

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

---

# ANNALI

DELLA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA DI PISA

Volume XLIII - 1990

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE SPERMATICA  
NEL CONIGLIO: TRE METODI A CONFRONTO (\*)

SPERMATOZOA CONCENTRATION OF THE RABBIT SEMEN  
ESTIMATED BY THREE DIFFERENT METHODS

Marco BAGLIACCA, Margherita MARZONI FECIA DI COSSATO,  
Gisella PACI, Novella BENVENUTI

GIARDINI

1991

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE SPERMATICA  
NEL CONIGLIO: TRE METODI A CONFRONTO (\*)

SPERMATOOZA CONCENTRATION OF THE RABBIT SEMEN  
ESTIMATED BY THREE DIFFERENT METHODS

Marco BAGLIACCA, Margherita MARZONI FECIA DI COSSATO,  
Gisella PACI, Novella BENVENUTI

RIASSUNTO

Per la prova sono stati utilizzati venti maschi riproduttori di razza NZB allevati in due allevamenti del centro Italia. La concentrazione spermatica (79 campioni in totale) è stata determinata con tre differenti tecniche: conta diretta (camera Burker) spettrofotometria e microcentrifugazione.

I risultati hanno mostrato che, seppure entrambi i metodi indiretti possono essere utilizzati ai fini pratici per la diluizione del seme, la spettrofotometria è il metodo più affidabile. Lo studio dei coefficienti di correlazione di Spearman ha evidenziato come, per una selezione di campo della concentrazione spermatica, sia sufficiente la microcentrifugazione.

Parole chiave: coniglio, concentrazione spermatica.

SUMMARY

Twenty male rabbits, bred in two rabbitries, were used for this study. Three subsamples of each ejaculate (total 79) were used to determine the density of the semen by each procedure: Burker-camera, spectrophotometer, percent packed cell volume.

Results show that spectrophotometric technique is the best workable method. Spearman rank correlation coefficients showed that, to select rabbit for sperm concentration, it is tolerable to measure the percent packed cell volume.

Key words: rabbit, spermatozoa-concentration.

(\*) Ricerca effettuata con contributo M.P.I. 40%.

## INTRODUZIONE

La valutazione della concentrazione dello sperma di coniglio risulta indispensabile per effettuare una giusta diluizione dello sperma da impiegare in fecondazione artificiale. Mentre la fecondazione effettuata nell'ambito delle 2-3 ore dal prelievo non presenta problemi per la sopravvivenza degli spermatozoi e la diluizione può essere fatta con semplice soluzione fisiologica, la fecondazione effettuata con seme refrigerato e conservato per più di 5-6 ore necessita di un diluente «nutritivo». È quindi indispensabile una giusta diluizione dello sperma per fornire agli spermatozoi con il diluente un apporto alimentare sufficiente per il tempo intercorrente fra il prelievo del seme e la fecondazione (3, 4, 5, 6, 7).

Attualmente per valutare la concentrazione degli spermatozoi sono in commercio delle apparecchiature automatizzate molto efficienti che permettono anche una valutazione obiettiva della loro motilità e della loro vitalità (8, 10, 17, 18). Tali apparecchiature hanno però un costo non indifferente e mentre possono essere utilizzate per valutare lo sperma di coniglio ai fini sperimentali e potranno essere impiegate in futuro per la valutazione del seme congelato, sono difficilmente accessibili ai piccoli centri ed agli allevatori che effettuano la inseminazione artificiale. Spesso, negli allevamenti e nei centri di produzione del seme, la motilità e vitalità degli spermatozoi viene valutata secondo metodiche che parametrizzano osservazioni soggettive (1, 2, 7) e la concentrazione dello sperma viene stimata, o soggettivamente, senza neppure utilizzare possibili scale di paragone (13), o tramite semplici conte effettuate a campione, riducendo al minimo il numero di riquadri della camera di Burker contati per velocizzare le operazioni il più possibile.

