

TECNICHE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE NELLA SPECIE CANINA

Dott. Giovanni Majolino

Specialista in Malattie dei Piccoli Animali

Past-President SIRVAC (Società di Riproduzione Veterinari Animali da Compagnia)

Ambulatorio Veterinario Associato Majolino- Ranieri, Collecchio (Parma)

Tel fax 0521-800108, e-mail : giovanni.majolino@libero.it

L' inseminazione artificiale nella specie canina è possibile utilizzando seme fresco, seme refrigerato o seme congelato. Le tecniche di inseminazione sono diverse a seconda che il seme da utilizzare sia fresco o refrigerato (inseminazione vaginale craniale) o congelato (inseminazione intra-uterina).

Per un buon successo di una inseminazione artificiale è fondamentale la scelta del momento in cui praticarla che dovrà essere indicato da un buon monitoraggio dell' ovulazione attraverso esecuzione e lettura di strisci vaginali, dai primi giorni in cui sono presenti perdite di sangue vaginali e ogni 48 ore fino ad un quadro citologico di estro con una cheratinizzazione maggiore del 60 %. E' a questo punto che si inizierà a dosare il progesterone ematico a giorni alterni fino ad evidenziare il primo considerevole aumento del progesterone oltre il livello basale (raddoppio del valore precedente), questo verrà considerato il giorno in cui si ha il picco dell' LH e l' ovulazione seguirà di 48 ore con un tasso di progesterone compreso tra 5-8 ng/ml.

Il momento di massima fertilità è considerato 48 ore dopo l' ovulazione per permettere l' estrapolazione del globulo polare e avere quindi ovuli fecondabili.

Se si dovrà programmare un' unica inseminazione sarà quindi 24- 48 ore dopo l' ovulazione.

Il tasso di progesterone raggiunto 24-48 ore post-ovulazione è estremamente soggettivo, tuttavia nella mia esperienza, nella maggior parte di cagne, la concentrazione raggiunta è compresa tra i 10-25 ng/ml.

Sarà quindi indispensabile per un corretto monitoraggio seguire l' incremento del progesterone e valutare il giorno in cui viene raggiunta la concentrazione da ovulazione che rimane costante nella maggior parte delle cagne (5-10 ng/ml).

Le ragioni per cui può essere richiesta un' inseminazione artificiale possono essere le seguenti : 1) problemi comportamentali di aggressività da parte della cagna che non permette al maschio di montarla. 2) difficoltà anatomiche che non permettono una monta naturale, quali: struttura anulare fibrinosa nella parte caudale vaginale, setti che bipartiscono la vagina o briglie cicatriziali per processi flogistici e/o traumatici precedenti. 3) iperplasia vaginale in presenza o non di tessuto vaginale prolassato. 4) maschi anziani non più in grado di eseguire una monta naturale. 5) scarsa libido del maschio.

La richiesta da parte del proprietario della femmina di intervenire con una inseminazione artificiale molto spesso è dovuto al fatto che la femmina non è ancora in grado di accettare una monta naturale semplicemente perché non ancora pronta. Ci sono cagne che ovulano già in 3°-4° giornata dall' inizio delle perdite vaginali e cagne che ovulano anche dopo 22-25 giorni dall' inizio delle stesse. Molto spesso quando una cagna non è stata coperta naturalmente al 14° giorno il proprietario richiede una inseminazione artificiale. Sarà indispensabile, in questi casi in cui non si è proceduto ad un adeguato monitoraggio dell' ovulazione, procedere ad un dosaggio del progesterone una volta che si è accertato che la cagna sia nella fase di estro conclamato tramite uno striscio vaginale. In questo modo anche se si deciderà di procedere ad una inseminazione si potrà confermare o meno che la cagna fosse effettivamente fecondabile.

TECNICA E MATERIALE NECESSARIO PER PRELIEVO DEL SEME

Il prelievo del seme può rendersi necessario essenzialmente per due motivi : 1) per una completa valutazione per inquadrare al meglio un problema di infertilità. 2) per poter eseguire un' inseminazione artificiale o allestire il seme refrigerato da spedire altrove.

- Sarà necessario avere una cagna in calore per facilitare l' eiaculazione.

- Permettere al maschio di montare la cagna

- Far arretrare il prepuzio dietro al bulbo del pene prima che sia raggiunta la completa erezione

- Inserire la vagina artificiale con la provetta di raccolta raccordata fino a coprire anche il bulbo del glande

- Esercitare una certa pressione dietro al bulbo del glande per simulare quello che naturalmente avverrebbe durante il blocco coitale durante un' accoppiamento naturale

- Raccogliere tutte e tre le frazioni nel caso in cui si proceda ad una inseminazione artificiale subito susseguente.

