



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

Studio morfologico ed ottimizzazione dei parametri CASA in  
campioni di seme bovino, caprino, ovino e canino.

Relatore  
Dott. Stelletta Calogero  
Correlatori  
Prof. Daşkin Ali  
Dott. Tekin Koray

Laureanda  
Emma Toffanin  
Matricola n. 602192

ANNO ACCADEMICO 2014/2015



*“Non serve iniziare la giornata  
cercando di indovinare cosa accadrà.”*

*J. J.*

## *Indice*

Riassunto .....	6
Abstract .....	7
Introduzione .....	8
1. Valutazione del materiale seminale. ....	9
1.1 Tecniche di valutazione tradizionali .....	9
1.2 Tecniche di valutazione innovative. ....	17
2. Obiettivi dello studio. ....	24
3. Materiali e metodi. ....	25
3.1 Materiale seminale utilizzato .....	25
3.2 Strumentazione utilizzata. ....	25
3.3 Procedura di analisi. ....	26
4. RISULTATI.....	33
5. Discussione. ....	39
Limiti dello studio.....	43
6. Conclusioni.....	44
7. Bibliografia. ....	45
8. Sitografia.....	49



Riassunto.

Scopo del presente studio è l'ottimizzazione dei parametri morfologici del CASA system SCA® (Microptic, Barcelona, Spain), tramite valutazione morfologica di campioni di seme appartenente a specie diverse, e tramite confronto dei risultati ottenuti con i risultati forniti da un altro sistema di analisi del seme, il LAS® (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Sono stati analizzati un totale di 60 campioni di seme crioconservato, provenienti da 3 soggetti diversi appartenenti rispettivamente alle specie bovina, canina, caprina ed ovina. Ogni soggetto ha fornito 5 aliquote di seme.

Tutti i campioni sono stati colorati con SpermBlue®, ad eccezione di quelli di ariete, che sono stati invece fissati con glutaraldeide al 3% e poi colorati con Sperm Stain®; i vetrini sono stati quindi analizzati con entrambe le metodiche, SCA® e LAS®, allo stesso ingrandimento. Sono stati valutati un totale di 20 spermatozoi per vetrino.

I parametri morfometrici presi in considerazione con la metodica SCA®, ovvero i diametri maggiori e minori della testa, l'area della testa, l'area dell'acrosoma, la larghezza e l'area del collo e l'angolo di inserzione collo-testa, mostrano significative differenze ( $P < 0,05$ ) interspecifiche, in maniera però diversa a seconda del parametro considerato; il seme caprino mostra valori non differenti dal seme bovino e canino per la maggior parte dei parametri considerati.

Nella valutazione tra diverse metodiche di analisi sono emersi dati statisticamente different tra LAS® e SCA®, in tutte le specie e per tutti i parametri presi in considerazione (larghezza e lunghezza della testa), in particolare nelle specie bovina, caprina ed ovina.

Al fine di implementare accuratezza e ripetibilità del sistema SCA® appare necessario migliorare l'algoritmo di analisi per la specie caprina ed ovina, oltre che aumentare il livello di standardizzazione durante l'intero processo di analisi.

## Abstract.

Purpose of this study is the optimization of the morphological parameters of the CASA system SCA<sup>®</sup> (Microptic, Barcelona, Spain), through morphological evaluation of semen samples belonging to different species, and by comparing these results with the results provided by another semi-automatic system used for semen analysis, the LAS<sup>®</sup> (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

A total of 60 samples of cryopreserved semen were analyzed, from 3 different subjects belonging respectively to bovine, canine, caprine and ovine species. From each subject 5 different semen batch were analysed.

All samples were stained with SpermBlue<sup>®</sup>, except for the ram semen, which was instead fixed with 3% glutaraldehyde and then stained with Sperm Stain<sup>®</sup>; the slides were then analysed<sup>®</sup>, at the same magnification, with both methods, SCA<sup>®</sup> and LAS. In each slide 20 sperm cell have been randomly chosen and then evaluated.

The morphometric parameters taken into account by the method SCA<sup>®</sup>, namely major and minor diameters of the head, head area, acrosome area, width and area of the midpiece and angle of insertion midpiece/head, show significant differences ( $P < 0.05$ ) between different species; however, differences were varying according to the parameter considered. Most of the parameters of the caprine semen were not significantly different from those of bovine and canine semen.

Evaluating the two different methods of analysis, statistically different data have been found in all species and for all the parameters taken into account (width and length of the head), particularly for bovine, caprine and ovine semen.

In order to implement accuracy and repeatability of the SCA<sup>®</sup> system, improving the algorithm of analysis for ovine and caprine species, as well as increasing the level of standardization throughout the entire process of analysis, appears to be necessary.

## Introduzione

L' enorme importanza assunta dalle tecniche di fecondazione artificiale in ambito zootecnico, per scopi di protezione e ripopolamento di specie a rischio, e per la riproduzione di animali d'affezione, ha fatto sì che la valutazione del materiale seminale divenisse ambito di studi in continua espansione e rinnovamento.

La valutazione del materiale seminale si propone infatti di risolvere, almeno in parte, l'incognita rappresentata dalla effettiva capacità fecondante delle dosi di seme, fresco o crioconservato, destinato all' inseminazione artificiale.

Dalle prime osservazioni empiriche su motilità e concentrazione si è fatta molta strada, arrivando a capire come un seme motile e sufficientemente concentrato non sia necessariamente garanzia di buona qualità.

I parametri da tenere in considerazione sono molti, così come le tecniche per valutarli: all'osservazione macro- e micro-scopica si sono affiancate metodiche automatizzate, che consentono stime più precise e meno soggettive non solo di concentrazione, motilità progressiva e vitalità degli spermatozoi, ma anche di morfologia, morfometria e cinetica.

Scopo di questo studio è l'ottimizzazione dei parametri di valutazione del seme usati dallo SCA® CASA System (Sperm Class Analyzer, Microptic), strumento utilizzato da centri di produzione seme e da laboratori di ricerca per una valutazione qualitativa dei campioni seminali di varie specie animali.

Tale ottimizzazione vuole essere raggiunta tramite confronto di diverse metodiche di analisi del seme, nello specifico lo SCA® CASA System ed il LAS® software (Leica Application Suite), ed ulteriore confronto intra-metodo, analizzando e confrontando campioni seminali provenienti da specie diverse (bovino, caprino, ovino e canino).

I dati ottenuti saranno utilizzati per validare l'analisi dello SCA® o, in caso di discrepanze, fornire degli strumenti per migliorarne la metodica di analisi.



## 1. Valutazione del materiale seminale.

La valutazione del materiale seminale raccolto è il primo e fondamentale step, dopo la raccolta del seme stesso, di quel processo che si concluderà poi con l'inseminazione artificiale; indipendentemente dalla specie in esame e dal motivo per cui si intende ricorrere alla fecondazione artificiale piuttosto che alla monta naturale, il seme utilizzato deve presentare delle caratteristiche tali da garantirne una buona, se non eccellente, fertilità. Per molti tecnici del settore la valutazione della progenie generata, rimane l'unico test affidabile per stabilire la potenzialità riproduttiva del soggetto in esame, ma, essendo tale valutazione non sempre praticabile e molto dispendiosa in termini di tempo e di denaro, il ricorso ad altre metodiche è indispensabile.

Nei centri di raccolta del seme e nei laboratori specializzati l'analisi del campione seminale viene effettuata, di routine, con tecniche tradizionali, associate poi a tecniche più avanzate ed innovative, ottenendo quindi un profilo a 360° del campione raccolto.

### 1.1 Tecniche di valutazione tradizionali

- *Valutazione macroscopica.*

La valutazione macroscopica fornisce una prima, generale, idea su quello che è lo stato del campione; viene effettuata subito dopo la raccolta, prima di eventuali diluizioni, e viene svolta ad occhio nudo, non necessitando quindi di alcuna strumentazione specifica. Pur essendo fondamentale per capire se l'aliquota di seme ha volume e concentrazione adeguati e/o contaminazioni anomale, le informazioni ottenibili sono solo parzialmente, e piuttosto grossolanamente, correlabili a fertilità e qualità del campione. (Rijsselaere et al., 2005)

I parametri presi in considerazione sono:

- Volume
- Viscosità
- Colore
- Presenza di coaguli, pus, sangue od altro materiale estraneo

- **Odore**

Il **volume** del campione varia a seconda della specie considerata, dell'età del soggetto e di frequenza e metodi di raccolta. In alcune specie, quali ad esempio ovini e caprini, anche il fotoperiodo rientra tra i fattori che influiscono sulla quantità e sulla qualità del seme prodotto. Questo primo, importante parametro, viene valutato semplicemente misurando la quantità di seme appena prelevato con l'ausilio di una provetta o di un cilindro graduato.

All'aumentare del volume, variano anche, in condizioni fisiologiche, **viscosità** e **colore** dell'eiaculato: un seme con volume limitato, e dunque molto concentrato, è solitamente bianco perlaceo, di consistenza cremosa, mentre campioni con volume maggiore sono più trasparenti e più acquosi, di aspetto lattescente (fig. 1.1.) . Pur essendo questi dei parametri fortemente correlati all'esperienza dell'operatore, data la loro valutazione "occhiometrica", consistenza e colore possono fornire delle indicazioni circa la concentrazione del campione. Chiaramente è fondamentale tenere conto delle differenze di specie. La consistenza varia solitamente da latteo-acquosa a latteo-densa, da latteo-cremosa a cremosa.

Alterazioni non fisiologiche del colore del campione possono essere imputabili alla presenza di sangue (campione rosato-rossastro o marrone, a seconda si tratti di sangue fresco o meno), pus (flocculazioni chiare e colorito giallastro), urine (campione giallastro) e degenerazione purulenta (verdastro). Può essere visibile la presenza di inquinanti quali sabbia, terriccio, peli o residui di lettiera. Anche le xantine, pigmenti di derivazione alimentare, possono modificare il colore del campione, pur non essendo correlate ad alterazioni del seme.

Il seme raccolto non deve presentare alcun odore particolare, ed anzi, odori anomali possono far sospettare delle alterazioni (ad esempio la presenza di urina).

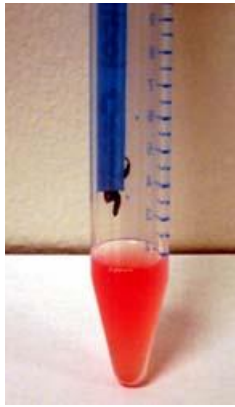


FIG. 1.1 Da sinistra: differenza di volume e colore in un campione di seme bovino e seme canino; campione di seme canino con colorazione alterata (emospermia).

