



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA**

Dipartimento di scienze cliniche veterinarie

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI

TITOLO

NUOVE TECNICHE DI VALUTAZIONE DEL MATERIALE SEMINALE

NEW TECHNIQUES OF SPERM EVALUATION

Relatore:

Prof. Antonio Mollo

Laureando:

Alessandro Matarrese

Matricola n.553029

ANNO ACCADEMICO 2008 - 2009

Indice

1. Abstract	Pag 2
2. Introduzione	3
3. Caratteristiche del materiale seminale	4
4. Introduzione F.A.	9
5. Raccolta del materiale seminale	10
6. Valutazione del materiale seminale	11
7. Concentrazione	12
8. Citomorfologia	17
9. Motilità	20
10. Diluizione	24
11. Congelamento e stoccaggio	26
12. Controllo di qualità nei laboratori di analisi	28
13. Introduzione alle nuove tecniche di valutazione	38
14. Zona free-Hamster Oocyte	39
15. Zona Binding Ability	44
16. Hypo osmotic swelling test	48
17. ASMA system	51
18. Citofluorimetria a flusso	56
19. Conclusioni	66
20. Bibliografia	69

Abstract

Le tecniche di valutazione del materiale seminale, attualmente impiegate nei laboratori di analisi specializzati, presentano gravi handicap, legati soprattutto al ridotto numero di parametri di valutazione presi in considerazione (concentrazione, motilità e morfologia), parametri che se pur correlati con la fertilità dell'eiaculato, non forniscono informazioni conclusive in grado di stimare con sufficiente precisione la reale capacità fecondante; legati inoltre all'oggettività delle rilevazioni (in quanto è l'operatore a stimare e quantificare le varie caratteristiche del materiale seminale), ed alla bassa ripetibilità delle misurazioni, dovuta all'incidenza di errori sistematici e non, caratteristici delle quantificazioni oggettive.

Tali limiti, si ripercuotono negativamente sia nei confronti dei centri di raccolta e distribuzione del seme (in quanto l'approssimativa stima del numero di spermatozoi progressivamente motili, costringe ad incrementare notevolmente il numero di spermatozoi per dose, determinando di conseguenza una perdita di capitale); che nei confronti dei consumatori, i quali a fronte di un investimento di capitale (acquisto delle dosi), esigono una garanzia di qualità, garanzia che non potendo essere fornita, presuppone una, non quantificabile ma presente, inefficienza del prodotto. Per far fronte a tali limiti, sono state messe a punto tecniche di valutazione innovative, in grado di stimare con un più alto grado di oggettività e quindi con maggiore precisione, i parametri già rilevabili con le tradizionali tecniche di valutazione, e di rilevare altri parametri (funzionali, biochimici e ultrastrutturali), meglio correlati con la capacità fecondante dello spermatozoo, Di tutte le nuove tecniche di valutazione sperimentate, quelle che (a fronte dei risultati ottenuti), appaiono più promettenti per un impiego routinario nei centri di produzione sono: "zona free-Hamster Oocyte", "zona binding ability", "hypo osmotic swelling test", "ASMA system" e "flow cytometry", quest'ultima in particolare rappresenta il metodo di valutazione, in grado di fornire le informazioni e le misurazioni più precise e approfondite ottenibili con le attuali tecnologie a disposizione.

Introduzione

La pratica di Inseminazione Artificiale (I.A.) con seme crioconservato rappresenta ormai nella grande maggioranza degli allevamenti (soprattutto di bovine da latte), l'unico metodo di fecondazione.

Tale metodica però presenta tutt'ora dei limiti, legati soprattutto all'incognita rappresentata dall'effettiva capacità fecondante degli spermatozoi raccolti, stoccati e crioconservati dai centri tori; limiti che in realtà intensive, come quelle degli allevamenti di vacche da latte (nelle quali il nodo fertilità ricopre forse il ruolo più importante), possono concorrere ad ridurre le performance riproduttive, e quindi determinare l'instaurarsi di un meccanismo a catena che sfocia inevitabilmente in una perdita economica, che l'allevatore, potrebbe erroneamente attribuire a cause materne.

Nei centri tori infatti, lo stoccaggio delle dosi, è subordinato a valutazioni sui parametri di concentrazione, morfologia e motilità dello sperma, parametri che se pur correlati con la fertilità totale dell'eiaculato, non permettono l'identificazione della reale capacità fecondante dello stesso. Infatti nella caratterizzazione della fertilità, entrano in gioco altri parametri non identificabili con le tradizionali tecniche di valutazione adoperate. A questo limite si cerca di ovviare con l'aumento del numero di spermatozoi per dose.

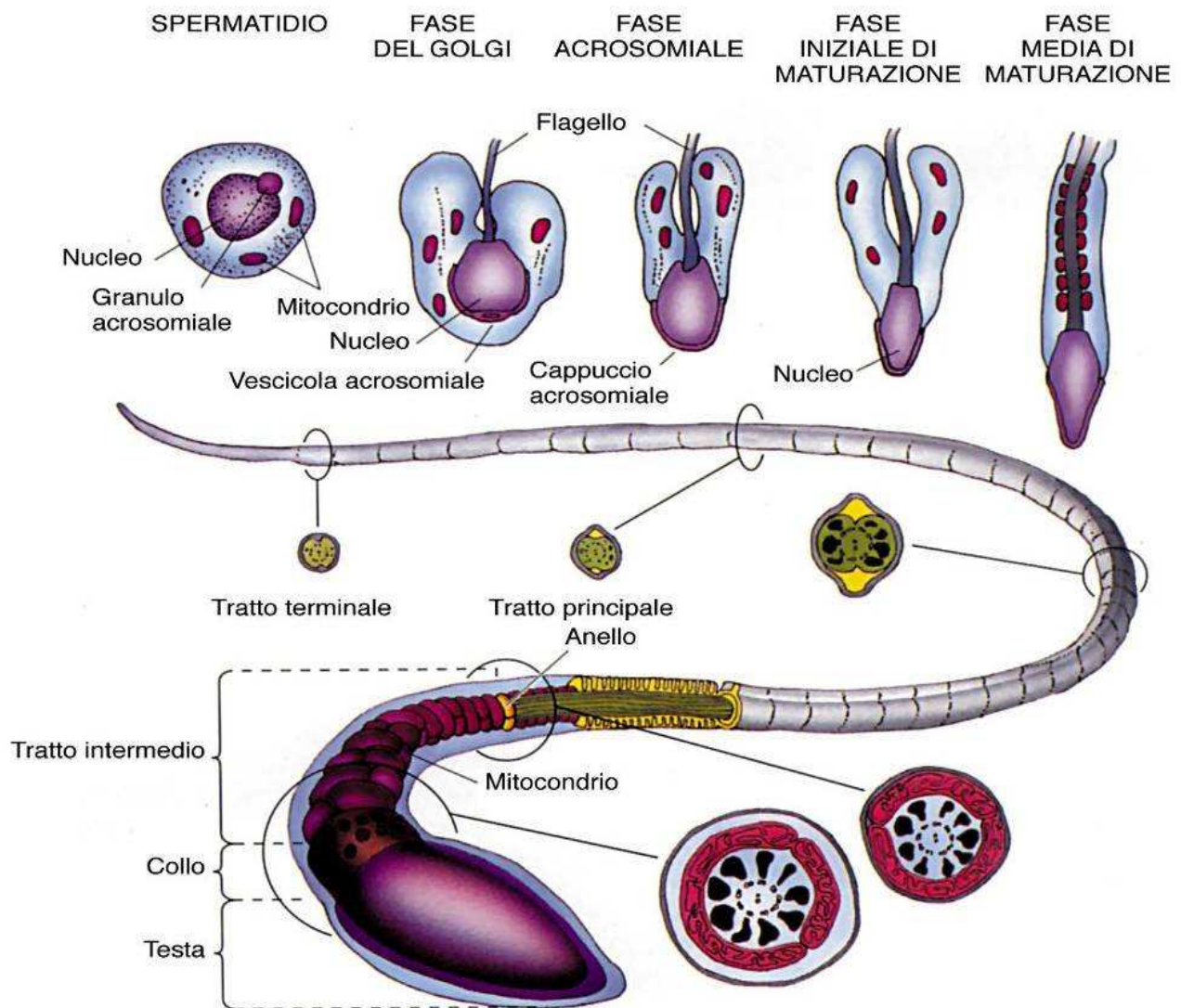
Purtroppo questa tecnica di "camuffaggio", permette l'eliminazione di tutti quei parametri "compensabili" come il basso Numero di Spermatozoi Progressivamente Motili (NSPM), legati alle caratteristiche intrinseche agli spermatozoi, ma non dei parametri "non compensabili" (legati non ai singoli spermatozoi, ma bensì al soggetto che li produce), come ad esempio lo stato di compattamento della cromatina, rilevabile però solo con tecniche di rilevazione più sofisticate!

A tal fine con questa tesi, si vogliono mettere in luce le deficienze che le tradizionali tecniche di valutazione del seme presentano, le nuove tecniche di valutazione in grado di risolvere (almeno in

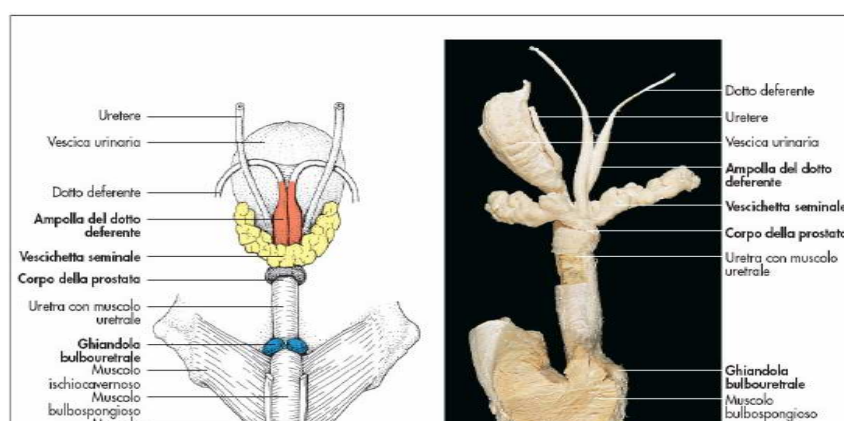
parte) tali limiti, e le problematiche relative alla loro adozione nelle metodiche di valutazione routinarie nei laboratori dei centri tori.

Caratteristiche del liquido seminale

In condizioni normali, il liquido seminale, è composto dagli spermatozoi e dal plasma seminale che origina dalle ghiandole accessorie. Gli spermatozoi si vengono a formare nei tubuli seminiferi delle gonadi, a partire dalle cellule germinali, dopo un processo che prende il nome di spermatogenesi. L'intero processo di spermatogenesi, è suddiviso a sua volta in una prima fase chiamata spermatocitogenesi, dove avviene il dimezzamento del contenuto di DNA e del corredo cromosomico, e la trasformazione degli spermatociti primari in spermatidi; e in una seconda fase chiamata spermiogenesi, nella quale avvengono le trasformazioni strutturali che determinano il passaggio da spermatidi a spermatozoi.(A.Gallo e F.Maffeo).



Le ghiandole accessorie che secernono il medium (plasma seminale), nel quale vengono veicolati gli spermatozoi, si dividono in: ghiandole vescicolari, prostata e ghiandole bulbouretrali. Esse assumono una dimensione e una rilevanza fisiologica variabile nelle diverse specie animali, in virtù soprattutto delle caratteristiche intrinseche agli spermatozoi e del sito di deposito del seme al momento dell'inseminazione (naturale).



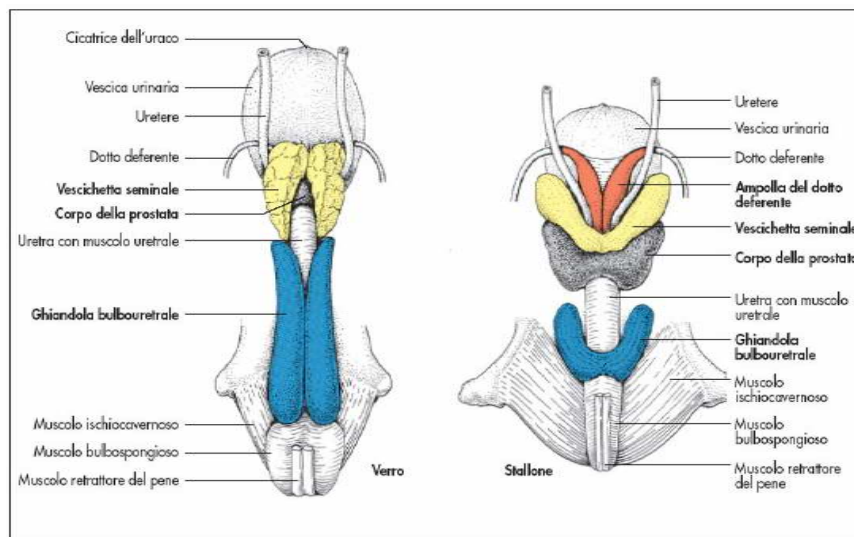


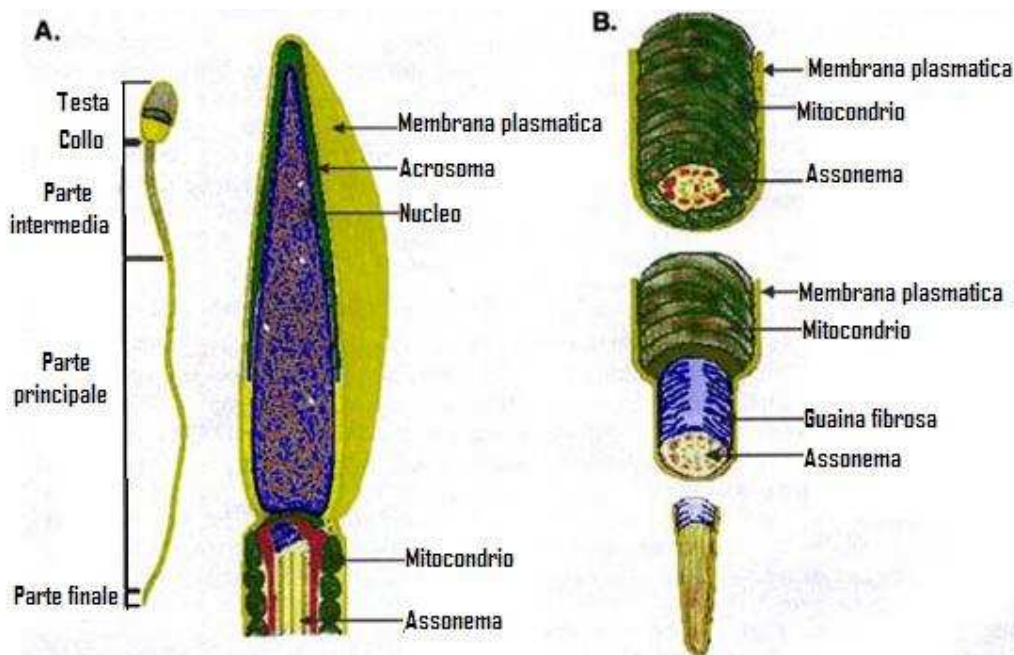
Fig. 10-20. Rappresentazione schematica delle ghiandole sessuali accessorie di verro e di stallone.

- Il secreto delle ghiandole vescicolari è costituito da fruttosio di derivazione ematica, (fonte di energia immediatamente disponibile per il metabolismo e per il movimento degli spermatozoi), acido citrico (interviene nel processo di coagulazione e fluidificazione dello sperma attraverso il legame con gli ioni Ca^{++} sequestrati dall'ambiente) e inositolo (concorre al determinismo della pressione osmotica);
- Il secreto prostatico (più acido rispetto al secreto vescicolare) è costituito principalmente da enzimi (componenti caratteristici del citoplasma) come la fosfatasi acida, e da sostanze proteiche. Il suo aspetto è lattescente, e partecipa all'attivazione del movimento flagellare;
- Il secreto delle ghiandole bulbo uretrali è molto importante nel verro per la formazione del caratteristico gel dell'eiaculato che determina la chiusura del canale cervicale della scrofa dopo l'eiaculazione. In altre specie, come in quella bovina, il secreto di queste ghiandole viene emesso durante l'eccitazione sessuale e concorre alla detersione del canale uretrale prima dell'eiaculazione. (G. Maffeo e A. Gallo)

Il volume dell'eiaculato, la sua concentrazione e la composizione del plasma seminale, variano molto nelle diverse specie:

Parametri	TORO	BECCO	STALLONE	ARIETE	VERRO
Volume eiaculato (ml)	4/12	0,5/2	50/180	0,8/1,2	300/500
Concentrazione spermatozoi (N° spermatozoi x 10⁶/ml)	800/2000	3000/6000	150/300	2000/3000	200/300
Motilità (%)	70	80	70	75	60
Secreto prostatico (% eiaculato)	6	6	30	/	30
Secreto ghiandole bulbo-uretrali (% eiaculato)	/	/	/	/	40
Secreto vescicolare (% eiaculato)	30	8	/	/	30

Morfologia e struttura dello spermatozoo



Come è possibile notare nella raffigurazione sopra riportata, strutturalmente uno spermatozoo maturo è costituito da:

- **Testa:** Caratterizzata dalla presenza di un nucleo con cromatina molto compatta e resistente alla denaturazione acida della reazione di Feulgen. La porzione anteriore della testa è circondata dall'acrosoma, formazione membranosa che deriva dall'apparato di Golgi, tale da considerarsi un lisosoma modificato. L'acrosoma è costituito da una membrana esterna e da una interna, con interposta una matrice che contiene vari enzimi idrolitici (ialuronidasi, acrosina, enzima penetrante la corona) che intervengono in maniera determinante durante il processo di fecondazione.
- **Collo:** è formato dal centriolo prossimale, dal segmento di connessione e da una serie di nove colonne segmentate fibrose che si continuano con le fibre dense esterne
- **Parte intermedia:** è costituita dall'assonema con la classica struttura di nove doppiette periferiche e da una centrale di microtubuli. Tali doppiette sono tra di loro connesse da vari ponti di tipo proteico. La struttura base delle doppiette è data da dimeri di tubulina alle quali sono ancorati dei ponti di dineina ad attività ATP-asi. Lo scorrimento dei ponti di dineina fra doppiette assonemiche adiacenti determina il movimento flagellare della coda. Attorno all'assonema e alle nove fibre dense esterne sono disposti ad elica i mitocondri che funzionano da trasduttori di energia, convertendo un flusso di elettroni di riserva in energia sotto forma di ATP.
- **Parte principale:** Terminata la parte intermedia, con un anello denso, le fibre dense sono ricoperte da una guaina fibrosa, composta da una serie di coste trasversali e da due lunghi

ispessimenti longitudinali, che vanno fondendosi con due fibre dense esterne che da nove diventano sette.

- **Parte terminale:** è composta solamente dalla membrana plasmatica che circonda l'assonema.

Classificazione delle principali anomalie degli spermatozoi

Le anomalie della struttura e i difetti funzionali degli spermatozoi, possono coinvolgere l'intera cellula o singole sue parti (la testa o la coda); e pregiudicano nella maggior parte dei casi la capacità fecondante della cellula, abbassando inevitabilmente anche l'efficienza riproduttiva dell'eiaculato.



Non tutte le anomalie morfologiche sono associate ad ipofertilità, infatti spermatozoi con anomalie del genere “knobbed acrosome”, “diadem crater” e “dag defect” riescono comunque a fecondare. La presenza di spermatozoi anormali è comune in qualunque eiaculato, e si può definire fisiologica se non supera il 20% della popolazione totale di spermatozoi.

Processo di Raccolta, valutazione, diluizione e stoccaggio del materiale seminale nei centri F.A.

I centri di produzione del materiale seminale, rappresentano nell'ambito della pratica di Fecondazione Artificiale (F.A.) il principale organo di riferimento, e per tanto essendo visti come industrie produttrici di un bene, devono essere considerate alla stregua di ogni altra azienda, finalizzate all'ottimizzazione del profitto, ma comunque in un'ottica di conseguimento della qualità. La qualità, intesa come soddisfacimento delle aspettative del consumatore (in questo caso allevatori e tecnici), presuppone l'attivazione di una serie di modalità gestionali aziendali, che consentano il pieno controllo e l'ottimizzazione di tutte le fasi produttive in qualche modo coinvolte nell'ottenimento del prodotto di interesse. Per i centri F.A. dunque la qualità può esser vista come l'ottenimento di materiale seminale appartenente ad individui di elevatissimo valore genetico, con il massimo della fertilità (C.Galli et all. 2004), al minimo costo (R.G.Saacke 1982)! La fertilità è legata alla capacità da parte del centro F.A. di preparare dosi che contengano un adeguato numero di spermatozoi vitali dopo scongelamento (stimati come spermatozoi progressivamente motili NMPS), mentre il basso costo è legato alla capacità del centro F.A. di produrre dosi che abbiano il minor NMPS che consenta di ottenere la fertilità maggiore (A.Galli et all. 2006) In sintesi le finalità di un centro F.A. sono quelle di produrre il maggior numero possibile di dosi standard (tutte uguali) che assicurino il maggior successo in termini di fertilità e che consentano di minimizzare i costi produttivi. Per far ciò occorre in primis definire lo standard produttivo, che equivale alla definizione delle specifiche (NMPS $\sim 8 \cdot 10^6$), dopodiché è necessario definire le modalità produttive (in modo tale da ottenere un processo stabile nel tempo) in termini di raccolta, valutazione, diluizione e stoccaggio del materiale seminale.



Raccolta del materiale seminale

La raccolta del materiale seminale, è l'operazione preliminare di tutta la procedura di F.A. (L.Vicenti 2006). Il materiale viene prelevato da maschi (di elevato valore genetico, sanitariamente controllati e privi di tare genetiche) mediante l'utilizzo di vagine artificiali (si induce il donatore a compiere una falsa monta su di una femmina in calore al lato della quale è posto un operatore che devia l'apice del pene all'interno della vagina artificiale) o di manichini.



