

Tecnologie innovative nella riproduzione bovina e suina per una nuova redditività dell'allevamento lombardo: azioni informative e dimostrative

NEW4REP

**Tecnologie, caratteristiche e potenzialità del seme suino congelato e
refrigerato nella gestione aziendale**



Questo manuale divulgativo è stato pensato affinché gli allevatori possano facilmente raggiungere una maggiore autonomia sulle pratiche di gestione e monitoraggio del proprio centro verri aziendale. Il lettore verrà accompagnato nella descrizione illustrata di alcune semplici ed immediate soluzioni che hanno lo scopo di facilitare le operazioni quotidiane nel rispetto della qualità e dell'igiene del prodotto finale.

A cura di:

Valeria Bornaghi

Istituto Sperimentale Italiano "L.Spallanzani"



PSR LOMBARDIA
L'INNOVAZIONE
METTE RADICI
2014 2020



INDICE

I vantaggi dell'inseminazione artificiale	3
La scelta del verro	4
Il benessere	4
L'addestramento al salto	6
La sala monta	7
Il laboratorio	8
Il processo produttivo	10
L'analisi seminale	15
La preparazione delle dosi inseminanti	23
Le tecniche di inseminazione strumentale nella scrofa	23
Le modalità di calcolo delle dosi	25
Confezionamento, raffreddamento e conservazione	26
Il monitoraggio qualitativo delle dosi	26
Riassumendo il processo	27
Il seme congelato	27
La gestione dei dati	35
La gestione dell'azoto liquido e la sicurezza dell'operatore	36

I Vantaggi dell'inseminazione artificiale



<p>Sanitario</p> <p>Diminuzione dell'introduzione di nuovi soggetti in allevamento. Controllo delle patologie sessualmente trasmissibili. Monitoraggio continuo delle condizioni dell'apparato genitale delle femmine.</p>	<p>Pieno controllo della gestione riproduttiva dell'allevamento</p> <p>Per valorizzare questo punto è necessario prevedere una accurata registrazione dei dati, presupposto per una loro analisi finalizzata al monitoraggio delle statistiche di allevamento. Possibilità di definire OBIETTIVI il cui raggiungimento sia valutabile oggettivamente.</p>
<p>Eliminazione dei rischi di trasmissione di patologie legate alla sfera riproduttiva</p> <p>I verri non vengono utilizzati in monta naturale e non rappresentano un veicolo di diffusione di patologie della sfera sessuale, sempreché la IA venga gestita con la massima igiene.</p>	<p>Riduzione del numero di verri presenti in allevamento</p> <p>Minor numero di verri utilizzati come riproduttori (centro verri aziendale) con conseguente:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Riduzione dei costi legati al mantenimento. ➤ Riduzione della manodopera generale.
<p>Diffusione dei geni migliori nella popolazione femminile</p> <p>Per ottimizzare il guadagno genetico è necessario limitare il numero di verri utilizzati, cosa possibile aumentando il numero di scrofe inseminabili per verro. E' necessario diminuire il numero di spermatozoi per dose e il numero di inseminazioni utilizzate.</p> <p>OBIETTIVO --> singola inseminazione a ridotto numero di spermatozoi</p>	<p>Vantaggio economico</p> <p>Si concretizza nella riduzione dei costi legati al mantenimento dei verri per la riproduzione, consentendo di ottenere un numero maggiore di dosi per eiaculato, un costo per dose inferiore ed una riduzione della manodopera generale, oltre che una diffusione più mirata e rapida delle caratteristiche genetiche ricercate.</p>

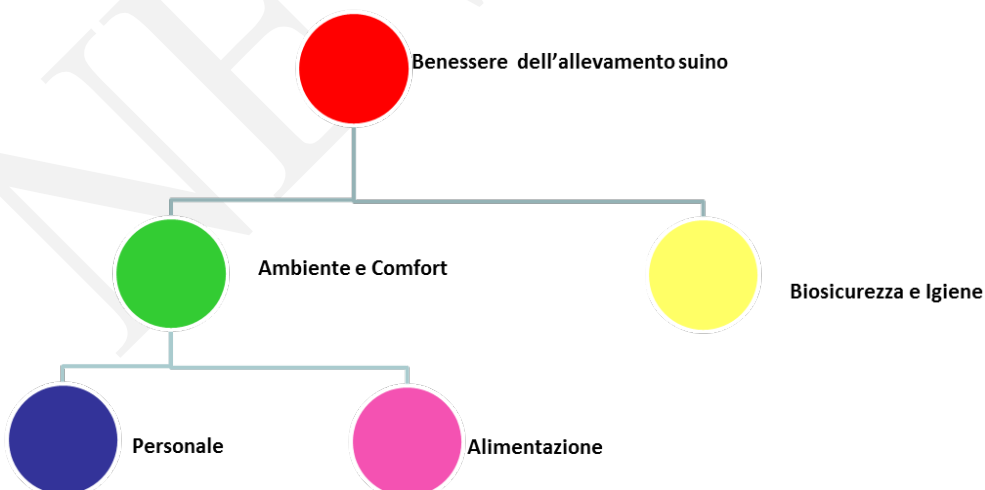
La scelta del verro

- Figlio di riproduttori iscritti al libro genealogico (linee pure) o iscritti all'albo nazionale (ibridi)
- Soddisfare le esigenze morfo-funzionali in funzione della tipologia di allevamento
- Tipo genetico scelto in funzione della produzione che si vuole ottenere
- Correttezza delle linee mammarie e il numero di capezzoli (per produrre scrofe da rimonta)
- Robustezza degli arti e correttezza degli appiombi
- Apparato riproduttivo privo di anomalie

Il benessere

Il grado di benessere animale è proporzionale al livello di adattamento che gli animali hanno per l'ambiente circostante. Il mancato adattamento potrebbe procurare sofferenza e stress nell'animale andando ad incidere negativamente sugli equilibri e sulle prestazioni produttive e riproduttive.

Direttiva 2008/120/Ce
D. Lgs 7 luglio 2011 N°122 (recepimento Italia)





Ambiente e Comfort

- Box di allevamento:
 - a) Singolo.
 - b) Superficie libera al suolo di almeno 6 mq
 - c) Pavimento non sdruciolevole.
 - d) Temperatura controllata 14-18°C.
 - e) Ben illuminato e ventilato.
 - f) Arricchimenti ambientali (materiale manipolabile come paglia tronco di legno e palle da gioco).
 - g) Sistemati e costruiti in modo da permettere all'animale di girarsi e di avere il contatto uditivo, olfattivo e visivo con gli altri suini.



Alimentazione

- Favorire un buon accrescimento scheletrico e muscolare per evitare difetti agli arti (compromissione capacità di monta e debolezza delle ossa).
- Razione di mantenimento a copertura dei fabbisogni.
- Evitare l'ingrassamento (ripercussioni negative sulla libido e produzione spermatica con diminuzione della fertilità).



Biosicurezza e Igiene

- **Corretta gestione della movimentazione degli animali in entrata e uscita** dall'allevamento e la corretta gestione del periodo di quarantena risultano fondamentali al fine della corretta gestione della Biosicurezza dell'allevamento. A tal proposito i riproduttori, se non provengono dal reparto di selezione dell'allevamento ma vengono acquistati dall'esterno, dovranno alloggiare in un apposito ricovero, pulito e disinfettato lontano e del tutto indipendente dall'allevamento per un periodo di almeno 30-40 giorni.
- **Adeguate misure per la gestione degli accessi in allevamento** (mezzi, indumenti, calzari) attrezzando ad esempio gli accessi in allevamento con una zona "*spogliatoio*" realizzata in modo che chi entra in allevamento si trovi costretto ad indossare abiti da lavoro puliti o dispositivi monouso come calzari e camici che risultano fondamentali per un'opera di contenimento.
- **Adeguate pulizia e disinfezione dei locali e delle attrezzature** indispensabile sia nei box di allevamento che in tutti i locali utilizzati come sala monta e laboratorio, allo scopo di abbattere la carica batterica con conseguente riduzione dell'uso degli antibiotici e prevenire l'insorgenza di malattie.



Il personale

Dovrà:

- Essere in numero adeguato.
- Avere conoscenze e competenze professionali specifiche acquisite anche tramite la formazione continua.
- Trattare il verro con calma e tranquillità per evitare:
 - a) stati di irritazione e di panico nell'animale che potrebbero determinare una riduzione dell'efficienza riproduttiva.
 - b) le sessioni di allenamento al salto non devono mai essere associate a eventi spiacevoli (percosse, situazioni di stress) o a comportamenti ostili dell'operatore durante il salto con conseguente rifiuto alla monta e maggiore aggressività.