- Raccogliere esclusivamente la seconda frazione (spermatica) nel caso in cui si debba procedere all' allestimento del seme refrigerato.

- Esaminare subito dopo la raccolta una goccia di seme al microscopio a 100 X per valutarne la concentrazione e la motilità

- Allestire uno striscio di seme su un vetrino da asciugare all' aria e da colorare successivamente per la valutazione della morfologia degli spermatozoi.

- Tenere 0,1 ml di seme per poter effettuare una conta degli spermatozoi in camera conta-globuli, soprattutto se si intende spedire il seme refrigerato.

Il volume totale dell' eiaculato varia notevolmente a seconda della taglia del cane e può variare da 3 ml nelle piccole taglie a 20 ml nelle razze giganti.

Durante le manualità per la valutazione dell' eiaculato sarà bene tenere il seme in un bagno-maria a 37 °C fino al momento dell' inseminazione. Fare attenzione che non ci sia contaminazione del seme da parte di acqua per evitare un effetto spermicida.

Una valutazione di massima dell' eiaculato in funzione di una inseminazione artificiale prevederà la valutazione di :

- Colore (n.: lattescente, oppure con tracce di sangue, contaminato da urina, trasparente)
- Concentrazione (scala da 1 – 5)
- Motilità (n.: >70%)
- Presenza di altre cellule (detriti cellulari, cellule infiammatorie)
- Percentuale di spermatozoi normali, difetti primari, difetti secondari (normali: = o >80%, d.primari : <20 %, d. secondari : <20%)

INSEMINAZIONE ARTIFICIALE

Esistono varie tecniche di inseminazione nella parte craniale vaginale, quella da me preferita è avvalendosi di un catetere rigido di plastica con terminale arrotondato a cui viene raccordata una siringa preferibilmente con stantuffo in plastica e non in gomma, materiale che potrebbe avere azione spermicida.

Il catetere rigido permetterà di percorrere la vagina in tutta la sua lunghezza evitando che il catetere possa ripiegarsi su se stesso , il diametro del catetere è di 4 o 5 mm tale, quindi da evitare il meato urinario.

L' inserimento del catetere dovrà tener conto della anatomia del tratto riproduttivo della cagna che ha un andamento piuttosto verticale nella sua porzione vaginale caudale per poi compiere una curvatura ed assumere, nella sua porzione più craniale, un andamento orizzontale.

La lunghezza del canale vaginale nella cagna è ovviamente dipendente dalla taglia dei vari soggetti, si parla per le piccole taglie circa 10 cm, medie taglie 10-15 cm, grandi taglie 18-22 cm e nelle razze giganti da 22 a 28 cm.

La deposizione del seme fresco o refrigerato è bene che avvenga nella parte più craniale della vagina (porzione para-cervicale), questo consentirà agli spermatozoi una più facile passaggio in utero attraverso il canale cervicale, passaggio che potrà essere agevolato tenendo per circa 10 minuti il posteriore della cagna elevato dopo aver depositato il seme.