Il seme eiaculato viene raccolto in una provetta graduata ed immediatamente trasferita in un laboratorio per esser sottoposto a valutazione.



Valutazione del materiale seminale

Subito dopo la raccolta del seme, vengono effettuati su di esso i primi controlli, che possiamo suddividere in:

- Macroscopici
- Microscopici/funzionali

L'esame macroscopico si effettua senza l'ausilio di alcuna strumentazione, ed è volto alla rilevazione di tutti quei parametri giudicabili ad occhio nudo, come:

- **Volume:** varia con la specie, l'età del soggetto, la stagione e il regime di raccolta;
- **Colore:** da bianco traslucido, a bianco-grigio a bianco-crema; può essere giallastro per la presenza di pigmenti come le xantine, normalmente assunte dall'animale con la dieta giornaliera. Sono da escludere le colorazioni verdastre (presenza di pus, e quindi indice di patologie latenti) e rosate (presenza di sangue e quindi indice di lesioni recenti a carico dell'apparato genitale del donatore);
- **Consistenza:** da latteo-acquoso a latteo-denso a latteo-cremoso a cremoso, varia in rapporto alla concentrazione di cellule spermatiche rispetto al volume di liquido testicolare, epididimario e al secreto delle ghiandole accessorie;
- **Odore:** pressochè inodore.

Gli esami microscopico/funzionali invece si effettuano utilizzando strumentazioni più o meno sofisticate, e sono volti all'identificazione di parametri come:

- **Concentrazione:** Numero di spermatozoi/ml di seme;
- **Cinetica:** insieme degli attributi del movimento degli spermatozoi motilità e velocità;
- **Citomorfologia:** valutazione morfologica dello spermatozoo, volta alla verifica dell'integrità delle strutture deputate al movimento e alla funzionalità.

Concentrazione

La determinazione della concentrazione (numero di spermatozoi/unità di volume) può essere effettuata attraverso metodi manuali, semi-automatici o completamente automatici.

1. **Il Conteggio manuale** viene effettuato con ematocitometri (P.J.Hansen, 2000), particolari vetrini portaoggetto, dotati di camera interna con volume standard calibrato e disegno superiore a scacchiera (Camera di Thomas, di Barker, di Neubauer, di Makler ecc...), che permettono in seguito a conta manuale (utilizzando un normale microscopio), la rilevazione della concentrazione di spermatozoi del liquido seminale analizzato (G.W.Salisbury et al. 1942).

Procedura:

- Si diluisce con uno spermicida (formalina, soluzione salina con bicarbonato o con clorammina ecc...) il liquido seminale in rapporto 1:20/1:100; è bene inoltre effettuare una colorazione del materiale seminale per facilitare la rilevazione microscopica di tutte le cellule!
- Si riempiono le camere dell'ematocitometro (in questo caso di Burkner, costituite da 9 quadrati grandi, costituiti a loro volta da 16 quadrati piccoli) per capillare azione, e si attende la sedimentazione per 10-30 minuti in ambiente umido;
- Si esegue il conteggio medio di 5 quadrati piccoli su 4 quadrati grandi, nei due reticoli della camera di Burkner, per un totale di 8 quadrati grandi; (il conteggio viene effettuato sui due reticoli di due camere, con due diverse aliquote di materiale seminale. La distribuzione degli spermatozoi, all'interno dei reticoli della camera dovrebbe seguire una distribuzione di Poisson, e dal momento che non risulta possibile accertare tale distribuzione durante le valutazioni routinarie, vengono scartati nell'ambito degli otto conteggi eseguiti, il valore più alto e il valore più basso, in modo tale da approssimare maggiormente la media alla mediana della distribuzione delle classi di frequenza delle conte, ottimizzando il risultato!)

A1			A5					D1			D5
	A2								D2		
		A3								D3	
			A4								D4
				B1			B5				
					B2						
						B3					
							B4				
								C1			C5
									C2		
										C3	
											C4

$$[(A1..A5 + B1..B5 + C1..C5 + D1..D5)+(A1..A5 + B1..B5 + C1..C5 +D1..D5)]/8$$

- Dato che la superficie di un quadrato piccolo è 0,04mm², l'altezza di un quadrato piccolo è 0,10mm, il volume di un quadrato è 0,004mm³ e il volume di 5 quadrati piccoli è 0,02mm³, il calcolo della concentrazione viene eseguito utilizzando la seguente formula:

$$C= N*(1/V5)*FD*FC$$

dove:

C = concentrazione spermatica / ml;

N = numero di spermatozoi contati in 5 quadrati piccoli;

1 = riferimento ad 1 ml;

V5 = volume di 5 quadrati piccoli (1 / V5 consente il calcolo del numero di spermatozoi in 1 mm³);

FD = fattore di diluizione (1:100 = 100);

FC = fattore di conversione (mm³ → ml = 1000). (G.F.M.Fabbris et al.2001)

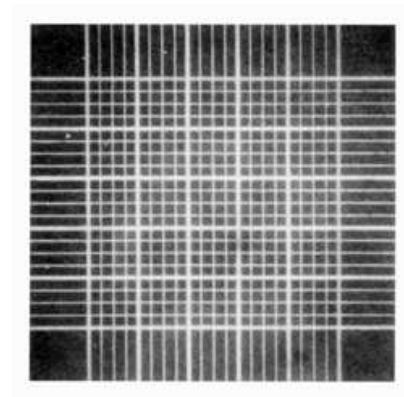
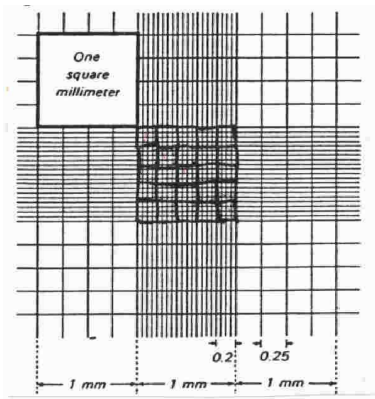
ES. di calcolo su sperma di toro

Volume eiaculato:5cc ;

Diluizione utilizzata:1:100;

N:393

$$C=393*(1/0,02)*100*1000=1965000000 \rightarrow 1960*10^6$$



Il vantaggio di questa tecnica di conta, è quello di essere poco costoso e di facile esecuzione, ma presenta lo svantaggio di possedere un elevato errore standard (tra le 8 e le 12 UDS), che ne determina una mediocre affidabilità.

2. Il conteggio semi-automatico viene effettuato con fotometri o colorimetri;

- Il **colorimetro** è un metodo facile da eseguire e molto economico, che sfrutta la torbidità dell'eiaculato (fresco) per stimare la sua concentrazione, ma presenta il limite di essere estremamente approssimativo, ragion per cui l'utilizzo è giustificato solo a livello aziendale e in quelle tipologie di allevamento (come quello suino) dove non è necessaria una scrupolosa stima della concentrazione di spermatozoi.



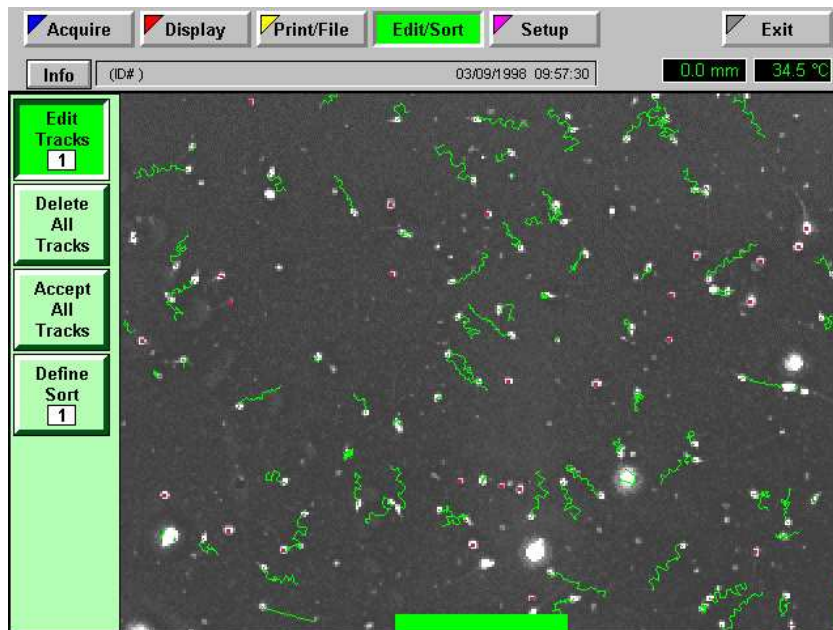
- Il **Fotometro** è uno strumento facile da utilizzare, che conta il numero di cellule presenti in un campione a volume noto, sfruttando la diversa assorbanza che queste ultime presentano in presenza di un fascio di luce a lunghezza d'onda definita. Il valore che si ottiene (in pochi minuti) presenta una notevole accuratezza, a patto però che lo strumento sia opportunamente tarato. Il limite di questo strumento sta nella significativa perdita di attendibilità, in caso di presenza di

cellule patologiche nel materiale esaminato, in quanto non è in grado di distinguerle dagli spermatozoi. (Jasko, 1992)



3. **IL conteggio completamente automatico**, viene effettuato invece con un complesso analizzatore d'immagine dotato di software, che prende il nome di C.A.S.A. (computer assisted sperm analyzer) (A.C.Tardif et al. 1997). Questo strumento d'analisi, (molto costoso) permette non solo di stimare con un'elevatissima accuratezza la concentrazione del materiale seminale (J.E.Johnson et al. 1996), ma anche di rilevare altri parametri come la motilità e la velocità degli sperm (M.J.Zinamam et al. 1996)

- Il conteggio degli spermatozoi, viene effettuato attraverso l'elaborazione da parte del software, delle resistenze elettriche dovute al passaggio delle particelle del campione (una alla volta) attraverso un campo elettrico
- La rilevazione della motilità e della velocità degli spermatozoi invece è permessa attraverso lo studio delle immagini video a forte ingrandimento (relative ad una goccia di liquido seminale), registrate e digitalizzate dal computer che riesce a rilevare fino a 60 fotogrammi al secondo (frames). L'analisi delle immagini in tal modo può essere analizzata dal software che seguendo parametri imposti dall'operatore, valuta le traiettorie, la velocità e la progressione degli spermatozoi.



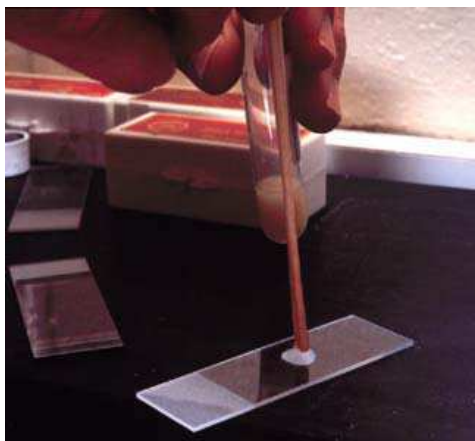
Anche questa sofisticata tecnica di valutazione però presenta dei limiti, dovuti principalmente:

- All'accuratezza con la quale l'operatore ha eseguito il protocollo di diluizione del seme prima dell'analisi;
- Alla precisione con la quale l'operatore ha effettuato il settaggio e la taratura del software per la tipologia di seme da analizzare (sostanziali differenze tra spermatozoi di diverse specie);
- Alla soggettività con la quale vengono analizzate le videoregistrazioni relative al movimento degli spermatozoi, in quanto se pur effettuate da un computer (M.Iguer-Onada et al. 2001; D.Y.Liu et al. 1991), sono sempre relative ai parametri di valutazione imposti dall'operatore al momento della taratura.(A.Galli, 2005)

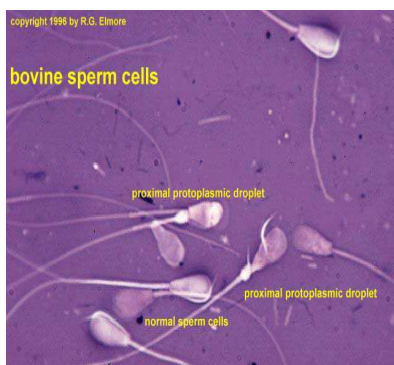
Citomorfologia

La valutazione della morfologia dello spermatozoo è finalizzata alla verifica dell'integrità delle strutture deputate al movimento e alla funzionalità, e cioè alla rilevazione di anomalie, potenzialmente in grado di ostacolare il raggiungimento del sito di fecondazione, impedire la penetrazione nell'oocita o la decondensazione del nucleo.. Tale valutazione è condotta utilizzando sistemi di contrasto ottico microscopico (microscopia in contrasto di fase o in contrasto interferenziale differenziale di Nomarsky), previa fissazione in sospensione degli spermatozoi. E' la valutazione meno ripetibile, poiché è strettamente correlata al livello di esperienza dell'operatore. (A.Galli e Balduzzi 2006)

Perché uno spermatozoo possa essere considerato normale, è necessario che siano normali la testa, il collo, il tratto intermedio e la coda dello spermatozoo. (G.F.M. Fabbris et all. 2001)



Principali anomalie rilevabili microscopicamente:



Il valore ottenuto dall'analisi morfologica degli spermatozoi viene espresso come % di spermatozoi morfologicamente normali, e prende il nome di normalità.

Calcolo degli indici di difetti multipli degli spermatozoi

Gli spermatozoi morfologicamente anormali hanno spesso difetti multipli. Nei protocolli di valutazione adoperati negli anni passati, anche quando erano presenti anomalie multiple, ne veniva registrata soltanto una, con la priorità data ai difetti della testa rispetto a quelli del tratto intermedio, ed a quelli del tratto intermedio rispetto a quelli della coda. Attualmente si preferisce registrare il numero delle anomalie diviso il numero di spermatozoi, per determinare un valore detto indice di teratozoospermia (TZI) o indice di anomalie multiple (MAI) (Jouannet et al. 1988; Mortimer et al. 1990), ed il numero di anomalie diviso il numero totale di spermatozoi, per ottenere l'indice di deformità spermatozoaria (SDI) (Aziz et al. 1996). Questi indici sono prognostici della funzionalità degli spermatozoi, sia in vivo che in vitro.

Per questa determinazione può essere utilizzato un contatore di cellule da laboratorio, (comunemente utilizzato per le conte leucocitarie) con tasti multipli etichettati "normali", "anomalie della testa", "anomalie del tratto intermedio" e "anomalie della coda".

Uno spermatozoo con un'unica anomalia, ad esempio un'anomalia della testa, viene classificato premendo quel singolo tasto, e lo spermatozoo viene contato come una singola cellula. Uno spermatozoo con anomalie della testa, del tratto intermedio e della coda, viene classificato premendo i relativi tre tasti contemporaneamente. Le anomalie (3) vengono inserite in ciascuna categoria, ma viene ugualmente contata un'unica cellula.

In alternativa se non si dispone di un conta cellule, si può eseguire la classificazione semplicemente con un foglio di carta.

Esempio di calcolo degli indici di malformazioni multiple degli spermatozoi:

<i>Numero di spermatozoi contati</i>	200
<i>Numero di spermatozoi normali</i>	78
<i>% di spermatozoi normali (78/200*100)</i>	39%
<i>Numero di spermatozoi con anomalie (200-78)</i>	122(61%)
<i>Spermatozoi con anomalie della testa</i>	110(55%)
<i>Spermatozoi con anomalie del tratto intermedio</i>	18(9%)
<i>Spermatozoi con anomalie della coda</i>	16(8%)
<i>Numero totale di anomalie (110+18+16)</i>	144
<i>Indice di teratozoospermia (anomalie TOT/ n. sperm. anormali)=144/122</i>	1,18
<i>Indice di deformità spermatozoaria (anomalie TOT/n. sperm. contati)=144/200</i>	0,72

Il valore dell'indice di teratozoospermia deve variare tra 1,00 (ogni spermatozoo anormale ha una sola anomalia) e 3,00 (ogni spermatozoo anormale ha anomalie della testa, del tratto intermedio e della coda).(G.M.F.Fabbris et al. 2001)

TERMINOLOGIA

Parametro	Criterio di valutazione	Nomenclatura
VOLUME	ZERO	ASPERMIA
	RIDOTTO	IOSPERMIA
	AUMENTATO	IPERSPERMIA
CONCENTRAZIONE	ZERO	AZOOSPERMIA
	RIDOTTO	OLIGOSPERMIA
	NORMALE	NORMOZOOSPERMIA
	AUMENTATO	POLIZOOSPERMIA
MOTILITA'	RIDOTTA	ASTENOZOOSPERMIA
VITALITA'	SPZ. TUTTI MORTI	NECROZOOSPERMIA

MORFOLOGIA	MOLTI SPZ. ANOMALI	TERATOZOOSPERMIA
-------------------	---------------------------	-------------------------

I requisiti minimi di qualità del seme per tori in produzione presso centri I.A. sono:

- Concentrazione= 500×10^6 spz/ml;
- 50% di motilità progressiva;
- 70% di spermatozoi morfologicamente normali.

Comunque, anche se questi requisiti non vengono soddisfatti, il toro non può essere definito sterile; ma non rispondente ai requisiti minimi richiesti. In altri termini, non conveniente economicamente (poche dosi per I.A. e/o poche vacche gravide in monta libera).

Un riproduttore può essere, ragionevolmente, definito sterile solo di fronte alla totale assenza di spermatozoi vitali nell'eiaculato (Azoospermia o necrozoospermia) (L.Vicenti 2006).

Motilità

La motilità è una delle caratteristiche maggiormente correlate con la fertilità (J.E.Chandler et al. 1987), in quanto serve per:

- L'attraversamento della cervice (parametro assente nell'I.A. della specie bovina, in quanto il materiale seminale viene immesso direttamente nel primo tratto dell'utero);
- L'attraversamento della giunzione utero tubarica;
- La penetrazione del cumulo ooforo;
- La penetrazione attraverso la zona pellucida.

Viene indicata in % spermatozoi mobili (che in soggetti normali dovrebbe essere $\geq 70\%$) e si distingue in:

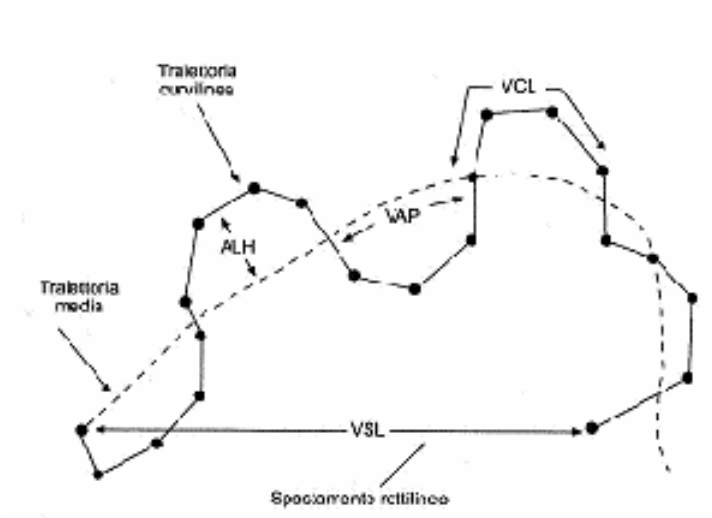
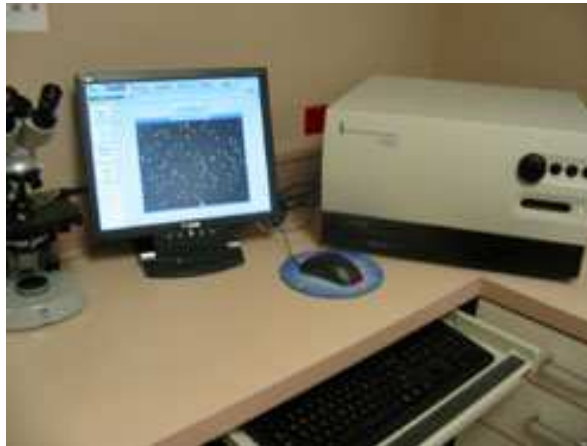
- Totale→ identificazione della % di spermatozoi vivi nell'eiaculato;
- Progressiva→ confronto di una serie di misurazioni relative al movimento degli spermatozoi.

1. La rilevazione della motilità totale (o tasso di vitalità) viene effettuata con diversi metodi:

- Attraverso l'utilizzo di colorazioni Post-vitali come l'eosina, la negrosina o il blu di bromo fenolo, volte a colorare gli spermatozoi morti (si basano sul principio che le cellule morte, che presentano una membrana danneggiata, trattengono determinati coloranti come quelli appena menzionati!), rilevabili attraverso microscopia a contrasto di fase.
- Attraverso metodo di gravammo, che consiste nel far passare gli spermatozoi attraverso una colonna di Sephadex contenente destrano. Gli spermatozoi morti con membrana cellulare danneggiata, si legano al destrano e vengono trattenuti dalla colonna mentre tutti gli altri passano senza alcun problema.

2. La rilevazione della motilità progressiva invece viene effettuata attraverso l'analisi delle registrazioni relative al movimento degli spermatozoi. Queste analisi possono essere di tipo manuale o computerizzata:

- Per le rilevazioni di tipo manuale si utilizzano videoregistrazioni rallentate del movimento degli spermatozoi, che vengono visionate da operatori che riportano a loro volta, su di un lucido manualmente i vari movimenti degli spermatozoi. E' questa però una metodica molto laboriosa ed estremamente soggettiva, in quanto la sua accuratezza è direttamente proporzionale alla sensibilità dell'operatore nella trascrizione delle immagini e alla sua imparzialità nella lettura dei lucidi.
- La valutazione computerizzata, invece è effettuata da strumentazioni (CASA) (D.D.Varner et al. 1991) costituite essenzialmente da un computer, dotato di scheda di digitalizzazione, che converte il segnale di una telecamera in una matrice di punti. Tramite apposito software quindi è possibile individuare gli spermatozoi e ricostruirne le tracce per unità di tempo. (A.Galli e D.Balduzzi, 2006).



