

Test di laboratorio per valutare la capacità riproduttiva del toro

VALUTAZIONE DEL SEME

Attrezzature minime necessarie

Le attrezzature minime necessarie per realizzare un'accurata valutazione del seme sono le seguenti:

- un microscopio con oculari 10X con placca termica, obiettivi 10X, 20X o 40X e necessariamente un obiettivo 100X. Non è necessario che il microscopio sia dotato di contrasto di fase, ma è consigliato;

- un sistema per mantenere il campione di sperma, i media e le diluizioni a 30-35 ° C. Può essere uno scongelatore delle fiale di seme, un bagnomaria d'acqua o uno scambiatore termico.

- micropipette, che consentono di misurare volumi da 7 a 10 µl, 40 µl e 4000 µl

Se, inoltre, si desidera determinare con precisione la concentrazione seminale, una camera di conta, un fotometro o un sistema CASA portatile sono modi relativamente economici per realizzare questo obiettivo.

Volume del seme

Il volume dello sperma viene misurato direttamente nel tubo di raccolta graduato. Si consiglia di farlo mediante pesatura e successiva conversione da peso a volume (corrispondente fattore di densità), a causa della difficoltà causata dalla presenza di schiuma e talvolta dall'inesattezza della scala graduata al momento della lettura diretta. Il volume medio di un eiaculato raccolto dalla vagina artificiale è di circa 8 ml. Con l'elettroeiaculazione, il risultato può essere molto variabile. Un aumento del volume dell'eiaculazione è stato descritto in ragione dell'età del toro fino a 7 anni, poi rimane pressoché costante fino ai 9-10 anni. Il volume dipende anche fortemente dalla stimolazione, dalla preparazione sessuale del toro e dal periodo di riposo sessuale cui è stato sottoposto. È noto fin dall'antichità che il primo eiaculato dopo un periodo di riposo sessuale contiene molti più spermatozoi rispetto ai successivi eiaculati. Alcuni tori, per una percentuale inferiore al

Arantxa Echegaray*,
Nicolas Escartin*,
Isabel Muñoz*,
Marta Guillén*,
Cristina Vittoria
Armanda Maraboli**,
Giovanni Gnemmi**, ***
*Humeco, Huesca (ES)
**Bovinevet Internacional,
Bovine Ultrasound Services &
Herd Management, Huesca (ES)
***Facoltà Veterinaria
Università Cattolica S.
Vicente Martir, Valencia, Dip.
Riproduzione

5%, accumulano sperma senescente nella coda dell'epididimo e nelle ampolle del dotto deferente. Quando finalmente eiaculano, questi tori possono dare fino a 20-40 ml di seme concentrato in una volta sola. La maggior parte degli spermatozoi sarà tuttavia morta e molte volte la percentuale di teste libere aumenta a causa della senescenza, ma la loro morfologia è normale [1].

Un toro azoospermico dovrebbe sempre essere oggetto di una attenta riflessione, per comprendere se è veramente azoospermico, oppure se questa situazione è il risultato di una raccolta maldestra, oppure se non possa dipendere dal fatto che si tratti di un toro che non risponde bene all'elettroeiaculazione; vi sono tori che trattengono il seme nel deferente (1%). In altri casi l'azoospermia dipende da una degenerazione testicolare, che può essere reversibile o irreversibile. Solo quest'ultima determinerebbe una prognosi definitiva di infertilità per un toro.

Volumi eccessivi si verificano in caso di eccessiva stimolazione delle ghiandole annesse, o per la contaminazione del seme con urina o sangue. Il colore del seme varia a seconda della concentrazione di spermatozoi. Il colore normale è bianco perlaceo di consistenza variabile (foto 1):

- cremoso (concentrazione > 1 miliardo di Spz/ml),



Foto 1. Differenti eiaculati di toro con una vasta gamma di sfumature bianco-giallastre.

- latteo (concentrazione 500-1.000 milioni di Spz/ml)

- acquoso (meno di 500 milioni di Spz/ml)

Il colore giallastro può essere dovuto a una dieta ricca di caroteni o a contaminazione di urina, mentre un colore rosso o rosa è dovuto alla presenza di globuli rossi o emoglobina; un colore brunoastro, può essere dovuto alla presenza di emosiderina o a una contaminazione batterica come *Escherichia coli*. La presenza di sangue può essere considerata normale quando viene eseguita l'estrazione del campione di sperma dopo aver effettuato un *citobrush* del fondo prepuziale per la diagnosi di *Trichomonas*. A volte la



Foto 2. Eiaculati di toro con diversi gradi di contaminazione da sangue.



Foto 3. Emoglobina nel seme rilevata con strisce reattive.

presenza di sangue è difficile da verificare ad occhio nudo o addirittura al microscopio se si ha una emolisi. In questi casi, l'uso di strisce reattive consente di determinare senza dubbio l'emospermia nascosta (foto 2, 3).

pH seminale

Un pH compreso tra 6,8 e 7,4 è considerato normale e non influenza in modo significativo la qualità dello sperma. Un pH basso (5,5), riduce la mobilità degli spermatozoi e l'integrità della membrana, mentre un pH più elevato (8,5), provoca l'immobilizzazione degli spermatozoi attraverso una riduzione significativa della loro attività mitocondriale [2]. Il pH del seme ottenuto per elettroiaculazione è leggermente superiore a quello ottenuto con la vagina artificiale, ma sempre all'interno dell'intervallo che consente la massima espressione di motilità (7,4-7,6). La contaminazione urinaria dell'eiaculato può far variare il suo pH verso l'alto o verso il basso. Tutto dipenderà dal tipo di alimentazione dell'animale. Un pH elevato appare quando l'urina proviene da un animale nutrito con foraggio [3], mentre un pH neutro o acido potrebbe apparire in un animale alimentato con concentrato. Anche le infezioni delle vescicole seminali influenzano il pH: un'infezione può causare variazioni del pH [4], che possono ridurre la motilità e la vitalità degli spermatozoi.

CONCENTRAZIONE SPERMATICA

La concentrazione di sperma è definita come il numero di spermatozoi per millilitro di eiaculato.

Protocollo

Concentrazione spermatica con camera di conteggio

Le camere di conteggio sono vetrini da microscopio modificati; hanno una grigliatura sui due lati e il quadrato più piccolo misura 50 micron di lato. Un vetrino copri-oggetto viene aggiunto a un'altezza di 100 micron. In questo modo si ottiene una camera di volume noto. In questa camera, il campione di sperma viene diffuso per azione capillare e si contano il numero di spermatozoi in un determinato numero di quadrati e il numero di spermatozoi per unità di volume viene calcolato usando una formula. Le soluzioni per la camera di conteggio devono avere formalina

Tabella 1			
	Volume di seme puro	Volume di acqua o SSF formulato	Tasso diluizione
Toro	40 µl	3960 µl	1/100

o un altro fissativo per determinare la morte degli spermatozoi poiché, ovviamente, sarebbe impossibile per noi contarli mentre sono in movimento. Un'alternativa alla



Foto 4. Immagine di griglia nella camera di Burker (OB 40X). I quadrati da 50 micron sono disposti in file (in blu).

