och hastighet. Spermerna delas upp i fyra undergrupper beroende på rörelsemönster och hastighet.

Genom selektion av sperma hoppas man kunna få fram spermier som bibehåller sin fruktsamhetspotential längre tid och på så sätt höja fertiliteten. Selektionen sker genom att spermerna centrifugeras genom en kolloid s.k. "Single layer centrifugation" (Morrell, Johannisson et al, 2008). Genom centrifugering fås samtidigt en minskning av antal spermier. Detta kan, men behöver inte vara ett problem; genom att få fram spermier av bättre kvalitet kan inseminationsdosen eventuellt minskas. I Sverige idag ligger en inseminationsdos vid användning av färsk sperma på ungefär 500 miljoner motila spermier, med transportsperma på 1 miljard motila spermier och vid användning av fryst sperma varierar dosen (Nie et al, 2002, Dalin, A-M., Malmgren, L. 2004, s176-177).

Den praktiska delen av denna delstudie genomfördes på Flyinge hingststation under juni 2008. Totalt ingick 12 hingstar och från dessa undersöktes 4-5 ejakulat per hingst. Sperman späddes med två olika spädningvätskor, Kenney's eller INRA96, varefter den undersöktes avseende bl.a. motilitet både före och efter selektion. Selektionen skedde genom centrifugering (Single Layer Centrifugation). Sperman analyserades vid tre tidpunkter; 0, 24 och 48 timmar efter samling.

Bedömning av motilitet skedde både subjektivt med hjälp av ljusmikroskop och objektivt med hjälp av Qualisperm™. Den statistiska analysen bestod i att jämföra subjektiv, objektiv och progressiv motilitet, förändringar i motilitet efter kylförvaring i 24 och 48 timmar och skillnader i motilitet beroende på vilken spädningsvätska som använts. Även skillnader mellan olika hingstar och vilken roll selektion spelat undersöktes. Dessa parametrar har sedan jämförts med dräktighetsresultat.

Resultaten från både den subjektiva och objektiva motilitetsbedömningen tyder på att spermier som får en tillsats av INRA96 har en högre rörelseförmåga än de spermier som späds med Kenney's. Den statistiska analysen visar att korrelationen mellan de olika metoderna för motilitetsbedömning är hög och att de skillnader som föreligger är statistiskt signifikanta.

Betydelsen av selektion genom centrifugering har utvärderats i studien och resultaten tyder på att centrifugering gör att spermerna bibehåller en större rörelseförmåga, såväl vid spädning med INRA96 som med Kenney's spädningsvätska.

Resultaten visar även att en viss korrelation finns mellan spermernas hastighet och dräktighetsresultatet. Dessutom föreligger en ganska hög korrelation mellan dräktighetsprocent för AI (färsk sperma) och progressiv motilitet hos färsk sperma. Resultaten talar även för att subjektiv analys metod är mer tillförlitlig än objektiv analysmetod.

Qualisperm™ är en objektiv analysmetod som, med tanke på den tid det tar att utföra analysen, den träning som krävs och den subjektivitet som fortfarande föreligger samt de felkällor som ovan nämnda parametrar medför, i dagsläget inte lämpar sig för praktisk tillämpning på en hingststation. Dock har Qualisperm™ flera fördelar jämfört med traditionell subjektiv motilitetsanalys då den analyserar fler parametrar. En vidareutveckling av Qualisperm™ kan mycket väl innebära att metoden blir tillämpbar även i den praktiska verksamheten.

SUMMARY

At SLU, Division of Reproduction, Dept of Clinical Science, there is an ongoing project on the development and evaluation of new methods for the assessment of stallion semen quality. This EEF-study, which is a part of that larger project, has focused on the effects on motility and fertility of stallion semen of two different extenders and selection. Both an objective method and a subjective method for analysis have been used and compared in the study.

The increase in the use of artificial insemination with cooled semen in Swedish horse breeding over the last decade is thought to play a part in declining foaling rates (Kareskoski et al, 2006, Kuisma et al, 2006). This calls for better evaluation methods of semen quality since cooling and transportation put higher demands on semen quality in order to maintain fertility (Aurich, 2005). Visual assessment by light microscope is a subjective method of sperm motility evaluation and the most common method used in the field. The correlation between fertility and the subjective motility results are not conclusive which has led to the development of objective methods for semen analysis. The method evaluated in this project is Qualisperm™ 2008 (Biophos AG, Switzerland) which is a development of CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Qualisperm™ consists of a computer program and a phase light microscope. The images of thousands of spermatozoa are captured via the camera attached to the microscope. These images are digitalized and analyzed for motility, concentration and speed of movement by the computer. In comparison with other CASA-systems Qualisperm™ analyses a greater number of spermatozoa, is easier to use and cheaper, which make it more suitable for field-practice.

The aim of spermatozoal selection is to increase fertility by sifting out spermatozoa that will keep their fertility potential for a longer time. The selection is carried out through "Single Layer Centrifugation" where the spermatozoa travel through a colloid (Morrell et al, 2008). Centrifugation eliminates seminal plasma and decreases the number of spermatozoa. Studies have shown that spermatozoa benefit if some of the seminal plasma is removed (Love et al, 2005, Braun et al, 1994, Kareskoski et al, 2006, MacPherson et al, 2002, Sieme et al, 2004, Waite et al, 2008).

The EEF-study was carried out during June 2008 at the national stud at Flyinge, Sweden. Twelve stallions were included in the project, each stallion provided with four or five ejaculates. Aliquots were extended with two different types of extenders; Kenney's or INRA96, and were analyzed for subjective, objective and progressive motility in fresh and cooled semen before and after selection by centrifugation. Semen was analyzed directly after collection and at 24 and 48 hours after collection. Between the analyses the semen was stored in 5°C.

Assessment of motility was made both subjectively by phase contrast microscope and objectively with Qualisperm™. The results from Qualisperm™ also included progressive motility and velocity. The results including selection/non selection were statistically analyzed with SAS (Statistical Analysis Systems Package, version 9, 1 SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA, 1989) and both Correlation Procedure and Mixed Procedure were used. The parameters have then been compared with fertility results.

Results from both subjective and objective assessment of motility shows that spermatozoa treated with INRA96 extender have higher motility both initially and 24 hours after collection than spermatozoa treated with Kenney's. The subjective motility assessment also shows that semen extended with INRA96 has a higher motility after 48 hours than semen extended with Kenney's. The results after selection are consistent with those above; spermatozoa extended with INRA96 have higher motility than spermatozoa treated with Kenney's. The analysis shows that there was high significant correlation between the subjective and objective assessment methods.

Furthermore the results implicate that spermatozoa after centrifugation maintain their motility longer, both with INRA96 and Kenney's, than spermatozoa that are not selected.

Results from the study also suggest that there is a correlation between sperm velocity and pregnancy results. High velocity of spermatozoa yields high percentage of pregnancy. These results agree with results from earlier studies (2005, 2006). Furthermore a comparison between pregnancy results and subjective and objective method of analysis show that the subjective method, in this particular study, is more reliable.

To sum up: Qualisperm™ is an objective method of analysis that need certain adjustments. There still is a subjective element to the method and with consideration of the amount of time the analysis take, the amount of training required, and the sources of error all the above mentioned creates, the method is not usable in practice today. Nevertheless Qualisperm™ has several advantages to traditional subjective assessment method since the program can analyze more parameters. A further development of Qualisperm™ could very well increase the applicability of the method for semen analysis in the field.

INLEDNING

Sedan 1970-talet när tekniken för artificiell insemination (AI) först introducerades i Sverige har andelen ston betäckta genom AI stadigt ökat. 1986 användes AI vid knappt en tredjedel av alla betäckningar för att 2003 utgöra knappt 90 % av alla betäckningar. Idag 2008 omfattar AI >90% av alla betäckningar av varmblodiga travare och halvblod. Totalt insemineras ca 10000 ston årligen i Sverige. I begreppet artificiell insemination inkluderas flera olika tekniker. Vid AI kan man använda sig av antingen färsk sperma, färsk kyld transporterad sperma eller fryst sperma. Under 1980-talet började fryst och kyld sperma användas inom hästaveln (Söderquist, 2004). 1986 dominerade fortfarande användningen av färsk sperma vid AI men successivt har transportsperman blivit den mest använda och står idag, 2008, för mer än 50 % av alla betäckningar genom AI. Genom att använda kyld transportsperma ökas tillgängligheten av hingstmaterial för stoägare och hingsten kan nå en större marknad.

