

Szczegółowa ocena nasienia

Ricardo Faundez

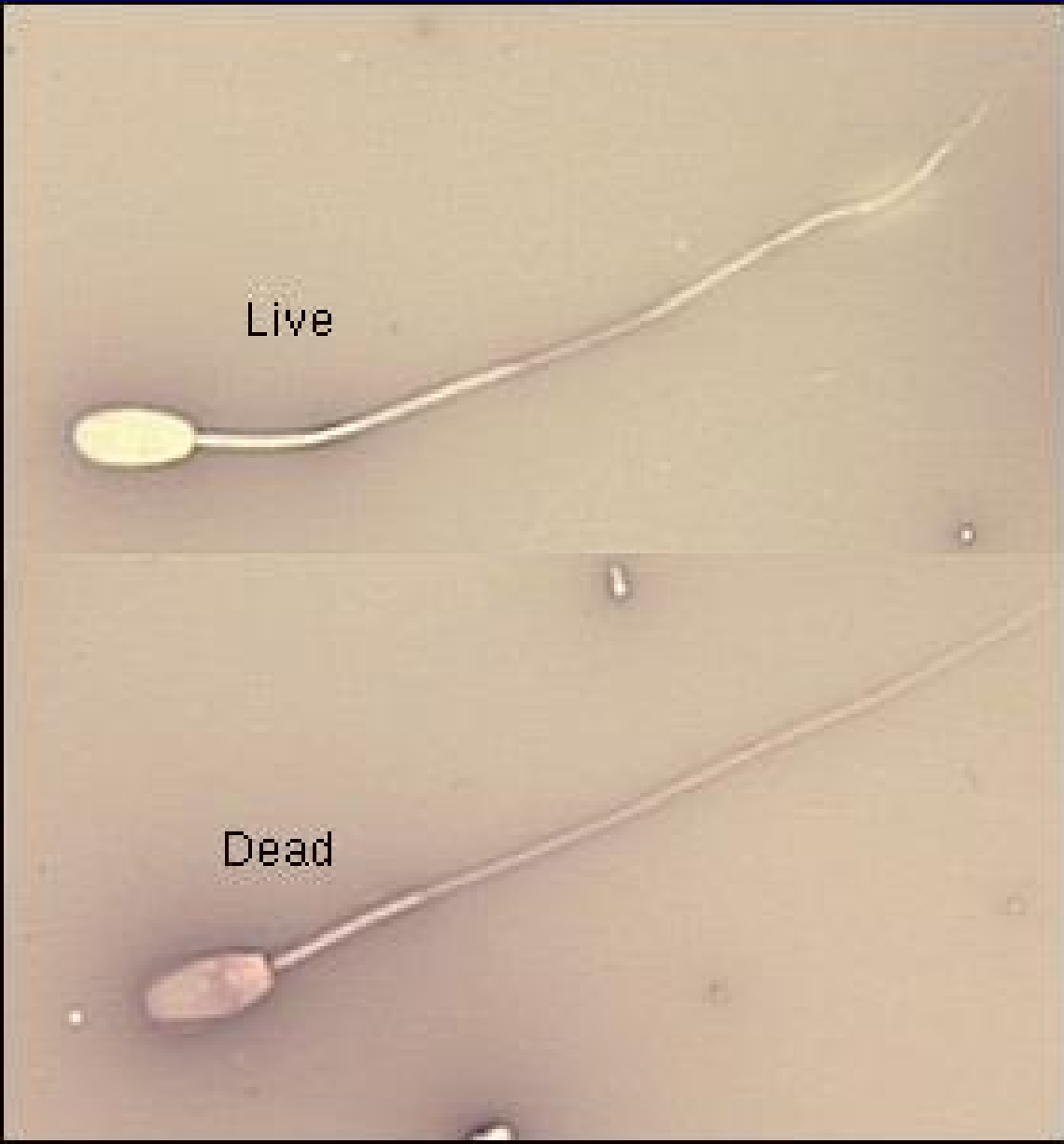
Zakład Rozrodu, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu Zwierząt
Katedra Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

Ocena ruchu plemników

- Materiały: szkiełka podstawowe, nakrywkowe, mikroskop z kontrastem fazowym, blok grzejny, stółk ogrzewczy do mikroskopu, stółk Bloma, bagietki szklane, szkiełka nakrywkowe
- Objętość próbki - 10 μ l
- Powiększenie 100 - 400 x
- Ocena ruchliwości plemników
 - Badana próbkę nasienia ogląda się w warstwie o grubości 5 μ m
 - Ogólny odsetek ruchliwych plemników
 - Odsetek plemników poruszających się ruchem prawidłowym (postępowy i torpedowy) Norma: $\geq 70\%$. Ejakulatory wykazujące $\leq 50\%$ plemników o ruchu postępowym nie nadają się do użycia.

