

# **Förekomst av leukocyter i rå sperma hos semingaltar**

**Maria Wahnström**

**Handledare: Ann-Sofi Bergqvist  
Inst. för kliniska vetenskaper  
Biträdande handledare: Margareta Wallgren  
Quality Genetics**

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Litteraturoversikt.....	4
Anatomi.....	4
Testikel.....	4
Bitestikel.....	5
Accessoriska könskörtlar.....	6
Penis .....	6
Spermieutveckling.....	6
Kapacitering och akrosomreaktion.....	7
Ejakulatets innehåll .....	8
Förekomst av främmande celler i sperma .....	9
Leukocyter.....	9
Fria radikaler/ ROS .....	10
Cytokiner.....	10
Erytrocyter.....	11
Spermatogenetiska celler.....	11
Ytepitelceller .....	11
Förekomst av bakterier i galt sperma .....	11
Faktorer som påverkar spermaproduktionen.....	12
Sjukdomar och abnormaliteter som kan orsaka förekomst av främmande celler i sperma..	12
Balanopostit.....	12
Testikeldegeneration .....	13
Testikelhypoplasi .....	13
Orkit .....	14
Epididymidit.....	14
Seminovesikulit.....	14
Prostatit.....	15
Systemiska infektionssjukdomar.....	15
Artificiell insemination .....	15
Galtstationer i Sverige.....	15
Spermasamling .....	16
I stallet.....	16
På laboratoriet .....	17
Framställning av inseminationsdoser .....	19

Material och metoder .....	20
Antal galtar i studien .....	20
Hampshiregaltar .....	20
Yorkshiregaltar och Lantrasgaltar .....	20
Provtagningsförfarande .....	20
Färgningsförfarande .....	21
Papanicolaou färgningsmetod enligt spermalaboratoriet vid SLU .....	21
Papanicolaou fäргеgenskaper: .....	22
Harris Hematoxylin .....	22
OG-6 och EA-50 .....	22
Mikroskopering .....	22
Resultat.....	23
Diskussion .....	24
Tolkning av resultat.....	24
Leukocyter i sperma .....	25
Råd och förslag på fortsatta studier.....	27
Litteraturförteckning .....	28

## **SAMMANFATTNING**

Påvisande av leukocyter i ejakulat är en del i bedömningen av spermakvalitet hos galt. Leukocyter i sperman kan orsaka skada på spermerna vilket leder till nedsatt befruktningsduglighet. Inom svinseminproduktionen finns utarbetade rutiner för kvalitetssäkring av spermadoserna. Sedan år 2001 kontrolleras dock inte leukocytförekomst rutinmässigt i sperma från Hampshiregaltar som används till produktion av slaktsvin hos det svenska seminföretaget Quality Genetics.

Syftet med studien var att undersöka förekomst av leukocyter i sperma från semingaltar. Frågeställningen var om det finns galtar som har leukocyter i sperman och i så fall hur vanligt det är. Ytterligare frågeställningar var om det föreligger rasskillnader och om det finns skillnader mellan semingaltar som testats innan användning i semindosproduktion jämfört med dem som inte kontrollerats.

I studien ingick totalt 135st semingaltar varav 67st Hampshire, 35st Yorkshire och 33st Lantras, samtliga tillhörande Quality Genetics, och uppstallade vid galtstationen i Hållsta. Provtagningsperioden var mellan 1/1 2008 - 31/8 2008. Spermasamlingen utfördes av personal vid galtstationen enligt gängse rutiner. Råsperma togs från respektive ejakulat, därefter gjordes vallutstryk som färgades enligt Papanicolaou, varpå förekomst av leukocyter undersöktes i ljusmikroskop.

Resultatet av studien visar att det förekommer semingaltar som har leukocyter i sperman. Vid den första screeningen hade 23st (17 %) av galtarna leukocyter i sperman. Förekomsten av leukocyter var dock enstaka hos majoriteten av galtarna. Vid ny provtagning efter ett första positivt prov sjönk förekomsten av leukocyter vid andra provtagningen. Rasmässigt var leukocytförekomst vanligast hos Hampshire, därefter kom Lantras medan Yorkshire hade betydligt lägre förekomst. Vid jämförelse mellan tidigare rutintestade avelsgaltar (Lantras- samt Yorkshire) och Hampshiregaltar, som inte provtas rutinmässigt, tyder resultatet på att leukocytförekomst hos de tidigare otestade galtarna var högre.

Mest forskning om leukocyter i sperma och dess effekter pågår på humansidan, men mycket av forskningsresultaten kan vara av nytta för svinseminproduktionen. Forskning om leukocyter i sperma är komplicerad och det finns olika uppfattningar om leukocyternas påverkan på spermakvalitén. Det är dessutom svårt att härleda varifrån i könsvägarna leukocyterna kommer. Leukocyter producerar en stor mängd fria radikaler (reactive oxygen species, ROS) och de har en negativ inverkan på spermernas befruktningsförmåga. Vid diagnostisering av leukocytförekomst i humansperma är den rekommenderade metoden peroxidasfärgning, eventuellt skulle denna färgningsmetod underlätta bedömningen även inom svinseminproduktionen.

Enligt resultatet i den här studien rekommenderas ytterligare analyser avseende leukocytförekomst hos fler Hampshiregaltar under en längre period. Detta ger en bredare grund för att fatta beslut om hur semingaltarna i framtiden ska undersökas innan användning i spermadosproduktion.

## **SUMMARY**

Detection of leukocytes in semen from boars is part of the routine control of semen quality. Leukocytes in semen can cause damage to spermatozoa that leads to impaired fertilization. In the artificial insemination (AI) industry there are standard routines for the quality control of the boars and of the neat semen before use. Since 2001, Quality Genetics has not done the leukocyte examination on semen samples from boars which are used for the production of pigs for slaughter.

The purpose of this study was to investigate the occurrence of leukocytes in semen from AI-boars. The questions addressed were whether there are boars that have leukocytes in their semen and how frequently it occurs and, moreover, if there are differences between breeds, or even between individuals whose semen was checked before use in AI-dose production compared to those which were not.

The study included a total of 135 AI-boars, of which 67 were Hampshire, 35 Yorkshire and 33 Landrace, all belonging to Quality Genetics AI-station in Hållsta. The period of sampling was from 1<sup>st</sup> January until 31<sup>st</sup> August, 2008. The semen collections were done by staff at the AI-station according to their regular routines. A smear was prepared using an aliquot of neat semen from each ejaculate. The smears were stained with Papanicolau stain and examined by light microscopy.

The results of the study confirmed that there are boars that have leukocytes in their semen. In the first screening there were 23 boars (17%) showing leukocytes in their semen. However, the majority of the boars had only a few leukocytes. When a new examination was done following a positive test, the number of leukocytes was reduced. Subdivided by breed, leukocytes were found most commonly in Hampshire, followed by Landrace, while they were rare in the semen of Yorkshire boars. Hampshire boars that are not normally tested showed a higher incidence of leukocytes in their semen than the boars which are routinely tested.

Most of the studies of leukocytes in semen and their effects are done in men, but the test could be useful in the pig AI-industry. The research on leukocytes is complicated and there are different opinions about their effects on sperm quality. Furthermore, it is difficult to define the origin of the leukocytes. Leukocytes produce a large amount of reactive oxygen species (ROS), which have a negative effect on the fertilizing ability of the spermatozoa. When diagnosing leukocytes in semen from men, the recommended method is peroxidase-staining: It is possible that this method could facilitate the analysis of boar semen in the swine AI-industry.

According to the result in this study the recommendation is to do further analyses, investigating the presence of leukocytes from additional Hampshire boars during a longer period. The establishment of a broader database would enable an informed decision to be made on how the boars should be examined in the future before use in the production of AI-doses.

## INLEDNING

Ett normalt galtejakulat består av spermier från testiklarna och seminalplasma från bitestiklar och de accessoriska könskörtlarna. Förekomst av andra celler än spermier, framförallt leukocyter i ejakulatet är inte önskvärt. Leukocyter i ejakulatet indikerar att galten antingen har en infektion/inflammation i könsvägarna eller att sperman förorenats under samlingsprocessen, troligen vanligast från preputialfickan. En infektion med samtidig förekomst av mikroorganismer utgör en risk för spridning av smitta och sjukdom via sperman. Vid framställning av spermadoser för inseminering tillsätts alltid antibiotika för att förhindra tillväxt av de bakterier som kontaminerat sperman vid samlingsproceduren. Även om bakterierna oskadliggörs och inte utgör något hot mot spermiernas kvalitet kan leukocyter skada spermierna genom att bilda ämnen, fria radikaler, som kan leda till nedsatt befruktningförmåga.

Inom svinseminproduktionen finns utarbetade rutiner för kvalitetssäkring av spermadoserna, varje samlat ejakulat undersöks och godkänns innan användning. Före insättning i semindosproduktionen genomgår alla nya galtar hälsomässiga kontrollprogram och sperman undersöks med avseende på färg, volym, spermiekoncentration, motilitet, enklare morfologi samt överlevnadstid efter spädning. Sperman från de galtar som ska användas för produktion av avelsdjur testas dessutom gällande förekomst av oönskade celler i sperman, framför allt leukocyter, samt genomgår en omfattande spermimorfologisk undersökning. Galtar i vars sperma man hittar inflammatoriska celler och/eller en onormal spermabild används inte i semindosproduktionen. De mer omfattande laboratorieundersökningarna är tidskrävande och fordrar bl.a. specialfärgningar. Sedan början av 2001, av framförallt ekonomiska skäl, kontrolleras inte sperma med avseende på förekomst av främmande celler i sperma från Quality Genetics galtar som används till produktion av slaktsvin.