Vilken teknik som används mest varierar mellan halvblod och varmblodiga travare. Hos den varmblodiga travaren används fortfarande färsk sperma till största delen (45 % 2006) men andelen fryst sperma ökar stadigt.

De positiva effekterna av artificiell insemination är många; bl.a. minskar risken för smittspridning och skador på djuren som kan uppstå i samband med naturlig betäckning samtidigt som snabbare avelsframsteg kan göras. En av de största vinsterna med AI är att hingsten görs tillgänglig för ett större antal ston då geografiska och tidsmässiga begränsningar kan överbryggas. Dock är problemen med AI flera; noggrann brunstpassning krävs och det finns en risk för stor spridning av ogynnsamma anlag samtidigt som man har sett ett sämre fruktsamhetsresultat ffa vid användning av fryst sperma men även vid användning av transportsperma (Batellier et al, 2001, Söderquist, 2004, 2006). Studier visar även att fölningsprocenten har sjunkit det senaste decenniet och detta tros bero på att användningen av transporterad kyld sperma har ökat (Kareskoski et al, 2006, Kuisma et al, 2006, Dahlsten, 2006).

Artificiell insemination är även vida använd inom nötaveln där 85-90 % av mjölkorna omfattas av AI (Söderquist, 2006). Den stora skillnaden mellan nöt- och hästavel är att man inom nötaveln fokuserar till stor del på god fruktsamhet medan hästaveln främst baseras på prestation (Colenbrander et al, 2003). Detta leder till att spermier från de hingstar som används i avel varierar mycket i fruktsamhetspotential.

Det finns sålunda många anledningar till varför behovet av kvalitetssäkring av hingstsperma uppkommit och syftet är att kvalitetsförbättra sperman och även urskilja de hingstar som har nedsatt spermakvalitet och inte lämpar sig för kylning eller frysning.

År 2007 hade 98 seminstationer i Sverige tillstånd från jordbruksverket för spermasamling och behandling av sperma (Personligt meddelande, Dalin). På stationerna kvalitetssäkras sperman genom att koncentrationen bestäms, detta sker oftast objektivt med hjälp av en apparat (t.ex. "spermacue" som tillverkas av Minitub, Tyskland), en makroskopisk bedömning görs avseende volym, utseende och täthet och sist men inte minst undersöks spermiernas motilitet. Denna

motilitetsbestämning sker antingen genom subjektiv motilitetsbedömning med ljusmikroskop (Malmgren, 1997) eller med hjälp av objektiv analysapparatur.

Flera studier har visat på att spermans fruktsamhetspotential inte kan bedömas endast genom att utvärdera motiliteten (Samper et al, 1991). En spermie med normalt rörelsemönster kan vara morfologiskt onormal, dvs. ha felaktigt utseende eller egenskaper som gör att den har mindre chans att befrukta ett ägg eller minska det befruktade äggets möjligheter att utvecklas vidare. Dessutom påverkas spermernas motilitet av för hög respektive för låg temperatur, ljus, desinfektionsmedel och egenskaper såsom pH hos spädningssvätska. Detta gör att specifika krav ställs på den som hanterar sperman vid samling, spädning och utvärdering. Resultatet av hantering och bedömning av sperman varierar därför av ovan nämnda orsaker. Även vid samma hantering av sperman varierar resultatet av motilitetsbedömningen då den utförs subjektivt, dvs. olika personer bedömer sperman olika. Således krävs att bedömningen av ett ejakulats kvalitet inte endast baseras på motilitetsvärden (Varner, 2008). Dock är bedömning av motilitet ett led i kvalitetssäkring av sperma varför det skulle vara av värde att kunna använda en objektiv analysmetod för säkrare bedömning av motilitet (Amann, 1989). Problemet med objektiv motilitetsanalys är att de metoder som hittills arbetats fram inte är praktiskt och ekonomiskt tillämpbara på en hingststation.

Den metod som prövats i detta examensarbete är en variant av CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Den första kommersiella varianten av CASA kom 1985 (Rupert et al, 2004) och den har sedan utvecklats från att kunna analysera upp till 150 spermier per prov till att idag (2008) kunna analysera tusentals spermier per prov. Den variant av CASA som testats i detta arbete heter Qualisperm™ (Biophos AG, Switzerland) och arbetar genom att mäta antalet spermier som passerar genom optiska fält under en viss tid. Från detta kan spermernas antal och hastighet räknas ut och spermerna grupperas efter typ av motilitet. Morfologin hos spermerna kan inte analyseras med denna metod. Jämfört med föregångare till Qualisperm™ är denna metod lättare att använda och inte lika dyr vilket gör den mer anpassad för användning ute på hingststationerna, detta förutsatt att analysresultaten är tillförlitliga.

Genom centrifugering av spermerna genom en kolloid hoppas man kunna selektera fram de spermier som har högst fruktsamhetspotential. Vid enbart centrifugering, utan kolloid, elimineras endast seminalplasman. Genom centrifugering genom en kolloid elimineras både döda spermier och seminalplasman. Elimination av seminalplasman har inte en genomgående positiv effekt på spermernas överlevnad och fruktsamhetspotential (Love et al, 2005, Braun et al, 1994, Kareskoski et al, 2006, MacPherson et al, 2002, Sieme et al, 2004, Waite et al, 2008, Morrell, 2008). Dock har den minskning av döda spermier som centrifugering genom en kolloid leder till en positiv effekt på de levande spermernas överlevnad och fruktsamhetspotential (Brinsko et al, 2003, Morrell, 2008).

Ytterligare ett steg i att förbättra spermernas fruktsamhetspotential är att tillföra sperman spädningssvätska. Med spädningssvätskan tillsätts näring, buffring och antibiotika vilket har visat sig öka spermernas överlevnadstid (Aurich, 2005, Batellier et al, 1998, Malmgren, 1997, Rota et al, 2004, Rousset et al, 1987). Detta är särskilt viktigt vid kylning och frysning då denna hantering utsätter

spermierna för negativa påfrestningar samtidigt som det ökar spermans hållbarhet vilket är nödvändigt då sperman ska transporteras (Malmgren, 1997). Dock lämpar sig inte alla hingstars sperma för kylning, man har sett variationer i fertilitet hos vissa hingstar som kan förklaras av kylning av sperman (Aurich, 2005, Katila, 1997). Det finns ett stort utbud av spädningvätskor med olika sammansättning. Vanligt är att spädningvätskan är antingen skummjölks- eller äggulebaserad. Förut användes spädningvätskan Kenney's till största delen i Sverige medan INRA96 idag är den mest använda. Båda vätskorna är skummjölksbaserade men annars till sin sammansättning olika. Tidigare studier har pekat på att INRA96 ger en ökad hållbarhet hos sperman (Pillet et al, 2008) men detta gäller inte för alla hingstar, en del hingstars spermier överlever längre i Kenney's (Batellier et al, 1998).

Examensarbetet är i sig en del i ett större projekt som sedan tre år tillbaka pågår på SLU. Projektet genomförs i samarbete med Flyinge AB och dess syfte är att förbättra befintliga och förhoppningsvis skapa nya metoder för kvalitetssäkring av hingstesperma.

Qualisperm™ har utvärderats två gånger tidigare i liknande delprojekt; 2006 av Jessika Pettersson och 2007 av Hanna Strutz. Qualisperm™ programvara har förändrats till viss del sedan dessa utvärderingar, bl.a. mäter Qualisperm™ i den nya versionen (2008) även progressiv motilitet.

Detta examensarbets syfte var att undersöka hur motilitet och fruktsamhet hos hingstesperma påverkas av olika spädningvätskor, av selektion och av kylning samt jämföra analysresultat från Qualisperm™ med resultat från subjektiv bedömning med hjälp av ljuskontrastmikroskop.

