

**Projnr. V0750239:**

**Undersökning och identifiering av olika spermiesubpopulationer i ejakulat från galtar samt avlägsnande av patogener med hjälp av kolloidcentrifugering.**

**Bakgrund**

År 2007 inlämnades en ansökan till SLF angående projektet ” Undersökning och identifiering av olika spermiesubpopulationer i ejakulat från galtar samt avlägsnande av patogener med hjälp av kolloidcentrifugering”. Syftet med projektet var att genom att använda kolloidcentrifugering undersöka möjligheten att ta bort oönskade mikroorganismer från galt spermier och förhindra spridning av virus och bakterier samt att genom detta bidra till en minskad antibiotikaanvändning inom svinseminverksamheten. Därutöver kommer vi att undersöka möjligheten att selektera fram X-kromosombärande spermier med hjälp av samma metod. Vår hypotes är att hos spermier med identiska somatiska kromosomer har de X-innehållande kromosomerna större kromosommassa än de Y-innehållande även om spermiehuvudets volym i stort är densamma. Av den anledningen blir densiteten hos den X-kromosominnehållande spermien högre jämfört med den X- kromosominnehållande spermien. Detta möjliggör separering av de två spermityperna med hjälp av kolloidcentrifugering och anrikning av tillräckligt många X-bärande spermier för användning vid lågdosinsemination.

**Relevans för seminindustrin**

Spridning av mikroorganismer via sperma är ett problem inom svinseminindustrin, sperman kontamineras så gott som alltid vid samling och för att förhindra att dessa kontaminanter (ffa bakterier) växer till i sperman under lagring (upptill 5 dygn) tillsätts alltid antibiotika till spermans spädningvätska. Trots att man strävar att vara så restriktiv så möjligt i sitt val av antibiotika och vid doseringen samt att man försöker undvika att producera ett överskott av spermadoser, som inte kommer till användning utan slängs, handlar det här om stora mängder antibiotika som i slutänden kan bli en belastning på vår miljö. Här erbjuds en metod som väsentligt kan minska antibiotikaanvändningen. I en population där ett virus förekommer endemiskt finns alltid en risk att enstaka galtar periodvis kan utsöndra viruset i fråga. Serologisk undersökning fungerar inte eftersom många djur tidigt har träffat på viruset och är seropositiva. Man kan testa varje samlat ejakulat avseende förekomst av virus. När det gäller kontroll av virus i färsk spädd galt spermia är PCR enda alternativet eftersom virusodling tar allt för lång tid och hållbarheten på färsk spädd galt spermia är begränsad. Här presenteras en metod med potential att ”rena” sperman från virus/bakterier redan under produktionsfasen och som dessutom kan leda till en minskad användning av antibiotika.

Vid könsmognade uppstår hos vissa hangrisar en obehaglig galtluktt i köttet, därutöver utvecklar den könsmogna galten ett sexuellt och ofta aggressivt beteende. Kirurgisk kastrering sker för att förhindra att detta sker men kirurgisk kastrering ifrågasätts idag ffa av djurskyddsskäl. Inom EU vill man också införa förbud mot kirurgisk kastrering. Till djurskyddsskålen måste hänföras inte bara smärtan vid kastreringen utan också problemen med det sexuella beteende och den ökade aggressivitet som utvecklas hos okastrerade handjur vid könsmognaden och de problem som uppstår i en grupp djur (slagsmål mellan galtar, skador vid upphopp och eventuella dräktiga hondjur). Förutom kirurgisk kastrering finns idag vaccin för immunokastrering, där vaccinet verkar genom att förhindra

bildningen av könshormoner och förhindrar könsmodnings inträde. Vaccinet finns kommersiellt tillgänglig. Användning av könssorterad sperma minskar behovet av kastrering då könet på de födda smågrisarna kan förutbestämmas.