Tab. 1.1.1 Tabella riassuntiva delle caratteristiche dell'eiaculato di alcune specie di interesse veterinario (fonte dati:<http://www.federica.unina.it>)

	Toro	Montone	Becco	Cane (solo seconda frazione)
Volume (ml)	8-10	0.5-1.2	0.5-1.2	1-4
Concentrazione (10 <sup>6</sup> /ml)	1000	3000	3000	4-400
Colore	Opaco, bianco- lattiginoso	Opaco, bianco	Opaco, bianco	Opalescente, biancastro
Consistenza	acquosa	cremosa	Cremosa	acquosa

- Valutazione microscopica

Il seme, fino ad ora tal quale, viene sottoposto a valutazione microscopica, la quale richiede un tempo maggiore rispetto a quella macroscopica; è quindi di fondamentale importanza che il seme non sia sottoposto a shock termici. La quota di seme non sottoposta a valutazione deve essere mantenuta a temperatura idonea, secondo le caratteristiche di specie, e se vetrini e vetrini copri-oggetti non sono accuratamente puliti e pre-riscaldati a circa 37°C, la vitalità e motilità dell'eiaculato ne risentiranno, portando a una sottostima della sua qualità.

I parametri valutati comprendono:

- Concentrazione
- Cinetica
- Spermatozoi vitali e non vitali
- Citomorfologia

La **concentrazione** (numero di spermatozoi/unità volume) si valuta ricorrendo all'ausilio di *ematocitometri* (camera di Burker, Neubauer, o altri..), a seguito di diluizione di una aliquota di campione con acqua distillata o fissativo. Il rapporto di diluizione varia in dipendenza della concentrazione del campione stesso, stimandola a partire dall' esame macroscopico e dalle caratteristiche di specie: un campione non ben diluito non sarà infatti correttamente valutabile, a causa della sovrapposizione delle cellule. Generalmente si opta per un rapporto di diluizione tra 1:3 e 1:6. A seconda della camera di conta utilizzata varierà il numero di aree da prendere in esame. In una camera di Burker, ad esempio, vanno contati almeno 5 quadrati grandi (aree verdi in figura 1.2), ed il numero medio di spermatozoi presente in ogni quadrato andrà poi moltiplicato per il fattore di diluizione, per il volume contenuto nei quadrati considerati e per il fattore  $10^6$ , dal momento che per convenzione la concentrazione di spermatozoi viene espressa in  $10^6/\text{ml}$ .

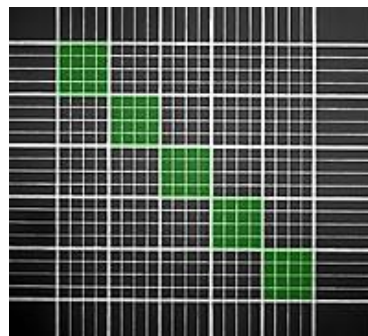


FIG. 1.2 Camera di Burker e dettaglio delle aree in cui eseguire la conta.

La conta manuale ha una precisione molto limitata a causa del ristretto numero di cellule valutabile; contarne un numero maggiore non è tuttavia un'ipotesi accettabile, in quanto richiederebbe un tempo eccessivo. Per questa ragione

metodi di conta automatica sono oggi largamente preferiti, ed i più utilizzati sono la conta con spettrofotometro e con Coulter Counter.

Il funzionamento dello *spettrofotometro* (schematizzato in fig. 1.3) si basa sul principio di assorbanza: il campione in esame viene attraversato da un fascio luminoso, ed a seconda della quota di radiazione non assorbita, se ne calcolerà la concentrazione. La radiazione non assorbita è infatti inversamente proporzionale all'opacità e dunque alla concentrazione del campione stesso.

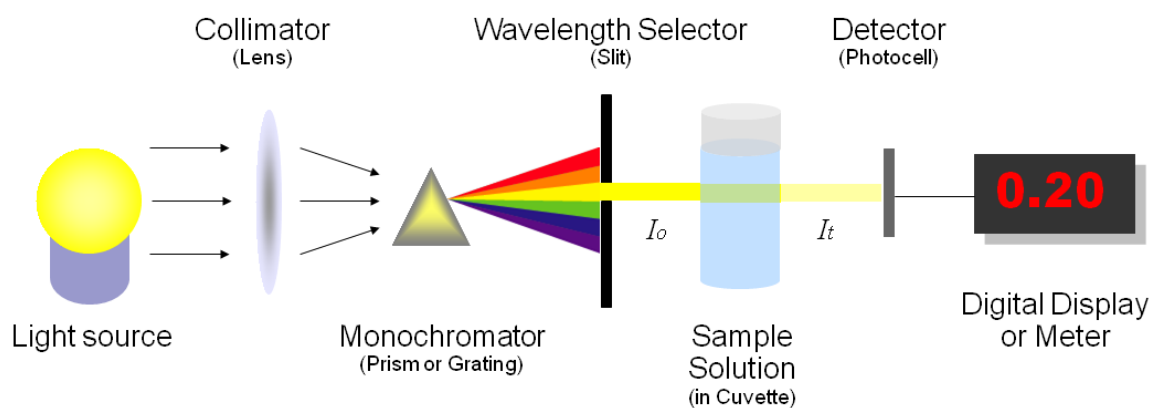


FIG. 1.3 Rappresentazione del funzionamento di uno spettrofotometro (fonte: <http://chemwiki.ucdavis.edu/>)

Il *Coulter Counter* altro non è invece che un contaglobuli automatico, in cui il campione, opportunamente diluito in una soluzione salina, viene “risucchiato” tra due elettrodi. Il potenziale d’azione esistente tra i due elettrodi verrà di conseguenza alterato, in maniera direttamente correlata al numero delle particelle e alla dimensione delle stesse (vedi fig. 1.4).

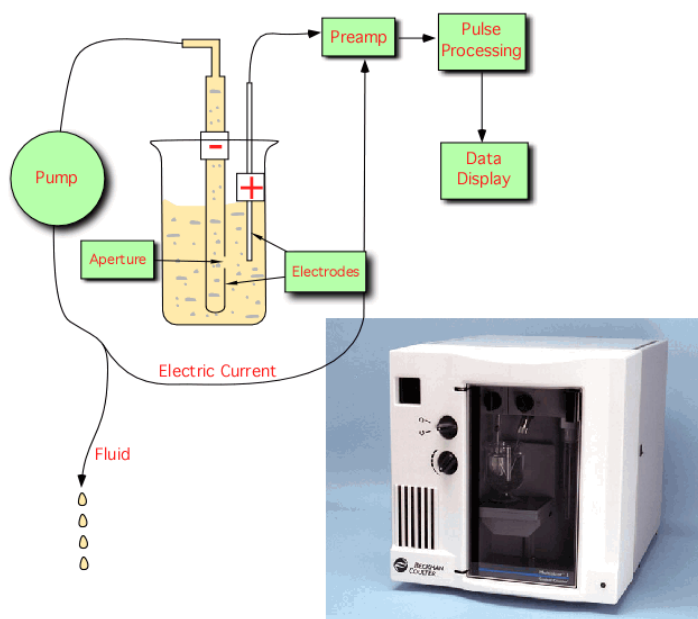
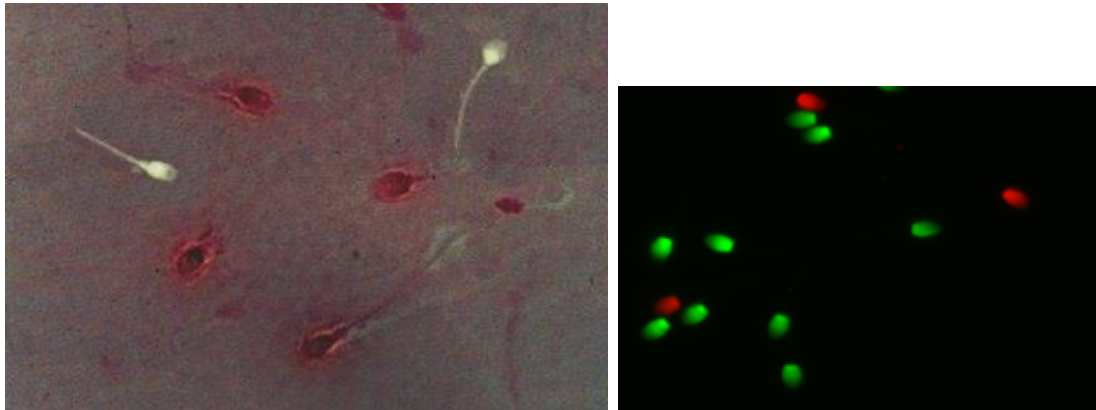


FIG. 1.4 Schema di funzionamento del Coulter Counter (tratto da <http://inst.bact.wisc.edu/>)

La **cinetica** di un campione seminale può essere valutata, seppur in maniera approssimativa, con il solo ausilio di un microscopio ottico, ponendo una goccia di seme tal quale su un vetrino e valutandola ad ingrandimento 50x e 200x. In questo modo è possibile valutare le cosiddette “onde spermatiche”, indice della motilità di massa, causate dal movimento degli spermatozoi stessi. La cinetica di massa è valutata con un punteggio da 0 a 4 (rispettivamente nessuna onda visibile, ed eccellente motilità, caratterizzata da onde spermatiche rapide e vorticose). Anche la motilità individuale può essere stimata con lo stesso metodo, previa però diluizione del campione, utilizzando l’obiettivo da 100x: i parametri valutati saranno la percentuale di spermatozoi motili e la motilità progressiva lineare, esaminando almeno una decina di campi visivi.

Per la valutazione della **vitalità** del seme raccolto si ricorre invece all’utilizzo di colorazioni selettive, che penetrano cioè solamente nelle cellule che hanno perduto la permeabilità selettiva della membrana, e che sono quindi morte. La colorazione con eosina-nigrosina, visibile in fig. 1.5, ne è un esempio, come anche con trypan blue, o con coloranti fluorescenti; il principio di base è sempre lo stesso, anche se varieranno la tonalità assunta dalla cellula e la necessità di utilizzare un microscopio ottico od a fluorescenza. È possibile anche combinare diversi coloranti, in modo da evidenziare le cellule vive con un colore, e le cellule morte

con un altro, ricorrendo a sostanze che, se convertite da enzimi di membrana, presenti ovviamente solamente in cellule vitali, mostrano fluorescenza colorata. La sensibilità di entrambi i metodi è sovrapponibile, così come lo è l'utilizzo della citometria di flusso (Pena et al., 1998).



*FIG. 1.5 A sinistra: esempio di colorazione con eosina-nigrosina: le cellule vitali appaiono chiare, mentre quelle morte roseo-violacee. A destra: colorazione con SYBR 14-PI, in cui le cellule vive sono verdi, mentre quelle morte sono rosse.*

Anche per la valutazione della **morfologia** è necessario ricorrere alla colorazione del campione, in genere con eosina-nigrosina o con la colorazione di Papanicolaou. Il vetrino viene poi valutato al microscopio, in brightfield e ad elevato ingrandimento: ogni anomalia morfologica rilevata viene classificata a seconda della zona dello spermatozoo coinvolta (testa, collo, coda. Si veda, a scopo esemplificativo, la fig. 1.6). La normalità morfologica delle cellule è molto importante ai fini della fertilizzazione dell'ovocita: spermatozoi privi di coda, con coda piegata, o con doppia testa, difficilmente arriveranno a fertilizzare l'ovocita, ma soprattutto cellule presentanti anomalie riflettono, nella maggior parte dei casi, lo stato del proprio corredo genetico (Murphy et al., 2013 ; Thurston et al., 2001 ).