MATERIAL OCH METODER

Hingstmaterial

I studien ingick 12 hingstar som var uppstallade i Flyinge och dessa hingstar var mellan 4 och 25 år gamla. Elva av dessa var av halvblodstyp och en av ponnytyp. Vilka hingstar som inkluderades i studien baserades på hur stor efterfrågan det var på varje enskild hingst dvs. att först försågs de kunder som hade beställt aktuell hingst och blev det sedan sperma över inkluderades denna hingst i studien. Under två veckor i juni 2008 samlades och analyserades sperma från dessa hingstar på Flyinge hingststation. Vid spermasamlingen användes artificiell vagina av typerna Missouri och Colorado. Hingstarna samlades som regel varannan dag men vissa hingstar samlades vid enstaka tillfällen två dagar i sträck. Totalt ingick 52 ejakulat i studien varav 4 hingstar bidrog med 5 ejakulat var och 8 hingstar med 4 ejakulat var. Ejakulaten analyserades efter 0 timmar, 24 timmar och 48 timmar. Mellan analyserna förvarades sperman i kylskåp (5°C).

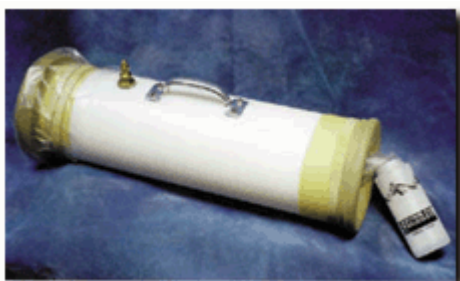


Bild 1. Artificiell vagina av Colorado-typ

Bild 2. Artificiell vagina av Missouri-typ



Flödesschema

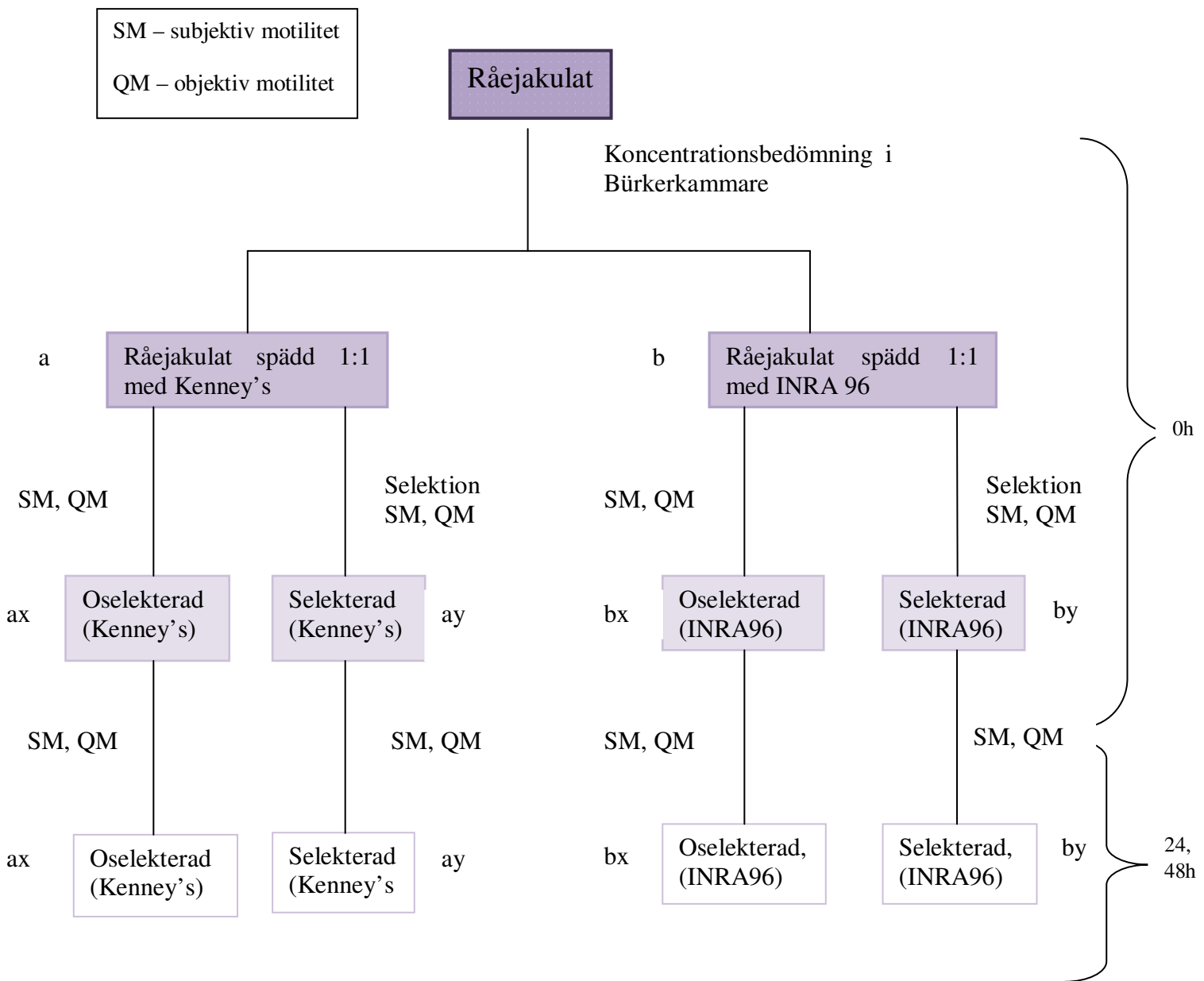
Sperman (råejakulat) späddes 1:1 med Kenney's eller INRA96. Kenney's är skummjölksbaserad och består av 2,4g mjölkpulver, 4,9g glukos 0,15g dihydrostreptomycin och 0,15g penicillin som blandas i 100 ml sterilt vatten. Även INRA96 är skummjölksbaserad och består av okända proportioner penicillin, Gentamicin och fungiciden Amphotericin B (IMV Technologies, 2008-09-01). Flyinge AB använder INRA96 för spädning.

Sperman kodades avseende hingstens identitet och delades upp i två prover; ett för spädning med Kenney's (a) och ett för spädning med INRA96 (b). Därefter delades vardera spädda provet upp i två; ett för selektion mha centrifugering genom en kolloid(x) och ett som inte selekterades (y).

Proverna (ax, ay, bx, by) analyserades avseende motilitet; först genom subjektiv bedömning mha ljusmikroskop och sedan med Qualisperm™. (CASA). Analyserna genomfördes vid 0, 24 och 48 timmar efter samling. Alla prover förvarades i kylskåp (5°C) mellan analystillfällena.

Koncentration analyserades i ocentrifugerat prov med hjälp av Bürkerkammare.

Figur 1. Flödesschema för de olika beredningsformerna ax, ay, bx, och by under 0 h, 24 h och 48 h.



Koncentration

Bürkerkammare användes för manuell koncentrationsbestämning och analysen utfördes av Jane Morrell. En Bürkerkammare består av ett rutsystem där antalet spermier räknas i 25 rutor och koncentrationen räknas fram i spermier per ml. För att genomföra analysen späds 10 μ l sperma med 990 μ l koksaltlösning (buffertlösning av natriumklorid och fosfat) och en droppe av denna lades i kammaren. Vid analys med Qualisperm™ fås ett mått på koncentration för varje enskilt prov som analyseras.

Selektion

Spermierna selekterades genom "Single layer centrifugation" som utfördes av Jane Morrell. Metoden var en modifiering av den som beskrevs av Morrell et al. (2008). Provet prepareras genom att 4 ml kolloid (Androcoll- E™) pipetteras ned i ett centrifugrör och 1,5 ml sperma, av koncentrationen ca 100 miljoner spermier/ml, tillsätts. Provet centrifugeras vid 300g i 20 minuter. Efter centrifugering suges seminalplasma och kolloid bort varefter spermiepelleten späds med 2 ml av antingen Kenney's eller INRA96 (Morrell, Johannisson et al, 2008).

Motilitetsbedömning

Hingstspermiens huvud är ovalt och det naturliga rörelsemönstret stora vida cirklar.

Motilitetsbedömningen bestod av en subjektiv del som gjordes genom att 5 μ l av varje prov (ax, ay, bx, by) lades på ett i förväg uppvärmt objektsglas med ett täckglas ovanpå. Objektsglaset placerades på en värmeplatta som höll temperaturen 38°C och motiliteten bedömdes i ljusmikroskop. Motiliteten bedömdes i procent (0-100%).

