



Regione Lombardia
Agricoltura



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO
ISTITUTO DI ZOOTECNICA
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

UOFAA

UNIONE OPERATORI
DI F.A. ANIMALE

"MIGLIORAMENTO DELLE PRESTAZIONI PRODUTTIVE E RIPRODUTTIVE MEDIANTE NUOVE TECNICHE DI INSEMINAZIONE STRUMENTALE

ALLA SICURTÀ



QUADERNI DELLA RICERCA N°40
OTTOBRE 2004

**Sperimentazione condotta nell'ambito del progetto di ricerca
"Miglioramento delle prestazioni produttive e riproduttive mediante nuove
tecniche di inseminazione strumentale della scrofa"
(d.g.r. n 13077 del 23/05/2003)**

Autori del testo

Massimo Zecchini
Sara Barbieri
Francesca Chiesa

Autore delle fotografie

Roberto Spelta

Ha realizzato l'attività sperimentale:

Istituto di Zootecnica - Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Milano
Via G. Celoria, 10 - 20133 Milano - MI
Referente: Prof. Casimiro Crimella - miro.crimella@unimi.it

Per informazioni:

Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura
Piazza IV Novembre, 5 - 20124 Milano
<http://www.agricoltura.regione.lombardia.it>
U.O. Programmazione e ricerca per le filiere agroindustriali
Struttura ricerca e innovazione tecnologica
Tel 0267652537 Fax 0267652576
e-mail: agri_ricerca@regione.lombardia.it
Referente: Gianpaolo Bertoncini - tel. 0267652524

U.O. Politiche Agroambientali e Servizi per le Imprese
Struttura Servizi per le Imprese
Tel 0267655902 Fax 0267652757
Referente: Chiara Carasi - tel.0267653800

Presentazione

Il comparto suinicolo lombardo, che detiene il primato nel panorama nazionale, è caratterizzato da aziende che si avvalgono delle più moderne tecnologie di allevamento.

La pubblicazione che ho il piacere di presentare descrive i risultati di un anno di ricerca per il miglioramento della fecondazione artificiale, una tecnologia che, forse più di altre, ha permesso il miglioramento delle performance produttive dei nostri allevamenti.

Con questo “Quaderno della Ricerca” si è voluto infatti creare uno strumento di consultazione per gli allevatori suinicoli lombardi, in grado di fornire indicazioni circa nuovi metodi di fecondazione artificiale oggi a disposizione.

Il progetto “*Miglioramento delle prestazioni produttive e riproduttive mediante nuove tecniche di inseminazione strumentale nella scrofa*” ha senza dubbio avuto il merito di divulgare alcune delle più moderne tecnologie nel campo della riproduzione e di valutarne la reale diffusibilità nel contesto produttivo regionale.

Sono sicura che i risultati di questo progetto possano soddisfare le esigenze del comparto e apportino il necessario contributo al costante aggiornamento indispensabile all’evoluzione del settore.

Viviana Beccalossi

Vicepresidente ed Assessore Regionale all’Agricoltura

Perché occuparsi di nuove tecniche di F.A. e perché nella scrofa?

L'appuntamento scientifico con questa problematica non è sterile e non è una semplice esercitazione accademica; questo settore di indagine, la bibliografia specifica sull'argomento ne è testimone, rappresenta a tuttora un *challenge* valido e soprattutto attuale.

La veterinaria di settore, il mondo imprenditoriale dell'industria e dell'allevamento necessitano di sempre più aggiornate e validate tecniche gestionali ed operative, pertanto mettere a confronto nuovi sistemi, nuove strategie e nuovi materiali rappresenta sicuramente motivo di interesse per conoscere e verificare le nuove proposte.

Affrontare la problematica di tecnologie alternative e/o innovative significa confrontarsi con tematiche di ricerca tra le più importanti e qualificanti in un ambito così specializzato, quale quello della suinicoltura intensiva.

Anche se la tendenza attuale del mondo zootecnico è quella di mirare pressoché solo ad aspetti qualitativi della produzione, sono personalmente convinto che la zootecnia tradizionale, che affronta le problematiche del miglioramento produttivo e riproduttivo in chiave quantitativa, abbia ancora molto spazio e soprattutto possa ancora contribuire ad aumentare la redditività dell'allevamento.

Questo filone della ricerca applicata, che ha caratterizzato e caratterizza l'Istituto di Zootecnica da moltissimi anni, sono convinto abbia trovato nel progetto "*Miglioramento delle prestazioni produttive e riproduttive mediante nuove tecniche di inseminazione strumentale nella scrofa*" possibilità di valorizzazione delle competenze acquisite e condizioni per esprimere le potenzialità delle conoscenze di settore. La realizzazione della ricerca si è concretizzata grazie alla fattiva collaborazione con l'Unione Operatori di F.A. Animale che ha permesso l'esecuzione del progetto nella sua fase applicativa: una collaborazione che si è dimostrata proficua e che mi auguro possa proseguire in future attività di ricerca.

Milano 30/09/04

Miro Crimella

*Direttore Istituto di Zootecnica - Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Milano*

Introduzione e scopo del progetto

Il progetto “Miglioramento delle prestazioni produttive e riproduttive mediante nuove tecniche di inseminazione strumentale nella scrofa” ha avuto come obiettivo la valutazione dei risultati produttivi ottenuti in un gruppo di allevamenti suinicoli lombardi, che hanno sperimentato alcuni differenti cateteri per l’inseminazione intrauterina.

Questo documento, che gli autori si augurano possa risultare interessante e stimolare un alto numero di operatori della filiera suinicola, rappresenta il punto di arrivo del progetto, ma anche il punto di inizio delle attività di informazione e di trasferimento dei risultati ottenuti. Ci è sembrato importante, soprattutto nella particolare realtà italiana, verificare l’efficacia di queste tecniche, proprio perché innovative, in termini sia produttivi che di gradimento da parte dell’allevatore, sebbene, come verrà evidenziato successivamente, queste siano supportate da un’ampia bibliografia scientifica e la cui validità a livello sperimentale è ormai ben nota da parte dei ricercatori e dei tecnici di settore.

L’interesse per l’introduzione di queste nuove tecnologie della fecondazione artificiale ha una immediata ricaduta sul miglioramento dell’impiego del materiale seminale, grazie alla riduzione del numero totale di spermatozoi e del volume della dose impiegata. Il vantaggio economico si concretizza quindi nella riduzione dei costi legati al mantenimento dei verri per la riproduzione, consentendo di ottenere un numero maggiore di dosi per eiaculato, un costo per dose inferiore ed una riduzione della manodopera generale, oltre che una diffusione più mirata e rapida delle caratteristiche genetiche ricercate. Lo studio di queste nuove tecnologie rappresenta anche una base importante nel processo di diffusione dell’impiego di materiale seminale congelato e sessato nella realtà suinicola.

Oggi la Lombardia è la regione italiana che alleva il maggior numero di suini, circa 3 milioni e mezzo di capi, ossia più di un terzo della produzione nazionale. Nell’ultimo decennio, si è verificata una drastica riduzione nel numero di allevamenti, dovuta all’uscita dal mercato di quelli meno competitivi. Il settore è caratterizzato dall’uso di moderne tecnologie alle quali si aggiunge un dinamico miglioramento della genetica, dell’alimentazione e della gestione; tali fattori rendono gli allevamenti lombardi altamente produttivi e competitivi a livello nazionale, soprattutto nelle aree a forte vocazione suinicola (Lodi, Bergamo, Brescia, Mantova e Cremona), dove è maggiore la specializzazione degli allevamenti (www.ersal.lombardia.it, Situazione Regionale, 2000).

Lo scenario descritto in precedenza richiede che le aziende lombarde siano in grado di aggiornarsi e di rivolgersi ai sistemi più attuali e innovativi proposti nell’ambito scientifico internazionale, in modo tale da essere ancora più competitive sul mercato ed avere gli strumenti per confrontarsi con la realtà europea.

Nell’ambito della inseminazione artificiale suina, in Italia si continua ad operare secondo le conoscenze e i metodi di dieci anni fa; l’inseminazione con l’utilizzo di seme fresco resta, tuttora, la tecnica che dà migliori risultati. Nel contesto scientifico internazionale invece, ricerche svolte sulla crioconservazione del materiale seminale, oltre alle sperimentazioni riguardanti il trasferimento di embrioni e la fecondazione profonda con metodo chirurgico, hanno stimolato l’approfondimento di tecniche per la fecondazione intrauterina non chirurgica con seme fresco (Krueger *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2001).

Se da una parte infatti, i vantaggi della fecondazione artificiale secondo i metodi tradizionali non hanno più bisogno di trovare conferma nel settore della moderna suinicoltura, metodiche sempre più innovative si sono dimostrate in grado di contribuire ulteriormente al miglioramento dell’efficienza riproduttiva delle scrofe, momento chiave nell’economia dell’allevamento.

Conoscenze approfondite dell’anatomia e della fisiologia riproduttiva della scrofa hanno consentito di mettere a punto queste tecniche di inseminazione strumentale con risultati sempre più soddisfacenti. In particolare, la fecondazione post-cervicale e l’inseminazione intrauterina appaiono delle metodiche molto promettenti, la cui diffusibilità è da verificare anche nella realtà italiana.