Il personale che si occupa degli animali svolge un ruolo fondamentale nell'attività, infatti una buona gestione dell'allevamento può essere ottenuta solo quando tra uomo e animale si instaura un vero e proprio *feeling*.

L'addetto deve essere in grado di interpretare le reazioni individuali degli animali per valutare poi il comportamento corretto da adottare evitando qualsiasi manifestazione di aggressività nei suoi confronti. Non si deve dimenticare che uno scorretto atteggiamento dell'operatore nei confronti dell'animale può ridurre in modo significativo la sua produttività a discapito della fertilità e del benessere dell'animale stesso.

Pertanto avere personale competente e professionale con specifiche conoscenze acquisite tramite la formazione continua o seguendo indicazioni di base può fare la differenza.

L' addestramento al salto

- Maturità sessuale raggiunta al 5°-6° mese
- Inizio addestramento 7°-8° mese
- Frequenza di salto:
 - 1 prelievo/settimana fino 12-15 mesi
 - 2-3 prelievi/settimana dopo i 12-15 mesi
- Riposo tra i salti:
 - circa 36 ore o più in funzione dell'età
 - non superiore ai 15 giorni

Al prelievo del materiale spermatico si giunge dopo aver addestrato il verro a montare sul manichino e ad accettare il contatto con la mano dell'operatore.

L'addestramento deve avvenire senza maltrattamenti e in un ambiente tranquillo privo di distrazioni.

Inoltre, per dare massima stabilità all'animale durante il salto, risulta utile porre sul pavimento davanti al manichino un tappeto anti sdrucciolo così da permettere un buon appoggio degli arti posteriori.

La sala monta

Deve essere collocata in un reparto vicino alla stabulazione dei verri, ma separata da questa e dai locali destinati alle altre fasi di allevamento. L'ambiente deve essere particolarmente tranquillo così da scatenare nel verro i riflessi condizionati legati alla libido e al prelievo. Il locale deve essere sufficientemente illuminato e areato, possibilmente riscaldato per evitare shock termico durante l'inverno. Il pavimento antiscivolo e le pareti devono essere facilmente lavabili e disinfettabili. La stanza, dedicata alla monta deve essere inoltre dotata di:

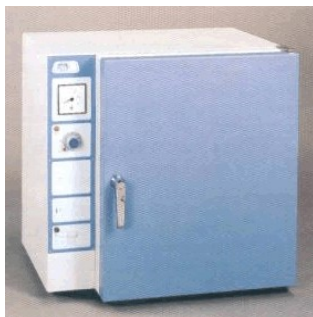
- Manichino regolabile in altezza per essere adattato a tutti i verri.
- Barre poste in prossimità del manichino che possano proteggere l'operatore in caso di verro aggressivo.
- Materiale necessario per il lavaggio e la pulizia (attacco acqua possibilmente fredda e calda, scarico sul pavimento ecc.).
- Stufa termostata al fine di gestire ad una temperatura ottimale il materiale occorrente durante il prelievo.
- Thermos per il prelievo dotato di sacchetti di plastica monouso ad uso alimentare per contenere l'eiaculato.

La sala monta dovrà essere inoltre collocata anche vicino al laboratorio ma divisa dallo stesso da un disimpegno per evitare il passaggio diretto da un ambiente all'altro.

Stufa termostata

La stufa termostata ha la funzione di riscaldare fino a una temperatura ottimale di circa 37°C tutto ciò che viene a diretto contatto con il materiale seminale fresco. La temperatura al suo interno dovrebbe essere verificata mensilmente con l'ausilio di un termometro posto in un bicchiere contenente acqua.

Pulire con frequenza mensile le parti interne della stufa utilizzando carta asciuga-tutto imbevuta di una miscela d'acqua ed alcool etilico denaturato.



Contenitori di raccolta

Utilizzare thermos preriscaldati a 37°C con inseriti sacchetti in plastica monouso.

Nel caso di utilizzo di bicchieri in vetro assicurarsi che siano puliti, ben asciutti e caldi.

Il Laboratorio

laboratorio

Mantenere pulito e disinfettato al fine di **prevenire contaminazioni batteriche**

Dotato di tutti gli strumenti necessari calibrati, tarati e ben mantenuti

Corretta definizione dei parametri seminali

Preparare tutto il necessario prima di effettuare il prelievo

Il seme va subito lavorato !

La scelta dell'ubicazione delle apparecchiature all'interno del laboratorio ed il loro attento controllo devono essere svolti considerando le diverse esigenze funzionali presenti nelle varie aree. Per le modalità di utilizzo e manutenzione si deve fare riferimento a quanto in seguito descritto e/o ai relativi manuali forniti dal produttore.

Data l'importanza delle apparecchiature, è indispensabile che il personale che ne usufruisce sia formato ed addestrato in maniera adeguata.

Per garantirne il perfetto funzionamento, le apparecchiature devono essere movimentate il meno possibile e collocate in locali idonei. Prima di iniziare una seduta di prelievo dovrà essere verificata l'adeguatezza delle apparecchiature e dei materiali sia in termini di pulizia che di temperatura di lavoro quando specificato. Inoltre, il laboratorio dovrà essere equipaggiato di tutto il materiale, sia monouso che non, utile alle attività di preparazione dell'extender e del materiale seminale.

Attrezzatura necessaria

Bilancia



Utilizzata per la determinazione di volumi

- Controllare che il piano di appoggio della bilancia sia stabile.
- Calibrazione periodica (come da istruzioni del costruttore).

Spettrofotometro

Utilizzato per la determinazione della concentrazione

Determina la concentrazione di un campione tramite la lettura dell'assorbanza. Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione; in altre parole *l'assorbimento risulta direttamente proporzionale alla concentrazione.*

Per valori di concentrazione alti i valori di assorbanza saranno elevati.



Microscopio in contrasto di fase con tavolino riscaldato e obiettivi 20x e 40x



Utilizzato per la determinazione della motilità visiva e per la valutazione di eventuali anomalie spermatiche e di centri di agglutinazione

- Verificare la temperatura del tavolino a 37°C sul display (quando presente) della piastra riscaldante.
- Effettuare periodicamente la pulizia degli oculari e degli obbiettivi tramite utilizzo di carta per apparecchi fotografici.

Bagnomaria termostato



Utilizzato essenzialmente per mantenere il materiale seminale ad una temperatura di circa 37°C per la determinazione della motilità

- Cambio periodico dell'acqua.
- Pulizia della vaschetta e del gruppo termostatico.
- Controllo periodico con termometro della Temperatura all'interno della vasca.

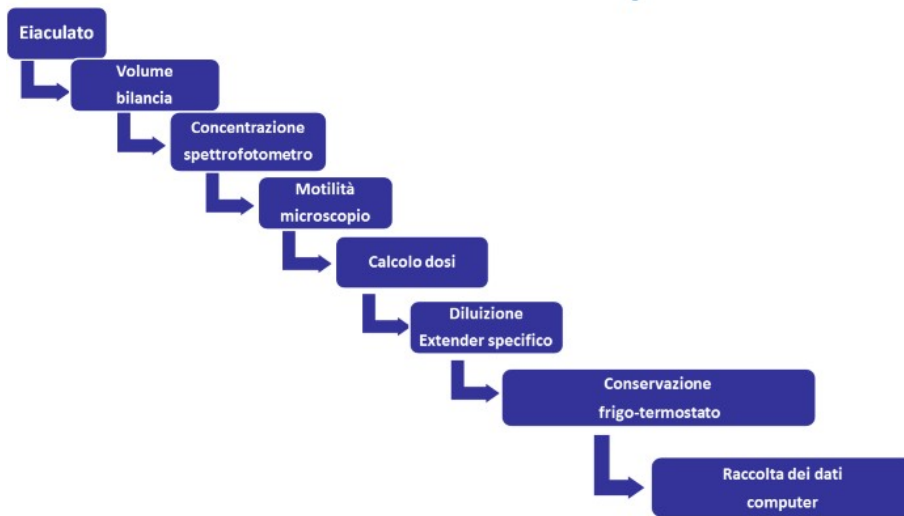
Frigo-termostato



Utilizzato per conservare il seme refrigerato ad una temperatura di 15-16°C

- Verificare regolarmente la temperatura all'interno degli apparecchi con l'ausilio di un termometro posto in un bicchiere contenente acqua.
- I ripiani non devono mai essere riempiti completamente al fine di consentire un'uniforme circolazione dell'aria tra gli oggetti.
- Pulizia periodica della parte interna.