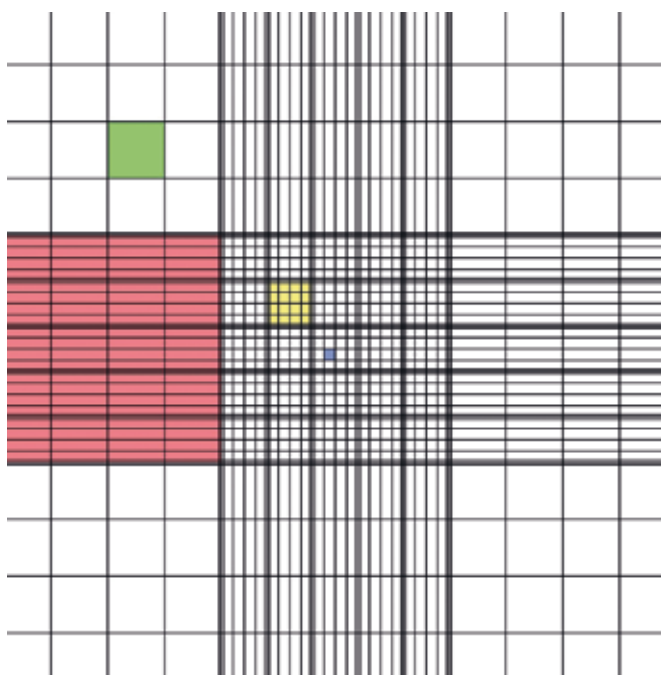


Foto 5. Griglia di una camera Neubauer, che mostra l'unità di area: cornice laterale da 50 micron (blu) e cornice laterale da 200 micron (giallo).

formalina ancora più economica e migliore è usare l'acqua corrente. L'acqua è spermicida ed impedisce anche la formazione di grumi di sperma. Il tasso di diluizione scelto è direttamente correlato al numero di spermatozoi per campo: questo non dovrebbe essere troppo alto o troppo basso perché renderebbe il conteggio molto più difficile/più lungo. In linea di principio, a meno che il campione di sperma puro non sia di per sé molto diluito, la diluizione più comoda per valutare lo sperma di toro è una diluizione di 1/100 (tabella 1).

L'eiaculato viene omogeneizzato 6 volte, utilizzando contenitori e/o pipette di precisione. Devono essere utilizzati solo recipienti di misurazione esatti: pipette di vetro graduate, pipette per ematocrito, matracci tarati. La camera di conteggio viene adeguatamente preparata. Per questo, il vetrino coprioggetto verrà posizionato a pressione o con l'aiuto della pinza della camera. Un modo per verificare che il vetrino sia stato posizionato correttamente è la comparsa di iridescenza sotto pressione sui lati del vetrino, i cosiddetti "Anelli di Newton". La camera viene riempita dall'alto e dal basso con una quantità compresa tra 6-10 µl di campione diluito su ciascun lato della camera. Il conteggio dovrebbe essere effettuato dopo la sedimentazione dello sperma, ovvero 10-20 minuti dopo la preparazione del campione.

Una volta messa a fuoco la camera di conteggio (obiettivo 20X o 40X) conteremo lo sperma da 80 piccoli quadrati (quadrati da 50 x 50 micron). Tutti i modelli di camere di conteggio (*Burker, Neubauer, Enhanced Neubauer, Thoma*) contengono questa unità di misura, ma differiscono nella disposizione spaziale: in file (*Burker*) o raggruppate in 4-5 quadrati distribuiti diagonalmente più grandi (*Thoma, Neubauer, Enhanced Neubauer*) (foto 4 e 5).

Quando si contano gli spermatozoi, esiste una convenzione: non contare gli spermatozoi le cui teste si trovano sui limiti inferiore sinistro e quelle sui bordi superiore destro. Quando avremo finito di contare avremo un numero N. Deve essere fatto un doppio conteggio su entrambi i lati della camera, realizzando una media di entrambi. Verrà poi applicata la formula corrispondente per ogni camera.

Concentrazione spermatica per fotometria

Per determinare la concentrazione mediante fotometria, il campione si dovrà diluire secondo le indicazioni presenti nel manuale dello strumento.

Per questa diluizione, il latte o altra soluzione non trasparente non devono essere utilizzate, poiché introducono un'opacità aggiuntiva nel campione, causando una sovravalutazione del risultato. Il raggio di luce del fotometro passa attraverso la *cuvetta* in cui è posizionato il campione e la quantità di luce che non passa attraverso il campione (assorbanza) è correlata da una formula matematica alla concentrazione di spermatozoi.

Valori minimi

La concentrazione di spermatozoi in un eiaculato raccolto mediante elettroeiaculazione può essere influenzata da una varietà di fattori e pertanto, non esiste un valore minimo della concentrazione di spermatozoi per la valutazione della capacità riproduttiva. Si verificheranno basse concentrazioni in caso di degenerazione testicolare, animali molto giovani o bassa risposta all'elettroeiaculazione.

Considerazioni importanti

Le camere di conteggio sono un metodo economico per il calcolo della concentrazione di spermatozoi, sebbene più lento rispetto ad altri metodi disponibili: sono necessari 10-15 minuti per campione, se viene seguito il protocollo appropriato.

Queste camere sono il metodo più accurato per il conteggio degli spermatozoi poiché vengono contati direttamente. Pertanto, per la maggior parte dei laboratori e per la specie umana, rappresenta il metodo standard o "gold standard". Tuttavia vanno anche considerati alcuni limiti di questa determinazione: il possibile errore umano nel conteggio, il fatto che il numero di spermatozoi contati è limitato e il tempo che si deve dedicare a questa valutazione. Esiste una relazione tra la precisione del conteggio e il numero di spermatozoi contati: il protocollo richiede il conteggio di almeno 200 spermatozoi per campione.

Quando si utilizzano telecamere, fotometri o sistemi CASA, è necessario seguire un protocollo di diluizione rigoroso realizzato con strumenti di precisione. Nella nostra esperienza, una pipetta non verificata è quasi sempre la fonte di errori sistematici per molti laboratori di spermatologia. La procedura di verifica è semplice, economica e può essere eseguita da qualsiasi medico con l'aiuto di una bilancia di precisione.

PRODUZIONE SPERMATICA

La produzione di sperma di un toro, è il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato e si ottiene moltiplicando il volume dell'eiaculato per la sua concentrazione di spermatozoi. Cercare di mettere in relazione la produzione di sperma di un toro con il suo volume testicolare ha i suoi limiti:

1. Solo un toro sottoposto a un regime di estrazione regolare produce un numero di spermatozoi stabile. In un toro in monta naturale, sarebbe necessario effettuare in anticipo diverse raccolte successive, fino a quando l'animale non ha esaurito le sue riserve epididimali e i volumi prodotti si sono stabilizzati [5].

2. L'elettroeiaculazione può causare una perdita fino al 20% della produzione di spermatozoi nella raccolta, per eiaculazione retrograda alla vescica urinaria (6). Si verificheranno basse produzioni in caso di degenerazione testicolare, animali molto giovani o bassa risposta all'elettroeiaculazione.