Recenti ricerche, svolte in Inghilterra, Spagna e Stati Uniti, hanno dimostrato che è possibile ridurre considerevolmente la quantità di seme, se questo viene depositato direttamente all’interno dell’utero, con un considerevole risparmio economico sull’eiaculato del verro, mantenendo risultati di fertilità e prolificità paragonabili a quelli ottenuti con il sistema di fecondazione tradizionale. Ricerche condotte in Francia da Watson e Behan (2002) hanno evidenziato come la metodica di fecondazione post-cervicale sia semplice, efficace e sicura e costituisca una reale opportunità per gli allevatori a livello di campo.

Il progetto ha voluto quindi confrontare la tecnica di fecondazione artificiale con metodo tradizionale in uso negli allevamenti coinvolti con 3 sistemi di inseminazione intrauterina, denominati rispettivamente, e per le loro caratteristiche applicative, inseminazione post-cervicale con catetere Deepgoldenpig™ (IMV, Francia), inseminazione intrauterina con catetere Magaplus™ (MAGAPOR, Spagna) e inseminazione intrauterina profonda con sonda Firflex® (MAGAPOR, Spagna).



- il miglioramento delle tecniche per individuare il momento dell'ovulazione nella scrofa,
- il miglioramento delle tecniche di F.A., diminuendo il numero di spermatozoi per dose e depositando il seme in prossimità della salpingi,
- il sessaggio degli spermatozoi,
- le tecniche di embryo transfer,
- la crioconservazione degli ovociti e degli embrioni,
- la produzione in vitro di embrioni,
- la bisezione embrionale,
- il trasferimento nucleare e la microiniezione di DNA.

Le effettive applicazioni si discostano tuttavia dalle ricerche. Ad esempio, la tecnologia dell'*embryo transfer*, pratica ormai consolidata in altre specie, ha scarsa diffusione nella specie suina a livello aziendale: il miglioramento delle tecniche di crioconservazione degli embrioni suini e di ET per via non chirurgica potrebbe nel futuro aumentarne l'impiego (Niemann e Rath, 2001).

E' perciò evidente che nel suino, nonostante i recenti progressi, lo stato delle biotecnologie della riproduzione non sia così avanzato come per la specie bovina e ovina; anche la possibilità di congelare il seme di suino è ancora a livello sperimentale, lontano dall'aver un valido riscontro pratico, sebbene recenti ricerche abbiano dimostrato come si possano fare notevoli passi avanti.

L'utilizzo di seme congelato è una tecnica che va comunque perfezionata, poiché comporta ancora numerosi svantaggi quali:

- competenza e attenzione durante la manipolazione e lo scongelamento,
- ridotta vitalità dello sperma dopo lo scongelamento rispetto all'ejacolato fresco (è perciò estremamente importante conoscere il momento dell'ovulazione ed eseguire la fecondazione circa 4 ore prima),
- alta variabilità individuale poiché non tutti i verri hanno un seme adatto al congelamento (è stato stimato che solo 1/3 dei verri ha un seme ideale al congelamento, 1/3 ha qualità moderate e 1/3 non è assolutamente idoneo; Murhpy, 1998).

Quindi, nonostante ricerche avanzate abbiano dimostrato la possibilità di realizzare seme congelato accessibile agli allevatori, la sua reale applicazione è ancora limitata da problemi tecnici ed economici.

L'inseminazione intrauterina

L'inseminazione intrauterina è una tecnica che si sta diffondendo rapidamente: dopo la Francia, anche la Gran Bretagna, la Germania, la Spagna, i Paesi Bassi, il Canada, gli Stati Uniti e il Messico hanno potuto verificare la sua applicabilità in allevamento. La tecnica si è rivelata semplice e interessante, mettendo in luce nuove prospettive in grado di favorire progressi nell'intero settore suinicolo e apportando vantaggi sia a livello dei centri genetici sia dei singoli allevamenti (Cassou, 2002).

L'avvenire della tecnica di inseminazione intrauterina si basa sui seguenti presupposti:

- aumentare il numero delle dosi prodotte per ejacolato e sfruttare il seme dei verri di maggior potenziale genetico;
- ridurre il numero di verri, diminuendo i costi di gestione negli allevamenti e aumentando la competitività dei centri verri;
- dare nuovo impulso allo sviluppo delle tecniche di congelamento e sessaggio del seme e di trasferimento embrionale.

Diverse ricerche in campo suinicolo sull'inseminazione artificiale stanno studiando come ridurre il numero di spermatozoi da utilizzare nella F.A., senza compromettere la fertilità e la prolificità. È stato osservato (Steverinnk *et al.*, 1998) che entro le 2,5 ore dall'inseminazione artificiale convenzionale, fino al 70% del volume e al 25% degli spermatozoi introdotti vengono persi come reflusso dal tratto riproduttivo della scrofa. Recentemente, alcuni esperimenti (Kruger e Rath, 2000; Martinez *et al.*, 2001) hanno verificato la possibilità di evitare tali perdite attraverso l'inseminazione direttamente all'interno dell'utero.

L'inseminazione intrauterina può indubbiamente portare differenti vantaggi dal momento che, nella parte prossimale dell'apparato genitale femminile, gli spermatozoi sono attaccati dai leucociti; tanto più avanzata è la sede di deposizione del seme tanto meno spermatozoi saranno eliminati. Ciò significa che il numero di spermatozoi per dose può essere ridotto a 1-1,5 miliardi contro i 3 necessari nella F.A. tradizionale. La sede di deposizione, essendo successiva alla cervice, limita il fenomeno del reflusso durante o dopo l'inseminazione stessa. I parametri produttivi, quali il tasso di gravidanza, la portata al parto, il numero di nati totali e nati vivi, sono paragonabili se, per entrambe le tecniche, si utilizzano 2 o 3 miliardi di spermatozoi. Quando invece si utilizza un miliardo di spermatozoi per dose,

la tecnica tradizionale mostra un drastico calo di queste performance, mentre la tecnica intrauterina registra solo una lieve riduzione. Questo può rappresentare una piccola perdita, che però è bilanciata dal potenziale profitto garantito dalla riduzione della dose spermatica (Watson e Behan, 2002).

Vantaggi dell'inseminazione intrauterina post-cervicale

- Riduzione del volume della dose da 80-100 ml a 30-50 ml
- Riduzione del numero totale di spermatozoi per dose da 3×10^9 a $1-1,5 \times 10^9$
- Aumento del numero totale di dosi per eiaculato
- Riduzione del tempo di lavoro
- Riduzione del fenomeno del reflusso
- Riduzione del numero di verri, del loro costo d'acquisto e di mantenimento
- Miglior sfruttamento dei verri geneticamente superiori
- Riduzione del costo di produzione del kg di carne
- Aumento del numero di suinetti dai verri migliori:
 - maggiore uniformità dei lotti
 - migliore indice di conversione
 - miglioramenti della velocità di crescita
- Riduzione del volume necessario per il trasporto e conservazione delle dosi seminali
- Possibilità di utilizzo con maggiori risultati (soprattutto per la fecondazione intrauterina profonda) di:
 - seme congelato
 - spermatozoi sessati.

Esaminando la tecnica di inseminazione intrauterina, oltre agli innegabili vantaggi, vanno considerate anche alcune problematiche, quali:

- la difficoltà d'inserimento del catetere e l'aumento del rischio di traumi a livello del tratto riproduttivo;
- l'inadeguatezza o maggior difficoltà dell'impiego della tecnica sulle scrofette;
- la necessità di un tecnico particolarmente addestrato e competente, in grado di individuare il calore con la massima precisione. Prove condotte in Francia dalla Cobiporc, hanno fatto osservare come non si riscontrino problemi, nell'esecuzione della tecnica intrauterina, quando le scrofe sono ben in calore (Châtillon, 2002).

L'inseminazione intrauterina, come tecnica che consente l'utilizzo di dosi a minor volume e concentrazione va distinta, per attrezzature e modalità d'esecuzione, in:

- *tecnica chirurgica*: con deposizione del seme vicino alla giunzione utero tubarica;
- *inseminazione intrauterina profonda*: con dosi a

bassa concentrazione e deposizione unilaterale a 2/3 di un corno uterino;

- *inseminazione intrauterina* (transcervicale o post-cervicale) con deposizione del seme a livello del corpo dell'utero.