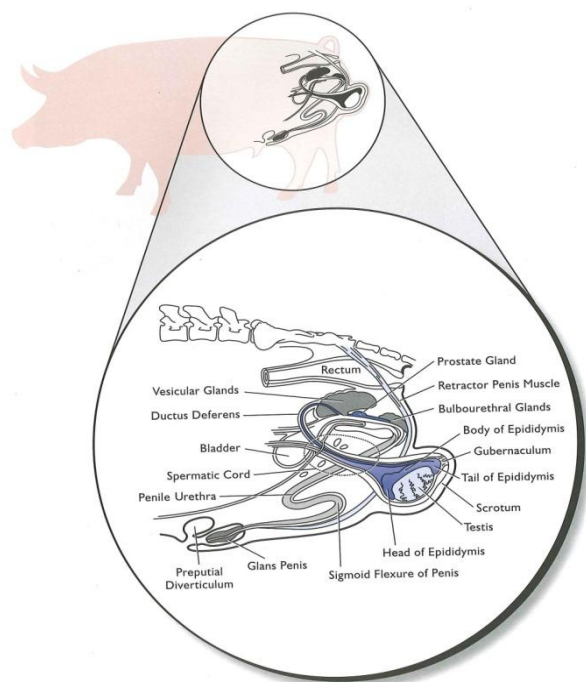
Syftet med studien är att undersöka förekomst av leukocyter i sperman från semingaltar vid Quality Genetics galtstation i Hållsta. Frågeställningen är om det finns galtar som har leukocyter i sperman och i förekommande fall hur vanligt det är. Ytterligare frågeställningar är om det föreligger rasskillnader och om frekvensen galtar med leukocytförekomst är lägre hos dem som rutinmässigt kontrolleras innan användning till AI jämfört med de galtar som inte testas alls.

Resultaten av denna studie kan komma att ligga till grund för hur man fortsättningsvis kommer att undersöka galtar innan insättning som semingaltar och under användning i semindosproduktion.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Anatomi

Galtens reproduktionsorgan karaktäriseras av skrotums perineala position med testiklar som är placerade i ett nästan horisontellt läge dikt an mot kroppen, stora könskörtlar och en smal fibroelastisk penis (Dyce et al., 2002), se figur 1.



Figur 1. Översiktsbild av galtens reproduktionsorgan (Senger, 2003).

### Testikel

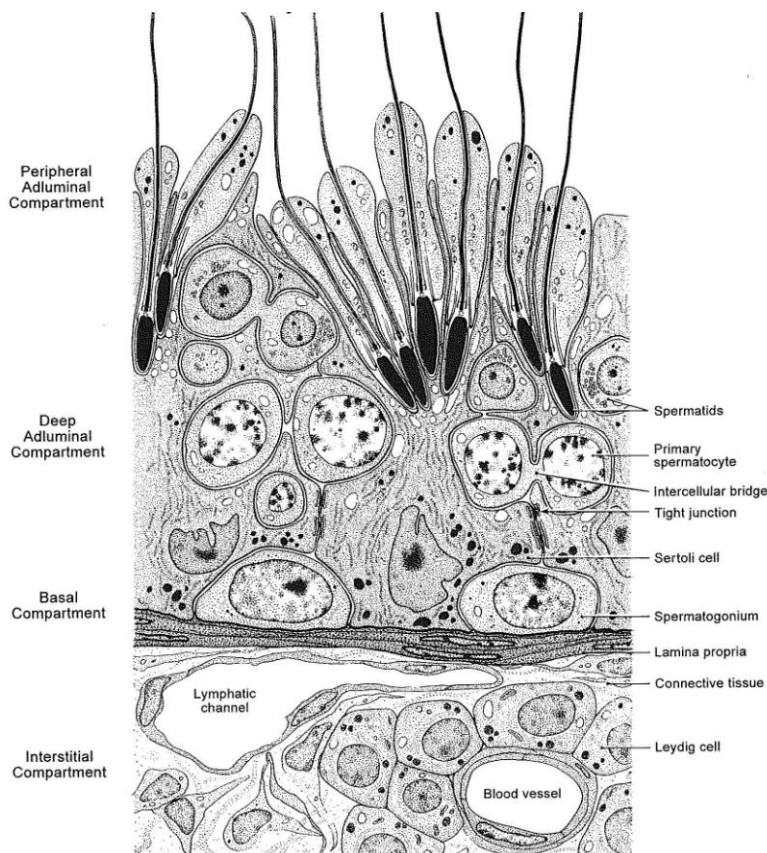
Testikeln består av parenkym med en tubulär del och en interstitiell del, som omges av bindvävslager.

Testikelns tubulära del består av sädesepitel (könsceller) och Sertoliceller på insidan samt kontraktila celler peritubulärt, se figur 2. I testiklarnas tubulära del sker bildningen av spermier, där beroende på djurslag,  $1-25 \times 10^9$  spermier bildas per dag, vilket motsvarar 35 000–200 000 spermier per sekund. Spermerna utvecklas i flera olika steg via mitos, meios och differentiering. De vindlade tubulära gångarna mynnar i en rak gång i testikelns mitt varifrån spermerna lämnar testikeln med ett vätskeflöde som producerats av Sertolicellerna. Spermatogenesisen hos galt tar ca 40 dagar.

Testikelns interstitiella del består av Leydigceller, blodkärl, lymfkärl, nerver och bindväv, se figur 2. Leydigcellerna bildar framförallt testosteron men även andra hormoner som inhibin och östrogen.

Könscellerna som är under utveckling skyddas immunologiskt av den så kallade blod-testis barriären, som består av de peritubulära cellerna runt testikelns gångsystem och tight-junctions mellan Sertolicellerna, se figur 2. Utan barriären skulle immunologiska celler som makrofager, lymfocyter och immunoglobuliner

komma i kontakt med de omogna spermerna och uppfatta dessa som främmande eftersom de undergår meios och därmed skiljer sig från andra kroppsceller. Blodtestisbarriären skyddar även spermerna från skadliga ämnen i omgivningen.



Figur 2. Testikelns parenkym, tubulär och interstitiell del (Amann, 1983).

Funikeln utgör en förbindelse från kroppen till skrotum, den utgår från inguinalringen och fäster till testikelns dorsala pool. Funikeln innehåller musculus cremaster, kärl, nerver och sädesledaren. För att spermatogenesis ska fungera krävs att testikeln håller en temperatur på ca 4-6° C lägre än kroppstemperaturen. Detta regleras på flera olika sätt dels av det vaskulära nätverket, plexus pampiniformis, där även musculus cremasters kontraktioner underlättar blodets cirkulation. Testikeltemperaturen regleras även via skrotumhudens värmekänsliga nerver som vid förhöjda temperaturer leder till ökad aktivitet av skrotums svettkörtlar samt ökning av individens andningsfrekvens (Senger, 2003).

### **Bitestikel**

Bitestikeln hos galt är stor och har en bitestikelsvans som är synlig och palperbar, placerad kaudodorsalt i skrotum (Dyce et al., 2002). Bitestikeln är en lång vindlande gång, hos gris 50-65m, som är uppdelad i tre distinkta regioner; caput, corpus och cauda (Söderquist, 2007). Spermerna från testikeln når bitestikelns huvud, där sker absorption av vätskan som fraktat spermerna. I bitestikelkroppen mognar spermerna vilket leder till att de får motilitet och blir fertila. I bitestikelsvansen lagras spermerna tills de vid ejakulationen når sädesledaren. Absorptionen av vätska i caput leder till att spermiekoncentrationen är högre i cauda än i caput, men antalet spermier i cauda påverkas av hur ofta djuret ejakulerar.



När spermien når caput har den en cytoplasmadroppe nära sitt huvud, så kallad proximal cytoplasmadroppe. Då spermien förflyttas genom bitestikeln flyttas droppen ner mot spermies svans, vilket leder till en distal cytoplasmadroppe. Normalt försvinner den distala droppen i bitestikelsvansen eller vid ejakulationen. Om ett högt antal spermier bär cytoplasmadroppar efter ejakulationen tyder det på någon störning i mognadsprocessen i bitestikeln (Senger, 2003). Cytoplasmadroppar kan även vara tecken på att sperma har samlats för tätt under en för kort period (Holst, 1949). Passagen genom bitestikeln hos galt tar 9-14 dagar (Senger, 2003).

### **Accessoriska könskörtlar**

Galtens accessoriska könskörtlar består av prostata, två bulbourethrala körtlar och två sädesblåsor. Könskörtlarnas uppgift är att producera seminalplasma som utsöndras i urethra vid ejakulation (Dyce et al., 2002).

### **Penis**

Galtens penis är av fibroelastisk typ, den är smal och omgiven av en tjock kollagen kapsel, tunica albuginea. Penis har en sigmoidal flexur och är longitudinellt vriden. Glans penis är korkskruvsformad för att kunna penetrera saggans cervix vid betäckning. Vid erektion rätas den sigmoidala flexuren ut, vilket leder till att penis som är ca 60 cm lång, ökar sin längd med ca 25 %. Den longitudinella vridningen och korkskruvsspiralen blir vid erektion mer tydlig. Preputiet är långt, den kraniala delen är vid och kommunicerar dorsalt med en för galt unik blindficka. I preputiet bildas sekret som ger den karakteristiska galtlukten, vilken även fungerar som feromoner för saggan (Dyce et al., 2002).

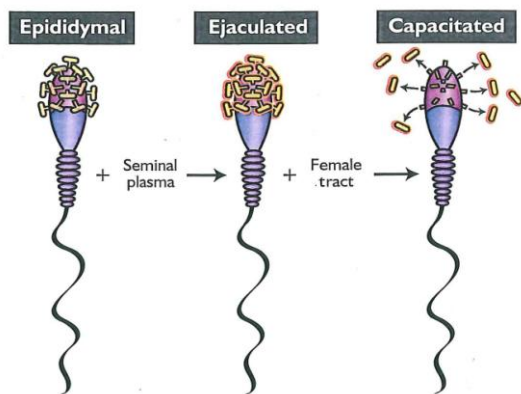
### **Spermieutveckling**

Spermien består av tre huvuddelar: huvud, mittstycke och svans. I spermiehuvudet finns nukleolen med DNA och i främre delen av huvudet finns akrosomen med enzymer. En mogen spermie innehåller minimalt med cytoplasma och cytoplasmiska organeller. Mittstycket består av mitokondrier som bildar energi i form av ATP, energikällan är fruktos som producerats av de accessoriska könskörtlarna. Testikelsvansen består av en cilie, så kallad flagell som sköter spermies motilitet med 30-40 rörelser per sekund. Spermies rörelse ger en hastighet av 3mm/min, men spermier transporteras mycket snabbare i det honliga reproduktionsorganet framför allt pga. muskelkontraktioner i livmodern (Sjaastad, 2003). För att underlätta kontakten med oocyten ändrar spermies rörelsemönster i äggledaren, från en rak progressiv rörelse till att bli mer hyperaktiv med ett oregelbundet rörelsemönster.