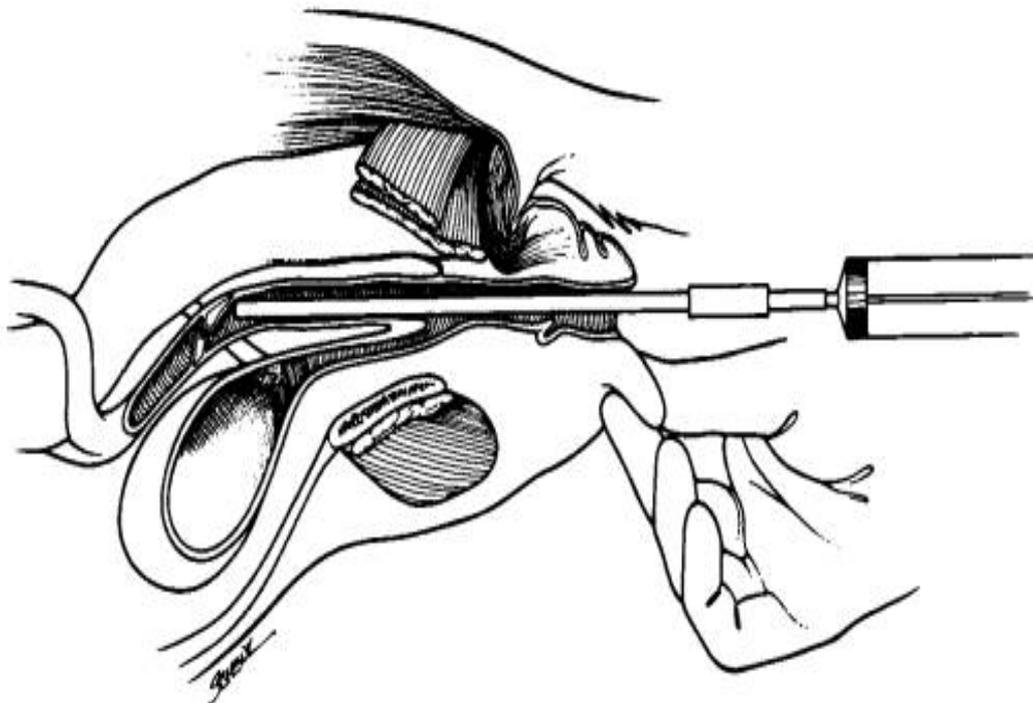
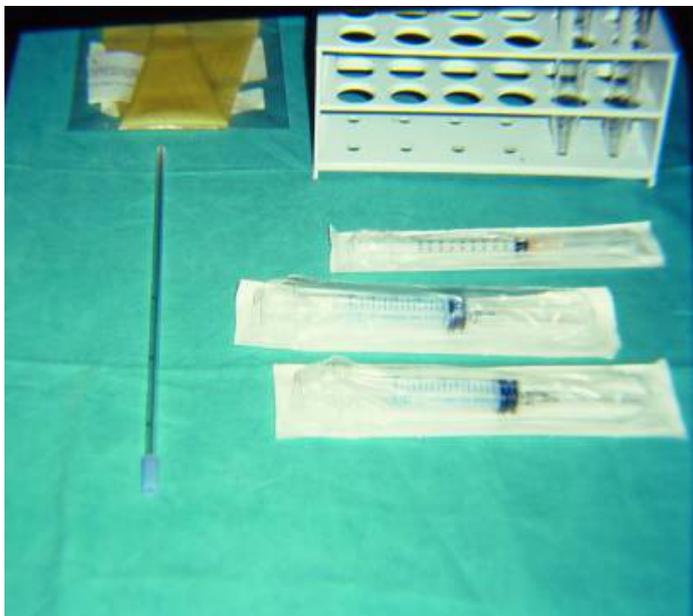


Figure 4-12. Position for placement of the insemination catheter for canine artificial insemination with fresh or chilled extended semen. Semen should be deposited at the external cervical os, and the bitch's hindquarters thereafter elevated for 5 minutes to cause pooling of semen around the external cervical os.



Altri tipi di cateteri utilizzati per l' inseminazione

vaginale sono i cateteri dotati di palloncino gonfiabile (folley) una volta che il catetere è stato fatto procedere fino alla parte più craniale della vagina. Questo permette al catetere di rimanere in sito senza muoversi o arretrare e la pressione esercitata dal palloncino sulle pareti vaginali stimola le contrazioni vaginali simulando quello che determinerebbe il bulbo del glande durante un accoppiamento naturale. Inoltre previene il reflusso di seme tenendo comunque la femmina subito dopo l' inseminazione per 10 minuti col posteriore elevato con il catetere posizionato. Un reflusso di un modesto quantitativo di seme dopo l' inseminazione è comunque da ritenersi normale.

CAUSE DI MANCATO CONCEPIMENTO IN SEGUITO AD INSEMINAZIONE ARTIFICIALE

- Momento dell' inseminazione non adeguato. Eseguire sempre un dosaggio del progesterone al momento dell' inseminazione artificiale. Questo confermerà se l' ovulazione è avvenuta, se è prossima, se avverrà nei giorni a seguire. Nel caso in cui il progesterone sia troppo elevato (>10 ng/ml) (e non si abbiano valutazioni dei giorni precedenti del progesterone che permettano di inquadrare quando la cagna abbia ovulato) non sarà possibile dire da quanto tempo sia trascorsa l' ovulazione; in questo caso è bene informare il proprietario che l' inseminazione potrebbe essere stata eseguita troppo tardi ma sarà necessaria una diagnosi di gravidanza per confermarlo o meno.