Ocena żywotności plemników

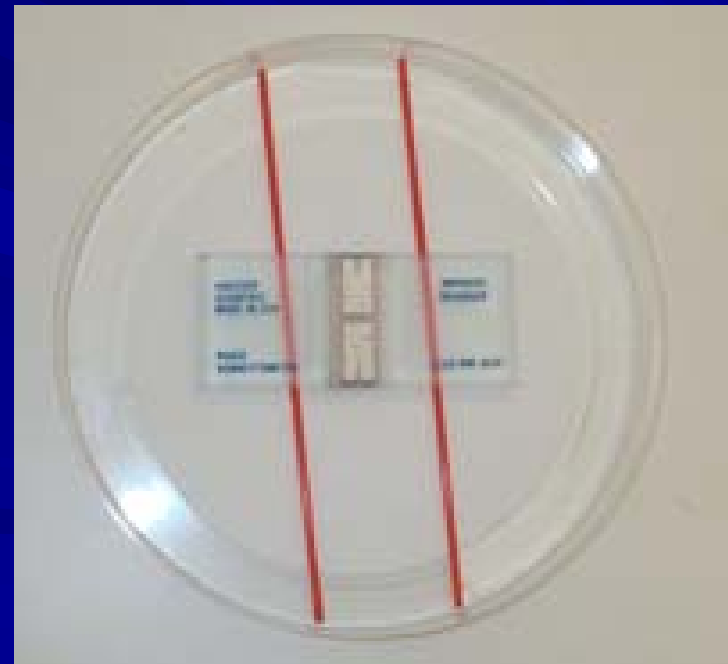
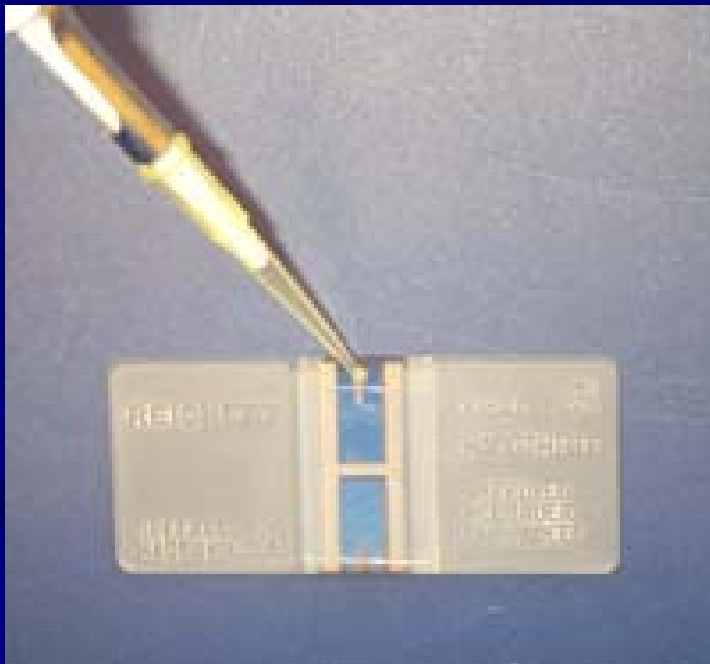
- Barwniki: 5 % eozyny niebieskiej i 10% nigrozyny → 1:4
- 1 kropla nasienia + 2 eozyny i 4 nigrozyny
- Temperatura sporządzenia preparatu wynosi 37-38°C
- Rozmaz – 1 min
- Ocena przy 800 – 1000X – liczymy 100 -200 plemników
- Martwe plemniki – różowe, żywe – nie barwione
- Norma: > 75% żywych plemników



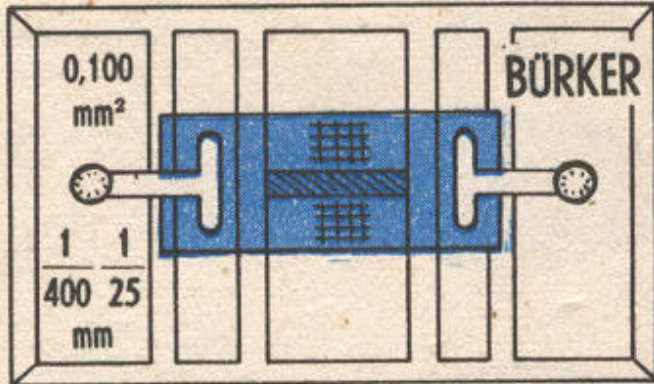
Badanie koncentracji plemników

Metoda cytometryczna wg Bielańskiego

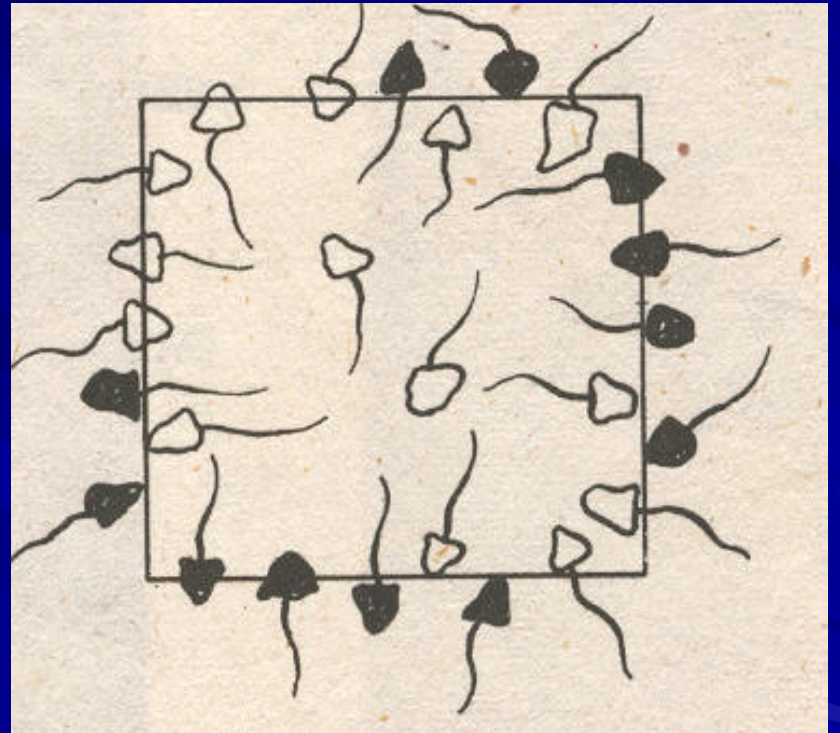
- Materiały: mikroskop z kontrastem fazowym, hemocytometr Bürker'a, szkiełka nakrywkowe, pipety o pojemności 0,1, 1,0 i 20,0 ml, probówki o pojemności 25 ml, roztwór immobilizujący plemników: 3 % NaCl
- 2 x 0,1 ml nasienia dodać 20 ml 3% roztworu NaCl → 1:200
- 10 μ l zawiesiny do komory Bürker'a
- Oglądanie pod 400-krotnym powiększeniem
- Średnia liczba plemników w 1 dużym kwadracie mnoży się przez 50.000 → liczba plemników w 1 mm^3



BÜRKER



			$\frac{1}{16}$
	$\frac{1}{25}$		
1			
400			



Koncentracja plemników nasienia buhaja

- Do wykorzystania nadają się ejakulatory, wykazujące koncentrację $>0,5 \times 10^6/\text{mm}^3$ ($500 \times 10^6/\text{ml}$)
- Ejakulatory o gęstości $\leq 0,5 \times 10^6/\text{mm}^3$ mogą być wykorzystywane tylko w uzasadnionych, wyjątkowych przypadkach
- Ejakulatory o koncentracji wynoszącej $\leq 0,4 \times 10^6/\text{mm}^3$ nie nadają się do użycia