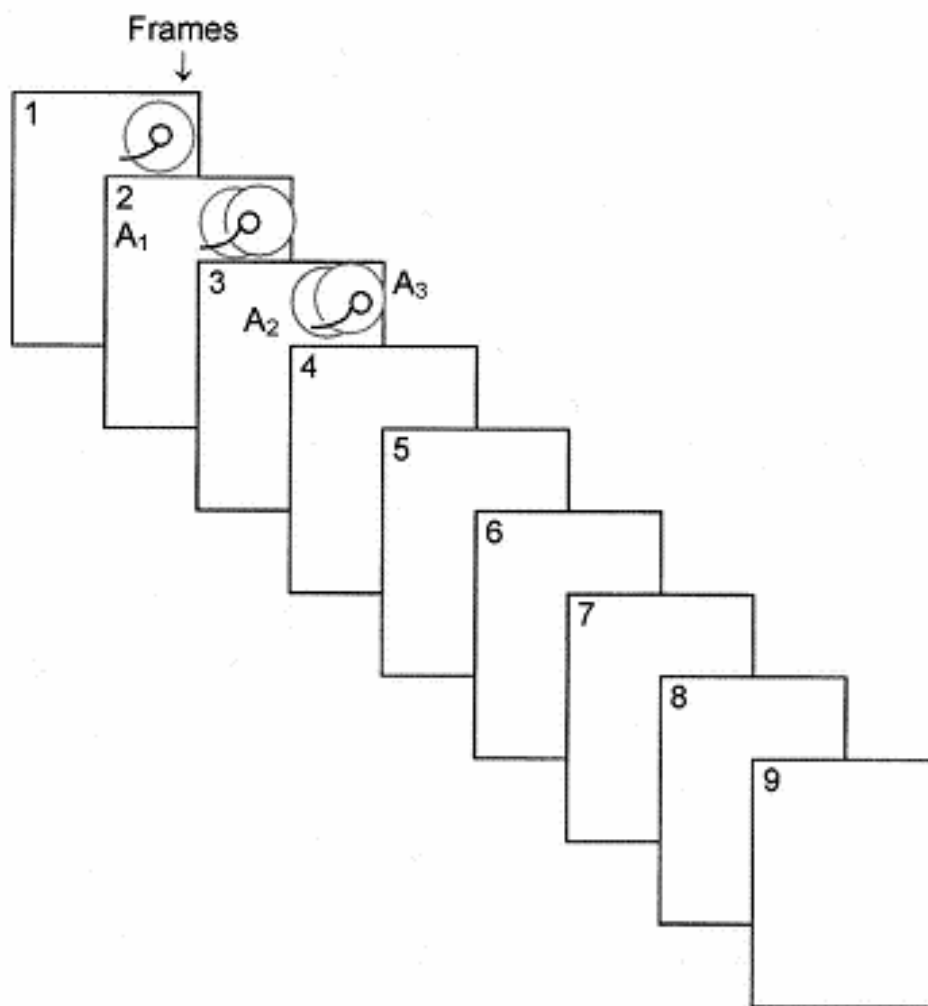
Parametri relativi al movimento degli spermatozoi, rilevati dal CASA:

- La velocità lineare (VSL) data dalla distanza fra la prima e l'ultima posizione assunta dallo spermatozoo (percorso rettilineo) diviso il tempo;
- La velocità curvilinea (VCL) data dalla somma dei segmenti sottesi fra le varie posizioni della traettoria dello spermatozoo (percorso curvilineo) diviso il tempo;
- La average-path-velocity (VAP) data dal rapporto fra la lunghezza della traettoria dello spermatozoo (calcolata tramite algoritmo utilizzando la media mobile) ed il tempo;
- L'ampiezza dello spostamento laterale della testa (ALH). (G.F.M.Fabbris et al. 2001)

Gli spermatozoi sono considerati motili per $VAP \geq$ di un valore di riferimento imposto nel settaggio e diverso a seconda della specie; e la % di tali spermatozoi rappresenta la motilità totale. La velocità media di spostamento (VM) è la media delle VAP di tutti gli spermatozoi classificati come mobili.

La motilità progressiva è data dalla differenza tra il numero di spermatozoi considerati motili totali, e il numero di spermatozoi motili con rapporto VSL/VAP inferiore all'80%; ed è espressa in NSMP (numero spermi progressivamente motili). (A.Galli, 2005). Questa analisi comunque per poter essere sufficientemente rappresentativa di tutto il campione, deve essere effettuata su un minimo di 4 campi microscopici analizzando almeno 200 spermi, e se possibile 400!

Modalità di funzionamento di un sistema CASA



Il singolo oggetto viene riconosciuto e "seguito" nelle varie "frames". L'identità viene definita in funzione della presenza di un oggetto nella "frame" successiva in una data area (A_1 A_2 A_3), prece-dentemente calcolata, associata alla velocità media stimata di spostamento delle cellule. Tale area rappresenta la superficie dove è più probabile che si posizioni lo spermatozoo dotato di motilità nella "frame" successiva.

La motilità degli spermatozoi, si sviluppa gradualmente durante la loro maturazione, e dipende da:

- Proteine che sono acquisite durante la maturazione epididimale (FMP= Forward motility protein)
- Corretto rapporto tra secrezione delle ghiandole accessorie (il secreto delle vescichette seminali inibisce la motilità e la vitalità degli spermatozoi, quello della prostata invece stimola entrambi);
- Temperatura e pulizia di tutto il materiale di laboratorio che viene a contatto con il seme.

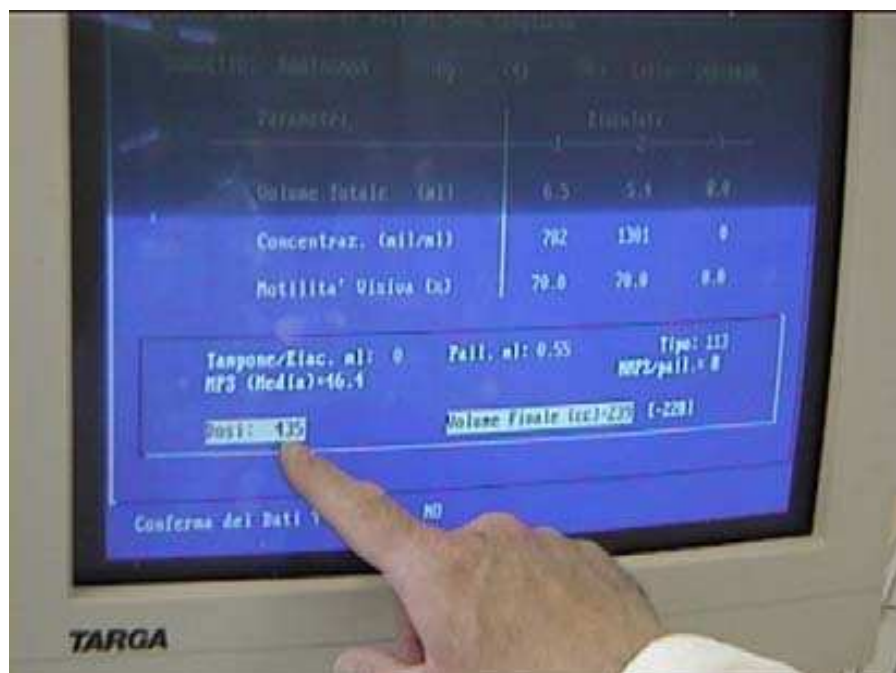
E' opportuno considerare però che:

- ✓ Gli spermatozoi perdono prima la capacità fertilizzante della motilità, quindi è possibile valutare uno spermatozoo motile quando non è già più in grado di fertilizzare;
- ✓ Spermatozoi anormali possono essere mobili ed in grado di fertilizzare un'oocita! (L.Vicenti 2006)

Diluizione

La diluizione del seme può essere effettuata solo al termine del processo di valutazione, in quanto per ottenere una dose standard occorre prima conoscere:

- Il NSPM in una dose necessari per assicurare il maggior successo in termini di fertilità (per la specie bovina tale parametro si aggira intorno agli $8 \cdot 10^6$);
- Il NSPM presenti nell'eiaculato che intendiamo diluire (nel caso si utilizzano tecniche di valutazione non computerizzate, e che non permettono l'immediata stima del NSPM, il numero di spermatozoi potenzialmente fecondi si calcola tramite l'applicazione della seguente formula: $\text{NSPM} = \text{Concentrazione} \cdot \text{ml di eiaculato} \cdot \text{motilità} (\sim 0,75) \cdot \text{normalità} (\sim 0,85)$)



Programma di diluizione

Appurati questi due parametri, è possibile calcolare la quantità di liquido seminale da immettere nelle dosi, e di conseguenza anche la quantità di diluente da aggiungervi. Il diluente è una sostanza biocompatibile con il materiale seminale, e permette non solo di ottenere un numero elevato di dosi inseminative da un solo eiaculato, ma consente anche il congelamento a -196 C° (N liquido) dello stesso, senza compromettere eccessivamente la vitalità degli spermatozoi.

In generale un diluitore deve essere:

- Isotonico con le cellule seminali;
 - Dotato di un sistema tampone che moderi la progressiva acidificazione del mezzo;
 - Dotato di capacità protettive nei confronti delle membrane cellulari;
 - Dotato di capacità nutritive;
 - Addizionato di antibiotici con poter batteriostatico/battericida;
 - Addizionato di un crioprotettore per controllare la formazione di cristalli di ghiaccio.
- (R.H.Foote et al. 2002)

Sono qui riportate alcune sostanze che, variamente combinate possono costituire un diluitore per le diverse specie animali:

- Citrato trisodico, Acido citrico
- Latte scremato trattato termicamente (Laiciphos)
- TRIS (idrossimetil-aminometano)
- Tuorlo d'uovo (20%)
- Zuccheri (fruttosio, lattosio)
- Antibiotici (Penicillina/Streptomicina/Lincomicina/Spectinomicina)
- Crioprotettore (Glicerolo a concentrazione diversa)

Diluitori per seme confezionati presenti sul mercato:

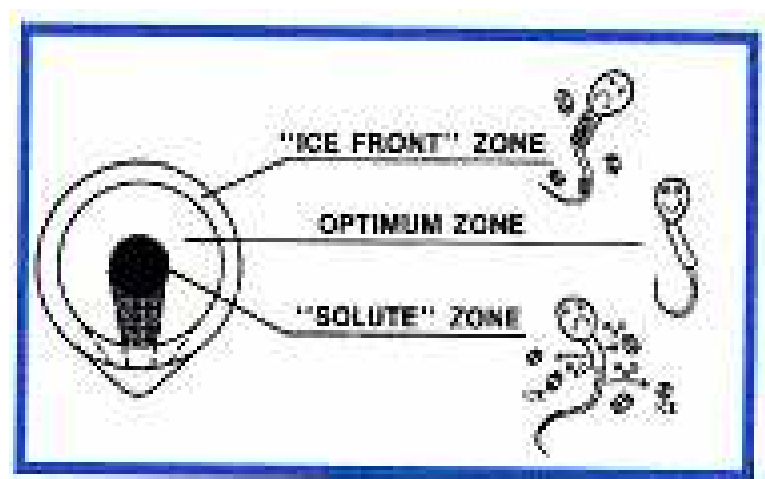


Congelamento e stoccaggio

Il congelamento e lo stoccaggio delle dosi (paillettes), sono le ultime due attività svolte nel centro F.A. La pratica di congelamento però non è così facile come si può pensare, in quanto il passaggio da $+36\text{ C}^\circ$ a -196 C° , se non effettuato correttamente può determinare la comparsa di danni cellulari irreversibili, tali da compromettere la vitalità degli spermatozoi, e quindi pregiudicare drasticamente la fertilità del materiale seminale.

L'abbassamento della temperatura, provoca:

- Una modifica della conformazione della membrana cellulare;
- Un progressivo aumento della solubilità dei gas, con aumento delle pressioni parziali di CO_2 , O_2 e N_2 ;
- La formazione di cristalli di ghiaccio intra ed extra cellulari.

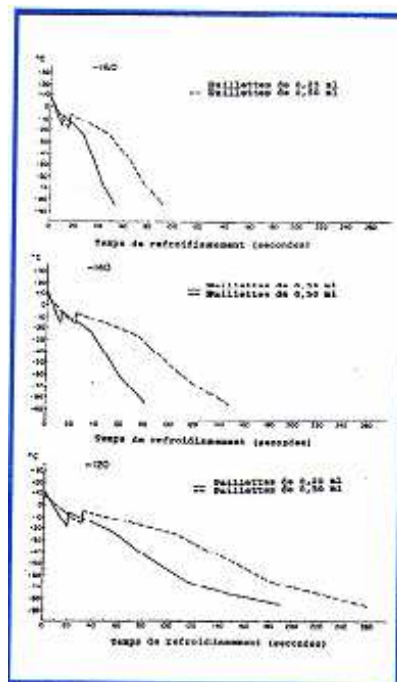


Esemplificazione dei danni da freddo e da osmosi

Per ridurre al minimo l'incidenza dei danni da congelamento quindi, si effettuano due principali azioni:

- Si aggiunge un crioprotettore (come il glicerolo) al liquido seminale da congelare;
- Si effettua il congelamento, seguendo determinate curve di discesa della temperatura, (specifiche ed ottimali per ogni tipo di cellula). (C. Buletti, 2000)

CURVE DI DISCESA DELLA TEMPERATURA PER IL CONGELAMENTO DEL SEME



Lo stoccaggio del seme avviene nella specie bovina tramite l'uso di paillettes del volume di 0,25/0,50 ml, che dopo esser state riempite, vengono sigillate ed esposte ai vapori di N liquido. (L.Vicenti 2006)



L'adeguatezza di tutto il processo di congelamento del seme, viene solitamente valutata utilizzando la % di ritorno alla motilità o fattore di criospermia (CSF):

$$\text{CSF} = \% \text{ sp. mobili dopo scongelamento} / \% \text{ sp. mobili pre congelamento} * 100$$

Un buon CSF è $\geq$ al 50%! (L.Vicenti 2006)

Controllo di qualità nei laboratori di analisi

Il controllo di qualità (QC) dell'analisi seminale è indispensabile per individuare e corregger gli errori sistematici ed una eccessiva variabilità (G.F.M. Fabbris et al. 2001). La verifica periodica attraverso il QC da parte di un supervisore, è requisito per l'accreditamento e per il mantenimento di accuratezza, precisione e competenza del centro di raccolta e distribuzione di seme.

Le attività di QC eseguite entro un laboratorio, sono riportate come un controllo di qualità interno (IQC), mentre la verifica esterna di qualità (EQA) è la valutazione dei risultati su uno stesso campione analizzato in un centro di controllo esterno (nel caso dell'Italia il centro Spallanzani di Milano), che ha il fine di garantire la qualità del prodotto.

La gestione di procedure di QC richiede la cognizione dell'origine e dell'ampiezza degli errori di misurazione. L'analisi del liquido seminale è infatti soggetta ad errori random relativamente ampi, associati al conteggio di un basso numero di spermatozoi. Le ampie discordanze tra le determinazioni di conta spermatica e morfologia in diversi laboratori (Matson, 1995) sottolineano l'importanza di migliorare i QC e la standardizzazione.

Origine degli errori di misurazione

Ogni misurazione ha un grado di errore, la cui ampiezza è descritta come un intervallo di confidenza dotato di un limite superiore ed uno inferiore. Una misurazione è precisa quando questi limiti sono vicini tra loro, ed il risultato è accurato quando vi è uno scostamento minimo dal valore reale. Esistono due classi di errori: random e sistematici. Gli errori random, che causano mancanza di precisione, nascono da differenze nel campionamento o nella lettura; possono essere controllati ripetendo le misurazioni ad opera dello stesso operatore e con gli stessi strumenti. Gli errori sistematici (detti anche "bias") sono più insidiosi, dal momento che nascono da fattori che

alterano il risultato sempre in una stessa direzione e creano così differenze che non possono essere individuate ripetendo la misurazione. Le procedure di QC sono necessarie per individuare sia gli errori random che quelli sistematici nell'esame seminale di routine. (G.F.M.Fabbris et al. 2001).

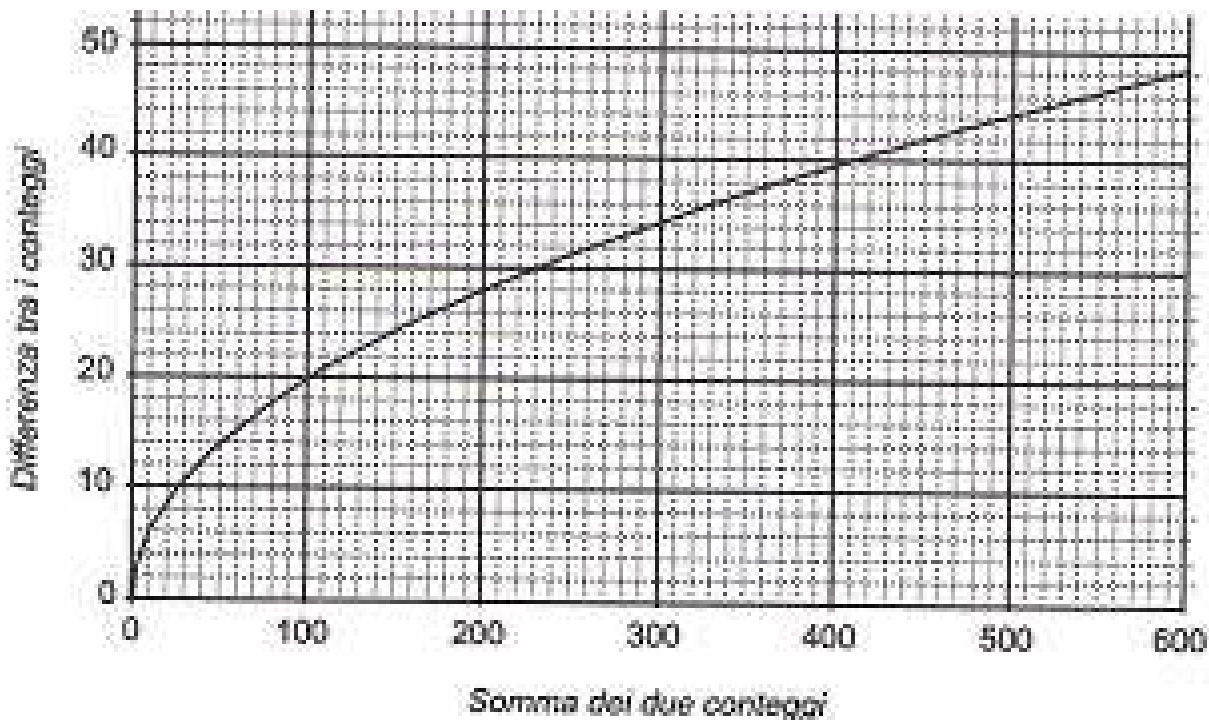
Errori statistici di conteggio nell'analisi seminale

La distribuzione casuale degli spermatozoi, anche quando il campione è stato ben miscelato, è responsabile della maggior parte della variabilità e della perdita di precisione nei risultati dell'analisi seminale. Le misurazioni della concentrazione di spermatozoi, della motilità e della morfologia prevedono tutte di contare un limitato numero di cellule, presumendo che siano rappresentative dell'intero campione. La variazione di campionamento che nasce dalla scelta di un determinato volume per stimare la concentrazione, o di un determinato numero di spermatozoi per classificare la motilità e la morfologia, è un errore random comunemente riportato ad un errore statistico di conteggio. L'ampiezza relativa dell'errore di conteggio, è inversamente correlata con la radice quadrata del numero di spermatozoi analizzati. La cognizione degli errori di conteggio è essenziale per stabilire la precisione dell'analisi seminale e per perfezionare le procedure di QC nella ricerca di altre eventuali fonti di errore. (G.F.M. Fabbris et al. 2001).

- **Errori di conteggio nella misurazione della concentrazione spermatica**

Per misurare la concentrazione degli spermatozoi, si contano con un ematocitometro le cellule in un volume predefinito. Se gli spermatozoi, sono casualmente distribuiti nella camera, il loro numero esatto in un dato volume, segue la distribuzione di Poisson, la cui varianza è pari al numero contato. Così quando vengono contati N spermatozoi, la varianza è N , l'errore standard è $\sqrt{N}$, e l'errore percentuale è $100\sqrt{N}/N$. L'intervallo di confidenza al 95% per il numero di spermatozoi nel volume di sperma è, approssimativamente, $N \pm 1,96\sqrt{N}$. Per questo se vengono contate 100 cellule, l'errore standard del conteggio sarà 10 (10%) e l'intervallo di confidenza al 95% per il numero di spermatozoi in quel volume di sperma è 80-120. Allo stesso modo se vengono contati 200 spermatozoi, l'errore standard è 14 (7%) con un intervallo di confidenza al

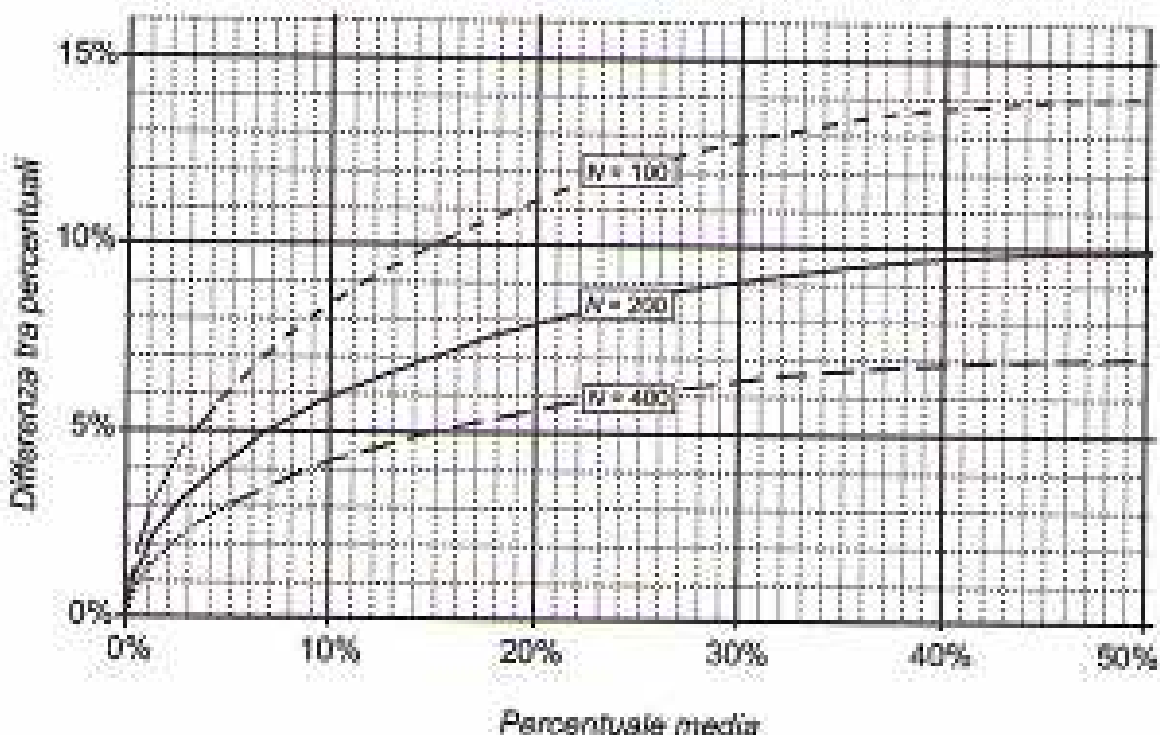
95% di 172-228. Per raggiungere una precisione caratterizzata da un errore % del 2,5 è necessario contare 1600 spermatozoi.