- Scarsa qualità del seme con ridotta fertilità. Eseguire una valutazione del seme al momento della raccolta servirà per poter informare i proprietari, nel caso di scarsa qualità, prima di procedere all' inseminazione artificiale. In modo tale che il proprietario della femmina possa decidere di utilizzare un' altro maschio o accettare il rischio di una eventuale non gravidanza o numero di nati ridotto. Nel caso in cui il maschio che si intende utilizzare sia anziano e non abbia prodotto cucciolate negli ultimi 3 mesi sarà bene consigliare di effettuare una completa valutazione dell' eiaculato circa 6-8 settimane prima del calore della cagna. In questo modo se l' eiaculato fosse di qualità scadente si ha il tempo di poter trattare il cane (se possibile) o di trovare un altro stallone.

- Tecnica di inseminazione scarsa Tutto il materiale da utilizzare deve essere pulito e sterilizzato, controllare che non ci sia una esposizione del seme a temperature troppo basse o troppo alte prima di procedere all' inseminazione. Evitare che possa esserci contaminazione del seme da parte di acqua. Controllare che tutto il materiale utilizzato per la raccolta del seme e l' inseminazione non abbia azione spermicida.

Se una inseminazione artificiale viene eseguita nel momento corretto e utilizzando il seme di un cane fertile e la cagna non rimane gravida si dovrà proporre di effettuare un controllo completo per la fertilità della cagna stessa.

IMPIEGO DEL SEME REFRIGERATO

I vantaggi dell' impiego del seme refrigerato sono .

- possibilità di importare il seme dall' estero
- maggior e miglior utilizzo di uno stallone
- evitare tutti i rischi e spese derivanti da far viaggiare le fattrici per raggiungere il maschio
- controllo delle patologie trasmissibili attraverso contatto diretto tra i partners

Materiale necessario :

- provetta con imbuto per la raccolta della frazione spermatica dell' eiaculato
- vetrino porta e copri-oggetto per la valutazione di una goccia di seme
- microscopio
- centrifuga
- bagnomaria
- diluitore
- provetta di raccolta
- scatola di polistirolo (ghiaccio sintetico) o termos per la spedizione

Come è possibile diluire il seme possibilità di utilizzare un kit del commercio per il seme canino refrigerato (Clone, Pennsylvania Usa; oppure ICG, Pennsylvania, Usa); all' interno di questi kit è contenuto tutto il necessario sia per il prelievo della frazione spermatica sia per la refrigerazione del seme e l' inseminazione, con istruzioni dettagliate sia

per chi allestisce il seme sia per chi riceve il seme. Sarà possibile anche allestire un diluitore partendo da principi attivi noti (diluitore casalingo).

Diluitore casalingo a base di TRIS :

- Trishydroxymethylaminomethane: 6,056 g.
- Acido citrico : 3,400 g.
- Fruttosio : 2,500 g.
- Acqua Distillata : 200 ml
- Penicillina Cristallina : 200.000 UI
- Diidrostreptomicina : 0,2 g.
- Tuorlo d' uovo : 20 %

(aggiungere il tuorlo subito prima della diluizione con acqua : 2 ml di tuorlo ogni 8 ml di tris : 20%)

Diluitore a base di Latte-Tuorlo d' uovo

- Latte pastorizzato con 0,1 % di grassi (weight watchers) : 8 ml
- Tuorlo d' uovo : 2 ml
- Aggiunta di antibiotici come sopra

Diluitore a base di Crema – Tuorlo d' uovo

- Crema Uht con 12 % di grassi : 8 ml
- Tuorlo d' uovo : 2 ml
- Aggiunta di antibiotici come sopra

ALLESTIMENTO DEL SEME REFRIGERATO

La percentuale di diluizione è approssimativamente 1 : 6, in relazione alla concentrazione iniziale del seme, il volume del diluitore dovrà essere, comunque, maggiore del volume del seme prelevato. Sarà buona norma centrifugare il seme se non si è provveduto alla raccolta della sola frazione spermatica (700 g per 5 m') poi eliminare ilsovrnatante e diluire.

Importante sarà che tutto il materiale impiegato sia rigorosamente tutto alla stessa temperatura (37 °C.) Il seme diluito verrà alloggiato in una provetta di plastica con tappo a vite; sarà necessario inserire la provetta contenente il seme diluito all' interno di un'altra provetta più grande in modo tale da isolare la provetta con il seme dal contatto diretto col il ghiaccio. Mettere la provetta così isolata all' interno di un thermos contenente il ghiaccio triturato o in una scatola di polistirolo con all' interno una tavoletta di ghiaccio sintetico. A questo punto sarà indispensabile spedire il seme al destinatario con servizio di posta celere.