### **Material och metoder; Resultat**

Dr Jane Morrell anställdes 50 % vid SLU juni 2007. Att projektet påbörjades senare än tänkt var på grund av att bekräftelsen på bidraget kom i början av maj och SLU behövde detta för att anställa Dr. Jane Morrell.

Först fokuserade verksamheten på jämförande undersökningar av gradientcentrifugering genom ett lager (SLC=Single Layer Centrifugation) och densitetsgradientcentrifugering (DGC=Density Gradient Centrifugation). SLC kan utgöra ett enklare och mer praktiskt alternativ för separering av galt spermier, jämfört med DGC, särskilt när det kommer till uppgradering av metoden för användning av stora volymer (hela ejakulat). Dessutom ansågs att en utveckling av standardprocedurer för SLC såväl som för DGC nödvändiga för projektets fortsättning. Jämförande undersökningar har därför gjorts innefattande autoklavering av kolloiden och tvättning av spermiepelleten efter centrifugering samt inkubering av samtliga prover i 30 minuter i 37 °C innan motilitetsbedömningar gjorts. I en fristående studie har betydelsen av spermiernas ursprung studerats (enbart SLC). Slutligen har spädningsvätskans effekt på överlevnaden hos ocentrifugerade spermier studerats. Man kunde, med hjälp av fasmikroskop, se att motiliteten hos oselektade spermier sjunker med tiden samtidigt som en ökad förekomst av bakterier kunde ses medan SLC-selektade spermier under samma tidsperiod uppvisar en högre motilitet och ingen bakterieförekomst (subjektivt bedömning).

### **Gradientcentrifugering i ett lager (SLC) kontra densitetsgradientcentrifugering (DCG)**

I dessa experiment har spermie-motiliteten i centrifugerade och ocentrifugerade prover undersökts dagligen till dess att den totala motiliteten har sjunkit till under 20 %. Spermaproverna har förvarats vid rumstemperatur i en isolerad box. Ingen statistisk skillnad i motilitet kunde vid jämförelse av de två centrifugeringsmetoderna ( $67.5 \pm 25.6$  % motilitet för SLC och  $59.6 \pm 22.3$  % motilitet för DGC). Spermie-motilitet var högre hos centrifugerade spermier än hos ocentrifugerade spermier både direkt efter förberedning och under de följande dagar. Skillnaden i motilitet mellan ocentrifugerade och centrifugerade spermiepreparationer var signifikant ( $P < 0.001$  vid alla tidpunkter). Inga skillnader sågs mellan de två centrifugeringsmetoderna ( $P > 0.05$ ), vilket innebar att SLC inte var sämre än DGC. Dessutom var spermieöverlevnaden längre i centrifugerade spermaproverna jämfört med de ocentrifugerade (SLC:  $5.5 \pm 0.79$  dagar, DGC:  $5.75 \pm 0.62$  dagar, ocentrifugerade  $3.1 \pm 0.3$  dagar,  $P < 0.001$ ). En ökning av bakterier kunde ses i samband med sänkningen i spermie-motilitet. Lagrad sperma, spädd och förvarad vid rumstemperatur under 24 timmar och längre innan centrifugering uppvisade liknande resultat (Morrell et al, 2009; Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypropyltrimethoxy-silane-coated silica colloid. **Journal of Reproduction and Development** 55, 547-552).

En jämförelse med tjurspermier gjordes, där spermierna preparerats för IVF (in vitro fertilisering, provrörsbefruktning) och för CASA (datoriserad spermieanalys). Tre olika centrifugeringsmetoder jämfördes, SLC och DGC med silan-belagd kiselsyre-kolloid och