II Processo produttivo



Prima di iniziare il processo produttivo preparare l'extender necessario per affrontare la produzione di dosi giornaliera



L' extender

Il pH si stabilizza in 2 ore !!



- Supporto energetico.
- Protegge le membrane.
- Conserva il pH.
- Mantiene la corretta osmolarità.
- E' isotonico rispetto allo sperma (300 mosm).
- Ha un pH di (7.0-7.5).
- Ha un potere tampone a protezione delle membrane.
- Contiene sostanze favorevoli al metabolismo anaerobico delle cellule e svolgere un'azione inibente (batteriostatica).

La funzione dell'extender, composto principalmente da zuccheri, proteine, lipidi e additivi, è quella di diluire il materiale seminale garantendo il nutrimento agli spermatozoi, un'adeguata protezione delle membrane degli stessi, il tamponamento del materiale seminale e l'inibizione della crescita batterica.

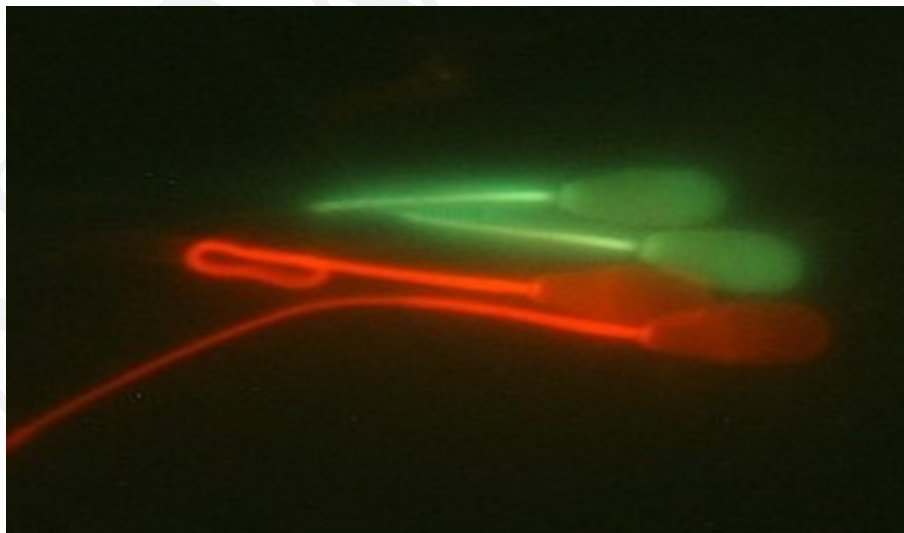
Una scorretta preparazione dell'extender danneggia le membrane degli spermatozoi con una conseguente scarsa qualità della dose



Prima di preparare l'extender:	Come diluire l'extender:
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Verificare la data di scadenza (riportata sulla confezione). ➤ Verificare lo stato di conservazione (come da indicazioni produttore). ➤ Utilizzare acqua bidistillata sterile. ➤ Utilizzare, per la diluizione, vetreria pulita e sterilizzata. 	<ul style="list-style-type: none"> • Prodotto finito OK • Polvere o liquido da ricostituire (indicazioni produttore): <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Diluire</u> in XX litri = misurare il quantitativo di acqua e sciogliere l'extender 2. <u>Portare</u> a XX litri= sciogliere l'extender in metà acqua e portare a volume <p>Una diluizione errata dell'extender potrebbe comportare un'alterazione della qualità dell'eiaculato:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ se <i>"Eccessiva"</i> o <i>"Scarsa"</i> le sostanze protettive e nutritive non risultano equilibrate per un corretto mantenimento e un'adeguata protezione delle cellule. <p>Preriscaldare l'extender (la temperatura di lavoro deve essere quella stimata nell'eiaculato al suo arrivo)</p>

L'analisi dell'eiaculato.

Cosa analizziamo ?



Lo spermatozoo cellula *"atipica"* in quanto esprime il meglio di sé in un organismo diverso da quello che lo ha prodotto!!!

L'eiaculato

Non è omogeneo ma si presenta con aspetti e contenuti diversi:

Fase Post-spermatica contiene «tapioca»

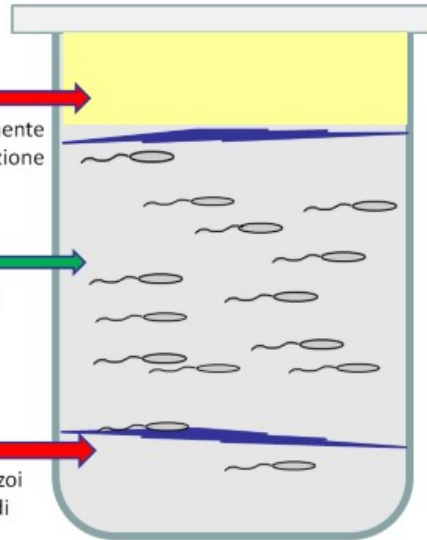
è l'ultima frazione che viene eiaculata ed è composta principalmente dalla "tapioca" prodotta dalle ghiandole bulbo-uretrali. Questa frazione deve essere filtrata eliminata ponendo un filtro sopra il contenitore

Fase Spermatica densa di spermatozoi

è l'eiaculazione vera e propria contenente gli spermatozoi che deve essere raccolta completamente.

Fase Pre-spermatica con pochi spermatozoi

rappresenta i primi getti di liquido limpido contenente pochi spermatozoi ma inquinata di batteri e patogeni. Pertanto si sconsiglia la raccolta di tale frazione



La durata dell'eiaculazione varia a seconda del verro (da 3 a 10 minuti) ed è caratterizzata da periodi di pausa e periodi di emissione. L'eiaculato deve essere raccolto in sacchetto di plastica per alimenti inserito in contenitore coibentato mantenuto a 37°C in termostato fino al momento del prelievo. Subito dopo il prelievo, sul contenitore deve essere apposta un'etichetta con l'identificativo del verro.

Prima valutazione dell'eiaculato

Colore

- valutazione visiva per verificare l'eventuale presenza di elementi estranei: tracce di sangue, urina, detriti ecc...
- escludere la presenza di "tapioca", disturba la produzione di dosi!

Volume

- la massa totale dell'eiaculato raccolto.
- la valutazione viene determinata tramite pesata con l'utilizzo di una bilancia (1 g = 1 mL) previa determinazione della tara del recipiente per il prelievo.

Si consiglia pertanto che i recipienti per i prelievi vengano pesati prima di essere inseriti nel processo ed identificati per risalire al singolo peso (tara)

Pre-diluzione dell'eiaculato raccolto



L'eiaculato deve essere tamponato con precisione direttamente nel contenitore da prelievo, in rapporto 1:1 (es. 100g di seme + 100g di extender) con extender alla stessa temperatura del seme per conservare gli spermatozoi in attesa delle fasi successive di lavorazione presso il laboratorio.

Si consiglia pertanto di mantenere l'extender di diluizione ad una temperatura intorno a 34-35°C e di pre-diluire immediatamente il seme dopo il prelievo.

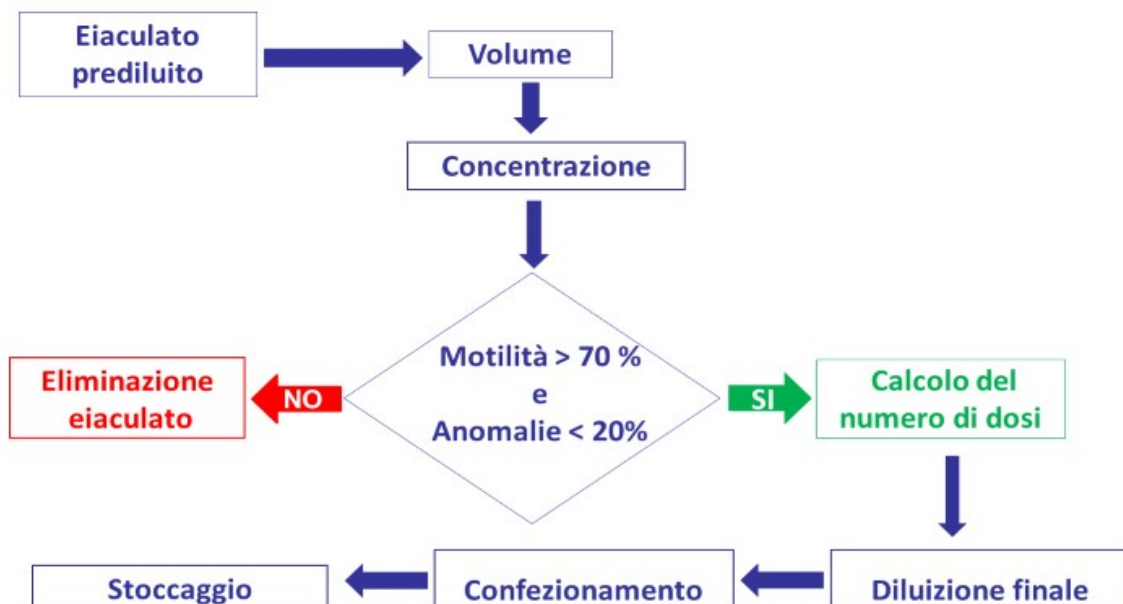
Differenze di $\pm 3^{\circ}\text{C}$ fra il seme e l'extender sono tollerate mentre variazioni maggiori di temperatura possono danneggiare il seme per shock termico.

