



Qualità del seme bovino e sua gestione in allevamento

Valeria Bornaghi

Istituto Spallanzani, Rivolta d'Adda (CR)

INFO_BOV_1_SECONDA PARTE

MATERIALE PARTECIPANTI

EVENTI DEL 06/02/2019 E DEL 24/01/2020

SEMINARIO

Migliorare le prestazioni riproduttive nella bovina da latte

Mercoledì 6 Febbraio 2019 - ore 10.00 - 12.15
Aula Magna dell'Istituto Agrario Statale "Gaetano Cantoni"
Viale Merisio, 17/C - Treviglio (BG)

Evento informativo (INFO_BOV_1) previsto nell'ambito del progetto PSR Regione Lombardia «NEW4REP-Tecnologie innovative nella riproduzione bovina e suina per una nuova redditività dell'allevamento lombardo: azioni informative e dimostrative», organizzato dal CREA Centro di Ricerca Zootecnia e Acquacoltura di Lodi e dall'Istituto Spallanzani di Rivolta d'Adda (CR), in collaborazione con l'Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (ARAL) e rivolto agli allevatori e agli studenti dell'Istituto ospitante.

PROGRAMMA

- 10.00 - 10.10 **Introduzione e presentazione progetto PSR NEW4REP**
- 10.10 - 10.30 **Sensori di PLF: gestione, benessere e fertilità bovina**
(Francesca Petrerà, CREA)
- 10.30 - 10.50 **Tecnologie di produzione e caratteristiche del seme bovino congelato convenzionale, sessato e a lento rilascio**
(Valeria Bornaghi, Istituto Spallanzani)
- 10.50 - 11.05 **Pausa caffè**
- 11.05 - 11.20 **Gestione del seme bovino e possibili danni cellulari**
(Valeria Bornaghi, Istituto Spallanzani)
- 11.20 - 11.40 **Nuovi schemi di selezione della Frisone Italiana**
(Giulio Visentin, ANAFIJ)
- 11.40 - 12.05 **Obiettivi e schemi riproduttivi a livello aziendale**
(Emanuele Cavalleri, LP)
- 12.05 - 12.15 **Discussione e chiusura dei lavori**

La partecipazione è GRATUITA, ma a numero chiuso e riservata agli allevatori della Lombardia. PER REGISTRARSI: inviare una mail con i nomi dei partecipanti e dell'azienda agricola a francesca.petrera@crea.gov.it - o telefonare al: 0371 - 450104.
Ai presenti saranno rilasciati **attestato di partecipazione e materiale informativo**.

CORRETTA GESTIONE AZIENDALE E VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEL SEME BOVINO CONGELATO

Venerdì 24 Gennaio 2020

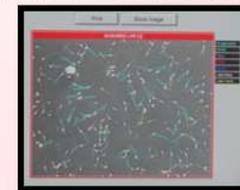
Presso: ISTITUTO SPALLANZANI

Via per la Tamburina – Loc. La Quercia, 26027 Rivolta d'Adda (CR) (Coordinate navigatore: 45.443645,9.520050)

Ore 10.00 – 12.00 (INFO_BOV_1)

Evento Informativo

- Tecnologie di produzione e caratteristiche del seme bovino congelato convenzionale, sessato e a lento rilascio.
- Gestione del seme e possibili danni cellulari.



A CURA DI: Valeria Bornaghi, Graziella Bongioni e Roberto Puglisi.

La partecipazione è GRATUITA e rivolta agli allevatori della Lombardia. Per motivi organizzativi è richiesta l'ISCRIZIONE: mandare una e-mail a valeria.bornaghi@istitutospallanzani.it oppure telefonare al **0363-78883 int.230**, indicando i nomi dei partecipanti e il nome e l'indirizzo dell'azienda agricola. Ai presenti sarà rilasciato un **ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE**.



Consiglio per la ricerca in agricoltura
e l'analisi dell'economia agraria



In collaborazione
con



MISURA 1. - "Trasferimento di conoscenze e azioni di
informazione"-

SOTTOMISURA 1.2 - "Sostegno a attività dimostrative e azioni
di informazione"

OPERAZIONE 1.2.01 - "Progetti dimostrativi e azioni
di informazione"

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

Responsabile del progetto: *Francesca Petrera*, CREA-Centro di Ricerca Zootecnia e Acquacoltura, Lodi

CONTATTI: francesca.petrera@crea.gov.it; www.crea.gov.it; tel: 0371 450104

Questa presentazione è stata realizzata dall'autore VALERIA BORNAGHI per gli allevatori, i tecnici e gli studenti degli ITAS della Regione Lombardia nell'ambito del progetto PSR NEW4REP. La stessa può essere utilizzata solo per scopi non commerciali e sempre citando l'autore e l'evento informativo per cui è stata prodotta. Sono vietati la riproduzione, distribuzione, pubblicazione, copia, trasmissione, adattamento ecc. dei contenuti della stessa, senza autorizzazione del responsabile.