DGC med Percoll (standardmetod för preparering av tjurspermier för IVF). Befruktningsförmåga, blastocystutveckling och totalantal celler var  $56.27\% \pm 29.1$ ,  $33.5\% \pm 17.4$  och  $83.2 \pm 29.9$  för DGC selekterade spermier;  $58.1\% \pm 23.3$ ,  $24.5\% \pm 14.3$  och  $94.6 \pm 23.4$  för SLC selekterade spermier;  $55.3 \pm 7.3$ ,  $27.5 \pm 15.6$  och  $98.6 \pm 24.6$  för spermier selekterade med Percoll. Den datoriserade spermieanalysen visade inga skillnader mellan de två prepareringsmetoderna. (**Thys et al, 2009**; *In vitro* fertilising capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer glycidoxypropyl-trimethoxy silane-coated silica colloidal centrifugation. **Reproduction in Domestic Animals 44, 390-394**).

**Slutsats:** SLC är ett effektivt hjälpmedel för att särskilja galtspermier med god motilitet, och skiljer sig inte gentemot DGC i detta avseende. Centrifugerade spermiepreparat uppvisar en signifikant bättre spermie motilitet och överlevnad än ocentrifugerade, i vissa fall är motiliteten fortfarande hög sju dagar efter samling efter förvaring i rumstemperatur. Ingen skillnad mellan centrifugeringsmetoderna kunde ses avseende befruktningförmågan hos tjurspermier frampreparerade för IVF. Då varken autoklavering av kolloiden eller tvättning av spermiepelletten efter centrifugering verkar vara nödvändigt för att erhålla ett bra resultat vid användning av SLC, kan mycket tid sparas vid iordningställandet. SLC kommer att fortsättningsvis användas i detta projekt.

### **Spermans ursprung**

Tidigare arbeten vid institutionen har visat att genom att samla de första 10 ml av den spermierika fraktionen, skilt ifrån resten av galtejakulatet, möjliggörs en anrikning av starkt motila spermier. I vårt nästa experiment samlades galtejakulatet i fraktioner och preparerades med hjälp av SCL. Spermieöverlevnaden efter kolloidcentrifugeringen av de olika fraktionerna uppvisade en annan bild än vad som erhöles efter centrifugering av ”traditionellt” samlade spermier (helejakulat). Kolloidcentrifugerade spermier samlade fraktionsvis hade sämre överlevnad och uppvisade inte lika god motilitet som ”traditionellt” samlade spermier, dessutom var skillnaden mellan olika galtar stor (**Morrell et al, (2009)**; Sperm survival following colloid centrifugation varies according to the part of the sperm-rich fraction used. **Society for Reproduction and Fertility, Suppl. 66, 85-86**). Dessa fynd är intressanta då de avslöjar ett möjligt samband mellan spermieantal och förhållandet mellan sekretionen från de olika accessoriska könskörtlarna. Dessa förhållanden är av betydelse för olika spermieproduktionsåtgärder förutom kolloidcentrifugering, som t.ex. frysning. I övrigt bekräftade försöket att SLC som metod lämpar sig väl för användning till galtsperma.

### **Virusstudium**

Under 2008 har en virusstudie påbörjats med utvärdering av en 2-steps metod för avlägsnande av virus från ”virusspikad”(känd mängd virus tillsatt till sperma) svinsperma. I första hand har spermans påverkan på celler i odling undersökts. Sperma i sig har en starkt cytopatisk effekt på celler i odling men det var möjligt att optimera förhållandena så att även en eventuell förekomst av virus kunde påvisas. Därefter kunde spermierening genom kolloidcentrifugering med eller utan ”swim-up” av sperma ”spikad” med virus testas. Hittills har en stor sänkning av virustitrar påvisats, från titrar

på 21870-196830 i ”spikad” sperma till 90-270 i SLC behandlad sperma efter ”swim-up”.