Intervallo di confidenza approssimato al 95% per le differenze tra due conteggi. Per valutare questi conteggi, calcolare la loro somma e differenza. Se la differenza è maggiore di quella indicata dalla curva potrebbe esserci un errore sistematico ed il campione deve essere nuovamente analizzato. Sono evidenti gli ampi errori statistici associati al conteggio di un numero di spermatozoi inferiore a 200. Per esempio, per un conteggio medio di 60 spermatozoi (somma 120), le due conte possono variare da 50 a 70 solo per effetto del caso. (G.F.M. Fabbris et al. 2001).

Errori di conteggio nella misurazione di motilità e morfologia degli spermatozoi

Quando gli spermatozoi vengono classificati in due o più classi (come “morfologia normale” o “anormale”, “motilità progressiva” o “non progressiva”) l’errore standard della percentuale (p) stimata entro una classe dipende dalla percentuale reale, ma sconosciuta, così come dal numero di spermatozoi contati (N). L’errore standard stimato è pari a $\sqrt{p(100-p)/N}$. Così se vengono contati 100 spermatozoi e la reale percentuale stimata degli spermatozoi normale è 4,0%. Il corrispondente intervallo di confidenza al 95% di 14,5%-25,5%. Se vengono contati 400 spermatozoi, l’errore standard è ulteriormente ridotto a 2,0% con un intervallo di confidenza al 95% di 16,1%-23,9%.



Range di confidenza al 95% per le differenze tra le due percentuali della conta di 100, 200, o 400 spermatozoi. Per determinare le percentuali delle due conte da 200, calcolare la media e la differenza. Se la differenza risulta maggiore di quanto indicato dalla curva $N = 200$, il campione dovrà essere analizzato nuovamente. La curva inferiore mostra l'incremento in precisione per la conta di 400 spermatozoi ($N = 400$). Per un risultato medio del 5%, l'intervallo di confidenza al 95% risulta del 3%. Gli errori statistici associati alla conta di 100 spermatozoi sono rappresentati sulla curva più alta ($N = 100$). Per un risultato del 5%, le due separate conte di 100 spermatozoi potranno essere del 3% e del 9% per solo effetto della variabilità casuale.

Esempio 1:

Le motilità degli spermatozoi in due conte di 200 spermatozoi sono: categoria a = 3% e 20%; b = 32% e 40%; c = 5% e 5%; e d = 60% e 35%. La categoria di motilità più numerosa è la d (60% e 35%) con una media di 47,5% e una differenza di 25%. Dalla Fig. 2.3 si vede che per $N = 200$ spermatozoi in ogni preparato e con una media del 47,5%, è previsto che possa aver luogo una differenza fino al 10% ma non una del 25%. Di conseguenza i risultati devono essere scartati e la preparazione ripetuta. Si noti che, se la differenza percentuale in una categoria di motilità risulta maggiore di quanto atteso, allora anche quella in un'altra risulterà maggiore, come nell'esempio per la categoria a. Solamente le differenze delle categorie più rappresentate andranno comparate.

Esempio 2:

Le motilità di due conte di 200 spermatozoi sono: categoria a = 32% e 25%; b = 4% e 3%; c = 4% e 4%; e d = 60 e 68%; la categoria più rappresentata è la d, con una media del 64% ed una differenza dell'8%. Poiché la percentuale media 64% non rientra nella Fig. 2.3, è riportata la differenza attesa per una percentuale media di 36% ($=100\%-64\%$). Per $N = 200$ in ciascun campione, differenze fino a 9,5% possono realizzarsi per solo effetto casuale, e la differenza osservata è inferiore a questa. Vengono calcolate le percentuali medie per ciascuna categoria di motilità: 28,5%, 3,5%, 4% e 64%. Notare che la convenzione prevede di arrotondare lo 0,5% al più vicino numero pari, ad esempio, 28,5% si

abbassa a 28% ma 3,5% si alza a 4%. Le percentuali riportate dovrebbero sommare a 100% aggiustando, se necessario, la categoria più numerosa, ad esempio a = 28%, b = 4%, c = 4% e d = 64%. (G.F.M. Fabbri et al. 2001).

- **Minimizzare l'errore statistico di conteggio**

Quando un errore statistico può essere ridotto aumentando il numero di spermatozoi analizzati, bisogna trovare un compromesso tra l'aumento di precisione statistica e la possibile perdita di accuratezza dovuta alla stanchezza dell'operatore.

- **Altri errori nell'analisi seminale**

Analisi ripetute dallo stesso operatore e con la medesima attrezzatura possono mostrare una variabilità maggiore di quella dovuta solo all'errore di conteggio, per la frequente presenza di altri errori random. Questi possono nascere da una inadeguata miscelazione (specialmente in presenza di campioni viscosi ed agglutinati), stress dell'operatore (errori di conteggio o di registrazione dei dati), scarsa capacità tecnica (pipettaggio approssimativo o scarsa manualità nella preparazione del vetrino o della camera), variabilità strumentale (pipette automatiche mal funzionanti, che possono ridurre la riproducibilità durante il campionamento e le diluizioni). Al contrario, risultati meno variabili dell'errore di conteggio atteso possono suggerire errori di registrazione o un errore sistematico legato alla conoscenza dei dati precedenti. Misurazioni ripetute da diversi operatori possono discostarsi per differenze sistematiche o per marcati errori di calcolo, o differenze nella classificazione della motilità e della morfologia. Per esempio la percentuale degli spermatozoi motili è generalmente sovrastimata poiché l'occhio è attratto dal movimento. Questo errore può essere eliminato contando prima tutti gli spermatozoi motili, e successivamente gli immobili nella stessa area.

- **Importanza del controllo di qualità**

La precisione e la riproducibilità dell'esame seminale può essere determinata attraverso i risultati di misurazioni ripetute dello stesso campione, un metodo che, assieme alla periodica calibrazione degli strumenti, è alla base dell'IQC. La precisione intra-operatore è determinata da valutazioni ripetute o analisi ripetute dello stesso campione "in cieco". La precisione inter-operatore nello stesso laboratorio viene determinata dallo stesso campione. L'IQC quindi ha il ruolo di garantire

che la precisione ottimale venga mantenuta nel laboratorio di analisi, e che non ci sia uno scivolamento graduale degli standard.

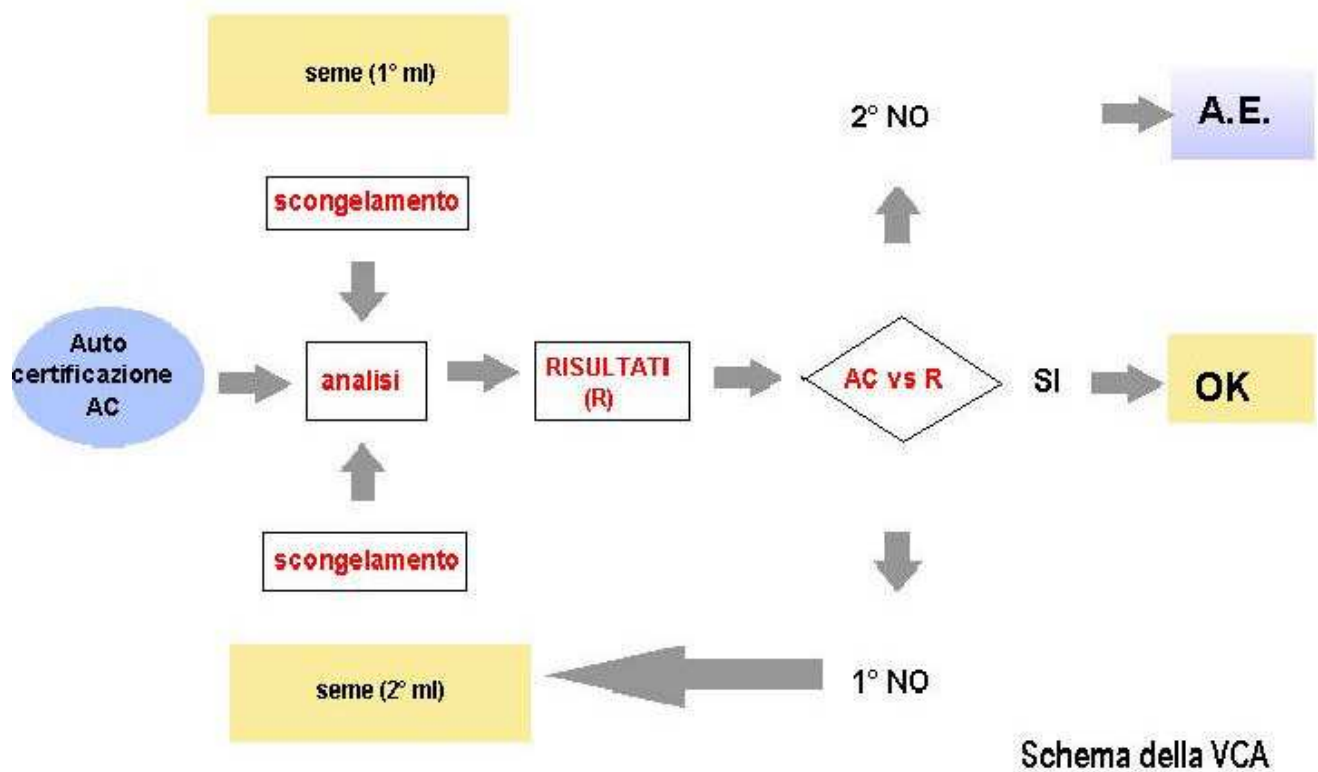
Il controllo ufficiale del seme

L'attività di Controllo ufficiale del seme (CUS), da parte dell'Istituto sperimentale italiano "Lazzaro Spallanzani", prevede due tipi di verifiche, quella della corretta autocertificazione (VCA) e quella della corretta identificazione (VCI).

La VCA prevede che i centri di produzione seme (CPS) e gli importatori accompagnino le paillettes di seme congelato da loro commercializzate con delle autocertificazioni che ne attestino la qualità. Tali autocertificazioni devono contenere i valori relativi alle seguenti variabili: concentrazione totale (CT) (milioni/paillette), motilità progressiva (MP) (%) e numero di spermatozoi progressivamente mobili (NSPM) (milioni/paillette).

L'Istituto Spallanzani quindi a campione deve verificare la congruità di tali autocertificazioni effettuando l'analisi qualitativa del materiale seminale dopo scongelamento per quanto concerne la concentrazione e la motilità progressiva al fine di determinare il numero di spermatozoi progressivamente mobili (NSPM) che rappresenta il parametro di riferimento qualitativo. I NSPM ottenuti vengono confrontati con le autocertificazioni: in caso di mancata concordanza il centro deve modificare l'autocertificazione, senza vincolo alcuno circa la commercializzazione del seme. Per l'analisi dei dati è stato convenuto di utilizzare un intervallo di confidenza al 99% e di utilizzare il valore minimo di tale intervallo come stima del numero minimo di spermatozoi mobili per dose dopo lo scongelamento, nell'ambito dell'autocertificazione fornita dai centri. Proprio dal confronto fra tale stima ed il valore ottenuto dall'Istituto scaturisce la valutazione AE (Autocertificazione Errata).

Schema della verifica di corretta autocertificazione



Schema della VCA

La valutazione del materiale seminale congelato prevede le seguenti fasi:

1. Scongellamento del seme;
2. Determinazione della concentrazione;
3. Determinazione della motilità;
4. Analisi dei dati.(A.Galli et al 2004)

1. Scongellamento del seme:

Il CUS prevede che per ogni partita venga analizzato 1 ml. di seme che viene scongelato in acqua a 37° C per 10' e poi miscelato in un'unica provetta.

2. Determinazione della concentrazione

La concentrazione comporta la misura del numero di spermatozoi per unità di volume. Le metodologie utilizzate per la sua determinazione prevedono l'uso di camere contaglobuli e di contatori elettronici di particelle. Le camere contaglobuli consentono il conteggio degli spermatozoi in

microambienti di volume predefinito, utilizzando un reticolo quale area di riferimento. La metodologia analitica è molto semplice ma vanno assolutamente rispettate alcune norme, quale una adeguata distribuzione e stabilizzazione degli spermatozoi all'interno della camera e la standardizzazione delle procedure di conteggio. Questa è la metodica di riferimento per gli altri sistemi consentendo infatti la taratura dei contatori elettronici di particelle. I contatori elettronici di particelle (Coulter Counter) effettuano il conteggio valutando le impedenze elettriche causate dal passaggio degli spermatozoi in un capillare posto fra due elettrodi e immerso in un liquido isotonico. A tali spermatozoi devono venire precedentemente tolte la coda e le proteine superficiali di membrana al fine di eliminare interferenze a livello elettrico da parte delle stesse.

3. Determinazione della motilità:

La valutazione della motilità consente di misurare le variabili di tipo cinetico, delle quali quella d'interesse è la motilità progressiva. Per ottenere misure oggettive è necessario utilizzare gli analizzatori automatici d'immagine (sistemi CASA) che prevedono l'acquisizione di immagini tramite generatori di segnali analogici (telecamera o videoregistratori) convertiti in segnali digitali da un apposito convertitore (ADC). Ogni campo microscopico viene digitalizzato varie volte in successione, consentendo di ottenere una serie di immagini digitalizzate dalla cui analisi lo strumento è in grado di ricavare varie informazioni.

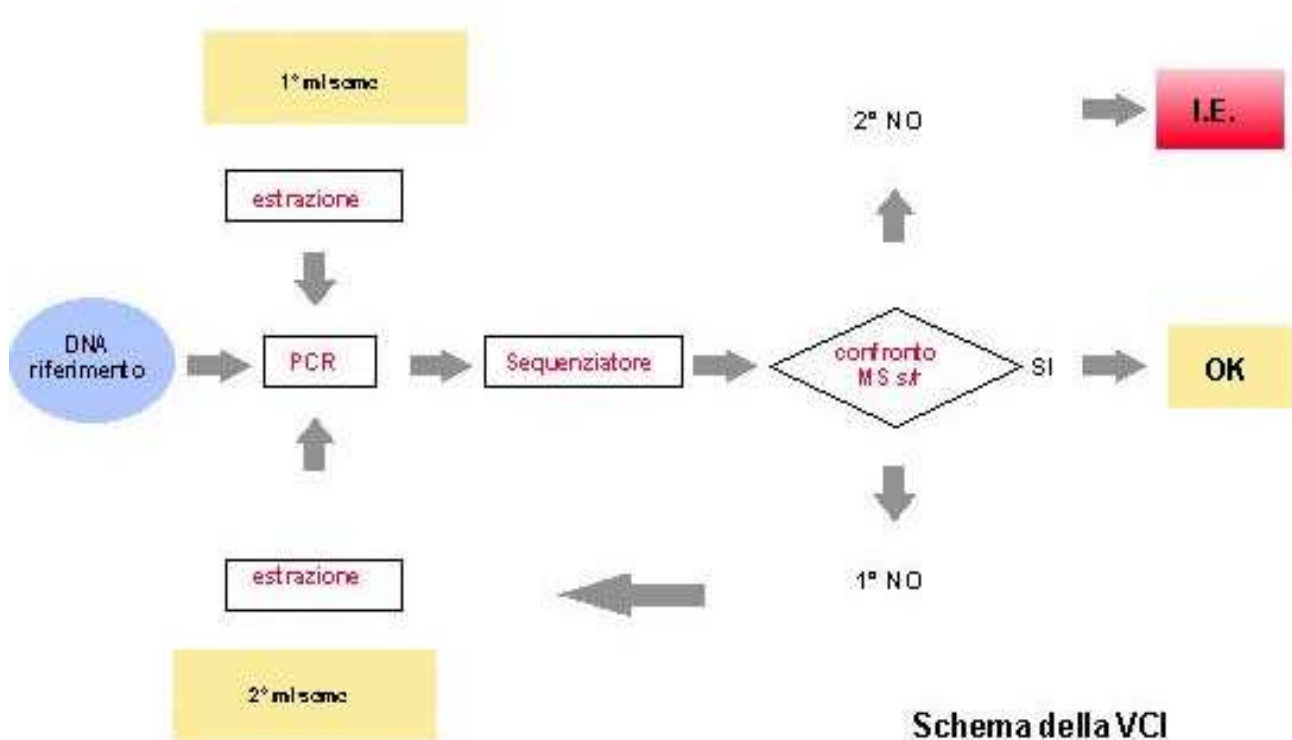
4. Analisi dei dati:

I dati vengono caricati in apposito database ed analizzati utilizzando procedure automatiche che confrontano il valore di NSPM determinato dall'Istituto con il valore minimo stimato in base all'autocertificazione rilasciata dal CPS. L'autocertificazione è corretta, nel caso il valore di NSPM misurato dall'Istituto sia superiore o uguale al valore minimo dichiarato dal CPS.

Verifica della Corretta Identificazione

La VCI viene eseguita mediante il confronto fra specifici marcatori genetici (microsatelliti) del DNA estratto dagli spermatozoi della partita campionata rispetto al DNA di riferimento, estratto dal campione biologico del riproduttore (il cui codice identificativo è stampato sulla paillette). Nel caso di mancata concordanza fra i frammenti del DNA di riferimento e quello del seme, la partita viene definita I.E. (Identificazione Errata) e deve essere distrutta dal centro di produzione seme

Schema corretta verifica di identificazione



Schema della VCI

La verifica della corretta identificazione prevede le seguenti fasi:

1. Estrazione del DNA dal materiale biologico di riferimento e dal seme;
2. Dosaggio del DNA;
3. Amplificazione del DNA;
4. Analisi dei frammenti;
5. Acquisizione ed analisi dei dati. (A.Galli et al 2004)

1. Estrazione del DNA:

L'estrazione del DNA permette l'isolamento dello stesso partendo da materiale organico (seme, sangue ed eventualmente bulbo pilifero). La metodica ottimizzata dall'Istituto prevede una fase iniziale di precipitazione delle cellule seguita da una di lisi delle stesse. Dal lisato così ottenuto viene poi separato il DNA che successivamente viene purificato da contaminanti.

2. Dosaggio del DNA:

La determinazione della concentrazione del DNA estratto da materiale biologico risulta di fondamentale importanza per affrontare le successive fasi di lavorazione. Tale determinazione viene eseguita tramite spettrofotometro (Pharmacia Biotech), specificatamente studiato per la biologia molecolare, sfruttando la proprietà delle basi eterocicliche di assorbire la luce ultravioletta (spettrofotometria di assorbimento). La concentrazione del DNA ottenuto dal materiale biologico di riferimento viene determinata allo scopo di costituire per ciascun campione una quantità di DNA tale da permettere l'effettuazione del test di identità per almeno 10 anni, come previsto dal DM. 27/12/94.

3. Amplificazione del DNA:

L'amplificazione dei microsatelliti del DNA avviene in un termociclatore tramite una reazione chiamata PCR (Polimerase chain reaction - reazione a catena della polimerasi), utilizzando come *primers* specifiche sequenze oligonucleotidiche diverse a seconda della specie. Per il DNA ottenuto dal materiale biologico di riferimento vengono utilizzati oligonucleotidi fluorescinati in maniera differente rispetto a quelli del seme.

4. Analisi dei frammenti:

Dopo l'amplificazione, aliquote di ciascuna PCR dello stesso riproduttore vengono miscelate e diluite, vi viene aggiunto dello standard interno per permettere l'assegnazione automatica delle dimensioni dei microsatelliti e vengono caricate in un gel denaturante di poliacrilamide per la separazione elettroforetica, condotta in un sequenziatore automatico.

5. Acquisizione ed analisi dei dati:

Dai dati ottenuti viene ricavata la dimensione allelica espressa in paia di basi (bp). La VCI è corretta quando la differenza allelica fra seme e campione biologico di riferimento è inferiore a 2 bp; la VCI è errata quando la differenza allelica risulta uguale/superiore a 2 bp. (A.Galli et al 2004)

Introduzione alle nuove tecniche di valutazione

Le tradizionali metodiche di valutazione del seme, utilizzate nei centri I.A., sono generalmente semplici e di veloce effettuazione, ma si limitano alla valutazione della motilità, della concentrazione di spermatozoi e alla presenza di cellule con grossolane anomalie morfologiche, parametri che se pur correlati con la capacità fecondante dell'eiaculato, non forniscono informazioni conclusive e con un sufficiente grado di attendibilità, tali da fornire all'allevatore utilizzatore di seme, la garanzia di qualità, determinando di conseguenza l'inevitabile comparsa dell'effetto paterno, come possibile causa/concausa di infertilità, qualora l'intervento inseminativo non palesi gli esiti attesi.

