

# ANNALI

DELLA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA DI PISA

Volume XLIV - 1991

ESTRATTO



GIARDINI

1992

## METODI DI VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE SPERMATICA NELL'ANATRA MUSCHIATA (\*)

### METHODS TO ESTIMATE MUSCOVY DRAKE SPERMATOZOA CONCENTRATION

Gisella PACI, Margherita MARZONI FECIA DI COSSATO,  
Marco BAGLIACCA, Carlotta FEDELI AVANZI

#### RIASSUNTO

Per la prova sono stati utilizzati 194 campioni di materiale spermatico prelevati, col metodo della vagina artificiale, da 7 maschi di anatra muschiata. La determinazione della concentrazione spermatica è stata effettuata con tre differenti tecniche: citometrica, spettrofotometrica e microcentrifugazione.

Dai risultati emerge che entrambe le metodiche indirette possono sostituirsi alla conta diretta per una valutazione in campo del materiale seminale. Il metodo spettrofotometrico risulta comunque più valido di quello di microcentrifugazione e, dall'analisi della correlazione per ranghi, sembra utilizzabile anche per una selezione dei riproduttori, particolarmente quando si impone di agire con rapidità. La correlazione tra il metodo diretto e quelli indiretti evidenzia comunque risultati più modesti che nei mammiferi probabilmente imputabili alla presenza di inevitabili agenti contaminanti nei campioni sottoposti ad analisi.

Parole chiave: anatra muschiata, sperma.

#### SUMMARY

Seven muscovy drakes, bred in individual cages, were used for this study. Three samples of each ejaculate (total 194) were used to determine the density of the semen by each procedure: Burkner-camera, spectrophotometer, percent packed cell volume.

Results show that spectrophotometric technique is the best workable method. A lower correlation than that observed in rabbit, probably due to cloacal contaminants, resulted between direct and indirect methods. However we can conclude that optical measurement should be used for repeated measures and when a large number of samples are involved.

Key words: muscovy drake, semen.

(\*) Ricerca effettuata con contributo M.U.R.S.T. 40%.

## INTRODUZIONE

La fecondazione artificiale, utilizzata da diversi anni in alcune specie avicole, costituisce uno dei mezzi per ridurre i costi di produzione e per superare problemi di incompatibilità fisiche e fisiologiche (ibridi interspecifici) o l'elevato dimorfismo sessuale dei riproduttori (5, 9, 10).

Il successo della fecondazione artificiale è legato alla possibilità di ottenere e mantenere nel tempo livelli di fertilità validi, per cui devono essere assicurate condizioni ottimali di allevamento dei riproduttori e di raccolta/conservazione del materiale seminale. È necessario inoltre che vengano eseguiti controlli periodici sul seme, per ricavare indicazioni attendibili sulla qualità del materiale spermatico e sulla validità riproduttiva dei maschi.

Le operazioni di valutazione del materiale seminale sono di ordine macroscopico (volume, colore etc.) e microscopico (concentrazione, motilità, etc). Negli allevamenti che impiegano la fecondazione artificiale spesso, per motivi di tempo, vengono effettuati generalmente i soli esami macroscopici all'atto del prelievo; infatti la stima della motilità e vitalità, con metodi soggettivi, e della concentrazione spermatica, mediante la conta diretta, viene effettuata solo saltuariamente a campione.

È noto che la valutazione della qualità dello sperma necessita di diverse indagini la cui concordanza permette di ottenere un giudizio oggettivo. Gli esami macroscopici da soli dunque possono fornire solo indicazioni ma non certezze sulla validità di un riproduttore.

A causa della insufficiente affidabilità dei soli metodi macroscopici, del diffondersi della inseminazione artificiale in avicoltura e dell'importanza di inseminare ogni femmina con un numero sufficiente di spermatozoi per mantenere un'alta fertilità delle uova (3), si ritiene quindi utile e auspicabile che nella pratica vengano impiegate di routine anche metodiche oggettive di stima della concentrazione spermatica. A tal fine tuttavia va rilevato che la conta diretta necessita di un notevole dispendio di tempo. Per tale motivo sono state condotte ricerche in alcune specie avicole (pollo e tacchino) per individuare metodi alternativi indiretti e rapidi di stima della concentrazione (1, 3, 4, 8, 13). Tali metodi, individuati nelle tecniche spettrofotometriche, coulter counter e di microcentrifugazione, si sono dimostrati di veloce e semplice utilizzo e, particolarmente per i primi due, in grado di fornire risultati estremamente validi (3, 4, 8, 9, 13).