### **Kapacitering och akrosomreaktion**

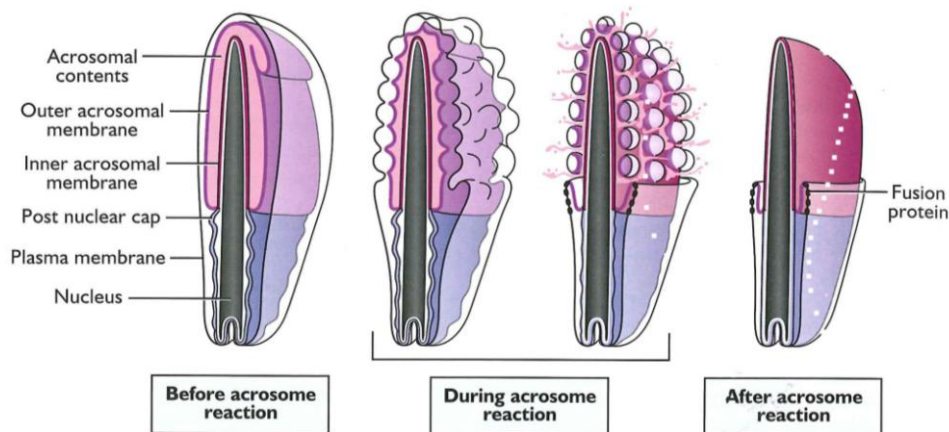
När spermien lämnar bitestikeln är den mogen men ännu inte redo att befrukta oocyten, de slutliga stegen för att bli befruktningsduglig sker i hondjurets reproduktionsorgan. Enbart vissa spermier genomgår förändringar så att de blir befruktningsdugliga.

Vid betäckning och insemination av gris deponeras sperman i cervix och sperman når omedelbart uterus. Hos gris påbörjas spermernas kapacitering i uterus och avslutas i äggledaren, kapaciteringen pågår under flera timmar och alla spermier kapaciteras inte samtidigt. Vid kapaciteringen genomgår spermens huvud biokemiska reaktioner som innefattar bl.a. att olika proteiner som finns på ytan tas bort och molekyler som har möjlighet att binda till oocyten blottas, se figur 3.



*Figur 3. Kapaciteringens tre steg. När spermien befinner sig i bitestikeln har plasmamembranet molekyler (proteiner och kolhydrater) på ytan. I ejakulatet blir ytmolekylerna täckta av seminalplasmaproteiner. I honliga könsvägarna lossnar ytmolekylerna med proteinhöljen och blottar molekyler som kan binda till zona pellucida på oocyten (Senger, 2003).*

När spermien binder till glykoproteiner i oocyten zona pellucida initieras akrosomreaktionen som varar i några minuter. Målet med akrosomreaktionen är att spermiehuvudet ska kunna penetrera zona pellucida och sedan smälta samman med oocyten plasmamembran. Akrosomreaktionen startar med blåsbildning där spermies plasmamembran och dess yttre akrosommembran smälter samman och många små blåsor och porer bildas på spermiehuvudets yta. Via porerna utsöndras akrosomala enzymer och penetrering av zona pellucida kan genomföras, se figur 4. När spermien och oocyten membran smält samman sker befruktningen, spermies kärna hamnar i oocyten cytoplasma, en hanlig och en honlig förkärna bildas av spermies och oocyten kärna. Dessa smälter samman och en zygot har bildats.



Figur 4. Innan akrosomreaktionen är spermiehuvudets membran intakta. Under akrosomreaktionen smälter spermiehuvudets membran samman vilket ger blå- och porbildning, genom porerna strömmar akrosomala enzymer varefter spermien kan penetrera oocyten. Efter akrosomreaktionen lossnar blåsorna varpå spermens kvarstående membran kan smälta samman med oocyten's membran (Senger, 2003).

Skador i plasma- och akrosommembran är irreversibla och kan orsakas av förändringar i osmotiskt tryck, plötslig nedkylning, värmestegring eller förändrade pH-värden. Förekommer skador på dessa membran kan akrosomreaktionen ej genomföras, normal blåsbildning uteblir, spermiehuvudet rupturerar och spermien är ej befruktningsduglig (Senger, 2003).

### Ejakulatets innehåll

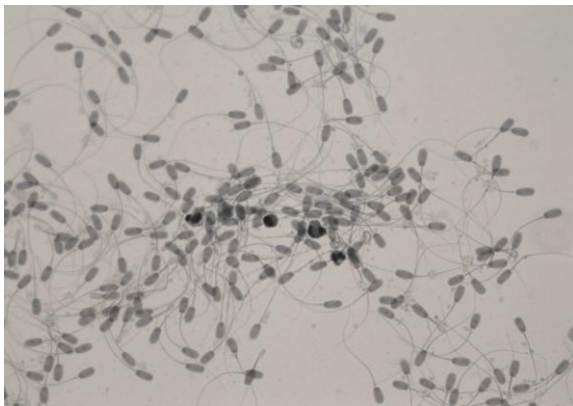
Sperma består av spermier och seminalplasma. Ejakulatet är uppdelat i tre distinkta fraktioner, en första vattning fraktion från prostata, därefter en spermierik fraktion med spermier från bitestiklar och seminalplasma från sädesblåsor och sist en fraktion med visköst sekret från samtliga könskörtlar där det slutliga geléaktiga sekretet kommer från bulbourethral körtlarna. Fördelningen varifrån galtens seminalplasma härrör är följande: Prostata bildar 50-70 %, bulbourethral körtlarna 10-25 %, sädesblåsorna 15-20 % och bitestiklarna 2-5 %. Könskörtlarna bidrar med olika substanser, prostatasekret innehåller rikligt med elektrolyter, från bulbourethral körtlarna kommer stora mängder kiselnsyra och sädesblåsesekret innehåller citronsyra och fruktos (Rodriguez-Martinez, 2007).

## Förekomst av främmande celler i sperma

Sperman kan innehålla ett antal oönskade celler, dvs. andra celler än mogna spermier.

### *Leukocyter*

Leukocyter ska normalt ej förekomma i sperma, de försämrar spermiernas kvalitet samt deras befruktningförmåga (Rodriguez-Martinez & Einarsson, 2007). Hos galt kan leukocyter vara en indikation på en infektion eller inflammation någonstans i könsvägarna som t.ex. i sädesblåsorna (Einarsson, 2007) eller i testiklarna (Rodriguez-Martinez, 2007). Leukocyter kan även vara ett tecken på att sperman förorenats under samlingsprocessen t ex från sekret i preputialfickan (Wallgren 2008, pers. medd.). Figur 5 visar galt spermier med leukocyter. Leukocyterna skulle också kunna ha en fysiologisk roll i immunförsvarets arbete att eliminera onormala spermier.



Figur 5. Leukocyter i galt sperma, Papanicolaoufärgning, förstoring x400.

Beräkning av antalet vita blodkroppar i sperma är ett klassiskt sätt att mäta spermakvalité (Sharma et al., 2001). Olika studier på humansidan visar dock varierande resultat beträffande leukocyternas påverkan på spermans kvalité, vissa studier visar att leukocyter har negativ effekt medan andra studier inte visar några negativa effekter (Gdoura et al., 2008). Leukocyternas negativa effekter skulle innebära minskad spermimotoilitet och därmed minskad möjlighet till befruktning av oocyten (Kaleli et al., 2000). Leukocyter kan orsaka skador på spermier genom att producera fria radikaler, proteaser och/eller cytokiner (Gdoura et al., 2008).

Leukocyter i sperma är vanligt förekommande hos infertila män, 10-44% lider enligt WHO:s definition av leukocytospermi ( $>1 \times 10^6$  per ml). De flesta infertila män har ingen tydlig infektion och leukocyter i sperma kan förekomma utan kliniska symtom vilket ofta leder till att leukocyternas ursprung förblir oklart (Gdoura et al., 2008). I humansperma är granulocyter vanligast förekommande (50-60%), därefter makrofager (20-30%) och sist T-lymfocyter (2-5%) (Ochsendorf, 1999). Granulocyter härrör framförallt från de accessoriska könskörtlarna, medan lymfocyter och makrofager kommer från testiklar och bitestiklar (Sharma et al., 2001).

### *Fria radikaler/ ROS*

Stora delar av kroppens energi bildas vid celandningen i mitokondrierna genom oxidativ fosforylering, en enzymatiskt kontrollerad reaktion mellan syre och väte. Vid dessa reaktioner bildas även kortlivade, högreaktiva, kemiska intermediärer s.k. fria radikaler som är högreaktiva, pga. att de har oparade elektroner i det yttersta elektronskalet, vilket kan orsaka omfattande cellskador. Reactive oxygen species (ROS) är en benämning på alla fria radikaler som kan orsaka oxidativ skada.

I de hanliga könsvägarna bildar spermerna en liten del ROS, men leukocyterna, framför allt granulocyter och makrofager, är huvudproducenter, leukocyterna bildar 1000 gånger mer ROS jämfört med könscellerna. I låga koncentrationer har ROS positiva effekter och agerar selektivt, de är involverade i regleringen av spermens kapacitering och akrosomreaktion. Vid normala tillstånd kontrolleras de fria radikalernas skador av antioxidanter, men om det blir en obalans mellan de fria radikalerna och antioxidanterna uppstår så kallad oxidativ stress som orsakar cellskador. Vid infektioner bildar leukocyterna höga koncentrationer av ROS, som då reagerar ospecificikt och orsakar skador på alla typer av biologiska molekyler såsom lipider i cellmembran, proteiner, cellkärnor och kolhydrater. Spermernas funktion skadas både beträffande motilitet samt förmåga till befruktning av oocyten (Ochsendorf, 1999). Senare rapporter visar att ROS kan ha en direkt skadlig effekt på spermens DNA (Gdoura et al., 2008).

ROS har en klar inverkan på patogenesen vid manlig infertilitet. Ökade mängder leukocyter ger ökad mängd ROS och negativ effekt på spermakoncentrationen och spermernas motilitet. På humansidan har konstaterats att fertila män har lägre mängd ROS i sperman jämfört med subfertila män (Athayde et al., 2007). ROS som produceras vid infektioner i testiklar och bitestiklar är speciellt skadliga för spermerna pga. den långa tiden spermerna befinner sig i dessa organ och bristen på antioxidativt skydd. Avgörande för om spermerna tar skada eller ej beror således på leukocyternas aktivitet, dvs. mängden ROS de producerar, tillgången på antioxidativa system och hur länge infektionen pågår. I seminalplasma finns höga koncentrationer anitoxidantia, vilket gör att stora mängder ROS-producerande leukocyter krävs i ejakulatet för att spermiefunktionen ska påverkas negativt (Ochsendorf, 1999).