**Tabell 1: virustiter i olika fraktioner efter SLC och ”swim-up”.**

Fraktion	Virustiter analys I	Virus titer analys II
Sperma, spädningvätska	<10	<10
Spädd sperma + virus	>21870	196830
Spermaplasma efter centrifugering	7290	21870
Kolloid efter centrifugering	2430	2430
Spermierpellet, uppslammad	810	270
Tvättvätska	270	810
”swim-up” fraktion	270	90
Kvarvarande vätska	810	Ej analyserat

Eftersom virustitern i ”spikad” sperma förmodligen är mycket högre än vad som ses vid naturlig infektion är resultat mycket lovande. Möjligheten att använda två kolloidcentrifugeringssteg istället för ett följt av ”swim-up” har också undersökts i nativ sperma dvs utan virusspikning. På detta sätt undviker man att förlora så många spermier (Tabell 2). Spermerna hade bra motilitet strax efter den andra centrifugeringen.

**Tabell 2: Andelen återfunna spermier efter centrifugering och motilitetsresultat efter 1 respektiv 2 x SLC och efter 1 x SLC + ”swim-up”.**

Parameter	Ocentrifugerat	1 x SLC	2 x SLC	1 x SLC + ”swim-up”
Utbyte spermier (%)	-	64.7±15.6	60.5±7.9	45±20.2
Motilitet (%)	54.5±24.2	85.8±6.5	79.4±4.2	71.6±22.8

Dessa resultat har skickats in för publicering (**Blomqvist et al**, Removal of Virus from Boar Semen Spiked with Porcine Circovirus Type 2).

#### **Borttagning av andra bakterier**

Åtta galtejakulat samlades och en del av varje ejakulat preparerades genom SLC , enligt tidigare beskrivning. Den resulterande spermiepelleten omhändertogs i en sterilbänk. Från varje ejakulat sändes prov från SLC-selekterade respektive oselekterade spermier för bakteriell undersökning och kvantifiering, vid bakterieväxt identifierades även

bakterierna. Resten av de selekterade och oselekterade ejakulaten förvarades i klimatbox vid 16-18 °C och nya prover för bakteriell undersökning togs efter 24 timmar. Resultaten av den bakteriella undersökningen och identifieringen visas i tabell 3.

I ett av de åtta oselekterade spermaproverna och tre av de SLC selekterade växte inga bakterier alls, varken vid 0 eller efter 24 timmar. Ett SLC-selekterat prov uppvisade bakterieväxt vid 0 men inte efter 24 timmar, vilket tyder på att 0-provet kontaminerats. De kvarvarande sju oselekterade proverna innehöll alla kontaminerande bakterier vid 0 timmar, och antalet bakterier hade ökat efter 24 timmar.

Fyra SLC-selekterade prover uppvisade en lindrig bakterieväxt vid 0 timmar och denna hade i de flesta fall inte ökat efter 24 timmar. Antalet bakterier isolerades enligt följande: oselekterade 0 timmar, 11000 cfu/mL; SLC- selekterade 0 timmar, 1270 cfu/mL; oselekterade 24 timmar, 18500 cfu/mL; SLC- selekterade 24 timmar, 940 cfu/mL .

De bakterier som framförallt reducerade av SLC var kocker utan flageller medan rörliga flagellförsedda stavar oftare kunde isoleras efter SLC. Resultaten visar att det är möjligt att helt eller delvis reducera mängden kontaminerande bakterier från galtejakulat och att det dessutom verkar som att bakterierna i SLC proverna inte ökar i antal under inkubering under 24 timmarsperiod vid 16-18 °C .