La ridotta attendibilità, che presentano le informazioni relative a valutazioni seminali condotte con le tradizionali tecniche, è attribuibile (oltre che alla considerazione di pochi parametri) a due nodi cruciali, e cioè la soggettività di analisi e la bassa ripetibilità delle misurazioni.

Essendo tali valutazioni, effettuate con metodologie, che necessitano dell'occhio umano per l'interpretazione, infatti, sono soggette inevitabilmente ad errori di quantificazione, direttamente proporzionali alla sensibilità e all'esperienza dell'operatore che le effettua, e quindi sono "vittime" della soggettività dell'occhio umano.

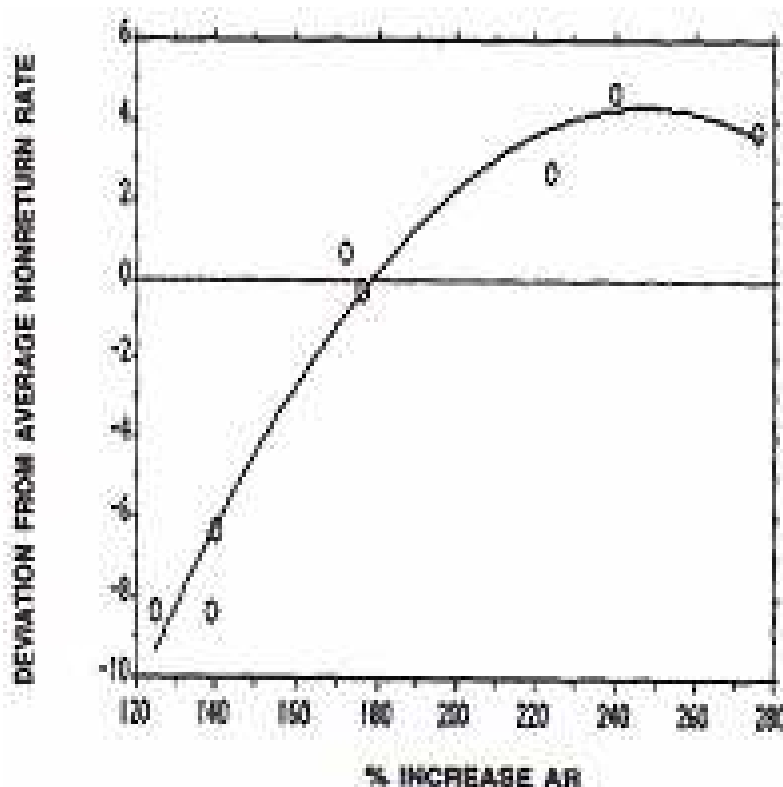
La bassa ripetibilità delle misurazioni, è da un certo punto di vista dovuta anche alla soggettività delle rilevazioni effettuate (in quanto valutazioni effettuate sullo stesso campione ma da più operatori, presentano un certo range di differenza), ma non è da sottovalutare anche l'aspetto relativo all'omogeneità del campione sul quale si effettua l'analisi, in quanto appunto si analizza solo una piccolissima quota dell'intero eiaculato, dando per scontato che essa sia rappresentativa dell'intero campione, e quindi "portavoce" delle informazioni medie dell'intero eiaculato. Ma ciò impone necessariamente la presenza di errori sistematici nella quantificazione finale, che sommati agli errori random dovuti alla soggettività di valutazione, ed estesi all'intero campione (da non sottovalutare l'ordine del numero di spermatozoi con il quale si lavora: "milioni") danno luce ad un notevole range di discostamento dal valore reale di NSPM, che è in conclusione il motivo della mediocre attuale attendibilità dei valori dichiarati per ogni eiaculato, e quindi anche per ogni dose "paillettes" immessa sul mercato. Per far fronte ai limiti relativi a tali valutazioni, sono state messe a punto (anche se tutt'ora in via di perfezionamento) tecniche di valutazione innovative, in grado di fornire elevatissima oggettività alle analisi (in quanto eseguite da computer, imparziali e non soggetti ad andamenti altalenanti attribuibili a stress, stanchezza o bassa competenza, caratteristiche strettamente umane!), e/o in grado di fornire informazioni, relative ad altri parametri correlati con la capacità fecondante dello spermatozoo (aspetti biochimici, ultrastrutturali e funzionali), che possono rappresentare una cospicua integrazione alle tradizionali tecniche di valutazione. Diverse nuove tecniche di valutazione sono state sviluppate e comparate con quelle già in uso, ma tra di esse, quelle che hanno suscitato maggiore interesse nei centri di valutazione (in quanto hanno dimostrato di possedere una capacità di eseguire analisi molto più dettagliate, precise, ripetibili ed oggettive), sono: La zona binding-ability, la zona-free Hamster Oocyte, l'Hypoosmotic swelling test, l'ASMA system e la citofluorimetria a flusso.

Zona free-Hamster Oocytes assay

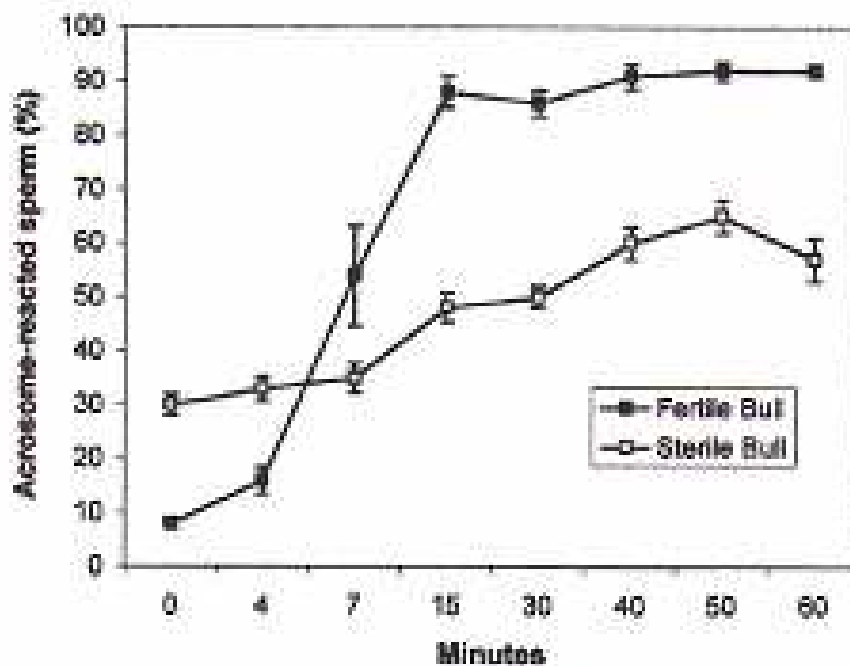
Tale metodica di valutazione si prefigge di quantificare la fertilità dell'eiaculato, attraverso la valutazione della capacità degli spermatozoi capacitati nel fecondare un'oocita di Hamster (oocita privo della zona pellucida) (N.Iqbac et al. 1995); quindi i parametri presi in considerazione sono fondamentalmente 2, e cioè:

- La capacità nell'effettuare la reazione acrosomiale;
- La capacità di penetrazione nell'oocita di Hamster (T. Katila 2001).

La capacità dello spermatozoo nell'espletare la reazione acrosomiale, è altamente correlata con la sua capacità fertilizzante, infatti si è dimostrato che: all'aumentare della % di reazione acrosomiale in un'eiaculato, si riduce il tasso di ritorno in calore (W.Lenz et al. 1988); e che la teratospermia di diversi tori è sufficientemente correlata con una bassa capacità nell'indurre reazione acrosomiale degli spermatozoi.

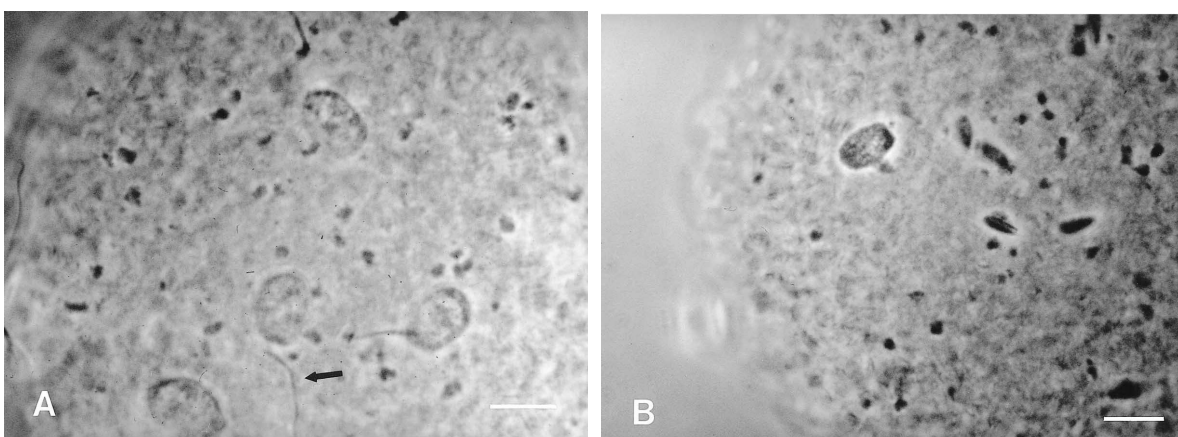


Relazione tra tasso di non ritorno in calore e incremento % della reazione acrosomiale (W.Lenze at al.1988)



Correlazione tra la % di spermatozoi in grado di espletare reazione acrosomiale e il tempo di reazione del seme di 8 tori fertili e 8 tori teratospermici (valutazioni effettuate con metodi di valutazione soggettiva) (R.Shelley et al. 2002).

La capacità di penetrazione nell'ovocita di Hamster invece è un parametro correlato con la motilità dello spermatozoo, e permette di stabilire semplicemente la % di spermatozoi capacitati, che al momento dell'incontro con l'ovocita, sono in grado di perforare ed attraversare la membrana plasmatica (R.P. Amman, 1989).



Immagini di oociti di hamster fecondati da spermatozoi appartenenti a tori fertili (immagine 1) e a tori sterili (immagine 2) (R. Shelley et al. 2002).

Protocollo standard di esecuzione:

- i. Mantenere per 30-60 minuti il campione seminale a temperatura ambiente fino a completa liquefazione;
- ii. Il terreno di coltura per questo test è il medium BWW (Biggers et al. 1971). Questo terreno viene preparato sotto forma di una soluzione stock che può essere conservata senza danno per diverse settimane a 4 °C. Al momento dell'uso, 100 ml di soluzione stock vengono supplementati con 210 mg di bicarbonato di sodio, 100 mg di glucosio, 0,37 mg di una soluzione di 600 g/l di sodio lattato, 3 mg di piruvato di sodio, 350 mg di frazione V di albumina serica bovina, 10000 unità di penicillina, 10 mg di streptomicina solfato e Sali di Hepes 20 mM. Il medium deve essere scaldato a 37°C prima dell'uso, preferibilmente in un'atmosfera di CO₂ al 5% ed aria al 95%.

Componenti della soluzione stock di BWB

Sostanza	Quantità g/l
NaCl	5,540
KCl	0,356
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,250
KH ₂ PO ₄	0,162
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,294
Rosso fenolo 1,0 ml/l	

- iii. Durante il tempo di incubazione, la maggior parte degli spermatozoi mobili migra dal plasma seminale al medium stratificato sopra di esso;
- iv. La sospensione di spermatozoi, viene centrifugata a 500g per 5 minuti, risospesa per ottenere una concentrazione di 10x10⁶ spermatozoi/ml in un volume non inferiore a 0,5 ml ed incubata per 18-24 ore a 37°C in un'atmosfera di CO₂ al 5% ed aria al 95% (se non è possibile un incubatore adeguato, le provette possono venire mantenute a 37°C all'aria, dopo aver serrato bene il tappo. Durante l'incubazione le provette dovrebbero stare inclinate con un angolo di 20° rispetto all'orizzontale, per evitare la sedimentazione di spermatozoi nel pellet e per aumentare la superficie disponibile per gli scambi gassosi.
- v. Gli oociti possono essere ottenuti o da femmine immature di hamster, oppure da femmine mature, trattate il giorno prima del ciclo estrale. Siero di cavalla gravida (PMS) e gonadotropina corionica umana (hCG) iniettate intraperineo al dosaggio di 30-40 UI, a 48/72 ore, separatamente. In seguito, gli oociti dovrebbero essere prelevati entro 18 ore dall'iniezione di hCG e trattati a temperatura ambiente con ialuronidasi allo 0,1% e tripsina allo 0,1% per rimuovere, rispettivamente, le cellule del cumulo e la zona pellucida. Ciascun trattamento dovrà essere seguito da due lavaggi in medium BWB. Gli oociti isolati possono

essere riscaldati a 37°C ed introdotti immediatamente nella sospensione di spermatozoi, oppure conservati a 4°C fino a 24 ore;

- vi. Alla fine della fase di capacitazione, le provette di incubazione vengono riportate in posizione verticale per 20 minuti per far sedimentare le cellule immobili, dopo di che gli spermatozoi mobili vengono aspirati con il soprannatante e portati alla concentrazione di $3,5 \times 10^6$ spermatozoi mobili/ml. Gli spermatozoi vengono quindi posti sotto paraffina liquida in gocce di 50-100µl, a cui vengono aggiunti gli oociti "zona free" di hamster nella misura di almeno 15 per gocciolina. I gameti vengono quindi incubati a 37°C in un'atmosfera di CO₂ al 5% ed aria al 95% per 3 ore.
- vii. Il numero degli spermatozoi che sono penetrati negli oociti viene quindi valutato accuratamente, dopo aver rimosso gli oociti ed averli liberati, con un lavaggio, dagli spermatozoi bassamente adesi; successivamente gli oociti vengono compressi allo spessore di 30µm sotto un copri oggetto 22x22mm ed esaminati al microscopio in contrasto di fase;
- viii. Gli oociti dovrebbero essere quindi osservati per determinare la percentuale di quelli che hanno spermatozoi nel citoplasma ed il numero medio di spermatozoi incorporati in ciascun oocita. La presenza di spermatozoi che rimangono legati alla superficie dell'oocita dopo il lavaggio iniziale dovrebbe, inoltre essere annotato, dal momento che esso può fornire indicazioni sulla percentuale di spermatozoi che hanno avuto la reazione acrosomiale. (G. F. M. Fabris et al. 2001).

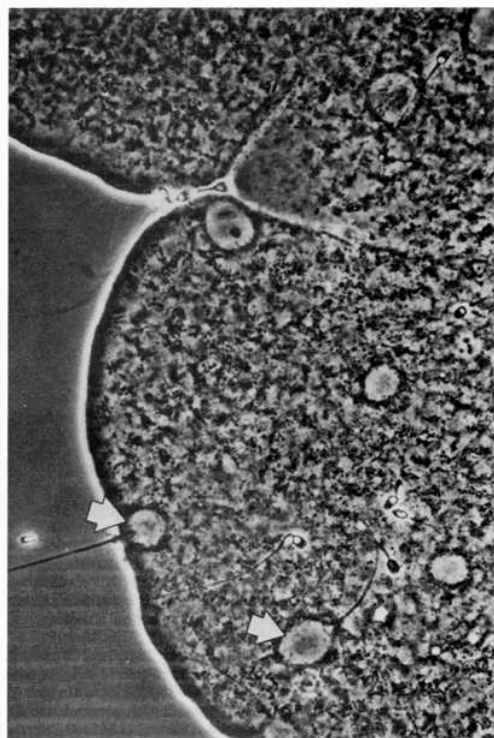


Immagine di un oocita zona free di hamster appena colonizzato dagli spermatozoi, come appare in microscopia di fase. Le frecce indicano la presenza di teste di spermatozoi decondensate entro l'ooplasma (scala 1:500) (Aitken et al. 1983).

Il grande limite del test “Zona free Hamster Oocyte” sta nell’incapacità nel valutare la capacità dello spermatozoo nel legarsi ed attraversare la zona pellucida dell’oocita, che rappresenta la prima barriera per la fecondazione, nonché l’ostacolo che maggiormente pregiudica il cammino degli spermatozoi.

Inoltre la messa a nudo della membrana plasmatica dell’oocita (attraverso l’asportazione della zona pellucida) può determinare l’uccisione della cellula, determinando quindi anomalie nella normale resistenza alla penetrazione degli spermatozoi, e quindi falsare i risultati del test (Truelson et al. 1996).

I risultati del test non sono di per sé conclusivi (A. Okoloski, 1987), pertanto possono essere utilizzati come parametri complementari ai risultati ottenuti con i test soggettivi utilizzati routinariamente nei laboratori di analisi, in quanto non presentano elevati costi di esecuzione; tenendo conto comunque che l’utilità di tali misurazioni è relativa, e può essere valutata con altri test multipli (più dettagliati) come la valutazione della Zona Binding Ability, o la valutazione microscopica in fluorescenza.

Zona Binding Ability

E' questa una tecnica di valutazione che si propone di determinare la relazione tra la capacità di legame competitiva in vitro (tra l'acrosoma dello spermatozoo e la zona pellucida dell'oocita) e la fertilità in vivo del seme oggetto di valutazione.(Rogers et. al 1985; R. Puglisi et al. 2004)

La metodica di competizione in vitro consiste nel mettere a contatto materiale seminale, appartenente a più individui, ciascuno dei quali marcato con differenti fluorofori (sostanze coloranti) (S.P.S. Gill et al. 1999), con oociti appartenenti a più femmine, al fine di valutare attraverso il test di paternità, che utilizza appunto marcatori micro satellite (Brandmeier A.G. et al. 2001; E.D.Collins et al. 2008), a quale individuo è attestabile la maggiore capacità fecondante e in che misura.

Diagramma delle prove di competizione tra materiale seminale appartenente a diversi individui: Ad ogni toro è assegnata in maniera casuale una lettera dalla A alla H, e con X si evidenziano i semi utilizzati per ogni prova di competizione.

Bull	A	B	C	D	E	F	G	H
A		X	X	X				
B			X	X	X			
C				X	X	X		
D					X	X	X	
E						X	X	X
F	X						X	X
G	X	X						X
H	X	X	X					

Per classificare la Binding-ability dello sperma di ciascun individuo, viene utilizzato il modello ANOVA (test per l'analisi della varianza), un test statistico che si effettua con la seguente formula:

$$nb=assay+comp(assay)+bull+b(tb)+dye+dye*bull+random\ error$$

dove:

-nb: numero di spermatozoi legati all'oocita;

-assay: risultato della rilevazione microscopica;

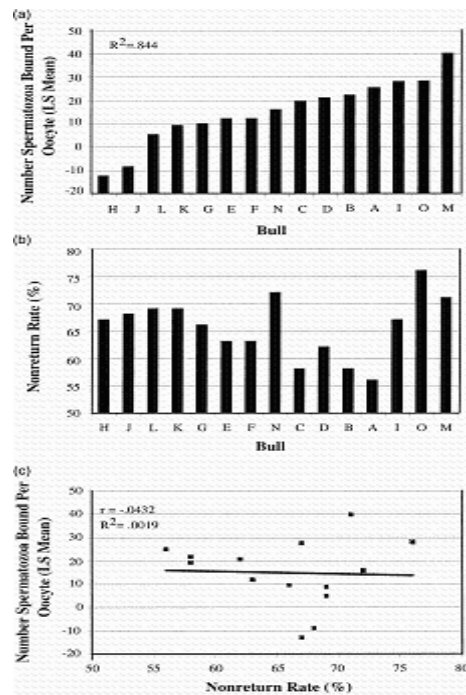
- comp(assay): incidenza dell'assegnazione del colorante per ogni competizione nelle diverse valutazioni;
- bull: effetto del maschio;
- b(tb): coefficiente di regressione tra nb e tb
- dye: effetto di ogni colorazione
- dye*bull: interazione tra effetto del maschio e colorazione;
- random error: errore standard.(A.G.Brandmaier et al. 2003)

Tale metodo di rilevazione si è dimostrato idoneo per la classificazione del materiale seminale per la capacità di legame del seme con la zona pellucida, ma non si può dire altrettanto della efficacia del metodo di valutazione nei confronti della fertilità dell'individuo frutto di analisi (A.Galli et al. 2002). Diverse prove infatti sono state effettuate al fine di verificare l'effettiva attendibilità di tale metodo di valutazione in relazione con la fertilità bovina, ma i risultati sono stati tutti controversi. Si sono messi in relazione i valori ottenuti con i test in vitro con parametri quali:

- Il non ritorno in calore dopo 60 e 90 giorni;
- I risultati dell'esame eterospermico (Saacke et al. 1980);
- Il numero di spermatozoi accessori per oocita.

Relazione tra competitive zona binding-ability e non ritorno in calore a 60 giorni

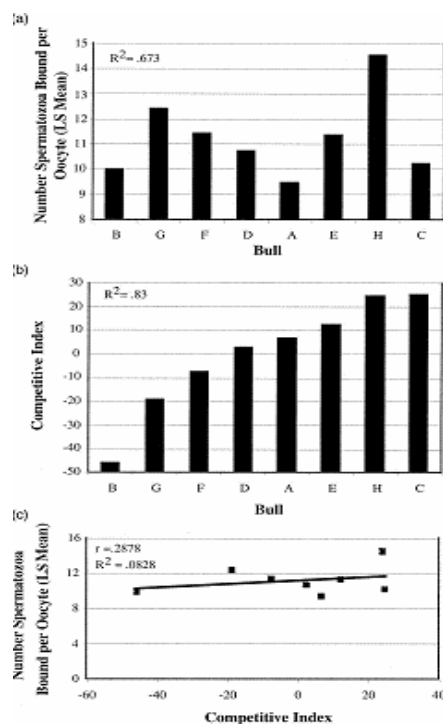
Per tale test è stato utilizzato lo sperma appartenente a 15 tori, dei quali si conosce il profilo storico per il parametro non ritorno in calore a 60 giorni:



Dalla tabella si evince come la binding-ability degli spermatozoi non sia significativamente correlata con la fertilità del toro di appartenenza calcolata sulla base del non ritorno in calore ($r = -0,04$ $R^2 = 0,002$).