För objektiv motilitetsanalys användes Qualisperm™ som är en typ av CASA (Computer Assisted Semen Analysis), dvs. ett dataprogram för analys av sperma. Dataprogrammet används tillsammans med en kamera (MV-D640-48-U2-10 Photon Focus Camera) som är kopplad till ett faskontrastoptikmikroskop (Nikon E200). Innan analys påbörjas måste rätt djurslag anges för att dataprogrammet ska kunna skilja på normalt och defekt rörelsemönster. Genom att spermier avger ljus i faskontrast kan programmet registrera dem och räkna ut hastigheten för varje enskild spermie. Analysen sker genom att 5 μ l sperma sätts på ett i förväg uppvärmt objektsglas, ett täckglas placeras ovanpå, fyra olika fält på objektsglaset analyseras och ett genomsnitt fås av resultaten från de fyra olika fälten. Programmet delar upp spermier i fyra olika kategorier baserat på vilken slags motilitet de har. Spermier i kategori A rör sig snabbt framåt medan spermier i kategori B rör sig långsamt framåt. Kategori C innehåller spermier som rör sig men spermier har inte progressiv motilitet. Spermier i kategori D är omotila. Programmet räknar ut ett totalt mått på motilitet samt ett sammanlagt resultat för progressiv motilitet (spermier i kategori A och B) och det är dessa motilitetsvärden som använts i analysen och jämförts med det subjektiva måttet på rörelseförmåga.

Qualisperm™ räknar även ut koncentration och andel omotila spermier, dessa mått har dock inte inkluderats i denna studie.

Dessutom räknar programmet ut hastighet hos spermerna ($\mu\text{m/s}$) och dessa resultat har jämförts med de sammanlagda fertilitetsresultaten (dräktighet/inseminerade brunster) för perioden 2- 12/6 och för hela säsongen 2008. Även motilitetsresultaten, både de subjektiva och objektiva, har analyserats tillsammans med fertilitetsresultaten. De resultat som har använts vid analys med fertilitetsresultaten är de för beredning bx (oselekterad, INRA96).



Bild 3. Qualisperm™ på plats i Flyinge

Statistik

Resultaten från den subjektiva motilitetsbedömningen samt från Qualisperm™ har bearbetats statistiskt mha SAS (Statistical Analysis Systems Package, version 9,1 SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA, 1989) av docent Nils Lundeheim. I SAS har Spearman (CORR Procedure) och Mixed Procedure använts.

Medelvärden och variationskoefficiens har räknats ut för de olika spädningvätskorna samt för objektiv motilitetsbedömning och progressiv motilitetsbedömning framtagen med Qualisperm™ samt för subjektiv motilitetsbedömning utförd mha ljusmikroskop. Spearman (CORR Procedure) har använts för att räkna fram korrelationer mellan objektiv motilitetsbedömning, progressiv motilitetsbedömning framtagen med Qualisperm™ samt för subjektiv motilitetsbedömning utförd mha ljusmikroskop utifrån de två olika spädningvätskorna och selektion/icke selektion. För ovan nämnda värden har även variansanalysen räknats fram med Mixed Procedure.

Korrelationen mellan spermiehastighet och dräktighetsprocent samt motilitet och dräktighetsprocent har räknats fram mha Microsoft Office Excel (2007).

Fertilitetsresultat för hela säsongen 2008 och för perioden 2/6 – 12/6 2008 har använts. Dräktighetsprocenten anges per inseminerad brunst. Varje brunst omfattar mellan 1-4 inseminationer.

RESULTAT

Totalt analyserades 208 prover från 52 ejakulat. Varje ejakulat fördelades på fyra olika beredningsformer (se tabell 1). Proverna analyserades vid tre olika tidpunkter; 0h, 24h och 48 h efter samling.

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

Tid	ax	ay	bx	by	ax-Kenney's oselek
0h	52	52	52	52	ay- Kenney's selek
24h	52	52	52	52	bx- INRA96 oselek
*48h	52	52	52	52	by- INRA96 selek

* - endast subjektiv motilitetsanalys mha ljusmikroskop

Analysresultat per hingst avseende motilitet samt koppling till fertiliteten

I Tabell 2 anges medelvärde och standarddeviation avseende både subjektiv (SM) och objektiv motilitet (OM) för varje hingsts bx-prov (INRA96, ocentrifugerat) vid 0h. I tabellen finns även antal dräktigheter per antal inseminerade brunster för tiden 2/6 – 12/6 2008 angivna, resultaten inkluderar både insemination med transportsperma och färsk sperma. Den subjektiva motiliteten anges med 5 % intervall medan Qualisperm™ anger motilitet med två decimaler. I tabellen kan man utläsa att den objektiva motiliteten varierade mer för varje enskild hingst än den subjektiva motiliteten. Hingsten med högsta motilitet (DD) har dräktighetsprocent 100. Tabellen visar dock att hög motilitet inte alltid innebär hög dräktighetsprocent, se t.ex. hingst N och K.

Endast korrelation mellan hingstarnas motilitets- och fertilitetsresultat har analyserats. Då fertilitetsresultaten omfattar för få ston kan inte någon enskild bedömning per hingst göras.

Tabell 2. Jämförelse av objektiv och subjektiv motilitet per hingst för bx (INRA96 ocentrifugerade) - prover 0 timmar efter samling, samt dräktighetsresultat från antal inseminerade brunster under perioden 2/6 – 12/6 2008.

Hingst	Antal ejakulat	OM Medel ± SD	SM Medel ± SD	Dräktigheter/inseminerade brunster 2/6-12/6 2008
I	4	70,5±9,7 %	75±7 %	4/13, 31 %
J	4	69,9±18,8 %	74±10 %	1/3, 33 %
K	5	78,0±13,9 %	77±12 %	2/7, 29 %
L	4	79,1±13,0 %	84±6 %	3/3, 100 %
N	4	82,7±9,6 %	80±9 %	10/19, 53 %
O	4	71,5±15,6	78±10 %	2/3, 67 %
Q	4	79,3±5,0	81±3 %	2/3, 67 %
R	5	76,9±3,0 %	79±2 %	4/5, 80 %
T	4	70,8±16,3 %	75±12 %	4/6, 67 %
U	5	80,4±14,5 %	79±11 %	11/22, 50 %
AA	5	74,7±16,1 %	79±9 %	9/14, 64 %
DD	4	81,5±9,2	83±8 %	6/6, 100 %

OM – objektiv motilitet, SM – subjektiv motilitet, SD – standardavvikelse

I tabell 3 visas dräktighetsresultaten per hingst för insemination med transportsperma (TAI) och färsk sperma (AI). Ur tabellen kan man utläsa att transportsperma ger sämre dräktighetsresultat än vid insemination med färsk sperma. Antalet inseminerade brunster där transportsperma respektive färsk sperma använts skiljer sig mycket, vid 62 brunster har transportsperma använts medan färsk sperma endast använts vid 32 brunster.

Tabell 3. Dräktighet per inseminerade brunster 2-12/6 angivet per hingst.

	TAI	AI
I	3/9, 33 %	1/2, 50 %
J	0/1, 0 %	1/2, 50 %
K	2/4, 50 %	0/1, 0 %
L	1/1, 100 %	2/2, 100 %
N	7/17, 41 %	2/2, 100 %
O	1/1, 100 %	1/2, 50 %
Q	2/2, 100 %	-
R	2/2, 100 %	2/3, 67 %
T	2/4, 50 %	2/3, 67 %
U	7/12, 58 %	4/9, 44 %
AA	7/9, 78 %	1/4, 25 %
DD	5/5, 100 %	2/2, 100 %
TOTAL	28/62, 45 %	18/32, 56 %

TAI - transportsperma, AI – färsk sperma

Analysresultat avseende motilitet samt dräktighetsresultat för AI och TAI

Nedan följer en tabell där motilitetsresultat för olika analysmetoder jämförs med dräktighetsresultat för perioden 2-12/6 2008. Den beredning som använts är sperma spädd med INRA96, oselekerad. Det man kan se är att korrelationen för subjektiv motilitetsanalys generellt är högre, med hög signifikans, ffa för färsk, oselekerad sperma spädd med INRA96 direkt efter samling (beredning by) jämförd med dräktighetsprocent (både AI och TAI inkluderade) för perioden 2-12/6 2008 med korrelationen 0,77 och hög signifikans.