L'aggiunta dell'extender al materiale seminale deve avvenire possibilmente per scorrimento lungo la parete del contenitore o comunque lentamente.



- Proteggere l'eiaculato dalle temperature estremamente calde o fredde, gli spermatozoi sono molto sensibili alle brusche variazioni termiche.
- Evitare che l'eiaculato venga a contatto con acqua.
- Evitare l'esposizione alla luce diretta del sole e limitare l'esposizione all'aria.
- Miscelare delicatamente l'eiaculato senza agitare il contenitore.
- Tutte le fasi operative, fino al raffreddamento delle dosi, verrà effettuato a temperatura ambiente (18-20 °C).

Come produrre dosi di seme refrigerato



L'analisi seminale

L'analisi seminale si compone delle seguenti determinazioni:

- Concentrazione
- Motilità Visiva
- Centri di Agglutinazione
- Anomalie degli Spermatozoi

Concentrazione

Per concentrazione (**CONC**) si intende il numero di spermatozoi per unità di volume, espresso in milioni (10^6) per mL. La determinazione della concentrazione **permette la standardizzazione del numero di spermatozoi contenuti in una dose** in funzione dell'ottimizzazione del processo produttivo e del raggiungimento della massima fertilità della dose stessa. La valutazione viene eseguita tramite spettrofotometro calibrato.

Spettrofotometro

Lo spettrofotometro deve essere collocato in laboratorio rispettando i seguenti punti:

- a) temperatura ambiente compresa tra 16°C e 35°C.
- b) assenza di campi elettromagnetici intensi o di dispositivi che generano campi energetici ad alta frequenza.
- c) piano di lavoro stabile con una superficie piana orizzontale, asciutta e pulita, esente da vibrazioni.
- d) assenza di ogni oggetto che possa ostruire la circolazione di aria sottostante ed intorno allo strumento.
- e) assenza di luce incidente solare.

Una corretta manutenzione e pulizia dello strumento ne garantiscono il buono stato.

Si consiglia di pulire le superfici interne ed esterne con un normale detergente multiuso spruzzato su di un panno morbido inumidito.

Prima di procedere con la pulizia o con un'eventuale decontaminazione, l'utente deve accertarsi che il metodo adottato non danneggi lo strumento.

Impostare la corretta curva di taratura fornita con lo strumento e attenersi scrupolosamente alle istruzioni di preparazione del campione

Determinazione della concentrazione

- Attenersi scrupolosamente alle istruzioni fornite con lo spettrofotometro per la preparazione del campione.

La curva di taratura impostata lavora correttamente solo se vengono rispettate le indicazioni

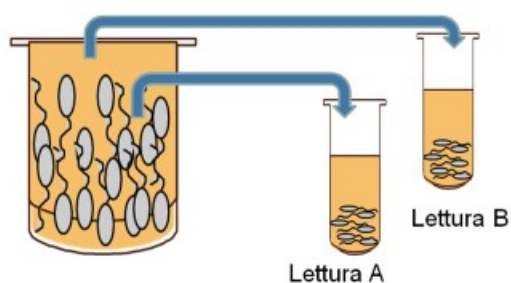
- Utilizzare cuvette pulite facendo in modo di non porre le dita sulla parte liscia (lato dedicato al passaggio della luce).

Le pareti della cuvetta sporche potrebbero dare un valore di assorbanza elevato con un conseguente dato di concentrazione non corretto

Preparazione del campione per la determinazione della concentrazione tramite Spettrofotometro

Allestire due diverse cuvette per campione (al fine di minimizzare un possibile errore di campionamento)

Il quantitativo di seme da utilizzare viene indicato nel protocollo fornito con lo strumento



$$\text{Concentrazione/mL} = A+B/2$$

Pescare dall'eiaculato ben miscelato aliquote di seme in modo casuale

Motilità

La motilità è importante per il passaggio delle barriere uterine e per la penetrazione nel cumolo ooforo attorno l'ovocita; a tutt'oggi rimane il parametro qualitativo che più comunemente viene valutato associandolo alla fertilità.

Per essere mobile uno spermatozoo deve essere metabolicamente attivo e nella maggioranza dei casi morfologicamente normale;

Il calo della motilità risulta essere un indicatore di compromissione dell'attività metabolica anche se non implica necessariamente il danneggiamento della membrana.

L'osservazione al microscopio permette di valutare il movimento degli spermatozoi in grandi categorie quali:

- **progressivo**: gli spermatozoi si spostano in avanti in modo più o meno energico. Questo è il movimento più importante ai fini fecondativi in quanto sinonimo di spermatozoo normale. La percentuale stimata di questa categoria di spermatozoi fornisce il dato di **MOTILITA'**
- **ondulatorio**: gli spermatozoi restano sul posto o si spostano in modo lento. Il movimento viene effettuato dalla coda con colpi lenti e laterali più o meno bruschi. Questo movimento indica spesso uno stato regressivo o comunque di ridotta vitalità, potrebbe essere anche causato da condizioni ambientali sfavorevoli (temperature di lavoro, extender non ottimali ecc)
- **rotatorio**: gli spermatozoi compiono movimenti sul posto o in un diametro ridotto in modo più o meno veloce. Questo movimento indica una condizione vitale sfavorevole e irreversibile (si consiglia di ripreparare la goccia sul vetrino in quanto questa situazione potrebbe essere un artefatto legato al vetrino sporco o ad un difetto di preparazione dello stesso)
- **retrocedente**: gli spermatozoi presentano la coda attorcigliata su se stessa (malformazione detta "frustino"). Tale movimento (lo spermatozoo si muove retrocedendo) può essere causato da fattori esogeni ed endogeni (problemi legati al verro o causati durante il processo produttivo).

Bagnomaria termostato

- Temperatura di lavoro (34-37° C).
- La vaschetta deve essere riempita possibilmente con acqua demineralizzata.
- Prima dell'utilizzo assicurarsi che la temperatura del display del gruppo termostatico abbia raggiunto la temperatura d'uso e che il livello d'acqua sia sufficiente per garantire l'immersione del seme nelle provette.

Verificare periodicamente la temperatura dell'acqua con un termometro ad immersione

Microscopio

- Per la determinazione della motilità visiva si consiglia l'utilizzo di un obiettivo 20x
- La temperatura di lavoro del tavolinetto riscaldato deve essere circa 37°C

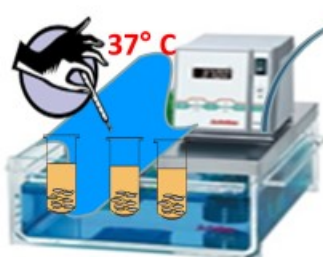
Periodicamente deve essere effettuata la pulizia degli oculari e degli obbiettivi utilizzando carta per apparecchi fotografici

Determinazione della Motilità

- Per una corretta valutazione della motilità il campione deve avere una concentrazione tale da consentire all'operatore di distinguere nel campo microscopico le singole cellule.
- Nel caso di eccessive concentrazioni, l'aliquota di pre-diluito dovrà essere ulteriormente diluita con extender preriscaldato alla stessa temperatura.
- Stima delle cellule mobili, rispetto al totale delle stesse. La valutazione viene espressa in percentuale, utilizzando una soglia discriminante del 10% (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%).
- Il dato finale di motilità deriverà dalla media delle osservazioni effettuate sulle singole gocce.
- In presenza di un eiaculato con una motilità inferiore al 70% il processo produttivo viene interrotto e l'eiaculato eliminato.

