



**Sintesi dell'attività scientifica svolta da IBBA-CNR  
nell'ambito del Progetto:  
SHEEP&GOAT "Sustainability Health Environment Economy Profitability  
& Genomic Organisation Animal (pheno)Typing"  
Azione 8: Raccolta di materiale biologico e germoplasma.  
I semestre - Luglio 2022**

**Linea di attività**

L'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBBA-CNR) ha svolto principalmente le sue attività nell'ambito dell'Azione 8: Raccolta di materiale biologico e germoplasma. Obiettivo generale dell'Azione 8 è da un lato la corretta gestione della variabilità genetica delle razze di Libro Genealogico, nell'ottica di continuare a sviluppare ed implementare modelli di gestione a basso costo da replicare in futuro nelle diverse razze italiane, e dall'altra un'attività mirata alla valutazione della fertilità maschile nelle stazioni sperimentali. Quest'ultimo aspetto ha ricadute applicative particolarmente importanti non solo all'interno della stazione sperimentale stessa, migliorando il livello riproduttivo complessivo dell'allevamento nucleo, ma anche in popolazione dove andranno ad operare i maschi venduti e dove c'è forte richiesta di animali con caratteristiche di fertilità ottimali.

**Resoconto delle attività**

Come previsto dal progetto nel primo semestre si è svolta l'Attività 8.1 Formazione personale per raccolta materiale seminale di riproduttori ovini e caprini (mesi 1-6). Sono state organizzate delle giornate formative tenute da ricercatori IBBA-CNR e finalizzate alla messa a punto ed al trasferimento al personale AssoNaPa dei protocolli necessari alla raccolta di materiale seminale da riproduttori ovini, sia tramite prelievo in vivo sia tramite estrazione di spermatozoi epididimali da testicoli (prelevati) al macello.

Nell'ambito del primo step del Progetto, le ricercatrici Dr.sse Flavia Pizzi e Federica Turri dell'IBBA-CNR si sono recate presso il Centro Genetico di Asciano (SI) per effettuare la formazione teorica e pratica del personale di AssoNaPa operante presso il Centro ed in particolare del Veterinario Dr. Domenico Biagini. Durante la loro permanenza al Centro le ricercatrici hanno installato un laboratorio "da campo" per effettuare la dimostrazione pratica delle tecniche di raccolta e valutazione materiale seminale dagli arieti del Centro. Il materiale raccolto è stato successivamente trasportato presso i laboratori IBBA CNR di Lodi,

*Sede: Via Edoardo Bassini 15 - 20133 Milano (MI)*

*Tel. +39 02 23699 /402 Segreteria /430 Direzione /413 Amministrazione - Fax +39 0223699411*

- U.O.S. di Lodi: c/o Parco Tecnologico Padano – Via Einstein, Località Cascina Codazza – 26900 Lodi (LO)*
- U.O.S. di Pisa: c/o Area della Ricerca di Pisa, Via Moruzzi, 1 – 56124 Pisa (PI)*
- U.O.S. di Roma: c/o Area della Ricerca di Roma 1, Via Salaria Km 29,300 – 00015 Monterotondo S. (RM)*

valutato per le principali caratteristiche qualitative, quali motilità e relativi parametri cinetici con sistema computerizzato di analisi, e concentrazione spermatica. Il materiale è stato quindi diluito con specifici diluenti, congelato e stoccato nella Criobanca del Germoplasma Animale presso IBBA-CNR con l'obiettivo di conservare il materiale genetico delle razze autoctone italiane.

In particolare l'attività è stata articolata in tre giornate:

Giornata 1: arrivo delle ricercatrici Flavia Pizzi e Federica Turri presso il Centro genetico di Asciano; pianificazione della attività insieme al veterinario del Centro genetico, Dott. Domenico Biagini; allestimento del laboratorio da campo per l'espletamento delle attività dei giorni successivi.

Giornata 2: In questa giornata il Centro Genetico ha organizzato la valutazione morfologica degli arieti di razza Comisana allevati presso il Centro, effettuata da un esperto di razza, per identificare i migliori soggetti da utilizzare nei futuri gruppi di monta. Le ricercatrici del CNR hanno assistito alla valutazione morfologica, identificando in accordo con il personale del centro genetico, i riproduttori da avviare alla raccolta del materiale seminale in vivo. Nella stessa giornata il veterinario aziendale e le ricercatrici del CNR hanno recuperato da un macello in provincia di Grosseto, testicoli di ariete di razza Comisana, avviati alla macellazione al termine della loro carriera riproduttiva, al fine di mostrare al Veterinario aziendale le tecniche del recupero degli spermatozoi epididimali direttamente dai testicoli. Al rientro dal macello le ricercatrici hanno tenuto un momento di formazione al Veterinario del Centro Genetico, illustrando con una presentazione preparata ad hoc, i principi della conservazione delle razze locali zootecniche con particolare riferimento alle tecniche di raccolta del materiale seminale, alla valutazione della qualità del materiale seminale, e ai principali aspetti della crio-conservazione di materiale genetico.