PSR LOMBARDIA
L'INNOVAZIONE
METTE RADICI
2014 2020

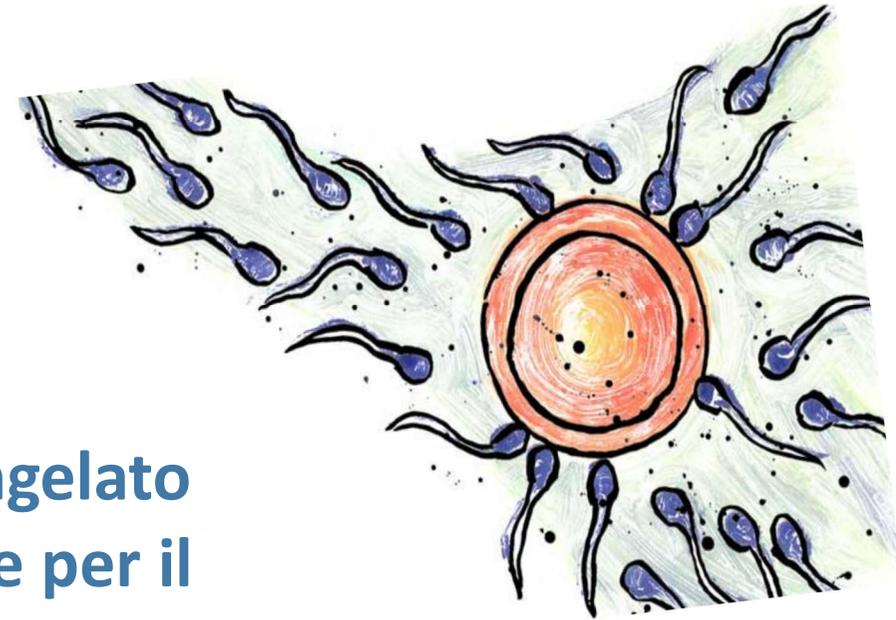


Regione
Lombardia

Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

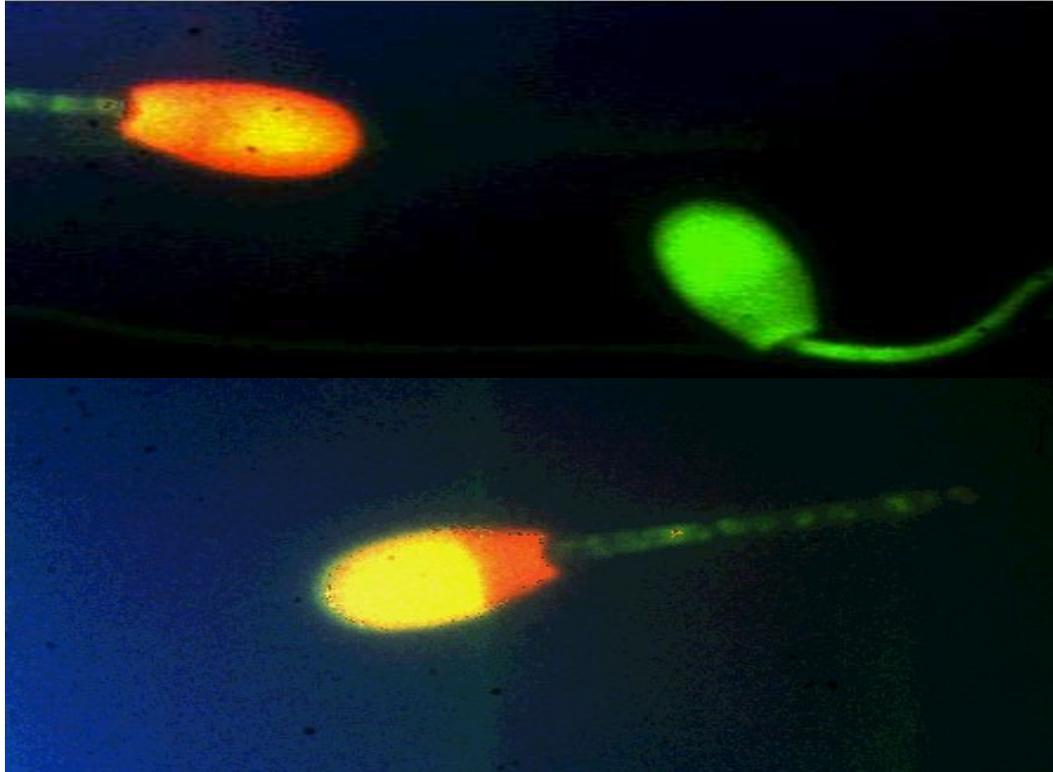


L'inseminazione artificiale si basa sull'uso di Seme Congelato



**Pertanto le caratteristiche del seme congelato
risultano essere un requisito importante per il
successo dell'inseminazione**

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 !!!**



TESTA

CODA

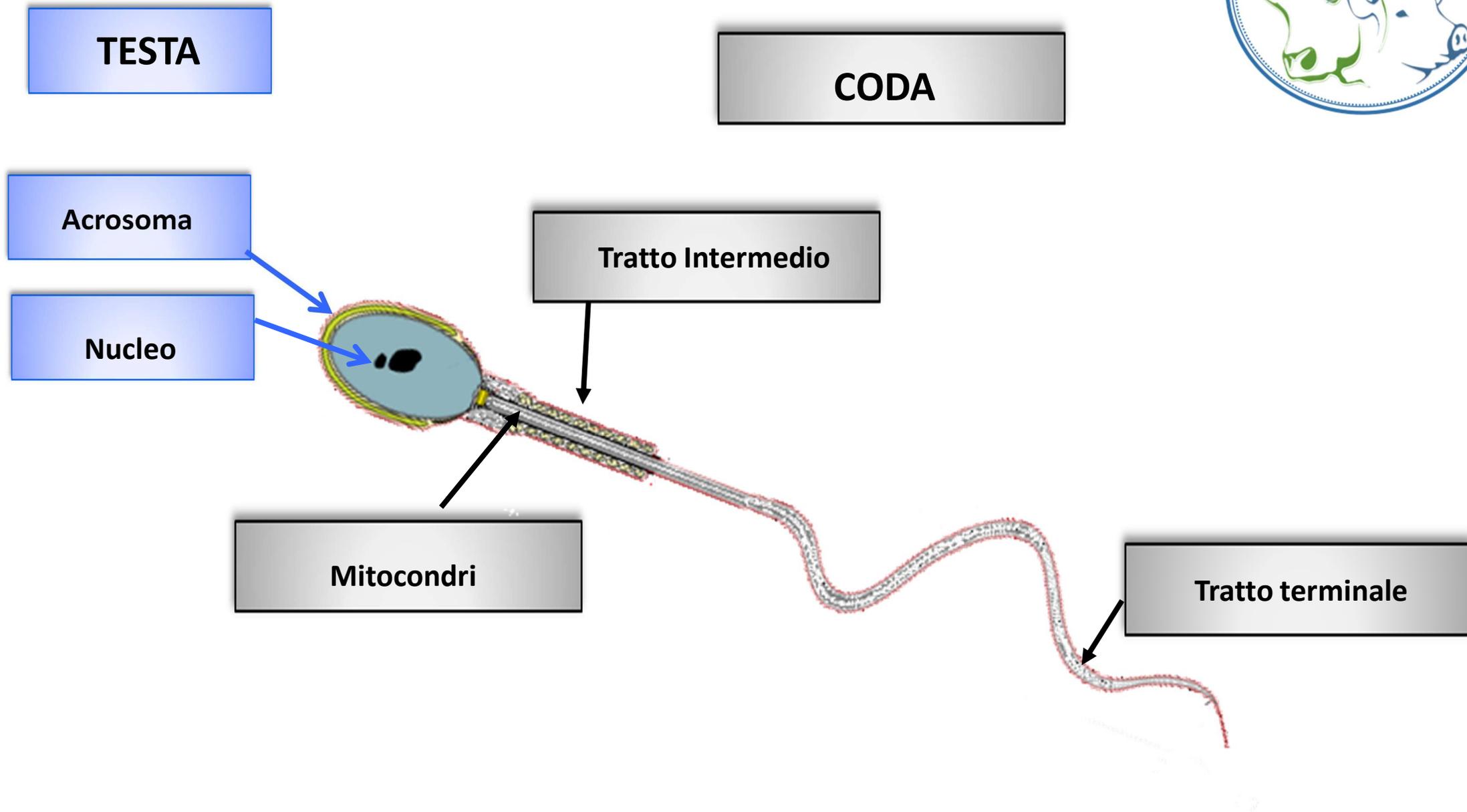
Acrosoma

Nucleo

Tratto Intermedio

Mitocondri

Tratto terminale



Un test seminale deve essere ...

- Oggettivo
- Accurato
- Preciso
- Applicabile di routine
- Economico





Caratteristiche del seme

- Concentrazione
- Motilità
- Morfologia
- Membrane Integre
- Acrosomi Integri
- Fluidità della Membrana
- Attività Mitocondriale
- Stato della Cromatina

Analisi Standard

Analisi Avanzata



Concentrazione e Integrità di Membrana



Numero di spermatozoi totali
per unità di volume



Percentuale di spermatozoi
con membrane integre

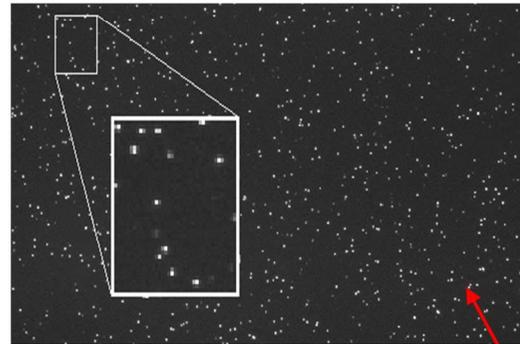
NucleoCounter SP-100



Composto da:

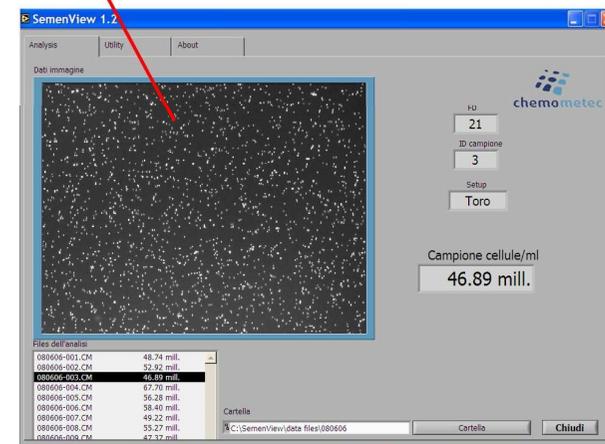
- ✓ Microscopio a fluorescenza
- ✓ Campionatore
- ✓ Analizzatore d'immagini statico