Morfologia plemników

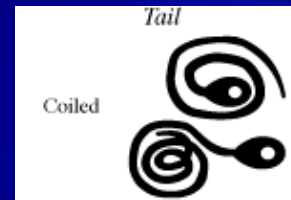
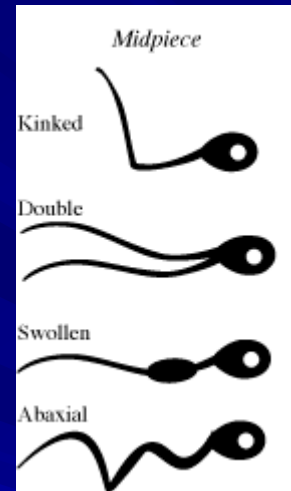
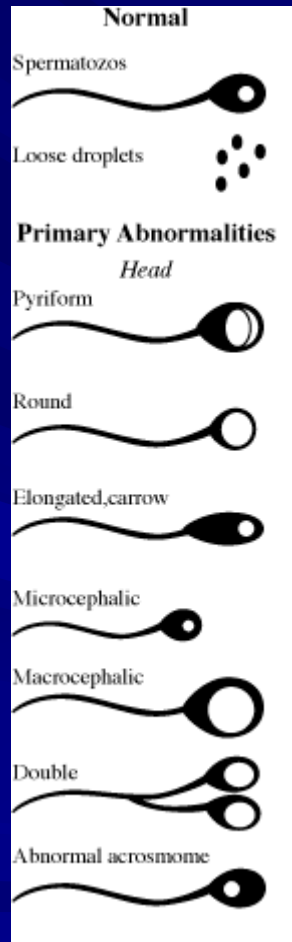
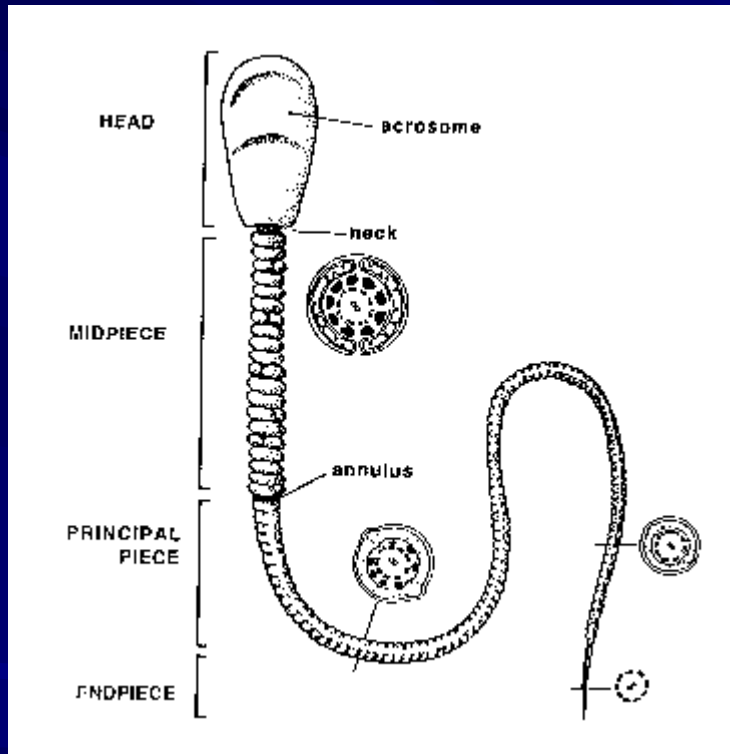
Badanie morfologii plemników

Metody barwienia preparatów

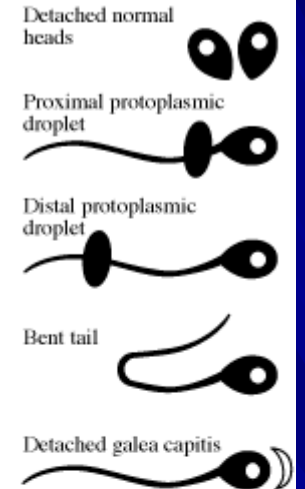
- Barwienie eozyną i nigrozyną
- Barwienie negatywowe
 - Tusz chiński lub tusz wg Burriego z dodatkiem 1 % fenolu
- Barwienie fioletem goryczki (bydgoska)
 - 1 % wodny roztwór eozyny niebieskiej i barwnik gencjanowy (fiolet goryczki 0,75 g, błękit metylenowy 2,0 g, glicerol 5 ml oraz woda destylowana do 100 ml)
 - Rozmaz nasienia utrwala się 96% alkoholem przez 5 min i barwimy eozyną przez 20-60 sekund płuczemy wodą następnie zanurzamy preparat do barwnika gencjanowego przez 15 sekund do 3 minut, wypłukać wodą i wysuszyć

Ocena morfologiczna nasienia buhaja wg Bloma

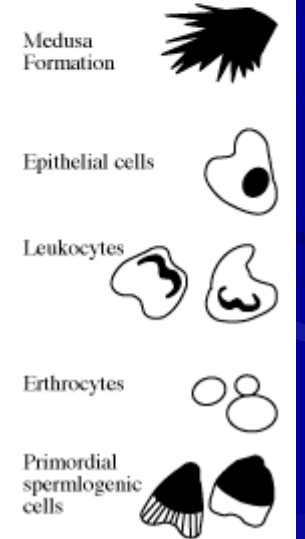
- **Wady główne:** wszystkie typy wad plemników, które są skorelowane z obniżoną płodnością
- **Wady podrzędne:** inne odchylenia w budowie plemników, które mają mniejsze znaczenia
 - Wynik badania powinien być wyrażony procentem plemników wykazujących wady główne oraz oddzielnie procentem plemników z wadami podrzędnymi z równoczesnym zaznaczeniem charakteru szczegółowej wady dominującej