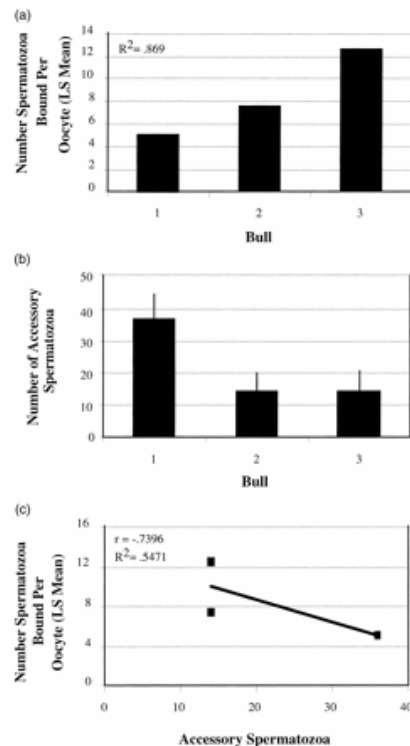
Relazione tra competitive zona binding-ability e competitive insemination

Per tale test è stato utilizzato il seme di 8 tori, contemporaneamente su più oociti, e il successivo esame di paternità è stato effettuato tramite rilevazione dei marcatori micro satelliti:



Anche in questo caso però i risultati ottenuti hanno determinato una non correlazione tra i due parametri considerati.(A. Galli et al. 2002)

Relazione tra zona binding-ability e spermatozoi accessori



La non correlazione ottenuta dall'analisi della binding-ability e i vari parametri usati per la comparazione, non deve però classificare tale metodo di valutazione come assolutamente inadeguato, in quanto in tali comparazioni non sono stati prese in considerazione alcune caratteristiche fondamentali dello spermatozoo, come la normalità e la motilità.

Altri test effettuati su suini infatti, hanno evidenziato un'importante correlazione tra il numero di suinetti generati da ogni verro e la combinazione tra binding-ability, motilità, normalità e integrità acro somale (A.G.Brandmeier et al. 2003). Inoltre test di valutazione in vitro hanno dimostrato che la maggior causa di non fertilizzazione è attestabile proprio all'inefficienza nella corretta interazione tra spermatozoo e zona pellucida(Liu D.Y. et al. 2000).

Quindi il test per la rilevazione della capacità di legame (zona binding-ability) pur non essendo di per sé conclusivo, può essere efficacemente utilizzato come prova complementare ai normali test attualmente utilizzati per la valutazione seminale, in virtù soprattutto della sua facilità e del basso costo di esecuzione.

Hypo osmotic swelling test (HOS-test)

L'Hypo osmotic swelling test, è una procedura di valutazione del materiale seminale, che si prefigge l'obiettivo di identificare e quantificare percentualmente il numero di spermatozoi presenti in un eiaculato, aventi una membrana plasmatica integra, ed esente da alterazioni.(J.R.Correa et al. 1994)

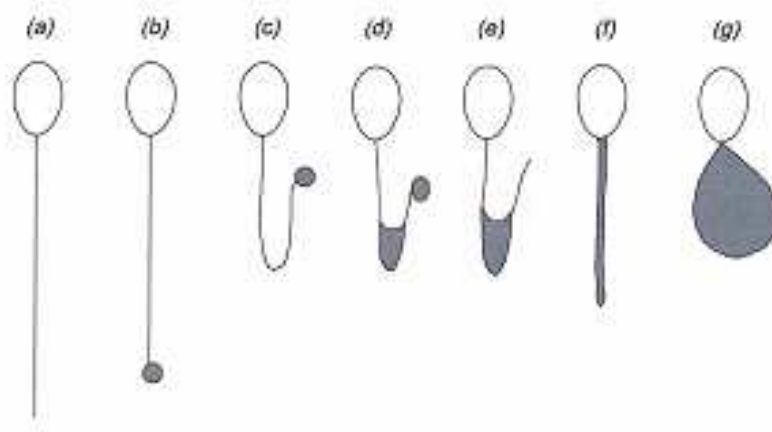
L'integrità funzionale della membrana plasmatica, è un parametro altamente correlato con la capacità fecondante dello spermatozoo (Neild D.M. et al. 2000), in quanto la presenza di anomalie a suo carico, è intrinseca soprattutto a spermatozoi morti e a spermatozoi, che pur non avendo ancora perso la motilità, non sono più in grado di fecondare un oocita (la capacità fecondante viene persa prima della motilità!).

Il principio di funzionamento di tale test, si basa proprio sul comportamento che assumono gli spermatozoi con membrana integra, in condizioni ipo-osmotiche (Jeyendram R.S. et al. 1992); queste infatti una volta poste in soluzione ipo-osmotica si rigonfiano per ingresso del solvente (espansione del volume cellulare), in condizioni di alterata funzionalità del plasmalemma, l'equilibrio osmotico è raggiunto attraverso la perdita di soluti, che quindi determinano il non rigonfiamento cellulare (L. Drevious et al. 1966)



Procedimento:

- Il primo step consiste nel comporre la soluzione ipo-osmotica: si sciolgono 0,735 gr. di citrato di sodio bi-idrato $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 2\text{H}_2\text{O}$ e 1,351 gr. di fruttosio in 100ml di H_2O distillata;
- Riscaldare a 37°C per 5 minuti, 1 ml di soluzione ipo-osmotica (ben mescolata) in una provetta Eppendorf chiusa. Aggiungere 0,1 ml di sperma liquefatto e mescolare delicatamente con una pipetta;
- Mantenere a 37°C per almeno 30 minuti (ma non oltre i 120) ed osservare con un microscopio a contrasto di fase con ingrandimento 40x uno striscio del preparato su di un apposito vetrino;
- Il rigonfiamento degli spermatozoi viene rilevato dalla presenza di modificazioni del profilo del flagello;
- Contare in doppio gli spermatozoi rigonfi (su 2 strisci) su di un totale di 200 spermatozoi, e calcolare la percentuale media;
- Il risultato viene espresso come percentuale di spermatozoi rigonfi, sul totale di quelli contati. (G.F.M. Fabbris et al. 2001)



Rappresentazione

schematica delle modificazioni morfologiche degli spermatozoi sottoposti a stress ipo-osmotico: (a)= nessun cambiamento; (b-g)= diversi tipi di modificazione della coda.

Il test di swelling (HOS) viene considerato normale quando almeno il 60% degli spermatozoi va incontro al rigonfiamento della coda. Se meno del 50% delle cellule mostra rigonfiamento, l'eiaculato deve essere considerato anomalo (condizioni di ipofertilità o subfertilità). Poiché alcuni liquidi seminali contengono spermatozoi con flagello avvolto prima dell'esposizione alla soluzione ipo-osmotica, è essenziale che l'eiaculato sia osservato prima del trattamento. La percentuale di spermatozoi con coda avvolta nel campione non trattato dovrebbe essere sottratta dalla percentuale ottenuta dopo trattamento, per ottenere quella degli spermatozoi che realmente hanno risposto al test.

Diversi studi sono stati effettuati al fine di rilevare l'effettiva applicabilità di tale test, nelle routinarie metodiche di valutazione del seme; sono stati comparati infatti i risultati di rilevazioni eseguite con le tradizionali tecniche di valutazione qualitativa standard (analisi cinetica e morfologica), con citofluorimetria a flusso e con Hos-test, palesando una concreta interscambiabilità dei risultati, che consiglia la bontà di tale metodo di valutazione (D.Neild et al.1999).

In ultima analisi è possibile affermare che l'HOS-test pur non fornendo informazioni di per sé conclusive riguardo alla fertilità seminale, rappresenta un valido complemento alle convenzionali metodiche utilizzate nei laboratori specializzati per la valutazione seminale (H.Yavetz et al.,1995), in virtù soprattutto del bassissimo costo di esecuzione, della facilità di interpretazione, della velocità con la quale è possibile ottenere la valutazione (40 minuti circa) (Neild et al. 1999), e della più che soddisfacente oggettività che presenta nell'analisi.

ASMA system (Automated sperm morphometry analysis system)

L'ASMA system è una sofisticata metodica di valutazione del materiale seminale, che permette di rilevare in maniera del tutto oggettiva la normalità degli spermatozoi (Gravance et al. 1995).

L'oggettività di tale strumentazione è dovuta all'analisi completamente computerizzata delle caratteristiche morfometriche dello spermatozoo, che considera una moltitudine di parametri morfologici (Sancho M. et al. 1998), altamente correlati con la capacità fertilizzante, tra i quali alcuni rilevabili esclusivamente attraverso sistemi di misurazione estremamente precisi.

L'ASMA system è stata originariamente concepita per la valutazione dello sperma umano, e la sua introduzione come metodica di laboratorio è piuttosto recente (1990) (Davis et al. 1992); ma successivamente è stata progressivamente adottata per la valutazione del materiale seminale appartenente ad altre specie di interesse zootecnico. (Gravance et al. 1996).

L'intera strumentazione è costituita da:

- un microscopio a contrasto di fase con obiettivo 100x e oculare 3,3;
- una videocamera (montata sul microscopio) per la captazione e la trasmissione delle immagini al sistema di digitalizzazione;

- e da un computer in grado di digitalizzare le immagini, effettuare la misurazione di tutti i parametri impostati, calcolare (utilizzando le misurazioni rilevate) tutti i valori morfometrici di interesse, e quindi di stimare la normalità spermatica.

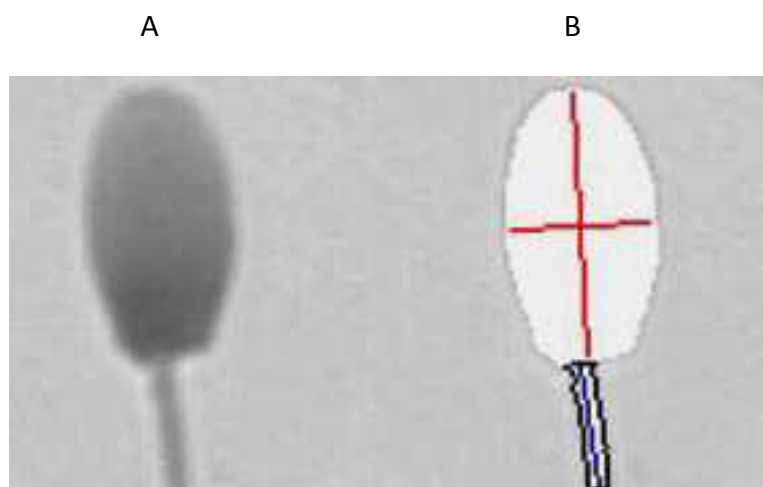


Procedura di effettuazione:

- I
Il primo step prevede la raccolta del seme, la sua diluizione con extender e la successiva incubazione a 37 °C;
- S
Successivamente si rileva la sua concentrazione attraverso metodi soggettivi (Gravance G. et al. 1997), come: ematocitometro o CASA-system;
- S
Si prelevano 200 µl di sperma diluito, si depositano in una provetta di eppendorf, vi si aggiunge DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) e si centrifuga il tutto ad una velocità di 600 giri/minuto;
- T
Terminata la centrifuga si elimina il surnatante e si risospende il seme centrifugato in DPBS, fino al raggiungimento della concentrazione di 50 milioni di spermi/ml;

- S
i prelevano 7 μ l del materiale appena diluito, e si depositano su di un vetrino;
- S
i fissa il materiale con opportuni fissanti (Diff-Quik DQ; Haemacolor HC; Harris' Haematoxilin HH);
- S
i sottopone il vetrino a visione microscopica attraverso l'utilizzo di un'ottica ad immersione con ingrandimento 100x.

Terminato il processo di preparazione del vetrino da analizzare, si procede con la taratura del sistema di rilevazione delle immagini, che consiste nel regolare la sensibilità dei sensori per la captazione dei diversi livelli di grigio, al fine di permettere l'efficiente individuazione degli spermatozoi necessari all'analisi, nonché del loro integrale profilo. Terminato anche il settaggio, si dà via all'acquisizione delle immagini, e alla loro digitalizzazione, che permetterà infine la rilevazione dei parametri di interesse morfometrico (Il numero di spermatozoi sui quali si effettuano le misurazioni viene stabilito dall'operatore, mentre la scelta degli spermatozoi da analizzare, è eseguita in maniera random dall'ASMA system).(Boersma A. et al. 1999)



Frame relativo ad uno spermatozoo che ha subito il processo di digitalizzazione (A), e analisi morfometrica(B) attraverso l'utilizzo dell'ASMA system.

I valori misurati dall'ASMA system sono 13, e sono:

Per la taglia dell'acrosoma:

- Altezza (L , in μ m);
- Larghezza (W , in μ m);

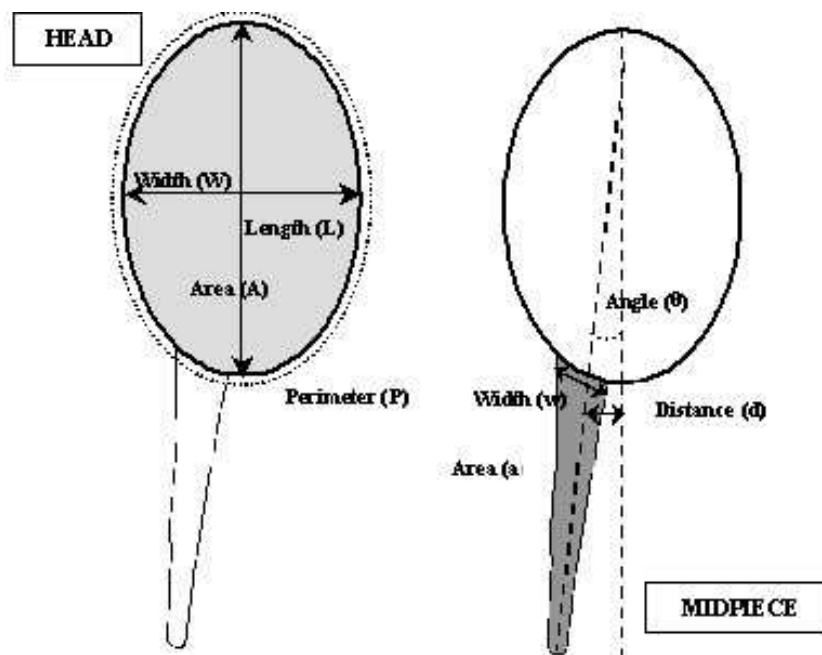
- Area (A, in μm^2);
- Perimetro (P, in μm).

Per la forma dell'acrosoma:

- Ellitticità = (L/W) ;
- Rugosità = $(4\pi A/P^2)$;
- Allungamento = $((L-W)/(L+W))$;
- Regolarità = $(\pi LW/4A)$.

Per la parte intermedia:

- Larghezza (w, in μm);
- Area (a, in μm);
- Distanza (d, in μm) (tra l'asse dello spermatozoo e l'ipotetico asse verticale dello stesso);
- Angolo ($^\circ$) (divergenza tra asse dello spermatozoo e ipotetico asse verticale dello stesso).



Parametri morfometrici rilevati e analizzati dall'ASMA system (Soler et al., 2003).

Il punto cruciale dell'intera pratica di valutazione attraverso l'ASMA system, sta nella corretta rilevazione del profilo dello spermatozoo, nell'immagine digitalizzata; infatti non è solo necessario che gli spermi presentino livelli di grigio compatibili con il sistema di captazione del computer, ma è anche necessario che la diversa distribuzione del colore nello spermatozoo appena fissato non determini errori nella digitalizzazione (Van der Horst, 2009), che determinerebbero di conseguenza la rilevazione di misure falsate, falsando di conseguenza l'intera procedura.

Per tale motivo, assume una rilevante importanza l'oculata scelta del metodo di fissazione e colorazione degli spermatozoi, prima di sottoporli ad analisi (Boersma A. et al., 2001).

Diverse ricerche hanno dimostrato la completa incompatibilità di metodi di colorazione come Papanicolaou, Spermac, Tripan blue e Giemsa, inquanto non permettono la digitalizzazione delle immagini (Gravance et al., 1995).

Altri metodi di colorazione come Diff-Quik, Hemacolor e Harri's Haematoxilin, in virtù soprattutto della sufficiente compatibilità con il sistema di digitalizzazione immagini rilevata in esperimenti su materiale seminale umano, sono stati comparati tra di loro, nella valutazione di materiale seminale appartenente a stalloni con caratteristiche di concentrazione, motilità e normalità già note. Tali prove hanno dimostrato che solo l'Harri's haematoxilin permette una sufficientemente corretta e precisa analisi degli spermatozoi (80,47%), mentre gli altri e due metodi palesano pesanti limiti, che falsano la valutazione. (Hidalgo M. et al., 2005).

Tabella 1: percentuale di corrette valutazioni di spermatozoi (n=2420) effettuate su materiale seminale appartenente a 6 stalloni differenti con 3 diverse metodiche di colorazione.

Animal	Staining Method (% correctly analysed)		
	Diff-Quik	Hemacolor	Harris' Haematoxylin
1	43.77	72.85	88.10
2	43.72	89.47	74.62
3	60.79	37.82	75.28
4	57.71	52.63	83.68
5	50.25	54.30	81.70
6	75.38	63.52	79.44
CV	21.88	29.01	6.39
Mean	55.27 ^a	61.76 ^a	80.47 ^b

CV= coefficiente di variabilità (%)

Tabella 2: effetto delle 3 differenti tecniche di colorazione sui parametri morfometrici relativi a testa e parte intermedia di spermatozoi appartenenti a 6 stalloni differenti.

Stain	Diff-Quik	Hemacolor	Harris' Haematoxylin
n	612	603	1 205
Head Parameters			
Length (µm)	5.87 ± 0.39 ^a	5.90 ± 0.41 ^a	5.67 ± 0.36 ^b
Width (µm)	3.07 ± 0.27 ^a	2.97 ± 0.30 ^b	2.85 ± 0.31 ^c
Area (µm ²)	14.72 ± 1.72 ^a	14.29 ± 1.85 ^b	13.42 ± 1.72 ^c
Perimeter (µm)	15.64 ± 0.92 ^a	15.61 ± 1.00 ^a	15.00 ± 0.89 ^b
Ellipticity	1.92 ± 0.18 ^a	2.00 ± 0.19 ^b	2.00 ± 0.20 ^b
Rugosity	0.75 ± 0.04 ^a	0.73 ± 0.04 ^b	0.76 ± 0.04 ^c
Elongation	0.31 ± 0.04 ^a	0.33 ± 0.04 ^b	0.33 ± 0.05 ^b
Regularity	0.96 ± 0.03 ^a	0.96 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.03 ^b
Midpiece Parameters			
Width (µm)	0.96 ± 0.23 ^a	0.82 ± 0.23 ^b	0.81 ± 0.27 ^b
Area (µm ²)	2.09 ± 0.50 ^a	1.72 ± 0.48 ^b	1.63 ± 0.56 ^c
Distance (µm)	0.27 ± 0.13 ^a	0.26 ± 0.13 ^a	0.26 ± 0.12 ^a
Angle (°)	5.63 ± 6.02 ^a	6.83 ± 7.76 ^b	6.28 ± 6.34 ^{a,b}

n= numero di spermatozoi analizzati

Il punto di forza dell'ASMA system sta nella precisione e nella ripetibilità delle rilevazioni effettuate, infatti la comparazione di dati ottenuti analizzando serie di 100, 150, 175 e 200 spermatozoi, ha palesato minime differenze tra i vari parametri presi in considerazione, ragion per cui è sufficiente l'estensione di tale metodo di valutazione a 100 spermatozoi (scelti in maniera random) per ogni analisi, in virtù anche del notevole risparmio di tempo. (Hidalgo et al. 2005).

Tabella 3: comparazione di valutazioni effettuate su serie di 100, 150, 175 e 200 spermatozoi, appartenenti a 6 stalloni differenti.