MOTILITÀ SPERMATICA

Motilità di Massa

La motilità di massa è il parametro che esprime la quantità di movimento ondoso presente in un campione di seme non diluito, in funzione sia della concentrazione dello sperma che della motilità individuale.

Il protocollo

Prima di estrarre una quantità di sperma per la valutazione, il campione deve essere ben miscelato nel contenitore originale, girando delicatamente 6 volte. Per prelevare il campione, utilizzare una pipetta. Aspirare e rilasciare più volte prima di prelevare il campione da osservare. Il pipettaggio non danneggia lo sperma, purché non si formino delle bolle. Metteremo una goccia di seme puro in un vetrino porta oggetti preriscaldato e osserveremo la goccia al microscopio con una placca riscaldata con l'obiettivo 10X, usando il campo luminoso.

Si vedranno le onde prodotte dal movimento dello sperma. Maggiore è la forza dell'onda, maggiore è la qualità dello sperma. Esistono diversi sistemi di classificazione, che aggiungono ancora più variabilità al risultato.



Foto 6. Sequenza di valutazione della motilità di massa. (a) Messa a fuoco con OB 10X (b) messa a fuoco sulla periferia della goccia (c) Messa a fuoco sulla zona centrale della goccia.

Tabella 2. Valori minimi. La motilità di massa può essere classificata in 5 livelli a seconda del modello d'onda osservato

Descrizione	Classificazione	Punteggio
Movimento onda rapido	Molto Buono	5
Movimento onda lento	Buono	4
Oscillazione generalizzata	Regolare	3
Oscillazione sporadica	Povero	2
Senza movimento	Nulla	1

Tabella 3. Diluizione da effettuare per la prova di motilità individuale totale e progressiva

Aspetto eiaculato	Diluizione	Volume seme (µL)	Volume diluente (µL)
Cre moso	1/40	10	390
Latteo	1/20	10	200
Latteo diluito o non cremoso	1/2	10	10
Liquido trasparente	Osservare senza diluire		

Il protocollo dovrebbe essere sempre lo stesso per tutti gli esami e, se possibile, anche per l'osservatore che li esegue (foto 6, tabella 2).

Considerazioni importanti

È un metodo economico e semplice da eseguire, ma è necessario prendere alcune precauzioni per ottenere risultati affidabili e ripetibili. Dobbiamo sempre standardizzare il nostro metodo e, se possibile, sarebbe bene che ci fosse sempre lo stesso tecnico ad eseguire il test. Per la valutazione della motilità di massa, la goccia di sperma valutata dovrebbe sempre avere le stesse dimensioni. Una goccia di 5-10 µL è una dimensione adatta. Tutto il materiale da utilizzare, deve essere ad una temperatura di 37 ° C (piastra riscaldante o fornello). La motilità di massa dipenderà soprattutto dalla temperatura e dalla concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato. Un eiaculato con pochi spermatozoi può avere valori di motilità di massa molto bassi, sebbene la maggior parte dei suoi spermatozoi si muovano vigorosamente. Uno sperma con una buona concentrazione può avere una bassa motilità di massa se il tempo di osservazione è prolungato di oltre 20 secondi.

A causa della grande variabilità cui questo parametro è soggetto, le linee guida di diversi paesi per la valutazione dell'attitudine riproduttiva dei tori lo escludono come parametro discriminatorio della fertilità, preferendo parametri come la motilità individuale progressiva.

Motilità individuale totale e progressiva

La motilità totale è la percentuale di spermatozoi che si muovono, indipendentemente dalla loro velocità o modello

di movimento.

La motilità progressiva: lo sperma si muove attivamente, in modo lineare o in un ampio cerchio, indipendentemente dalla velocità.

La motilità non progressiva: tutti gli altri schemi di motilità senza progressione, ad esempio, nuotando in piccoli cerchi, la forza flagellare sposta a malapena la testa o quando è possibile osservare solo un battito flagellare. Immobilità: percentuale di spermatozoi senza movimento.

Il protocollo

Per valutare la motilità individuale, la concentrazione ideale del campione dovrebbe essere tra 25-50 x 10⁶ Spz/ml. Per sapere quale diluizione fare, dobbiamo guardare all'aspetto del seme puro. La diluizione da eseguire è indicata di seguito a seconda dell'aspetto iniziale dell'eiaculato (tabella 3).

Dopo la diluizione, omogeneizzeremo nuovamente il campione. Prenderemo una goccia di 6-10 uL con la micropipetta e la posizioneremo su un vetrino preriscaldato. Quindi posizioneremo un vetrino copri oggetto sopra la goccia.

Osserveremo la goccia al microscopio con una placca termica con l'obiettivo 20X-40X. Per mettere a fuoco, è conveniente chiudere completamente il diaframma di campo chiaro o, se disponibile, lavorare in contrasto di fase. Pertanto, aumenta il contrasto dello sperma con lo sfondo. Dovrebbero essere esaminati 5 campi attorno al centro del coprioggetto, facendo la media delle percentuali osservate.

La motilità sui bordi del vetrino si riduce più rapidamente a causa della disidratazione e dell'esposizione all'aria, quindi i bordi devono essere evitati.

Il flusso del fluido tende a spingere lo sperma immobile verso la periferia, mentre lo sperma più vigoroso rimane nella zona centrale. Pertanto, è anche conveniente evitare la zona centrale (figura 1).

Compaiono tre gruppi di spermatozoi: immobile, mobile progressivo e mobile non progressivo. La percentuale di spermatozoi non mobili sul totale sarà stimata in ciascun campo e sarà calcolata la media. Detta percentuale verrà sottratta dal 100% per ottenere i dati per la percentuale di sperma mobile totale. I dati sulla motilità progressiva si riferiscono alla percentuale di spermatozoi che si muovono in un percorso rettilineo e in avanti, rispetto al totale.

Considerazioni importanti

Il diluente utilizzato non deve alterare il modello di motilità degli spermatozoi. Le guide raccomandano spesso prodotti commerciali specifici per il seme di toro. È anche possibile utilizzare latte parzialmente scremato o soluzione salina. Se la goccia di sperma su cui viene esaminata la motilità è troppo grande o spessa, l'osservatore vedrà più strati di fluido contemporaneamente e, in queste

condizioni, la percentuale di motilità tende sempre a essere sopravvalutata. Il modo per ottenere un singolo strato di celle di circa 20 micron di spessore è quello di utilizzare volumi più grandi, in ragione del diametro del vetrino copri oggetto utilizzato:

- 6-7 microlitri per coprioggetto di 18x18 mm;
- 8 microlitri per copri oggetto di 20 x 20 mm;
- 10 microlitri per copri oggetto di 22 x 22 mm.

La motilità individuale totale e progressiva cambia con il tempo di conservazione, la temperatura e il mezzo utilizzato per diluire il campione di sperma. Se si osserva la motilità individuale su seme fresco, si raccomanda la sua diluizione in uno specifico diluente per seme di toro. Il siero fisiologico o il latte parzialmente scremato possono servire come seconda opzione.