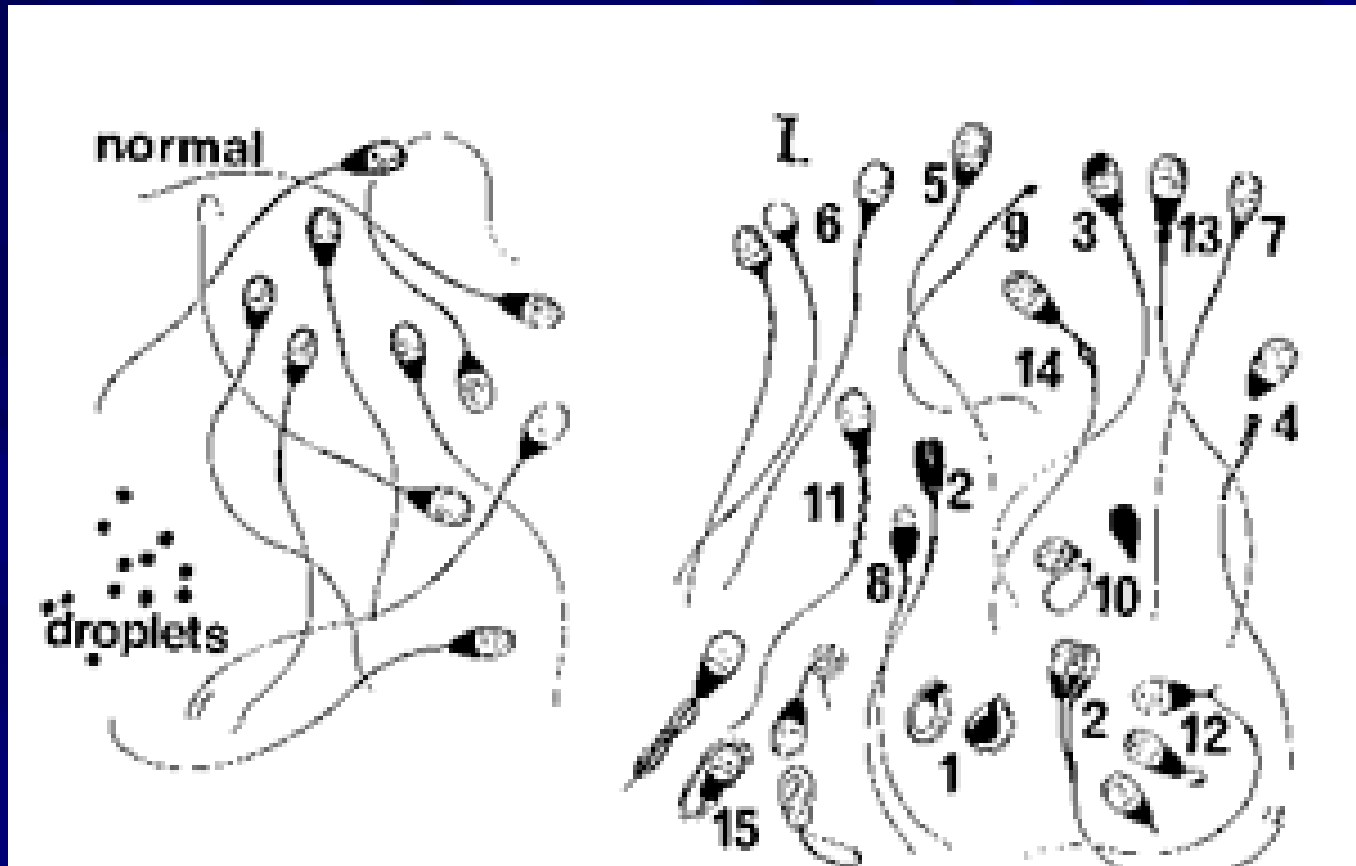
Secondary Abnormalities



Other Cells Occuring in Semen



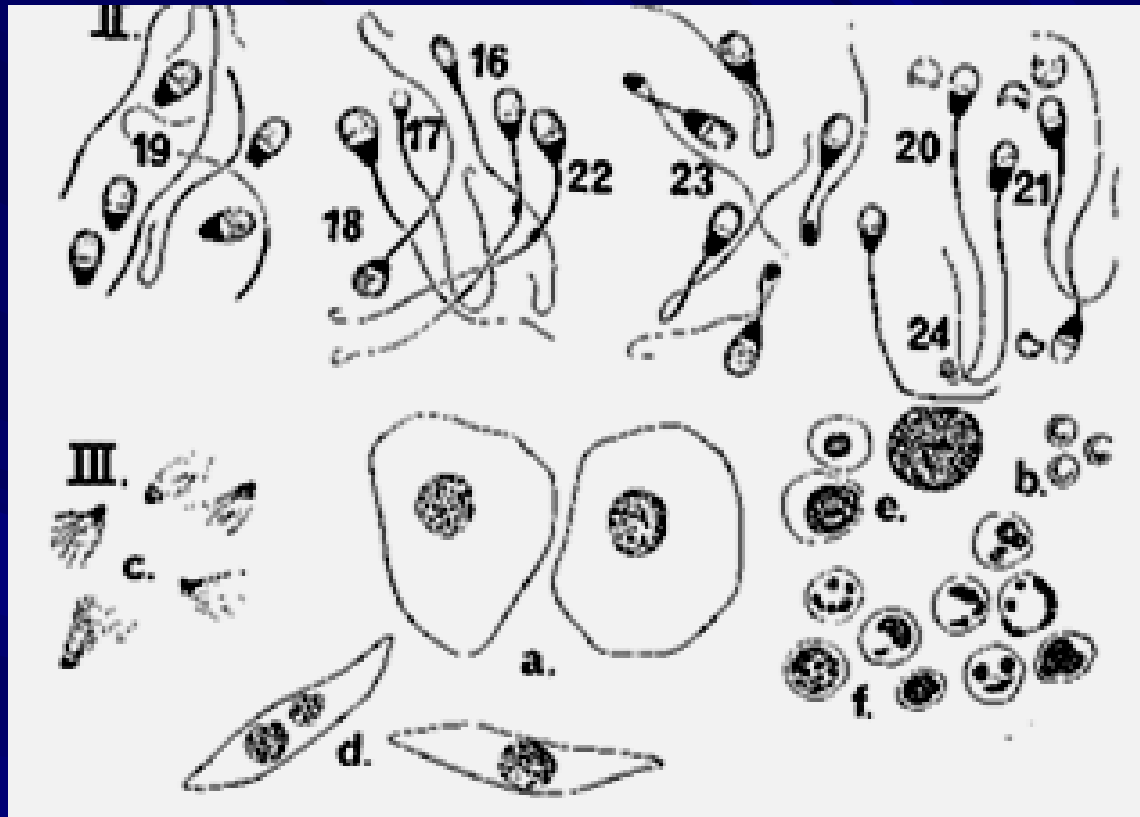
Wady główne (Blom 1982)



- I. 1. Plemniki nedorozwinięty
- I. 2. Plemniki podwójny
- I. 3. Plemniki guzowaty (defekt akrosomu)
- I. 4. Plemniki bezgłowy
- I. 5. Plemniki z diademem główki
- I. 6. Plemniki z główką gruszkowatą
- I. 7. Plemniki z główką zwężoną u podstawy
- I. 8. Plemniki z główką o nieprawidłowym (zatartym) konturze

- I. 9. Plemniki z główką małą i nieprawidłową
- I. 10. Główki luźne, nieprawidłowe
- I. 11. Plemniki z wstawką w kształcie korkociągu
- I. 12. Plemniki z inną wadą wstawki (wstawka kikutowata)
- I. 13. Plemniki z bliższą (proksymalną) kropką wstawki
- I. 14. Plemniki z niby-kropką wstawki
- I. 15. Plemniki z silnie zapętloną wijką (wada Daga)