### *Cytokiner*

Cytokiner produceras av leukocyter och andra celler, cytokiner har påverkan på cellers tillväxt, differentiering och funktioner. Vid infektioner bildas cytokiner som genom en signalkaskad får cellerna att reagera på patogena stimuli. Cytokiner är också involverade i könskörtlarna och spermernas funktioner. I humansperma har flera olika typer av cytokiner påvisats. Cytokiner kan påverka spermerna att producera ROS, detta kan leda till en ökad oxidativ stress i könsvägarna och därmed minskad spermimotoilitet (Ochsendorf, 1999).

## **Erythrocyter**

Erythrocyter ska normalt ej förekomma i sperma, de försämrar spermernas kvalitet samt deras befruktningförmåga (Rodriguez-Martinez & Einarsson, 2007). Erythrocyter i sperman är vanligtvis orsakade av en skada med blödning i samband med spermasamling (Söderquist, 2006). Förekomst av röda blodkroppar i galt sperma kan även vara tecken på en mer kronisk form av erektionsblödning, orsaken är ofta traumatisk, en skada på penis kan orsaka granulom, fistelbildning i svällkropp eller bristningar i blodkärl. Blödningarna härrör antingen direkt från penisslemhinnan eller kommer från kärlskador i urethra, då ses blodet blandat i ejakulatet. Galtar med erektionsblödning är kliniskt friska, men vid erektion då blodtrycket stiger ses blödningen. Prognosen är ofta dålig och de flesta galtar med erektionsblödning slaktas (Einarsson, 2007).

## **Spermatogenetiska celler**

Spermatogenetiska celler är omogna, degenererade spermieceller från olika stadier av spermiebildningen. En mindre mängd spermatogenetiska celler förekommer normalt i sperman, större mängder kan ses vid bl.a. testikeldegeneration. Jätteceller är stora celler bestående av flera spermatocyter med gemensam cytoplasma och cellmembran. Pseudojätteceller kan uppkomma vid testikelhypoplasi, de är hopklumpade, degenererade spermatocyter med gemensam cytoplasma men utan cellmembran (Söderquist, 2006).

## **Ytepitelceller**

Enstaka ytepitelceller, max 5 % förekommer i normala galtejakulat (Holst, 1949), vid någon form av retning i könsvägarna kan ett ökat antal ses. Ytepitelcellerna kommer från preputiet, urethra eller bitestikel (Söderquist, 2006).

## **Förekomst av bakterier i galt sperma**

Normal sperma från en frisk galt innehåller inte bakterier, men vid spermasamling kan sperman kontamineras. Bakteriefloren är oftast av blandtyp; *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. och *Escherichia coli* är vanligast förekommande (Wallgren, 1996). Galten själv är den viktigaste kontamineringskällan, bakterierna kommer från preputium, avföring och hud. Andra källor är omgivningen med t.ex. foder, vatten, strö och ventilationssystem. Dessutom kan spermasamlaren utgöra en viktig källa till kontamination av sperman genom ohygienisk hantering vid spermasamling och spermahantering.

Bakterier har negativ effekt på spermiekvalitén, effekten är koncentrationsberoende och påverkar både kvalitén och livslängden på spermerna. Tid, omgivningsmiljö och temperatur är viktiga komponenter för hur stor negativ effekt bakterierna kommer att utgöra för spermerna. Om bakterietillväxten ej kontrollerades skulle den orsaka nedsatt befruktningduglighet. Då kontamination vid spermasamling är så gott som oundviklig tillsätts alltid antibiotika till inseminationsdoserna om sperman inte skall användas direkt (Althouse & Lu, 2005). Bakterier i sperman kan dessutom vid insemination sprida infektion till hondjuret.

## **Faktorer som påverkar spermaproduktionen**

Förutom rent patologiska effekter som kan ses på spermaproduktionen påverkas spermaproduktionen av en rad fysiologiska faktorer:

- Ålder, galten är könsmogen vid 7-8 månaders ålder. Används den till avel tidigare än så kan den ha en god täckningsförmåga, men en dålig spermakvalitet med många omogna spermier. Full spermaproduktion har inte galten förrän vid 18-24 månaders ålder
- Ras, Lantras blir könsmogna cirka en månad tidigare än Yorkshire och Hampshire
- Individuella skillnader föreligger
- Testikelstorlek, det föreligger en positiv korrelation mellan testikelstorlek och spermaproduktion
- Näringsstatus, låga mängder protein och låg energimängd i foder minskar spermernas antal, men inte deras kvalitet
- Säsongsvariationer, spermieproduktionens kvantitet ändras med säsong, den ökar från september till februari och minskar under våren (Rodriguez-Martinez, 2007).

## **Sjukdomar och abnormaliteter som kan orsaka förekomst av främmande celler i sperma**

Nedsatt befruktningsskicklighet orsakas vanligtvis av sjukdomar i testiklar, bitestiklar eller accessoriska könskörtlar. Diagnos ställs genom klinisk undersökning som inkluderar palpation av yttre genitalia samt spermaundersökning (Noakes et al., 2001). På humansidan är kroniska inflammationer i de accessoriska könskörtlar den vanligaste orsaken till infertilitet (Kaleli, 2000). Hos galt orsakar även överanvändning onormal sperma (Straw et al., 2006). Överanvändning av hingst och bagge kan leda till inflammatoriska celler i ejakulatet, detta kan antingen beror på ett inflammatoriskt svar orsakat av nötning mot den artificiella vaginan eller en förändring av den preputiala miljön. Vid samling av sperma på tjur med massage av ampullerna ses fler vita blodkroppar än vid samling med artificiell vagina (Söderquist 2008, pers.medd.).

### ***Balanopostit***

Infektioner vid penis och preputium är vanligt hos hund, tjur och bagge, förekommer hos hingst, men är ovanligt hos galt (Noakes et al., 2001).

Galtens preputium är långt med en stor blindficka, där kan stora mängder sekret ansamlas, detta kan leda till bakterietillväxt och leukocytförekomst. Leukocyterna är ofta degenererade pga. den dåliga miljön i preputiet. Galten visar dock sällan några symptom på infektion eller inflammation. Vid ohygienisk spermasamling kan leukocyter ses i sperman (Wallgren 2008, pers. medd.).

Mild preputialinfektion ska ej behandlas med antiseptiska medel, då det kan leda till en rubbning av normalfloran och opportunistiska bakterier börjar växa till och orsakar infektion. Specifika virusinfektioner kan i vissa fall leda till grav balanopostit, men kan också ge symptomlösa bärare med påföljande risk för venerisk smitta vid täckning (Noakes et al., 2001).

### ***Testikeldegeneration***

Testikeldegeneration är den vanligaste orsaken till nedsatt fertilitet hos galt (Rodriguez-Martinez, 2007). Testikeldegeneration kan förekomma hos alla djurslag. Testikelns sädesepitel är mycket känsligt för olika typer av störningar som t.ex. förhöjd intratestikulär temperatur, infektioner, toxiner och endokrina substanser. Ökad temperatur generellt eller lokalt i testikeln kan orsakas av många olika faktorer t.ex. feber, inflammation i skrotum och förhöjd omgivningstemperatur. Galtar drabbas lätt av nedsatt fertilitet efter höga temperaturer på sommaren, luftkonditionering på galtstationerna är ett viktigt sätt att förebygga detta.

Vid testikeldegeneration är ejakulatets volym normal men med minskad spermiekoncentration och nedsatt spermimotoilitet. Många spermier har ett onormalt utseende, (Noakes et al., 2001), framförallt ses spermatogenetiska celler (Söderquist, 2006).

Degenerationen som uppstår kan vara reversibel eller irreversibel. På grund av att spermatogenesis tar ca 7 veckor dröjer det 4-8 veckor från att testikeln tagit skada innan negativa effekter ses i sperman. Den långa tiden som krävs för spermatogenesis leder även till att det tar lång tid tills en normal spermieproduktion återfåts efter tillfrisknande (Noakes et al., 2001). Tidsfördröjningen mellan den utlösande faktorn och innan t.ex. omlöpningar hos suggor ses, är bidragande till att den bakomliggande orsaken endast kan fastställas i cirka hälften av fallen (Rodriguez-Martinez, 2007).

Testikeldegeneration ger normalt inga kliniska symtom och libido är oftast opåverkat. Vid extrema fall kan testiklarna initialt kännas mjukare i konsistensen för att senare minska i storlek och eventuellt hårdna på grund av fibros. Duration och omfattning av degenerationen avgörs av den utlösande faktorns intensitet och individens motståndskraft. Prognosen är bättre för ett ungt djur än ett äldre djur och en kortare tids påverkan är mer gynnsam än en längre tid. Efter att diagnosen är ställd kan prognosen bedömas med upprepade spermprov med en månads intervall. Om sperman är normal efter en månad bedöms det som en reversibel degeneration och därmed föreligger en god prognos. Om spermie förändringarna är grava tas nya spermprov, och om ingen förbättring setts efter två till fyra månader bedöms chansen för regeneration som dålig (Rodriguez-Martinez, 2007).

### ***Testikelhypoplasi***

Testikelhypoplasi är relativt vanligt hos baggar men förekommer också hos tjur, hingst, galt och hund. Det är en medfödd utvecklingsrubbning, som finns i både ärftlig och spontan form (Noakes et al., 2001). Hypoplasin är orsakad av brist på urkönsceller under tidigt embryonalstadium eller onormal differentiering av könscellerna vid spermatogenesis. Hypoplasin kan vara total eller partiell dvs. innefatta hela eller delar av testikeln samt vara enkelsidig eller dubbelsidig.

Vid dubbelsidig hypoplasi, som är vanligast hos galt, saknar ejakulatet spermier. Vid partiell hypoplasi kan ett lågt antal spermier i ejakulatet förekomma, spermimotoiliteten är nedsatt och antalet morfologiskt avvikande spermier är högt, framförallt ses ett högt antal omogna spermier (Rodriguez-Martinez 2007).



Vid hypoplasi kan även s.k. pseudojätteceller ses, de är degenererade spermacyter som inte delat sig normalt från varandra (Söderquist, 2006).

Symtomen vid testikelhypoplasi är små testiklar med normala bitestiklar, dock med tomma bitestikelsvansar. Sekundära könskaraktärer samt libido är normala (Rodriguez-Martinez, 2007).