L'enorme quantità di lavoro noioso che richiede l'effettuazione della conta diretta ha già indotto in passato i ricercatori a sviluppare metodi indiretti per la stima della concentrazione (9, 10, 12, 15, 16). Le tecniche turbidimetriche, che misurano l'opacità delle sospensioni, le tecniche spettrofotometriche che utilizzano la rilevazione dell'assorbimento a particolari lunghezze d'onda, e la microcentrifugazione, che impiega la centrifuga per il microematocrito, sono certamente le metodiche più semplice e più veloci da utilizzare in alternativa alla conta diretta (9, 10, 11, 12, 15, 16).

In considerazione di quanto sopra, con il presente studio si è voluto investigare anche nel coniglio le relazioni che intercorrono fra la conta diretta degli spermatozoi e due metodi indiretti di stima della concentrazione del seme: la densità ottica e la microcentrifugazione.

## MATERIALI E METODI

Per la prova sono stati utilizzati venti conigli maschi di razza NZB allevati in due diversi piccoli centri attrezzati per il prelievo del seme (dieci conigli per ciascun allevamento).

In ciascun allevamento i maschi erano alloggiati in gabbie individuali ed erano stati abituati al prelievo del seme mediante la tecnica della vagina artificiale (1).

I campioni di sperma sono stati prelevati durante il periodo marzo-novembre 1990.

Ciascun campione di seme, previa asportazione del tappo mucoso, qualora fosse stato presente, è stato omogeneato mediante ripetuto capovolgimento della provetta di raccolta e quindi diviso in tre sottocampioni.

Tutte le operazioni di raccolta e di campionamento sono state effettuate nell'arco di un'ora e tutte le determinazioni sono state fatte entro i successivi trenta minuti.

Le tecniche impiegate per la determinazione della concentrazione degli spermatozoi sono state le seguenti:

### *Tecnica citometrica*

Il numero di spermatozoi in un millimetro cubo di sperma è stato stimato per mezzo di una camera Burker. Una goccia di sperma è stata diluita all'1% (allo 0,5% o 0,25% i campioni più densi) mediante una soluzione di NaCl 3% capace di uccidere gli spermatozoi. Sono stati quindi contati gli spermatozoi presenti in 40 quadratini della camera Burker seguendo la procedura di conteggio descritta in un precedente lavoro (1). Per la stima della riproducibilità dei risultati, lo sperma è stato pipettato con due diverse pasteur e sono state effettuate due conte per ciascun campione.

### *Tecnica di microcentrifugazione*

Anche in questo caso sono stati preparati due capillari per ogni eiaculato. Il seme è stato aspirato per capillarità in un microtubo da ematocrito e quindi un lato del capillare è stato sigillato con la plastilina. I capillari così preparati sono stati posti in un microematocrito (10.000 giri/minuto per 10 minuti) e dopo la centrifugazione la percentuale di sedimento è stata calcolata utilizzando la scala grafica fornita con la centrifuga che permette una lettura diretta della percentuale di sedimento

senza la standardizzazione del quantitativo di seme di ogni capillare. La tecnica è stata essenzialmente la stessa descritta già nel 1958 per il seme bovino (11).

### *Tecnica della spettrofotometria*

Due campioni di 0,05 ml per ciascun eiaculato sono stati sottoposti a tre diluizioni con soluzione fisiologica: 1:50, 1:100 e 1:200 e la densità ottica di ciascuna cuvetta è stata misurata a due diverse lunghezze d'onda: 430 m $\mu$  e 600 m $\mu$  con uno spettrofotometro LKB Ultrospec 4050.

La stima della riproducibilità di ciascun metodo di misura della concentrazione spermatica è stata effettuata mediante la correlazione dei due sottocampioni di ciascun eiaculato per ciascun metodo di conteggio, mentre le equazioni di regressione lineare fra le diverse tecniche di misurazione sono state calcolate usando la media dei due sottocampioni determinati con ciascun metodo.

## RISULTATI

I valori medi stimati e i coefficienti di variazione (basati sulla variazione fra le due replicazioni) relativi alla densità ottica, alla microcentrifugazione e alla conta diretta sono riportati nella tabella n. 1.