Wady podrzędne i inne elementy (Blom 1982)

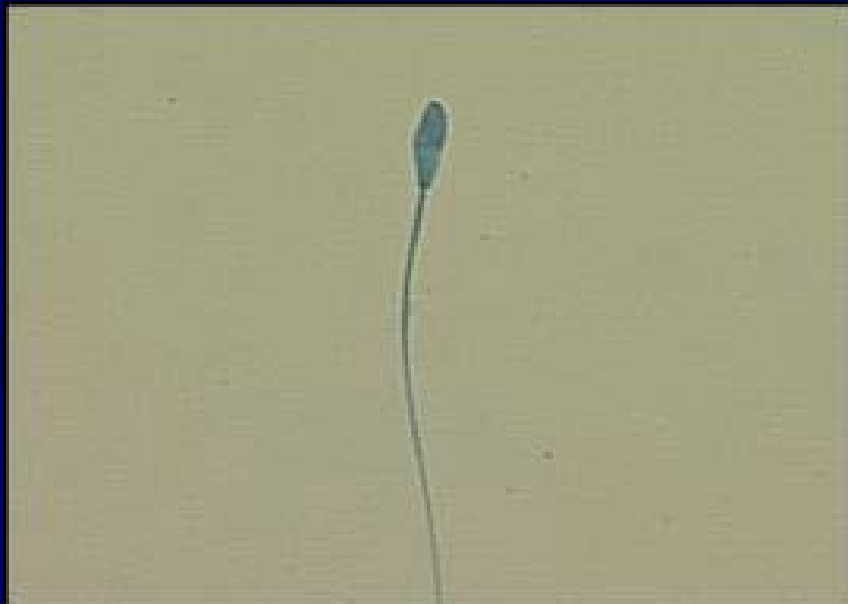


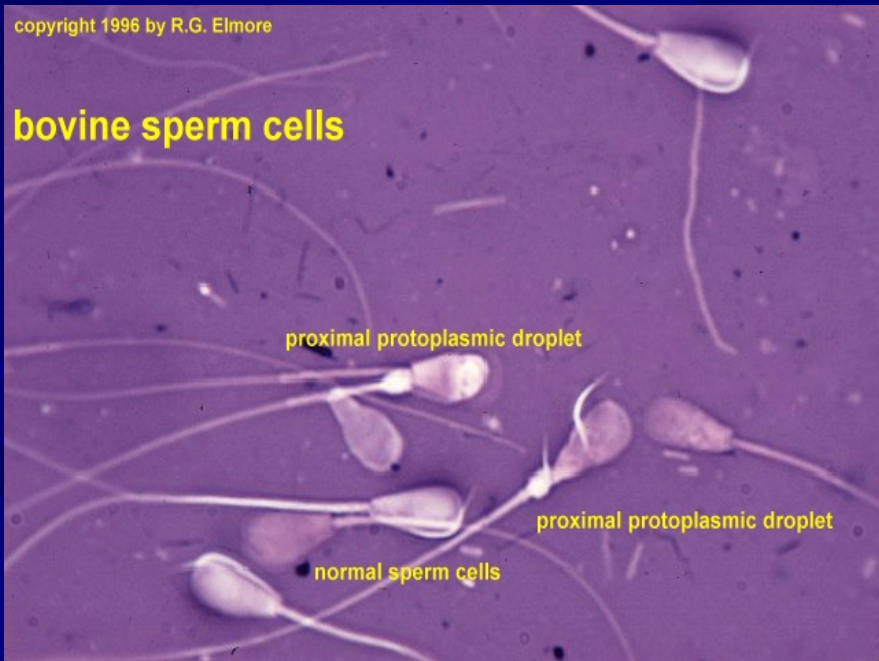
II. Wady podrzędne (16 — 24)

- II. 16. Plemniki z główką zwężoną
- II. 17. Plemniki z główką matą i normalną
- II. 18. Plemniki z główką szeroką i olbrzymią
- II. 19. Główka luźna, normalna
- II. 20. Plemniki z oddzielną błoną akrosomu
- II. 21. Plemniki z główką odosiową (abaksjalną)
- II. 22. Plemniki z dalszą (distalną) kropką wstawki
- II. 23. Plemniki z pojedynczą pętlą witki
- II. 24. Plemniki z pętlą na końcu witki

III. Inne elementy (a — f)

- III. a. komórki nabłonkowe
- III. b. erytrocyty
- III. c. formy meduzowate
- III. d. komórki wrzecionowate
- III. e. komórki kuliste
- III. f. ciątka ropne





bovine sperm cells

distal protoplasmic droplet

copyright 1996 by R. G. Elmore

bovine sperm cells

proximal protoplasmic droplet

copyright 1996 by R. G. Elmore

bovine sperm cells

proximal droplet

copyright 1996 by R. G. Elmore

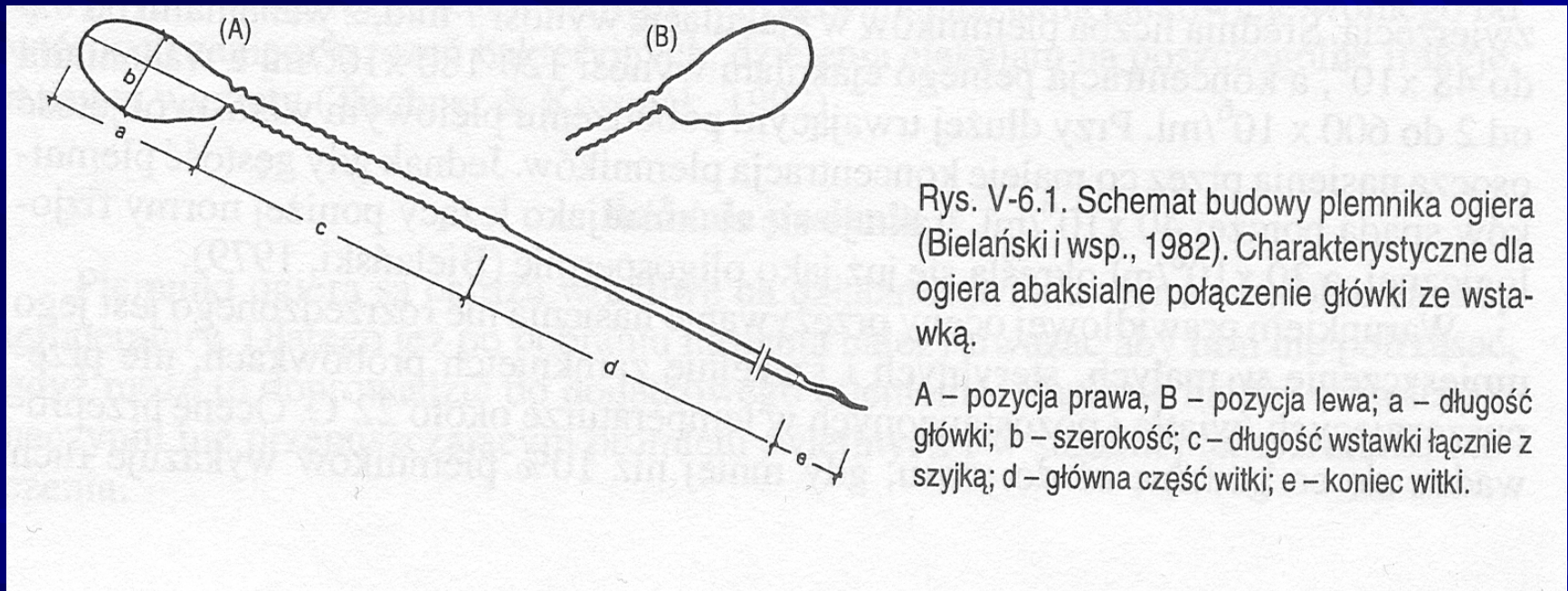
spheroids (spermatogenic epithelial cells)