L'analisi morfologica manuale è tuttavia correlata a bassa sensibilità ed a bassa ripetibilità, ancor più di quanto non accada nelle altre tecniche non automatiche fin qui illustrate. La rilevazione di anomalie è influenzata in maniera significativa

dall'esperienza e dall'abilità dell'operatore e dalle metodiche di analisi utilizzate, e non è inoltre diffusa una formazione specifica ed uniforme per chi si occupa di tale mansione (Brito et al., 2001) .

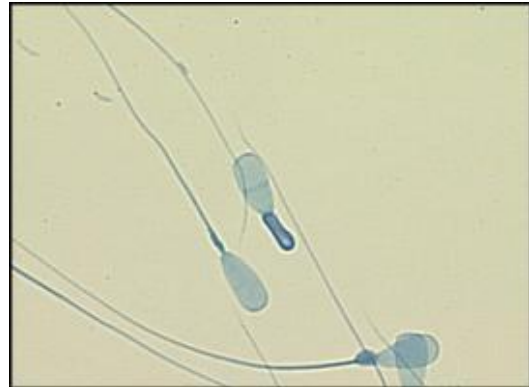
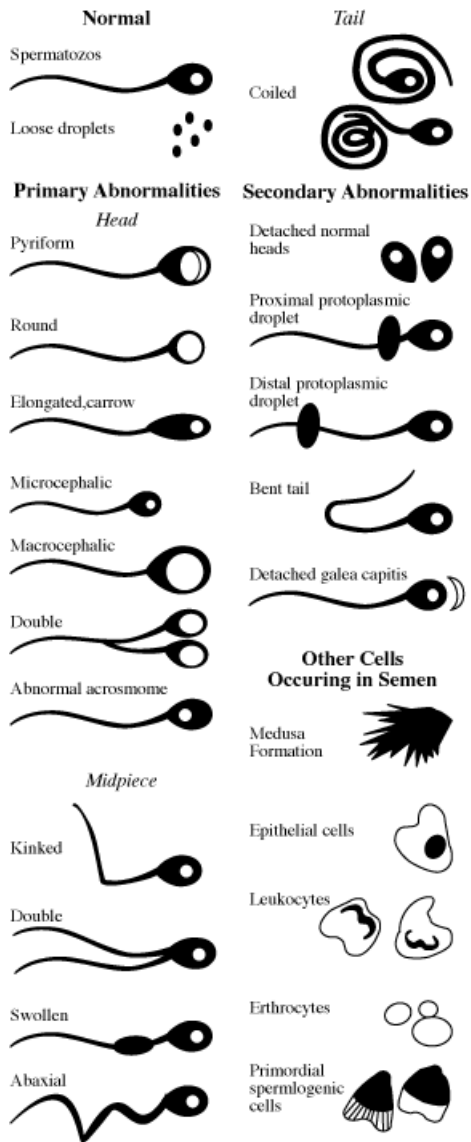


FIG.1.6

Sopra: Spermatozoi con coda piegata e goccia citoplasmica, colorazione eosina-nigrosina. (tratto da [www.vivo.colostate.edu](http://www.vivo.colostate.edu))

A lato: Alcuni esempi delle principali anomalie morfologiche riscontrabili (tratto da "predicting bull fertility", <http://www.ext.vt.edu/>)



Le tecniche di valutazione trattate sono tutte relativamente semplici da eseguirsi, economiche ed immediate, ma come abbiamo visto il loro principale difetto è la mancanza di oggettività e di standardizzazione: tutte le analisi eseguite con l'ausilio di un microscopio ottico risentono dell'abilità e dell'esperienza dell'operatore, e per forza di cose si avranno valutazioni che differiscono, magari anche solo minimamente, da un operatore all'altro. La tecnica di fissazione e colorazione del campione influenza l'analisi morfologica, ed i parametri esaminati sono inoltre solo parzialmente correlati alla fertilità, ancor di più se si considera il basso numero di cellule analizzabile. (Brito et al, 2001 ; Rijsselaere et al., 2005 )

Alla luce di queste considerazioni, appare chiaro come si sia resa necessaria, nel tempo, l'adozione di metodiche di valutazione più standardizzate ed automatizzate, che prendessero in considerazione anche altri parametri funzionali, utili alla stima della capacità fecondante del campione.

Tali metodiche innovative, non hanno soppiantato le vecchie tecniche, ma ne sono anzi divenute complemento e sostegno.

#### 1.2 Tecniche di valutazione innovative.

- Hypo-osmotic swelling test
- Citometria a flusso
- CASA system

Queste metodiche consentono una valutazione approfondita ed oggettiva delle caratteristiche biochimiche, chimico-fisiche e morfologiche dell'eiaculato, delineando in maniera più precisa la potenzialità fecondante del seme in esame.

### *Hypo osmotic swell test (HOS test)*

L'HOS test è una metodica di valutazione del materiale seminale che si pone lo scopo di identificare prima, e quantificare poi, gli spermatozoi aventi membrana plasmatica integra e funzionante; tale parametro è infatti altamente correlato con la capacità fecondante dello spermatozoo stesso (Neild et al., 2000). Per valutare quindi la corretta funzionalità di membrana, gli spermatozoi vengono posti a contatto con una soluzione ipo-osmotica: se la membrana è intatta e funzionante, ci sarà l'ingresso del solvente nella cellula, che ne determinerà un rigonfiamento, visibile a livello del flagello; se invece la membrana è danneggiata, e lo spermatozoo è morente o morto, la cellula tenderà a raggiungere l'equilibrio osmotico perdendo fluidi, e quindi non si gonfierà (fig. 1.7). L'HOS test è considerato nella norma quando almeno il 60% degli spermatozoi presenti nell'eiaculato va incontro al rigonfiamento della coda.

Limite di questa tecnica rimane però il numero di cellule analizzate, dal momento che il conteggio delle cellule presentanti il rigonfiamento a livello di flagello viene comunque fatto da un operatore, utilizzando un microscopio a contrasto di fase con obiettivo 20x o 40x. Per ottenere un valore significativo diventa molto importante valutare almeno 200 cellule.

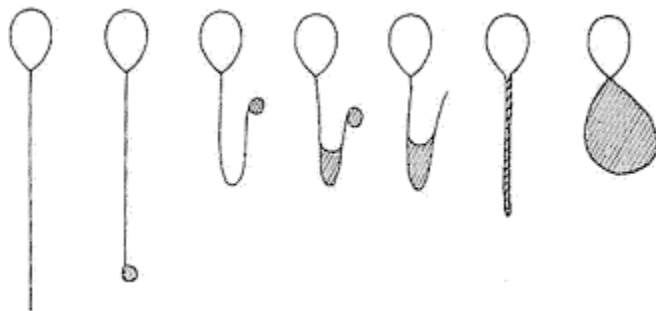


FIG.1.7 *Il primo spermatozoo a sinistra è normale, le altre sono tutte cellule positive all'HOS test. (tratto da "manuale d'uso fertility swelling test", [www.abanalitica.it](http://www.abanalitica.it) )*

## Citometria a flusso

Contariamente alle tecniche presentate finora, la citometria a flusso consente l'analisi di un numero elevato di cellule in poco tempo, fornendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa. Tramite questa tecnica possiamo valutare la vitalità del campione, l'integrità acrosomale, la funzionalità mitocondriale, la fluidità di membrana e lo stato e la quantità di DNA presenti nel nucleo, tutti parametri strettamente correlati con la fertilità dell'eiaculato (Gillan et al., 2005). Altra interessante applicazione di questa metodica è la possibilità di sessare il seme.

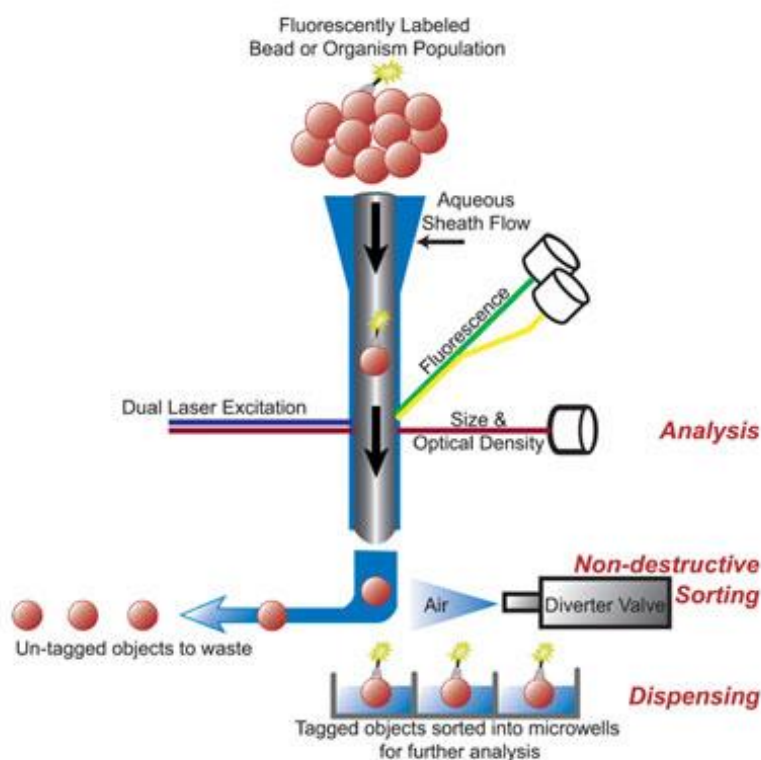


FIG. 1.8 Schema di funzionamento della citometria a flusso. (immagine tratta da [www.unionbio.com](http://www.unionbio.com))

Nella citometria a flusso una sospensione cellulare viene iniettata in un sistema fluidico il quale trasporterà le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di misura, dove incontreranno un fascio luminoso proveniente da un laser. L'incontro tra il raggio di luce e ogni singola cellula presente nel flusso cellulare genererà dei segnali. Questi segnali dipendono dalle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori che ne misurano

l'intensità'. Seguirà infine la valutazione ed interpretazione statistica dei dati raccolti. L'intero processo è brevemente schematizzato in fig. 1.8

### *CASA SYSTEM*

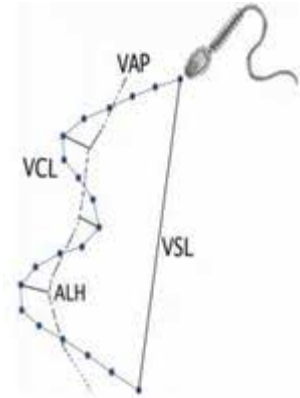
Il termine CASA system (computer aided sperm analysis) indica un sistema utilizzato per la valutazione del materiale seminale, in grado di visualizzare e successivamente digitalizzare immagini dei singoli spermatozoi, processando ed analizzando informazioni sulla cinetica e sulla morfologia della popolazione sottoposta ad esame, ed elaborando sui dati raccolti delle informazioni statistiche. I primi CASA furono inventati negli anni '70 a partire da un software della NASA, ideato per tracciare missili e satelliti in movimento, e richiedevano l'assistenza di un operatore nel funzionamento; oggi i sistemi più diffusi non necessitano invece di interventi esterni, se non nelle fasi di validazione del sistema, di avvio e di salvataggio dei dati. I CASA, commercializzati da diverse compagnie (e dunque con caratteristiche lievemente diverse l'uno dall'altro), possono visualizzare e catturare istantanee di circa 200-500 spermatozoi, in campo chiaro o scuro, alla velocità di 50 o 60 fotogrammi al secondo, fornendo quindi, in meno di 2 minuti, informazioni relative a circa 30 fotogrammi, valutando parametri relativi alla singola cellula ed all'intera popolazione analizzata; alcuni sistemi valutano anche la morfologia, in contemporanea.