TABELLA 1 - Valori medi e coefficienti di variazione della concentrazione spermatica determinata tramite la conta diretta, la microcentrifugazione e la spettrofotometria.  
(Coefficienti di variazione calcolati sulla varianza delle due sottocampionature di ciascun eiaculato).

METODO DI STIMA DELLA CONCENTRAZIONE SPERMATICA		VALORE MEDIO	C.V.
CONTA DIRETTA		251,59	22,9%
MICROCENTRIFUGAZIONE		6,55	17,5%
SPETTROFOTOMETRIA			
430m $\mu$	1:50	0,65	4,1%
	1:100	0,37	12,2%
	1:200	0,24	12,7%
600m $\mu$	1:50	0,50	9,1%
	1:100	0,28	12,8%
	1:200	0,18	14,4%

Come si può osservare, i coefficienti di variazione relativi alla conta diretta (camera Burkner) sono più elevati di quelli relativi sia al metodo di microcentrifugazione che quello della spettrofotometria. La tecnica spettrofotometrica in particolare mostra, alle due lunghezze d'onda considerate, dei coefficienti di variazione di poco superiori al 10% alle diluizioni maggiori ed inferiori a tale valore alla diluizione più bassa.

I risultati dell'analisi dei minimi quadrati, effettuata sui valori di concentrazione determinati con i tre metodi di stima della concentrazione spermatica, sono riportati nella tabella n. 2.

TABELLA 2 - Effetto delle differenti fonti di variazione sulla concentrazione spermatica determinata tramite la conta diretta, la microcentrifugazione e la spettrofotometria.

FONTI DI VARIAZIONE	CONTEGGIO DIRETTO	MICRO CENTRIFUGAZIONE	DENSITÀ OTTICA
ALLEVAMENTO	NS	NS	NS
INDIVIDUO	**	**	**
STAGIONE	*	*	*

\* effetto significativo per  $P < 0,05$ ; \*\* effetto significativo per  $P < 0,01$ ; NS effetto non significativo.

Come si può notare gli allevamenti non sono differiti statisticamente fra di loro e si sono evidenziate delle differenze sia fra gli individui che fra i valori osservati mensilmente per lo stesso soggetto. Tali risultati confermano ulteriormente quanto osservato in altre esperienze nelle quali è stata sottolineata la notevole variabilità individuale della qualità dello sperma e la grande influenza che ha la stagione su questo parametro (1, 2).

Ai fini di valutare la riproducibilità delle diverse metodiche adottate, sono stati riportati nella tabella n. 3 i coefficienti di correlazione fra i sottocampioni di ciascun eiaculato relativi alla conta diretta, alla microcentrifugazione e alla spettrofotometria.

TABELLA 3 - Riproducibilità della concentrazione spermatica determinata con la conta diretta, la microcentrifugazione e la spettrofotometria.

METODO DI STIMA DELLA CONCENTRAZIONE SPERMATICA		R <sup>2</sup>
CONTA DIRETTA		0,889
MICROCENTRIFUGAZIONE		0,850
SPETTROFOTOMETRIA		
430m $\mu$	1:50	0,996
	1:100	0,979
	1:200	0,979
600m $\mu$	1:50	0,994
	1:100	0,986
	1:200	0,976

La riproducibilità calcolata per le diverse misure effettuate con la spettrofotometria è risultata più elevata sia di quella ottenuta con la conta diretta che di quella calcolata sulle misure ottenute per microcentrifugazione. Il basso valore di riproducibilità da noi osservato con la conta diretta può essere in parte dovuto al fatto che sono stati contati solo 40+40 quadratini rispetto agli ottanta ritenuti il numero ottimale (1, 6).

Le correlazioni fra i diversi metodi di valutazione della concentrazione degli spermatozoi (tabella n. 4) sono risultate tutte significative.