Spermatozoa sampled	Head Parameters			
	Length (μm)	Width (μm)	Area (μm^2)	Perimeter (μm)
100	5.64 ± 0.01	2.84 ± 0.01	13.33 ± 0.07	14.95 ± 0.04
150	5.66 ± 0.01	2.86 ± 0.01	13.42 ± 0.06	15.00 ± 0.03
175	5.66 ± 0.01	2.86 ± 0.01	13.44 ± 0.05	15.01 ± 0.03
200	5.66 ± 0.01	2.85 ± 0.01	13.42 ± 0.05	15.00 ± 0.03
Spermatozoa sampled	Midpiece Parameters			
	Ellipticity	Rugosity	Elongation	Regularity
100	2.00 ± 0.01	0.75 ± 0.001	0.33 ± 0.002	0.95 ± 0.001
150	2.00 ± 0.01	0.75 ± 0.001	0.33 ± 0.002	0.95 ± 0.001
175	2.00 ± 0.01	0.75 ± 0.001	0.33 ± 0.002	0.95 ± 0.001
200	2.00 ± 0.01	0.75 ± 0.001	0.33 ± 0.001	0.95 ± 0.001
Spermatozoa sampled	Midpiece Parameters			
	Width (μm)	Area (μm^2)	Distance (μm)	Angle ($^\circ$)
100	0.81 ± 0.01	1.61 ± 0.02	0.25 ± 0.005	6.22 ± 0.26
150	0.81 ± 0.01	1.63 ± 0.02	0.26 ± 0.004	6.23 ± 0.21
175	0.81 ± 0.01	1.63 ± 0.02	0.26 ± 0.004	6.28 ± 0.19
200	0.81 ± 0.01	1.63 ± 0.02	0.26 ± 0.004	6.28 ± 0.18

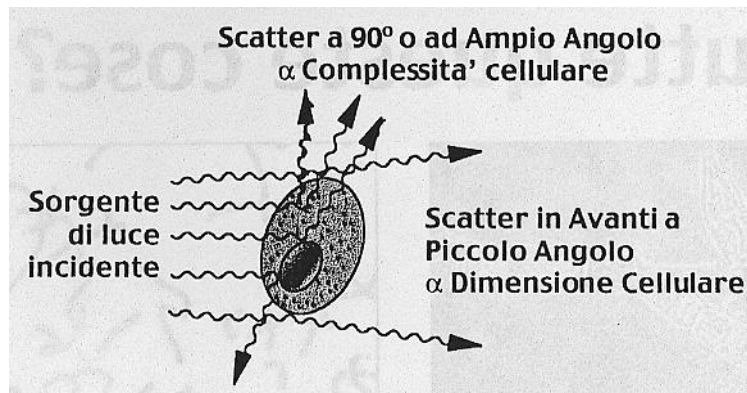
Citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso è una tecnica di misurazione multiparametrica di caratteristiche fisiche e/o biochimiche (D.Pinkel et al 1985), condotte su cellule in sospensione all'interno di un fluido di trasporto, che interseca una sorgente di eccitazione. Tale tecnica permette la rilevazione di una vasta gamma di parametri, relativi agli spermatozoi (M.Spanò et al., 1993; J.K. Graham, 2001), e tra questi possiamo annoverare:

- La taglia e la complessità morfologica della cellula;
- L'integrità di membrana;
- La motilità cellulare;
- Il grado di capacitazione;
- L'attività mitocondriale
- La quantità di DNA ed RNA contenuti nel nucleo, nonché il grado di compensazione della cromatina; (A. Januaskauska et al., 2001; L. Gillan et al., 2004; J.K. Grahman et al., 1990)

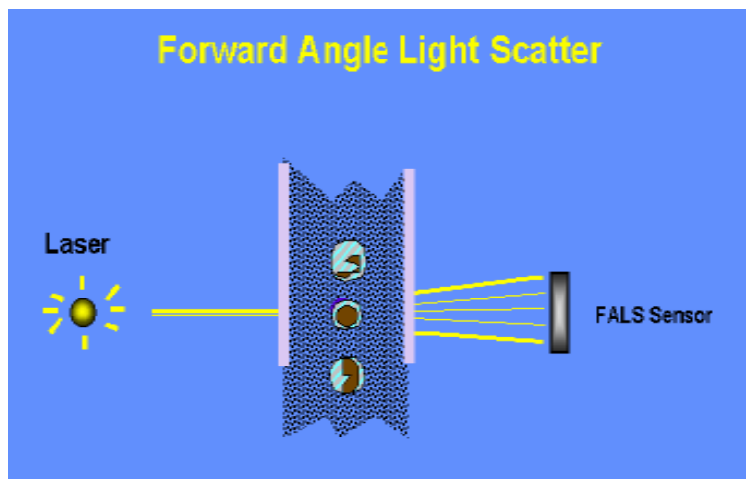
Il suo meccanismo di funzionamento si basa sul principio di comportamento delle particelle, costituenti la materia in presenza di una fonte energetica eccitante; infatti la materia si può considerare come composta da particelle dotate di cariche elettriche discrete e di segno opposto, che una volta colpite da un'onda elettromagnetica oscillano, liberando a loro volta radiazioni elettromagnetiche in tutte le direzioni (radiazione diffusa) e il fenomeno ad esso associato è noto come light scattering (LS) (F. Crescentini, 2004).

Utilizzando parametri legati a LS è possibile risalire alle dimensioni del campione e alla sua granularità relativa (complessità interna).



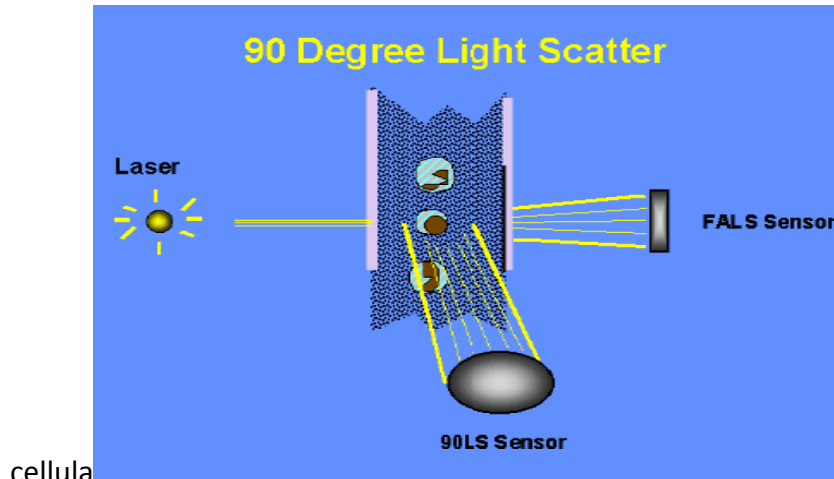
Quando si utilizza un citometro a flusso, i dati di LS vengono generalmente acquisiti in diffusione centrale e laterale:

- La diffusione frontale FSC (forward scattering) è rilevata a 0° mascherando il fascio di radiazione (permette di identificare il diametro relativo cellulare);



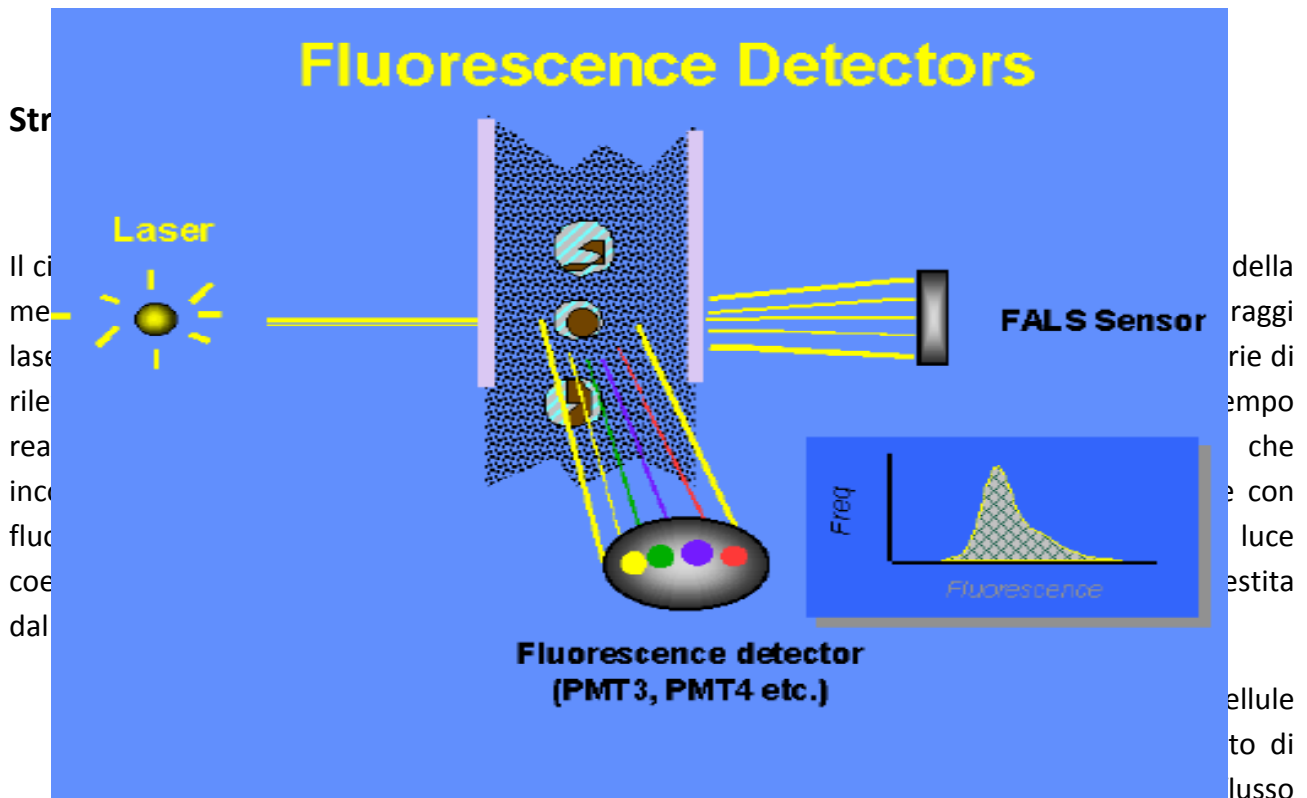
- La diffusione laterale SSC (side scattering) è rilevata a 90° rispetto la direzione di propagazione del fascio investigante (permette di rilevare la granulosità citoplasmatica)

relativa e la complessità interna della



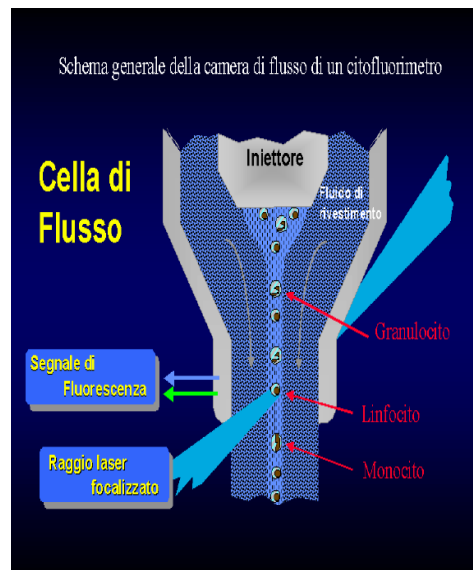
cellula

Se le particelle sono state marcate con una o più sostanze fluorescenti (J.M. Morrel, 1991), al momento del contatto con la fonte elettromagnetica eccitante, emanano fotoni con intensità luminosa variabile in base alle caratteristiche cellulari. Tali emissioni vengono separate attraverso un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, (in modo tale da permettere l'analisi separata di tutte le diverse fluorescenze FL1, FL2, FL3, FL4 ecc...) e trasformate in impulsi elettrici di intensità direttamente proporzionale alla luce raccolta (conversione analogico-digitale), che possono essere analizzati per mezzo di un computer



(particolare capillare realizzato solitamente in quarzo sintetico) vengono immesse tramite un iniettore le cellule monodisperse, che vengono in tal modo spinte in un altro flusso

fluidico (costituito dal fluido di trasporto messo in moto da un apparato idropneumatico dedicato).



Così facendo quindi le singole particelle in sospensione vengono forzate a fluire al centro del capillare stesso dove è focalizzata la sorgente luminosa (F. Ferrara, 2005).

- La componente ottica è quella che genera e raccoglie i segnali. Nella grande maggioranza dei citofluorimetri, si utilizza una sorgente luminosa ad ioni Argon, centrata su una lunghezza d'onda di 488 nm (blu). Tale luce consente una efficace misura dei parametri fisici, inoltre permette la contemporanea eccitazione di diversi fluoro cromi. Se è necessario utilizzare altre lunghezze d'onda, bisogna utilizzare altri tipi di laser (Krypton, Elio Neon, ecc.), ma l'elevato costo di solito ne sconsiglia l'acquisto da parte dei centri di analisi.

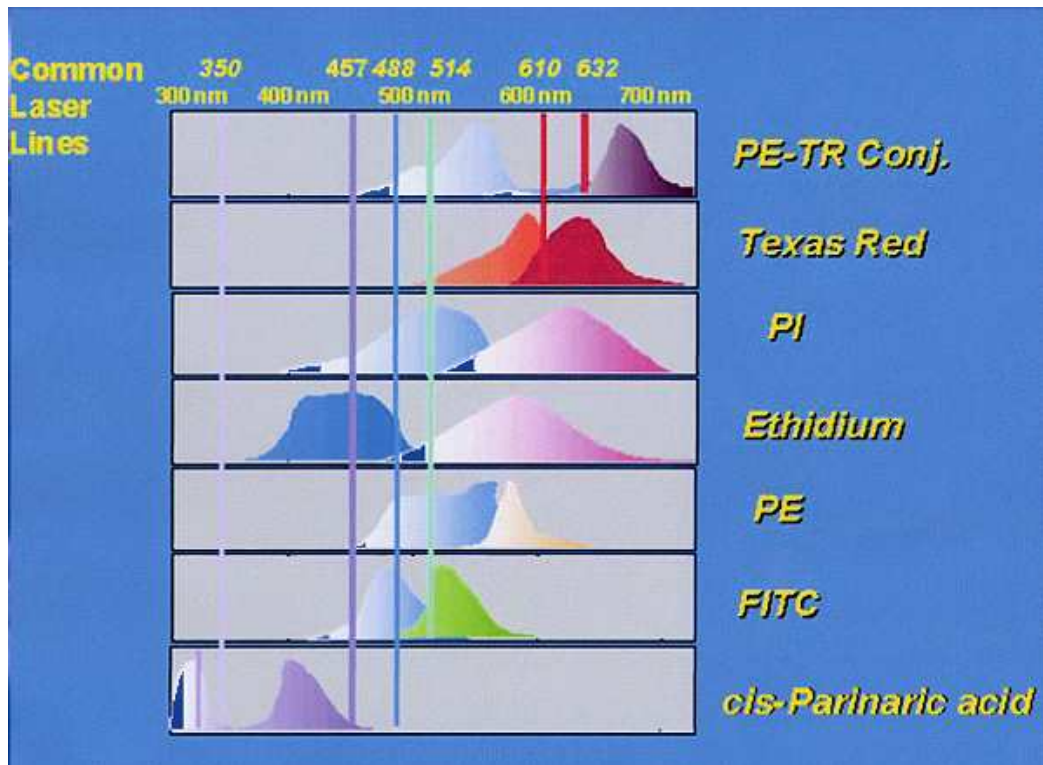


- Un'alternativa più economica, è costituita dall'uso di citometri a lampada, che hanno come fonte di eccitazione una lampada a vapori di mercurio o xenon che non richiede particolari sistemi di raffreddamento (componente che determina pesantemente l'elevato costo della strumentazione) (Howard M. Shapiro, 1994);

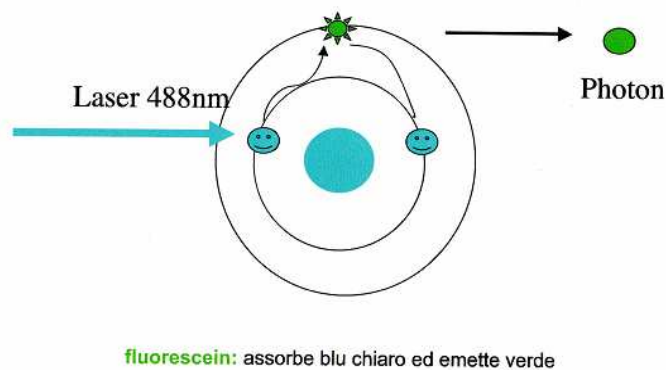


- Una volta colpita dal fascio di luce emesso dal laser, la cellula emette segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche. Tali segnali, sotto forma di fluorescenza, per poter essere analizzati singolarmente, devono essere prima separati, e per far ciò si può ricorrere:

I. All'utilizzo di diversi fluorocromi con lunghezza d'onda diversa,



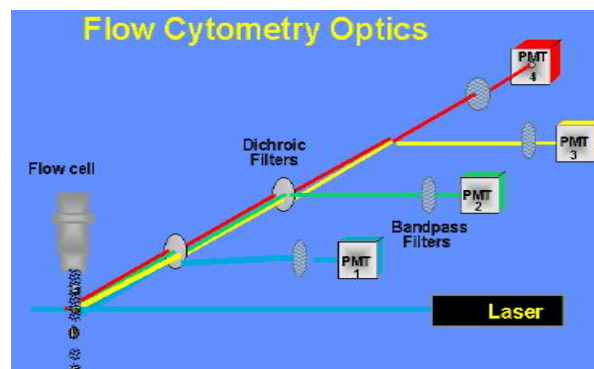
Le sostanze fluorescenti, o marcatori, hanno la capacità di assorbire determinate lunghezze d'onda quando vengono eccitate, e di emettere un'altra lunghezza d'onda diversa da quella assorbita (D.L. Garner et al., 1995). Ovviamente con l'utilizzo di più fluorocromi simultaneamente, è possibile identificare in una certa popolazione elementi con diverse fluorescenze, relative a diverse caratteristiche cellulari (Evenson et al., 1993; Bernas et al., 2005)



- II. Alla pluriexcitazione effettuata attraverso l'utilizzo di diversi laser. Ci sono 4 diverse opzioni: 488 nm blu, 633 red, 405 violet, 350 uv.



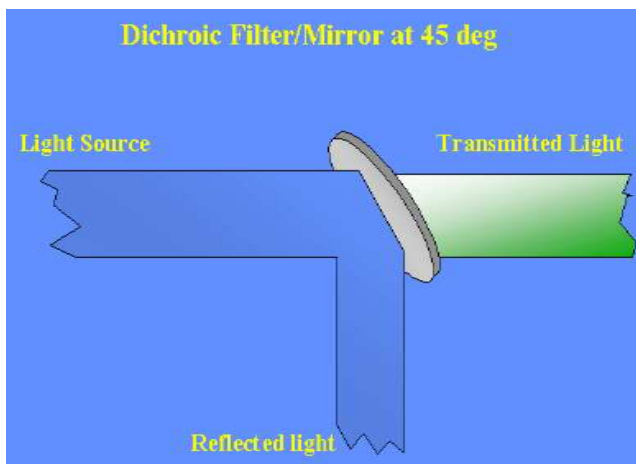
- III. All'utilizzo di diversi filtri e specchi ottici, attraverso i quali è possibile separare le diverse lunghezze d'onda ed inviarle a diversi detectors:



Si utilizzano fondamentalmente 3 tipi di filtri ottici:

Long Pass: passano le lunghezze d'onda **superiori** al filter number

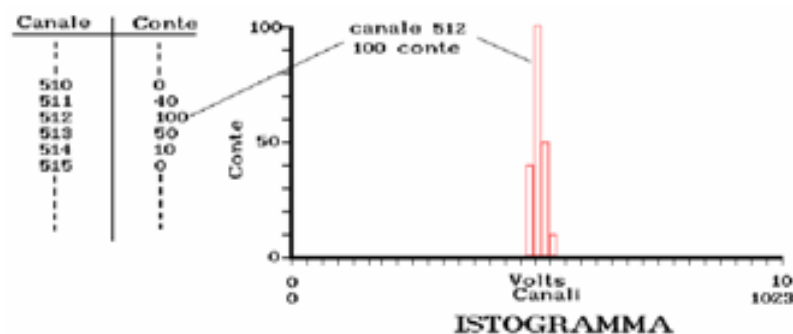
Short Pass: passano le lunghezze d'onda **inferiori** al filter number



Dichroics: riflettono le lunghezze d'onda superiori e inferiori al filter number

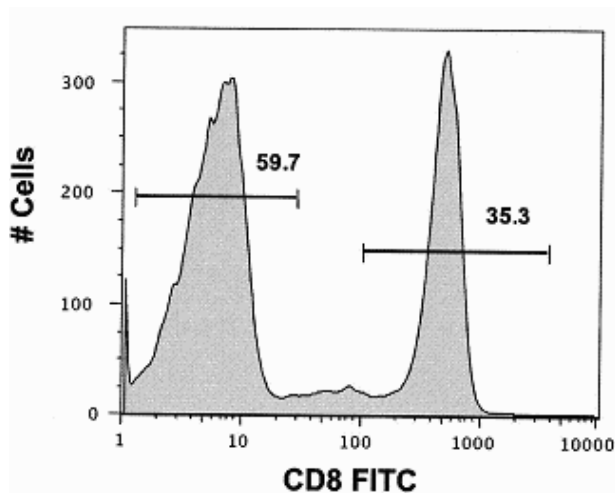
A questo punto i singoli segnali luminosi vengono raccolti dal fotomoltiplicatore, che li trasforma in impulsi elettrici di intensità direttamente proporzionale alla luce .

L'ampiezza del segnale viene misurata in volt (da 0 a 10) e per dare una visione grafica al voltaggio viene trasformata in canali di conta (da 0 a 1023). Questo passaggio viene definito come conversione analogico-digitale. Gli impulsi convertiti incrementano la conta per ogni canale, e il diagramma delle conte rispetto ai canali fornisce l'istogramma.



Esistono diversi modi per rappresentare un dato citofluorimetrico;

- L'analisi più semplice è costituita dall'istogramma, dove l'ascissa riporta l'intensità di fluorescenza e l'ordinata il numero di cellule che esprimono o meno l'antigene

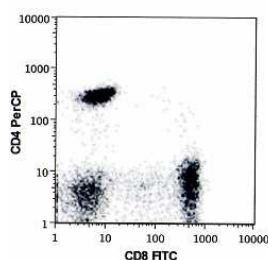


L'analisi statistica si basa sull'impostazione di cursori che delimitano le aree di interesse, e sulla quantificazione degli eventi cellulari che rientrano in tali aree. Per ogni picco e' possibile calcolare dati statistici (valore medio, deviazione standard, coefficiente di variazione, ecc)

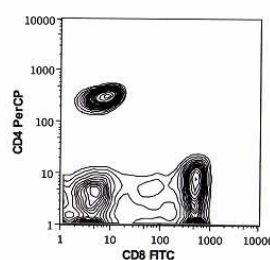
- Oltre all'istogramma è possibile utilizzare una serie di rappresentazioni bidimensionali, che permettono di mettere in correlazione più parametri tra di loro, come

- **Dot-plot:** ogni singolo punto rappresenta un evento;
- **Contour-plot:** Visualizzano aree aventi stessa densità attraverso linee concentriche;
- **Density-plot:** Dove l'intensità dell'evento è rappresentata da una proporzionale colorazione bicromatica (bianco e nero);
- **Pseudo color-plot:** dove l'intensità dell'evento è rappresentata attraverso l'utilizzo di colorazioni. È questo il metodo di più facile lettura ed interpretazione.