### **Orkit**

Orkit förekommer i liten skala hos alla djurslag och är relativt ovanlig även hos galt. Vid orkit hos galt förekommer ofta leukocyter i ejakulatet. Vanligaste orsaken till orkit är en bakteriell infektion av blandflora, spridningsvägen kan vara hematogen, via sår i skrotum eller via könsvägarna. Bakterien *Brucella suis* orsakar en kronisk form av orkit med abscessbildningar och störd spermatogenes (Rodriguez-Martinez, 2007). Även vissa virus och parasiter kan orsaka infektion i testikeln.

Oftast är orkit enkelsidig och den kan även involvera bitestikeln. I akutskedet ses inflammationstecken, testikeln blir röd, varm, svullen och öm. Orkit orsakar stor skada i den drabbade testikeln, infektionen kan vara purulent och leda till omfattande nekros. Övergår inflammationen i kronisk form leder det till att testikeln blir förminskad, fibrotisk och kan adherera till skrotum (Noakes et al., 2001). Om antibiotikabehandling provas skall den sättas in i ett mycket tidigt skede och behandlingen ska ske under lång tid. Galten skall inte användas i avel förrän de kliniska symtomen är borta och spermaundersökning tidigast fyra veckor efter insjuknandet påvisar normal sperma. Prognosen gällande fruktsamhet är dock dålig till mycket dålig (Rodriguez-Martinez, 2007).

### **Epididymidit**

Bitestikelinflammation är vanligt hos framförallt hos bagge, men förekommer även på galt (Noakes et al., 2001). Vid bitestikelinflammation kan leukocyter förekomma i sperman (Söderquist, 2006). Epididymidit orsakas antingen av en primär infektion i bitestikeln eller genom spridning från en testikelinfektion.

Symtomen är värme, svullnad och smärta från bitestikeln, inflammationen orsakar obstruktion av bitestikeltubuli. Enkelsidig bitestikelinflammation orsakar nedsatt fertilitet medan dubbelsidig orsakar sterilitet (Noakes et al., 2001).

### **Seminovesikulit**

Vid infektion i sädesblåsorna kan leukocyter påvisas i sperman (Söderquist, 2006). Dessutom har spermierna minskad motilitet och ejakulatet förhöjda pH-värden och låga fruktoskoncentrationer. Makroskopiskt kan sperman vara purulent med brunaktig färg pga. blödningar i den inflammerade körteln (Noakes et al., 2001).

Påvisade orsakande agens hos galt är *Brucella suis*, streptokocker och stafylokocker (Einarsson, 2007).

### **Prostatit**

Vid prostatit finns leukocyter, bakterier och blod ofta i sperma. Prostatit är vanligt hos hund, men sjukdomar i prostata är ovanliga hos andra djurslag (Noakes et al., 2001).

### **Systemiska infektionssjukdomar**

Infektionssjukdomar med feber orsakar testikeldegeneration med förhöjd testikeltemperatur med nedsatt spermiekvalitet vilket leder till sänkt fruktsamhet.

Bakterier som har direkt påverkan på testiklarnas funktion hos galt är *Brucella suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus* och *Escherichia coli*. Många virussjukdomar smittar via sperma, exempel är Afrikansk svinpest, Porcine parvo och Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS), där den sistnämnda har stor negativ effekt på spermaproduktionen upp till 13 veckor efter infektion (Straw et al., 2006). Brucellos, Afrikans svinpest och PRRS är sjukdomar som ej finns i Sverige (Sternberg-Lewerin, 2006).

### **Artificiell insemination**

I Sverige började artificiell insemination (AI) på svin att användas i slutet av 1950-talet, idag är AI inom grisproduktionen det klart vanligaste alternativet jämfört med naturlig betäckning. Till en början utförde personal från husdjursföreningar inseminationerna, men nu utförs de nästan enbart av djurägare eller djurskötare (Söderquist & Wallgren, 2007).

### **Galtstationer i Sverige**

I Sverige drivs galtstationerna av slakteriorganisationerna (Söderquist & Wallgren, 2007) via Quality Genetics som är ett dotterbolag till Scan (Scan, 2008) och Avelspoolen som ägs av flertalet privata svenska slakterier och norska Norsvin (Avelspolen, 2008).

Quality Genetics har två galtstationer, i Hållsta och Hörby. Deras avelsarbete bedrivs av dotterbolaget Nordic Genetics som är ägt till lika del av Quality Genetics och det finska avelsbolaget Finnpig. Quality Genetics sköter avelsarbetet med raserna Hampshire och Yorkshire, genom samarbete med norska Norsvin erhålls Norska Lantrasgaltar. För slaktsvinsproduktion används hybridsuggor av Lantras och Yorkshire, som faderras används Hampshire. Quality Genetics har ca 400 semingaltar vilka producerar ca 622 000 semindoser per år (Quality Genetics, 2008).

Avelspoolens galtstation ligger i Hudaryd. Delägarna Norsvin bedriver avelsarbete med Lantras och Duroc. Genom samarbete med Quality Genetics erhålls Yorkshire genom att Avelspoolen köper galtar och Norsvin köper sperma. För slaktsvinsproduktion används hybridsuggor av Lantras och Yorkshire, som faderras används korsningar av Lantras och Duroc, så kallade SP<sup>II</sup>galtar. Avelspoolen har ca 120 semingaltar som producerar ca 218 000 semindoser per år (Avelspoolen, 2008).

## Spermasamling

På Quality Genetics galtstationer används galtarna under kortare tid än ett år och nya galtar sätts in i spermosproduktionen varannan vecka (Quality Genetics, 2008). Innan galtarna tas in på stationen isoleras de i minst 30 dagar, under denna tid testas de för vissa smittsamma sjukdomar, vaccineras och avmaskas. När de kommer till seminestationen tränas de i att lämna sperma och deras spermakvalitet kontrolleras och godkänns innan insättning i produktion.

### *I stallet*

Sperma samlas från varje galt två till tre gånger på 14 dagar. Samlingen utförs i galtens box med hjälp av en så kallad suggfantom, som utgörs av en stålpall med stöd för galtens framben, se figur 6. Under förspelet nafsar och puffar galten på suggfantomen, han saliverar och grymtar. Galten bestiger fantomen och utför kraftiga koitala bäckenrörelser. Spermasamlingen utförs med en handskbeklädd hand (Söderquist & Wallgren, 2007). För att minimera kontaminering används dubbla engångshandskar. Den yttersta handsken tas av efter förberedelser, som att vid behov tömma preputialfickan manuellt, därmed används alltid en ren handsk när själva spermasamlingen startar (Althouse & Lu, 2005). Penis ska inte hållas fast eller dras ut förrän galten själv skaftar ut. Penis skruvar in sig i handen som hålls knuten så att tumme och pekfinger bildar en ring, handen hålls med ett fast tag runt glans penis för att efterlikna ”kuddarna” i suggans cervikalkanal (Söderquist & Wallgren, 2007). För att en galt ska ejakulera är ett fast tryck om penis viktigt, artificiell vagina för spermasamling på galt finns, men den manuella metoden har visat sig mer funktionell (Noakes et al., 2001). Då ejakulationen startar är galten lugn och står stilla, ejakulationstiden är mellan 5-10 minuter och avslutas med koitala bäckenrörelser. För att inte få med bakterier som finns i urinrörets mynning samlas inte de första strålarna vid ejakulationen. Sperma samlas i en plastpåse vars öppning täcks av gasväv för att sila bort det geléliknande sekretet som kommer i ejakulationens slutskede, påse och gasväv förankras med gummiband i en isolerad behållare (Söderquist & Wallgren, 2007), se figur 7. Gummiband och gasväv tas bort innan sperman lämnas till laboratoriet (Althouse & Lu, 2005).



*Figur 6. Hampshiregalt på suggfantom.*

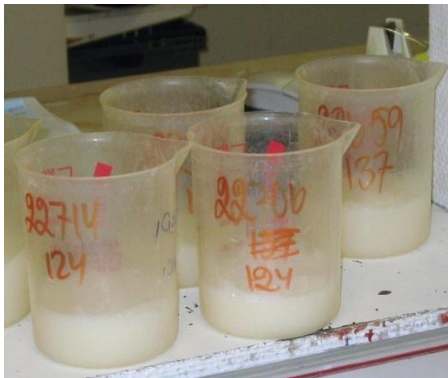


*Figur 7. Uppsamlingskärl med gasväv och isolerad behållare.*

### **På laboratoriet**

Omedelbart efter spermasamling ska ejakulatets mängd, färg, spermiekoncentration och spermiernas motilitet bedömas. Om morfologisk bedömning ska göras förbereds även preparat för detta. Figur 8 visar nysamlad rå sperma.

Normal ejakulationsvolym är 100-300 ml, nedre gräns för användning till AI är 50 ml. Om mängden är under 50 ml och spermiekoncentrationen är låg tyder det på ofullständig ejakulation. Färgen är normalt gråvit, missfärgning får ej förekomma.



*Figur 8. Rå sperma.*



*Figur 9. Spädning av sperma.*

För att fastställa spermiekoncentrationen späds sperman med spädningsvätska som är värmd till 30°C, se figur 9, och bedöms sedan med hjälp av en fotometer. Normalt totalantal spermier är 20-100x10<sup>9</sup> per ejakulat, det är dock ovanligt att semingaltar ger under 40x10<sup>9</sup> spermier, vilket motsvarar 18 semindoser, medelgalten ger 36 semindoser. Nedre gräns för användning till AI är 10x10<sup>9</sup> spermier (Wallgren 2008, pers. medd.).

Vanligtvis används en subjektiv metod för att avgöra spermiernas motilitet, sperma droppas på uppvärmda objektsglas (37°C) täcks med ett täckglas och granskas i 200-400 gångers förstoring i faskontrastmikroskop. Spermiernas progressiva rörelse bedöms och eventuella onormala rörelser som t.ex. cirkelrörelse och även agglutination noteras (Rodriguez-Martinez & Einarsson, 2007). Agglutination kan bl.a. orsakas av bakteriekontamination (Althouse et al., 2008). Motiliteten är normalt 70-90 %, nedre gränsen för godkännande för AI är 70 %. För bedömning av motilitet finns även datoriserade metoder, olika CASA (Computer Assisted Sperm Analyser) instrument, som ger en mer objektiv bedömning (Rodriguez-Martinez & Einarsson, 2007). Det föreligger en hög korrelation mellan motilitet och fertilitet.

Spermier är mycket känsliga för snabb nedkylning och temperaturfluktuationer. För att spermaundersökningarna ska ge ett rättvist svar är en korrekt hantering av sperman viktig. Bedömningarna ska göras så snart som möjligt efter att sperman är samlad, spädningsvätskor och objektsglas skall hålla samma temperatur som sperman (Noakes et al., 2001).