Se il test di motilità individuale deve essere eseguito con ritardo, ma sempre il giorno della raccolta, lo sperma deve essere diluito in un rapporto 1:1 (½ diluizione) nel mezzo di conservazione e mantenuto a temperatura ambiente (18-24 °C) fino all'osservazione. Se il campione viene titolato il giorno dopo la raccolta, l'eiaculato (o parte dell'eiaculato) deve essere diluito nel mezzo di conservazione in un rapporto di 1: 4 (diluizione 1/5).

Lo sperma refrigerato deve essere attivato prima di valutare la motilità individuale. Il tempo di attivazione raccomandato è di 20 minuti a 37 °C. Con un tempo più breve il movimento dello sperma non sarà progressivo.

Nella preparazione (sperma + diluente) si possono anche osservare altri elementi, come accumuli di spermatozoi, agglutinazioni di spermatozoi, cellule di sfaldamento della pelle o dell'uretra, cellule rotonde, batteri, granuli di polline, ecc. In caso di osservazione di un numero significativo di cellule rotonde, si consiglia di eseguire una colorazione Diff Quik o Giemsa per discriminare il tipo di cellula o elemento in questione: leucociti (infezione), cellule del ciclo meiotico (degenerazione testicolare, ecc. ...

VALORI MINIMI

La SFT stabilisce una percentuale minima del 30% di sperma mobile progressivo per un toro fertile. Il progetto di legge spagnolo suggerisce valori del 60% di sperma progressivo per seme fresco, 40% a 6 ore e 30% a 24 ore (comunicazione personale). Questo parametro è

discriminante, quindi deve essere valutato in 2 campioni diversi per lo stesso toro. Quando la differenza tra entrambe le valutazioni supera il 10%, verrà effettuato un terzo test. In tutti i casi, il valore assegnato a ciascun parametro sarà la media delle valutazioni effettuate.

MOTILITÀ OGGETTIVA: SISTEMA COMPUTERIZZATO DI ANALISI SPERMATICA (CASA)

La valutazione soggettiva della motilità degli spermatozoi è soggetta ad errore umano, che ha portato allo sviluppo di metodi automatizzati oggettivi. I sistemi CASA trovano la loro utilità nonostante il loro costo elevato (15.000-50.000 euro). Di recente, i sistemi portatili, portatili accoppiati a tablet stanno entrando nel mercato a costi molto più bassi. Questi dispositivi registrano sequenze video di un campione posto al microscopio e utilizzano algoritmi matematici per ricostruire la traiettoria di ogni singolo spermatozoo rilevato. Ogni sperma è classificato come mobile o immobile e viene calcolata anche la sua concentrazione. Inoltre, la motilità è valutata in dettaglio, ottenendo i seguenti parametri: MOT = motilità totale (%), PMOT = motilità progressiva (%), VCL = velocità curvilinea media, VAP = velocità media del percorso, VSL = velocità rettilinea media, Rettilineità (STR = VSL/VAP), Linearità (LIN = VSL / VCL), ALH = Ampiezza dello spostamento laterale della testa, BCF = Frequenza del battito della coda.

Naturalmente, questi sistemi determinano automaticamente la concentrazione di spermatozoi in modo molto preciso, a causa dell'elevato numero di spermatozoi che possono essere contati. I modelli attuali hanno anche la possibilità di ottenere le percentuali di anomalie della coda, della goccia prossimale e della goccia distale, sebbene la precisione e l'accuratezza di queste applicazioni di studio sulla morfoanomia rimangano indeterminate. La concentrazione alla quale un campione di sperma deve essere valutato nel sistema CASA è tra 25-60 x 10⁶ spz/ml, pertanto, il più delle volte sarà necessaria una diluizione dell'eiaculato con un mezzo appropriato.

MORFOLOGIA SPERMATICA

Il test di morfologia degli spermatozoi valuta i difetti nelle dimensioni e nella forma delle

diverse parti dello spermatozoo: la testa, pezzo intermedio e il flagello.

Protocollo

A nostro avviso, la migliore tecnica per valutare la morfoanomia degli spermatozoi è la colorazione con eosina-nigrosina. Questa tecnica è molto economica, può essere utilizzata con semplici microscopi a campo chiaro, consente un migliore posizionamento dello sperma, rispetto alla tecnica di fissazione della glutaraldeide e consente anche una visualizzazione più chiara degli acrosomi. Esistono più di 10 protocolli o formule per la preparazione della colorazione con eosina-nigrosina. I più adatti sono la formula di Hancock e Mortimer, perché la loro formulazione dà un composto che rasenta l'iso-osmolarità (250 mOsm/L), cioè perché la loro quantità di soluti è simile a quella del siero o del seme (300 mOsm/L) [7].

Per l'implementazione del protocollo, sia i vetrini copri-oggetto che porta-oggetto che l'eosina-nigrosina sono scaldati a 37-38 °C prima dell'uso.

Per fare la colorazione con eosina-nigrosina dobbiamo posizionare una piccola goccia di sperma

(da 4 a 10 µL) su un'estremità del vetrino, aggiungere un'altra goccia dello stesso volume della soluzione di eosina-nigrosina (entrambi alla stessa temperatura) e mescolare. Dopo un'incubazione massima di 30 secondi, la miscela viene distribuita sull'intero vetrino con l'aiuto di un altro vetrino porta-oggetto o copri-oggetto. Osservare sotto un microscopio a campo chiaro o a contrasto di fase con OB 100X e olio a immersione.

Per lavorare con una precisione adeguata (coefficiente di variazione inferiore al 10%), almeno 200 spermatozoi devono essere valutati in ciascun campione. Se ciò non è possibile, a causa di vincoli di tempo, è interessante sapere che, una volta effettuata l'estensione, la colorazione con eosina-nigrosina viene mantenuta a temperatura ambiente per mesi, quindi è sempre possibile effettuare una valutazione ritardata.

La colorazione con eosina-nigrosina consente inoltre di diagnosticare l'integrità strutturale del plasma

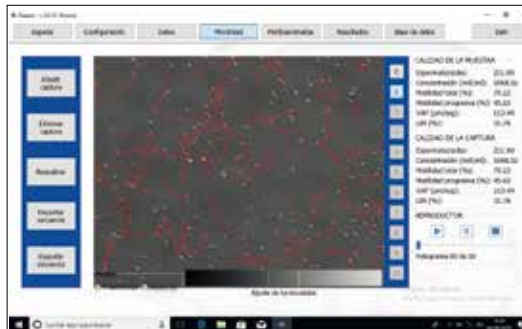


Foto 7. Analisi CASA.

