**Vliv přípravy vzorku na výsledky hodnocení motility spermií býků po rozmrazení pomocí počítačem řízené analýzy motility (CASA)**

**Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa**

Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carlucio A. (2010). *Theriogenology*. 74: 424-435

**klíčová slova:** býk, kryokonzervované spermie, motilita, CASA

**dostupné z:** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20451996

Počítačem řízená analýza spermií (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA) se díky vyšší míře objektivity a možnosti vyhodnocení tisíců trajektorií v jeden okamžik postupně stává standardem pro hodnocení motility spermií a jejich kinetických parametrů. Nicméně před uvedením tohoto systému do praktického provozu či výzkumných laboratoří je nezbytné řádně nastavit jednotlivé kroky přípravy vzorku před měřením. V této studii byly hodnoceny vlivy různých nastavení systému CASA a postupů přípravy vzorku pro stanovení motility spermií býků a jejich kinetických parametrů po rozmrazení, a to: I) počet snímků, které je schopna kamera nasnímat za sekundu, II) počet snímků pořízených na jedno snímané pole, III) postup rozmrazení vzorku, IV) koncentrace spermií ve vzorku, V) použitá komůrka a čas analýzy, a VI) použité médium pro ředění vzorku. Ve studii byl použit systém CASA od firmy Hamilton Thorne s označením IVOS 12.3.

V prvním experimentu byl při porovnávání kamery s frekvencí 60 a 30 snímků za sekundu prokázán signifikantní vliv rychlosti. Při hodnocení možného vlivu počtu snímků 30 *vs.* 45pořízených na jedno snímané pole nebyl efekt prokázán. V třetím experimentu byl potvrzen vliv teploty při rozmrazování vzorku na výsledky analýzy ve prospěch standardního postupu 37°C/1 minutu navíc bez rozdílu v porovnání s použitím teploty 70°C/5 s. Ve čtvrtém experimentu byl prokázán významný vliv koncentrace spermií vzorku. Kdy koncentrace 100 x 106 a 50 x 106 spermií/ml značně omezují detekci spermií programem a vedou ke snížení objektivnosti a pravdivosti výsledků. Naopak koncentrace 5; 10; 20 a 30 x 106 spermií/ml jsou pro rozpoznání spermií softwarem optimální, ale byly zde detekovány rozdíly ve výsledcích. Médium použité pro úpravu koncentrace spermií mělo rovněž signifikantní vliv na výsledky motility spermií. Vliv použité komůrky na výsledky motility spermií byl posuzován mezi dvěma nejrozšířenějšími typy a to Makler a Leja a tento vliv byl prokázán jako signifikantní. Čas analýzy motility spermií (od napipetování vzorku po ukončení snímání) měl rovněž významný vliv na výsledky.

Na základě výsledků této studie mohou být pro použitý systém Hamilton Thorne IVOS verze 12.3. stanoveny parametry nastavení systému a specifikace pre-analytické části pro hodnocení motility spermií býků po rozmrazení. Z hlediska snímkování je možno použít kamery s 30 a 60 snímky za sekundu. Koncentrace spermií ve vzorku musí být upravena optimálně pomocí fosfátového pufru (PBS), jako standardně široce používaného média na minimálně 20 x 106 spermií/ml. Co se týče použité komůrky tak autoři i přes časově náročnější přípravu doporučují komůrku typu Makler a dobu analýzy nepřekračující 1 – 2 minuty.

**Zpracoval:** Ing. Ondřej Šimoník, Česká zemědělská univerzita v Praze, simoniko@af.czu.cz