På galtstationens laboratorium görs även enklare bedömningar av galtarnas spermiekvalitet såsom förekomst av böjda svansar, omogna spermier med proximala cytoplasma droppar samt kontroll av spermernas överlevnadstid. Överlevnadstiden kontrolleras i ljusmikroskop genom bedömning av motiliteten vid flera tillfällen under den tid man garanterar spermadosens hållbarhet, dvs. upp till 5 dagar.

Noggrannare bedömningar av spermernas morfologi och förekomst av oönskade celler i sperman utförs vid spermalaboratoriet, avdelningen för reproduktion vid institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, Uppsala. Dessa undersökningar görs på sperma från galtar som ska användas till avelsdjursproduktion. Prov skickas även när galtstationen vid sin egen mikroskopiska bedömning sett något avvikande morfologiskt. Provsvarat baseras på en bedömning av spermalaboratoriets resultat, sammanvägt med anamnes och kliniska uppgifter som lämnats med provet (Wallgren, 2008 pers medd.).

Bedömning gällande spermernas morfologiska felaktigheter på bl.a. akrosomer, mittstycken, svansar och förekomst av cytoplasmadroppar görs på 200 spermier med hjälp av faskontrastmikroskop i 1000 gångers förstoring. Spermerna fixeras i buffrad formalin och en droppe fixerad sperma studeras under täckglas, s.k. våtpreparat. Morfologin hos 500 spermiehuvuden bedöms i Williamsfärgade, släta utstryk med hjälp av ljusmikroskopi (Rodriguez-Martinez & Einarsson, 2007). Minimikravet för användning inom AI är minst 80 % morfologiskt normala celler (Wallgren, 2008 pers medd.).

För bedömning av förekomst av andra celler än spermier såsom leukocyter, erythrocyter, spermatogenetiska celler och ytepitelceller görs s.k. vallutstryk, dessa färgas enligt Papanicolaou innan bedömning i ljusmikroskop (Rodriguez-Martinez & Einarsson, 2007). Anledningen till att bedömning av förekomst av onormal celltillblandning kräver vallutstryk är att dessa celler har en benägenhet att flyta ovanpå spermaskiktet och därmed kan falla över objektglasets kanter. Dessutom är oftast antalet ej önskvärda celler litet i jämförelse med antalet spermier. Vid vallutstryk samlas celler ihop, vilket leder till en koncentration av celler på specifika ställen. Detta förenklar mikroskoperingsundersökningen väsentligt (Wallgren 2008, pers. medd.). Leukocyter och erythrocyter får ej förekomma i ejakulaten, medan en mindre mängd spermatogenetiska celler och ytepitelceller accepteras (Rodriguez-Martinez & Einarsson, 2007). Vid förekomst av leukocyter i ejakulatet används inte galten i spermaproduktion och ett omprov tas efter ca 14 dagar. Om galten har leukocyter i sperman vid 2-3 provtillfällen går den till slakt. En anledning till att omprov ej alltid tas är att galtarna slaktats av andra anledningar än leukocytförekomst, som t.ex. för hög andel morfologiskt avvikande spermier, benproblem, ovilja att lämna sperma etc. (Wallgren, 2008 pers medd.).

### **Framställning av inseminationsdoser**

Hos Quality Genetics används bland sperma, dvs. sperma från tre till sex galtar för produktion av slaktsvin. Spermadoser som används för produktion av avelsdjur innehåller sperma från enskilda galtar (Söderquist & Wallgren, 2007). Det föreligger ingen skillnad i dräktighetsresultat vid användande av enskild respektive bland sperma (Colenbrander et al., 1993).

Spädning av sperman sker i två steg, det är viktigt att spädningssvätskan och sperman har samma temperatur för att spermerna ej ska ta skada. Första spädningen sker vid ca 30°C och den andra vid 22-24°C, därefter får sperman ytterligare svalna till förvaringstemperaturen som är 17-23°C. Den spädningssvätska som används mest är BTS (Beltsville Thawing Solution), den håller spermerna befruktningssugliga i tre dygn (Söderquist & Wallgren 2007). X-CELL™ är en spädningssvätska som håller spermerna befruktningssugliga i fem dygn (Kuster & Althouse, 1999). Bland sperma spädd med BTS benämns MIX, spädd med X-CELL™ kallas den MAX. Hos Quality Genetics används X-CELL™ till all avelssperma och till ca 20 % av slaktsvinsperman (Wallgren 2008, pers. medd.). Spädningssvätskan har flera funktioner, den ska öka spermans volym och skapa en optimal miljö för spermerna. Spädningssvätskans främsta energikälla är glukos, för att reglera osmotiskt tryck tillsätts elektrolyter och för att behålla ett stabilt pH tillsätts buffert (Straw et al., 2006).

Sperman kontamineras så gott som alltid vid spermasamling, för att hämma bakteriernas tillväxt tillsätts alltid antibiotika till spädningssvätskan. För insemination inom Sverige används gentamycin eller neomycin. Om sperman ska exporteras inom EU krävs en antibiotikablandning av penicillin, streptomycin, spektinomycin och linkomycin. Vid export utanför EU tillsätts antibiotika enligt mottagarlandets bestämmelser.

När spermablandningen har svalnat tillverkas inseminationsdoser, 80 ml fylls i mjuka plastförpackningar, där varje dos innehåller totalt 2,3–3,0 miljarder spermier, vilket motsvarar minst 2 miljarder levande spermier. (Söderquist & Wallgren, 2007). Figur 10 visar fyllningsmaskinen för tillverkning av spermadoser.



*Figur 10. Fyllningsmaskin för tillverkning av spermadoser i mjuka plastförpackningar.*

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Antal galtar i studien**

I studien ingick totalt 135st semingaltar varav 67st Hampshire, 35st Yorkshire och 33st Lantras, samtliga tillhöriga Quality Genetics, och uppstallade vid galtstationen i Hållsta. Alla galtar var äldre än 8 månader. Provtagningsperioden var mellan 1/1 2008-31/8 2008. Specifikt för denna studie provtogs 92 galtar, varav 67st Hampshire, 6st Yorkshire och 19st Lantras. 43st galtar analyserades i samband med ordinarie rutinprovtagning innan insättande i semindosproduktion. Vid förekomst av leukocyter togs nytt prov från totalt 9st slumpmässigt valda galtar.

### ***Hampshiregaltar***

Sperma från Hampshiregaltar används till största delen för produktion av slaktsvin, endast en liten del används för avel. Deras sperma kontrolleras normalt inte avseende förekomst av andra celler än spermier innan användning i semindosproduktion. I studien provtogs 62st galtar en gång och 5st provtogs två gånger med ca tre månaders mellanrum.

### ***Yorkshiregaltar och Lantrasgaltar***

Yorkshire- och Lantrasgaltar används för produktion av avelssperma, deras sperma undersöks alltid avseende förekomst av främmande celler innan användning i avelsarbete.

Av Yorkshiregaltarna i denna studie hade 29st ej tidigare provtagits och undersökts medan 6st hade undersökts tidigare, innan användning som semingaltar. Av de 29 Yorkshiregaltar som testades för första gången provtogs 2st två gånger med ca två veckors mellanrum.

Av Lantrasgaltarna hade 25st aldrig tidigare provtagits och undersökts medan 8st hade kontrollerats tidigare, innan användning som semingaltar. Av de 25 galtar som testades för första gången provtogs 2st galtar, två gånger, med två veckors respektive ca fyra veckors mellanrum.

### **Provtagningsförfarande**

Spermasamlingen utfördes av personal vid galtstationen enligt tidigare beskriven metod. På galtstationens laboratorium togs råsperma med engångspipett av plast, från respektive ejakulat, därefter gjordes vallutstryk. Tekniken för att göra ett vallutstryk innebär att en droppe sperma läggs på ena kortsidan av objektsglasets, ett utstrykningsglas läggs mot sperman som stryks ut några millimeter, utstrykningsglaset lyfts några millimeter och en vall bildas därefter upprepas proceduren. Ett objektglas ska innehålla fyra till fem stycken vallar, se figur 11. Det är viktigt att utstryken får torka ordentligt innan färgning. Objektsglasen märktes med datum och galtindividnummer.





Figur 11. Vallutstryk.

### Färgningsförfarande

Vid spermalaboratoriet, avdelningen för reproduktion vid institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, Uppsala, färgades proven enligt Papanicolaou. Denna typ av färgning används vid cytologi av exfoliativa celler, dvs. celler som stöts bort och ansamlas i kroppssekret som t.ex. sperma.



Figur 12. Färgbad vid Papanicolaoufärgning.

### **Papanicolaou färgningsmetod enligt spermalaboratoriet vid SLU**

Preparatet fixerades först i 95 % etanol i 15 min. Därefter skedde dehydrering i 70 % och 50 % etanol. Preparatet färgades i Harris Hematoxylin i 5 min, varpå det sköljdes med kranvatten. Överflödigt färg togs bort genom dopp i 1 % väteklorid och 70 % etanol. Därpå sköljdes preparatet i kranvatten i 30 min samt i destillerat vatten. Därefter sänktes utstryket ned i 70 % och 95 % etanol varpå det färgades i OG-6 i 5 min, och doppades två gånger i 95 % etanol. Därefter följde färgning i EA-50 i 5 min med efterföljande nedsänkning i 95 % etanol. Sedan doppades objektglaset två gånger i 99,9 % etanol, varpå det fick stå i 99,9% etanol i ca 5 min. Utstryket fick därpå klarna genom att stå två gånger i 5 min vardera i xylen (dimetylbenzen). Figur 12 visar delar av färgningsutrustningen. Slutligen monterades täckglas med pertex (xylen och etylbenzen) på objektglaset, se figur 13.





Figur 13. Montering med täckglas på färgade vallutstryk.

### *Papanicolaou fäргеgenskaper*

Cellkärnor färgas blåa medan cytoplasma beroende på pH uppvisar olika nyanser av blått, orange, rosa eller rött. Leukocyternas cellkärnor blir mörkt blå.

### *Harris Hematoxylin*

Harris Hematoxylin är en kärnfärg som används inom histologi och cytologi. Färgen utvinns ur ett extrakt av kampesträdet (*Haematoxylon campechianum*). För att kunna använda hematoxylin som färg oxideras den till hematien och kombineras med en metalljon som t.ex. aluminium eller järn. När det positiva aluminium-hematein-komplexet reagerar med det negativt laddade fosfatset i nukleärt DNA bildas en karakteristisk blålila färg.