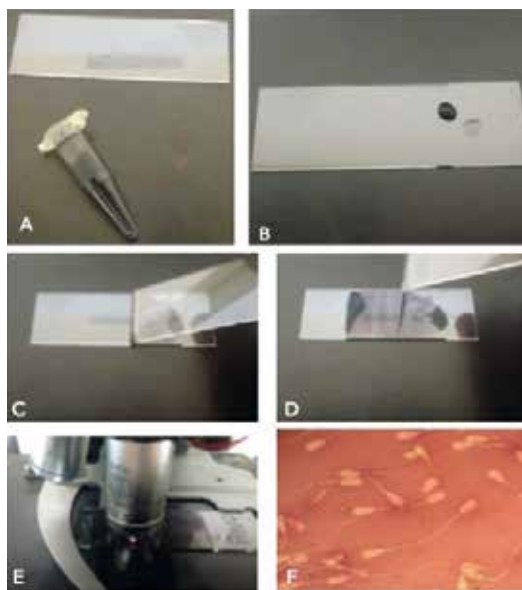


Foto 8. (a) Pre-riscaldamento dei vetrini e della colorazione (b) inserimento delle gocce di seme e di colorante sul vetrino (c, d) estensione della miscela (e, f) osservazione al microscopio.

e delle membrane acrosomiali. Uno sperma con una membrana plasmatica danneggiata apparirà macchiato di rosso. Allo stesso modo, anche un acrosoma danneggiato avrà lo stesso colore. Un danno significativo alla membrana di solito indica shock termici, variazioni del pH e/o osmolarità (ad esempio nella vesciculite) (foto 8).

Seguendo le raccomandazioni dello standard spagnolo, vengono preparati due campioni per ciascun toro. Le 2 valutazioni devono essere eseguite in percentuale e in doppio, contando 200 spermatozoi per campione. Quando la differenza tra entrambe le valutazioni supera il 10%, verrà effettuato un terzo campione. In tutti i casi, il valore assegnato a ciascun parametro sarà la media delle valutazioni effettuate.

TIPI DI ANOMALIE

Le anomalie dello sperma sono state classificate inizialmente in base alla loro origine in primarie, se originate da spermatogenesi, secondarie, se si verificano durante il transito attraverso il canale riproduttivo o terziarie, se originate dopo l'eiaculazione.

Questa classificazione è stata rivista dando origine ad una seconda classificazione che divide le anomalie in maggiori o minori, in base al loro effetto sulla fertilità. Infine, la classificazione più attuale sarebbe quella che divide le anomalie in compensabili o incompensabili, a seconda della possibilità di compensare la loro presenza nell'eiaculato con un aumento del numero totale di spermatozoi nelle dosi di inseminazione. Le prime sono quelle che impediscono allo spermatozoo di raggiungere gli ovidotti (ad esempio, le code piegate), mentre le seconde impediscono la fecondazione dell'ovocita e/o lo sviluppo embrionale precoce (ad esempio, goccia citoplasmatica prossimale).

Lo studio delle morfoanomalie degli spermatozoi ci dice molto sul riproduttore e sul suo passato immediato. L'età, la degenerazione testicolare influenzano il regolare sviluppo della spermatogenesi e la traccia di questo apparirà nell'eiaculato.

Anomalie di tipo testicolare

Macro e micro-teste

Sono teste molto più grandi o molto più piccole del normale e di solito contengono un numero anormale di cromosomi. In generale, a causa dell'esaurimento dei livelli di GnRH e testosterone, ma soprattutto come conseguenza dell'aumento della temperatura testicolare locale, nella meiosi compaiono alterazioni del fuso meiotico, che porta alla distribuzione disuguale dei cromosomi, che danno origine alla comparsa di sperma con micro e macro-teste.

Testa piriforme

Questa anomalia si sviluppa durante la fase spermatica, quando il nucleo si appiattisce e si allunga e la cromatina si condensa. Gli spermatozoi con teste piriformi hanno una ridotta capacità di legarsi e penetrare nella zona pellucida e quelli che fertilizzano con successo un ovocita hanno una ridotta capacità di produrre embrioni vitali.

Testa libera

Malformazione della piastra basale, una struttura di origine nucleare che copre la fossetta di impianto e collega la testa alla coda. A causa di questa anomalia, la testa e la coda sono tenute insieme solo dalla membrana plasmatica e in queste circostanze, la testa viene alla fine rilasciata, di solito quando lo sperma passa attraverso la rete testis o la testa dell'epididimo. In caso di vescicolite, epididimite o sperma vecchio possono apparire anche teste allentate. La diagnosi differenziale viene fatta rapidamente. La testa allentata a seguito di un processo degenerativo del testicolo apparirà accompagnata da altre anomalie importanti come le teste micro o teste piriformi. Anche molte micro-teste saranno poi teste libere. La testa libera a seguito di necrospermia o senescenza testicolare, apparirà in campioni di sperma con vitalità ridotta e un numero ridotto di acrosomi normali.

Spermatozoi con goccia prossimale

Quando ci sono problemi nella spermatogenesi, compaiono alterazioni nella formazione della goccia citoplasmatica prossimale che ne impediscono la corretta maturazione e la fanno rimanere nello spermatozoo eiaculato. Gli spermatozoi

con goccia prossimale non sono in grado di penetrare nella zona pellucida e, pertanto, questa anomalia sarebbe classificata come compensabile. Tuttavia, è stato dimostrato che la presenza di oltre il 30% di gocce prossimali in un eiaculato è un indicatore di immaturità [8], degenerazione testicolare [9] e/o bassa capacità di fecondazione e sviluppo embrionale che interessa l'intero eiaculato [10].

Vacuoli nucleari, acrosomi annodati o danneggiati

Inoltre, in misura minore, appariranno spermatozoi con vacuoli nucleari e acrosomi annodati. Gli spermatozoi con vacuoli nucleari sono meno in grado di legarsi e penetrare nella zona pellucida, ma, una volta penetrati, sono in grado di avviare e mantenere uno sviluppo embrionale precoce, suggerendo che queste anomalie sono compensabili. Sebbene l'acrosoma annodato (acrosoma *Knobbed*) sia stato descritto come un difetto genetico negli individui della razza Holstein, Angus e probabilmente Charolais [11], può apparire anche in piccole proporzioni, in qualche fase della degenerazione testicolare. Lo spermatozoo affetto da acrosoma annodato non è in grado di penetrare nella zona pellucida e, in quanto tale, è un'anomalia compensabile.

Cellule rotonde

Le cosiddette cellule rotonde, rilevate con il microscopio a campo chiaro o contrasto di fase, comprendono 3 tipi principali di strutture:

- 1) cellule della meiosi, da spermatociti agli spermatidi
 - 2) cellule immunitarie, in genere leucociti
 - 3) altri: globuli rossi, granuli di polline ecc.
- È importante differenziare i primi dagli altri, per i quali vengono utilizzate le colorazioni Giemsa o Diff Quick.

Altre alterazioni di origine testicolare

Possiamo trovare in piccole proporzioni, alterazioni nella formazione del tratto intermedio dello spermatozoo e nella sua connessione con la testa, dando origine a anomalie del tratto intermedio o gravi alterazioni nella formazione del flagello, come l'assenza di un flagello. La coda del moncone o "difetto del moncone della coda" è dovuta allo sviluppo vestigiale della coda durante una spermatogenesi anomala (foto 9-17) [12].