copyright 1996 by R.G. Elmore

Ocena morfologiczna nasienia buhaja wg Bloma

- W nasieniu zdrowego i płodnego buhaja odsetek plemników z wadami głównymi nie powinien przekraczać 15% w tym plemników z wadą dominującą do 5%
- Procent plemników z wadami podrzędnymi nie powinien przekraczać 25%, w tym z wadą dominującą do 15%
- Jeśli podane parametry zostaną przekroczone wówczas należy po upływie 2-4 tygodni powtórzyć badanie

Ocena morfologiczna plemników ogiera



Ocena morfologiczna plemników ogiera

Bielański i wsp. 1982

No.	Forma	Opis
N		plemnik normalny w pozycji prawej
N		plemnik normalny w pozycji lewej
1		kropla dalsza wstawki
2		kropla bliższa wstawki
3		niby kropla wstawki
4		pojedyncza pętla witki
5		podwójna pętla witki
6		pętla na końcu witki
7		spiralna witka
8		pętla ułożona wokół główki
9		luźne główki
10		złamana witka

11		podwójny akrosom (obrzętkły)
12		plemnik bez akrosomu
13		plemnik zlepiony dwugłowy
14		plemniki zespolone na całej powierzchni
15		karłowata główka
16		główka olbrzymia
17		główka gruszkowata
18		główka biskoptowata
19		wstawka cienka
20		wstawka z rozszczepionymi włóknkami lub mitochondriami
21		niedorozwinięty plemnik

Ocena morfologiczna plemników ogiera

- Ogiery o normalnej płodności posiadają ponad 85 % plemników o prawidłowej budowie i < 10 % plemników z kroplą cytoplazmatyczną, < 3 % ze zawiniętą witką, < 3 % pozbawionych witki (luźne główki), a pozostałe zmiany morfologiczne nie przekraczają < 1%.

Ocena szczegółowa nasienia ogiera

- Ruchliwość: 70 - 80 % (5 min po pobraniu)
 - Korelacja pomiędzy ruchliwością a wynikami urodzeń
- Koncentracja plemników zależna od częstotliwości pobrań, pory roku i cech indywidualnych zwierzęcia. Koncentracja pełnego ejakulatu wynosi 120 – 180 x 10⁶/ml z wahaniami od 2 do 600 x 10⁶/ml. Norma 40 x 10⁶/ml
- Żywotność – Norma > 70% żywych plemników. Plemniki płodnych ogierów przeżywają ok. 6 godz. w temperaturze 22°C .

Ocena szczegółowa nasienia knura

- Ruch plemników: $> 50\%$
- Koncentracja i ogólna liczba plemników
 - 150×10^6 – $600 \times 10^6/\text{ml}$. W przypadku knurów rasy duroc, hampshire i yorkshire ejakulatory z koncentracją niższą od $200 \times 10^6/\text{ml}$ powinny być dyskwalifikowane
- Morfologia: ilość plemników ze zmianami pierwotnymi nie może przekraczać 5% , a ze zmianami podrzędnymi - 10%

Ocena szczegółowa nasienia psa

- Koncentracja plemników: $100 - 500 \times 10^6/\text{ml}$ (bez III frakcji). Psy wykazujące normalną płodność średnio $36 - 630 \times 10^6$ plemników w ejakulacie. Może wahać się pomiędzy $100 - 5000 \times 10^6$ plemników w ejakulacie w zależności od wielkości psa
- Ruch postępowy prawidłowy $> 70\%$
- Morfologia: $> 40\%$ plemników o prawidłowej budowie

Ocena szczegółowa nasienia kocura

■ Całkowita liczba plemników w ejakulacie

– Sztuczna pochwa

■ Średnia - $57 - 61 \times 10^6$ (zakres $3 - 117 \times 10^6$)

– Elektroejakulacja

■ Średnia - $12 - 30 \times 10^6$ ($9 - 153 \times 10^6$)

■ Morfologia

– 40 % - 90% prawidłowych plemników

■ Ruchliwość

– 50% to 80%

■ pH 6.6 - 8.8

Ocena szczegółowa nasienia kocura

■ Objętość ejakulatu:

– Sztuczna pochwa

■ Średnia - 0.04 ml (0.01 - 0.12)

– Elektroejakulacja

■ Średnia - 0.08 to 0.22 ml (0.02 - 0.74 ml)

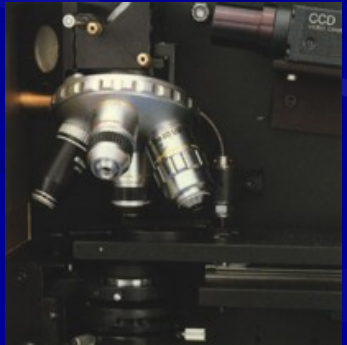
■ Koncentracja:

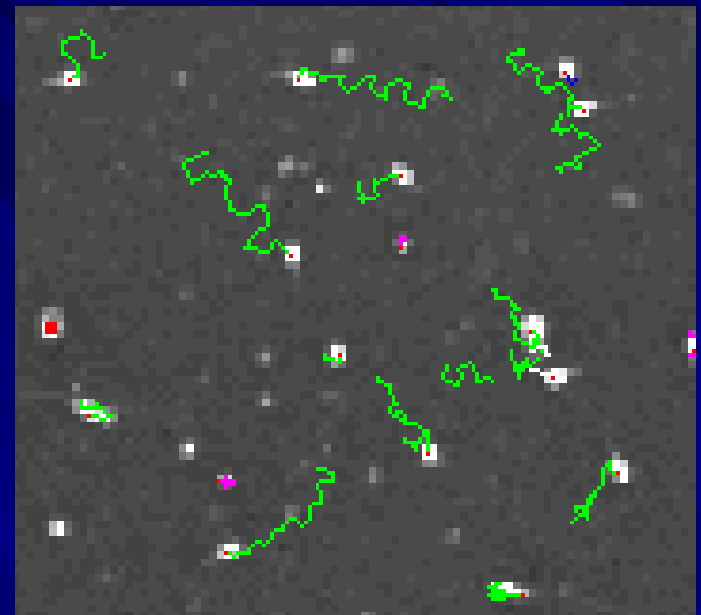
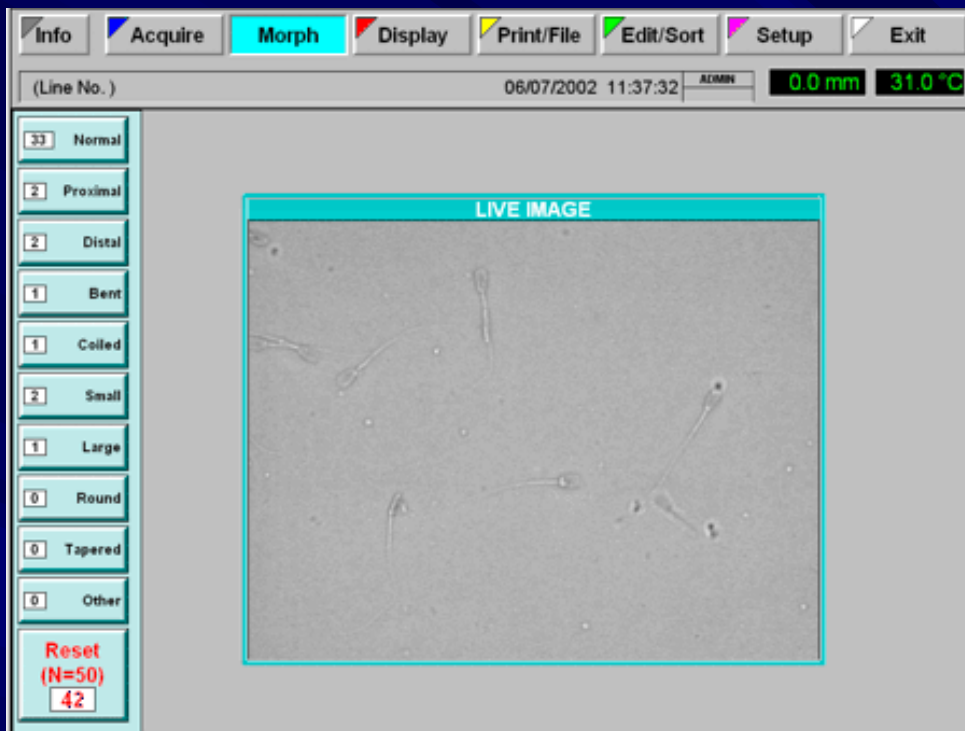
– Sztuczna pochwa

■ Średnia 1700×10^6 /ml (zakres $96 - 5100 \times 10^6$ /ml)

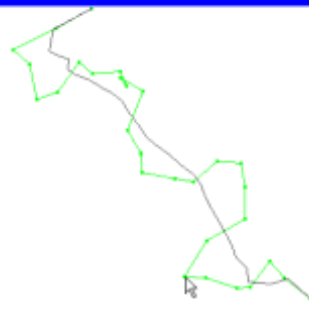
– Elektroejakulacja -

■ Średnia - $168 - 361 \times 10^6$ /ml





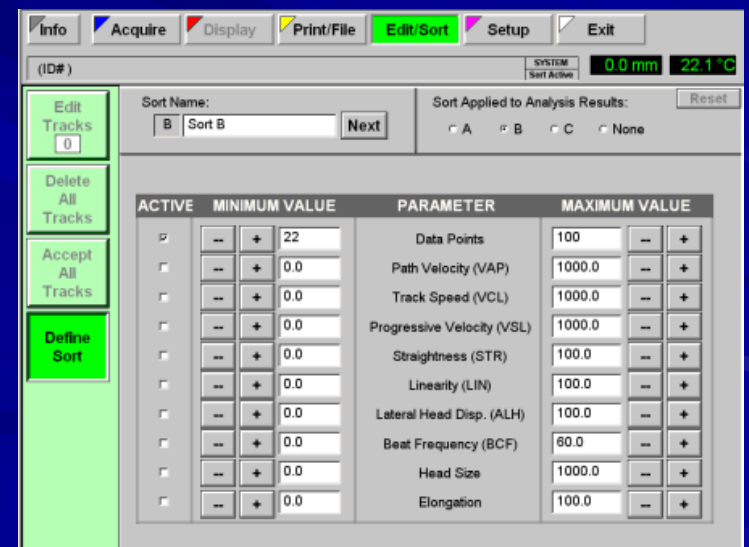
TRACK No. 16							
Parameter	Value	#	X	Y	#	X	Y
Type	Rapid	1)	261.2	81.5	16)	246.9	69.3
VAP	79.7 $\mu\text{m/s}$	2)	259.0	79.7	17)	246.9	69.2
VCL	138.7 $\mu\text{m/s}$	3)	257.8	78.3	18)	245.8	67.3
VSL	63.2 $\mu\text{m/s}$	4)	256.2	80.5	19)	247.1	64.0
STR	79 %	5)	255.0	80.6	20)	245.2	62.9
LIN	46 %	6)	252.4	79.8	21)	245.7	63.6
ALH	9.7 μm	7)	250.6	79.7	22)	245.2	62.3
BCF	13.3 Hz	8)	252.5	76.6	23)	242.9	62.5
Elongation	66 %	9)	255.7	74.8	24)	241.7	61.6
Head Area	3.6 $\mu\text{m sq}$	10)	255.7	72.1	25)	239.9	64.0
Head Size	5.0 Pixels	11)	255.4	70.1	26)	238.2	64.6
Intensity	171.5	12)	253.4	69.9	27)	237.6	61.7
Points	30	13)	251.4	71.6	28)	236.2	60.5
		14)	249.8	71.4	29)	239.8	58.7
		15)	247.0	70.8	30)	242.8	57.0
Sorts							
Hyperactivated	Pass						
Sort B	Pass						
16pts	Pass						