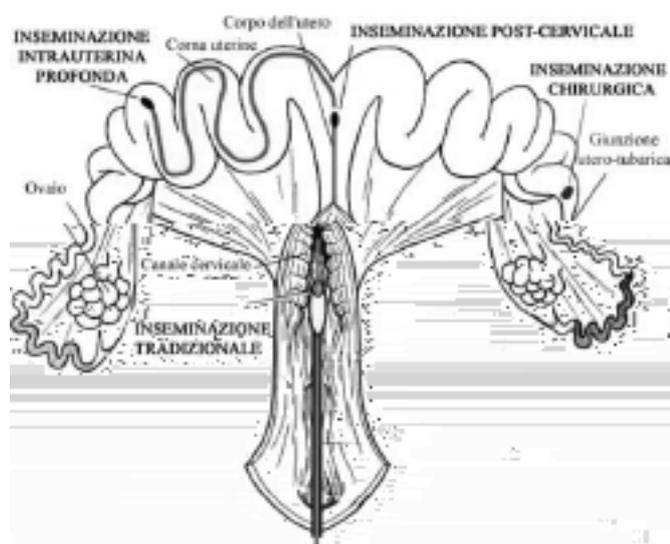


Fig. 1: Posizionamento della sonda in alcune delle tecniche d'inseminazione (da Belstra modificato, 2002)

Dose a bassa concentrazione

Durante gli anni '50 e '60, le ricerche riguardanti la dinamica dello sperma durante l'inseminazione con dosi a differente volume e concentrazione hanno suggerito come circa $5-10 \times 10^9$ di spermatozoi in 100 ml siano necessari per ottenere una fertilità ottimale (Stratman e Self, 1960). Da allora, come ben sappiamo, è stato possibile ridurre il numero di spermatozoi per dose. Oggi, migliori conoscenze sul ciclo estrale della scrofa, mestruai diluitori di miglior qualità e tecniche più innovative per il conteggio e la valutazione del materiale seminale hanno reso possibile ridurre il numero di spermatozoi a 3×10^9 , con dosi commerciali variabili tra i 2,5 e i 4 miliardi. Nelle procedure attuali di inseminazione artificiale nel suino infatti, si utilizzano $2,5-4 \times 10^9$ di spermatozoi per inseminazione, in un volume di liquido che varia da 70 a 100 ml, che vengono depositi a livello della cervice.

Miliardi di spermatozoi vengono introdotti in un elevato volume di liquido, anche se solo una piccola percentuale di questi raggiunge la giunzione utero-tubarica (1×10^5) e la regione caudale dell'istmo, dove sono localizzate le riserve spermatiche (1×10^3) (Mburu *et al.*, 1996). Qui le cellule rimangono senza perdere la loro capacità fecondante (Suarez *et al.*, 1991) e vengono rilasciate subito prima dell'ovulazione (Hunter, 1984).

Una cospicua perdita di spermatozoi è causata soprattutto dal reflusso di seme nelle prime ore successive alla fecondazione (Steверink *et al.*, 1998) e dall'intensiva fagocitosi uterina da parte dei leucociti polimorfonucleati (Rozeboom *et al.*, 1998), che invadono l'utero nelle due ore successive all'inseminazione.

La tecnica d'inseminazione artificiale delle scrofe, con 3×10^9 di spermatozoi, comporta quindi necessariamente un ingente utilizzo di seme, poiché sembra indispensabile per garantire un buon tasso di gravidanza e una numerosità

della figliata accettabile. Partendo da queste conoscenze, sono state valutate nuove procedure di fecondazione che richiedono un basso numero di spermatozoi da depositare in sede uterina. Recenti ricerche definiscono “dose a bassa concentrazione” quella pari a 1×10^9 cellule spermatiche che, quando deposta nel corpo dell’utero della scrofa, mantiene buone performance produttive (Watson e Behan, 2002). I risultati delle ricerche condotte da Rozeboom *et al.* (2004) hanno messo in evidenza che il tasso di gravidanza e la prolificità diminuiscono quando si utilizzi una dose contenente meno di 1×10^9 di spermatozoi, anche ricorrendo all’inseminazione intrauterina.

Inseminazione intrauterina profonda con metodo chirurgico

Recenti studi di inseminazione profonda chirurgica, eseguiti su scrofe e su scrofette, hanno ottenuto tassi di fertilità assolutamente paragonabili a quelli della F.A. convenzionale (Belstra, 2002).

Krueger *et al.* (1999) e Krueger e Rath (2000) hanno infatti dimostrato che, quando il materiale seminale viene depositato chirurgicamente in prossimità della giunzione utero-tubarica, il numero di spermatozoi e il volume della dose possono essere rispettivamente ridotti a 1×10^7 e 0,5 ml, senza una diminuzione del potenziale di fertilizzazione, in confronto all’inseminazione tradizionale cervicale, con 3×10^9 spermatozoi in 80 ml.

Gli animali sottoposti al trattamento hanno partorito senza difficoltà e i dati ottenuti non hanno mostrato differenze significative sul tasso di gravidanza e sulla portata al parto tra i gruppi sperimentali e i controlli. Anche il numero medio dei nati totali, vivi e morti non ha mostrato in nessun caso differenze significative tra i gruppi inseminati con tecnica chirurgica e i gruppi di controllo.

Dimostrata la possibilità di ridurre nettamente il numero e il volume della dose inseminante, si sono condotte indagini sulla possibilità di realizzare uno strumento semplificato per l’inseminazione non chirurgica, in grado di favorire l’applicazione in campo.

Inseminazione intrauterina profonda non chirurgica eseguita con fibroendoscopio (FBE)

Già Hancock (1959) aveva effettuato alcuni esperimenti d’inseminazione transcervicale non chirurgica nei suini. Più recentemente, Martinez *et al.* (2001) hanno condotto studi per verificare la possibilità di depositare il seme non chirurgicamente nella profondità del corno uterino, vicino alla giunzione utero-tubarica. A tale scopo, gli Autori hanno eseguito alcune prove per sviluppare un sistema per l’inseminazione intrauterina profonda senza sedazione dell’animale.

Per valutare la difficoltà dell’inserimento di un fibroendoscopio flessibile attraverso la cervice, lungo il corno uterino, tale strumento è stato inserito, con l’aiuto di un tradizionale catetere per l’inseminazione artificiale, in un gruppo di scrofe dopo lo svezzamento a 30-40 ore dal trattamento con hCG.

Nell’eseguire questa procedura, il maggior ostacolo sembrava determinato dalla particolare struttura anatomica della cervice e dell’utero del suino: le pliche del canale cervicale, la lunghezza e la curvatura delle corna uterine.

Martinez *et al.* (2001) con le loro prove hanno invece dimostrato che:

- questa procedura può essere eseguita senza particolari difficoltà tecniche, grazie alla flessibilità dello strumento,
- non è necessario avere un sistema ottico per inserire la sonda,
- è possibile attraversare la cervice e raggiungere il corno uterino in circa 4 minuti, nel 90,9% delle scrofe.

L’inserimento della sonda nell’apparato femminile della scrofa si è rilevato piuttosto semplice e veloce, la maggior difficoltà è stata incontrata a livello delle ultime due pieghe cervicali. Sembra esserci una variazione individuale nella dilatazione cervicale e nel passaggio dell’endoscopio; tuttavia, l’inseminazione profonda è una procedura relativamente non traumatica e ben tollerata dalle scrofe. Tutte le scrofe sottoposte alle prove non hanno presentato sintomi di infezione nei giorni successivi e sono tornate in calore dopo un normale periodo.

In termini produttivi, la prolificità non ha evidenziato differenze significative tra gli animali fecondati con tecnica profonda ($5-20 \times 10^7$ spermatozoi in 10 ml) e un gruppo controllo fecondato con tecnica tradizionale (3×10^9 spermatozoi in 80 ml).

L’inseminazione intrauterina profonda con endoscopio eseguita con metodo non chirurgico, utilizzando un minor numero di spermatozoi, può essere attuata efficacemente nelle scrofe, mantenendo un normale tasso di fertilità e numero di nati adeguato (Martinez *et al.*, 2001). Il fibroendoscopio presenta però lo svantaggio di non poter essere utilizzato in campo, in quanto lo strumento è piuttosto costoso e fragile.

Inseminazione intrauterina profonda non chirurgica eseguita con sonda modificata (Firflex®)

Gli studi sull’inseminazione intrauterina profonda sono proseguiti focalizzando l’attenzione sulla ricerca di uno strumento più pratico, economico ed efficiente, ma con le stesse caratteristiche di flessibilità e maneggevolezza del fibroendoscopio.

E’ stata brevettata una particolare sonda (Martinez *et al.*, 2002) che, inserita attraverso un tradizionale catetere d’inseminazione a spirale, è in grado di attraversare le pieghe della cervice e spingersi fino a 2/3 di uno delle due corna

uterine. Il catetere a spirale permette l'aggancio alla cervice e la speciale sonda flessibile, lunga 1,80 m e diametro esterno di 4 mm, può facilmente essere inserita, fino all'interno del corno uterino. Il seme viene fatto defluire per mezzo di una siringa collegata allo strumento.