### *OG-6 och EA-50*

OG-6 och EA-50 färgar cytoplasman och används som kontrastfärger till hematoxylinfärgningen. Orange G (OG-6) är en färg som består av fosforvolframsyra i denaturerad etanol. Eosin Azur-50 (EA-50) består av eosin Y, Fast Green FCF, bismarckbrun och fosforvolframsyra i denaturerad etanol (Sigma-Aldrich, 2008).

## **Mikroskopering**

Efter färgning undersöktes proven i ljusmikroskop (Reichert) i förstoring x125; x312,5; x562,5, med avseende på förekomst av leukocyter eller ej. Misstänkta leukocyter bekräftades även av personal vid spermalaboratoriet. Trots att gränsvärdet för leukocytförekomst i sperma för AI är satt till noll, kan det vara av intresse att gradera förekomsten. I den här studien är graderingen per prov enligt följande: enstaka leukocyter: <10, måttligt med leukocyter: 10-20, rikligt med leukocyter: >20.

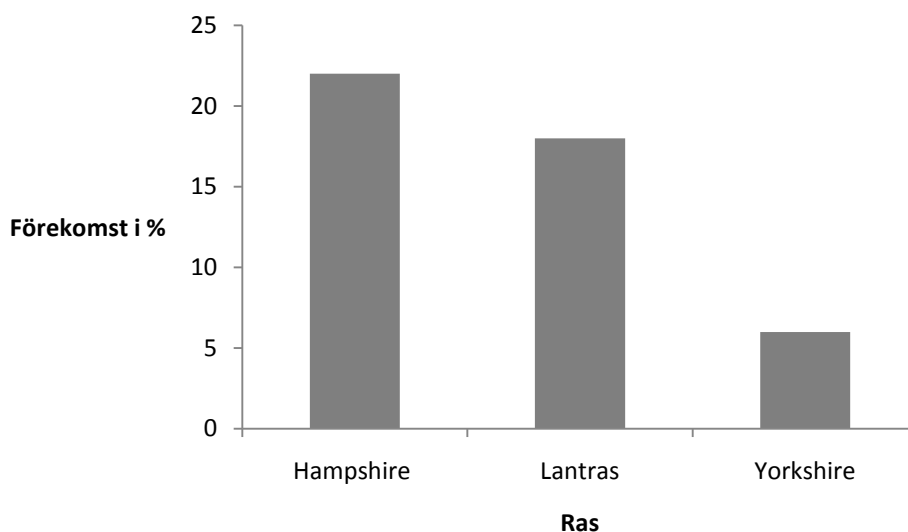
## RESULTAT

Studien visar att det förekommer semingaltar som har leukocyter i sperman. Vid den första screeningen hade 23st av 135 galtar leukocyter i sperman, detta motsvarar 17 %. Se tabell 1, som visar den rasmässiga fördelningen i detalj.

*Tabell 1. Totalt antal galtar av respektive ras och antal positiva vid studiens första provtagning respektive vid omprovtagning*

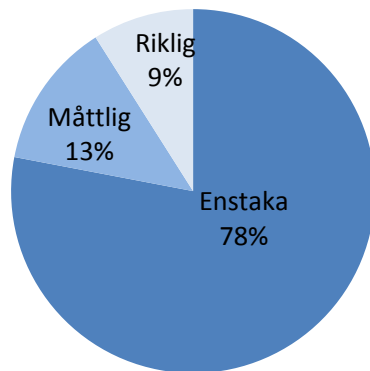
<i>Ras</i>	<i>Första prov</i>	<i>Positiv vid första prov</i>	<i>Omprov</i>	<i>Positiv vid omprov</i>
<i>Hampshire</i>	67	15	5	2
<i>Lantras</i>	33	6	2	1
<i>Yorkshire</i>	35	2	2	0

Rasmässigt var leukocytförekomst vanligast hos Hampshiregaltarna (22 %), därefter kom Lantrasgaltarna (18 %) medan Yorkshireregaltarna (6 %) hade betydligt lägre förekomst, se figur 14. För att få en mer rättvis jämförelse mellan raserna kan de galtar som tidigare testats vid insättning som semingaltar exkluderas, då motsvarar den rasmässiga fördelningen: Hampshire 22 %, Lantras 20 % och Yorkshire 7 %.



*Figur 14. Procentuell förekomst av leukocyter i sperma hos respektive ras*

Vid gradering enligt studiens kriterier ses att majoriteten av de positiva galtarna har enstaka förekomst av leukocyter, se figur 15. Av de positiva Hampshiregaltarna hade 73 % (11st) enstaka leukocytförekomst, 13 % (2st) måttlig och 13 % (2st) riklig förekomst. Beträffande Lantrasgaltarna hade 5st av de positiva, enstaka leukocytförekomst och en galt hade måttlig förekomst. De två positiva Yorkshireregaltarna hade båda enstaka förekomst av leukocyter.



Figur 15. Andelar enstaka, måttlig och riklig förekomst av leukocyter i sperma från semingaltar, samtliga i studien ingående raser

I de nio fall där omprov har tagits ses ett mönster av sjunkande antal leukocyter, från enstaka till noll i sex fall, från måttligt till enstaka i ett fall och från rikligt till måttligt i ett fall. En Lantrasgalt låg vid båda provtagningstillfällena konstant på en måttlig/riklig leukocyt förekomst.

Av de åtta Lantrasgaltarna som tidigare testats hade en galt enstaka förekomst av leukocyter i sperman, inget omprov kunde tas på denna galt pga. att den slaktats av annan anledning. Av de sex Yorkshiregaltarna som tidigare testats hade inga leukocyter i sperman vid undersökningen. Procentuellt sett motsvarar det en total leukocytförekomst på 7 % bland de tidigare testade galtar. Motsvarande siffra hos de galtar som testades för första gången, samtliga raser ingående i studien, är att av 121 galtar var 22 positiva, vilket motsvarar 18 %.

Vid mikroskopering har förutom leukocyter även andra oönskade celler förekommit i form av ytepitelceller, spermatogenetiska celler och enstaka erythrocyter.

## DISKUSSION

### Tolkning av resultat

Resultatet av studien visar att det förekommer galtar som har leukocyter i sperman. Enstaka förekomst var relativt vanligt, medan måttlig och riklig förekomst ej var så vanligt förekommande i studien.

Rasmässigt framträdde en stor skillnad där antalet Hampshire- och Lantrasgaltar som har leukocytförekomst i sperman är betydligt fler än antalet Yorkshiregaltar. Att leukocytförekomst hos Hampshiregaltarna var vanligast (22 %) var ett förväntat resultat eftersom dessa galtar normalt inte testas avseende leukocytförekomst. Däremot var resultatet att leukocytförekomst hos Lantrasgaltarna (18 %) var betydligt vanligare än hos Yorkshiregaltarna (6 %) ej lika väntat. Dessa raser genomgår ju samma rutinundersökningar innan

användning i avel. Enligt personligt meddelande av Wallgren (2008), föreligger även en skillnad mellan dessa två rasers spermimorfologi, där >90 % av Yorkshire galtarna uppfyller minimikraven för godkänd spermimorfologi jämfört med Lantras där drygt 70 % av galtarna godkänns.

Antalet omprov som togs efter första screeningen är för litet för att ge ett representativt resultat. Tendensen är dock att antalet leukocyter i de flesta fall är sjunkande mellan ett första positivt prov och ett efterföljande omprov. Detta stämmer väl överens med resultaten av de omprov som tas i samband med de rutinmässiga kontroller som görs innan insättning i avel. Orsaken till att leukocytförekomsten sjunker är ej känt. En orsak skulle kunna vara att dessa galtar har haft en infektion någonstans i könsvägarna som vid tillfället för den uppföljande provtagningen hade läkt av. Det förefaller dock ej realistiskt att de flesta galtar med infektion skulle läka av på 14 dagar utan någon behandling. En annan mer tänkbar orsak är att det föreligger en osäkerhet i provtagningsförfarande och/eller analys. Leukocytförekomst misstänks i många fall vara orsakad av en kontamination från preputialområdet. Tas omprovet med större hygienisk korrekthet som t.ex. handskbyte, större noggrannhet med att ej få med ejakulatets första strålar samt att noga se till att sperman direkt hamnar i uppsamlingsbägaren utan att vidröra en ev. kontaminerad handske, skulle detta kunna ge en lägre leukocytförekomst.

Antalet Lantras- och Yorkshiregaltar som tidigare rutintestats var begränsat, men resultatet på 7 % leukocytförekomst hos dessa jämfört med 22 % hos Hampshiregaltarna, visar att leukocytförekomst hos de tidigare otestade är betydligt högre. Detta tyder på att undersökning med avseende på förekomst av leukocyter är motiverad.

Resultat från en liknande studie, Wallgren (1996), där 116 AI-galtar undersöktes avseende bakterieförekomst i sperman visade att 14 % av ejakulaten innehöll leukocyter, enstaka förekomst hos samtliga. Nuvarande studie visar på en något högre frekvens leukocyter, 17,0 %, med en fördelning på 13,3 % med enstaka förekomst, 2,2 % med måttlig förekomst och 1,5 % med riklig förekomst. Den något högre frekvens som påvisats här kan förklaras med att den äldre studien baserades på galtar som redan användes i aveln och därmed tidigare var testade.

### **Leukocyter i sperma**

Den mesta forskningen om leukocyter i sperma och dess effekter pågår på humansidan. Där läggs av naturliga skäl en större betydelse med avseende på infertilitet jämfört med betydelsen på galtsidan. En galt med konstaterat dålig sperma används aldrig inom AI. Mycket av de forskningsresultat som framkommer på humansidan kan dock vara av nytta för semingaltverksamheten, då många av de rent fysiologiska aspekterna inte bör skilja särskilt mycket.

Enligt Haidl et al. (2008) är kroniska inflammatoriska tillstånd i genitalia en vanlig orsak till fertilitetsproblem hos människa. På humansidan har man sett en skillnad att antalet leukocyter i sperman vid inflammation i bitestikeln är lägre jämfört med inflammation i de accessoriska könskörtlarna. Detta har lett till att leukocyter inte alltid används för att ställa diagnos, istället analyseras andra

markörer som granulocytelastas, pro-inflammatoriska cytokiner, ROS och DNA förändringar.