I sistemi CASA non possono "predire" la fertilità del seme in esame, ma, se accuratamente validati e settati, possono dare informazioni molto importanti sulla qualità del seme e su come gli spermatozoi reagiscano a variazioni del microambiente in cui si trovano (Amann e Waberski, 2014); queste informazioni hanno sicuramente una grande importanza non solo nell'ambito della ricerca, ma anche in ambito commerciale, consentendo di ottimizzare la valutazione del seme ed i processi di stoccaggio e congelamento dello stesso.

Parametri valutabili dal sistema CASA:

*Cinetica dello spermatozoo.*

- Vsl (velocità lineare dello spermatozoo; distanza rettilinea fra la prima e l'ultima posizione assunta dallo spermatozoo, diviso il tempo)
- Vcl (velocità curvilinea; dalla somma dei segmenti sottesi fra le varie posizioni della traiettoria dello spermatozoo, diviso il tempo)
- Vap (average path velocity; velocità media dello spermatozoo, data da lunghezza percorsa, diviso il tempo)
- Alh (ampiezza dello spostamento laterale della testa)



Tutti questi parametri delineano il profilo cinetico del campione. La motilità progressiva è la differenza tra il numero di spermatozoi considerati motili (con VAP  $\geq$  ad un valore di riferimento imposto nel settaggio, soggetto a variazioni di specie) ed il numero di spermatozoi motili con rapporto VSL/VAP inferiore all'80%. Viene espressa in NSMP (numero spermatozoi progressivamente motili). (Galli, 2004).

*Morfologia dello spermatozoo.*

I sistemi CASA consentono in genere la valutazione morfologica degli spermatozoi in esame, misurando diversi parametri e confrontandoli poi con valori pre-settati, diversi a seconda della specie e della colorazione usata.

I parametri valutati sono

- Misura della testa (diametri maggiore e minore, perimetro, area, presenza di anomalie morfologiche)
- Misura dell'acrosoma (area, presenza di anomalie morfologiche)
- Misura del collo (lunghezza, larghezza, area ed angolo di inserzione con la testa, presenza di anomalie morfologiche)
- Misura della coda (presenza di anomalie morfologiche)

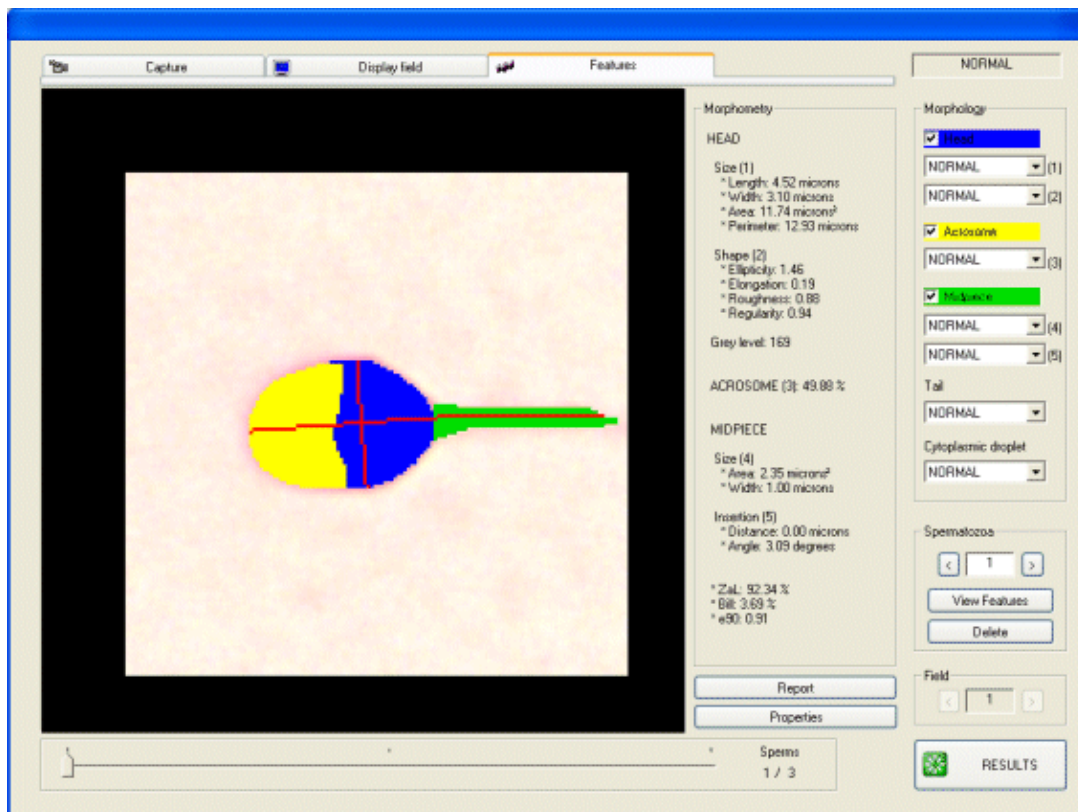


FIG. 1.9 CASA system, SCA<sup>®</sup>, Microptic; esempio di valutazione morfometrica e morfologica

Gli spermatozoi analizzati vengono quindi classificati come normali o anomali, ed il sistema è, ancora una volta, in grado di fornire dati statistici sull'intero campione analizzato, a patto ovviamente che il numero dei fotogrammi scattati sia numericamente rappresentativo dello stesso (fig. 1.9 e 1.10).

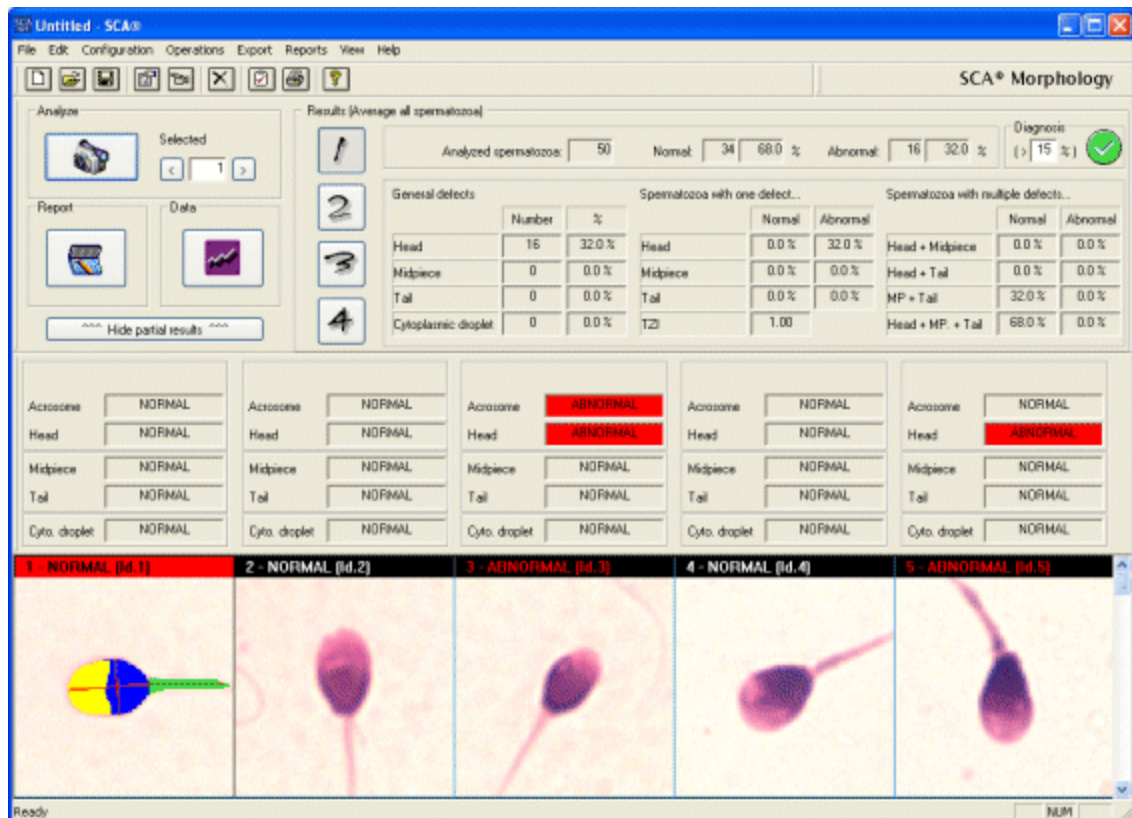


FIG. 1.10 CASA system, SCA®, Microptic; esempio di valutazione morfologica. Si noti, in alto a destra, le statistiche riferite al numero tot. di spermatozoi analizzati.

Pur essendo uno strumento molto utile per l'analisi dell'eiaculato, anche il CASA system presenta dei limiti: la specie animale, il medium in cui il seme è diluito, la colorazione del vetrino, la pulizia della strumentazione di laboratorio (vetrini, copri-oggetti, lenti e carrello del microscopio...), l'intensità dell'illuminazione, le impostazioni settate, sono tutti fattori che possono influenzare l'accuratezza del risultato (Aman e Waberski, 2013).

## 2. Obiettivi dello studio.

Obiettivo principale di questo studio è l'ottimizzazione dei parametri morfologici utilizzati dal sistema CASA Sperm Class Analyzer® (Microptic, Barcelona, Spain) per l'analisi di campioni di seme bovino, canino, caprino ed ovino.

Tale ottimizzazione vuole essere raggiunta tramite:

1. confronto dei dati ottenuti in specie diverse per gli stessi parametri, con la stessa metodica di analisi (SCA®).
2. Confronto dei dati ottenuti in specie diverse, per gli stessi parametri, con metodiche di analisi automatizzata diverse (SCA® e LAS®).