Concentrazione e Integrità di Membrana



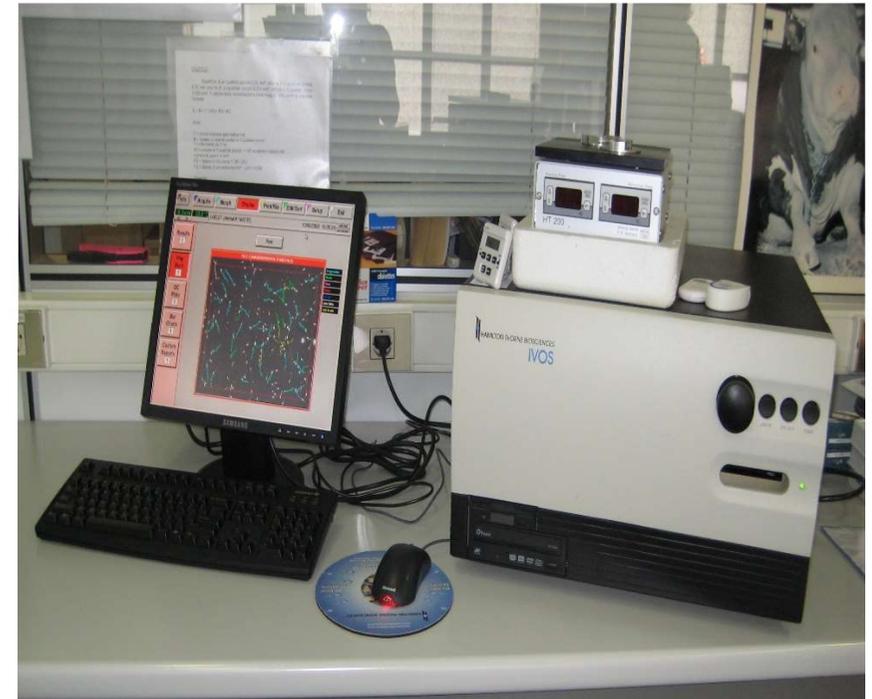
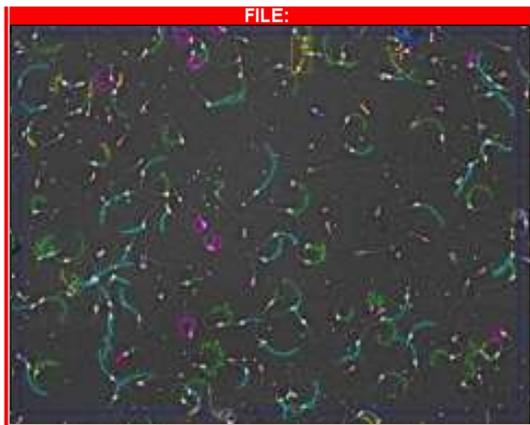
Conta delle singole
cellule colorate dopo
trattamento lisante

Viene utilizzato un dispositivo
specifico (cassetta) contenente
ioduro di propidio colorante
fluorescente che colora i nuclei
delle cellule morte

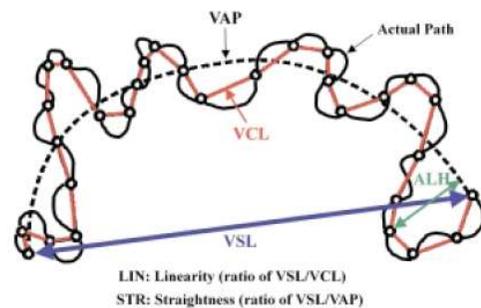


Motilità

L'analisi automatica d'immagine traccia il movimento degli spermatozoi rilevando gli spermatozoi nei fotogrammi successivi



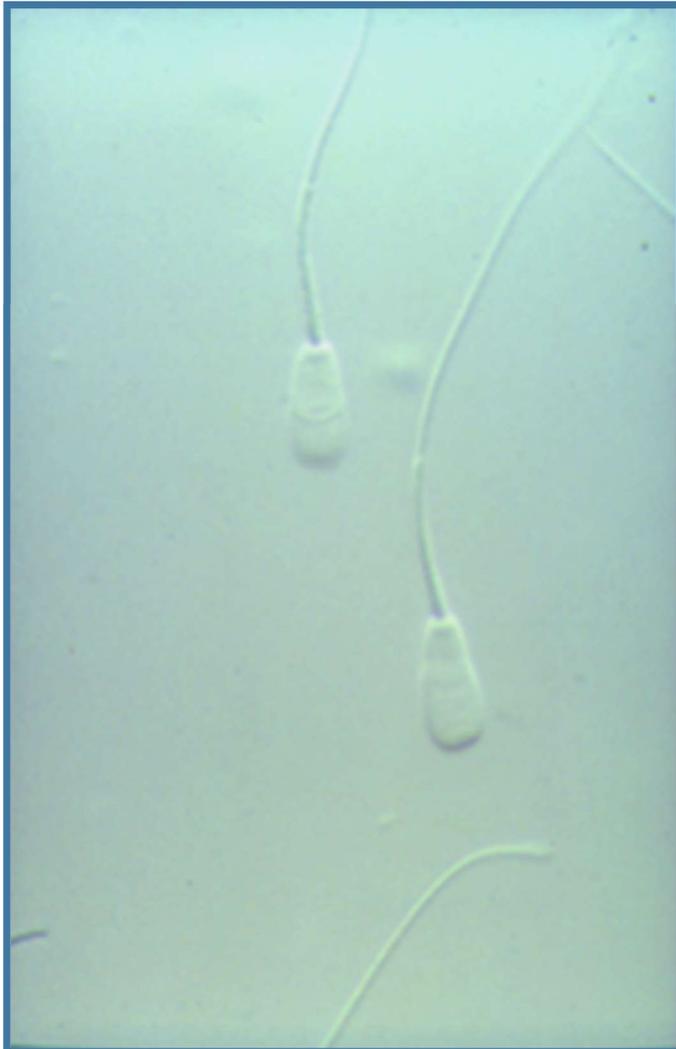
***HTM-IVOS CASA System
(Computer Assisted Sperm Analysis)***





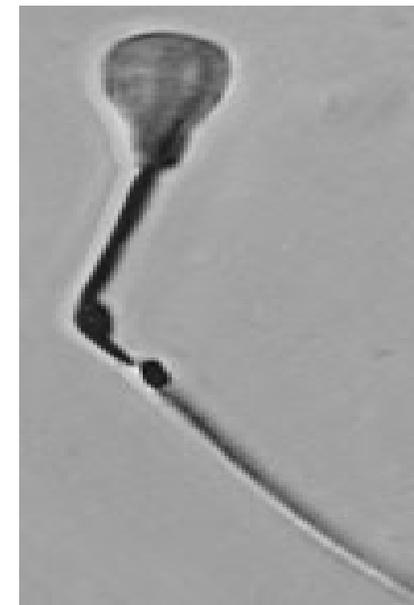
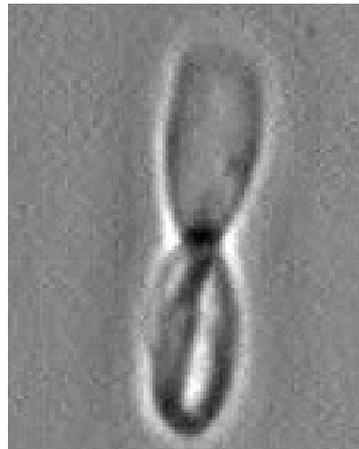
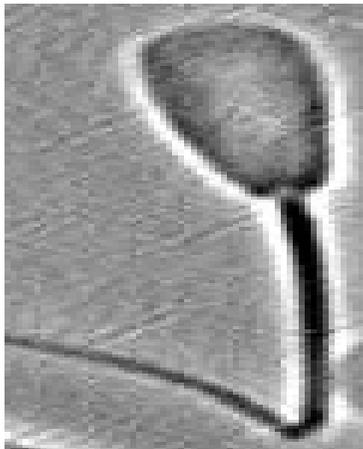
Morfologia

Valutazione tramite microscopio a contrasto differenziale interferenziale (1250 x).