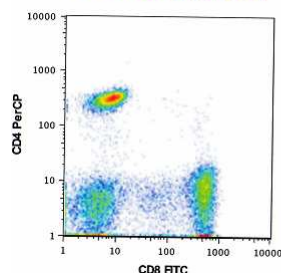
Dot-plot:
ogni singolo punto rappresenta un evento



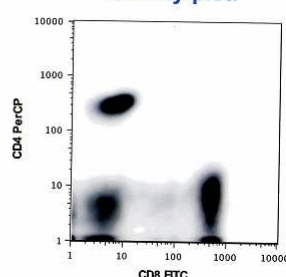
Contour-plot:
Visualizzano aree aventi la stessa densità mediante linee concentriche



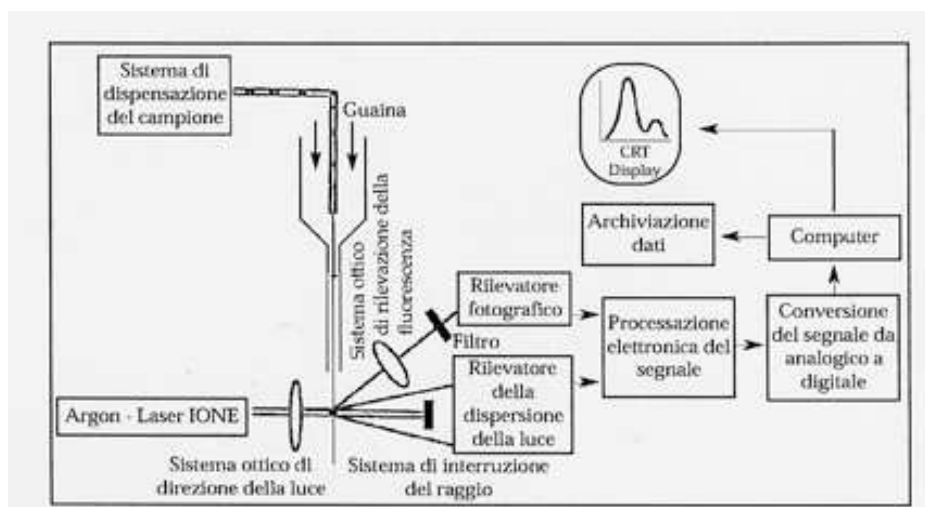
Pseudo color-plot:



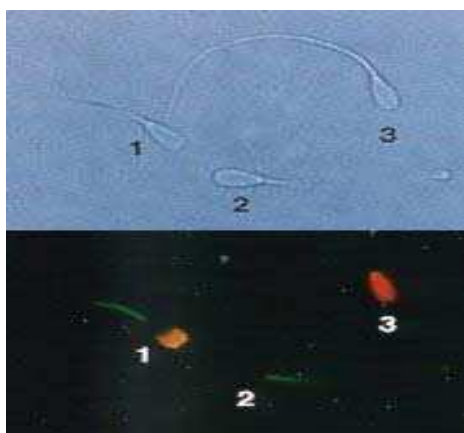
Density-plot:



Schematizzazione del sistema di funzionamento del citofluorimetro



Come si può notare dalle immagini sottostanti, anche la sola valutazione morfologica manuale effettuata dall'operatore (la componente umana tutt'oggi rappresenta il miglior metodo di supervisione nel funzionamento di strumentazioni estremamente sofisticate e completamente automatizzate) è notevolmente semplificata dalla colorazione in fluorescenza (A.I. Peña et al., 1998), in quanto permette la rilevazione di parametri essenziali al fine della valutazione che non possono essere palesati con la normale microscopia.



Due fotogrammi di uno stesso preparato (3 spz) osservato in contrasto di fase (sopra) ed in fluorescenza (sotto): Spz 1, è caratterizzato da mitocondri funzionanti (colorati in verde) ma da un acrosoma danneggiato (colorato in giallo), spz 2 totalmente normale (i mitocondri sono colorati di verde e non sono presenti danni di membrana), mentre lo spz 3 è morto (colorato di rosso)

Conclusioni

I limiti (relativi alla soggettività e alla bassa ripetibilità delle misurazioni, e alla non considerazione di importanti parametri degli spermatozoi, altamente correlati con la capacità fecondante), caratterizzanti le tradizionali tecniche di valutazione del seme, incidono sensibilmente sia sul potenziale produttivo dei centri I.A., che sulle performance riproduttive degli allevamenti utilizzatori di seme; infatti:

- Nei centri tori, pur di soddisfare (nei limiti del possibile) le esigenze del “consumatore” in termini di % di concepimenti/atti fecondativi, e pur di non incorrere in sanzioni (da parte dei centri di controllo e vigilanza- Istituto Spallanzani per l'Italia), dovute ad errata autovalutazione, si predilige aumentare la quantità di spermatozoi per dose, al fine di aumentare la percentuale di NSPM (non tenendo fede quindi all'obiettivo principe, che è quello di produrre paillettes con il minimo NSPM che consenta di ottenere la fertilità maggiore), compensando determinati parametri e perdendo però in ultima analisi capitale!;
- Negli allevamenti dove si pratica l'I.A., e dove quindi si utilizza del materiale seminale, la presenza di un effetto paterno, (se pur con incidenza notevolmente inferiore all'effetto materno), che determina un ulteriore abbassamento delle performance riproduttive; conseguenza quindi non legata a deficienze nel management aziendale dell'allevatore, ma alla bassa qualità del seme, che rappresenta in tali circostanze quindi una fonte di perdita economica sia diretta (costo della paillettes), che indiretta (aumento dei day-open).

Tali limiti possono però con le nuove tecniche di valutazione essere sensibilmente ridotti, permettendo una ottimizzazione nello stoccaggio delle paillettes in termini di NSPM (e quindi del uso del capitale rappresentato dagli spermatozoi stessi), ed un aumento della qualità delle stesse, che darebbe la garanzia di fertilità all'allevatore, ed eliminerebbe la presenza dell'effetto paterno come causa/concausa di ipofertilità.

Sicuramente la citofluorimetria a flusso, rappresenta, per le indubbie capacità di valutazione che già detiene e per le prospettive future (la costante e continua ricerca di nuovi probes, o di composti coniugati a probes fluorescenti, permetterà la rilevazione di importanti parametri biochimici, ultrastrutturali e funzionali correlati con la capacità fecondante dello spermatozoo), la tecnica di rilevazione di maggior interesse, ma il suo impiego è limitato a pochissimi centri di valutazione, a causa soprattutto dell'elevatissimo costo che presenta, che impone inevitabilmente un significativo periodo di ammortizzazione.

L'AMSA system invece, pur apportando benefici nella sola valutazione morfologica dello spermatozoo (estremamente precisa e completamente oggettiva), suscita interesse nei centri di valutazione, in virtù del fatto che può essere integrato all'attuale CASA (computer assisted semen analyzer) presente nella maggior parte dei centri I.A.

La zona-free Hamster Oocytes, la zona binding ability, e l'HOS test, pur non apportando valutazioni di per sé conclusive sulla fertilità dell'eiaculato, permettono la rilevazione di importanti parametri dello spermatozoo, come il grado di capacitazione, la struttura dell'acrosoma e l'integrità di membrana, che integrano notevolmente ed efficacemente le valutazioni eseguite con le tradizionali tecniche di valutazione, ad un modico costo, e con una elevata semplicità di effettuazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Aitken R.J., Templeton A., Shats R. Best F., Richardson D., Djahabakhch O., Less M; "Methods of assessing the functional capacity of human spermatozoa: their role in the selection of patients for in vitro fertilization"; In *Fertilization of Human egg in vitro*, 1983, ed. H. Beier e H. Lindner, pages 147-165, Berlin Springer;
2. Amman R.P., "Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?" *Journal of Andrology*, vol. 10, marzo/aprile 1989, pages 89-98;
3. Aziz N., Buchan I., Taylor C., Kingland C.R., Lewis-Jones I.; "The sperm deformity index: a reliable predictor to the outcome of oocyte fertilization in vitro"; *Fertility and Sterility*, vol.66, 1996, pages 100-108;
4. Bernas T., Grègoris G., Asem E. Robinson J.P.; "Integrating Cytoomics and proteomics"; *Molecular and cellular Proteomics*, vol.5, 28 ottobre 2005, pages 2-13;
5. Biggers J.D., Whitten W.K., Whittingham D.G., "The culture of mouse embryos in vitro"; In *Methods in mammalian Embryology*, ed. J.C. Domel, 1971, San Francisco freeman, pages 86-116;
6. Boersman A., Brann J., "Computer-assisted analysis of sperm morphology in veterinary medicine"; *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, vol.112 (2), marzo 1999 pages 81-85;
7. Boersman A., Rasshofer R., Stolla R.; "Influence of sample preparation, staining procedure and analysis condition on bull sperm head morphometry using the morphology analyzer integrated optical system"; *Reproduction of domestic animals*, vol. 36 (5), ottobre 2001, pages 222-229;
8. Brandmaier A.G., Miller D.J.; "The search is on: Finding accurate molecular markers of male fertility"; *Journal of Dairy Science*, vol.84, 2001, pages 1915-1925;

9. Brandmaier A.G., Deners J.M., Shakes R.D., Miller D.J.; "The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility"; *Animal growth Physiology and reproduction*, 15 ottobre 2003;
10. Buletti Carlo, "Crioconservazione di spermatozoi, ovociti ed embrioni";
11. Chandler J.E., Adkinson R.W., Smith J.W., Saxton A.M.; "Use of linear semen quality score for classification and decision making in evaluation of individual Ejaculates of holstein bulls"; *Journal of Dairy science*, vol.70, gennaio 1987, pages 1034-1044;
12. Collins E.D., Flowers W.L., Shanks R.D., Miller D.J.; "Zona-binding ability dello sperma suino come indicatore di fertilità"; *Animal Reproductive Science*, vol.104 (1), 1 febbraio 2008, pages 69-82;
13. Correa J.R., Zavos P.M.; "The Hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane"; *Theriogenology*, vol.42 (2), 1 agosto 1994, pages 351-360;
14. Crescentini F.; " La citofluorimetria a flusso consente l'analisi automatic di sospensioni cellular monodisperse, misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche" 2004;
15. Drevius L., Erikson H; " Osmotic swelling of mammalian spermatozoa"; *Experimental Cell Research*, vol.42, 1966, pages 135-156;
16. Evenson D.P., Parks J.E. Koproth M.T., Sost C.K; "Physiology and management- Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry"; *Journal of Dairy Science*, vol.76 n.1, 1993, pages 86-94;
17. Fabbris G.F.M., Silvia Valiani; " Manuale di laboratorio della WHO per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale" vol.37 n.1, 2001, pages 1-124;

18. Ferrara fulvio; "Le basi tecnologiche della citometria dale origini ai giorni nostri" 2005;
19. Foote R.H., Kaproth M.T.; "Large Batch Freezing of bull semen: Effect of time of freezing and fructose on fertility"; *Journal of Dairy Science*, vol.85, 2002, pages 453-456;
20. Galli A., Brandmaier, Deners Jill M, Shakes R.D., Saacke R.G., Miller D.J; "Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucid as an indicator of fertility"; *Journal of Andrology*, vol.23, n.5, settembre/ottobre 2002;
21. Galli A., Balduzzi D., Signori T., "Semen analysis by flow cytometry: an usefull to evaluate fertility capacities"; 2004;
22. Galli A., Balduzzi D.; " Legislazione ed inseminazione artificiale animale"; *Atti 2 Congresso Nazionale SIRA*, Grugliasco (TO), Pages 31-38, 2004;
23. Galli A., Balduzzi D.; "inseminare al momento giusto aumenta la fertilità"; *Informatore Agrario*, n.24, 2006, pages 47;
24. Galli A., Maffeo F; "Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia- Apparato riproduttore"; Uteth, Cap.16;
25. Galli A., "La biologia moderna nelle tematiche di controllo e di sessaggio del seme bovino"; *Atti soc. Agraria Lombardia*, vol.1; 2004, pages 31-50;
26. Galli C., Lazzari G.; "Nouve technologie della riproduzione"; *7th word conference of the brown swisse cattle breeders*; Marzo 2004, pages 225-229;
27. Garner D.L. Johnson L.A; "Viability asassment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide"; *Biology of Reproduction*; vol.53, 1995, pages 276-284;

28. Gill S.P.S., Donoghue A.M., Holsberger D.R., Amman R.P., Hulet R.M.; "Physiology and reproduction- Identifying potentially subfertile Toms via Sperm-binding Assay"; *Poultry Science*, vol.78, 27 febbraio 1999, pages 1208-1218;
29. Gillan Lindsay, Evans G., Maxwell W.M.C.; " Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential"; *Theriogenology*, vol. 63, n. 2, 11 novembre 2004, pages 445-457;
30. Graham J.K., Kunze E., Hamarstedt R.H.; "Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry"; *Biology of Reproduction*, vol.43, 1990, pages 55-64;
31. Graham J.K.; "Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach"; *Animal Reproduction Science*, vol.68 (3-4), 3 dicembre 2001, pages 239-247;
32. Gravance G., Chanpian Z., Liu I.K.M., Casey P.J.; "Sperm Head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples"; *Animal Reproduction Science*, vol.47, issue 1-2, Maggio 1997, pages 149-155;
33. Gravance G., Lewis K.M., Casey P.J.; " Computer Automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa"; *Theriogenology*, vol.44, issue7, novembre 1995, pages 989-1002;
34. Gravance G., Vishwanath R., Pitt C., Casey P.J.; "Computer Automated morphometric analysis of bull sperm head"; *Theriogenology*, vol.46, issue 7, 1 novembre 1996, pages 1205-1215;
35. Hansen P.J.; " L'utilizzo di un Haematocitometer"; 2000, Pages 9-90;

36. Hidalgo H., Rodriguez I., Dorado J., Sanz J., Soler C.; "Effect of simple size and staining methods on stallion sperm morphometry by the sperm class analyzer"; *Veterynari Medicine Czech*, vol.50, Gennaio 2005, pages 24-32;
37. Iguer-Onada M., Verstegen J.P.; "Evaluation of the Hamilton Thorn computer-based automated system, for dog semen analysis"; *Therigonology*, vol.55, n.3, 1 febbraio 2001, pages 733-749;
38. Iqbal N., Hunter A.G.; "Comparison of bovine sperm capacitation system for ability of sperm to penetrate zona-free Hamster Oocytes and bovine Oocytes matured in vitro"; *Journal of Dairy Science*, vol.87, 1995, pages 77-83;
39. Janonet E., Ducot B., Feneux D., Spira A.; "Male factor and likelihood of pregnancy in infertile couples study of sperm characteristic"; *International Journal of Andrology*, vol.11, 1988, pages 379-384;
40. Janskauska A., Johoninson A., Rodriguez-Martinez H.; "Assessment of sperm quality trough fluorimetry, and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish A.I. Bulls"; *Therigenology*, vol.55, issue 4, 1 marzo 2001, pages 947-961;
41. Jasko D.J.; "Evaluation of stallion semen"; *Veterinary clinics of north America: Equine practice*, Vol.8, n.1, 1992, pages 129-148;
42. Johnson J.E., Boone W.R., Bleckhurst D.W.; "Manual versus computer-automated semen analyses. Part 2, Determination of the working range of a computer-automated semen analyzer"; *Fertility and Sterility*, vol.65, n.1, 1996, pages 156-159;
43. Johnson L.A., Welch G.R.; "Sex preselection. High speed flow Cytometric sorting of x and y sperm for maximum efficiency"; *Therigenology*, vol. 52, n.8, 1 Dicembre 1999, pages 1323-1341;

44. Jejudram R.S., Van der Ven H.H., Zaneveld L.J.; " The Hipoosmotic swelling test: an update"; *Arch. Andrology*, vol. 92, issue 2, Settembre 1999, pages 105-116;
45. Katila T.; " In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a Rewiew"; *Acta vaterinaria Scandinavica*, vol. 42, issue 2, 30 giugno 2001, pages 199-217;
46. Lenz R.W., Martin J.L.; " Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reaction in sperm with chondroitin sulfates"; *Journal of Dairy Science*, n.71, novembre 1987, pages 1073-1077;
47. Liu D.Y., Baker H.W.G.; " Defective sperm-zona pellucid interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in vitro fertilization"; *Human Reproduction*, vol.15, n.3, Marzo 2000, pages 702-708;
48. Liu D.Y., Clarke G.N., Baker H.W.; "Relationship between sperm motility assessed with th Hamilton-Thorne motility analyzer and fertilization rates in vitro"; *Journal of Andrology*, vol.12, issue 4, 1991, pages 231-239;
49. Marrel J.M.; " Applications of flow cytometry to artificial insemination: a Rewiew"; *The Veterinary Record*, vol.129, issue 17, 1991, pages 375-378;
50. MiPA-RAIZ, Scheda A.21; "Qualità del seme e sistemi di qualità, nei centri di produzione del material seminal";
51. Mortimer D., Mortimer S.T., Shu M.A., Swart R; " A simplefield approach to sperm cervical mucus interaction testing, using a hyaluronate migration test"; *Human Reproduction*, vol.5, 1990, pages 835-841;
52. Neild D.M., Chaves M.G., Flores M., Miragaya M.H., Gonzales E., Aguerro A.; " The HOS test, and its relationship to fertility in the stallion"; *Andrologia*, vol. 32, issue 6, Novembre 2000, pages 351-355;

53. Neild D.M., Chaves G., Flores M., Mora N., Beconi M., Aguero A.; "Hypoosmotic test in equine spermatozoa"; *Theriogenology*, vol. 51, issue 4, Marzo 1999, pages 721-727;
54. Okoloski A., Babusik P., Tischner M., Lietz W.; " Evaluation of mare oocytes collection methods and stallion sperm penetration of zona-free Hamster ova"; *Journal of Reproduction and Fertility*, 1987, pages 191-196;
55. Pena A.I., Quintela L.A., Herradòn P.G.; "Viability assessment of dog spermatozoa, using flow cytometry"; *Theriogenology*, vol. 50, issue 8, Dicembre 1998, pages 1211-1220;
56. Pinkel D., Garner D.L., Ghedhill B.L., Lake S., Sthephenson D., Johonson L.A.; " Flow cytometric determination of the proportions of x and y chromosom bearing sperm in samples purportedly separated bull sperm"; *Journal of Animal Science*, vol.60, 1985, pages 1303- 1307;
57. Puglisi R., Balduzzi D., Galli A.; "In vitro sperm penetration speed on its relathionship with in vivo bull fertility"; *Reproduction of Domestic Animals*, vol. 39, issue 6, Dicembre 2004, pages 424-428;
58. Roger B.J.; " The sperm penetration assay: Its usefulness reevaluated"; *Fertility and Sterility*, vol.43, issue 6, Giugno 1985, pages 821-840;
59. Saacke R.G., Winson W.E., O'Conner M.; " The relationship of semen quality and fertility: a Heterospermic study"; In: *Proocedings of the Eighth Technical Conference on Artificial insemination and reproduction*, Milwankee, Wis., 1980 pages 71-78;
60. Saacke R.G.; "Semen quality in relation to semen preservation"; *Journal of Dairy Science*, vol.66, 1983, pages 2635-2644;
61. Sancho M., Perèz-Sanchez F., Tablado L., de Monserrat J.J., Soler C.; " Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads. Evaluation of different fixative techniques"; *Theriogenology*, vol.50, issue 1, 1 Luglio 1998, pages 27-37;

62. Salisbury G.W., Beck G.H., Elliot I., Willet E.L.; "Rapid method for estimating the number of spermatozoa in bull semen", 1942;
63. Shapiro Howard M.; "Practical flow cytometry", 3rd edition 1994, Wiley-Liss, New York;
64. Shelley R., Hough, Kaproth M.T., Foote R.H.; "Introduction of the acrosome reaction and zona-free Hamster Oocyte penetration by a bull with complete teratospermia versus a half brother with normal sperm"; *Journal of Andology*, vol.23, Gennaio 2002;
65. Soler C., de Mounsserrat J.J., Gutierrez R., Nunez J., Nunez M., Perez-Sanchez F., Cooper T.G.; "Use of the sperm-class Analyzer, for objective assessment of human sperm morphology"; *International Journal of Andrology*, vol. 26, 2003, pages 262-270;
66. Spanò Marcello, Evenson Donald P.; "Flow Cytometric analysis for reproductive biology"; *Biological Cell*, vol. 78, 28 Aprile 1993, pages 53-62;
67. Szaboles Nagy, Jonsen J., Topper E.K., Gadella B.M.; "A triple-Stain flow cytometric methods to assess plasma and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles"; *Biology Reproduction*, vol. 68, 11 Dicembre 2002, pages 1828-1835;
68. Tardif A.C., Farrell P.B., Tromer-trend V., Foote R.H.; "Computer-Assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C", *Journal of Dairy Science*, vol. 80, 1997, pages 1606-1612;
69. Truelson S.L., Graham J.K., Mortimer R.G., Field T.G.; "In vitro penetration into bovine Oocytes and zona-free Hamster Oocytes by bull spermatozoa treated with liposomes"; *Journal of Dairy Science*, vol. 79, n.6, Gennaio 1996, pages 991-999;

70. Van der Horst G., Maree L.; "Sperm Blue (R):"A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis"; *Biotechnology Histochemical*, 1 Giugno 2009, pages 1-10;
71. Varner D.D., Vanghan S.D., Johnson L; "Use of computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility", *Animal Journal of Veterinary Research*, vol. 52, n.2, 1991, pages 224-230;
72. Vicenti Leila; "Inseminazione artificiale: materiale didattico a cura della prof. Leila Vicenti", 2006;
73. Yavetz H., Hanser R., Yogev L., Botchman A., Lessing J.B., Amman Z.T., Paz G.; "Advanced methods for evaluation of sperm quality"; *Andrologia*, vol. 27, issue 1, 1995 pages 31-35;
74. Zinaman M.J., Uhler M.L., Vertuno E., Fischer S.G., Clegg E.D.; "Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA), with IDENT stain to determine sperm concentration", *Journal of Andrology*, vol.17, issue 3, 1996, pages 288-292.