Anomalie con origine nell'epididimo

Le anomalie della coda sono quasi sempre di origine epididimale. Questa anomalia è compensabile e minore. I cambiamenti nella fluidità della membrana producono una flessione più o meno intensa del flagello, con conseguente flessione della coda in frusta, angolo retto o forcina (DMR). L'accumulo di liquido nella coda dell'epididimo può causare shock ipo-osmotico con l'arricciatura del flagello. Abbiamo rilevato casi cronici con alterazione fibrotica della coda epididimale di natura generalmente unilaterale.

La degenerazione testicolare può produrre, in modo secondario, anomalie nella forma del flagello, attraverso alterazioni dei livelli ormonali o come conseguenza della produzione di spermatozoi che a causa di difetti di struttura della membrana, sono predisposti a questo difetto. Dopo l'eiaculazione, l'esposizione dello sperma a un ambiente ipotonico (ad es. acqua che entra nella vagina artificiale o nel tubo di raccolta) o un ambiente troppo freddo durante la raccolta induce anche la curvatura del flagello.

Il difetto Dag, che prende il nome dal toro di Jersey in cui fu identificato per la prima volta, può anche essere definito come una coda accartocciata [13]. È un

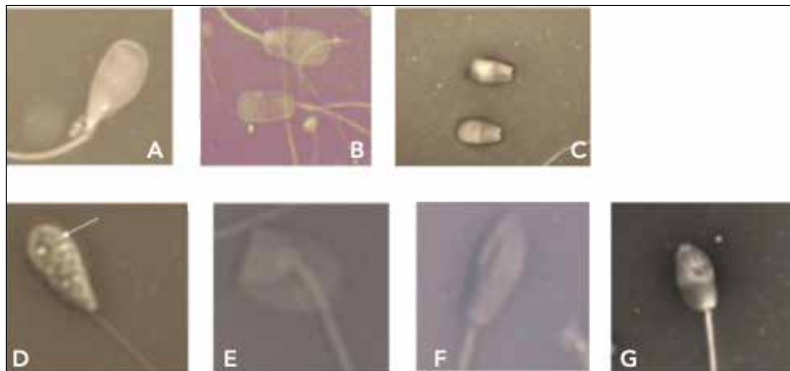


Foto 9. Anomalie della testa.

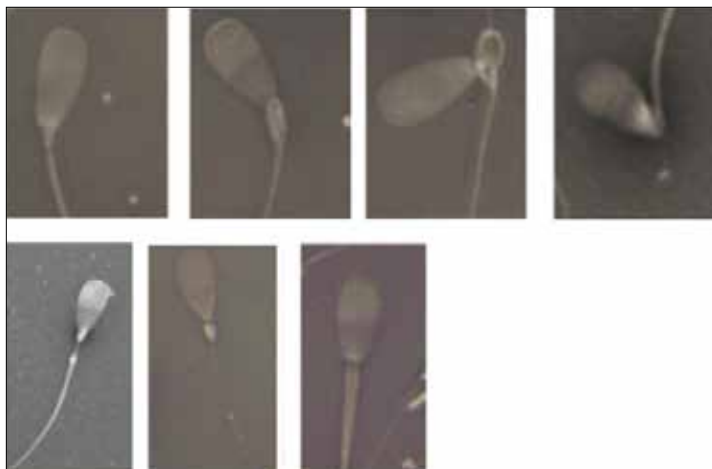


Foto 10. Anomalie del tratto intermedio.

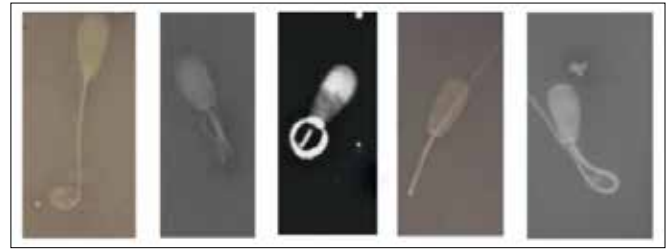


Foto 11. Anomalie della coda.

grave difetto, che può riflettere disturbi nel testicolo o nell'epididimo e può essere presente (in proporzioni inferiori al 4%) nel seme normale. Livelli superiori al 50% possono avere gravi implicazioni per la fertilità. Lo sperma con goccia distale è normale trovarlo nella coda dell'epididimo e nonostante ciò il seme di questa zona è più fertile e si congela meglio del seme eiaculato. Durante l'eiaculazione le gocce distali vengono rilasciate a contatto con il plasma seminale. Quando un gran numero di gocce distali appare nel seme eiaculato, dovremmo verificare in particolare i cambiamenti nella composizione del plasma seminale, tuttavia la sua incidenza sulla fertilità è controversa. In effetti, questa anomalia ha appena cessato di essere considerata

come tale, nell'ultimo aggiornamento dei regolamenti BSE della SFT (www.therio.org). Sebbene la persistenza della goccia prossimale abbia origine quasi sempre nei disturbi testicolari o negli animali immaturi, essi compaiono anche in tori sovrasfruttati, come conseguenza dell'esaurimento delle riserve epididimali.

Altre anomalie

La pseudo-goccia citoplasmatica prossimale è caratterizzata da un ispessimento locale del tratto intermedio. Si differenzia dalla goccia prossimale in quanto si reperisce nelle regioni in cui si trovano raramente gocce, nel mezzo del tratto intermedio. È anche più probabile che abbia una forma irregolare e visivamente più densa delle gocce: di solito sono accumulati di granuli e mitocondri e riflettono problemi nella spermatogenesi. Il pezzo intermedio in spermatozoi con cavatappi è un difetto raro. Si verifica una distribuzione irregolare dei mitocondri sotto forma di cavatappi. L'origine può essere genetica o ambientale.

Cellule rotonde

La tecnica Diff Quick è una tecnica complementare all'eosina-nigrosina, e serve a studiare la natura delle cellule rotonde nell'eiaculato, mentre non è adatta per rilevare anomalie come le gocce citoplasmatiche. Infatti, all'interno delle cosiddette cellule rotonde, ri-

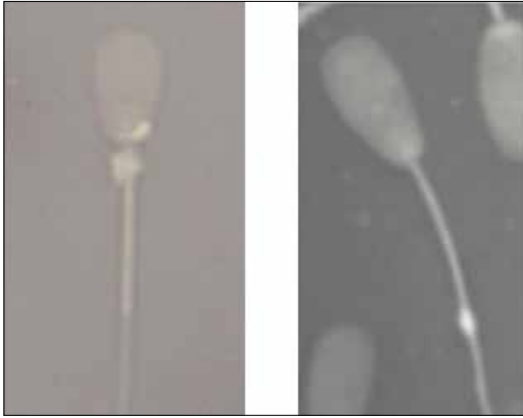


Foto 12. Goccia citoplasmica prossimale e distale.



Foto 13. Alterazioni acrosoma.