### 3. Materiali e metodi.

Lo studio è stato effettuato nel periodo compreso tra maggio e luglio 2014, presso il Dipartimento di Riproduzione ed Inseminazione Artificiale della Facoltà di Medicina Veterinaria della Ankara University, ad Ankara, in Turchia.

#### 3.1 Materiale seminale utilizzato

Per questa indagine sono stati analizzati un totale di 60 campioni di seme, provenienti dalle scorte di seme criocongelato del dipartimento. Nello specifico è stato valutato il seme appartenente a 3 soggetti diversi per ogni specie in analisi (bovina, canina, caprina ed ovina), e la valutazione è stata ripetuta 5 volte, su dosi raccolte, in momenti diversi, dallo stesso soggetto.

Il seme ovino ed il seme caprino analizzati provenivano da soggetti allevati a scopo riproduttivo nell'azienda didattica della facoltà; tali soggetti hanno tutti la stessa età, e sono allevati nelle medesime condizioni di stabulazione. La dieta loro somministrata è la stessa, sono esenti da patologie e godono di un buono stato di salute.

Il seme canino proveniva invece da soggetti afferenti all'ambulatorio del dipartimento, ed era stato precedentemente raccolto da soggetti uniformi per taglia ed età, ed in buono stato di salute.

Per quanto riguarda il seme bovino, si trattava di seme commerciale, regolarmente acquistato presso un centro di produzione del seme.

Tutte le paillettes erano conservate in azoto liquido, all'interno degli appositi contenitori.

#### 3.2 Strumentazione utilizzata.

*CASA Sperm Class Analyzer<sup>®</sup>, Veterinary Edition (Microptic, Barcelona, Spain)*

Lo SCA<sup>®</sup> system fa parte della famiglia dei CASA system, ovvero i sistemi di analisi automatizzata del materiale seminale; è costituito da un microscopio ottico digitale ed un pc su cui è installato il software di analisi. La versione del software utilizzata in questo caso è la veterinary edition, che consente di selezionare la specie di appartenenza del materiale seminale in analisi: a seconda della specie

selezionata, i parametri di valutazione pre-impostati dalla casa produttrice varieranno in accordo, tenendo appunto in considerazione le differenze di specie per quanto riguarda i valori morfometrici delle cellule spermatiche. Anche il tipo di colorazione citologica utilizzata va specificato al momento dell'analisi, in modo che il software possa adattare automaticamente luminosità e contrasto delle immagini rilevate, per una valutazione ottimale delle caratteristiche del campione.

*Leica Application Suite (LAS, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), vers. 3.1.0*

Il LAS® è un software di analisi, utilizzato in campo biomedico e della scienza dei materiali, che consente di lavorare con microscopio, fotocamera e software di elaborazione delle immagini come se il tutto fosse un unico sistema integrato; è quindi possibile acquisire, salvare, analizzare e modificare le immagini ottenute. In questo studio i fotogrammi digitali sono stati catturati con una fotocamera Leica DFC290, montata su un microscopio ottico digitale Leica DM2500. La versione del software LAS® utilizzata è la 3.1.0

### 3.3 Procedura di analisi.

Tutti i campioni sono stati come prima cosa scongelati, tramite immersione per 20 secondi in acqua distillata, riscaldata a 37°C. Tempo di scongelamento e temperatura dell'acqua sono stati accuratamente monitorati per ogni campione, utilizzando un timer da laboratorio ed il termostato del bagnomaria termostatico. Successivamente, estratto il campione di seme dalla paillette, si è proceduto all'esecuzione dello striscio su vetrino e sua colorazione.

L'aliquota di seme utilizzata per ogni vetrino è pari a 5µl, e lo striscio è stato eseguito su un vetrino precedentemente pulito con carta assorbente ed un po' d'alcool, onde evitare una contaminazione del fondo dello stesso, che ne avrebbe inficiato la lettura. Nel caso di becco ed ariete si è scelto di usare 3µl di seme anziché 5, a causa dell'elevata concentrazione dei campioni.

Lo striscio è stato eseguito con l'ausilio di un altro vetrino, prestando attenzione alla velocità ed all'inclinazione dello stesso, in modo da garantire una uniforme distribuzione del materiale seminale. Gli strisci sono stati eseguiti tutti dallo stesso

operatore, per poter garantire una più elevata standardizzazione dell'intero procedimento.

In seguito il vetrino è stato lasciato ad asciugare all'aria per 5 minuti, al riparo da polvere e contaminanti.

Successivamente è stata la colorazione: per i campioni di bovino, cane e becco si è utilizzata la colorazione SpermBlue<sup>®</sup>, seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice, mentre per il seme di ariete si è utilizzata la Sperm Stain<sup>®</sup>, sostituendone il fissativo originale con glutaraldeide al 3%. Entrambe le colorazioni sono state ideate specificamente per la colorazione di cellule spermatiche, e consentono l'evidenziazione dell'acrosoma, della testa, del collo e della coda della cellula. Sono colorazioni iso-osmotiche rispetto al materiale seminale, e la loro interferenza con la morfologia cellulare è minima (Van der Horst e Maree, 2009); sono le colorazioni consigliate dalla casa produttrice dello SCA system per la valutazione della morfologia spermatica. Abbiamo optato per due tipi di colorazione differenti perché con la SpermBlue<sup>®</sup>, nella sola specie ovina, il contrasto tra le varie strutture spermatiche non era ottimale; utilizzando invece la combinazione Sperm Stain<sup>®</sup>/glutaraldeide, si è ottenuta una maggiore penetrazione del colore nelle cellule, ed un miglior contrasto tra le varie strutture.

Il protocollo di colorazione con *SpermBlue*<sup>®</sup> prevede di coprire completamente ed in maniera uniforme lo striscio, già completamente asciutto, con 0.5-1 ml di fissativo. La fissazione richiede un tempo di 10 minuti, ed una temperatura ambientale di 20°-25°C ; il vetrino deve essere disposto orizzontalmente, su una superficie regolare. Quindi, dopo aver delicatamente lasciato scorrere via il fissativo inclinando leggermente il vetrino, si procede con la colorazione : utilizzando una pipetta in plastica monouso, si depongono 0.45-0.5 ml di colorante, avendo sempre l'accortezza di porre in vetrino in orizzontale, su una superficie regolare, coprendolo con il colorante in maniera uniforme. La colorazione richiede 12 minuti, alla stessa temperatura ambientale della fissazione. Infine, il colorante in eccesso deve essere lasciato scivolare via, ed il vetrino immerso in acqua distillata per 3 secondi, lentamente e con delicatezza.

Lasciate scivolare via le gocce d'acqua in eccesso, si appone il copri-vestrino sul vetrino, prima che quest'ultimo si asciughi.

La colorazione con Sperm Stain® è invece più rapida: la fissazione, effettuata immergendo lo striscio in glutaraldeide al 3% , richiede solo 2,5 minuti, mentre la colorazione, effettuata anch'essa per immersione del vetrino (dopo averlo lasciato sgocciolare 30 secondi), prevede l'immersione del vetrino nella soluzione 2 (Xanthene buffered solution) per 2,5 minuti, e, dopo sgocciolamento, nella soluzione 3 (Thiazine buffered solution) per altri 2,5 minuti. a seguito di sgocciolamento del vetrino, viene infine apposto il vetrino copri-oggetti. Il lato del vetrino su cui non è stato fatto lo striscio viene a questo punto accuratamente ripulito con della carta bibula, per evitare che gocciolamenti di colorante rendano il fondo del vetrino scuro.

Come per l'esecuzione degli strisci, anche la colorazione di tutti i vetrini è stata eseguita sempre dallo stesso operatore.

I vetrini così preparati sono stati analizzati prima con lo SCA® system, e subito dopo con il LAS®; tra un'analisi e l'altra non sono mai trascorsi più di 20 minuti, per evitare il disseccamento e la conseguente alterazione del vetrino. Tutte le analisi sono state eseguite dallo stesso operatore, nell'intento di standardizzare al massimo l'intera procedura.

L'obiettivo utilizzato è stato, in entrambi i casi, il 60x, e sono stati valutati 20 spermatozoi per ogni campione, scelti in maniera casuale da almeno 25 fotogrammi diversi, scattati da diverse zone del vetrino.

Durante l'analisi con lo SCA® system, la rilevazione degli spermatozoi presenti nel fotogramma è completamente automatizzata, così come l'identificazione e la misurazione dei parametri di interesse(vedi fig. 2.2); i parametri rilevati sono:

- Testa dello spermatozoo → Diametro maggiore (lunghezza)  
Diametro minore (larghezza)  
Area  
Perimetro  
Allungamento ("elongation")

Ellitticità

Regolarità della superficie

- Acrosoma → Area
- Collo dello spermatozoo → Larghezza

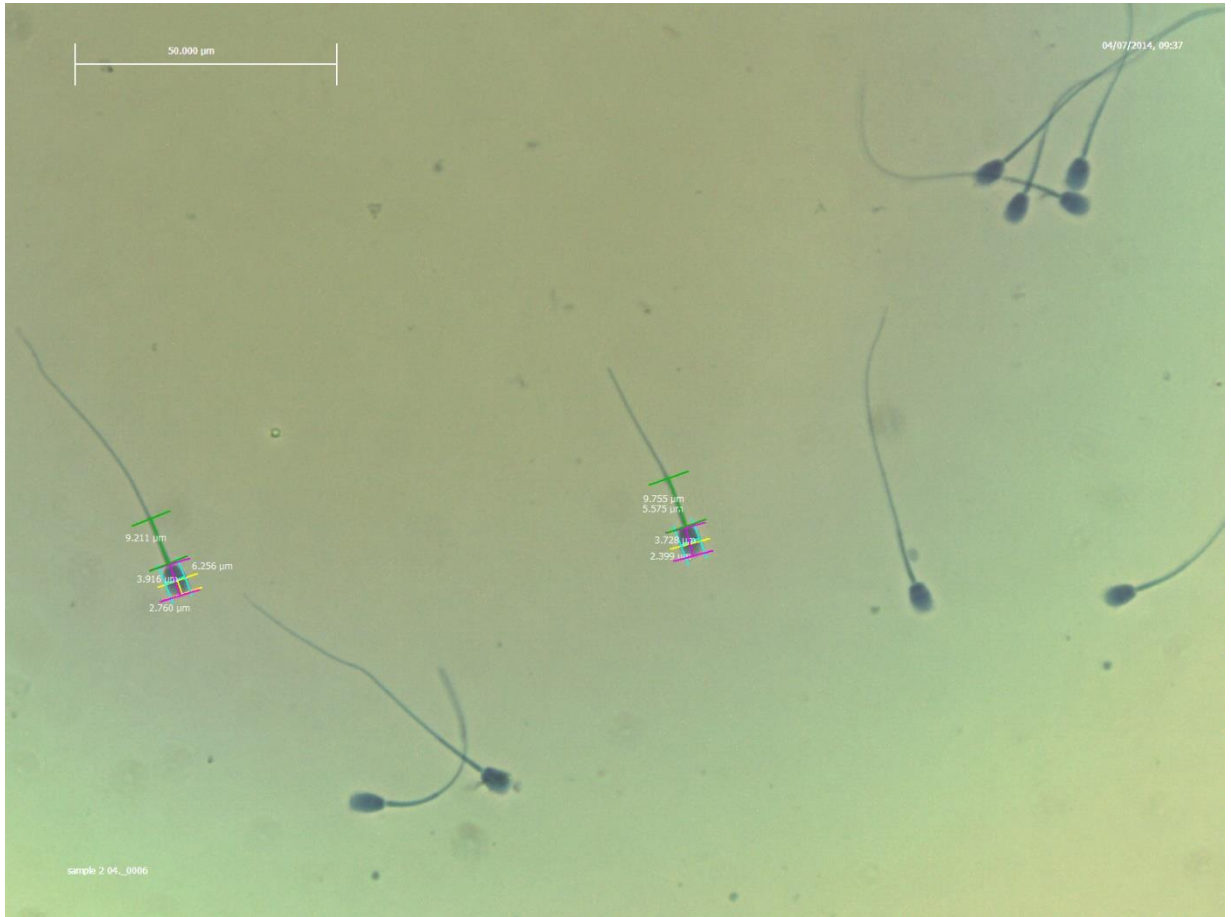
I parametri ottenuti invece dal LAS sono il risultato di una selezione manuale del tratto da misurare, le cui dimensioni sono poi calcolate automaticamente dal software di analisi (vedi fig. 2.1). Con il software LAS sono stati valutati:

- Testa dello spermatozoo → Diametro maggiore (lunghezza)  
Diametro minore (larghezza)
- Acrosoma → Lunghezza
- Collo dello spermatozoo → Lunghezza

In questo studio, non tutti i parametri rilevati sono stati utilizzati per la valutazione morfologica. Si è scelto infatti di utilizzare, per quanto riguarda il confronto inter-metodo tra SCA® e LAS®, solo i dati relativi a larghezza e lunghezza della testa, mentre nella valutazione intra-metodo dello SCA® si sono considerati i valori di larghezza, lunghezza ed area della testa, area acrosomale, area e larghezza del collo, ed infine angolo di inserzione collo-testa.

TAB 3.1 *Prospetto dei parametri utilizzati nello studio; in corsivo i parametri utilizzati per il confronto inter-metodo.*

	SCA®	LAS®
TESTA	<ul style="list-style-type: none"><li>· <i>Diametro maggiore (length)</i></li><li>· <i>Diametro minore (width)</i></li><li>· Area</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>· <i>Diametro maggiore (length)</i></li><li>· <i>Diametro minore (width)</i></li></ul>
ACROSOMA	<ul style="list-style-type: none"><li>· Area</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Lunghezza</li></ul>
COLLO	<ul style="list-style-type: none"><li>· Larghezza (width)</li><li>· Area</li><li>· Angolo di inserzione collo-testa</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Lunghezza (length)</li></ul>



**FIG. 3.1** *Sopra: esempio di analisi dell'immagine con il LAS® vers. 3.1.0*

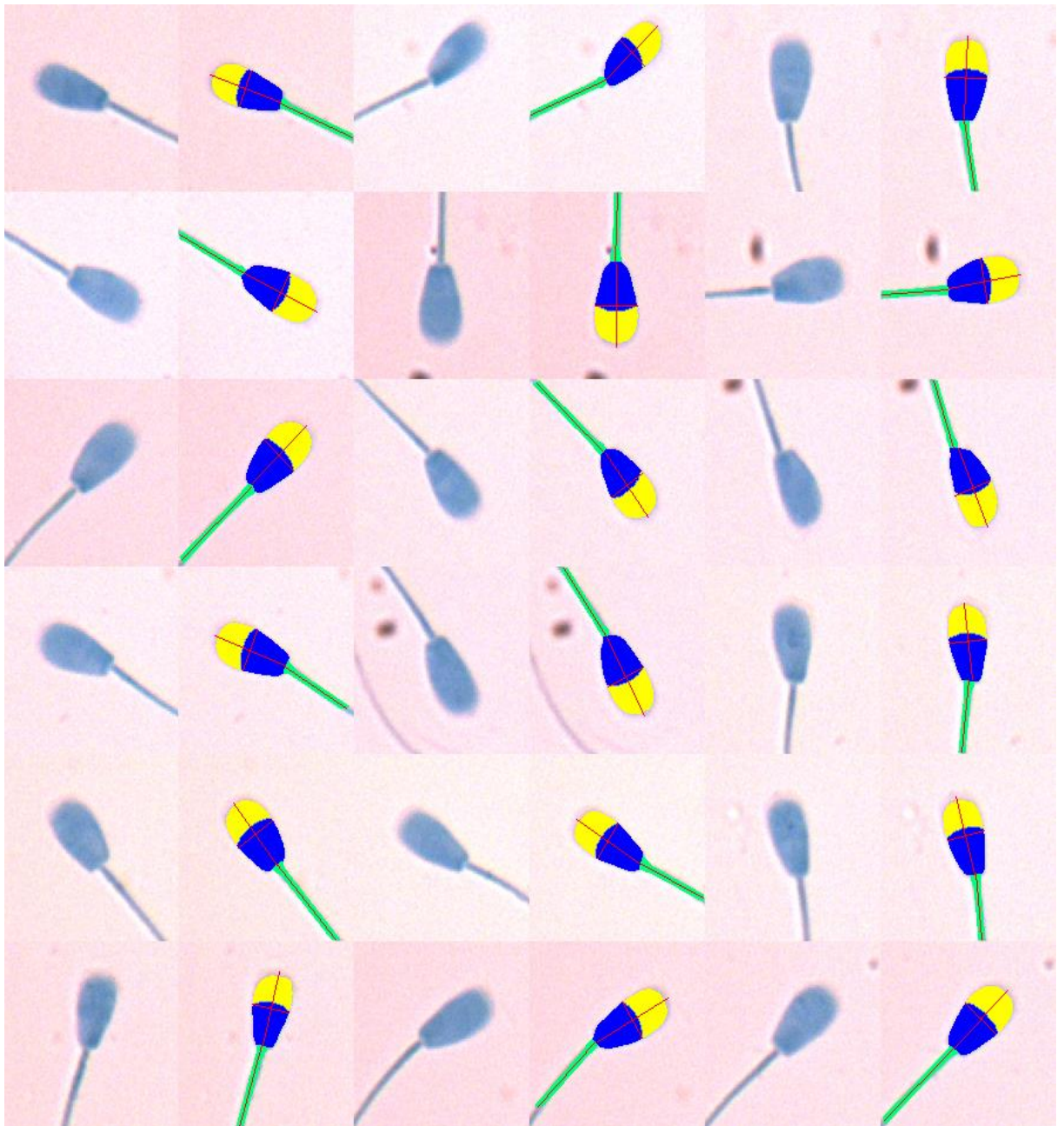
*A lato: particolare di una delle cellule spermatiche analizzate; in verde si può vedere la misura del midpiece, in rosa la lunghezza della testa, in turchese la larghezza della testa ed in giallo la lunghezza dell'acrosoma. L'immagine è stata ingrandita solo successivamente all'analisi, ad esemplificazione delle misurazioni effettuate.*

*Pagina seguente: FIG. 3.2 esempio di valutazione morfometrica con lo SCA® system veterinary edition.*

## MORPHOMETRIC VALUES

<i>head</i>	Average	Deviation	<i>midpiece</i>	Average	Deviation
Length	5,45	0,41	Width	1,28	0,09
Width	10,69	0,42	Area	14,49	2,62
Area	58,73	4,73	Angle	2,37	0,90
Perimeter	30,09	1,72			
Ellipticity	0,51	0,04			
Elongation	0,00	0,00			
Roughness	0,82	0,07			
Regularity	0,78	0,03			
Acrosome	58,48	1,96			

Analysis properties: - Objective: 60x (1 pixel = 0.164815 microns); - Stain: SpermBlue



Per ogni campione valutato lo SCA® ha restituito un foglio di calcolo con i valori morfometrici medi rilevati; al contrario il LAS® ha invece fornito un'immagine digitale con i valori annotati a fianco del singolo parametro misurato. Prima di procedere con l'analisi dei risultati è stato quindi necessario calcolare la media e la deviazione standard dei valori rilevati per ogni campione (per il solo LAS®) e per ogni specie (per SCA® e LAS®).

L'analisi statistica è stata effettuata attraverso il software di analisi SIGMASTAT; i test condotti sono i seguenti:

- Two way ANOVA e test di Tukey con specie e metodo come variabili indipendenti, ed
  - Larghezza della testa come variabile dipendente.
  - Lunghezza della testa come variabile dipendente.
- One way ANOVA e test di Tukey per
  - Larghezza della testa misurata con metodica SCA®.
  - Lunghezza della testa misurata con metodica SCA®.
  - Area dell'acrosoma misurata con metodica SCA®.
  - Area della testa misurata con metodica SCA®.
  - Angolo di inserzione testa-collo misurata con metodica SCA®.
  - Larghezza del collo misurata con metodica SCA®.
  - Area del collo misurata con metodica SCA®.
  - Larghezza della testa misurata con metodica LAS®.
  - Lunghezza della testa misurata con metodica LAS®.



#### 4. RISULTATI.

Le tabelle 4.1 , 4.2 e 4.3 mostrano come i test ANOVA e di Tukey abbiano evidenziato la presenza di differenze statisticamente significative tra i valori medi degli stessi parametri, calcolati con SCA®, in specie diverse (tab 4.1, 4.2 e 4.3).