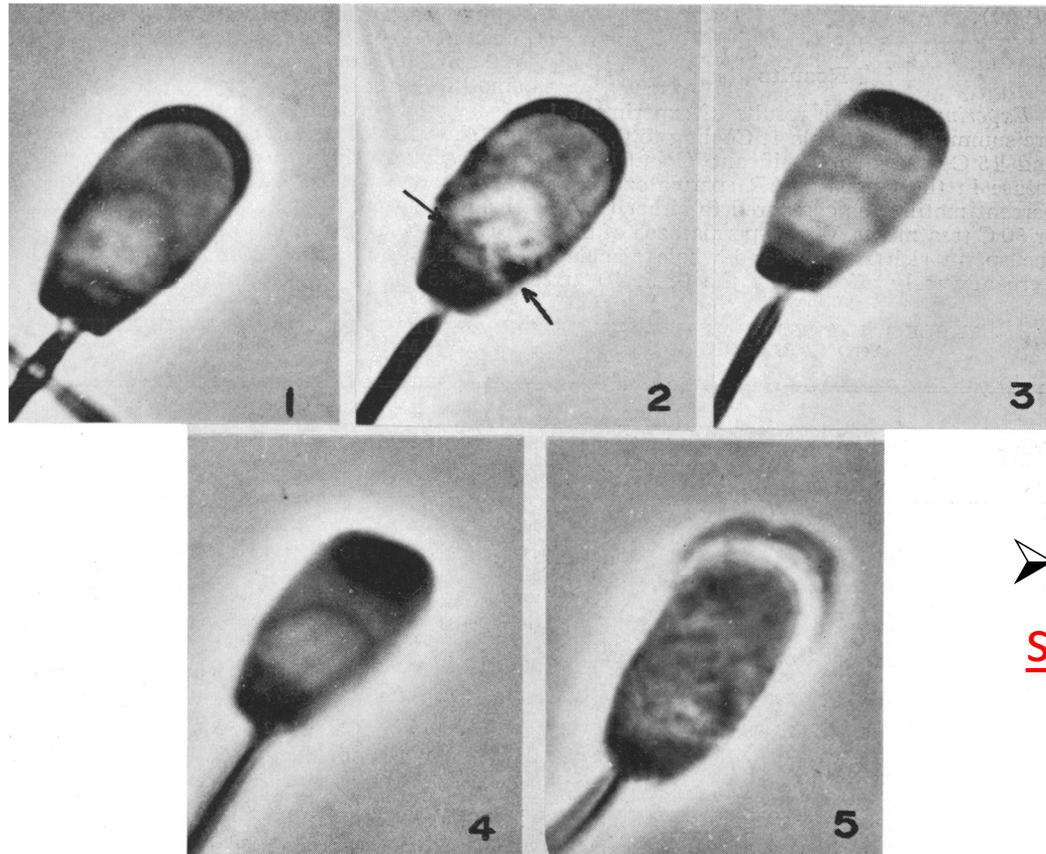
- ✓ Anomalie dell'acrosoma
- ✓ Anomalie della testa
- ✓ Anomalie della coda
- ✓ Gocce citoplasmatiche

- ✓ valutare la presenza di code anormali concorre alla definizione di:
 - alterazione del processo maturativo degli spermatozoi
 - invecchiamento cellulare da conservazione
 - osmolarità dell'extender non corretta



- ✓ valutare la presenza di gocce citoplasmatiche prossimali sulla coda dello spermatozoo concorre alla definizione di spermatozoi immaturi (maschi troppo giovani o eccessivamente sfruttati)

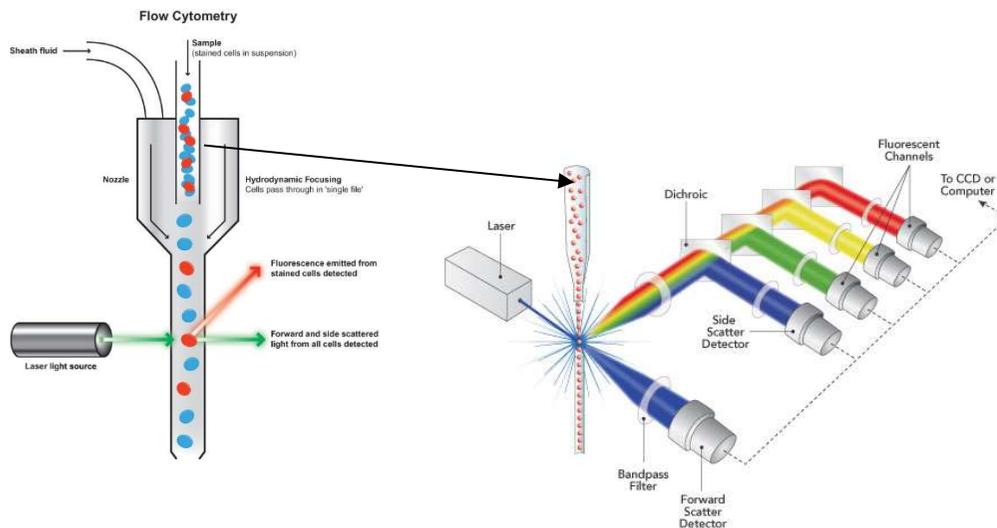
✓ valutare la presenza di anomalie dell'acrosoma sul seme lavorato
concorre alla definizione di:



➤ possibili shock termici da congelamento o
scongelo errati

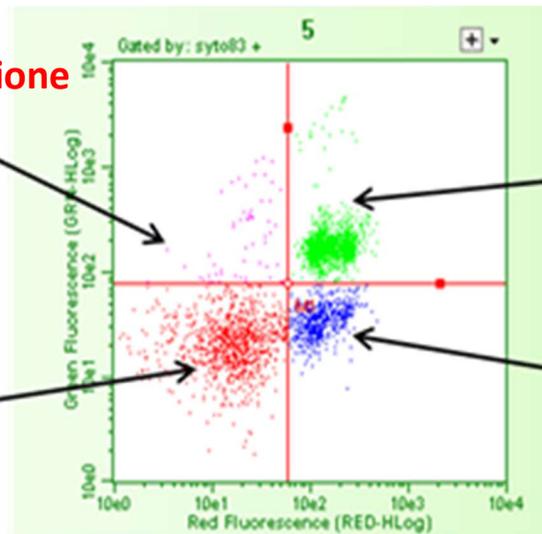
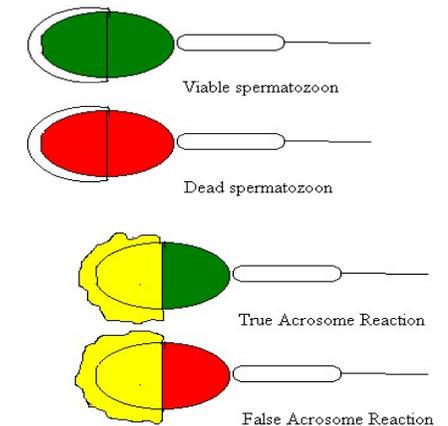
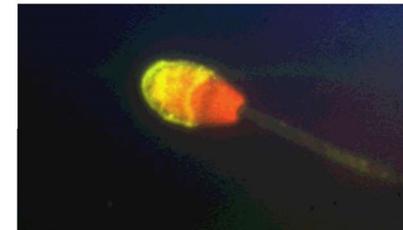
Analisi avanzata

Citofluorimetro EasyCyte



Integrita' delle Membrane e dell' acrosoma

La tripla colorazione permette la valutazione simultanea dell'integrità sia della membrana plasmatica che dell'acrosoma



Cellule in degenerazione

Membrane integre
acrosomi rotti

Vitali

Membrane integre
acrosomi integri

Morte

Membrane rotte
acrosomi rotti

Cellule in degenerazione

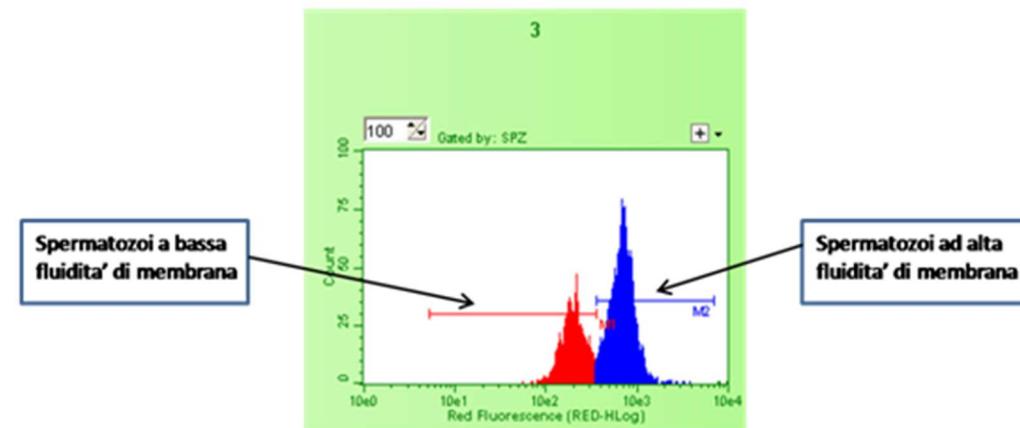
Membrane rotte
acrosomi integri

L'acrosoma è una grande vescicola sopra la testa dello spermatozoo e contiene enzimi necessari per la penetrazione nell'ovocita.