Tabell 4. Analysresultat avseende motilitet samt dräktighetsresultat för AI och TAI

Analysmetod	Tid	AI/TAI	Korrelation	Signifikans
SM	0 h	AI & TAI	0,77	P<0,01
OM	0 h	AI & TAI	0,39	Ingen
SM	0 h	AI	0,57	P<0,05
OM	0 h	AI	0,39	ingen
SM	0 h	TAI	0,75	P<0,001
OM	0 h	TAI	0,40	ingen
SM	24 h	TAI	- 0,14	Ingen
PM	0 h	AI	0,60	P<0,05
PM	24 h	TAI	0,01	ingen

SM – subjektiv analys mha faskontrastmikroskop, OM – objektiv motilitetsanalys mha QualispermTM, PM – progressiv motilitet analyserad mha QualispermTM

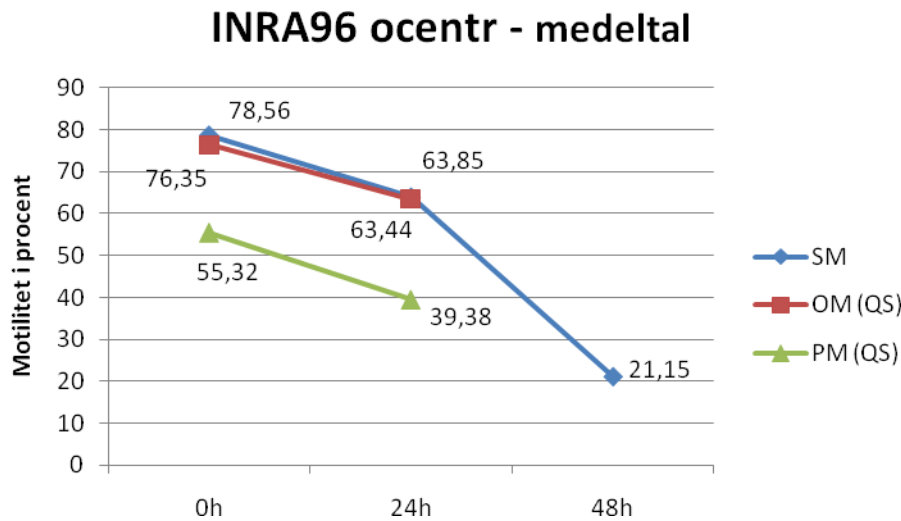
Analysresultat avseende spermiehastighet och dräktighetsresultat

Spermiehastighet och dräktighetsresultat för det totala antalet inseminerade brunster per hingst för perioden 2- 12/6 2008 jämfördes i studien. Spermiernas hastighet räknas i $\mu\text{m/s}$. Den beredning som analyserats är sperma spädd med INRA96, ej selekterade och provet har analyserats direkt efter samling. I dräktighetsresultatet ingick dräktighetsprocent för både AI (färsk sperma) och TAI (transportsperma). Det finns ett ganska högt samband mellan spermiehastighet och andel dräktiga/inseminerade brunster ($r=0,63$), $p<0,005$.

Inverkan av spädningsvätska och selektion på spermie motilitet

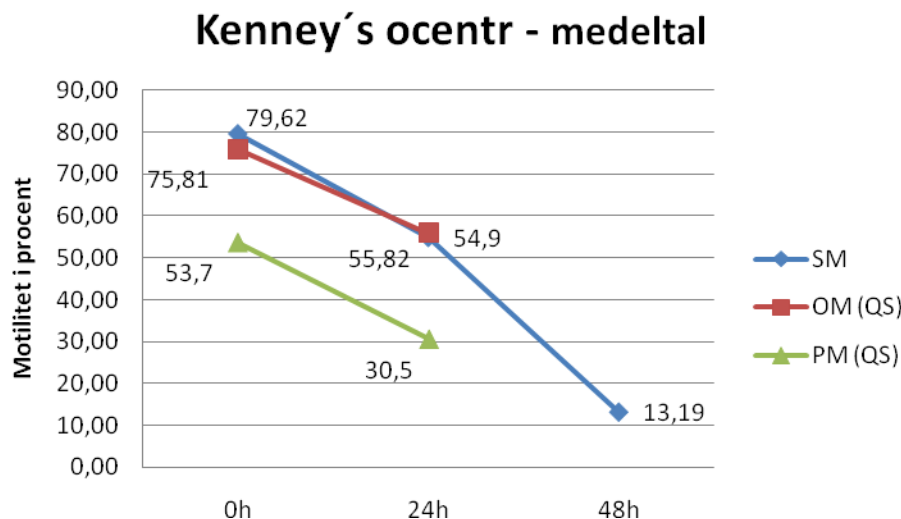
Figur 2 visar hur den subjektiva, objektiva och progressiva motiliteten hos samtliga hingstar förändras från samlingsdag och 24 timmar samt 48 timmar (endast subjektiv motilitet) efter samling. Figuren visar värdena för provet bx dvs. råejakulat som späts med INRA96 och inte centrifugerats. De tre kurvorna följs åt fram till 24 timmar efter samling. Den progressiva motiliteten har dock ett lägre

värde från början och denna skillnad mot subjektiv och objektiv motilitet kvarstår även vid mätning 24 timmar efter samling.



Figur 2. SM – subjektiv motilitet, OM – objektiv motilitet, PM – progressiv motilitet, QS – analys utförd mha QualispermTM

Figur 3 visar hur den subjektiva, objektiva och progressiva motiliteten hos samtliga hingstar förändras från samlingsdag och 24 timmar samt 48 timmar (endast subjektiv motilitet) efter samling. Figuren visar värdena för provet ax dvs. råejakulat som späts med Kenney's och inte centrifugerats. De tre kurvorna följs åt fram till 24 timmar efter samling. Den progressiva motiliteten har dock ett lägre värde från början och denna skillnad mot subjektiv och objektiv motilitet kvarstår även vid mätning 24 timmar efter samling.

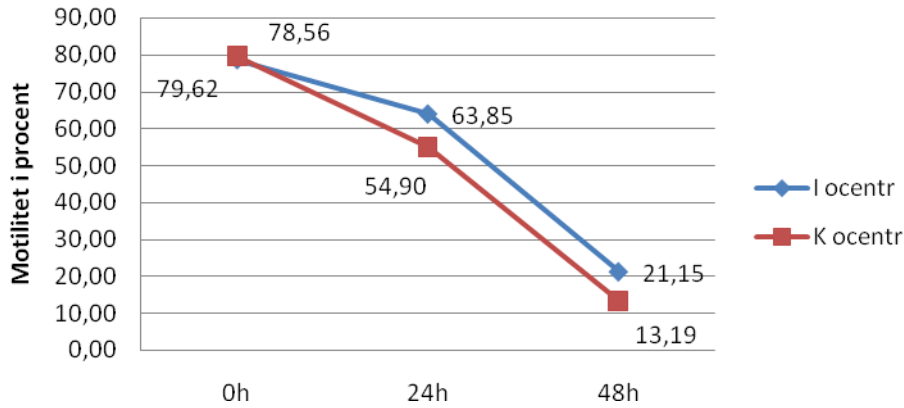


Figur 3. SM – subjektiv motilitet, OM – objektiv motilitet, PM – progressiv motilitet, QS – analys utförd mha QualispermTM

Figur 4 illustrerar hur motiliteten hos prov ax och bx enligt subjektiv motilitetsbedömning förändras från samlingsstidpunkt och 24 samt 48 timmar

framåt. I figuren kan man se hur kurvorna för de olika proven följs åt. Dock är förändringen i rörelseförmåga större hos prov ax (Kenney's, ocentrifugerat) än hos prov bx (INRA96, ocentrifugerat).