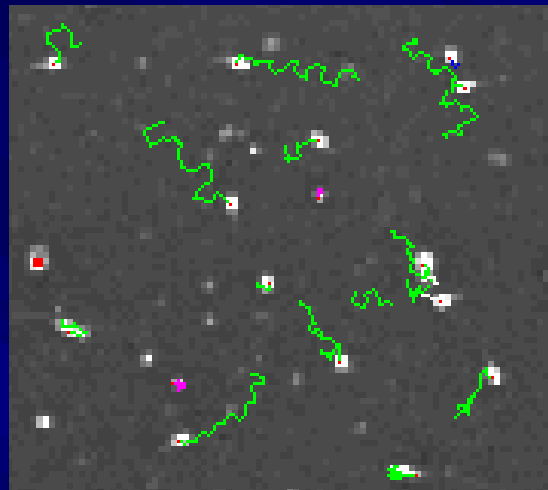
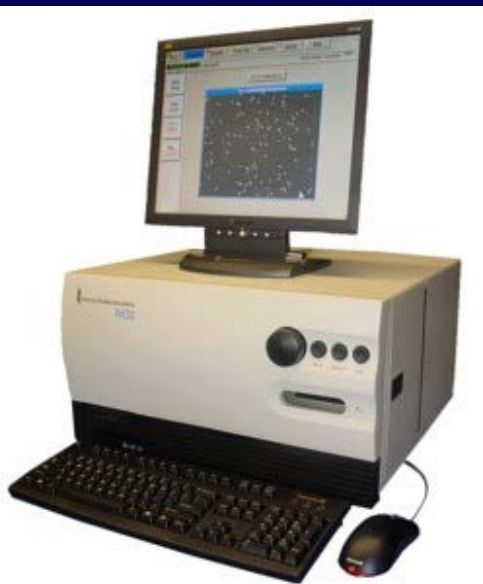
X=250.7 Y=79.7 I=1

Delete Accept Print

ACCEPTED



Komputerowe badanie nasienia (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA)



Liczba :

Ogólna, ruchliwych plemników, plemników o ruchliwości postępowej, % ruchliwych plemników, % plemników o ruchliwości postępowej szybkiej, średniej, wolnej. Liczba komórek nieruchliwych

Koncentracja:

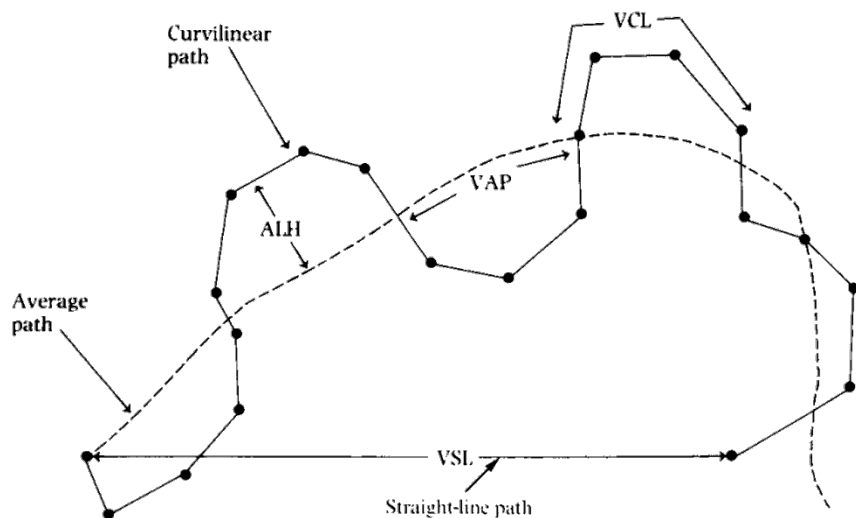
Ogólna, ruchliwych plemników, plemników o ruchliwości postępowej (milion/ml) szybkiej, średniej, wolnej oraz komórek nieruchliwych (milion/ml)

Średni wartości:

VAP: Średnia szybkość (mikron/sec)
VCL: Szybkość kątowna (mikron/sec)
VSL: Szybkość prostolinijna (mikron/sec)
ALH: Amplituda ruchu bocznego główki (mikron)
BCF: Częstotliwość bicia winki (hertz)
LIN: Linearność (VSL/VCL)
STR: Prostoliniowość (VSL/VAP)
Wydłużenie: kształt główki (stosunek mniejszej osi do większej osi główki plemnika)
Obszar główki (mikron^2)

Wykresy słupkowe:

VAP, VCL, VSL, wydłużenie, ALH, BCF, LIN, STR



Results
1

Play Back
1

QC Plots
1

Bar Charts
1

Custom Reports
1

COUNT SUMMARY

Category	Cells Counted	Sample (Billion)	Concentration (Billion/ml)	Percent
Total	456	183.17	0.674	100
Motile	426	171.12	0.630	93
Progressive	349	140.19	0.516	77

RESULTS

Parameter	Value	Units	Morph
Total Sperm/Dose	3.00	Billion	
Extend Ejaculate to	2878.59	ml	
Total # Doses Per Ejaculate	35		

MORPHOLOGY

Category	Value	Accepted	Category	Value	Accepted
Normal	77.00 %	>= 75 %	Small Head	4.00 %	<= 10 %
Proximal	8.00 %	<= 10 %	Large Head	3.00 %	<= 10 %
Distal	5.00 %	<= 10 %	Round Head	0.00 %	<= 10 %
Bent	1.00 %	<= 10 %	Tapered Head	0.00 %	<= 10 %
Coiled	2.00 %	<= 10 %	Other	0.00 %	<= 10 %
			TOTAL	100	>= 100

KEY	CODE	CATEGORY	ACCEPTED VALUE
F1:	Normal	Normal	>= 75 % -- +
F2:	Proximal	Proximal	<= 10 % -- +
F3:	Distal	Distal	<= 10 % -- +
F4:	Bent	Bent	<= 10 % -- +
F5:	Coiled	Coiled	<= 10 % -- +
F6:	Small	Small Head	<= 10 % -- +
F7:	Large	Large Head	<= 10 % -- +
F8:	Round	Round Head	<= 10 % -- +
F9:	Tapered	Tapered Head	<= 10 % -- +
F10:	Other	Other	<= 10 % -- +

Minimum Number to Count 50 -- +

COUNT SUMMARY

Category	Cells Counted	Sample (M)	Concentration (M/ml)	Percent
Total	540	121.1	30.3	100
Motile	376	84.4	21.1	70
Progressive	136	30.5	7.6	25