*TAB 4.1 Valori (media ± e.m.s.) espressi in µm di lunghezza e larghezza della testa degli spermatozoi analizzati con SCA®*

Specie	Lunghezza della testa (length)	Larghezza della testa (width)
Bovina	5,462 ± 0,0565 <sup>a</sup>	11,037 ± 0,0831 <sup>a</sup>
Canina	4,516 ± 0,0357 <sup>b</sup>	7,229 ± 0,0549 <sup>b</sup>
Caprina	4,530 ± 0,208 <sup>b</sup>	9,400 ± 0,460 <sup>c</sup>
Ovina	5,812 ± 0,0370 <sup>a</sup>	10,669 ± 0,0568 <sup>a</sup>

*Lettere differenti (a,b,c) tra specie all'interno di ogni parametro identificano una differenza statisticamente significativa (P<0.05).*

*TAB 4.2 Valori (media ± e.m.s.) espressi in µm<sup>2</sup> di area dell'acrosoma ed area della testa degli spermatozoi analizzati con SCA®*

Specie	Area dell'acrosoma (area of the acrosome)	Area della testa (area of the head)
Bovina	59,226 ± 0,110 <sup>a</sup>	59,008 ± 0,738 <sup>a</sup>
Canina	42,837 ± 2,352 <sup>b</sup>	37,567 ± 0,535 <sup>b</sup>
Caprina	46,926 ± 0,526 <sup>b</sup>	45,370 ± 3,177 <sup>c</sup>
Ovina	23,267 ± 4,087 <sup>c</sup>	67,300 ± 1,072 <sup>d</sup>

*Lettere differenti (a,b,c,d) tra specie all'interno di ogni parametro identificano una differenza statisticamente significativa (P<0.05)*

TAB 4.3 Valori (media  $\pm$  e.m.s.) di ampiezza del collo ( $\mu\text{m}$ ), dell'angolo di inserzione collo-testa e dell'area del collo ( $\mu\text{m}$ ) degli spermatozoi analizzati con SCA<sup>®</sup>

Specie	Ampiezza del collo (midpiece width)	Angolo di inserzione collo-testa (midpiece angle)	Area del collo (midpiece area)
Bovina	1,275 $\pm$ 0,0443 <sup>a</sup>	2,237 $\pm$ 0,0756 <sup>a</sup>	13,881 $\pm$ 0,564 <sup>a</sup>
Canina	1,209 $\pm$ 0,0226 <sup>a</sup>	1,517 $\pm$ 0,0693 <sup>b</sup>	15,267 $\pm$ 0,431 <sup>a</sup>
Caprina	1,153 $\pm$ 0,0186 <sup>a</sup>	1,145 $\pm$ 0,0629 <sup>c</sup>	13,008 $\pm$ 0,306 <sup>a</sup>
Ovina	1,449 $\pm$ 0,0556 <sup>b</sup>	1,803 $\pm$ 0,103 <sup>b</sup>	22,580 $\pm$ 1,481 <sup>b</sup>

Lettere differenti (a,b,c) tra specie all'interno di ogni parametro identificano una differenza statisticamente significativa ( $P < 0.05$ )

Dai dati riportati appare chiaro come esistano significative differenze tra i valori riportati da SCA® per lo stesso parametro, in specie diverse. È però interessante notare come tali differenze non siano le stesse, tra parametri diversi: l'area e l'ampiezza del collo, ad esempio, presentano valori simili nella specie canina, bovina e caprina, mentre la specie ovina differisce significativamente; non vale lo stesso invece per l'angolo di inserzione testa-collo, o per l'area della testa o ancora per larghezza e lunghezza della testa. Quest'ultimo parametro risulta statisticamente simile nel seme bovino ed ovino, e nel seme caprino e canino, mentre la larghezza della stessa testa differisce in tutte le specie.

La specie caprina si distingue inoltre dalle altre specie, in quanto non presenta differenze statisticamente significative con le specie bovina e canina in 4 dei 7 parametri morfometrici presi in considerazione.

Per quanto riguarda invece il confronto tra metodiche di analisi diverse, le tabelle 4.5 e 4.6 mostrano come esistano differenze statisticamente significative tra i valori medi ottenuti con LAS® e con SCA®, nei parametri lunghezza e larghezza della testa.

*TAB 4.4 Valori (media ± e.m.s.) espressi in μm di lunghezza e larghezza della testa degli spermatozoi analizzati con LAS®*

Specie	Lunghezza della testa (length)	Larghezza della testa (width)
Bovina	9,122 ± 0,0697 <sup>a</sup>	4,605 ± 0,0467 <sup>a</sup>
Canina	5,998 ± 0,0476 <sup>b</sup>	3,786 ± 0,0395 <sup>b</sup>
Caprina	8,265 ± 0,0594 <sup>c</sup>	4,037 ± 0,0432 <sup>c</sup>
Ovina	8,412 ± 0,0335 <sup>c</sup>	4,766 ± 0,0412 <sup>d</sup>

*Lettere differenti (a,b,c,d) tra specie all'interno di ogni parametro identificano una differenza statisticamente significativa (P<0.05).*

*TAB 4.5 valutazione delle differenze tra metodi di analisi diversi (SCA® E LAS®) per lo stesso parametro (ampiezza della testa), all'interno di specie diverse.*

SCA vs. LEICA	Differenza tra medie (width)	p	q	P	P<0,05
Specie					
Bovina	6,432	2	37,767	<0,001	si
Canina	3,443	2	20,218	<0,001	si
Caprina	5,363	2	31,492	<0,001	si
Ovina	5,903	2	34,662	<0,001	si

*TAB 4.6 valutazione delle differenze tra metodi di analisi diversi (SCA® E LAS®) per lo stesso parametro (lunghezza della testa), all'interno di specie diverse.*

SCA vs. LEICA	Differenza tra medie (length)	p	q	P	P<0,05
Specie					
Bovina	3,660	2	41,733	<0,001	si
Canina	1,482	2	16,898	<0,001	si
Caprina	3,735	2	42,584	<0,001	si
Ovina	2,599	2	29,116	<0,001	si

Nel confronto tra le due metodiche di analisi utilizzate, SCA® e LAS®, emerge come vi siano differenze statisticamente significative tra i tutti i valori rilevati, nelle diverse specie. La differenza tra i valori medi rilevati è particolarmente evidente, per il parametro “larghezza della testa”, in bovino ed ovino, mentre per il parametro “lunghezza della testa”, in bovino e caprino.

## 5. Discussione.

Il fine ultimo di questo studio è l'ottimizzazione del sistema di analisi SCA® e, per raggiungerlo, si intende valutare non solo la ripetibilità e oggettività dei dati morfologici da esso ottenibili, ma anche la loro precisione.

A scopo comparativo sono stati quindi riportati in tabella 5.1 i valori di larghezza, lunghezza ed area della testa di spermatozoi di toro, cane, ariete e becco, ottenuti da studi indipendenti dal presente.

*TAB 5.1 valori medi (media±D.S.) di larghezza (µm), altezza (µm) ed area (µm<sup>2</sup>) della testa di spermatozoi bovini, canini, ovini e caprini. Tutti i valori sono stati rilevati con sistemi di analisi automatizzata del seme, a partire da campioni di seme fresco.*

Specie	Larghezza della testa	Lunghezza della testa	Area della testa
Bovina	4,40±0,6	8,65±4,1	27,30±6,5
Canina	3,72±0,02	6,60±0,02	19,74±0,12
Ovina	4,79±0,33	8,90±0,49	35,02±3,17
Caprina	3,93±1,7	7,53±1,9	22,95±3,0

*Fonte dati: Gravance et al., 1995a, 1996b, 1997c ; Maroto-Morales et al.,2010*

Questi valori sono stati ottenuti da sistemi CASA, a partire da campioni di seme fresco, in quanto non sono ad oggi stati pubblicati studi sulla morfometria di campioni di seme congelato (se non su seme sottoposto a particolari protocolli sperimentali); come si può vedere, i valori sopra riportati si discostano da quelli rilevati sperimentalmente in questo studio, e ciò può essere dovuto a diverse ragioni: la prima, e forse più importante, è legata alla presenza di una elevata variabilità sia di specie che soggettiva, responsabile anche della carenza di valori morfometrici assoluti di riferimento. Tale variabilità, un tempo solamente

ipotizzata (Gravance et al., 1995), è oggi oggetto di numerosi studi, al punto che è ormai accettata la presenza di diverse sub-popolazioni di spermatozoi, chiaramente identificabili dal punto di vista cinetico e morfologico, all'interno dello stesso eiaculato ed all'interno di eiaculati di soggetti appartenenti allo stesso gruppo di animali (Vicente-Fiel et al., 2013).

Oltre alla variabilità legata alla specie, al gruppo di individui analizzato ed al soggetto, va considerata anche quella legata alla mancanza di standardizzazione del metodo di analisi e processazione. Se da un lato i sistemi CASA consentono una maggiore precisione e ripetibilità rispetto alle tradizionali tecniche di valutazione morfologica, dall'altro necessitano di adeguata standardizzazione ed adeguato set-up per fornire dei risultati attendibili.

Non esiste, ad oggi, un protocollo standardizzato per la processazione e l'analisi del materiale seminale. Ogni centro di ricerca ed ogni laboratorio tende infatti a "creare" il proprio protocollo di congelamento, scongelamento ed analisi dei campioni; solo i centri di produzione del seme per scopi commerciali si sottopongono ai controlli di un organismo esterno, il quale però non verifica in ogni caso i protocolli procedurali, ma solamente il prodotto finito, prima della commercializzazione. Tali organismi di controllo possono emettere delle linee guida, applicate unicamente su base volontaria. Il motivo di questa carenza è da ricercarsi probabilmente nel fatto che gli elementi che possono influenzare la valutazione morfologica (ma anche cinetica) del campione in questione sono moltissimi: dalla concentrazione e dimensione del campione, alle caratteristiche biochimiche dell'eiaculato, le tecniche di laboratorio degli operatori, il fattore di diluizione del seme ed il tipo di extender utilizzato, la tecnica di congelamento e di scongelamento della dose di seme, il tipo e la metodica di colorazione utilizzata, il numero di spermatozoi valutati, il grado di magnificazione utilizzato durante l'analisi, i parametri di valutazione impostati nel sistema CASA e le specifiche di luminosità e contrasto dell'unità di digitalizzazione (Amann et al., 2014 ; Hidalgo et al., 2005 ; Rijsselaere et al., 2005 ; Yániz et al., 2015).

Differenze tra valori morfometrici rilevati tra analisi eseguite su campioni processati ed analizzati con tecniche diverse sono quindi comprensibili, ma i



campioni utilizzati in questo studio per l'analisi sia inter- che intra- metodica sono esattamente gli stessi, così come i vetrini utilizzati, e gli algoritmi di rilevazione dei parametri morfometrici utilizzati dal sistema SCA® sono quelli specie-specifici impostati dalla casa di produzione (Microptic®, Barcellona, Spagna).

L'unica specie in cui il protocollo utilizzato differisce per tipo di colorazione e di fissazione scelta, è la specie ovina; questo dipende dal fatto che, trattando i campioni con SpermBlue®, non c'era un'adeguata penetrazione del colorante all'interno della cellula, probabilmente a causa delle caratteristiche biochimiche del seme stesso. I valori morfometrici ottenuti con SCA® in questa specie potrebbero quindi differire dalle altre specie analizzate, almeno parzialmente, a causa di questo fatto; la variazione potrebbe comunque inficiare il confronto inter-specifico, ma non quello intra-specifico tra LAS® e SCA®, né la valutazione intra-specifica in SCA®.