**Tabell 3: Identifiering och kvantifiering av bakterier i oselekterad och SLC-selekterad galtsperma.**

Galt	0 timmar efter SLC (>5 timmar efter samling)		Efter 24 h lagring vid 16-18°C	
	Ocentrifugerad	SLC	Ocentrifugerad	SLC
1	A-hämolyserande Streptokocker i blandflora ca 4000 cfu/ml	Ingen växt	Blandflora + a-hämolyserande streptococcus ca 40 cfu/ml	Ingen växt
2	Stafylococcus spp. i blandflora ca 500 cfu/ml	Staf.aureus i renkultur 1000 cfu/ml (?kontaminering efter SLC)	Lindrig växt av Stafylococcus spp i blandflora ca 50 cfu/ml	Ingen växt
3	α-hämolyserande Streptokocker. i blandflora Ca 1000 cfu/mL	Ingen växt	Lindrig växt av Bacillus spp i blandflora	Ingen växt
4	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt
5	Pseudomonas 10.000 cfu/ml Koagulasnegativa Stafylokokker 800 cfu/ml	Ingen växt	Pseudomonas >10.000 cfu/ml i sparsam blandflora	Ingen växt
6	Pseudomonas 6800 cfu/ml Koagulasnegativa Stafylokokker 920 cfu/ml	Ingen växt	Pseudomonas >10 000 cfu/ml, Koagulasnegativa Stafylokokker 2900 cfu/ml	Ingen växt
7	Burkholderia spp, 500 fu/ml Citrobacter spp, 500 cfu/ml	Burkholderia, 50 cfu/ml	Citrobacter spp ,10000 cfu/m	Pseudomonas aeruginosa 200 cfu/ml
8	E. coli, 3000 cfu/ml	E. coli ,150 cfu/ml	E. coli, 5000 cfu/ml	E. coli 300 cfu/ml
9	Pantoea spp, 1000 cfu/ml Citrobacter spp 200 cfu/ml	Pantoea spp 1000 cfu/ml	Pseudomonas aeruginosa 3000 cfu/ml; Citrobacter spp 300 cfu/ml	Psuedomonas aeruginosa 200 cfu/ml; Panteoa spp 200 cfu/ml
10	Pantoea spp, 260 cfu/ml	Gra-positiva kocker 70 cfu/ml	Klebsiella pneumoniae 20 cfu/ml; Pseudomonas aeruginosa 100 cfu/ml	Klebsiella pneumoniae 40 cfu/ml

(Wallgren et al, Single Layer Centrifugation with Androcoll™-P removes, or substantially reduces, bacterial contamination in boar sperm samples. Posterabstrakt, International Spermatology Symposium, 2010).

### **Försök med större ejakulatvolym (uppskalning) av Single Layer Centrifugering**

För att vara användbart för svinspermaindustrin (galtstationerna) måste SLC anpassas till större volymer. I första hand har ändringar i kolloidens densiteten undersökts för att öka antalet spermier och SLC anrikningsgrad. Följande volymer har utretts S: (small) 3 mL och 4.5 ml spädd sperma ovanpå 4 ml kolloid; och L (large) 10 mL, 12.5 mL och 15 mL ovanpå 15 ml kolloid. Det sågs ingen skillnad mellan 3 och 4.5 ml spädd sperma ovanpå 4 mL kolloid eller 10ml, 12.5ml och 15 ml ovanpå 15 ml kolloid. Om man tittar på motilitet i L- preparat (10 ml, 12.5 ml och 15 ml) och jämför med ocentrifugerad sperma, finns det en trend för bättre motilitet hos de SLC-selektade spermerna (85.3% jämfört med 77.6%, n=16; P<0.06). Idag används 15 ml rutinmässigt istället för 1.5 ml. Motilitetsresultat, andel selekterade spermier och spermieröverlevnad har jämförts mellan S och L-preparat och dessa har visat sig vara jämförbara (spermiermotilitet S =  $81.7 \pm 7.7$ , L =  $84.9 \pm 6.1$ %; utbyte spermier S =  $43.7 \pm 10.1$ %, L =  $42.4 \pm 23$ %). Ocentrifugerade spermier hade  $77.4 \pm 19$ % motilitet, något lägre än SLC-selektat spermier. Andelen selekterade spermier visade sig vara lägre än för 18 månader sedan, vilket förmodligen beror på en försämrad spermiekvalitet hos de använda galtarna. Under de kommande tre månaderna ska uppskalningen av metoden fokusera på ytterligare spermiekvalitetsparametrar, t.ex. viabilitet, morfologi, kromatinintegritet och oxidativ stress. Samtidigt ska uppskalningen fortsätta med förhoppningen att i slutändan ha utvecklat metoden till att förbereda hela galtejakulatet samtidigt och på ett enkelt sätt.