Vid undersökning av leukocytförekomst i sperma skiljer sig metoderna åt på humansidan och galtsidan. På humansidan har WHO fastställt att peroxidafärgning är den säkraste och rekommenderade metoden för att skilja leukocyter från omogna könsceller. Vid peroxidafärgning färgas granulocyterna bruna (Kaleli, 2000). Vid mikroskopingsundersökning av vallutstryk färgade enligt Papanicolaou färgas alla cellkärnor blå, vilket leder till att det inte i alla lägen är lätt att skilja leukocyter från omogna könsceller. Möjligen skulle peroxidafärgning kunna underlätta diagnostiseringen av leukocytförekomst även vid grissperma undersökning. Vid analys av galtsperma bedöms dock även förekomst av andra främmande celler, möjligt är att peroxidafärgning skulle försvåra bedömningen av dessa.

WHO har fastställt en gräns,  $1 \times 10^6$  leukocyter/ml, för att diagnosen leukocytospermi ska ställas, denna gräns kan vara för högt satt. Forskning har visat att förekomst av leukocyter i sperma, oavsett hur få leukocyter det rör sig om, är associerat med oxidativ stress. Enligt Sharma (2001) stiger den oxidativa stressen med ökad mängd leukocyter. Vid mikroskopisk bedömning av galtsperma görs en kvantitativ bedömning, men antalet leukocyter räknas ej exakt. Metoden med vallutstryk och färgning är inte en metod som ger en numerär bedömning av antalet leukocyter då mängden sperma som analyseras varierar mellan olika utstryk. Denna variation beror på att mängden sperma som droppas på objektsglasat varierar, vallarnas tjocklek och bredd varierar samt att material kan lossna vid färgningsproceduren. Dessutom uppstår en skillnad i spädningseffekt beroende på ejakulatmängden, en mindre mängd sperma leder till ökad leukocytförekomst. Inom svinseminverksamheten är dock kanske inte ett exakt antal leukocyter av intresse, utan en uppskattning tillräcklig. Metoder för exakt beräkning borde även medföra dyrare analysmetoder än dagens.

På humansidan har konstaterats en signifikant korrelation mellan bakterier och leukocyter i sperma. I 50 % av fallen där bakterier upptäckts i humansperma misstänks de härröra från kontamination (Gdoura et al., 2008). Även på galtsidan bedöms mängden kontamineringsbakterier som hög, där misstänks att stora mängder bakterier kommer från preputialfickan. Försök i utlandet har visat att spermasamling från galt med robot ger mindre föroreningar. Inom svinseminproduktionen efterfrågas spädningssvåtskor med längre hållbarhet. För att förlänga hållbarheten används idag i många länder höga doser antibiotika, detta är med avseende på resistensutveckling ej önskvärt.

Förekomst av leukocyter i sperma, både intakta och degenererade, misstänks ofta komma från preputialfickan. Orsaken till att leukocyterna blir degenererade i preputialfickan kan vara den ogynnsamma miljön som förekommer där. Vid bedömning av leukocyter i galtsperma brukar även degenererade leukocyter noteras, även dessa anses framförallt komma från preputialfickan. Degenererade leukocyter kan dock vara svårt att skilja från andra degenererade celler. Degenererade leukocyter anses i sperma från galt som mindre allvarliga än icke degenererade leukocyter. I den här studien har gradering av antalet degenererade leukocyter ej utförts framförallt pga. att det i de flesta fall endast kan beskrivas

som "troligtvis degenererade leukocyter". Det förefaller dock som om mängden leukocyter och degenererade leukocyter ofta korrelerar till varandra.

Generellt behövs mer forskning gällande relationen mellan infektion, förekomst av leukocyter och dess skadliga effekter på spermierna. Ytterligare intressanta studier inom AI området på galtsidan är att jämföra leukocytförekomst med motilitet, morfologi och spermieöverlevnadstid. Försök för att fastställa vilka bakterier som finns och om leukocyter förekommer i preputialfickan, och dess eventuella påverkan på spermakvalitet av också av intresse.

Studien visar att förekomst av leukocyter i sperma inte är ovanligt. Om beslutet inom Quality Genetics att ej provta Hampshiregaltarna innan insättning i avel med avseende på förekomst av leukocyter var korrekt är svårt att hitta ett entydigt svar på. Visserligen föreligger många frågetecken om leukocyternas negativa effekter på sperman. Det faktum att ingen heller egentligen heller vet varifrån dessa leukocyter härrör förenklar inte frågan. Det finns flera olika vägar att undersöka detta vidare. Kontamination från preputiet är en trolig orsak till leukocytförekomsten och den kan förebyggas genom att alltid utföra spermasamling på ett hygieniskt korrekt sätt. En rekommendation utifrån studiens resultat är att under en längre period provta fler Hampshiregaltar innan användning i seminverksamheten. Därmed fås ett större material och en bredare grund för att kunna fatta beslut om hur man fortsättningsvis bör undersöka galtar innan användning som semingaltar.

### **Råd och förslag på fortsatta studier**

Quality Genetics rekommenderas att ta stickprov från fler Hampshiregaltar för att få ett större underlag inför beslutsfattning om även dessa galtar rutinmässigt bör undersökas avseende leukocytförekomst i sperman innan användning som semingaltar.

Provtagningar från preputiet för att få bekräftelse om leukocytförekomst föreligger i preputialsekret.

Undersöka om peroxidafärgning är en möjlig väg att underlätta diagnostisering leukocytförekomst i galtsperma.

Vidare studier för att klargöra varför leukocytförekomst i sperma skiljer sig mellan Lantrasgaltar och Yorkshiregaltar.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Althouse, G. & Lu, K. (2005) Bacteriospermia in extended porcine semen, *Theriogenology* 63, 573-584.
- Althouse, G., Pierdon, M., Lu, K. (2008) Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen, *Theriogenology*, doi:101016/j.theriogenology.2008.07.010
- Amann R.P. (1983) Endocrine Changes Associated with Onset of Spermatogenesis in Holstein Bulls. *J.Dairy Sci* 66.
- Athayde, K., Cocuzza, M., Agarwal, A., Krajcir, N., Lucon, A., Srougi, M., Hallak, J. (2007) Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen in a fertile population, *Journal of Androlgy* Vol 28, No. 4 July/ August .
- Avelspolen. Hemsida [online] Tillgänglig: <http://www.avelspoolen.se> [2008-09-12].
- Colenbrander, B., Feitsma, H., Grooten, H. (1993) Optimizing semen production for artificial insemination in swine, *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 48, 207-215.
- Dyce, K., Sack, W., Wensing, C. (2002) *Textbook of veterinary anatomy*, 3.ed. Saunders, 790-794.
- Einarsson, S., (2007). Reproduktion, förlossning och juverfunktion hos gris, 50-58, 113-119. Uppsala. Avdelningen för reproduktion. Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Gdoura, R., Kchaou, W., Znazen, A., Chakroun, N., Fourati, M., Ammar-Keskes, L., Hammami, A. (2008). Screening for bacterial pathogens in semen samples from infertile men with and without leukocytospermia. *Andrologia* 40, 209-218.
- Haidl, G., Allam, J., Schuppe, H. (2008) Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *The Authors Journal Compilation*, Blackwell Publishing Ltd, *Andrologia* 40, 92-96.
- Holst, S., (1949) Sterility in boars. *Nord.Vet.-Med.* 1, 87-120.
- Kaleli, S., Öcer, F., Irez, T., Budak, E., Aksu, F. (2000) Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 89, 185-191.
- Kuster, C. & Althouse, G. (1999) The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep® and X-CELL™ extenders, *Theriogenology* 52:365-376.
- Noakes, D., Parkinson, T., England, G. (2001) *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*, 8.ed. Saunders.
- Ochsendorf F. (1999) Infections in the male genital tract and reactive oxygen species, *Human Reproduction Update*, Vol. 5, No.5 . 399-420.
- Quality Genetics. Hemsida. [online] (2008-07-04). Tillgänglig: <http://www.qgenetics.com> [2008-09-12].
- Rodriguez-Martinez, H. (2007). Reproduktion, förlossning och juverfunktion hos gris, 59-66, 105-112. Uppsala. Avdelningen för reproduktion. Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Rodriguez-Martinez, H. & Einarsson, S. (2007). Reproduktion, förlossning och juverfunktion hos gris, 67-73. Uppsala. Avdelningen för reproduktion. Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Scan. Hemsida [online] (1993-2008). Tillgänglig: <http://www.scan.se> [2008-09-23]

- Senger, P. (2003) Pathways to Pregnancy and parturition. 2. ed. Current Conceptions, Inc.
- Sharma, R., Pasqualotto, F., Nelson, D., Thomas, A., Agarwal, A. (2001) Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic, *Journal of andrology*, Vol 22, No 4, 575-583.
- Sigma-Aldrich. [online] (2008). Tillgänglig <http://www.sigma-aldrich.com> ([http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general % 20information/insert\\_se\\_hhs.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/insert_se_hhs.pdf)), ([http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general % 20information/insert\\_se\\_ht40.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/insert_se_ht40.pdf)) [2008-10-08]
- Sjaastad, Ö., Hove, K., Sand, O. (2003) *Physiology of Domestic Animals*. 1. ed. Scandinavian Veterinary Press
- Straw, B. (2006) *Diseases of swine*, 9.ed. Blackwell Publishing, 135-143
- Sternberg-Lewerin, S. (2006) Sammanställning av sjukdomar som lyder under epizootilagen. Uppsala. Avdelning för sjukdomskontroll, Sektion för epizootologi, Statens Veterinärmedicinska Anstalt.
- Söderquist, L., (2006) Nötkreaturens reproduktion, flik 12. Uppsala. Avdelningen för komparativ reproduktion, obstetrik och juverhälsa. Institutionen för kliniska vetenskaper. Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Söderquist, L. Avdelningen för komparativ reproduktion, obstetrik och juverhälsa. Institutionen för kliniska vetenskaper. Sveriges Lantbruksuniversitet. Personligt meddelande 2008-11-26.
- Söderquist, L., (2007) Reproduktion, förlossning och juverfunktion hos gris, 9-12. Uppsala. Avdelningen för reproduktion. Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Söderquist, L. & Wallgren, M. (2007). Reproduktion, förlossning och juverfunktion hos gris, 137-149. Uppsala. Avdelningen för reproduktion. Sveriges Lantbruksuniversitet.
- Wallgren, M., (1996). Mycoplasmal and bacterial content in raw semen from Swedish AI-boars, Eighth European A.I. Vets meeting 1996, Billund, Denmark.
- Wallgren, M. Quality Genetics. Personligt meddelande 2008-09-30.

Figur 1, 3 och 4 är publicerade med tillstånd från Dr P.L. Senger.