In considerazione del fatto che i maschi di anatra muschiata vengono spesso utilizzati per la produzione dei mulards (incroci dell'anatra muschiata per anatra comune) facendo sempre più ricorso alla tecnica

della inseminazione artificiale, si è voluto effettuare una prova sul confronto di vari metodi di valutazione della concentrazione spermatica al fine di individuare le relazioni esistenti tra la conta diretta e due metodi indiretti di stima, la spettrofotometria e la microcentrifugazione.

## MATERIALI E METODI

Per la prova sono stati utilizzati 194 campioni di materiale spermatico prelevati col metodo della vagina artificiale (6, 7, 12) da sette maschi di anatra muschiata, allevati all'aperto in gabbie singole, a luce naturale, ed alimentati *ad libitum*.

Prima del prelievo gli animali sono stati lasciati a digiuno per 12 ore circa per limitare l'inquinamento dello sperma da parte del materiale proveniente dalla cloaca. Ogni eiaculato è stato reso omogeneo mediante agitazione della vagina artificiale e quindi suddiviso in tre campioni.

Ogni campione dello stesso eiaculato è stato valutato con una diversa tecnica per la determinazione della concentrazione degli spermatozoi:

- tecnica citometrica
- tecnica di microcentrifugazione
- tecnica di spettrofotometria.

Per la descrizione dettagliata delle suddette tecniche si rimanda a quanto riportato in una nostra precedente esperienza effettuata sullo sperma di coniglio, dalla quale la presente prova differisce per la sola diluizione impiegata nella tecnica citometrica (2); lo sperma infatti è stato diluito 1:500 mediante soluzione di NaCl 3%.

Analogamente alla nostra precedente prova (2), i valori sono stati espressi in numero nemaspermi  $\times 10^6/\text{ml}$ .

La stima della riproducibilità per ciascun metodo di valutazione è stata effettuata correlando le letture relative a due sottocampioni di ciascun campione di eiaculato per ogni tecnica di misurazione; le equazioni di regressione lineare fra le diverse tecniche sono state calcolate usando la media dei valori ottenuti dalla lettura delle due sottocampionature per ogni metodo di conteggio.

## RISULTATI

Nella tabella I vengono riportati, per ciascun metodo di valutazione, le medie stimate ed i coefficienti di variazione, calcolati sulla varianza di due replicazioni.

TABELLA 1 - Medie stimate e coefficienti di variazione della concentrazione spermatica determinata con le varie tecniche di misurazione. (Coefficienti di variazione calcolati sulla varianza di due sottocampionature di ciascun eiaculato).

METODO DI VALUTAZIONE	MEDIA STIMATA	COEFF. DI VARIAZIONE
CONTA DIRETTA	2.081	12,84%
MICROCENTRIFUGAZIONE	5,82	7,89%
SPETTROFOTOMETRIA		
430m $\mu$ 1:50	0,77	1,45%
1:100	0,49	2,45%
1:200	0,29	4,36%
600m $\mu$ 1:50	0,67	1,63%
1:100	0,36	3,00%
1:200	0,20	4,10%

La conta diretta ha fatto registrare un numero medio di spermatozoi pari a  $2.081 \times 10^6/\text{ml}$  in accordo con i valori rilevati in altre esperienze sull'anatra muschiata (6, 12). Il coefficiente di variazione più elevato (12,84%) è risultato, come già osservato nel caso del pollo e del tacchino, quello fornito dalla conta diretta confermando la scarsa accuratezza di tale tecnica (3, 4, 8, 13). La variabilità del coefficiente di variazione fra due letture dello stesso campione aumenta inoltre notevolmente nel caso si impieghino diluizioni superiori a quella da noi utilizzata: infatti altri autori con diluizioni pari a 1:2.000 hanno osservato coefficienti di variazione che oscillavano da un minimo del 17,9% fino ad un massimo di 41,1% (3, 4).

Anche la microcentrifugazione, pur non mostrando discrepanze così elevate fra due letture dello stesso campione presenta comunque un coefficiente di variazione poco accettabile per letture singole (7,89%) seppur paragonabile a quello già rilevato nel pollo (3, 13).

La spettrofotometria viceversa mostra ad entrambe le lunghezze d'onda, coefficienti di variazione molto contenuti, che, ovviamente, crescono con l'aumentare della diluizione. La variabilità dei valori da noi osservati a 430 m $\mu$  e 600 m $\mu$  è infatti passata da 1,45% e 1,63%, con la diluizione 1:50, a 4,36% e 4,10%, con la diluizione 1:200. Tale variabilità è risultata perfettamente comparabile a quella rilevata da altri AA. in esperienze simili sul pollo (13).