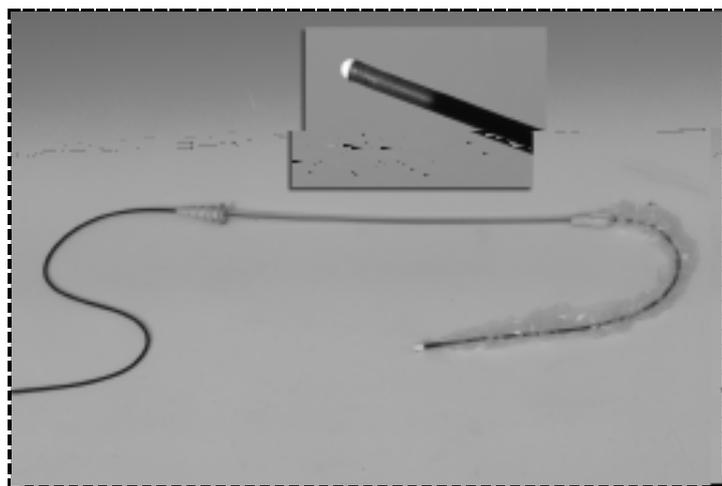
L'inseminazione intrauterina profonda

Nel dettaglio l'intervento fecondativo prevede le seguenti fasi:

- introduzione e aggancio di un catetere tradizionale a spirale,
- introduzione e posizionamento della sonda Firflex® fino al raggiungimento della parte distale di un corno uterino,
- introduzione di una dose a basso dosaggio ($50-150 \times 10^6$ in 10 ml) mediante una siringa agganciata alla sonda,
- aggiunta di 3 ml di diluente (corrispondente al volume interno della sonda stessa) per il lavaggio degli spermatozoi residui.

sito d'inseminazione. Poiché la tecnica prevede la deposizione di seme in un solo corno uterino (fecondazione unilaterale), si potrebbe pensare all'eventuale possibile fecondazione degli ovuli del solo ovidotto interessato. In realtà, il numero di nati, non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa rispetto alla F.A. tradizionale eseguita sul gruppo di controllo, mentre la percentuale di embrioni raccolti dopo l'inseminazione intrauterina profonda con 150×10^6 spermatozoi è stata simile in entrambi i corni. La reale spiegazione si è trovata nella spontanea migrazione degli spermatozoi, che depositi vicino alla giunzione utero-tubarica in un solo corno, sono in grado di raggiungere l'ovidotto controlaterale fertilizzando un elevato numero di ovociti (92%), anche se il meccanismo risulta ancora controverso (Martinez *et al.*, 2002).

La sonda utilizzata per l'inseminazione intrauterina profonda trova discrete applicazioni per lo studio e lo sviluppo di nuove biotecnologie della riproduzione. Il gruppo di ricerca spagnolo (Martinez *et al.*, 2004) ha recentemente verificato la possibilità di utilizzare la sonda Firflex® modificata per il trasferimento di embrioni con metodo non chirurgico nella scrofa. Benché tale pratica non abbia ancora applicazione nelle aziende commerciali, riveste un certo interesse nell'allevamento suino qualora ci sia la necessità di ridurre il rischio sanitario legato all'introduzione di animali da rimonta dall'esterno dell'azienda stessa. Tale pratica di fecondazione, nel passato, è stata molto limitata dalla necessità di ricorrere alla sedazione dell'animale; oggi il gruppo di ricerca spagnolo ha ottenuto risultati molto soddisfacenti (portata al parto 70,8% con una media nati di $6,9 \pm 0,7$) sviluppando questa nuova procedura per il trasferimento embrionale in scrofe e in scrofette non sedate.



Dai risultati ottenuti, si è rilevato come questo innovativo strumento sia efficiente e piuttosto maneggevole, raggiungendo la profondità delle corna uterine in un tempo medio di 3,7 minuti nel 95,4% delle scrofe.

La portata al parto e la prolificità, con dosi contenenti $50-150 \times 10^6$ spermatozoi, non si è dimostrata differente dal gruppo di controllo, fecondato con la F.A. tradizionale, consentendo una riduzione di 20-60 volte del numero di spermatozoi e di 8-10 volte del volume della dose.

Tra i dubbi sorti nell'applicazione di questa tecnica, uno ha riguardato il numero di nati, in relazione al

Un altro utilizzo dell'inseminazione intrauterina profonda è legato alle nuove tecnologie di conservazione e manipolazione del materiale seminale.

Recentemente, anche per l'allevamento suino, è stato dimostrato un certo interesse nella preselezione del sesso degli animali, soprattutto in relazione alla necessità di accelerare il progresso genetico nei piani di selezione. Il sessaggio del materiale seminale mediante citofluorimetro può compromettere la membrana delle cellule spermatiche, riducendone la capacità fecondante e la durata di vita. Benché il grado di purezza della procedura sia molto elevato, appare evidente che il metodo più interessante per sviluppare questa tecnica sia un'inseminazione a

bassa dose eseguita in prossimità del sito di fertilizzazione. In tal senso è evidente come l'inseminazione intrauterina profonda si adatti a queste esigenze (Vazquez *et al.*, 2003).

Inseminazione intrauterina (post-cervicale) eseguita con cateteri modificati

Il catetere per l'inseminazione post-cervicale è molto simile ad uno tradizionale, ma porta al suo interno una sonda, che può essere fatta avanzare per deporre il seme nel corpo dell'utero. La fecondazione post-cervicale, eseguita con l'utilizzo di un catetere non traumatico che consente la facile penetrazione della cervice, trova migliore impiego in scrofe che abbiano partorito almeno una volta.

Questo strumento consente di ridurre il numero di spermatozoi necessari per ogni inseminazione, pur ottenendo un'alta fertilità e fecondità (Watson e Behan, 2002).

La possibilità di mettere a punto una tecnica di fecondazione che utilizzi dosi a bassa concentrazione ha infatti spinto la ricerca a individuare una tecnica pratica e sicura, utilizzabile nella routine d'allevamento, in grado di consentire una riduzione del numero di spermatozoi a 1-1,5 miliardi per dose, senza compromettere la fertilità.

Le prove circa la possibilità di effettuare un'inseminazione direttamente in cavità uterina non sono recenti (Holt, 1959), tuttavia, non furono prese in considerazione, finché recentemente, Krueger *et al.* (1999) e Martinez *et al.* (2001) hanno provato a introdurre dosi a bassa concentrazione direttamente nel corno uterino.

Sulla spinta di queste ricerche, Watson e Behan (2002), in collaborazione con IMV, hanno investigato i potenziali vantaggi forniti da una fecondazione intrauterina, eseguita con nuovo catetere (Deepgoldenpig™), in confronto a quello tradizionale (Goldenpig®), utilizzando una dose a bassa concentrazione.

L'inseminazione post-cervicale nelle scrofe si è rivelata una tecnica semplice, efficace e sicura, in grado di consentire la riduzione della dose d'inseminazione a un miliardo di spermatozoi: la portata al parto non ha mostrato differenze significative con la tecnica e la dose tradizionale, anche la dimensione media delle nidiate si è dimostrata buona per tutti i tipi di interventi. Ovviamente, i risultati ottenuti impiegando la dose da 1 miliardo con catetere standard sono stati significativamente più bassi.

Altre ricerche (Magapor, 2004), volte a mettere a punto un catetere semplice e che eguagliasse gli altri sistemi esistenti in termini di risultati riproduttivi, hanno portato alla realizzazione di un differente prodotto: la sonda Magaplustm. Questo catetere è composto da una cannula flessibile di materiale plastico, la cui estremità di forma sferica favorisce l'introduzione del catetere e il suo avanzamento nell'apparato riproduttore.

I risultati riportati dagli Autori hanno evidenziato come i principali vantaggi siano la riduzione del tempo di inseminazione e la diminuzione del fenomeno del reflusso.

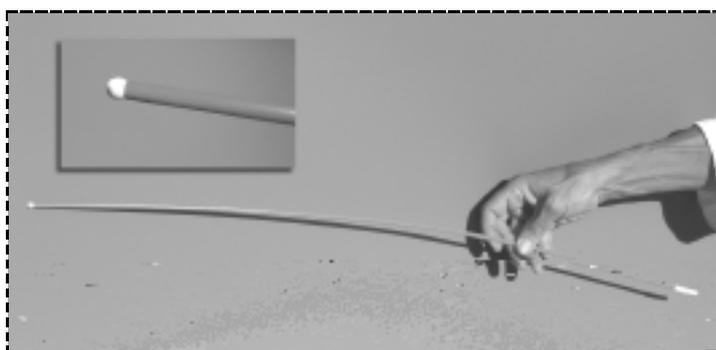
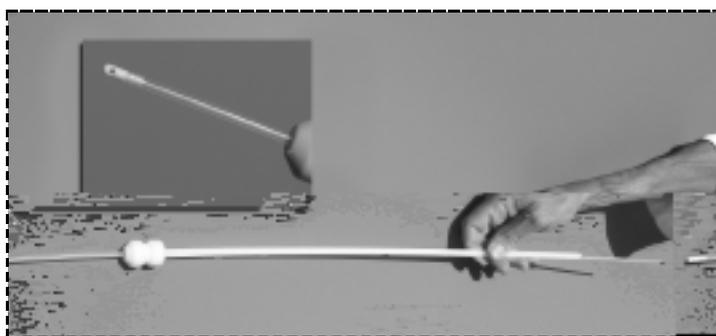
Il motivo per cui si osserva una diminuzione del reflusso con l'utilizzo di cateteri per la fecondazione post-cervicale, è la deposizione della dose in un luogo più avanzato rispetto alla cervice; inoltre, è stato dimostrato come la riduzione del volume della dose sia proporzionale alla diminuzione del reflusso (Mathijs *et al.*, 2003).

