Kan fersk rånesæd lagres lenger?

ANN HELEN GAUSTAD [1], TOMMY HAUGAN[2], PEER OLA HOFMO[1]
Norsvin[1], Team Semin[2]

Innledning

Rånespermier er svært sensitive overfor kuldesjokk, og kryokonservering har vist seg å medføre betydelige membranskader. Nedsatt overlevelse og befruktningsdyktighet i sæddoser som har vært nedfrosset resulterer i at man må kompensere med et høyere spermieantall i sæddosene. Til kunstig inseminasjon på gris brukes i derfor hovedsak fersk sæd. Det kan by på utfordringer å få transportert sæddosene helt fram til bruker innen rimelig tid. Norsvin har i alle år produsert ferske sæddoser 6 dager i uken for å kunne sikre forsyningene over hele landet. Det har vært et ønske om å kunne forlenge holdbarheten på fersk rånesæd med to dager innen 2005.

All sæd som skal lagres i kortere eller lengre tid, tilsettes fortynningsvæske som bl.a. skal stabilisere pH og sikre næring for sædcellene. Det finnes på markedet flere typer fortynningsvæsker med forskjellige innholdsstoffer. Noen av disse er kommersielle spesialprodukter.

I en pilotundersøkelse i regi av Team Semin ble overlevelse av rånespermier lagret i inntil fem døgn vurdert *in vitro* ved bruk av flowcytometri (Waterhouse et al., 2004). Spermiekvaliteten ble vurdert etter fortynning og lagring i tre ulike kommersielle fortynningsvæsker og sammenlignet med fortynningsvæsken Beltsville Thawing Solution (BTS) som brukes til kortidslagring. Dette laboriatorieforsøket viste at spermier lagret fem dager i langtidsfortynneren X-cell hadde like god overlevelse som spermier lagret i tre dager i BTS. Det ble derfor designet et inseminasjonsforsøk i felten med bruk av X-cell og BTS. Formålet med feltstudiet var å kunne vurdere om det var forskjell i grisingsprosent og kullstørrelse ved bruk av sæddoser brukt inntil fem døgn etter fortynning i X-cell og sæddoser brukt inntil tre døgn etter fortynning i BTS.

Materiale og metoder

I feltforsøket deltok to nav i purkeringer og 11 andre bruksbesetninger. Disse ble valgt ut på bakgrunn av (historiske) innsendte data til In-Gris sentralt lager. Disse dataene tydet på at besetningene hadde godt fungerende puljer med mesteparten av inseminasjonene utført på mandager og tirsdager. I alle besetningene ble det sikret en stabil lagringstemperatur på 18 °C for sæddosene gjennom bruk av klimaskap.

I produksjonen av sæddosene ble sæd fra tre til fire råner blandet sammen (blandetsæd). Det var i alt tre rånegrupper som vekslet på sædproduksjonen. Sæddosene til bruk under feltforsøket ble fortynnet med X-cell på fredag og lagret hos Norsvin fram til mandag. Til kontroll ble sæddoser fortynnet i BTS på søndag og

lagret til mandag. Alle sæddoser ble kodet slik at den som inseminerte ikke visste hvor lenge sæden var lagret eller hvilken fortynningsvæske som ble brukt. I hver pulje skulle halvparten av purkene dobbeltinsemineres med den ene eller den andre sædtypen. På denne måten ble inseminasjon med fjerde og femte dags sæddoser i X-cell sammenlignet med andre og tredje dags sæddoser i BTS.

De statistiske analysene ble utført ved bruk av statistikkprogrammet SAS, versjon 8 for Windows. Signifikansnivået ble satt til $p<0,05$. Effekten av sæd fortynnet i X-cell og brukt på den fjerde og femte dagen sammenlignet med sæd fortynnet i BTS og brukt på den andre og tredje dagen ble vurdert ved: 1) Grisingsprosent, hvor en lineær multippel logistisk modell for kategoriske data ble tilpasset ved bruk av "genmod procedure" i SAS. 2) Kullstørrelse, hvor en "mixed" modell ble tilpasset ved bruk av "mixed procedure" i SAS.

Responsvariablene som ble brukt var grising (suksess eller ikke suksess) og kullstørrelse. Forklaringsvariablene i modellene var: fortynner (sædtype), rånegruppe, paritet, interaksjonen mellom rånegruppe og fortynner, interaksjonen mellom paritet og fortynner, og besetning som en tilfeldig variabel.