Nella tabella n.2 sono riportati i coefficienti di riproducibilità della concentrazione spermatica determinata con le tre metodiche e calcolati fra i sottocampioni di ciascun eiaculato.

TABELLA 2 - Riproducibilità della concentrazione spermatica determinata con i tre diversi metodi di valutazione.

METODO DI VALUTAZIONE		R <sup>2</sup>
CONTA DIRETTA		0,900
MICROCENTRIFUGAZIONE		0,965
SPETTROFOTOMETRIA		
430m $\mu$	1:50	0,998
	1:100	0,996
	1:200	0,993
600m $\mu$	1:50	0,998
	1:100	0,996
	1:200	0,993

La riproducibilità risulta sempre molto elevata e il metodo spettrofotometrico, ad entrambe le densità ottiche, risulta il metodo migliore ( $R^2=0,99$ ) sia rispetto alla microcentrifugazione ( $R^2=0,96$ ) che alla conta diretta ( $R^2=0,90$ ). Il dato registrato con quest'ultimo metodo, che testimonia una ridotta riproducibilità delle letture effettuate con la camera Burker, conferma come sia necessario, per ottenere letture attendibili, contare un numero molto elevato di spermatozoi. È quindi indispensabile non diluire eccessivamente il materiale seminale o contare un numero elevato di quadratini (2, 13).

I coefficienti di determinazione calcolati sulle equazioni di regressione lineare, tra i metodi indiretti e la conta diretta (Tabella n. 3) sono risultati tutti altamente significativi.

I valori di correlazione più elevati si osservano tra la spettrofotometria e la conta diretta ( $R$  da 0,84 a 0,86). Tali dati pur non indicando una stretta correlazione tra i metodi rientrano nel range di valori riportati in letteratura in esperienze condotte su altre specie avicole,  $R$  da 0,41 a 0,99 (4, 11, 13). La relativamente modesta correlazione da noi registrata nell'anatra muschiata è probabilmente da imputarsi all'impiego della vagina artificiale che, nonostante le precauzioni osservate, comporta sempre una certa contaminazione dello sperma da parte di materiale estraneo.

Il valore relativo al coefficiente di correlazione per la microcentrifugazione risulta ancor più contenuto ( $R = 0,79$ ). Esso individua una scarsa precisione di questa tecnica applicata ai volatili, probabilmente legata al fatto che gli spermatozoi sono diversi da quelli dei mammiferi (testa filiforme). La particolare forma, che determina una riduzione del volu-

TABELLA 3 - Valori dell'intercetta, del coefficiente angolare e del coefficiente di determinazione calcolati fra la conta diretta e le tecniche indirette.

VARIABILE DIPENDENTE y	VARIABILE INDIPENDENTE x		a	b	R <sup>2</sup>
	MICROCENTRIFUGAZIONE		116,5	326,0	0,62
	SPETTROFOTOMETRIA				
CONTA DIRETTA	430m $\mu$	1:50	68,8	2549,6	0,71
		1:100	42,1	4082,4	0,72
		1:200	372,6	5715,6	0,72
	600m $\mu$	1:50	10,7	2960,2	0,72
		1:100	195,3	4924,5	0,74
		1:200	477,1	7784,4	0,73

me occupato da ciascun spermatozoo, risente in maggior misura della presenza di agenti contaminanti e inoltre fa sì che campioni di eiaculato con basso numero di cellule spermatiche risultino di difficile lettura (3).

Nella tabella n. 4 vengono riportati i valori dei coefficienti di determinazione per ranghi tra i metodi indiretti e la conta diretta. Gli errori di posizione in graduatoria con la tecnica fotometrica risultano dell'ordine del 20%.

In considerazione del fatto che la concentrazione dello sperma varia notevolmente durante la stagione riproduttiva, può essere più vantaggioso, ai fini selettivi, utilizzare un valore che deriva da più osservazioni effettuate nel corso del periodo riproduttivo piuttosto che un solo valore ottenuto per conta diretta di un numero rilevante di spermatozoi.

TABELLA 4 - Valori dei coefficienti di determinazione per ranghi (Spearman rank correlation coefficient) determinati fra la conta diretta e le tecniche indirette.