Ett experiment gjordes för att jämföra spermaprover preparerade genom SLC, i stora (L= 15 mL Androcoll™-P and 15 mL spädd sperma) och små volymer (S=4 mL Androcoll™-P and 4.5 mLs spädd sperma). Progressiv motilitet, linjäritet och normal morfologi var signifikant högre i selekterade prover än i oselektade prover (P<0.001), medan membranintegritet mätt med SYBR14/propidium iodidfärgning analyserat med flödescytometri förblev oförändrad. Ingen skillnad i spermiekvalitet kunde ses mellan SLC preparationerna oavsett volym vilket indikerar att den ”uppskalade” metoden är lika bra som den ursprungliga mindre när det gäller att selektera fram spermier av god kvalitet. Dessa resultat är under publicering (van Wienen et al, Single Layer Centrifugation with Androcoll™-P selects the best spermatozoa and can be scaled-up to process large volumes of boar semen).

Ytterligare försök med ökad volym har gjorts med 20 ml kolloid och 25 ml spädd sperma i 100 ml glaströr. Återigen var kvaliteten hos de selekterade spermerna lika god som med originalmetoden. I medeltal 65% av spermerna återfanns efter SLC, beroende på ursprungsspermans kvalitet (progressiv motilitet: ocentrifugerade 48%, liten volym 59%, stor volym 57%; normal morfologi: ocentrifugerade 82%, liten volym 97%, stor volym 97%).

### **Fertilitet hos SLC-selektade spermier**

Befruktningsdugligheten hos SLC-selektade spermier testades i ett *in vitro* försök. Utvecklingsgrad av befruktade oocyter var 35% med selekterade spermier jämfört med

19% med oselektade spermier. Det betyder att spermier kan fungera normalt sefter kollid centrifugering samt att SLC selekterar de mest befruktningdugliga spermier (Gonzalez Herrero et al, unpublished resultat).

### **Könsseparering av galtspermier**

I det första försöket användes ejakulat från fyra galtar, 15 ml spädd sperma innehållande  $100 \times 10^6$  spermier/ml separerades genom 15 ml Androcoll™ med olika densitet (i) 1.088, (ii) 1.104 and (iii) 1.117 g/ml. Efter centrifugering (300 g i 20 minuter) löstes spermie-pelletten upp i BTS med bSA-tillsats och spermiekoncentrationen justerades till  $100 \times 10^6$  spermier/ml. Efter centrifugering (300 g i 20 minuter) togs spermie-pelletten till vara löste resuspended in BTS with added bSA, adjusting the sperm concentration to  $100 \times 10^6$ /ml, därefter tvättades spermerna tre gånger med mellanliggande centrifugeringar (900g i 20 minuter). Spermerna fixerades i natriumazide (0.01%) and färgades med Hoechst 33342 vid tre olika koncentrationer (7.5µl, 10.0µl and 12.5µl i 5mg/ml slösning). Proverna förvarades i rumstemperatur fram till analys, flödescytometri vid universitetet i Bologna. Procenten Y- respektive X-kromosombärande spermier i proverna var som följer: Oselektade spermier 47:53; (i) 49:51; (ii) 49:51; (iii) 51:49, dessa data skiljer sig inte från det förväntade förhållandet, 50:50.