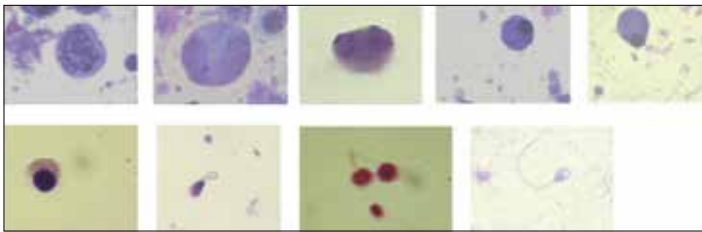


Foto 14. Cellule immature.

levate mediante microscopia a campo chiaro o contrasto di fase, possiamo trovare 3 tipi principali di strutture dopo la colorazione: 1) cellule di meiosi, dagli spermatociti agli spermatidi 2) cellule immunitarie, generalmente leucociti 3) altri: globuli rossi, granuli di polline, ecc. Questa tecnica è altrettanto semplice, economica e facile da implementare sul campo. Inoltre, in un modo nuovo, consente di studiare lo stato di condensazione della cromatina negli spermatozoi, poiché colora un colore diverso da quelli con la cromatina condensata. Fondamentalmente, l'estensione del seme è fissata dal calore e immersa per 5 secondi in 3 pigmenti consecutivi. Dopo l'essiccazione all'aria, è importante visualizzare la preparazione con



Foto 15. Batteri.

contrasto di fase, poiché, altrimenti, il campione rimane quasi invisibile.

Il Diff Quick verrà utilizzato di routine nei casi in cui il campione seminale è stato scarso e/o poco concentrato. Anche in tutti i casi con celle rotonde. Se necessario, il campione verrà concentrato, mediante centrifugazione o lasciandolo raffreddare e prelevato un'aliquota per la colorazione. La colorazione aiuterà a determinare se esiste un problema di spermatogenesi, un'infezione o semplicemente, c'è stata una scarsa risposta all'elettro eiaculazione.

Valori minimi (tit. 3)

Per la normalità verranno prese in considerazione tre categorie:

- Non idoneo (la normalità è inferiore al 50%).

- Discutibile (normalità tra il 50 e il 69%). Animali discutibili possono essere rivalutati dopo aver superato un ciclo di spermatogenesi (2 mesi).

- Adatto (normalità pari o superiore al 70%). Inoltre, tori che raggiungono la soglia del 30% in una delle anomalie compensabili (acrosoma, testa separata, parte intermedia, coda e caduta distale) e del 20% in una delle anomalie non compensabili (testa e goccia citoplasmatica prossimale).

Considerazioni importanti

La spermatogenesi inizia intorno ai 3-4 mesi di età. Il momento della pubertà nei tori è stato definito come il tempo in cui un eiaculato contiene 50 milioni di spermatozoi con una motilità minima del 10%. Ciò si verifica a una circonferenza scrotale di circa 28 cm e circa 42 settimane di età. Tra la pubertà e la maturità (circa 18 mesi), un giovane toro sano eiaculerà quantità decrescenti di spermatozoi con anomalie della testa e della goccia prossimale. Pertanto, la percentuale di queste anomalie nell'eiaculato sarà un indicatore della maturità del toro [8].

Nell'analisi di laboratorio, il test della morfo-anomalia consente di monitorare il processo degenerativo e può anche consentire l'emissione di una prognosi, sulla base dell'esame clinico testicolare. Il processo degenerativo del testicolo si traduce in una sequenza di eventi anormali negli eiaculati [14], a partire dal momento in cui il fattore scatenante inizia ad agire (Settimana 0):

- Settimana 0-1: bassa motilità e bassa congelabilità, a causa dell'alterazione dell'epi-

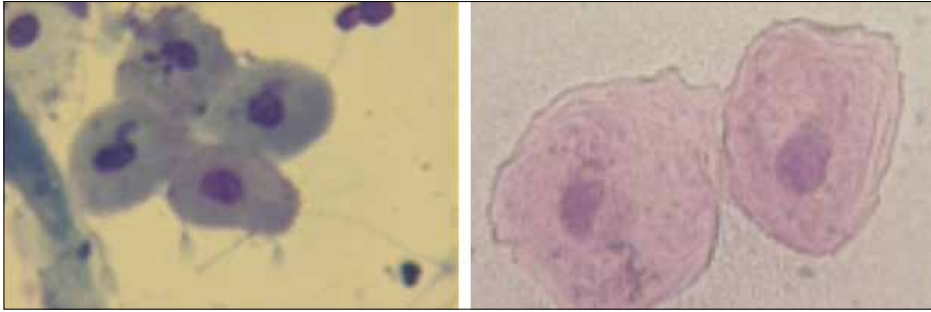


Foto 16. Cellule epiteliali.



Foto 17. Cellule sanguigne.

didimo.

- Settimana 1 in poi: si iniziano a vedere spermatozoi alterati morfologicamente a causa di spermatogenesi e spermiogenesi anormali: teste libere, micro-teste, teste piriformi, macro-teste, vacuoli nucleari, gocce prossimali superiori al 15%, lesioni acrosomiali e riduzione della produzione di spermatozoi a causa della degenerazione degli spermatidi.

Inoltre, i testicoli possono essere leggermente più morbidi e c'è un notevole cambiamento nella trama del parenchima testicolare.

Se la causa scatenante ha agito per un breve periodo (non più di 48 ore), questa situazione scomparirà dall'eiaculato in circa 50 giorni.

La causa più nota di degenerazione è, insieme all'esaurimento di GnRH, il calore [9]. La temperatura e il tempo minimi necessari per produrre un effetto acuto con danno sub-cellulare al tubulo seminifero sono di 30 °C e 72 h, sebbene siano stati documentati casi in tori con solo 12 ore di esposizione. Nei tori sottoposti a stress cronico (ad esempio settimane di stress da caldo), l'effetto o il periodo di recupero può durare fino a 10-14 settimane dopo la scomparsa della fonte dello stress. Lo stress molto forte (brusco cambiamento di temperatura) può causare gravi danni sui tubuli seminiferi con comparsa di spermatozoi nell'eiaculato o addirittura azoospermia. In questi casi, i testicoli sono morbidi, più piccoli e ipo-ecogeni a causa della bassa densità cellulare. Anche in questi casi, l'80% degli animali può riprendersi, se mantiene almeno le cellule spermatogoni e Sertoli nel tubulo seminifero. Questo recupero avverrà dopo 6-8 mesi.

A poco a poco, l'animale passerà dall'azoospermia al normale eiaculato. Tuttavia, una percentuale di tori non recupera. Questi tori sviluppano diversi gradi di fibrosi peri-tubulare nel parenchima testicolare. Questa fibrosi impedisce definitivamente la rigenerazione dei tubuli perché impedisce l'arrivo di nutrienti e ossigeno al tubulo e la sua possibile sopravvivenza. In questi casi, l'azoospermia persisterà e i testicoli saranno piccoli, duri e di ecogenicità variabile.