Fluidità della membrana

Valutazione dell'alterazione della componente fosfolipidica della membrana.

I cambiamenti della fluidità della membrana prima e dopo il processo di congelamento possono essere indicatori della congelabilità dello sperma.

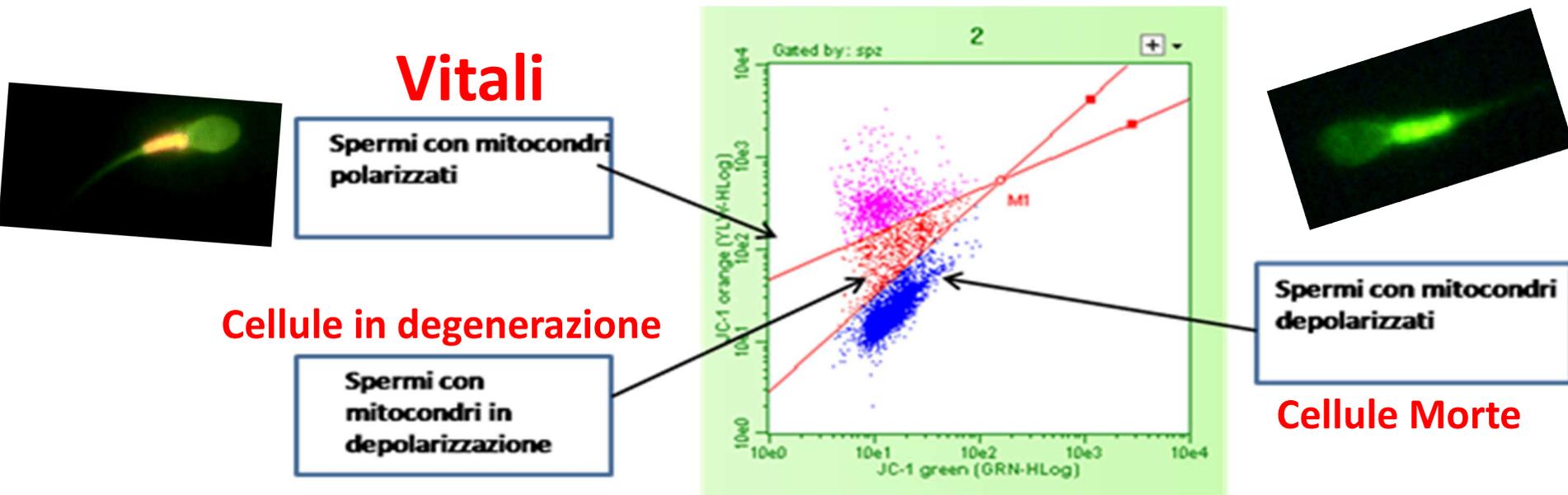


Gli spermatozoi eiaculati vanno incontro a cambiamenti nell'architettura delle membrane conosciuti con il termine di capacitazione (vera). Questo processo deve avvenire nel tratto genitale femminile affinché il gamete maschile possa penetrare l'oocita.

La capacitazione (falsa), perché non utile ai fini della fecondazione, può dipendere da alterazioni spermatiche provocate da manipolazioni del materiale seminale quali il congelamento

Funzionalità Mitocondriale

I mitocondri, situati nel segmento intermedio della coda, producono energia che viene utilizzata in maniera preponderante dallo spermatozoo per il mantenimento della motilità. Danneggiamenti a livello mitocondriale portano pertanto ad una immobilizzazione della cellula. La valutazione della funzionalità mitocondriale fornisce dati relativi allo stato metabolico della cellula





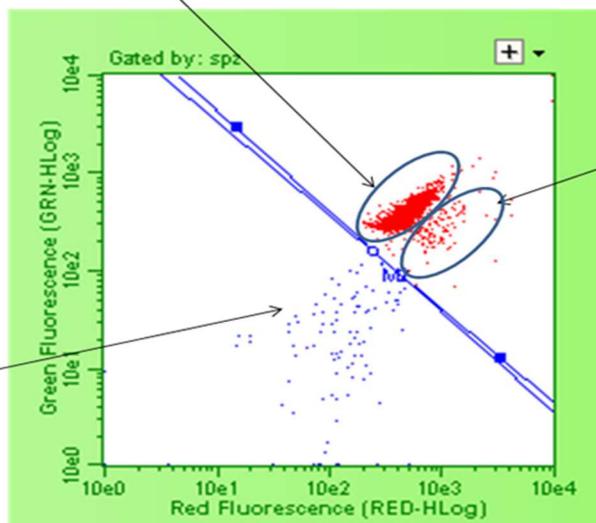
Stato della Cromatina Spermatica

La cellula germinale maschile può essere considerata un “corriere” particolarmente efficiente del DNA salvaguardato dalla cromatina strutturalmente molto compatta protettiva dello stesso.

Popolazione principale di spermatozoi avente cromatina ad uno stato altamente compatto

Popolazione principale di spermatozoi avente cromatina ad uno stato più lasso

Particolato escluso dall'analisi



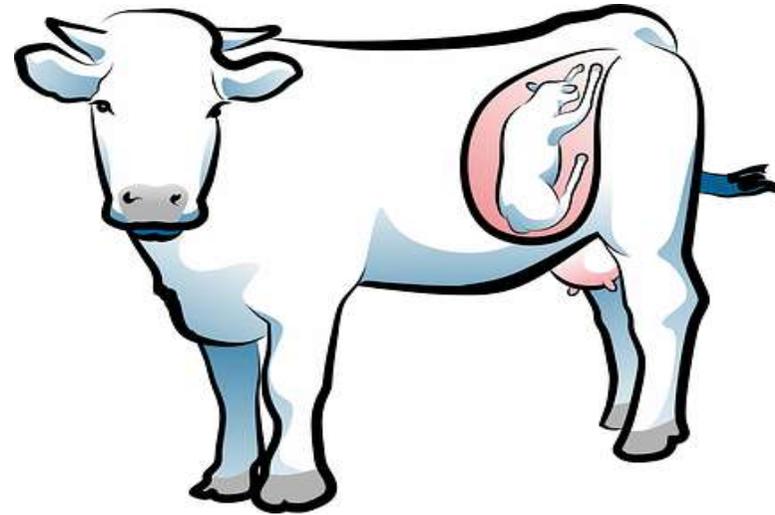
Le tecniche avanzate di analisi hanno permesso di notare un'alta correlazione tra ipofertilità e cromatina decondensata