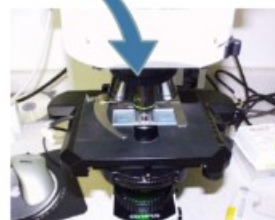
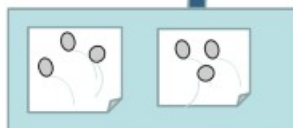
seme pre-diluito riscaldato a **37°C**
(per almeno 10 minuti).

Preparazione del campione per la determinazione della motilità tramite Microscopio



Due o più gocce di seme vengono poste su un vetrino portaoggetto pre-riscaldato a **37°C** e coperte da un vetrino copri-oggetto, anch'esso riscaldato.

Le gocce devono essere della misura del copri-oggetto in modo da non creare uno spessore di liquido eccessivo, che debordando, crea spostamento del preparato ostacolando la corretta lettura



Centri di agglutinazione

I centri di agglutinazione sono aggregazioni di più spermatozoi tra loro attaccati per la coda o per la testa. Valutare l'eventuale presenza di centri di agglutinazione per frequenza e dimensione concorre alla definizione di:

- «**ejaculato**» troppo maturo (verri a fine carriera o poco sfruttati)

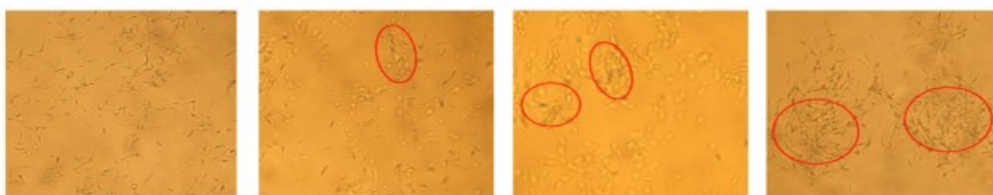
La presenza media e/o frequente dei centri di agglutinazione porta all'eliminazione dell'ejaculato.

Microscopio

- Per la determinazione dei centri di agglutinazione si consiglia l'utilizzo di un obiettivo 20x come prima indagine concomitante con la valutazione della motilità al fine di individuare la possibile presenza degli aggregati.
- In caso di presenza dei centri di agglutinazione osservare il vetrino con un obiettivo 40x per una valutazione più precisa degli stessi.

Determinazione dei centri di agglutinazione

Valutati tramite **microscopio** e classificati sia per **dimensioni** (piccoli, medi, grandi) che per **frequenza** (bassa, media, alta).



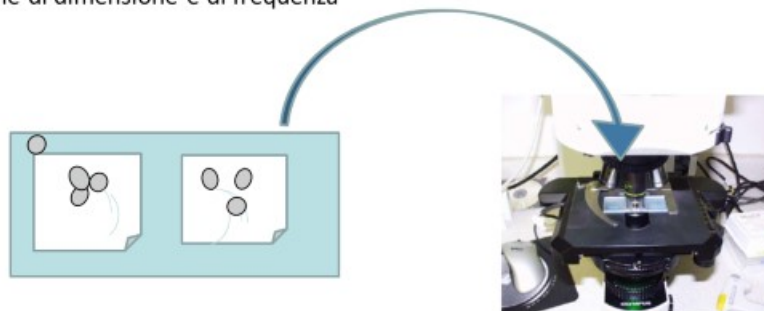
Dimensioni		Frequenza		Eiaculato
Piccoli	+	Bassa	+	OK
Medi	++	Media	++	NO
Grandi	+++	Alta	+++	NO

Preparazione del campione per la determinazione dei centri di agglutinazione tramite Microscopio

Due o più gocce di seme vengono poste su un vetrino coperte da un vetrino copri-oggetto.

La presenza o assenza dei centri di agglutinazione viene determinata durante l'analisi della motilità.

Nel caso di presenza il vetrino dovrà essere anche osservato utilizzando un obiettivo 40x al fine di ottimizzare la definizione di dimensione e di frequenza



Anomalie degli spermii

Per anomalie degli spermii si intendono tutte le deviazioni della forma dello spermatozoo rispetto al modello di **"normalità"**.

Valutare la presenza di anomalie degli spermatozoi nel campione in esame (teste staccate, gocce, code anomale) rappresenta un metodo per valutare lo sviluppo e la maturazione delle cellule.

Quando in un eiaculato un gran numero di spermatozoi si presenta morfologicamente anormale è probabile che si sia verificata un'alterazione della spermatogenesi o della maturazione degli spermatozoi.

L'importanza della valutazione delle anomalie degli spermatozoi è fondamentale per decidere se eliminare o no l'eiaculato.

Con anomalie morfologiche o gocce citoplasmatiche prossimali superiori al 20% eliminare l'eiaculato.

Anomalie della coda

Valutare la presenza di code anormali concorre alla definizione di:

- Alterazione del processo maturativo degli spermatozoi.
- Invecchiamento cellulare da conservazione.
- Osmolarità non corretta dell'extender (extender preparato non adeguatamente).

Coda incurvata



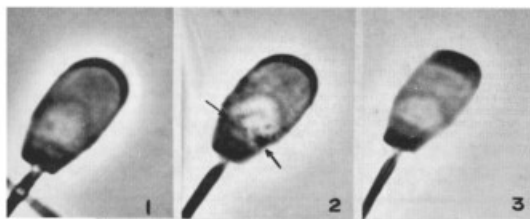
Coda arrotolata



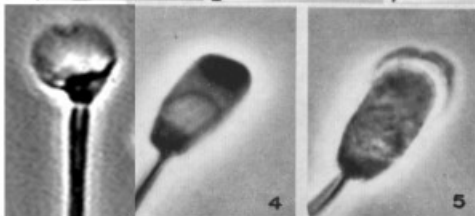
Coda a frustino

Anomalie della testa

Valutare la presenza di anomalie dell'acrosoma sul seme lavorato concorre alla definizione di:



- possibili shock termici
- osmolarità dell'extender non corretta



- presenza accidentale di acqua o urine
- invecchiamento cellulare da conservazione

Gocce citoplasmatiche

Valutare la presenza di gocce citoplasmatiche prossimali sulla coda dello spermatozoo concorre alla definizione di spermatozoi immaturi (verri troppo giovani o eccessivamente sfruttati).



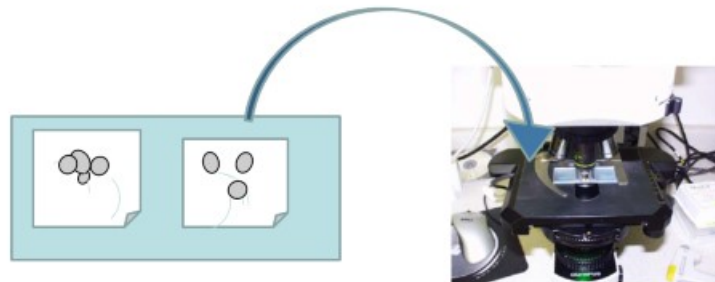
Goccia citoplasmatica prossimale

Preparazione del campione per la determinazione delle anomalie degli spermatozoi tramite Microscopio

Due o più gocce di seme vengono poste su un vetrino coperte da un vetrino copri-oggetto.

La presenza o assenza di anomalie in forma massiccia viene determinata durante l'analisi della motilità.

Nel caso di presenza il vetrino dovrà essere anche osservato utilizzando un obiettivo 40x al fine di ottimizzare la definizione di anomalie e del tipo di anomalia presente.



La preparazione delle dosi Inseminanti

Il volume dell'eiaculato, la determinazione della concentrazione e le valutazioni al microscopio di tutti i parametri che concorrono alla definizione di qualità seminale, consentono di stabilire il corretto grado di diluizione per la preparazione delle dosi.

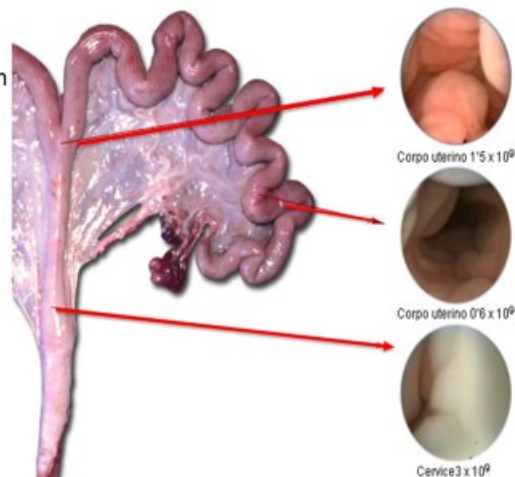
Con seme che presenta caratteristiche qualitative ottimali per motilità e bassa presenza di anomalie, si possono preparare dosi contenenti da 1,5 a 3 miliardi di spermatozoi in funzione del tipo di inseminazione che verrà praticata.