TABELLA 4 - Valori dell'intercetta, del coefficiente angolare e del coefficiente di correlazione determinati fra la conta diretta e le tecniche indirette.

VARIABILE DIPENDENTE	VARIABILE INDIPENDENTE	a	b	R <sup>2</sup>	
	MICROCENTRIFUGAZIONE	- 10,9	+ 41,3	0,88	
	SPETTROFOTOMETRIA				
CONTA DIRETTA	430m $\mu$	1:50	+ 36,1	+306,3	0,91
	"	1:100	+112,2	+329,8	0,82
	"	1:200	+132,7	+419,6	0,78
	600m $\mu$	1:50	+ 66,4	+314,7	0,89
	"	1:100	+126,5	+345,8	0,82
	"	1:200	+139,8	+503,5	0,77

Le più alte correlazioni sono state comunque ottenute fra le diverse densità ottiche e la conta diretta. Sebbene entrambi i metodi di valutazione indiretta (spettrofotometria e microcentrifugazione) appaiono sufficientemente attendibili da un punto di vista pratico, le tecniche spettrofotometriche risultano più precise.

Nell'ambito delle misure spettrofotometriche, la migliore stima della concentrazione degli spermatozoi è stata da noi osservata operando con una diluizione di 1:50 e leggendo i campioni a 430m $\mu$ .

I valori ricavati dalla matrice dei coefficienti di correlazione di Spearman sono riportati nella tabella n. 5. Come si può notare tutti i valori sono risultati molto alti. Conseguentemente gli errori di posizionatura in graduatoria che si effettuano misurando la concentrazione spermatica con i mezzi indiretti potrebbero essere accettabili anche ai fini di un miglioramento genetico rivolto alla concentrazione spermatica, soprattutto tenendo conto della rapidità e semplicità di esecuzione consentita dai metodi indiretti.

TABELLA 5 - Valori dei coefficienti di correlazione per ranghi (Spearman rank correlation coefficient) determinati fra la conta diretta e le tecniche indirette.

METODO DI STIMA DELLA CONCENTRAZIONE SPERMATICA		CONTA DIRETTA
MICROCENTRIFUGAZIONE		0,878
SPETTROFOTOMETRIA		
430m $\mu$	1:50	0,888
	1:100	0,857
	1:200	0,850
600m $\mu$	1:50	0,897
	1:100	0,852
	1:200	0,873

## CONCLUSIONI

Entrambe le tecniche di stima indiretta della concentrazione spermatica risultano adeguate per una valutazione «di campo» della concentrazione. L'impiego di tali semplici tecniche evita di effettuare la conta diretta che è non solo noiosa e fastidiosa per la vista ma anche causa di