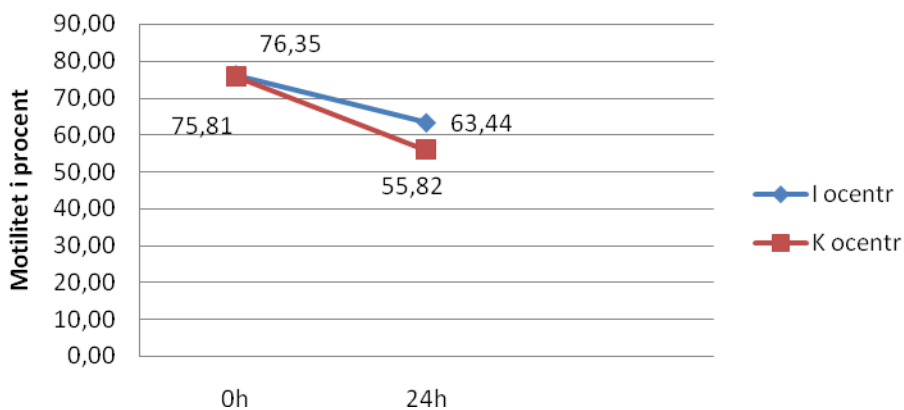
SM Kenney's och INRA96 ocentr - medeltal



Figur 4. SM – subjektiv motilitet

Figur 5 visar hur motiliteten hos prov ax och bx enligt objektiv motilitetsbedömning förändras från samlingstidpunkt och 24 timmar framåt. I figuren kan man se att motiliteten hos spermerna i prov ax (Kenney's ocentrifugerat) har något sämre rörelseförmåga från början och att rörelseförmågan försämras, från 0 - 24 timmar, i högre grad för denna beredningsform än för prov bx (INRA96 ocentrifugerat).

OM Kenney's och INRA96 ocentr - medeltal

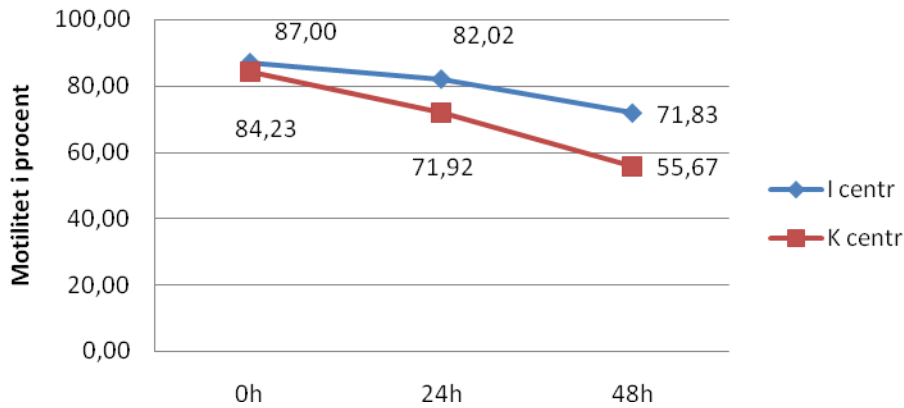


Figur 5. OM – objektiv motilitet

Figur 6 visar hur motiliteten hos prov ay och by enligt subjektiv motilitetsbedömning förändras från samlingstidpunkt och 24 samt 48 timmar framåt. I figuren kan man se att motiliteten hos spermerna i prov ay (Kenney's centrifugerat) har sämre rörelseförmåga från början och att rörelseförmågan

försämras, från 0 - 48 timmar, i högre grad för denna beredningsform än för prov by (INRA96 centrifugerat).

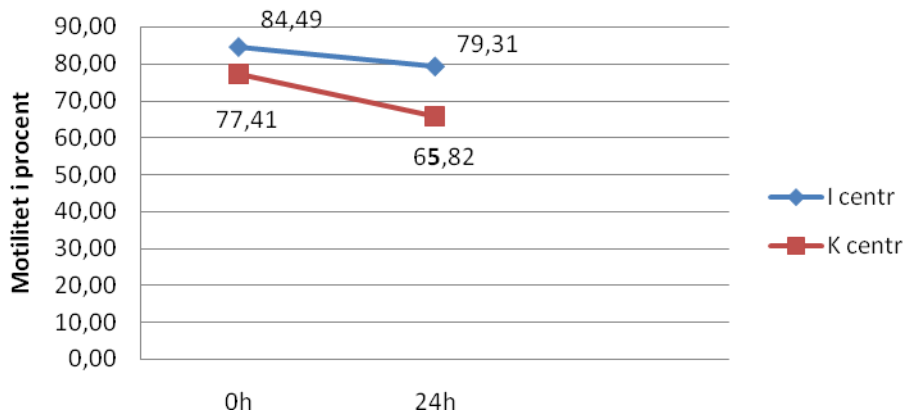
SM Kenney's och INRA96 centr - medeltal



Figur 6. SM – subjektiv motilitet

Figur 7 visar hur motiliteten hos prov ay och by enligt objektiv motilitetsbedömning förändras från samlingstidpunkt och 24 timmar framåt. I figuren kan man se att motiliteten hos spermerna i prov ay (Kenney's ocentrifugerat) har sämre rörelseförmåga från början och att rörelseförmågan försämras, från 0 - 24 timmar, i högre grad för denna beredningsform än för prov by (INRA96 ocentrifugerat).

OM Kenney's och INRA96 centr - medeltal



Figur 7. OM – objektiv motilitet

Korrelationer mellan subjektiv, objektiv och progressiv motilitet

Nedan följer tabeller där korrelationer redovisas. Den objektiva och progressiva motilitetsbedömningen är gjord mha Qualisperm™ medan den subjektiva motiliteten är bedömd mha ljusmikroskop.

I tabell 5 kan utläsas att det totalt sett rådde hög korrelation mellan subjektiv, objektiv och progressiv motilitet. Signifikansen hos korrelationerna är hög, $p = <0,0001$.

Tabell 5. Totala korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM) framtagen med ljusmikroskop, objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) framtagna med Qualisperm™.

SM – OM 0,81

SM – PM 0,66

OM – PM 0,80

Samtliga prover, $p = <0,0001$

I tabell 6 redovisas korrelationsvärden för beredningarna bx (INRA96, ocentrifugerat) och by (INRA96, centrifugerat). Hög korrelation råder framförallt mellan subjektiv och objektiv motilitet samt mellan objektiv och progressiv motilitet. Signifikansen för alla tre korrelationerna är hög, $p = <0,0001$.

Tabell 6. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM), objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) för prover bx och by.

SM – OM 0,75

SM – PM 0,61

OM – PM 0,83

Samtliga prover, $p = <0,0001$

I tabell 7 redovisas korrelationsvärden för beredningarna ax (Kenney's, ocentrifugerat) och ay (Kenney's, centrifugerat). Även här (jämför med Tabell 3) råder hög korrelation framförallt mellan subjektiv och objektiv motilitet samt mellan objektiv och progressiv motilitet. Signifikansen för alla tre korrelationerna är hög, $p = <0,0001$.

Tabell 7. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM), objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) för prover ax och ay.

SM – OM 0,82

SM – PM 0,64

OM – PM 0,76

Samtliga prover, $p = <0,0001$

Tabell 8 visar korrelation för beredningarna ax (Kenney's, ocentrifugerat) och bx (INRA96, ocentrifugerat). Korrelationerna mellan subjektiv och objektiv motilitet samt mellan objektiv och progressiv motilitet är relativt höga medan korrelationen mellan subjektiv och progressiv motilitet är något lägre. Signifikansen för alla tre korrelationerna är hög, $p = <0,0001$.

Tabell 8. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM), objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) för ocentrifugerade prover (ax och bx).

SM – OM 0,76

SM – PM 0,53

OM – PM 0,71

Samtliga prover, $p = <0,0001$

Tabell 9 visar korrelation för beredningarna ay (Kenney's, centrifugerat) och by (INRA96, centrifugerat). Korrelationerna mellan subjektiv och objektiv motilitet samt mellan objektiv och progressiv motilitet är höga medan korrelationen mellan subjektiv och progressiv motilitet är något lägre. Signifikansen för alla tre korrelationerna är hög, $p = <0,0001$.

Tabell 9. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM), objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) för centrifugerade prover (ay och by).

SM – OM 0,84

SM – PM 0,71

OM – PM 0,82

Samtliga prover, $p = <0,0001$

I tabell 10 redovisas korrelationerna för beredningen bx (INRA96, ocentrifugerat). Korrelationerna mellan subjektiv och objektiv motilitet samt mellan objektiv och progressiv motilitet är relativt höga och har hög signifikans, $p = <0,0001$, medan korrelationen mellan subjektiv och progressiv motilitet är ganska låg och har lägre, men fortfarande hög, signifikans, $p = 0,0009$.

Tabell 10. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM), objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) för provet bx.