Un problema legato invece all'utilizzo di queste tecniche è l'introduzione difficoltosa del catetere o l'impossibilità di passare le pliche cervicali in un certo numero di soggetti, anche se la percentuale di emorragie riscontrate è piuttosto bassa (Watson e Behan, 2002).

Disegno sperimentale

Il progetto si è posto come scopo principale il confronto delle performance produttive e riproduttive di scrofe fecondate con diverse tecniche di inseminazione. Queste tecniche differiscono tra loro per sede di deposizione e quantità di materiale seminale impiegato. Sebbene il disegno sperimentale del progetto prevedesse in origine un confronto tra la tecnica tradizionale di fecondazione artificiale e 2 tecniche innovative di fecondazione intrauterina (Deepgoldenpig™ e Firflex®), una terza tecnica è stata aggiunta (Magaplustm) in quanto ritenuta meritevole di indagine per caratteristiche intrinseche al catetere e alla profondità di inseminazione.

Nella prima fase della sperimentazione, per meglio definire le tipologie e le caratteristiche delle aziende stesse, e dato l'alto numero di allevamenti coinvolti, sono state raccolte informazioni generali tramite una scheda appositamente elaborata. Un totale di 33 aziende, la maggior parte a ciclo chiuso, distribuite nelle province di Bergamo, Pavia, Milano e Lodi sono state implicate nelle attività previste. Le aziende sono state scelte, oltre che su base geografica, anche in funzione di una omogenea distribuzione per dimensione e secondo il grado di accettabilità dell'esperimento da parte dell'imprenditore e del personale addetto. A questo scopo sono stati organizzati 3 incontri preliminari (sede di Lodi dell'APA Milano e Lodi, sede dell'APA Bergamo e sede dell'UOFAA Pavia) per illustrare le



finalità del progetto ed il suo disegno sperimentale. Alla fine di ciascun incontro, sono state raccolte le adesioni delle aziende che successivamente hanno partecipato alla prova.

TABELLA 1: Numero e dimensione delle aziende coinvolte nella sperimentazione

Aziende (n°)	Dimensioni
5	Piccole (<200 scrofe)
14	Medie (200-400 scrofe)
14	Grandi (>400 scrofe)

Per ciascun tipo di tecnica valutata e per ogni allevamento è stato identificato un gruppo di 15 scrofe pluripare in buono stato di salute e che non avessero mostrato precedenti problemi riproduttivi, da fecondare su calore naturale nel post-svezzamento. La genetica degli animali impiegati nella prova era caratterizzata da ibridi aziendali, ibridi commerciali e linee pure; la scelta delle scrofe e la loro assegnazione ai diversi gruppi sperimentali è stata totalmente casuale. In ogni azienda sono stati composti 3 gruppi sperimentali e le fecondazioni sono state effettuate in 2 diversi periodi dell'anno (settembre 2003 e marzo 2004) nelle stesse aziende e dal medesimo personale. Per limitare eventuali influenze stagionali inoltre, si è voluto imporre che il periodo sperimentale non fosse superiore alle 3 settimane. A questo proposito, vale la pena ricordare che la durata di ciascun periodo è stata forzatamente allungata da 1 a 3 settimane, vista l'impossibilità di identificare allevamenti che svezzassero almeno 45 scrofe settimanalmente.

Il disegno sperimentale prevedeva quindi di costituire i gruppi come qui di seguito dettagliato.

TABELLA 2: Caratteristiche dei gruppi sperimentali e delle tecniche di fecondazione impiegate

Gruppi	N.° animali	Tipo di fecondazione	Catetere impiegato	Dose ml/conc.
1	15	Tradizionale	Spirale, Spugna, Melrose	80/3x10 ⁹
2	15	Post- cervicale	Deepgoldenpig™	40/1,5x10 ⁹
3	15	Post- cervicale	Magaplustm™	40/1,5x10 ⁹
4	15	Profonda	Firflex®	10/150x10 ⁶

golo intervento fecondativo.

Il seme utilizzato per le fecondazioni dei gruppi 1, 2 e 3 è sempre stato prelevato e confezionato in azienda, eccetto in 7 allevamenti nei quali si è fatto ricorso a seme acquistato. Per garantire che la qualità del materiale seminale aziendale avesse caratteristiche quali-quantitative minime, il seme è stato preventivamente analizzato presso i laboratori dell'Istituto di Zootecnica. Per le fecondazioni del gruppo 4 invece, il materiale seminale è stato prelevato in azienda e successivamente analizzato, diluito e confezionato presso i laboratori dell'Istituto di Zootecnica per essere comunque impiegato in giornata.

Apposite schede sono state concepite per raccogliere le informazioni inerenti i dati di ciascuna azienda, la carriera riproduttiva pregressa degli animali e le informazioni relative alle fecondazioni effettuate nell'ambito del piano sperimentale. I risultati così ottenuti sono stati elaborati con il pacchetto statistico SAS (SAS/STAT, 2000), mediante analisi della varianza a modello lineare.

Il materiale seminale per l'inseminazione intrauterina

Disporre di materiale seminale controllato è una condizione indispensabile per il successo dell'inseminazione artificiale; in un programma di F.A. quindi, tutte le pratiche di raccolta, manipolazione e analisi del seme rivestono massima importanza.

La necessità di utilizzare dosi di materiale seminale con caratteristiche adeguate è ancor più rilevante quando si adotta una tecnica di inseminazione intrauterina. Benché sia stato dimostrato come l'impiego di "dosi a bassa concentrazione" non interferisca sulla fertilità, la qualità del materiale seminale di partenza è un presupposto fondamentale per il successo delle inseminazioni. La "dose a bassa concentrazione" può risultare insufficiente a raggiungere buoni livelli di prolificità in rapporto alla strategia di inseminazione e alla qualità del materiale seminale (Mezalira *et al.*, 2003, Bennemann *et al.*, 2003). I risultati positivi e il risparmio economico sono sicuramente dei vantaggi a favore della sicurezza e affidabilità di queste tecniche, anche se un punto critico riguarda la netta riduzione del materiale seminale da utilizzare.

Sono state quindi effettuate una valutazione quali-quantitativa e un'analisi microbiologica del materiale seminale

Le tecniche fecondative a confronto sono state effettuate volutamente ed esclusivamente dal personale aziendale, tenendo presente che per alcune di esse si è resa necessaria una dimostrazione pratica preliminare effettuata presso la sede UOFAA ed un eventuale intervento (da parte del personale dell'Istituto di Zootecnica e/o dei tecnici delle ditte produttrici dei cateteri) presso l'allevamento.

Per ciascun tipo di tecnica valutata e per ogni allevamento è stato identificato un gruppo di 15 scrofe pluripare in buono stato di salute e che non avessero mostrato precedenti problemi riproduttivi, da fecondare su calore naturale nel post-svezzamento. La genetica degli animali impiegati nella prova era caratterizzata da ibridi aziendali, ibridi commerciali e linee pure; la scelta delle scrofe e la loro assegnazione ai diversi gruppi sperimentali è stata totalmente casuale. In ogni azienda sono stati composti 3 gruppi sperimentali e le fecondazioni sono state effettuate in 2 diversi periodi dell'anno (settembre 2003 e marzo 2004) nelle stesse aziende e dal medesimo personale. Per limitare eventuali influenze stagionali inoltre, si è voluto imporre che il periodo sperimentale non fosse superiore alle 3 settimane. A questo proposito, vale la pena ricordare che la durata di ciascun periodo è stata forzatamente allungata da 1 a 3 settimane, vista l'impossibilità di identificare allevamenti che svezzassero almeno 45 scrofe settimanalmente.

Le inseminazioni tradizionali e post-cervicali sono state eseguite seguendo il programma delle fecondazioni di ciascuna azienda, mentre per il metodo Firflex® è stato effettuato un sin-

proveniente dalle aziende coinvolte, antecedentemente entrambi i periodi della sperimentazione. Sono stati testati in totale 153 campioni di seme suino, di cui 89 per la prima prova e 64 per la seconda. Contestualmente si sono raccolte informazioni circa la situazione generale dei laboratori aziendali, il loro equipaggiamento e il loro stato igienico, classificando i 26 allevamenti coinvolti in tre categorie: condizioni generali ed equipaggiamento buoni (21,6%), medi (31,4%) e scarsi (47,1%).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il 77,8% dei campioni analizzati possedeva i requisiti minimi necessari a garantire la preparazione di dosi di materiale seminale sufficientemente efficaci. I campioni (n. 34) che non sono stati ritenuti accettabili possedevano almeno uno dei seguenti parametri:

- motilità di massa inferiore al 50%,
- vitalità inferiore al 60%,
- elevata incidenza di anomalie morfologiche, in particolare gocce citoplasmatiche superiori al 20% e altre anomalie superiori al 10%.