In caso di necessità, e solo a carattere straordinario, se le caratteristiche del materiale seminale risultano al limite dei parametri di accettabilità ma servono dosi urgenti per inseminare, si potranno produrre meno dosi aumentando il contenuto di spermatozoi (5 miliardi/dose).

Prima di passare al calcolo delle dosi è doveroso conoscere il tipo di inseminazione che verrà praticata al fine di bilanciare sia il numero di spermatozoi contenuti nella dose che il suo volume.

Le Tecniche di Inseminazione strumentale nella scrofa

- Condotto cervicale (deposizione degli spermatozoi in cervice)
- Post-cervicale (deposizione degli spermatozoi all'interno del corpo dell'utero)
- Intrauterina profonda (deposizione degli spermatozoi nelle corna uterine)
tecnica chirurgica o con ausilio di specifici strumenti
di difficile applicazione



Inseminazione cervicale (CC)

- Dosi da 80-100 mL contenenti 2-3 miliardi di spermatozoi
- Reflusso del 70% del volume e del 25% degli spermatozoi
- Tempo di esecuzione medio 3 minuti
- Su tutte le femmine

Inseminazione post-cervicale (PC)

- Dosi da 30-60 mL contenenti 0,5-1 miliardi di spermatozoi
- Reflusso mancante o assente
- Tempo di esecuzione medio 1 minuto
- Non praticata nelle scrofette per difficoltà di introduzione del catetere interno
- Inserimento del catetere interno facile per le scrofe meno per le primipare

Confronto Produzione dosi

Parametri	CC	PC
Frequenza prelievo	2 volte/settimana	2 volte/settimana
Dosi/eiaculato	20	40
Dosi/anno	2.000	4.000
Proporzione verri	10	5

Risultati comparativi di fertilità e produttività di scrofe inseminate con seme refrigerato impiegando differenti tecniche

FONTE	INS	N°scrofe	Vol/ml seme	Conc/dose	% fert	N° nati/parto
Hernandez-Caravaca (2012)	CC	1.716	80	3,0	88,58	13,65
	PC	1.664	40	1,5	91,65	14,13
Juan Jimenez SAU	CC	68.308	80	3,0	83,30	10,51
	PC	65.808	40	1,5	85,80	10,51
Danske Svinproduktion (2008)	CC	3.009	80	2,0	90,2	16,5
	PC	3.077	80	0,75	91,3	16,3
	PC	3.021	80	0,50	88,9	16,2

Dose Obiettivo In funzione del tipo di inseminazione

Numero Spermatozoi Dose (**NSD**) = XXX (10^6)

Volume Dose (**VD**) = XX mL

Calcolo numero di dosi:

Volume Eiaculato pre-diluito → **VOL** (mL)

Concentrazione Eiaculato pre-diluito → **CONC** (10^6 /mL)

Numero Spermatozoi Eiaculato (**NSE**) (10^6) = VOL x CONC

Numero di Dosi (**ND**) = **NSE** / **NSD**

Volume Finale (Eiaculato + Extender) (**VF**) = ND x VD

Modalità di calcolo delle dosi

Esempio di calcolo

NSD = 2500 (10^6)

VD = 80 mL

VOL = 200 mL

CONC = 400 10^6 /mL

NSE = 200 X 400 = 80.000 10^6

ND = **NSE** / **NSD** = 80.000 / 2.500 = 32

Il confezionamento delle dosi

Per il confezionamento delle dosi, nel caso si utilizzi una confezionatrice o comunque un qualsiasi sistema di confezionamento che prevede l'uso di materiali riutilizzabili (tubi, imbuti, coni ecc) si raccomanda di sostituire tutto il materiale tra un lotto di seme ed il successivo, specialmente nel caso di produzione di dosi di verri in purezza.

In ogni caso mantenere pulito tutto il materiale in ogni sua parte mediante l'utilizzo di prodotti disinfettanti ed assicurarsi che, soprattutto la tuberia al momento dell'utilizzo, sia ben sciacquata ed asciutta per evitare che residui chimici e/o acqua vengano a contatto con il seme.

Tale evenienza potrebbe essere risolta facendo passare dell'extender nella tuberia o sulle superfici dei materiali prima dell'utilizzo.

Confezionamento e raffreddamento

- Preparare le 'buste' pre-marcate prima dell'inizio del confezionamento.
- Confezionare il seme diluito avendo cura di miscelare delicatamente e tenere in sospensione il preparato (operazione necessaria affinché le dosi risultino omogenee).
- Garantire lo stesso peso per tutte le dosi.
- Raffreddare le dosi a temperatura ambiente (20-22°C) per almeno un'ora al riparo dalla luce e da fonti di calore prima di riporle in frigo-termostato a 15°-16 C.

Conservazione delle dosi

- Porre le dosi in frigo-termostato dopo aver raggiunto il raffreddamento (20-22°C).
- Evitare di riporre a 15-16°C dosi ancora calde.
- I ripiani del frigo-termostato non devono mai essere riempiti completamente al fine di consentire un'uniforme circolazione dell'aria tra gli oggetti.

Monitoraggio qualitativo dosi

Durante la conservazione delle dosi nella fase di stoccaggio, e comunque prima del loro utilizzo, eseguire un'analisi qualitativa, tramite la determinazione della motilità, al fine di valutarne l'utilizzo per la successiva inseminazione.

Riassumendo il processo



Il seme Congelato

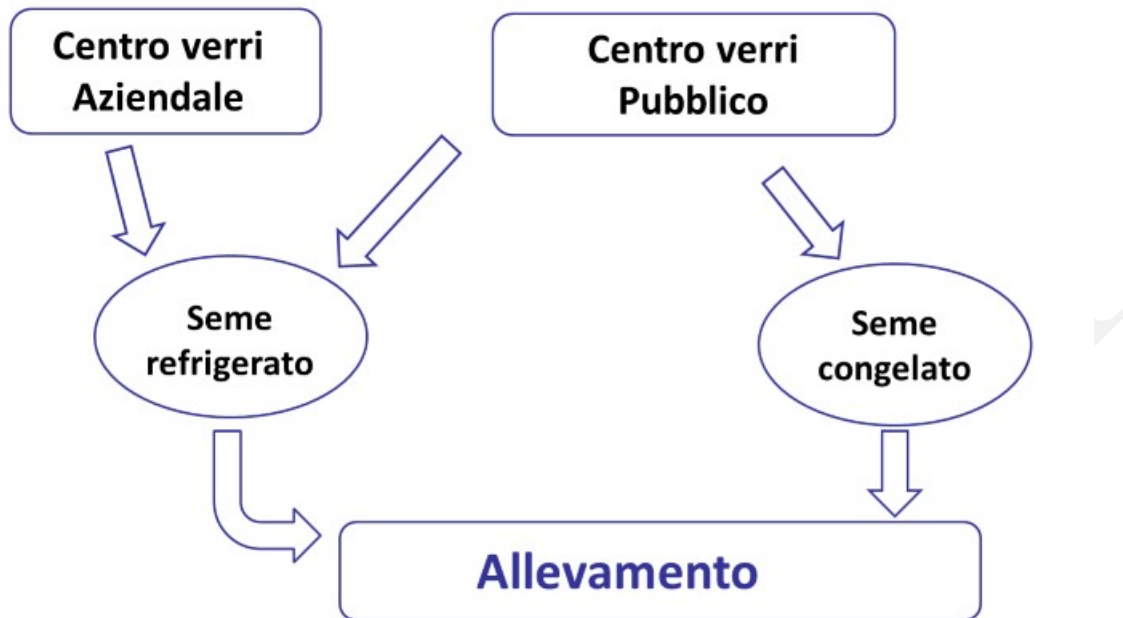
La Criobiologia

- La criobiologia è la branca della biologia che analizza il funzionamento degli organismi viventi, degli organi, dei tessuti e delle cellule a basse temperature.
- Alla base della crioconservazione vi è lo sfruttamento dell'azione del freddo che determina il rallentamento o l'arresto metabolico della cellula.

La sfida.....