SM – OM 0,72

SM – PM 0,45*

OM – PM 0,71

*Samtliga prover, $p = <0,0001$, * $p = 0,0009$*

Tabell 11 visar korrelation för beredningen by (INRA96, centrifugerat). Korrelationen mellan subjektiv och objektiv motilitet är relativt hög och mellan objektiv och progressiv motilitet är korrelationen hög, medan korrelationen mellan subjektiv och progressiv motilitet är något lägre. Signifikansen för alla tre korrelationerna är hög, $p = <0,0001$.

Tabell 11. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM), objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) för provet by.

SM – OM 0,73

SM – PM 0,67

OM – PM 0,87

Samtliga prover, $p = <0,0001$

I tabell 12 redovisas korrelationerna för beredningen ax (Kenney's, ocentrifugerat). Korrelationerna mellan subjektiv och objektiv motilitet samt mellan objektiv och progressiv motilitet är relativt höga och har hög signifikans, $p = <0,0001$, medan korrelationen mellan subjektiv och progressiv motilitet är ganska låg och har lägre, men fortfarande hög, signifikans, $p = 0,0004$.

Tabell 12. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM), objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) för provet ax.

SM – OM 0,76

SM – PM 0,48*

OM – PM 0,67

*Samtliga prover, $p = <0,0001$, * $p = 0,0004$*

Tabell 13 visar korrelation för beredningen ay (Kenney's, centrifugerat). Korrelationen mellan subjektiv motilitet är hög och mellan objektiv och progressiv motilitet samt mellan subjektiv och progressiv är korrelationen relativt hög. Signifikansen för alla tre korrelationerna är hög, $p = <0,0001$.

Tabell 13. Korrelationer mellan subjektiv motilitet (SM), objektiv motilitet (OM) och progressiv motilitet (PM) för provet ay.

SM – OM 0,89

SM – PM 0,70

OM – PM 0,77

Samtliga prover, $p = <0,0001$

Variansanalys

Variansanalysen visar att typ av spädningsvätska och selektion/icke selektion har signifikant betydelse för subjektiv, objektiv och progressiv motilitet, $p = <0,0001 - 0,0012$. Variansanalysen vid sammanvägning av de båda parametrarna spädningsvätska och selektion visar på mycket låg signifikans för subjektiv, objektiv och progressiv motilitet, $p = 0,4851 - 0,9214$.

DISKUSSION

Detta examensarbets syfte är att ta reda på hur rörelseförmåga och fruktsamhet hos hingstpermier påverkas av olika spädningsvätskor och av selektion och samtidigt jämföra analysresultat från Qualisperm™, en objektiv bedömningsmetod, med resultat från subjektiv bedömning utförd med hjälp av faskontrastmikroskop. Dessutom jämfördes resultaten med fruktsamheten under perioden 2008-06-02 - 2008-06-12.

Qualisperm™ har tidigare utvärderats i två olika examensarbeten (Pettersson, 2006 och Strutz, 2007) och företaget (Biophos AG, Schweiz) som tillverkar produkten utvärderar och omarbetar Qualisperm™ kontinuerligt. Dock har inga studier om Qualisperm™ publicerats utöver nämnda examensarbeten. 2008 års version av Qualisperm™ har utvecklats till att analysera fler parametrar än tidigare, nu kan instrumentet även analysera progressiv motilitet och hastighet hos spermerna. Fördelen med Qualisperm™ i jämförelse med andra objektiva motilitetsbedömningsmetoder som CASA (Computer Assisted Semen Analysis) är att Qualisperm™ är enklare att använda och betydligt billigare, vilket skulle kunna göra den lämplig att använda i verksamheten på en hingststation. Dock har Qualisperm™ ett visst mått av subjektivitet då användaren själv bestämmer var i provet analysen ska ske. Under studien (2008) hade Qualisperm™ ibland svårt att

analysera ett fält i provet vilket gjorde att man fick byta plats på objektsglaslet för att om möjligt kunna få ett mätresultat på ett annat ställe i provet. Detta innebar att tiden för analys per prov varierade och spermerna kom således att ligga olika länge i en temperatur om 38°C. Det verkade som om Qualisperm™ hade mest problem att analysera ett fält om spermiekoncentrationen varierade för mycket under mätningen, t.ex. vid hög motilitet hos spermerna eller vid en hög koncentration, denna iakttagelse stämmer med de resultat som H. Strutz kom fram till i sin studie 2007. De problem som kan uppstå vid analysen gör att proceduren för att analysera ett prov tar ganska lång tid. Det tar ca en minut att göra en subjektiv bedömning av ett spermprov medan det tog i genomsnitt 3-4 min att analysera ett prov mha Qualisperm™. Uppstod det problem, vid analys med Qualisperm™, som de nämnda ovan kunde det hända att ett nytt prov fick prepareras för att vara säker på att resultatet skulle bli rättvisande och detta medförde då att analysen tog ännu mer tid.

Ytterligare en aspekt av Qualisperm™ är att metoden inte ger något svar på spermiermorfologin. Detta gör bedömningen av spermernas fertilitet mindre tillförlitlig då flera studier har visat på att spermans fruktsamhetspotential inte kan bedömas endast genom att utvärdera motiliteten (Samper et al, 1991, Varner, 2008). Med subjektiv analysmetod kan man förutom att bedöma spermernas rörelseförmåga samtidigt få ett svar på hur sperman ser ut.

De olika spädningssvetsorna som utvärderats i studien är Kenney's och INRA96. Båda är skummjölksbaserade men innehållet skiljer sig i övrigt (se Material och Metod, Flödesschema). Resultaten från både den subjektiva och objektiva motilitetsbedömningen tyder på att spermier som får en tillsats av INRA96 har en högre rörelseförmåga både initialt men framförallt 24 timmar efter samling än de spermier som späds med Kenney's (se Figur 2 och 3). Den subjektiva motilitetsbedömningen vid 48 timmar efter samling tyder också på att spermerna har högre motilitet vid spädning med INRA96 (se Figur 2 och 5). Även efter selektion mha centrifugering har sperma spädd med INRA96 högre motilitet än vid spädning med Kenney's (se Figur 4 och 5). Den statistiska analysen visar att korrelationen mellan de olika metoderna för motilitetsbedömning är hög och att de skillnader som föreligger är statistiskt signifikanta, dvs. chansen för att de skillnader som finns skulle vara slumpmässigt uppkomna är mycket liten.

Betydelsen av selektion genom centrifugering (Single Layer Centrifugation) har utvärderats i studien. Resultaten tyder på att centrifugering gör att spermerna bibehåller en större rörelseförmåga, såväl vid spädning med INRA96 som med Kenney's spädningssvetsa (se figur 3 - 6). Detta är särskilt tydligt vid 48 timmar efter samling (se figur 3 och 5).

Nedan följer diskussion om motilitetsresultat och spermiehastighet som analyserats tillsammans med dräktighetsresultat. Man ska vara medveten om att då det rör sig om en mycket begränsad period, 2-12/6 2008, är endast dräktighetsresultat för sammanlagt 101 ston för totalt 12 hingstar representerade i studien. Från två av hingstarna användes sperma för insemination till så få ston som 3 st. Detta medför att en viss försiktighet får iakttagas vid tolkning av resultaten då underlaget är litet, ovan nämnda gör det också omöjligt att dra slutsatser vad gäller enskilda hingstar.

Spermiernas hastighet kan mätas mha Qualisperm™ och anges då i $\mu\text{m/s}$. I studien har spermiehastighet analyserats tillsammans med dräktighetsresultat. Dräktighetsresultaten är både från perioden 2-12/ 2008. Hastighetsvärdena är från perioden 2-12/6 2008 och är ett medelvärde uträknat för varje hingst. Då hastighetsvärdena analyseras tillsammans med dräktighetsprocenten för 2-12/6 2008 kan man se att korrelationen är 0,63, dvs. en ganska hög korrelation föreligger, detta samband är statistiskt signifikant. Resultaten tyder alltså på att en högre spermiehastighet ger bättre dräktighetsprocent. Dessa resultat överensstämmer med studier gjorda 2006 (Pettersson) och 2007 (Strutz) där spermiehastighet i relation till dräktighet också studerades. Även i dessa studier var sambandet mellan hög spermiehastighet och hög dräktighetsprocent starkt. I dessa studier analyserades spermier spädda med Kenney's och det var också denna beredning som användes vid insemination av hästarna i studien. Det skulle vara intressant att titta närmare på relationen mellan spermiehastighet och dräktighetsprocent. T.ex. skulle dräktighetsprocent för transportsperma och färsk sperma kunna jämföras med spermiehastighet för att kunna se om spermiehastighet har lika stor betydelse vid de olika tillvägagångssätten för artificiell insemination. Analysen av transportsperma skulle då kunna utföras på plats på mottagarstationen direkt innan insemination för att få så rättvisande värden som möjligt.