I ett andra experiment användes ett ejakulat, 4.5 ml spädd sperma centrifugerades genom 4 ml Androcoll™-P (densitet 1.104 g/ml) vid 200 g i 10 minuter eller vid 300 g i 5 eller 10 minuter för att försöka hitta de optimala betingelserna. Centrifugering vid 200 g i 10 minuter och 300 g i 5 minuter, resulterade inte i någon tydlig spermie-pellett även om en antydning till koncentrerad spermier kunde anas längst ner i kolloiden (ca 0,5 ml). Denna spermieinnehållande del av kolloiden togs till vara och centrifugerades vid 500 g i 10 minuter för att få en spermiepellet. Alla spermiepellettar fixerades och färgades som tidigare beskrivits. Fastän antalet spermier var väldigt lågt,  $22-47 \times 10^6$  jämfört med de  $450 \times 10^6$  spermier som tillsatts ovanpå kolloiden sågs ingen skillnad från det förväntade 50:50 förhållande vid något av de olika centrifugeringsstrategierna.

Dessa resultat indikerar att den gängse Androcoll™-P beredningen inte påverkar selektionen av X-kromosombärande spermier även om låga g-krafter och korta centrifugeringstider användes. En ny Androcollberedning har nyligen testats, denna ger ett lägre utbyte än den tidigare vilket indikerar att den tillåter en högre grad av selektion. Denna nya Androcollberedning kan möjligen användas för att selektera fram X-kromosombärande spermier.

### **Diskussion**

Projektets resultat kan sammanfattas enligt följande;

1. Single Layer Centrifugation (SLC) genom Androcoll™-P selekterar fram de bästa spermerna i galtens ejakulat och är lika effektiv som en densitetsgradientcentrifugering av små volymer (1.5 ml spädd sperma).
2. SLC kan användas för stora volymer, 15 ml spädd sperma i ett 50 ml provrör eller 25 ml sperma i ett 100 ml rör. Båda dessa metoder, som är mer lämpade för användning för galtasperma för AI, resulterar i en spermakvalitet liknande den som ses efter användning av originalmetoden med 1.5 ml sperma.
3. Porcint circovirus typ 2 (PCV2) användes som modell, det visade sig vara möjligt att reducera virusmängden i "spikade" spermaprover genom att använda en kombinerad

teknik med SLC genom Androcoll™-P följt av en ”svim-up” procedur. De erhållna resultaten var uppmuntrande, den tillsatta mängden virus var betydligt högre än vad som ses vid naturlig infektion och ändå reducerades virusmängden markant. Experimentet kommer att utökas till att inkludera även andra typer av virus som utsöndras via sperma.

4. Det var möjligt att ta bort eller reducera kontaminerande (från spermasamlingen) bakterier i ejakulat. Den totala bakteriemängden reducerades genom SLC genom Androcoll™-P, det visade sig vara svårare att ta bort rörliga bakterier (med flageller) än orörliga bakterier (utan flageller). Om bakteriekontamineringen var låg efter SLC ökade heller inte mängden bakterier under lagring, vilket var fallet med ocentrifugerade prover där bakterieantalet ökade under lagring. Dessa resultat är av stor betydelse för en framtida minskning av antibiotikaanvändning i spädningstvåskor och som följd därav en ökad biosäkerhet.

5. Androcoll-P i sin nuvarande form visades sig inte vara lämplig för att sortera för X-kromosombärande spermier ur ett spermaprov även vid användning av mycket låga g-krafter och korta centrifugeringstider. Möjligheter att anrika X-kromosombärande spermier finns om en ny beredningsform avkolloiden används.

6. SLC-selektade spermier var befruktningsdugliga vid provrörsbefruktnings.

Dessa resultat föreslår att SLC kan vara till nytta för svinseminindustrin på flera punkter.