Un solo campione è risultato azoospermico (assenza completa di gameti) e quindi giudicato inaccettabile; non si è invece effettuata alcuna selezione in funzione della concentrazione di spermatozoi in quanto tale parametro determina il numero di dosi ottenibili da ciascun eiaculato. Il 10,5% dei campioni analizzati ha riportato comunque una concentrazione inferiore a $100 \times 10^6/ml$, limite sotto il quale se ne sconsiglia l'utilizzo per la diluizione.

I risultati ottenuti dall'analisi del materiale seminale dei campioni giudicati accettabili per la preparazione delle dosi sono riassunti in Tabella 3.

TABELLA 3: Analisi preliminare dei campioni di materiale seminale

Volume	Concentrazione	Totale spermatozoi	Motilità	Vitalità
ml	$\times 10^6/ml$	$\times 10^9$	%	%
228±92	359±200	76±42	75±7	83±6
(34÷700)	(84÷961)	(9÷272)	(50÷85)	(60÷95)

Sono indicate le medie e le deviazioni standard e i valori minimi e massimi (tra parentesi) dei parametri considerati.

Per quanto riguarda le anomalie morfologiche, non si è evidenziata alcuna correlazione tra l'incidenza di queste e il periodo sperimentale. Questo nonostante l'estate molto calda e la nota influenza dello stress termico sull'incidenza di alcune anomalie spermatiche come la presenza

di gocce citoplasmatiche (A.A.V.V., 1998). Il totale dei campioni con percentuali di anomalie tali da favorirne l'eliminazione è stata del 15,8% (7,2% nel primo periodo e 8,6% nel secondo).

Per quanto riguarda invece la contaminazione batterica, il 62,5% dei campioni è risultato sterile, il 16,4% presentava una contaminazione da germi ambientali, l'8,5% da batteri di origine fecale, l'11,2% presentava batteri considerati patogeni e l'1,3% batteri di origine mista. Fonti bibliografiche (Althouse *et al.*, 2000) riportano che la contaminazione microbica e la motilità

degli spermatozoi sono correlati, anche nel nostro caso è stata evidenziata tale correlazione, seppur statisticamente non significativa. Va considerato infatti che la contaminazione microbica influenza i parametri qualitativi del seme, solo quando la carica batterica è molto elevata.

TABELLA 4: Risultati dell'analisi microbiologica del materiale seminale

Campioni (%)	Tipo di contaminazione				
	Assente	Ambientale	Fecale	Patogena	Mista
Accettabili	46,7	11,8	7,2	11,2	0,7
Non accettabili	15,8	4,6	1,3	-	0,7
Totale	62,5	16,4	8,5	11,2	1,4

Risultati: confronto tra la tecnica tradizionale e le tecniche post-cervicali

Come precedentemente descritto, la prova sperimentale è stata preceduta da incontri dimostrativi con gli allevatori che volontariamente si sono resi disponibili ad effettuare la sperimentazione. Nonostante in un primo momento i tecnici aziendali avessero recepito l'applicazione delle metodiche senza cogliere alcuna difficoltà, nel momento operativo alcuni di essi hanno trovato oggettive difficoltà nell'utilizzo dei nuovi cateteri. In particolare il catetere Magaplustm, essendo sprovvisto di un dispositivo di aggancio alla cervice, è stato rifiutato da 8 allevatori; infatti, tale metodica richiede una formazione degli operatori diversa da quella tradizionalmente impartita. Per analoghi motivi, il catetere Deepgoldenpigtm è stato ben accolto dagli allevatori in quanto la metodica si discosta molto poco da quella tradizionale, permettendo, con una piccola manualità aggiuntiva, di depositare il materiale seminale in sede più profonda.

Nonostante il rifiuto immediato da parte di alcuni allevatori, quelli che successivamente hanno aderito al programma sperimentale non hanno riscontrato particolari problemi nell'applicazione delle tecniche; infatti, se per la meto-

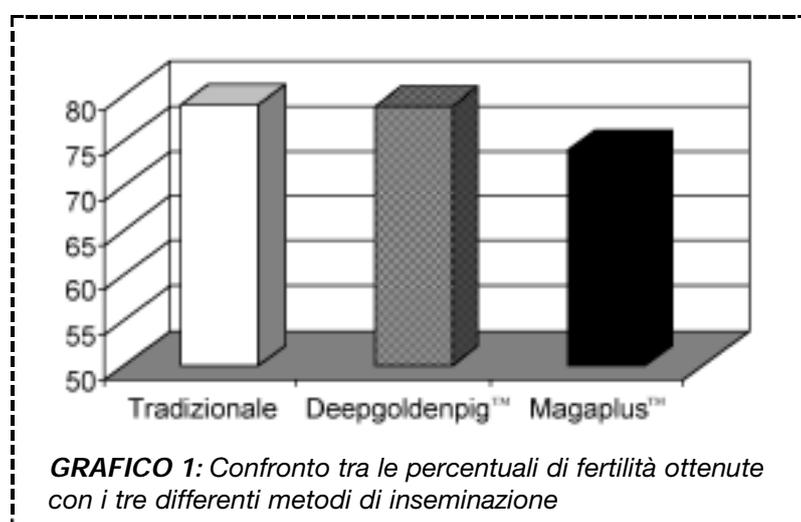
dica tradizionale i risultati mostrano un 3% di fecondazioni non pienamente riuscite, per le altre i valori sono del 5,1% e 5,4%, rispettivamente per il catetere Deepgoldenpig™ e Magaplus™. A questo proposito, anche Watson e Behan (2002), nella loro prova sperimentale, avevano concluso che l'inseminazione post-cervicale si era rilevata essere una tecnica semplice, efficace, sicura e facilmente applicabile al settore suinicolo.

Va considerato che quegli allevatori che hanno ben recepito l'una o l'altra tecnica, hanno proseguito ad utilizzare la metodica anche successivamente al periodo sperimentale.

Per entrambe le tecniche post-cervicali, in un esiguo numero di animali sono state rilevate tracce di sangue sul catetere, senza però determinare serie conseguenze sulla fertilità. Infatti, il rischio di danneggiare l'apparato riproduttore si ha solo se, incontrata una resistenza, il catetere viene spinto con forza. Dai nostri risultati è apparso come questa evenienza sia più probabile con l'utilizzo del sondino nella tecnica introdotta da IMV, probabilmente a causa della sua rigidità e della sua dimensione, che permette comunque il passaggio attraverso la cervice anche quando questa non è perfettamente dilatata.

Per quanto riguarda i parametri riproduttivi analizzati, la percentuale di fertilità non ha mostrato un'influenza significativa della metodica impiegata; in altre parole, anche se la tecnica Magaplus™ ha riportato valori leggermente inferiori alle altre due tecniche, in linea generale è possibile affermare che i risultati sono sostanzialmente paragonabili.

Nel dettaglio, sono risultate gravide il 79,1% delle scrofe inseminate con il catetere tradizionale, il 78,8% di quelle inseminate con il catetere Deepgoldenpig™ e il 73,9% di quelle inseminate con il catetere Magaplus™ (Grafico 1).



L'analisi dei risultati ha invece messo in luce significative differenze ($P \leq 0,001$) tra le diverse aziende. Ciò a significare che le capacità di gestione della riproduzione e le caratteristiche intrinseche all'azienda stessa (genetica, alimentazione, ecc.) giocano, come facilmente intuibile, un ruolo fondamentale sui livelli di fertilità.

Altre variabili considerate non hanno evidenziato alcuna influenza significativa sulla fertilità, anche se è interessante notare come il catetere Magaplus™ abbia conseguito risultati migliori nel secondo periodo sperimentale (72,6% nel primo e 75,2% nel secondo), a testimonianza che per questa tecnica è indispensabile una fase di apprendimento.

Per quanto riguarda la prolificità (nati totali, vivi e morti), la variabile azienda si è dimostrata, anche in questo caso, in grado di influenzare pesantemente ($P \leq 0,001$) i risultati ottenuti. Tale variabilità sembra quindi da imputarsi alle caratteristiche proprie di ciascuna azienda, in particolare la capacità di gestione del momento riproduttivo e le potenzialità riproduttive delle scrofe. Infatti, tra i fattori in grado di determinare il fallimento di un programma di F.A, le probabilità di insuccesso sono legate non solo alla difficoltà nell'esatto rilevamento dell'estro, ma anche alla manualità che richiede l'inseminazione strumentale. È perciò necessario personale competente, in grado di eseguire operazioni mirate, seguendo una precisa ed efficace routine. Questo concetto, valido per l'inseminazione tradizionale, assume ancora più importanza nel caso dell'impiego della tecnica intrauterina.

Per quanto riguarda il numero di nati totali e di nati vivi, il tipo di fecondazione ha invece mostrato migliori risultati con l'impiego del catetere Magaplus™; valori e significatività sono espressi in tabella 5.