Dräktighetsresultaten har även använts för analys tillsammans med motilitetsresultaten (se tabell 4). De motilitetsvärden som då användes var de för oselektad sperma spädd med INRA96 direkt efter samling samt 24 timmar efter samling. För en jämförelse mellan objektiv och subjektiv analysmetod jämfördes dräktighetsvärdena för AI (färsk sperma används vid inseminering) och TAI (transportsperma används vid inseminering) ihop med motsvarande dräktighetsresultat. Man kunde då se att den subjektiva analysen hade ett mycket starkare samband med dräktighetsresultaten än den objektiva analysen. Signifikansen för sambandet mellan subjektiv analys och dräktighetsresultat var hög. Detta är ett argument för att subjektiv analys mha faskontrastmikroskop fungerar bättre än objektiv analys mha Qualisperm™.

Dräktighetsresultat för AI har analyserats med resultaten för ovan nämnda beredning (by) direkt efter samling. Korrelationen mellan subjektiva motilitetsvärden och dräktighetsresultat för AI var 0,57 dvs. måttlig korrelation finns. Denna korrelation var statistiskt signifikant. Korrelationen mellan progressiv motilitet och dräktighetsresultat för AI var 0,6, här föreligger också måttlig korrelation, även detta samband var statistiskt signifikant. Utöver dessa analyser har dräktighetsresultaten för TAI analyserats tillsammans med värdena för subjektiv och progressiv motilitet vid 24 timmar efter samling. Korrelationen mellan subjektiv motilitet och dräktighetsresultat var $-0,14$ och mellan progressiv motilitet samt dräktighetsprocent var den 0,01, i båda ovan nämnda finns ingen korrelation. Skillnaderna i korrelationsvärden mellan AI respektive TAI och motsvarande motilitetsvärden kan bero att de kylförhållanden som råder för prover analyserade vid 24 timmar efter samling inte är likvärdiga med de förhållanden transportsperman har innan den når stoet. De prover som analyserades efter 24 timmar hade förvarats i kylskåp i 5°C medan sperman som skickas för inseminering på annan geografisk plats transporteras i en frigolitlåda med kylklampor. Beroende på hur länge sperman transporteras, och hur snabbt temperaturen ökar när spermerna omgivningens temperatur olika snabbt. Utöver

detta är spermiekoncentrationen en annan i de spermadoser som skickas till stoet än de som analyserades i denna studie. Kontentan är att förhållandena på laboratoriet inte är de samma som i verkliga livet. De slutsatser man kan dra av detta är att det kan vara svårt att få tillförlitliga resultat om de riktiga förhållandena inte kan efterliknas då en studie genomförs.

KONKLUSION

Enligt studien fungerar spädningssvåtskan INRA96 bäst för att bevara spermieens rörelseförmåga.

Selektion genom centrifugering (Single Layer Centrifugation) gör att spermierna bibehåller sin motilitet längre tid än utan centrifugering.

Qualisperm™ är en objektiv analysmetod som, med tanke på den tid det tar att utföra analysen, den träning som krävs och den subjektivitet som fortfarande föreligger samt de felkällor som ovan nämnda parametrar medför, i dagsläget inte lämpar sig för praktisk tillämpning på en hingststation. Dock har Qualisperm™ flera fördelar jämfört med traditionell subjektiv motilitetsanalys då den analyserar fler parametrar. Särskilt intressant är att Qualisperm™ analyserar spermiehastighet vilket skulle kunna utgöra en ny intressant spermieparameter att studera. En vidare utveckling av Qualisperm™ kan mycket väl innebära att metoden blir tillämpbar även i den praktiska verksamheten.

TACK

Jag vill tacka personalen på Flyinge hingstdepå för ett mycket trevligt bemötande och ett gott samarbete. Jag vill även tacka Laura Junttila för trevligt sällskap under labbandets vedermödor.

Tack till personalen på spermalaboratoriet på OG för all hjälp med träning inför projektet. För hjälp med statistiken vill jag tacka Doc. Nils Lundeheim. Jag vill också rikta ett tack till biträdande handledare Prof. Anne-Marie Dalin och Doc. Anders Johannisson som hjälpt till med kunskande och förberedelser.

Jag vill även tacka Axel Pallin som hjälpt mig att förstå finesserna med access och excel!

Till slut vill jag tacka min handledare Jane Morrell som med kunskande och engagemang både i Flyinge och under resans gång hjälpt mig att komma i hamn med detta projekt!



Susse i labbet vid Flyinge hingstdepå.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89, 65-75
- Amann, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J. Androl.* 1, 89-98.
- Batellier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E, Magistrini M. 1998. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 degrees C aerobic conditions. *Theriogenology* 50, 229-36.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal reproduction science* 68, 181-90.
- Brinsko SP, Blanchard TL, Rigby SL, Love CC, Varner DD. 2003. Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology* 59, 735-42.
- Braun J, Sakai M, Hochi S, Oguri N. 1994. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 41, 809-18
- 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.
- Dahlsten A. 2006. Fertilitet hos svenska halvblodshingstar betäckningssäsongen 2004: en pilotstudie. Examensarbete (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) nr 2006:31
- Dowsett, K.F and Pattie, W.A. 1982. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert., Suppl* 32, 1-8.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 63, 1584-91.
- 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. 1997. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology* 48, 523-530.
- Morrell JM, Johannisson, A., Strutz, H., Dalin, A-M & Rodriguez-Martinez, H. (2008) Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage. *Equine Vet J* (under tryckning).
- Morrell JM, Dalin AM & H Rodriguez-Martinez (2008c) Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. *Equine Vet J* 40: (under tryckning) (doi: 10.2746/042516408X3221391).

- 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.
- Petterson, Jessica. 2007. Utvärdering av förbättrad metod för objektiv kvalitetsbedömning av spermimotoilitet hos hingst. Dept. of Clinical Sciences, SLU. Examensarbete (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2007:17.
- Pillet, E., Batellier, F. Duchampe, G. Furstoss, V. Le Verng, Y. Kerboeuf, D. Desherces, S. Schmitt, E. Magistrini, M. 2008. High fertility rates with stallion sperm cryopreserved in INRA96® based extender are not predicted by *in vitro* parameters. *Animal rep sci* 1-59, 38-39.
- Rota, A., Furzi, C., Panzani, D. and Camillo, F. 2004. Studies in motility and fertility of cooled stallion spermatozia. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 103-109.
- Rousset, H., Chanteloube, Ph., Magistrini, M. and Palmer, E. 1987. Assesment of fertility and semen evaluations of stallions. *J. Reprod. Fert.* 35, 25-31.
- Rupert, P., Amann, Katz, D. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* v 25, nr 3
- 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, 107-14.
- 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.
- Strutz, Hanna. 2007. Bedömning av spermimotoilitet i färsk, kyld samt selekterad hingstsperma med Qualisperm. Dept. of Clinical Sciences, SLU. Examensarbete (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2007:79.
- Söderquist, L. 2004. Artificial insemination I Compendium in Equine Reproduction, 168-177. Ed Dalin, AM., Malmgren, L. Institutionen för OG, SLU, Uppsala.
- Söderquist, L. 2006. Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelningen för komparativ reproduktion, obstetrik och juverhälsa, SLU. Artificiell insemination. *Nötkreaturens reproduktion.* 19:3-5.
- 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
- Varner, DD. 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, 448-62.
- Waite JA, Love CC, Brinsko SP, Teague SR, Salazar JL Jr, Mancill SS, Varner DD. 2008. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 70, 704-14

Hemsidor

IMV Technologies. Hemsida. [online] (2006-07) Tillgänglig: <http://www.imv-technologies.com/dnn/Racine/Menu/Nosgammesdeproduits/Reproductionéquine/tabid/85/language/en-US/default.aspx> [20080901]

Övrigt

Dalin, Anne-Marie. Professor reproduktion, SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper, avd. för reproduktion, Uppsala. E-post 20081109