Gestione del seme Bovino Congelato

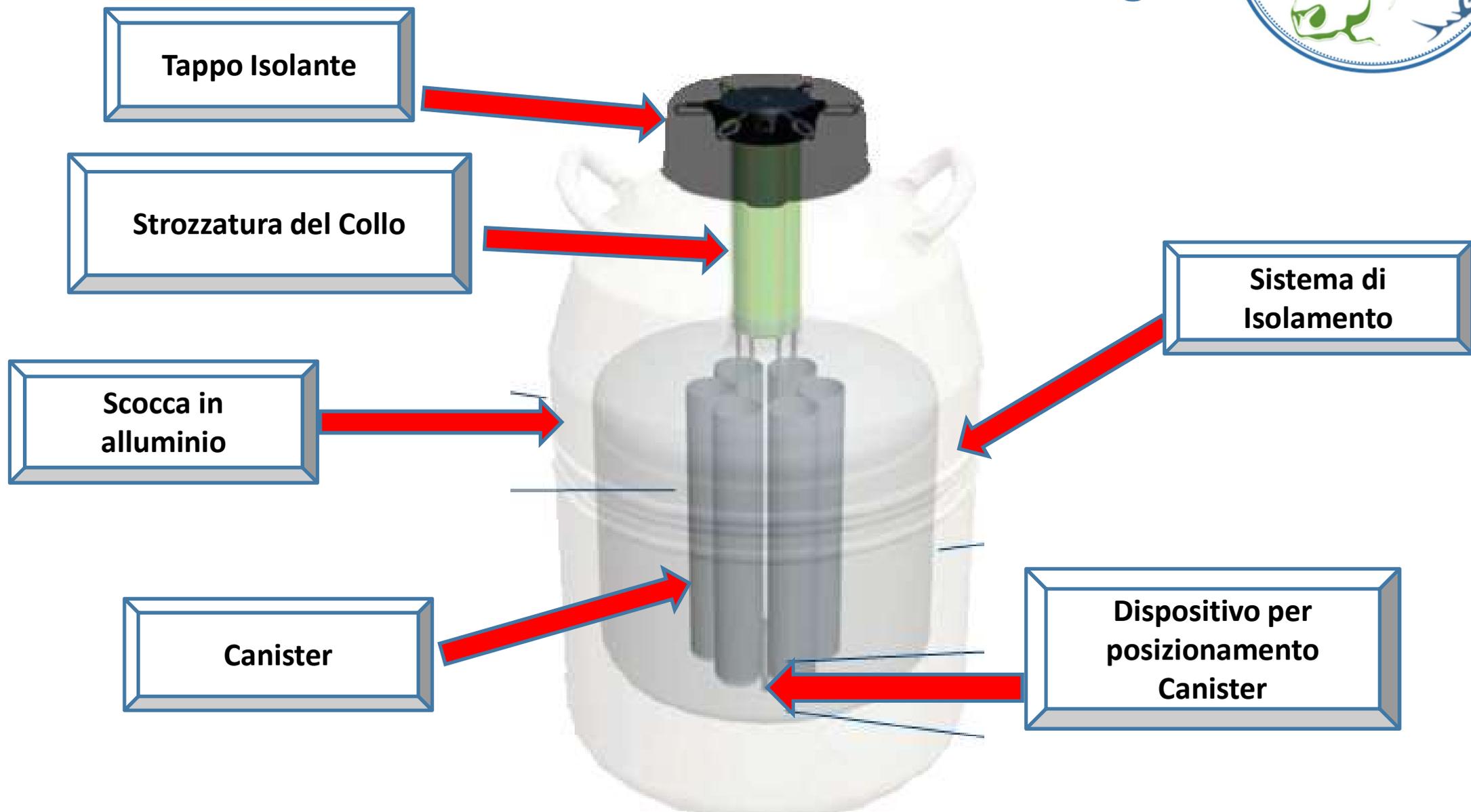
CENTRO TORI	AZIENDA
Crioconservazione:	Gestione:
✓ Convenzionale	✓ Conservazione
✓ Sessato	✓ Scongelamento
✓ Lento Rilascio	✓ Sicurezza
✓ Gestione dei dati	✓ Gestione dei dati

In Azienda*si può fare molto*



- ✓ Gestione del contenitore criobiologico
- ✓ Manipolazione delle paillettes
- ✓ Scongelamento RAPIDO (37°C)
- ✓ Tempo scongelamento vs inseminazione

Contenitore Criobiologico





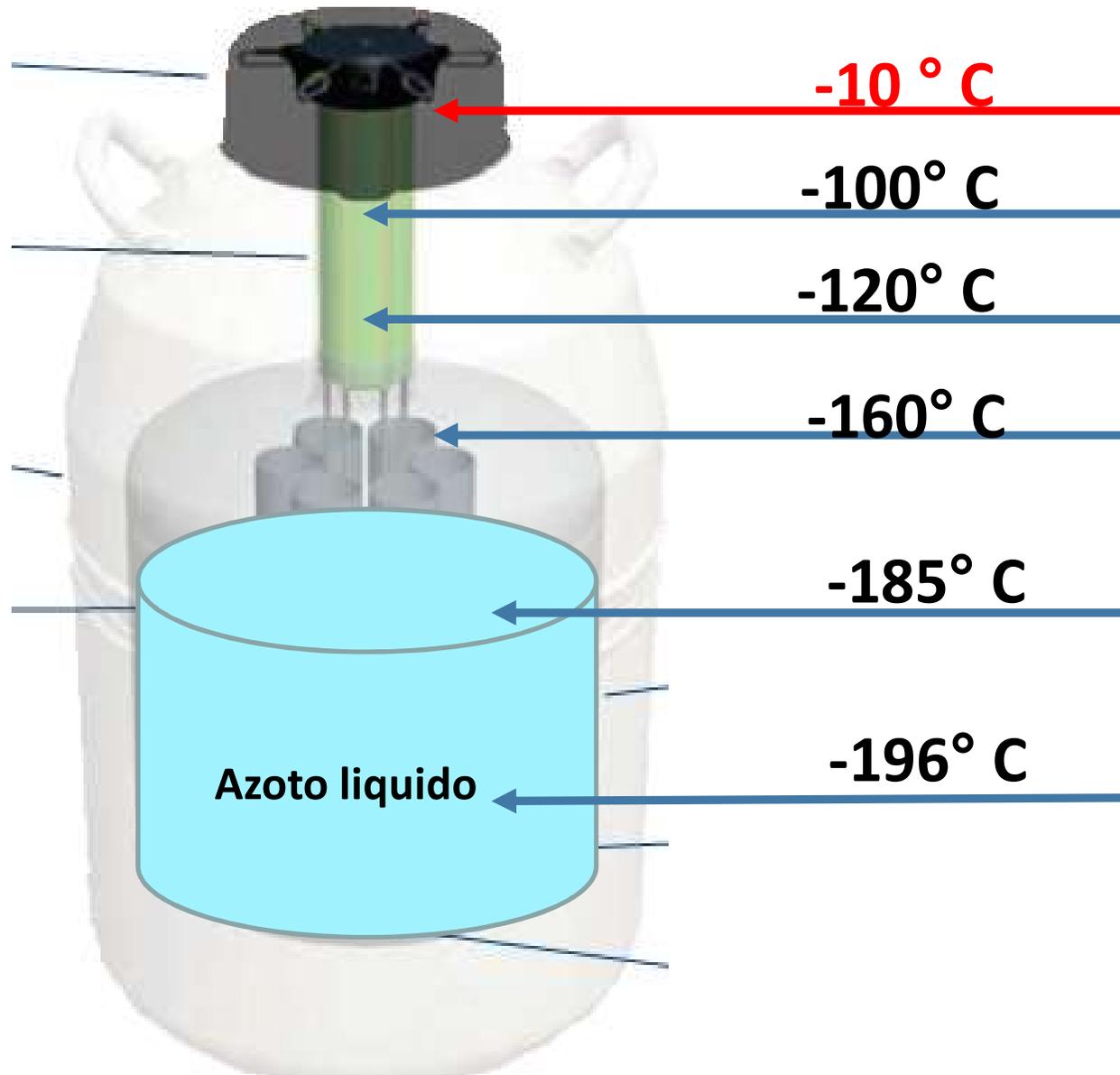
Manutenzione e controllo del contenitore criobiologico

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

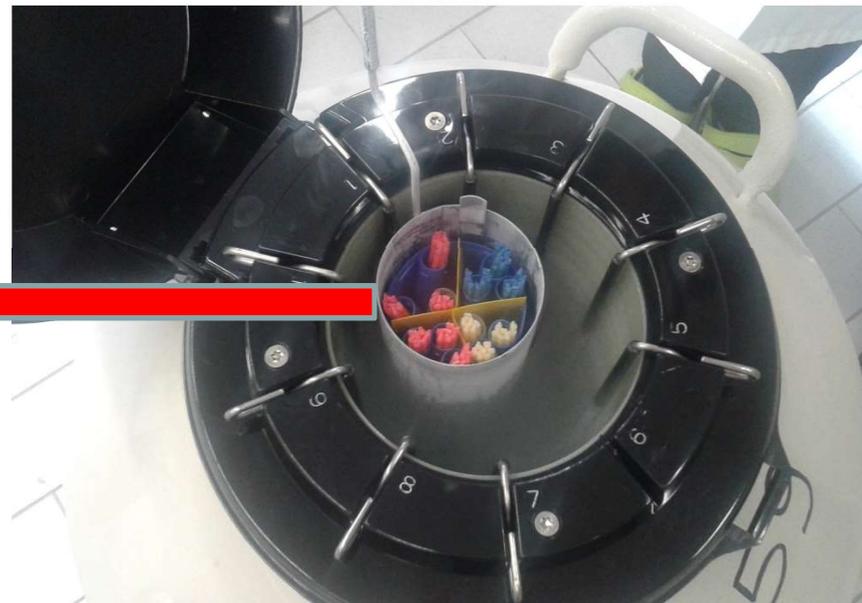
La presenza di ghiaccio sulla superficie esterna del bidone deve indurci a sospettare perdita di efficienza; in tal caso bisogna incrementare la frequenza dei controlli del livello ed eventualmente sostituire il contenitore

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 è in grado di deteriorare le caratteristiche qualitative degli spermatozoi, per l'inizio dei processi associati allo scongelamento.