Conservare le cellule in uno stato di animazione sospesa per lunghi periodi di tempo, preservando al contempo la loro capacità di riprendere vita al momento del ripristino della temperatura e di svolgere tutte le normali funzioni biologiche.

Il centro verri aziendale **non può** produrre seme congelato ma lo può utilizzare



Seme Refrigerato

Vantaggi

- maggiore fertilità
- utilizzo di verri aziendali
- facile utilizzo

Svantaggi

- periodo di conservazione limitato
- minore disponibilità di verri selezionati

Seme Congelato

Vantaggi

- programmi di accoppiamento ottimizzati fra verri e scrofe di alto interesse genetico
- permette ai selezionatori disponibilità di seme di soggetti non più in vita
- rende disponibile il miglioramento genetico anche agli allevatori che non riescono ad approvvigionarsi di seme refrigerato
- conservazione in azoto liquido per un tempo illimitato

Svantaggi

- minore fertilità
- minore numero di suinetti per parto
- protocollo di scongelamento delicato
- gestione dell'azoto liquido (sicurezza)

SEME CONGELATO : DOSE INSEMINANTE



La dose inseminante va utilizzata per una sola inseminazione!!!!

BOVINI



1 PAILLETES

SUINI



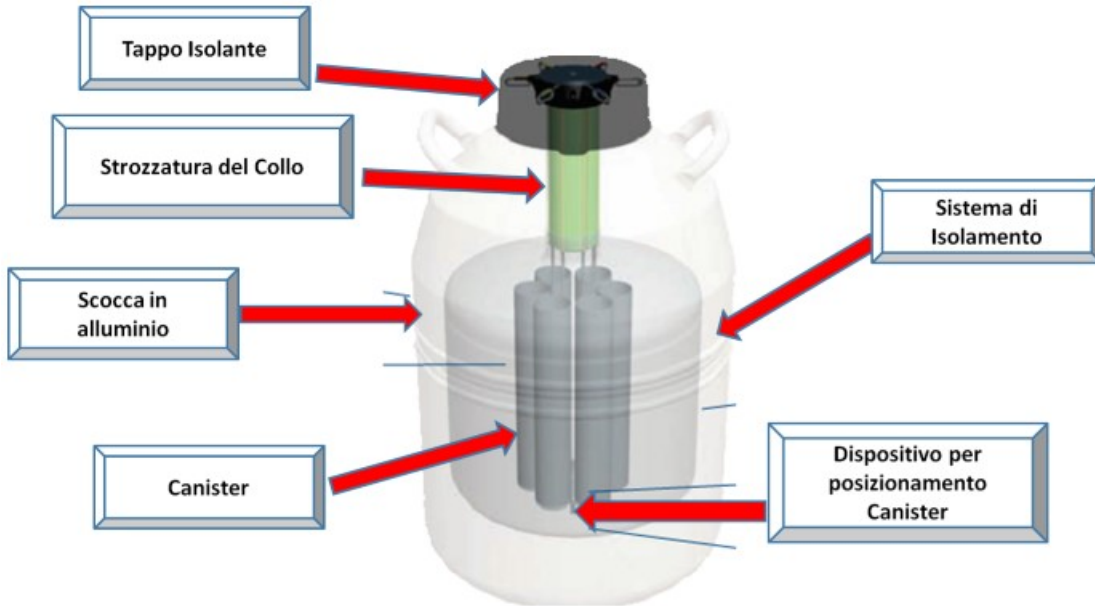
8-10 PAILLETES

In Aziendasi può fare molto

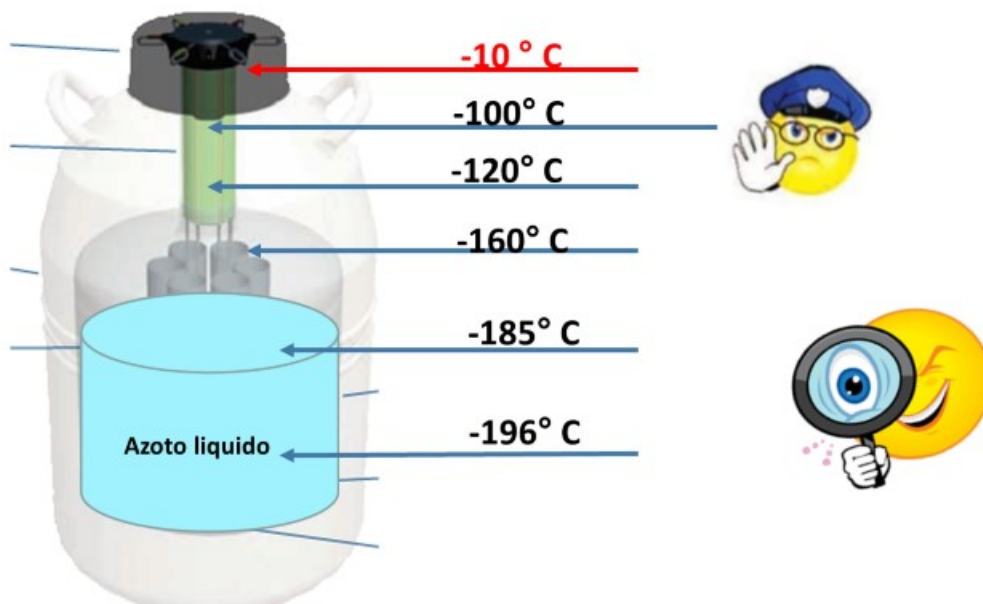


- Gestione del contenitore criobiologico.
- Manipolazione delle pailletes.
- Scongelo RAPIDO.
- Tempo scongelamento rispetto al tempo d'inseminazione.

Il contenitore Criobiologico



Temperature



Manutenzione e controllo del contenitore criobiologico

Gli urti, l'invecchiamento e i veloci sbalzi termici compromettono la tenuta del contenitore che perde di efficienza termica.

La presenza di ghiaccio sulla superficie esterna del bidone deve indurci a sospettare perdita di efficienza; in tal caso bisogna incrementare la frequenza dei controlli del livello ed eventualmente sostituire il contenitore.

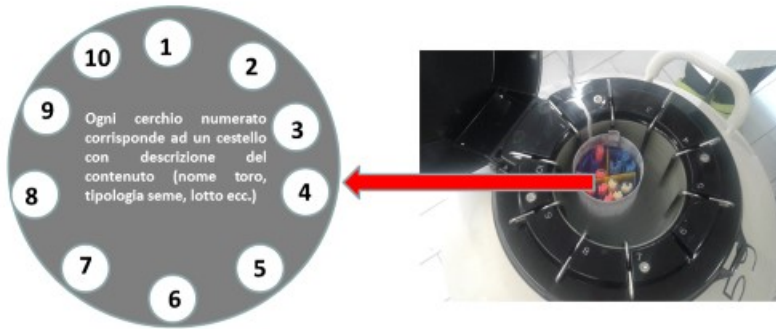
E' importante ricordare che le paillettes mantenute in azoto liquido a -196°C , sono stabili per un tempo molto lungo, **ma la loro esposizione a temperature superiori a -80°C** deteriorano gli spermatozoi compromettendone la qualità, per l'inizio dei processi associati allo scongelamento.

Stoccaggio



- Dotare il contenitore di mappa per poter individuare in modo facile la posizione del campione da utilizzare.
- Richiudere il contenitore il prima possibile per evitare inutile dispersione di azoto.
- Monitorare periodicamente il livello di azoto presente nel contenitore.

Foglio di archiviazione



L'identificazione rapida delle paillettes limita la manipolazione delle stesse (rischio scongelamento) ed evita eccessive evaporazioni di azoto dal contenitore.