METODO DI VALUTAZIONE	R <sup>2</sup>
MICROCENTRIFUGAZIONE	0,743
SPETTROFOTOMETRIA	
430m $\mu$ 1:50	0,763
1:100	0,793
1:200	0,799
600m $\mu$ 1:50	0,784
1:100	0,803
1:200	0,817

In tale ottica l'impiego della spettrofotometria può quindi ritenersi valido anche ai fini genetici in quanto estremamente rapida e di semplice impiego e conseguentemente ripetibile più volte con facilità nell'arco della stagione riproduttiva.

## CONCLUSIONI

Per una valutazione di campo della concentrazione spermatica le metodiche indirette da noi testate sembrano potersi utilizzare in sostituzione della conta diretta, dal momento che i coefficienti di variazione risultano più contenuti, particolarmente per la tecnica spettrofotometrica.

La preparazione in doppio dei campioni da leggere con i metodi indiretti non sembra necessaria, per la spettrofotometria, come dimostrano gli alti valori di riproducibilità ottenuti in questa esperienza.

Il ricorso all'impiego della vagina artificiale per il prelievo del materiale spermatico dell'anatra muschiata, comunque inevitabile, comporta una maggiore possibilità di inquinamento dell'ejaculato da parte del materiale cloacale (urati ed altri elementi contaminanti) rispetto al metodo del massaggio con aspirazione, impiegato in tutte le altre specie avicole. Prove eseguite nel pollo e nel tacchino per stabilire correlazioni tra il metodo diretto e quelli indiretti di valutazione della concentrazione spermatica, hanno evidenziato l'importanza di operare con materiale non contaminato (3, 11, 13). Pertanto la relativamente modesta correlazione da noi ottenuta con la spettrofotometria, ma ancor più con la microcentrifugazione, può essere attribuita ad una inevitabile presenza di campioni contaminati. Tenuto conto di questa eventualità i risultati da noi ottenuti possono comunque considerarsi accettabili anche nell'anatra muschiata in considerazione del vantaggio dato dalla rapidità e riproducibilità dei metodi indiretti.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) ARSCOTT G. H., KUHNS R. V. - Packed sperm volume versus optical density as a measure of semen concentration. *Poultry Sci.* 48 (1969), 1126-1127.
- 2) BAGLIACCA M., MARZONI M., PACI G., BENVENUTI N. - Valutazione della concentrazione spermatica nel coniglio: tre metodi a confronto. *Annali Fac. Med. Vet. Pisa* 43 (1990), 277-285.
- 3) BRILLARD J. P., MCDANIEL G. R. - The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poultry Sci.* 64 (1985), 155-158.



- 4) BROWN K. I., NESTOR K. E., TOPSCHER M. - A comparison of various methods of estimating spermatozoa concentration of turkey semen. *Poultry Sci.* 49 (1970), 1267-1271.
- 5) GIAVARINI I. - Fecondazione artificiale e avicoltura: i vantaggi. *Riv. di Avicoltura*, 60 (2) (1991), 17-23.
- 6) GVARYAHU G., ROBINZON B., MELTZER A., PEREK M., SNAPIR N. - An improved method for obtaining semen from Muscovy drakes and some of its quantitative and qualitative characteristics. *Poultry Sci.* 63 (1983), 548-553.
- 7) GVARYAHU G., ROBINZON B., MELTZER A., SNAPIR N. - Semen characteristics of the Muscovy drake (*Cairina moschata*) as affected by seasonal variation. *Reprod. Nutr. Develop.* 24 (4) (1984), 343-350.
- 8) JONES J. E., WILSON H. R. - Use of an electronic counter for sperm concentration determination in chicken semen. *Poultry Sci.* 46 (1967), 532-533.
- 9) MARIANI P., CEROLINI S., PIZZI F. - Fecondazione artificiale nei volatili: nuovi parametri e metodiche di valutazione del materiale seminale. *Riv. di Avicoltura* 58 (2) (1989), 37-41.
- 10) MARZONI FECIA DI COSSATO M., MORI B. - Inseminazione artificiale nei volatili. *Professione Allevatore*, 4 (1992), 37-38.
- 11) MCCARTNEY M. C., BROWN K. E. - Spermatozoa concentration in three varieties of turkeys. *Poultry Sci.* 38 (1959), 390-394.
- 12) TAN N. S. - The frequency of collection and semen production in muscovy ducks. *British Poultry Science* 21 (1980), 265-272.
- 13) TANEJA G. C., GOWE R. S. - Spermatozoa concentration in the semen of two breeds of fowl estimated by three different methods. *Poultry Sci.* 40 (1961), 608-615.