Successivamente all'acquisizione di nozioni fondamentali relative alle tecniche di estrazione degli spermatozoi epididimali, si è proceduto con la dimostrazione pratica e training del personale per il recupero di spermatozoi funzionali, dai testicoli raccolti in precedenza la macello.

Giornata 3: in questa giornata si è effettuata una dimostrazione pratica con training del personale per la raccolta del materiale seminale mediante il prelievo con vagina artificiale da arieti di razza Massese e Comisana. In previsione di questo nelle settimane antecedenti al prelievo di materiale seminale era stato avviato un protocollo di sincronizzazione degli estri su un nucleo di femmine in modo da sfruttare l'estro indotto per aumentare la possibilità di raccolta di materiale seminale.

Il seme è stato prelevato da 3 arieti di razza Massese sui quali è stato condotto anche uno screening sanitario per verificare la presenza/assenza di patologie trasmissibili con il materiale seminale. In totale sono state prodotte e stoccate 126 dosi di seme. Purtroppo per la razza Comisana il primo tentativo di raccolta di materiale seminale non è andato a buon fine a causa della troppa diffidenza degli arieti. E' già stato previsto che in autunno si pianificheranno nuove dimostrazioni e attività di prelievo in modo da recuperare materiale genetico anche da questa razza.

Dopo il prelievo presso il Centro si è effettuata una prima valutazione del materiale seminale. Il materiale è stato quindi diluito con un apposito diluente che ha consentito di conservare la qualità del materiale

refrigerato a 4°C fino a 24 ore dal prelievo. All'arrivo nei laboratori IBBA CNR di Lodi, è stata analizzata la motilità totale spermatica e i rispettivi parametri cinetici, mediante un analizzatore automatico di immagine collegato ad un microscopio di fase mediante videocamera, con un contrasto di fase negativo, un obiettivo 10x e un tavolino riscaldato per mantenere il campione a 37°C. 10 microlitri di materiale seminale sono stati valutati mediante camera di Makler appositamente studiata per preservare la motilità degli spermatozoi.

Al termine delle giornate di formazione e di attività pratica presso il Centro di Asciano le ricercatrici del CNR hanno stilato un manuale dal titolo "PROTOCOLLO OPERATIVO PER L'ADDESTRAMENTO, LA RACCOLTA, IL CONGELAMENTO E LO STOCCAGGIO DEL MATERIALE SEMINALE NELLA SPECIE OVICAPRINA" (in allegato) che potrà essere distribuito al personale del Centro Genetico di Asciano.

In tale manuale sono descritti in dettaglio i protocolli per la raccolta del materiale seminale sia in vivo, tramite vagina artificiale, che tramite estrazione degli spermatozoi epididimali nella specie ovicaprina. Sono descritti anche i protocolli per la diluizione, il congelamento e lo stoccaggio di dosi di materiale seminale.

Alcuni momenti di formazione e attività pratica svolti presso il centro genetico di Asciano.



**PROTOCOLLO OPERATIVO PER L'ADDESTRAMENTO, LA RACCOLTA, IL  
CONGELAMENTO E LO STOCCAGGIO DEL MATERIALE SEMINALE  
NELLA SPECIE OVICAPRINA**

**Addestramento arieti per la raccolta del materiale seminale**

- Controllo stato sanitario generale dei riproduttori da avviare alla raccolta del materiale genetico.
- Esame dell'apparato riproduttore (testicoli, pene e ghiandole bulbo uretrali) da parte del veterinario aziendale.
- Contenimento in cattività di femmine in manifestazione estrale (indotto o naturale).
- Presentazione ripetuta del maschio ad un nucleo di femmine in cattività durante la manifestazione estrale (indotto o naturale).

**Azioni antecedenti la raccolta del materiale seminale**

- Raccogliere le informazioni relative al donatore (Matricola, data di nascita, codice aziendale).
- Recuperare due campioni di sangue da ciascun donatore in provette Vacutainer®. Una provetta con l'anticoagulante EDTA (tappo viola), allo scopo di fluidificare il sangue e conservarlo per studi relativi all'analisi del DNA. Una seconda provetta con nessun tipo di anticoagulante (tappo rosso) al fine di separare il siero ematico, per analisi sanitarie. Refrigerare i campioni ematici a +5°C. La provetta viola successivamente può essere congelata. Consegnare la provetta tappo rosso ad un Istituto Zooprofilattico di riferimento, per la ricerca dei seguenti patogeni trasmissibile sessualmente:

<b>Specie ovicaprina</b>
Brucella abortus/melitensis
CAEV - Caprine Arthritis Encephalitis Virus
Chlamydia abortus
Q Fever - Coxiella burnetii
Mycobacterium avium subs paratuberculosis
Leptospira spp
Toxoplasma gondii
Blue Tongue
Mycoplasma agalactiae