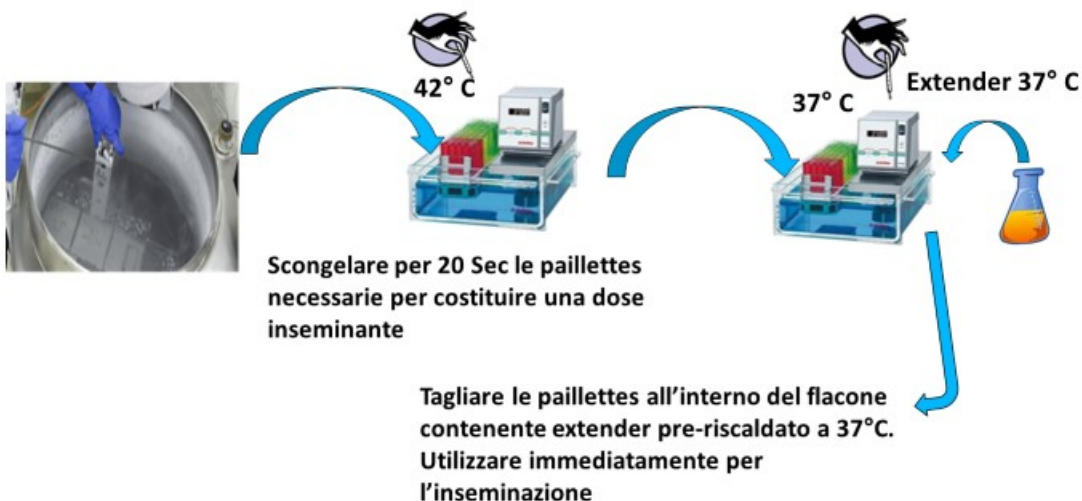
- Dotare il contenitore di mappa per poter individuare in modo facile la posizione del seme da utilizzare.
- Richiudere il contenitore il prima possibile per evitare inutile dispersione di azoto.
- Monitorare periodicamente il livello di azoto presente nel contenitore.

Lo scongelamento



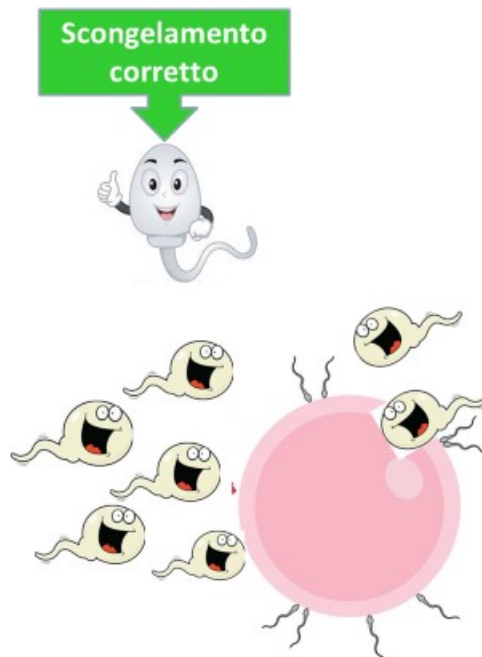
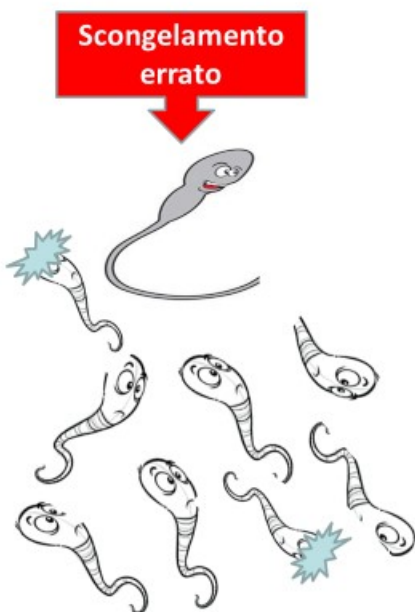
- Prestare molta attenzione alla movimentazione delle paillettes di seme congelato: se subiscono sbalzi di temperatura possono formarsi cristalli di ghiaccio intracellulari con conseguente danno cellulare!!!!!!!!!!!!
- Prima di scongelare preparare tutto il materiale necessario per le successive fasi.
- Estrarre rapidamente dal bicchiere solo le paillettes necessarie.
- Non scongelare e ricongelare le paillettes (le paillettes poste fuori dall'azoto liquido anche per pochi istanti si scongelano).

Procedura di scongelamento



Lo scongelamento del seme è una fase fondamentale

Lo scongelamento deve essere eseguito in acqua a 42°C per pochi secondi e la dose va poi ricostituita con extender pre-riscaldato a 37°C





Prima di scongelare preparare tutto il materiale necessario per le successive fasi

Seguire il protocollo di scongelamento

Estrarre dal contenitore solo le paillettes necessarie

Estrarre le paillettes dal contenitore in modo rapido evitare sbalzi termici - formazione ghiaccio = Danni cellulari

Non scongelare e ricongelare le paillettes (le paillettes poste fuori dall'azoto liquido anche per pochi istanti si scongelano)

La gestione dei dati

La registrazione dei dati computerizzata permette di:

- Monitorare in modo dettagliato e preciso l'andamento aziendale.
- Ottenere informazioni in tempi brevi.
- Confrontare più variabili contemporaneamente.
- Garantire una moderna e competitiva gestione aziendale.
- Scegliere i riproduttori.
- Garantire una corretta rimonta a favore di un costante progresso genetico.
- Costituire un archivio storico utile nei programmi di gestione aziendale (sanitaria, riproduttiva ecc).

L'allevamento del suino (soprattutto se a ciclo chiuso) è caratterizzato da una elevatissima presenza di soggetti distribuiti in fasi produttive considerevolmente differenti fra loro per tecnologia, alimentazione e gestione. La pur importante sensibilità ed esperienza degli operatori non è più sufficiente da sola a garantire una moderna e competitiva gestione aziendale che si deve invece fondare su principi di programmazione, di marketing e di innovazione tecnologica. Allo scopo è necessaria una conoscenza dettagliata e puntuale di quanto sta succedendo in azienda e ciò è possibile analizzando in tempo reale tutte le informazioni raccolte giorno per giorno. Con una corretta raccolta dei dati, e il loro inserimento

in database dedicati, si possono elaborare andamenti, grafici ed elenchi facilitando così l'associazione di variabili informative finalizzate alla corretta gestione dell'allevamento.

Ad esempio:

- L'elaborazione congiunta dei parametri produttivi e riproduttivi di verri e scrofe permette di ottenere delle informazioni necessarie all'allevatore per effettuare la scelta su quali riproduttori tenere e quali eliminare consentendo così una corretta rimonta e un costante progresso genetico.
- La registrazione dei dati relativi alla qualità del materiale seminale dei singoli verri e al numero di dosi prodotte da ogni eiaculato trova una sua utilità per valutare la capacità del riproduttore.
- Registrare vaccinazioni, malattie infettive zoppie ecc che, anche a distanza di diversi giorni dalla loro manifestazione, possono influire negativamente sulla qualità seminale del verro spiegano improvvisi cali di fertilità.

Non ultimo la registrazione di tutti gli eventi rilevati permetterà all'allevatore di costituire un archivio storico dell'azienda che risulta molto utile nei programmi di gestione sanitaria.

Gestione dell'azoto liquido : Sicurezza dell'operatore






Sicurezza dell'operatore




Collocare i contenitori criogenici, contenenti azoto liquido In luoghi ben areati:

l'evaporazione di azoto gassoso provoca pericolo di asfissia per possibile residuo di ossigeno insufficiente per la normale respirazione del lavoratore. L'ambiente deve essere inoltre dotato di rubinetto con acqua fredda da utilizzare in caso di ustioni.

Utilizzo azoto liquido e sicurezza dell'operatore

 <p>Nessun contrassegno</p>	<p>Contrassegno di pericolo dell'azoto Non presente in quanto sostanza non classificata pericolosa E' comunque un ASFISSIANTE SEMPLICE E UN LIQUIDO USTIONANTE</p>
	<p>Pericolo per la presenza di basse temperature</p>
	<p>Pericolo di asfissia per possibile residuo di ossigeno insufficiente per la normale respirazione del lavoratore</p>

Dispositivi di protezione individuale

	<p>Nel caso di manipolazione di azoto liquido è obbligatorio l'uso della pettorina in quanto un movimento o una operazione errata può comportare la fuoriuscita di azoto liquido dal contenitore criobiologico</p>
	<p>Obbligo di uso di guanti di protezione Nel caso di manipolazione di azoto liquido è obbligatorio l'uso dei guanti in quanto un movimento o una operazione errata può comportare la fuoriuscita di azoto liquido dal contenitore criobiologico</p>
	<p>Cartello di obbligo di uso di visiera di protezione Nel caso di manipolazione di azoto liquido è obbligatorio in quanto un movimento o una operazione errata può comportare lo schizzo di azoto liquido con possibili ustioni dell'operatore nonché proteggere gli occhi da eventuali scoppi delle paillettes</p>

Valeria Bornaghi

Istituto Sperimentale Italiano "L.Spallanzani"

via per la Tamburina

26027 Rivolta d'Adda (CR)

0363 78883

valeria.bornaghi@istitutospallanzani.it