notevoli perdite di tempo. D'altro canto, la stima indiretta può essere migliore oltre che più efficiente di quella diretta se, per «guadagnare» tempo, si riduce il numero di quadratini contati. Non va dimenticato che nella nostra prova le regressioni sono state calcolate sulle medie delle due stime fatte per ciascun campione di eiaculato e quindi considerando ottanta quadratini per ciascuna lettura. La riproducibilità fra le due misurazioni effettuate con le diverse tecniche non è risultata molto elevata nel caso della conta diretta (0,889) e della microcentrifugazione (0,850), mentre è risultata molto elevata nel caso delle procedure indirette per spettrofotometria (valore minimo 0,976 nel caso della diluizione 1:200 misurata a 600 m $\mu$ ). Ciò indica che mentre per la conta diretta non è opportuno ridurre il numero di quadratini contati e per la microcentrifugazione è utile utilizzare la media di due letture, per le misurazioni con lo spettrofotometro si può anche evitare di fare la doppia lettura. In quest'ultimo caso la doppia lettura effettuata sullo stesso campione a tempi diversi, previa l'apportazione di piccole modifiche allo spettrofotometro, potrebbe essere utile anche come riscontro alle osservazioni soggettive sulla motilità (14). L'utilizzazione dei metodi indiretti sembra poi accettabile anche ai fini di un intervento selettivo volto ad aumentare la concentrazione spermatica dei soggetti da utilizzare in F.A.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) BAGLIACCA M., CAMILLO F., PACI G. (1987) - Temperatura e performance di conigli maschi riproduttori. *Riv. di Coniglicoltura* 24 (10): 61-65.
- 2) BATTAGLINI M., COSTANTINI F. (1985) - Caratteristiche dello sperma di coniglio in rapporto al ritmo riproduttivo e alla stagione. *Atti 6° Con. A.S.P.A.* 449-454.
- 3) BATTAGLINI M., COSTANTINI F., CASTELLINI C. (1988) - Fecondazione artificiale del coniglio con sperma refrigerato e congelato. *Zoot. Nutr. Anim.* 14: 267-271.
- 4) CASTELLINI C., COSTANTINI F., BATTAGLINI M. (1988) - Fecondazione artificiale del coniglio. *Riv. di Coniglicoltura* 25 (7): 45-47.
- 5) COSTANTINI F. (1988) - F.A. nel coniglio, sistemi di conservazione dello sperma. *Riv. di Coniglicoltura* 26 (4): 14-18.
- 6) DERIVAUX J. (1975) - Riproduzione negli animali domestici II. Il maschio. *Inseminazione artificiale*. Patron ed. (Bo).
- 7) FACCHIN E., ZANIRATO M.G., GUALTIERO L., VALENTINI A. (1988) - A.I. in rabbit breeding: note 1. A.I. service for meat rabbit breedings. *4<sup>th</sup> World Rabbit Congress* (1): 121-129.
- 8) GALLI A. (1986) - Determination of concentration and morphology of bovine and swine sperm: methodological aspects. *Fertility Tribune* 3 (suppl. 1): 111-118.

- 9) GALLI A., BORNAGHI V., BALDUZZI D., MANZONI G., MAFFEO G. (1990) - Valutazione della concentrazione e della motilità del materiale seminale nella specie equina. 3° Meet. Naz. Studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico, Bergamo, 161-165.
- 10) GALLI A., BOSISIO M., ALEANDRI R. (1987) - Materiale seminale bovino per la F.A.: metodologia analitica. *Informatore Zootecnico* 7: 34-42.
- 11) HICKMAN C.G. (1958) - Spermatocrit values in facilitating the estimation of spermatozoa concentrations. *J. Dairy Sci.* 41: 318-319.
- 12) LORTON S.P., PACE M.N., SULLIVAN J.J. (1984) - Determination of spermatozoal concentration in initially extended bovine semen. 10° Int. Cong. on Animal Reprod. and Art. Ins. vol 2 paper 60, 3 pp.
- 13) MAKLER A., FISHER M., LISSAK A. (1984) - A new method for rapid determination of sperm concentration in bull and ram semen. *Thriogenology* 21 (4): 543-554.
- 14) MÜLLER K., NEHRING H. (1987) - Untersuchungen zur photometrischen Beurteilung der Spermienmotilität. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* 41 (3): 309-322.
- 15) NEHERING H., UECKERT H., ZEUNER A., HABERZETTL R., ROTHE L. (1987) - Die photometrische Bestimmung der Spermienkonzentration - eine Massnahme zur Objektivierung der Spermabeurteilung-sverfahren. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* 41 (3): 301-308.
- 16) PARKS J.E., EHRENWALD E., FOOTE R.H. (1985) - Counting mammalian spermatozoa in biological fluids. *Rabbits Cattle. Jour. of Dairy Sci.* 68 (9): 2329-2336.
- 17) RATH D., ARMBRECHT S., SCHAPP P., WEITZE K.F. (1988) - Experiences with a computerized videomicrographic system for sperm analysis. 11° Int. Cong. on Animal Repr. and Art. Ins. vol. 3 paper 288, 3 pp.
- 18) STEPHENS D.T., HICKMAN R., HOSKIN D.D. (1988) - Description, validation and performance characteristics of a new computer-automated sperm motility analysis system. *Biology of reproduction* 38 (3): 577-586.