TABELLA 5: Medie stimate ed errore standard del numero di nati totali, vivi e morti, in funzione del tipo di catetere utilizzato

Tipo di catetere	Nati totali	Nati vivi	Nati morti
Tradizionale	11,4 ^a ±0,2	10,1 ^b ±0,2	1,2±0,1
Deepgoldenpig™	11,4 ^b ±0,2	10,3 ^{ab} ±0,2	1,0±0,1
Magaplus™	12,0 ^a ±0,2	10,7 ^a ±0,2	1,3±0,1

$a \neq b, P \leq 0,05$

Dall'analisi dei risultati è emerso infine come tutti i dati relativi ai parametri produttivi (percentuale di fertilità, numero di nati totali, vivi e morti) hanno mostrato, com'era logico aspettarsi, migliori risultati nei soggetti con ordine di parto compreso tra il terzo e il quinto, in quanto le performance riproduttive raggiungono i massimi valori in questa fase della loro carriera produttiva.

Risultati: confronto tra la tecnica tradizionale e la tecnica Firflex®

Per quanto riguarda il confronto tra la metodica tradizionale e quella intrauterina profonda (con sonda Firflex®), la

proprietà della tecnica agli interventi, si sono
Tali perplessità hanno influenzato non solo

prov, ma anche sul

prova oggettiva dell'efficacia

fettivo risultato di fertilità

scrofla

prov un'adifferenza significativa ($P < 0,01$) della
paternità di fertilità a livello

osservato da Martinez

Studio ormonale quale strumento per la fecondazione intrauterina profonda

Allo scopo di verificare una relazione tra i livelli ormonali e l'ottimizzazione della fecondazione intrauterina profonda con sonda Firflex[®], è stato effettuato uno studio che ha previsto la valutazione delle concentrazioni di estradiolo nel sangue periferico di scrofe nelle fasi proestrali ed estrali. Tale metodo di inseminazione, che prevede un solo intervento fecondativo, si è rivelato piuttosto indaginoso e ci è sembrato importante cercare di capire quale fosse il momento più opportuno per effettuare la fecondazione, in funzione della dilatazione cervicale e dell'ovulazione.

Le analisi ormonali sono state eseguite con l'intenzione di stabilire, il più precisamente possibile, il momento dell'ovulazione, al fine di effettuare l'intervento fecondativo nel momento più appropriato. Il monitoraggio ormonale in campo consentirebbe quindi una più corretta gestione degli interventi fecondativi, inseminando soltanto i soggetti prossimi all'ovulazione.

Si è proceduto perciò ad effettuare una serie di prelievi ematici a tempi determinati, al fine di analizzare le concentrazioni estrogeniche (kit VIDAS ESTRADIOL II) in scrofe dallo svezzamento alla fine dell'estro. Contestualmente, gli stessi animali sono stati fecondati con metodo Firflex[®], annotando tempistiche e facilità di introduzione dello strumento. L'apparato riproduttore della scrofa è fortemente influenzato dagli estrogeni presenti, che inducono modificazioni morfo-funzionali, favorendo la penetrazione della sonda attraverso la cervice dilatata e le pareti uterine toniche.

Benché le concentrazioni estrogeniche ritrovate siano estremamente variabili, con valori minimi che vanno da 15 a 35 pg/ml e valori massimi da 70 a 135 pg/ml, sembra che esse non influenzino l'esecuzione della manualità. Correlando l'andamento della curva degli estrogeni, il momento dell'inseminazione e l'instaurarsi della gravidanza, è emerso che la fecondazione ha avuto esito positivo in quei soggetti in cui è avvenuta nella fase decrescente della curva, dopo il picco degli estrogeni. Una valutazione più precisa ha evidenziato come nella maggior parte delle scrofe inseminate da 48 a 72 ore dopo il picco degli estrogeni la fecondazione abbia avuto successo.

La valutazione in campo delle concentrazioni di estradiolo potrebbe rivelarsi efficace nella eventuale predizione del momento più adeguato per effettuare il singolo intervento fecondativo con metodo Firflex[®], ma la titolazione del campione ematico dovrebbe essere fatta in tempo reale, in modo che l'operatore possa decidere contestualmente quando intervenire.

Considerazioni conclusive

Il progetto ha consentito di effettuare un totale di 2.260 fecondazioni di cui 782 con catetere tradizionale, 895 con catetere Deepgoldenpig[™], 498 con catetere Magaplug[™] e 85 con sonda Firflex[®]. Per la prima volta in Italia è stato possibile effettuare un confronto realmente di campo tra la tecnica tradizionale e le tecniche intrauterine di fecondazione artificiale nella specie suina. Oltre a risultati strettamente statistici dei parametri riproduttivi ottenuti con le diverse tecniche, sono state raccolte anche informazioni sul grado di accettabilità delle metodiche. Il progetto ha inoltre consentito agli allevatori coinvolti di provare queste nuove metodiche in modo assolutamente svincolato da fattori di tipo economico e commerciale.

Malgrado la tipologia delle aziende (dimensioni, grado tecnologico, preparazione del personale) che hanno aderito alla sperimentazione, sono state riscontrate alcune difficoltà nel processo di raccolta dei dati, sebbene tutte avessero a disposizione un sistema informatizzato. Evidentemente, gli allevatori potrebbero sfruttare meglio le potenzialità del sistema a loro disposizione e considerano la gestione aziendale dei dati un'operazione marginale.

Il presente progetto aveva come scopo principale la valutazione della diffusibilità in campo di alcune tecniche innovative di fecondazione artificiale in alternativa a quella tradizionale. I risultati ottenuti da questa prova sperimentale vorrebbero offrire uno strumento per orientare le scelte aziendali per quanto riguarda gli aspetti di gestione della riproduzione. In particolare, si vuole focalizzare l'attenzione sui seguenti punti cardine.

Performance riproduttive

In linea generale la nostra prova ha evidenziato come le tecniche di F.A. post-cervicale diano risultati paragonabili, sotto il profilo della fertilità e della prolificità alla tecnica tradizionale. Va ricordato che a parità di performance le tecniche intrauterine prevedono l'impiego di una dose pari alla metà di quella impiegata nella tecnica tradizionale. Si tratta quindi di nuove metodologie che possono essere adottate senza compromettere le performance produttive, sebbene altre considerazioni debbano essere valutate, prima di optare per tale alternativa.

Per quanto riguarda invece la tecnica intrauterina profonda, i risultati generali non sono stati incoraggianti, tuttavia si è evidenziato un netto miglioramento nel secondo periodo sperimentale, in seguito alla confidenza che l'allevatore aveva acquisito con la metodica. Se ciò è vero per la fertilità, non altrettanto si può affermare per la prolificità, che si è dimostrata sempre molto bassa, anche se pienamente concorde con quanto citato dalle fonti bibliografiche (Martinez *et al.*, 2002). Dal momento che i risultati ottenuti non sono compatibili con una normale produttività aziendale, crediamo che tale tecnica possa avere un impiego limitato a fini sperimentali o per particolari esigenze.

Training

Un fattore fondamentale per la riuscita di un programma di fecondazione che preveda queste metodiche è rappresentato dalla formazione tecnica preliminare degli addetti alla F.A. Infatti, gli inconvenienti derivati da una cattiva applicazione della tecnica diminuiscono rapidamente con l'apprendimento, che per alcuni è risultato immediato e relativamente facile, per altri è sembrato tanto complesso da portare ad un completo rifiuto. Le capacità di recepire la novità è stata proporzionale al grado di formazione del personale e di affidabilità dello stesso.

Economicità

Nel contesto economico aziendale, il costo del catetere rappresenta una voce importante con cui l'allevatore si confronta direttamente. Per questo motivo, l'attuale costo dei cateteri per inseminazione intrauterina ha scoraggiato alcuni allevatori a continuarne l'utilizzo, in quanto a parità di risultati non vedevano la necessità di sostenere spese più elevate.

Il vantaggio legato all'utilizzo di una dose ridotta e del conseguente risparmio legato al costo dose non è stato adeguatamente valutato; infatti, nella maggior parte dei casi, si tratta di allevamenti che impiegano materiale seminale aziendale e non comprendono il potenziale risparmio legato alla riduzione del numero dei verri riproduttori.

Solo nei casi in cui si prevedeva una gestione a bande dell'allevamento, si è ipotizzato un reale interesse nei confronti dell'opportunità fornita da queste tecniche nell'aumentare il numero di dosi prodotte per eiaculato.

Se è vero che queste tecniche potrebbero consentire una diminuzione del tempo dedicato ad ogni singolo intervento fecondativo, grazie ad un rapido deflusso del materiale seminale, le difficoltà riscontrate nell'introduzione dei cateteri da alcuni allevatori hanno appiattito tale beneficio, soprattutto nel primo periodo sperimentale.

Tale principio risulta ancor più valido se applicato al metodo Firflex® al quale, ad un alto costo del prodotto, si associa la difficoltà di preparare in allevamento dosi alla concentrazione prevista.

Bibliografia

A.A.V.V., 1998. The swine inseminators' handbook. Ed. R. Cronje, p.106.

Althouse G.C., Kuster C.E., Clark S.G. e Weisiger R.M., 2000. Field investigation of bacterial contaminants and their effect on extended porcine semen. *Theriogenology*, **53**, p.1167-1176.

Belstra B., 2002. Intrauterine (transcervical) and fixed-time artificial insemination in swine: a review. *Swine news*, **25**:02, da <http://mark.asci.ncsu.edu>.