- SLC-behandlade spermier behöver inte antibiotikatillsats i spädningstvåskan vilket kan minska antibiotikaanvändningen och detta kan i sin tur leda till en minskad risk för uppkomst och spridning av antibiotikaresistenta bakterier.
- Borttagning av virus ökar biosäkerheten i spermadoser. Infekterade galtar kan utsöndra virus innan de har påvisbara antikroppar i blodet, och följaktligen undgår upptäckt. SLC minskar risken för spridning av virus med sperma.
- Spermakvaliteten ökar i SLC-selektade prover särskilt andelen spermier med normal morfologi. Galtar som är genetiskt intressanta kan användas med ett bra dräktighetsresultat även om de har en försämrad spermiekvalitet.
- SLC-tekniken kan fortfarande vara ett alternativ för könssortering, ensam eller i kombination med andra metoder, dock krävs ytterligare forskning för att optimera försöksbetingelserna.

### **Publicerade resultat**

1. Thys, M, Vandaele L, Morrell JM, Mestach J, Van Soom A, Hoogewijs M, Rodriguez-Martinez H. In vitro fertilising capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single layer glycidoxypropyltrimethyl silane-coated silica colloidal centrifugation. *Reprod Dom Anim* 44, 390-394.
2. Morrell JM & Rodriguez-Martinez H (2009) Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open Andrology Journal* 1, 1-9.
3. J.M. Morrell, F. Saravia, M. van Wienen, H. Rodriguez-Martinez M. Wallgren (2009) Sperm Survival following colloid centrifugation varies according to the part of the sperm-rich fraction used. *Society for Reproduction and Fertility Suppl.* 66, 85-86.
4. Morrell, JM, Saravia, F, Wallgren M, van Wienen, M & Rodriguez-Martinez, H. (2009) Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypropyltrimethoxy-silane-coated silica colloid. *Journal of Reproduction and Development* 55, 547-552.
5. Chatdarong K, Thuwanut P, Morrell JM (2010) Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology*. 2010 Feb 18. [Epub ahead of print] PMID: 20171724
6. Morrell JM and Wallgren M. (2010) Androcoll™-P-Large selects boar spermatozoa with good membrane integrity from the sperm-rich fraction of the ejaculate. *Animal Reproduction* *In press*

### **Konferensrapporter**

7. M Wallgren, F Saravia, H Rodriguez-Martinez & JM Morrell (2008) Effect of density gradient and single layer centrifugation on motility and survival of boar spermatozoa.. *Reproduction in Domestic Animal* 43, Suppl. 3, P 241.
8. Morrell JM, H Rodriguez-Martinez and C Linde Forsberg. Single layer centrifugation on a colloid selects motile and morphologically normal spermatozoa from dog semen: preliminary results. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 61. Abst. P29.
9. van Wienen, M, Johannisson, A, Wallgren M, Parlevliet J, Rodriguez-Martinez H. & JM Morrell (2009) Improvement in boar sperm morphology by Single Layer Centrifugation using Androcoll™-P. *Reprod Dom Anim* 44, Suppl. 3, Abst. P188.

### **Inskickade artiklar och artiklar under framställning**

10. van Wienen M, Johannisson A, Wallgren M, Parlevliet J, Rodriguez-Martinez H, Morrell JM. Single Layer Centrifugation with Androcoll™-P selects the best spermatozoa and can be scaled-up to process large volumes of boar semen.
11. M Wallgren, H Rodriguez-Martinez, JM Morrell. Single Layer Centrifugation with Androcoll™-P removes, or substantially reduces, bacterial contamination in boar sperm samples. Poster abstract submitted for International Spermatology Symposium, 2010.
12. M Wallgren, H Rodriguez-Martinez and J Morrell. Practical manipulation procedures in order to guarantee the biosecurity of cryopreserved gametes. Abstract submitted for ESDAR meeting 2010.
13. Blomqvist et al. Removal of Virus from Boar Semen Spiked with Porcine Circovirus Type 2.

14. Morrell et al. Can Single Layer Centrifugation with Androcoll™-P be used to select X-chromosome bearing boar spermatozoa from an ejaculate?
15. Gonzalaez Herrero et al. Blastocyst development rate is better after selection of boar spermatozoa with Androcoll-P.