Resultater

Resultatene etter i alt 1460 dobbeltinseminasjoner ble analysert. De fordelte seg med 52 ungpurker, 178 førstekullspurker og 517 eldre purker inseminert med sæd fortynnet i X-cell og lagret i 4 og 5 dager, samt 47 ungpurker, 200 førstekullspurker og 466 eldre purker inseminert med sæd fortynnet i BTS og lagret i 2 og 3 dager. De 747 inseminerte purkene i forsøksgruppen fødte 643 kull, mens de 713 inseminerte purkene i kontrollgruppen fikk 618 kull.

Estimert odds ratio for sannsynligheten for grising mellom X-cell og BTS var ikke signifikant forskjellig fra 1 (tabell 1). For en hypotetisk flerkullspurke var sannsynligheten for grising etter bruk av X-cell lik 84,8% (95 % konfidensintervall:(78,2, 89,6)) og etter bruk av BTS lik 85,6% (95 % konfidensintervall:(75,4, 92,0)). Styrkeberegninger viste en styrke på 0,85 for å påvise en forskjell i grisingsprosent på 6,0 %-enheter. Både besetning og antall tidligere kull var signifikante forklaringsvariabler når det gjaldt grisingsprosenten.
Rådata for kullstørrelse, beregnet som totalt antall født per kull, viste et gjennomsnitt på 13,8 og 13,9 grisunger for henholdsvis X-cell og BTS. Det ble i de statistiske modellene ikke funnet statistiske forskjeller i kullstørrelse mellom de to fortynningsvæskene verken når det gjaldt totalt antall fødte eller levendefødte per kull. Den statistiske styrken ble beregnet til 0,86 for å påvise en forskjell i 0,5 totalt fødte per kull. Least square means ± standard error for antallet levendefødte per kull var 12,5 ± 0,2 for X-cell og 12,6 ± 0,3 for BTS. Også når det gjaldt kullstørrelsen, var både besetning og tidligere antall kull signifikante forklaringsvariabler.

Diskusjon

Studien viste at dobbeltinseminasjoner med blandetsæd lagret i 4 og 5 dager i X-cell ga tilsvarende fruktbarhetsresultater som blandetsæd lagret i 2 og 3 dager i BTS. Ingen interaksjoner mellom fortynningsvæske og tidligere antall kull, eller mellom fortynningsvæske og rånegruppe, ble påvist. Tidligere undersøkelser har imidlertid vist at langtidslagring av sæd fortynnet i X-cell bare kan anbefales hvis sæden er av god kvalitet (Kuster et al., 1999). I undersøkelsene med bruk av flow-cytometri kunne en observere betydelig variasjon mellom råner når det gjaldt lagringsdyktighet også i X-cell (Waterhouse et al., 2004). Waterhouse et al. (2004) undersøkte kun spermier fra enkeltråner av landsvinrase og viste da god effekt av X-cell sammenlignet med BTS. Muligens kan de gode resultatene i feltforsøket ha sammenheng med bruken av dobbeltinseminasjon med blandetsæd, noe som tidligere er vist å kunne gi høyere fruktbarhetsresultater sammenlignet med sæd fra enkeltråner ved fortynning med BTS og lagret i inntil 3 dager (Haugan et al., 2004).

Tabell 1. Fruktbarhetsresultater med X-cell™ og BTS som fortynner for fersk rånesæd. Odds ratio-estimater for sannsynlighet for grising, og least square means ± standard error (SE) for kullstørrelse, for variablene: fortynningsvæske (sæd lagret 4 og 5 dager i X-cell™ i forhold til sæd lagret 2 og 3 dager i BTS), rånegruppe, og tidligere antall kull (0, 1 og >1). Resultatene ble estimert med genmod-prosedyren (sannsynlighet for grising) og mixed-prosedyren (kullstørrelse) in statistikk-programmet SAS.