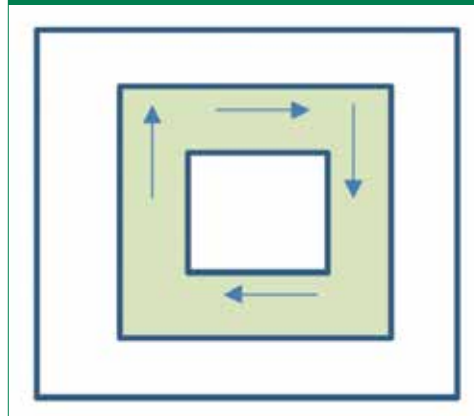
In questo senso, alcune razze come la Blue Belga sono particolarmente sensibili a molte fonti di degenerazione testicolare: alte

temperature, aumento o diminuzione del concentrato nella razione, zoppia o trasferimento del toro, scateneranno questo fenomeno. È stato suggerito che l'elevata quantità di tessuto connettivo nei testicoli dei tori di questa razza è responsabile della loro suscettibilità alla degenerazione testicolare [15].

Nei giovani tori c'è anche una certa suscettibilità ai processi degenerativi. Mentre l'ipoplasia è stata definita come una condizione ereditaria con piccoli testicoli che producono poco sperma di scarsa qualità, la degenerazione testicolare nei giovani animali è caratterizzata da una produzione iniziale di sperma relativamente normale per la loro età, ma poi, data una fonte di stress, questi smettono di produrre sperma di buona qualità e non si recuperano [16].

In pratica, nei processi degenerativi del testicolo, all'interno dello stesso organo compaiono diversi stadi di coinvolgimento tubulare. La proporzione di tubuli colpiti (lesione parenchimale focale, multifocale o diffusa) e il grado di coinvolgimento (da lievi problemi di spermatogenesi all'azoospermia) sono i fattori che determineranno la qualità degli eiaculati.

FIGURA 1. PORTA OGGETTO



Percorso raccomandato nella valutazione della motilità individuale, evitando bordi e area centrale. Verranno valutati 5 campi diversi e la valutazione verrà ripetuta due volte.

NORMATIVA BSE (BREEDING SOUNDNESS EVALUATION)

Quando si valuta la capacità riproduttiva di un toro, è conveniente fare riferimento a un regolamento. Le normative in vigore nei diversi paesi sono riassunte di seguito:

Regolamento BSE (*Breeding Soundness Assessment*) (tabella 4).

Come si può vedere, sebbene la va-

Tabella 4

Paese	Associazione	Descrizione	Riferimento
USA	<i>Society for Theriogenology (SFT)</i>	1. CS ≥ 30 cm. 2. >70% Spz normale 3. ≥30% Motilità	www.therio.org
Canada	<i>Western Canadian Association of Bovine Practitioners (WCABP)</i>	1. CS limite dep razza 2. <50%/50-69%/≥70%Spz normale 3. <40%/40-59%/≥70%Motilità	www.wcabp.com
Australia	<i>Australian Cattle Vets (ACV)</i>	1. CS limite dep raza 2. ≥70% Spz normale 3. ≥60% Motilità 4. Libido, appiombi, tono testicoli.	www.ava.com
Sud Africa	<i>South African Veterinary Association (SAVA)</i>	1. CS limite dep raza o specie 2. ≥70%Spz normale 3. ≥75% Motilità 4. Libido, ETS, appiombi, tono testicule, etc.	www.sava.co.za
Regno Unito	<i>British Cattle Veterinary Association (BCVA)</i>	1. CS ≥ 30 cm a 24 mesi. / ≥ 28 cm 15 mesi. 2. ≥70%Spz normale 3. ≥60% Motilità progressiva 4. Libido	www.bcva.org.uk

lutazione seminale in laboratorio possa includere un numero significativo di test, l'idoneità riproduttiva del toro si baserà solo su due test di laboratorio: motilità progressiva dello sperma e morfo-anomalie dello sperma. A questi due test si aggiungono la misurazione della circonferenza scrotale, la valutazione dello stato di salute e, non sempre, diversi test di libido.

Queste normative o guide presentano vantaggi e limitazioni. Lo standard di valutazione riproduttiva è una guida che evita la pressione sul veterinario durante gli esami di compravendita ed evita il rischio di introdurre uno toro sterile (o sub fertile) a un gruppo di femmine nell'immediata stagione riproduttiva. Il rispetto di queste normative garantisce la conformità con un protocollo diagnostico che è stato certificato da un'organizzazione esterna competente e prestigiosa. Questa organizzazione elabora lo standard sulla base delle attuali prove scientifiche ed è modificabile. La classificazione si basa sulla valutazione

fisica e sulla capacità del toro di soddisfare il minimo di sviluppo testicolare, motilità e morfologia normale degli spermatozoi, ma la libido non viene regolarmente valutata. Pertanto, dovrebbe essere ricordato di guardare i tori per assicurarsi che stiano cavalcando le vacche. Una buona-ottima libido tuttavia, non garantisce che un toro sia altamente fertile, né che sia privo di virus o altri agenti.

Questi regolamenti hanno anche i loro limiti quando si tratta di emettere una previsione. Come abbiamo visto nella sezione precedente, gli animali non idonei, anche gli animali azoospermici, possono riprendersi fino a 8 mesi dopo. Inoltre, gli animali in forma possono perdere la forma fisica immediatamente dopo la diagnosi.

Pertanto, la diagnosi globale e la prognosi della idoneità riproduttiva di un toro devono tener conto, oltre dei test di laboratorio, della misurazione della circonferenza scrotale, dell'esame ecografico, dell'anamnesi, dello stato clinico generale, dei test sanitari e della capacità di montare. Oltre ai valori di riferimento, il clinico deve sapere come eseguire un'interpretazione congiunta di tutti questi parametri e informare adeguatamente l'allevatore sulla situazione e sulla prognosi del toro, in modo che possa prendere una decisione informata.

La bibliografia è disponibile sul sito www.summaanimalidareddito.it

RIASSUNTO

Una corretta valutazione dell'eiaculato non richiede grandi investimenti in attrezzature: si tratta di test di base, che possono essere implementati con attrezzature molto semplici. Il punto più importante è la corretta implementazione dei protocolli di ogni test di valutazione. In questo senso, un nutrito gruppo di paesi ha adottato linee guida o protocolli standard che il veterinario può seguire durante l'esecuzione di questi test e a cui il professionista può o deve fare riferimento durante la diagnosi. Indica le conoscenze essenziali necessarie per poter interpretare i risultati ottenuti. È essenziale sapere come il processo di degenerazione testicolare e il processo di maturazione testicolare nei giovani tori influenzano la qualità seminale; questi due fenomeni segneranno infatti in modo decisivo la capacità riproduttiva di un toro.

Parole chiave: test di laboratorio, capacità riproduttiva, toro.

SUMMARY

Laboratory tests to assess reproductive capacity in bulls

A correct evaluation of the ejaculate does not require large investments in equipment: they are basic tests, which can be implemented with very simple equipment. The most important thing is the correct implementation of the protocols of each assessment test. In this sense, there is already a good group of countries that have standard guidelines or protocols that the veterinarian can follow when performing these tests and which the veterinarian can or should refer to during the diagnosis. It indicates the essential knowledge necessary to be able to interpret the results obtained. It is essential to know how the testicular degeneration process and the testicular maturation process in young bulls influence the seminal quality; these two phenomena will decisively mark the reproductive capacity of a bull.

Keywords: laboratory tests, reproductive capacity, bull.