Temperature



Foglio di archiviazione



L'identificazione rapida delle paillettes limita la manipolazione delle stesse (**rischio scongelamento**) e 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.

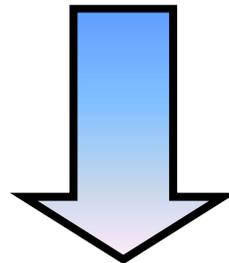


Scongelamento

CONGELAMENTO RAPIDO



SCONGELAMENTO RAPIDO



+ Spermatozoi Fecondanti



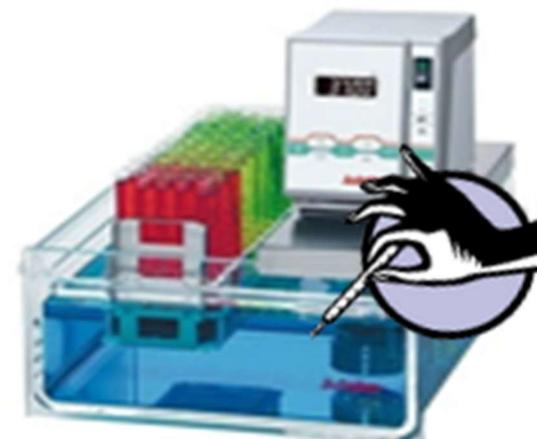
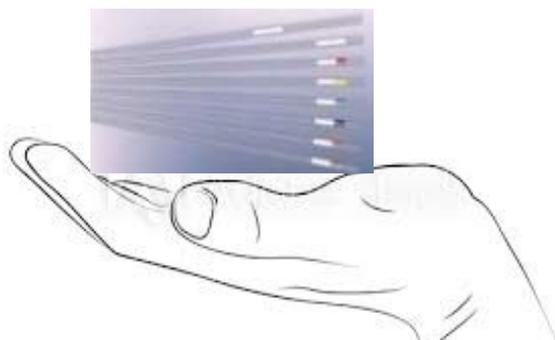
Punti Critici della crioconservazione

Formazione dei cristalli di ghiaccio nella fase iniziale di raffreddamento. (Centro di Produzione)

Allo scongelo, se il ripristino della temperatura non avviene con sufficiente rapidità, l'acqua libera rilasciata ha alte probabilità di tornare nuovamente nella forma cristallina, **danneggiando le membrane**. (Allevatore)

Lo scongelamento del seme è una fase fondamentale

Lo scongelamento deve essere eseguito in acqua con l'ausilio di un termometro a una temperatura compresa tra **34 e 38 °C**.





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

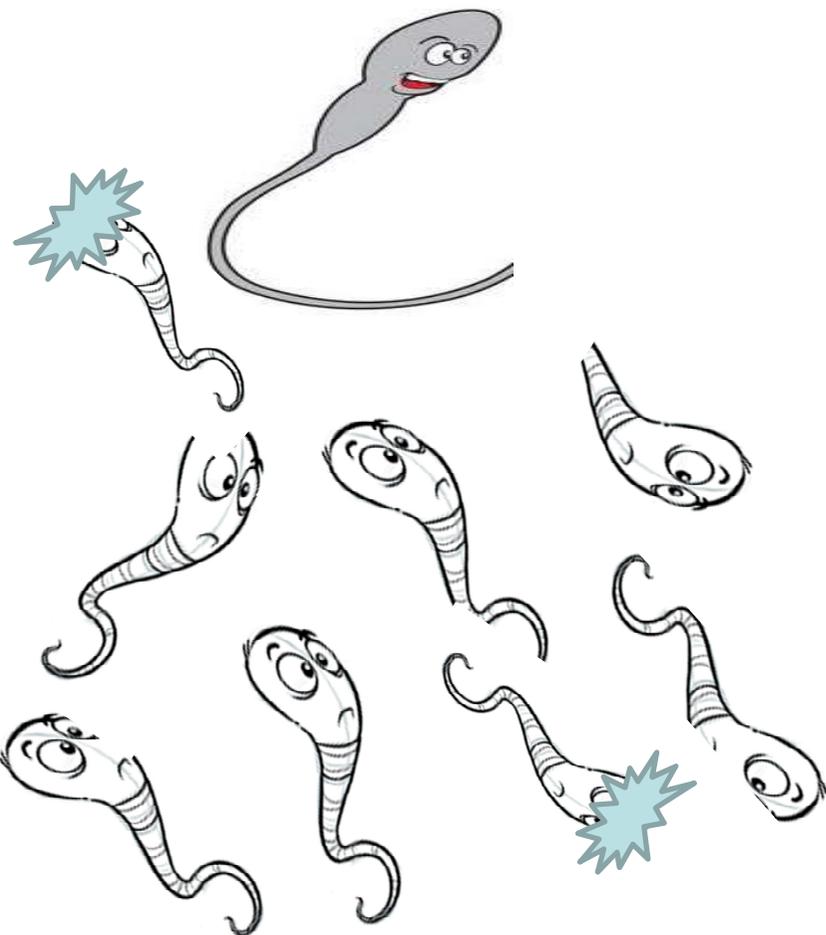
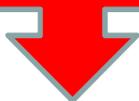
Seguire il protocollo di scongelamento

Estrarre dal contenitore solo le paillettes necessarie

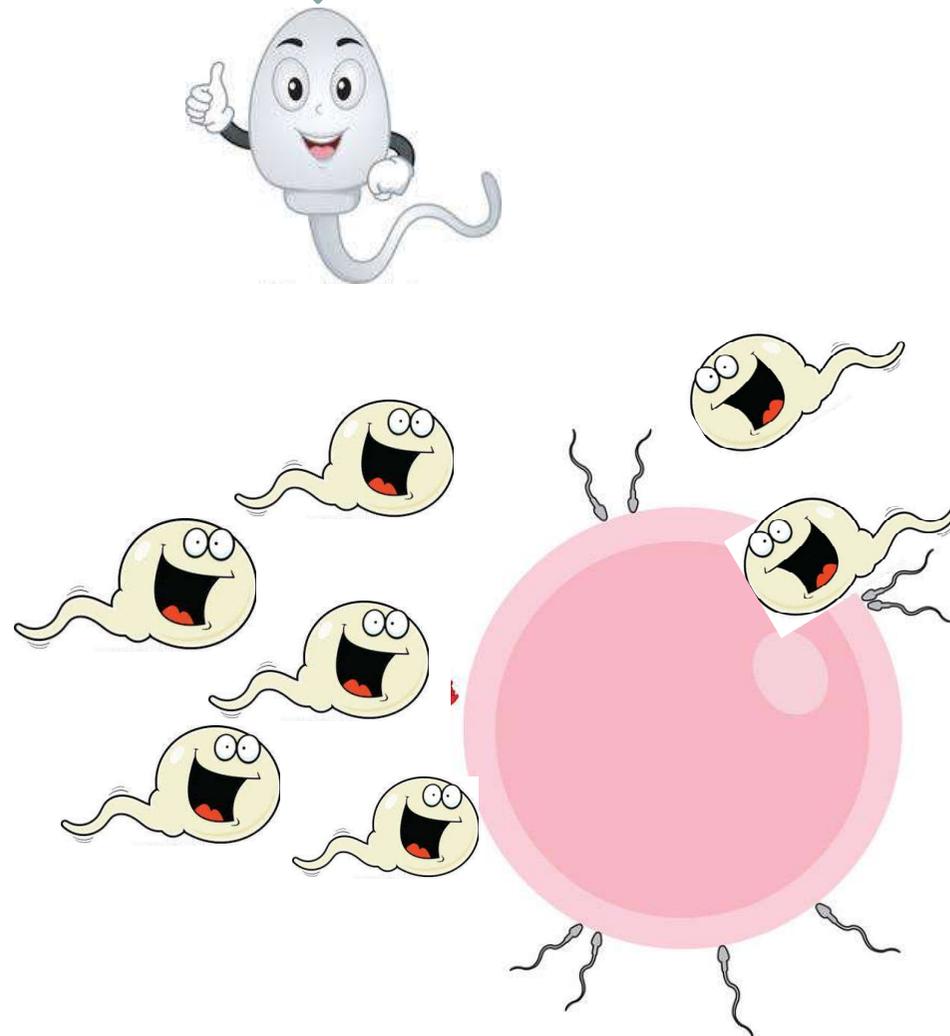
Estrazione rapida della paillette dal contenitore
evitare sbalzi termici - formazione ghiaccio = Danni cellulari