Bennemman P.E., Milbradt E., Diehl G.N., Vidor R., Fries H.C.C., Bernardi M., Wentz I. e Bortolozzo F.P., 2003. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas su metidas à inseminação intrauterina com uno e 2x10 espermatozoides em diferentes intervalos perovulatorio. XI Congresso Brasileiro de Veterinari Especialisti in Suini, p.211-212.

Bonadonna T., 1974. Riproduzione Animale e Fecondazione Artificiale. Ed Utet., p.621.

Caussou B., 2002. IMV - L'IA intra-uterine ouvre des prospectives. *PORC magazine*, **352**, p.94.

Châtillon G., 2002. Avec Kobideep, l'IA profonde accessible. *PORC magazine*, **351**, p.68-71.

Fiocchi D., 2003. Aggiornamenti sulla F.A.. *Rivista di Suinicoltura*, **6**, p.19.

Foote R. H., 1999. Artificial insemination from the origins up to today. Proc. of the International Symposium "From the first artificial insemination to the modern reproduction biotechnologies: traditional ways and new frontiers of animal production", Reggio Emilia, Italy, 8-9 Ottobre, p.23-67.

Hancock J.L., 1959. Pig insemination technique, *The Veterinary Record*, **71**, p.523-527.

Holt A.F., 1959. Observations on artificial insemination of pigs. *The Veterinary Record*, **71**, p.184-187.

Hunter R.H.F., 1984. Pre-ovulatory arrest and and pery-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, **72**, p.203-211.

Krueger C., Rath D. e Johnson L.A., 1999. Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology*, **52**, p.1363-1373.

Krueger C. e Rath D., 2000. Intrauterine insemination in sow with reduced sperm number. *Reproduction and Fertility Development*, **12**, p.113-117.

Magapor, 2004. Documento aziendale interno.

- Martinez E.A., Vazquez J.M, Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parilla I., Vazquez J.L. e Day B.N., 2001. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small number of spermatozoa in sows. *Reproduction*, **122**, p.289-296.
- Martinez E.A., Vazquez J.M, Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parilla I., Vazquez J.L. e Day B.N., 2002. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*, **123**, p.163-170.
- Martinez E.A., Caamano J.N., Gil M.A., Rieke A., McCauley T.C., Cantley T.C., Vazquez J.M., Roca J., Vazquez J.L., Didion B.A., Murphy C.N., Prather R.S. e Day B.N., 2004. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, **61**, p.137-146.
- Matthijs A., Engel B. e Woelders H., 2003. Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. *Reproduction*, **125**, p.357-367.
- Mburu J.N., Einarsson S., Lundeheim N. e Rodriguez-Martinez H., 1996. Distribution, number e membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Animal Reproduction Science*, **45**, p.109-121.
- Mezalira A., Dallanora D., Schmidt A.C.T., Zilli R., Bernardi M.L., Wentz I. e Bortolozzo F.P., 2003. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas de acordo com o macho utilizado na inseminação intrauterina. XI Congresso Brasileiro de Veterinari Especialisti in Suini, p.219-220.
- Murphy R., 1998. Boar sperm on ice. *Pig Progress*, **14**:6/7, p.8-11.
- Niemann H. e Rath D., 2001. Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology*, **56**, p.1291-1304.
- Perez y Perez F., 1994. Riproduzione animale: inseminazione artificiale e trapianto embrionale. Ed. italiana a cura di G. Colombo, Piccin, Padova, p.922.
- Polge C., 1956. Artificial Insemination in Pigs. *The Veterinary Record*, **68**, p.62-76.
- Rozeboom K.J., Troedsson M.H.T. e Crabo B.G., 1998. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*, **114**, p.195-199.
- Rozeboom K. J., Reicks D. L. e Wilson M. E., 2004. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *Journal of Animal Science*, **82**, p. 2164-2168.
- SAS/STAT, 2000. Version 8, User' Guide, Sas Institute, Gary, NC, USA.
- Situazione Regionale, 2000. Da www.ersal.lombardia.it.
- Steverink D.W.B., Soede N.M., Bouwman E.G. e Kemp B., 1998. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Animal Reproduction Science*, **54**, p.109-119.
- Steverink D., 2000. Developing A.I. strategies on a farm-by-farm basis. *Pig Progress*, **16**:2, p.8-10.
- Stratman F.W. e Self H.L., 1960. Effect of semen volume and number of sperm on fertility and embryo survival in artificially inseminated gilts. *Journal of Animal Science*, **19**, p.1081-1088.
- Suarez S., Redfern K., Raynor P., Martin F. e Phillips D.M., 1991. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, **44**, p.998-1004.
- Vazquez J.M., Martinez E.A., Parrilla I., Roca J., Gil M.A. e Vazquez J.L., 2003. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, **59**, p.1605-1614.
- Watson P.F. e Behan J.R., 2002. Intrauterine insemination of sow with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, **57**, p.1683-1693.

Ringraziamenti

Si ringraziano sentitamente:

- la IMV Technologies Italia e la Magapor Italia per la concreta collaborazione,
- la Sig.ra Maria Grazia Manziagalli dell'Istituto di Zootecnica per le analisi di laboratorio del materiale seminale,
- la Dott.ssa Piera Anna Martini del DIPAV - Sez. di Microbiologia e Immunologia per gli esami microbiologici,
- l'Associazione Provinciale Allevatori di Milano e Lodi per la piena assistenza fornita,
- l'Associazione Provinciale Allevatori di Bergamo per aver contattato gli allevatori della propria provincia,
- tutti gli allevatori che hanno partecipato con entusiasmo alla sperimentazione:

All. Guerini Rocco e Gabriele - Albuzzano (PV)

Az. Agr. Sangalli Camillo - S. Cristina (PV)

Az. Agr. Dordoni Ottorino e Francesco -
Bascapè (PV)

Az. Agr. Cotta Ramusino Luigi - Vidigulfo (PV)

Az. Agr. F.lli Anselmi - Torre d'Arese (PV)

All. Buroni Ernesto - Corteolona (PV)

Az. Agr. Preda Fiorenzo e Fabrizio - Bascapè
(PV)

Az. Agr. "S. Francesco" F.lli Papetti - Pieve del
Cairo (PV)

Az. Agr. Messaggio F.lli - Ossago Lodigiano
(LO)

Az. Agr. Fiorentini Angelo e Stefano - Terranova
del Passerini (LO)

Az. Agr. "La Pagana" di Bisi e Griffini -
Mulazzano (LO)

Az. Agr. Cerri Pietro e Rinaldo - Turano
Lodigiano (LO)

Az. Agr. Bianchi Marco e Gigi - Villanesco (LO)

Az. Agr. F.lli Dossena - Pieve Fissiraga (LO)

Az. Agr. Zuffada Marcello e Romano - Borgo
San Giovanni (LO)

Az. Agr. Bosia Roberto - Casaletto Lodigiano
(LO)

Az. Agr. Tamagni Sergio - Zelo Buon Persico
(LO)

Az. Agr. Asti Pietro e Alberto - Pieve

Fissiraga (LO)

Az. Agr. Corbellini Giampiero - Pieve Fissiraga
(LO)

Az. Agr. Semenza Davide - Castiraga Vidardo
(LO)

Az. Agr. De Vizzi Giovanni Maria - Castiraga
Vidardo (LO)

Az. Agr. Vitali F.lli - Truccazzano (MI)

Az. Agr. Arrigoni Fermo - Pantigliate (MI)

Az. Agr. Benetti Guido e Carlo - Melegnano
(MI)

Az. Agr. "La Castellana" - Corbetta (MI)

Az. Agr. Sangalli Oliviero e Giorgio - S. Zenone
al Lambro (MI)

S.a.s Eurosuini di Mutti Albino - Civate al
Piano (BG)

Az. Agr. Suarda di Piantoni Gustavo - Telgate
(BG)

Az. Agr. Società Suinicola Bergamasca di
Maccali - Antegnate (BG)

Az. Agr. Venier S.s G.V. & R. - Barbata (BG)

Az. Agr. F.lli Garattini - Ghisalba (BG)

S.p.a. Arrigoni Battista - Brignano Gera d'Adda
(BG)

Az. Baruffi Alberto - Palosco (BG)

Indice

Presentazione

pag. 3

Perché occuparsi di nuove tecniche di F.A. e perché nella scrofa

pag. 4

Introduzione e scopo del progetto

pag. 5

Evoluzione della tecnica di fecondazione artificiale nella specie suina

pag. 6

L'inseminazione intrauterina

pag. 7

Disegno sperimentale

pag. 11

Il materiale seminale per l'inseminazione intrauterina

pag. 12

Risultati: confronto tra la tecnica tradizionale e le tecniche post-cervicali

pag. 13

Risultati: confronto tra la tecnica tradizionale e la tecnica Firflex®

pag. 15

Studio ormonale quale strumento per la fecondazione intrauterina profonda

pag. 16

Considerazioni conclusive

pag. 16

Riassunto

pag. 17



RegioneLombardia
Agricoltura