- Tosare i riproduttori nella parte posteriore, pulire il prepuzio con soluzione fisiologica sterile.
- Riscaldare il diluente per la diluizione del materiale seminale a bagno maria a 37 °C.
- Mantenere il diluente a bagno maria a 37 °C.
- Tenere a portata di mano acqua calda a 45 °C.
- Montare la vagina artificiale e caricarla con acqua a 45 °C in modo da ottenere una temperatura interna di 38-39 °C

### Raccolta del materiale seminale con vagina artificiale

- Marcare la provetta di raccolta (15 ml) dotata di tacca graduata per la valutazione del volume raccolto, con il codice identificativo del singolo riproduttore.
- Utilizzare guanti sterili e puliti per ogni singolo riproduttore.
- Raccogliere il materiale seminale dal riproduttore deviando il pene all'interno della vagina artificiale.
- Una volta raccolto il campione controllare che sia privo di urina e contaminanti (paglia, feci, peli) e mantenere la temperatura del campione a 37°C.
- Determinare il volume leggendo la quantità sulla provetta graduata.
- Determinare la concentrazione spermatica mediante camera di conta con microscopio o spettrofotometro.
- Determinare la motilità spermatica totale al microscopio, mantenendo la temperatura del campione a 37°C.
- Diluire il campione 1:1 con il diluente riscaldato a 37°C in modo da raggiungere la concentrazione di  $300 \times 10^6$  spermatozoi per dose di materiale seminale (0,5 ml).
- Refrigerare il seme diluito a 5 °C per almeno 90 minuti.

### Raccolta del materiale seminale mediante recupero di testicoli di soggetti avviati alla macellazione

- Raccogliere le informazioni relative al donatore (Matricola, data di nascita, codice aziendale).
- Recuperare due campioni di sangue da ciascun donatore in provette Vacutainer®. Una provetta con l'anticoagulante EDTA (tappo viola), allo scopo di fluidificare il sangue e conservarlo per studi relativi all'analisi del DNA. Una seconda provetta con nessun tipo di anticoagulante (tappo rosso) al fine di separare il siero ematico, per analisi sanitarie. Refrigerare i campioni ematici a +5°C. La provetta viola successivamente può essere congelata. Consegnare la provetta tappo rosso ad un Istituto Zooprofilattico di riferimento, per la ricerca dei seguenti patogeni trasmissibile sessualmente:

<b>Specie ovicaprina</b>
Brucella abortus/melitensis
CAEV - Caprine Arthritis Encephalitis Virus
Chlamydia abortus
Q Fever - Coxiella burnetii
Mycobacterium avium subs paratuberculosis
Leptospira spp
Toxoplasma gondii
Blue Tongue
Mycoplasma agalactiae

- Recuperare al macello post-mortem testicoli integri, con il deferente il più lungo possibile dai riproduttori, all'interno di una busta di plastica.
- Recuperare campioni di sangue in seguito a iugulazione in provette Vacutainer® con tappo rosso e viola.
- Refrigerare i testicoli in borsa termica o scatola di polistirolo mediante siberini termici congelati, senza appoggiare direttamente i tessuti sui siberini congelati.
- Trasportare i testicoli al laboratorio.
- Isolare il prima possibile i testicoli, con relativo epididimi e vaso deferente, dallo scroto e dai vari tessuti, isolando la coda dell'epididimo collegata al dotto deferente.

- Isolare e pulire l'epididimo da sangue a tessuto connettivo.
- Incannulare il dotto deferente con un ago 20-22G da siringa.
- Effettuare un lavaggio in senso retrogrado, quindi dal dotto deferente alla coda dell'epididimo, con siringa precedentemente caricata di diluente per la conservazione del materiale seminale a temperatura ambiente.
- Raccogliere gli spermatozoi in una provetta graduata.
- Determinare il volume leggendo la quantità sulla provetta graduata.
- Determinare la concentrazione spermatica mediante camera di conta con microscopio o spettrofotometro.
- Determinare la motilità spermatica totale al microscopio, mantenendo la temperatura del campione a 37°C.
- Diluire il campione 1:1 con il diluente riscaldato a 37°C in modo da raggiungere la concentrazione di  $300 \times 10^6$  spermatozoi per dose di materiale seminale (0,5 ml).
- Refrigerare il seme diluito a 5 °C per almeno 90 minuti.

### **Congelamento e stoccaggio del materiale seminale**

- Stampare sulle paillettes il codice identificativo del prelievo (Codice razza, identificativo animale, data di raccolta).
- Confezionare il seme in paillettes da 0.5 ml utilizzando un sistema semiautomatico di confezionamento.
- Congelare le dosi di materiale seminale a 5 cm di altezza dai vapori di azoto liquido per 20 minuti.
- Conservare il materiale seminale congelato in bidoni di azoto liquido a -196°C.