Escludendo quindi l'influenza di differenze nella processazione e nell'analisi dei campioni come causa della differente capacità di differenziare i tratti morfologici del seme di diverse specie, ed in particolare del seme caprino da quello bovino e canino, l'ipotesi più plausibile sembra essere una scarsa ottimizzazione del sistema SCA® per l'analisi del seme caprino. Tale ipotesi trova sostegno anche nel fatto che il sistema SCA® è stato ideato per l'analisi degli spermatozoi la cui testa presenta una forma ovale, indipendentemente dalla specie di appartenenza, ma le specie in cui l'analisi morfologica è stata specificamente ottimizzata sono solamente quella bovina, suina, equina e canina probabilmente perché è proprio in queste specie che la pratica dell'inseminazione artificiale e della valutazione del materiale seminale in ambito clinico è ad oggi maggiormente diffusa.

I diversi valori ottenuti in SCA® ed in LAS® per i parametri lunghezza e larghezza della testa, sono invece, almeno in parte, legati al fatto che il sistema LAS® effettua misurazioni di segmenti precedentemente identificati dall'operatore a partire da immagini in 2 dimensioni, mentre il sistema SCA® si affida a formule ben più complesse, calcolando i parametri morfometrici nelle 3 dimensioni della cellula.

La sensibilità del sistema LAS® è inoltre fortemente operatore-dipendente, con tutte le conseguenze che ne derivano: l'esperienza di chi effettua l'analisi influirà sicuramente sui risultati, così come altri fattori tipicamente umani quali stanchezza, noia e distrazione.

È inoltre interessante notare come la differenza maggiore tra i valori rilevati con SCA® e con LAS®, sia proprio in bovino, una delle specie per cui l'analisi morfologica di SCA® è maggiormente ottimizzata, ed in piccoli ruminanti, specie per cui invece, come già detto, non si dispone ancora di specifici algoritmi d'analisi.

Limiti dello studio.

Diversi studi hanno stabilito che il numero ideale di cellule da analizzare per avere una immagine rappresentativa del campione seminale in analisi è  $n \geq 100$  (Hidalgo et al., 2005 ; Rijsselaere et al., 2002) , mentre nel presente studio è stato condotto su un numero ristretto di animali, e gli spermatozoi analizzati per ogni campione sono solamente 20.

Nonostante l'intenzione di standardizzare il più possibile l'intero procedimento di analisi, non è stato possibile garantire l'uniformità di tecniche di prelievo e di congelamento del materiale seminale utilizzato, così come non si è a conoscenza del tipo di extender utilizzato per i campioni di ogni singolo soggetto; diversi extender modificano infatti in misura diversa la morfologia spermatica (Leite et al., 2010), e questo può aver favorito, seppur in misura minima, l'insorgere di differenze all'interno del seme di soggetti diversi.

## 6. Conclusioni.

Il sistema di analisi SCA® risulta essere più preciso ed oggettivo del sistema LAS®, in virtù della sua elevata automatizzazione nei processi di analisi; tuttavia, per poter garantire una più elevata precisione dei dati morfologici ottenibili, è necessario mantenere una elevata standardizzazione di tutte le procedure, possibilmente anche tra laboratori diversi, in modo tale che i dati rilevati siano maggiormente confrontabili .

L' algoritmo sul quale è basata l'analisi morfologica dei piccoli ruminanti, e della specie caprina in particolare, dovrebbe essere implementato e migliorato, vista la maggiore importanza che l'analisi del seme va assumendo in queste specie, in particolare nell'ambito di progetti di conservazione della razza, nella valutazione clinica del benessere e della fertilità degli animali e, non ultimo, di miglioramento delle caratteristiche produttive e riproduttive in campo zootecnico.

## 7. Bibliografia.

1. Afzelius, B.A., 1995. Gustaf Retzius and spermatology. *Int. J. Dev. Biol.* 39, 675.
2. Al-Makhzoomi, A., 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 70, 682-691.
3. Amann, R.P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5.
4. Amann, R.P., 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 25, 317.
5. Barszcz, K., *Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination 2012-01-01*].
6. Benson, J.D., *Cryobiology of Spermatozoa 2012*].
7. Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R., Roy, T.J., 2014. Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Ruminant Research* 119, 114-119.
8. Brito, L.F.C., 2011. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology* 76, 745-750.
9. Contri, A., 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74, 424-435.
10. Correa, J.R., Pace, M.M., Zavos, P.M., 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48, 721-731.
11. Curry, M.R., 1996. Surface area and volume measurements for ram and human spermatozoa. *Biology of reproduction.* 55, 1325-1332.
12. Davis, R.O., 1993. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 14, 385.
13. Donnelly, E.T., Kristine Steele, E., McClure, N., Lewis, S.E.M., 2001. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction* 16, 1191.
14. Freshman, J.L., 2002. Semen collection and evaluation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 17, 104.

15. Galli, A., Quality and Analysis of Frozen Cattle Semen] 2004].
16. Gillan, L., 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal reproduction science*. 103, 201-214.
17. Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C., 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63, 445-457.
18. Gravance, C.G., 1998. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 49, 1219-1230.
19. Gravance, C.G., 1996. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology* 46, 1205-1215.
20. Hafez, E.S.E., Hafez, B., Seren, E., 2011. *Riproduzione Negli Animali d'Allevamento*. Libreriauniversitaria.it, Padova.
21. Hidalgo, M., 2005. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet. Med.* 50, 24-32.
22. Iguer-ouada, M., 2001. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* 55, 733.
23. Leite, T.G., 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 120, 31.
24. Lymberopoulos, A.G., 2010. Effect of Ram Age on Structural and Functional Competence of Frozen-Thawed Spermatozoa in Dairy Sheep. *Reproduction in domestic animals*. 45, 572-578.
25. Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A.J., Estesó, M.C., Martínez-Pastor, F., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2010. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73, 437-448.
26. Mortimer, D., 2001. Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions. *J. Androl.* 22, 192.
27. Murphy, C., 2013. Reducing sperm concentration is critical to limiting the oxidative stress challenge in liquid bull semen. *Journal of dairy science*. 96, 4447-4454.

28. Neild, D.M., 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 32, 351.
29. Nunez-Martinez, I., 2007. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Int. J. Androl.* 30, 182-189.
30. O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S.E.M., 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction* 17, 704.
31. Organizzazione mondiale, d.s., 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. World health organization, Geneva.
32. Peña, A.I., Quintela, L.A., Herradón, P.G., 1998. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology* 50, 1211-1220.
33. Rijsselaere, T., 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology* 64, 706-719.
34. Rijsselaere, T., 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 60, 1553-1568.
35. Rijsselaere, T., Van Soom, A., Hoflack, G., Maes, D., de Kruif, A., 2004. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology* 62, 1292-1306.
36. Samplaski, M.K., 2010. New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int. J. Urol.* 17, 839.
37. Sancho, M., 1998. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology* 50, 27.
38. Sundararaman, M.N., 2007. Analyses of morphological and morphometrical deviations of bull spermatozoa by computer assisted semen analysis technique. *Asian journal of animal and veterinary advances* 2, 196.
39. Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J., Holt, W.V., 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22, 382-94.

40. Tomlinson, M.J., 2010. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. *Fertil. Steril.* 93, 1911.
41. Verstegen, J., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
42. Vicente-Fiel, S., 2013. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Animal reproduction science.* 139, 182-189.
43. Yániz, J.L., 2015. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Anim. Reprod. Sci.* 156, 1.
44. Yániz, J.L., Vicente-Fiel, S., Capistrós, S., Palacín, I., Santolaria, P., 2012. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology* 77, 1343-1350.



## 8. Sitografia

[www.federica.unina.it](http://www.federica.unina.it)

[www.chemwiki.ucdavis.edu](http://www.chemwiki.ucdavis.edu)

[www.inst.bact.wisc.edu](http://www.inst.bact.wisc.edu)

[www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/)

[www.ext.vt.edu](http://www.ext.vt.edu)

[www.abanalitica.it](http://www.abanalitica.it)

[www.unionbio.com](http://www.unionbio.com)

[www.microopticsl.com](http://www.microopticsl.com)

Grazie a :

I miei genitori ed i miei fratelli, in particolare grazie per aver sopportato ogni crisi mistica, esistenziale e soprattutto isterica che ho avuto finora, (quasi) senza batter ciglio.

Cri, una sciamana speciale.

Ale, Andrea, Bea, Mezza, Rouge e Marghe, per esserci sempre, anche quando io non le voglio.

I miei amici, non meno importanti delle su-citate e succinte 6 grazie, per avermi ascoltata e fatta ridere, fatta arrabbiare, rattristare e poi rallegrare di nuovo, e per aver ascoltato tutti i miei sfoghi iper-polemici. Non importa se non ci vediamo più così spesso, se non ci parliamo più o se siamo sparsi in giro per il mondo, vi voglio bene ;)

Buco, Tita Cacinka, Maiti e Gordita, per ogni leccata, corsa, passeggiata, preda liberata (VIVA) nella mia stanza, fusa e vile agguato, che mi hanno aiutata a farmi due risate ed a non mollare, mai.

La Turchia, che mi ha sconvolta, nel bene e nel male, e tutte le persone, tutti i cani, tutti i gatti e tutti i pazienti "non convenzionali" che hanno reso quei 6 mesi così speciali.

Il mio relatore, dott. Calogero Stelletta, per la pazienza dimostrata, soprattutto in questo ultimo, frenetico periodo, per avermi spedita in Turchia, per tutte le cose insegnatemi e per tutto l'aiuto datomi..Grazie!

L'intero Dipartimento di Riproduzione ed Inseminazione Artificiale della Facoltà di Medicina Veterinaria della Ankara University... siete stati una famiglia, più che un gruppo di lavoro, mi avete fatta sentire a casa. In particolare grazie al prof Daşkin ed a Koray, per l'amicizia, l'infinita pazienza e disponibilità.

Grazie, a tutti voi, dal profondo del cuore.

Thanks to:

My parents and my brothers, especially for bearing me during every mystic, existential and hysteric crisis I had during these years, (almost) unflinchingly.

Cri, a very special shaman.

Ale, Andrea, Bea, Mezza, Rouge and Marghe, for being always there for me.

My friends, surely not less important than those 6 weird girls I just mentioned, for listening to me, making me laugh, getting me angry, sad and then happy again, and thank you also for having listened to every super critical outburst I had during these years. It doesn't matter if we're not seeing each other so often, if we're not talking together or if we're in different parts of the world..I love you! ;)

Buco, Tita Cacinka, Maiti and Gordita, for every lick, every run, walk and for every prey you freed in my room, thanks for every purr and vile ambush..you helped me by making me laugh and making me never give up.

Turkey, that surprised me in every possible way, and all the wonderful people I met there, all the dogs, cats and "non conventional" patients, who made those 6 months so special.

My supervisor, dott. Calogero Stelletta, who's been so patient with me, especially in this last, very frenetic period; thank you for "sending me over" in Turkey , for all the things you taught me, and for all your help..thank you!

The entire Reproduction and Artificial Insemination Department at Ankara University...you've been a family for me, you made me feel at home. I'd particularly like to thank prof. Daşkin and Koray for your friendship, your infinite patience and your helpfulness.

Thank you, to all of you, from the bottom of my heart.