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

**Scongelamento
errato**



**Scongelamento
corretto**





Il seme in azoto è al sicuro ma l'operatore!!!??



Contrassegno di pericolo dell'azoto
Non presente in quanto sostanza non classificata pericolosa
E' comunque un *ASFISSIANTE SEMPLICE E UN LIQUIDO USTIONANTE*



Pericolo per la presenza di basse temperature



Pericolo di asfissia per possibile residuo di ossigeno insufficiente per la normale respirazione del lavoratore



Caratteristica	Pericolo
Si sostituisce all'ossigeno nell'aria	Asfissia La fuoriuscita di azoto liquido trasformandosi in gassoso provoca abbassamento della concentrazione di ossigeno nel locale. L'inalazione di vapori a bassa temperatura può comportare danneggiamenti ai polmoni e/o forte carenza di ossigeno
Bassa temperatura Temperatura -196° C	Ustioni da contatto Nel caso che il contatto sia prolungato le lacerazioni possono essere molto gravi in quanto dovute a congelamento dei tessuti Lesioni oculari Dovute a contatto con il liquido o vapore criogenico



Dispositivi di protezione individuale

	<p><i>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</i></p>
	<p><i>Obbligo di uso di guanti di protezione</i> <i>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</i></p>
	<p><i>Cartello di obbligo di uso di visiera di protezione</i> <i>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</i></p>



Pertanto.....

- ✓ Tenere il contenitore in un ambiente ben aerato;
- ✓ Per lo spostamento dei contenitori utilizzare sempre mezzi appropriati (per es. carrelli);
- ✓ Tenere il contenitore aperto il minor tempo possibile per evitare il pericolo di condensazione e formazione di gas;
- ✓ Maneggiare sempre l'azoto liquido con la massima cautela;
- ✓ Tenersi sempre ad una distanza di sicurezza dall'azoto per evitare schizzi o inutili inalazioni di gas.



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...)



Il Controllo Ufficiale del Seme

In Italia, la riproduzione animale nel settore zootecnico è regolata dalla legge n. 30 del 15 Gennaio 1991 "Regolamento di riproduzione animale" e il successivo emendamento n.280 del 3 Agosto 1999. Le modalità di attuazione di questa norma sono delegate al DDMM 403/2000 e al 27.12.94, che stabiliscono il controllo di qualità dello sperma congelato.

L'attività di "Controllo Ufficiale del Seme" è assegnata dal Ministero all'Istituto Spallanzani



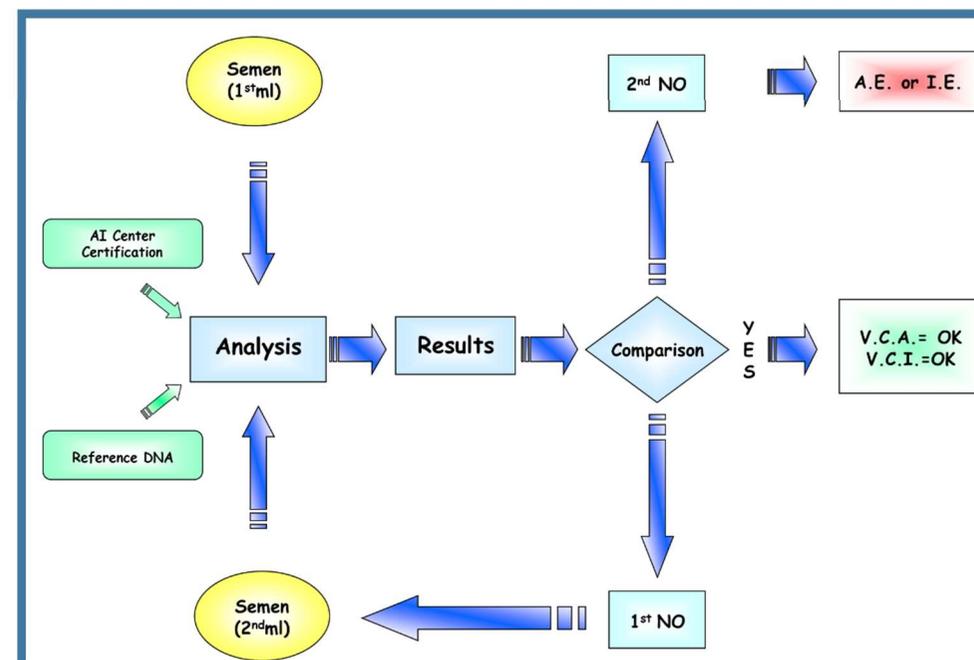


CERTIFICATO N° SC 17-4293

L'Istituto Spallanzani funge da esecutore tecnico del Ministero e delle Regioni a supporto della selezione in Italia.

Il CUS assicura che il seme congelato circolante in Italia:

- ✓ appartenga al riproduttore identificato sulle paillettes (Controllo dell'identificazione - VCI)
- ✓ sia correttamente autocertificato per la qualità (Controllo di autocertificazione - VCA).

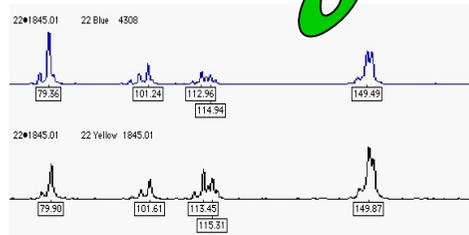


Controllo Ufficiale del Seme
 Sistema di gestione certificato a
 Norma UNI EN ISO 9001:2015

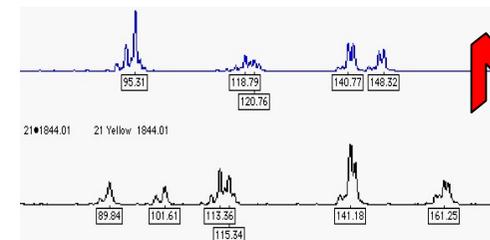
Identificazione - VCI



Confronto tra DNA ottenuto dal campione di riferimento e DNA estratto dal lotto di seme utilizzando microsatelliti secondo i pannelli ISAG. In caso di mancata corrispondenza il CENTRO deve distruggere tutte le paillettes del lotto



OK



NO



Autocertificazione – VCA



Confronto tra numero di spermatozoi progressivamente mobili certificati dal CENTRO (cNSPM) e quello ottenuto da Spallanzani (sNSPM).

In caso di discrepanza, il CENTRO deve modificare i risultati dell'autocertificazione con i dati di Spallanzani.

Centro
produzione



Spallanzani



sNSPM
cNSPM < sNSPM

sNSPM
cNSPM > sNSPM

OK

VCA

NO



Alcuni numeri.....

Attività Controllo Ufficiale del Seme dal 1995 a oggi

422.322	lotti di seme caricati in apposito archivio
26.833	riproduttori codificati
4.022	campionamenti effettuati presso i CPS
50.018	lotti campionati
100.036	parametri seminali analizzati
124.420	analisi loci microsatelliti per il seme campionato
45.054	analisi loci per il materiale di riferimento
15.800	riproduttori contenuti nella Criobanca costituita

NOI CI SIAMO.....