Parametre	**Sannsynlighet for grising**			**Kullstørrelse**	
	Odds ratio-estimater			Totalt antall fødte grisunger	
	Punkt-estimat	95 % konf. grenser	Antall ob-servasjoner	Least square means ± SE	Antall ob-servasjoner
Fort.væske:					
X-cell™	0.93[a]	(0.72 - 1.20)	747	13.4[a] ± 0.3	643
BTS	1.0[a]	-	713	13.5[a] ± 0.3	618
Rånegruppe:					
I	0.99[a]	(0.73 – 1.35)	566	13.4[a] ± 0.2	489
II	0.92[a]	(0.65 – 1.29)	478	13.4[a] ± 0.3	409
III	1.0[a]	-	416	13.6[a] ± 0.3	363
Tidl. ant. kull:					
0	0.75[a]	(0.57 – 0.98)	99	12.2[a] ± 0.4	79
1	1.0[b]	–	378	13.8[b] ± 0.2	313
>1	1.53[c]	(1.24 – 1.88)	983	14.5[c] ± 0.2	869

[a,b,c] De med samme bokstavmerking innen hver parameter er ikke signifikant forskjellig fra hverandre med p-verdi <0,05.

Det er også av stor interesse å sammenligne resultatene etter fortynning med X-cell og kortere lagring med resultatene fra doser fortynnet i BTS. Et nytt forsøk er også gjort i regi av Norsvin der både BTS- og X-cellsæden fortynnes på søndag og

brukes på mandag og tirsdag under tilsvarende betingelser som i forsøket beskrevet ovenfor. Resultatene av disse inseminasjonene ventes å komme inn til statistisk bearbeidelse etter påske, idet purkene i dette forsøket er inseminert mellom mai og november 2004.

Norsvin har imidlertid også eksportert sæddoser fortynnet i X-cell til en stor besetning i USA siden august 2003. Disse dosene er fra forskjellige raser, og både sæd fra enkeltråner og blandetsæd inngår i forsendelsene. Fruktbarhetsresultatene fra de inseminasjonene som er gjort med disse dosene blir også overvåket, idet sæden brukes helt opp til 7 dager etter uttak.

Svært viktig for holdbarheten er temperaturforholdene under transport og lagring. Det ideelle er 16 – 18 °C. I forsøket som er beskrevet, må en gå ut ifra at sæden som ble brukt på femte dagen etter uttak hadde fått tilfredsstillene lagringsforhold. Det er derimot ikke utenkelig at belastningen på spermiene over såpass lang lagringstid vil være større under mindre kontrollerte temperaturbetingelser.

Konklusjon og praktisk betydning

Det ble på bakgrunn av dette forsøket besluttet at Norsvin skulle skifte fortynningsvæske fra BTS til X-cell med virkning fra 13. desember 2004. Normalproduksjonen av rånesæd vil heretter foregå fra mandag til fredag. Sæduttak av råne på søndager blir kun unntaksvis, og da i forbindelse med bevegelige helligdager.

Kunden vil de fleste dager i uka motta sæd med 2 dager lenger holdbarhet enn før omleggingen. Dermed vil ofte alle sæddoser til en pulje med purker kunne sendes i én eneste pakke. Unntaket er for de pakkene som kommer med post, eller fra ett av depotene i Stavanger, Bergen eller Trondheim og er framme hos kunden mandag. I noen tilfeller kan det da lønne seg å utsette avvenningen av purker med et halvt til ett døgn slik at behovet for sæddoser på mandag blir mindre.

Det er fra Norsvins side sterkt understreket at kunden bør sørge for optimal lagringstemperatur i de tilfellene der sæddosene skal lagres helt til siste anbefalte bruksdag. I tillegg er det sannsynlig av tidspunktet for inseminasjon blir enda viktigere i de tilfellene sæddosene er lagret lenge før bruk, fordi spermiene sannsynligvis kan ha en kortere overlevelse inne i purkas kjønnsveier. Sjøl om de aller fleste doser fortsatt vil bli brukt etter kortvarig lagring, vil fruktbarhetsresultatene ute i felt måtte overvåkes nøye etter omleggingen.

Referanser

Haugan T, Reksen O, Gröhn YT, Gaustad AH, Hofmo PO. Effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegiane swine – A retrospective study. Akseptert (2004) for publisering i Theriogenology.

Waterhouse KE, De Angelis PM, Haugan T, Paulenz H, Hofmo PO, Farstad W. Effects of in vitro storage time and extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. Theriogenology 2004;62:1638-51.