UTILIZZO DEL SEME REFRIGERATO

La sopravvivenza degli spermatozoi diluiti con extender di vario tipo varia dalle 24 ore a 5 giorni e più, raccomandabile inseminare entro le 48 ore dall' allestimento del seme refrigerato. E' necessario al momento dell' arrivo del seme riportarlo a temperatura ambiente per circa 1 ora e successivamente a 37 °C in un bagnomaria fino al momento dell' inseminazione, controllandone la motilità prima di inseminare per confrontarla con quella del seme al momento del prelievo ricavandone il dato dal referto di accompagnamento del veterinario che ha allestito il seme refrigerato e spedito al destinatario.

Differenze tra i tre extender La conservazione del seme diluito per 4 giorni a + 4°C. con i tre differenti extender ha dato i seguenti risultati:

- TRIS : motilità progressiva : 53,5 %
- EYC (crema) : “ “ : 14,1 %
- EYM (latte) : “ “ : 30,4%

Tali differenze non sono però significative entro il primo giorno dalla diluizione e scarsamente significative dopo 48 ore, quindi se l' inseminazione avviene entro 48 ore dall' allestimento del seme refrigerato i risultati sono ottimi anche con il diluitore con latte e tuorlo d' uovo o con crema e tuorlo d' uovo.

Dott. Giovanni Majolino

Medico Veterinario

Libero Professionista

Specialista in Malattie dei Piccoli Animali

Past-President SIRVAC (Società Italiana Veterinari per la Riproduzione Animali da Compagnia)

Ambulatorio Veterinario : vicolo Del Forno 5, 43044 Collecchio (Parma)

Tel e fax 0521-800108

Allevamento Labrador “della Lontra”

www.dellalontra.it

giovanni.majolino@libero.it

Tecniche di prelievo manuale del seme maschile

Tecnica di primaria importanza per tutte le pratiche legate all'inseminazione artificiale sia essa con seme fresco, con seme fresco diluito, con seme refrigerato è il prelievo del seme.

Tralasciando altre metodologie di prelievo descriveremo di seguito il prelievo manuale.

Alcuni fattori comportamentali contribuiscono alla positiva riuscita del prelievo.

Poche regole rispettate facilitano l'operazione che comunque è attuabile nella percentuale del 95%:

- in caso di maschi dominanti effettuare il prelievo in presenza di una femmina in calore (nel 73% dei casi la mancanza non porta a risultati di rilievo nel prelievo);
- effettuare il prelievo nell'ambiente in cui il maschio vive solitamente;
- durante il prelievo la presenza di "coccole" da parte del proprietario favorisce sia erezione sia eiaculazione;
- non insistere nel prelievo quando il cane comincia a presentare segni di insofferenza, ma lasciarlo tranquillizzare e ripetere l'operazione in un secondo tempo.

Che materiale utilizzare?

Il materiale necessario per il prelievo è costituito da:

- barattolo sterile per esame delle urine;
- guarnizione di protezione da applicare sul bordo del vasetto; guanti in silicone.

Qual è la tecnica per il prelievo?

- masturbare il cane con il prepuzio in posizione di riposo fino all'iniziale inturgidimento del "nodo";
- all'iniziale inturgidimento del "nodo" portare delicatamente il prepuzio oltre il nodo stesso;
- continuare la masturbazione nel tratto d'asta tra il nodo ed i testicoli;
- ad inturgidimento avvenuto del "nodo" ruotare l'asta in posizione posteriore;
- impugnare il tratto d'asta suddetto stringendo l'asta stessa;
- mantenere la posizione fino al termine del prelievo;
- raccogliere il materiale seminale per circa 10 minuti;
- lasciare l'asta e far camminare il cane senza tentare "manualmente" di riportare il prepuzio in posizione;
- in soggetti a pelo lungo fare attenzione che il pelo non rientri nel prepuzio.

Osservazioni:

1. durante il prelievo alle "pulsazioni" osservabili dell'asta corrispondono delle pulsazioni dell'ano;
2. talvolta il cane tende a scavalcare la mano del prelevatore durante il prelievo, movimento da assecondare;
3. qualora durante il prelievo si riscontrasse un rientro dell'erezione massaggiare il tratto d'asta tra il nodo ed i testicoli come nella fase iniziale del prelievo, ricominceranno le pulsazioni già descritte;
4. qualora non riprendessero le pulsazioni, al fine di non "perdere" l'erezione coccolare il cane.

Alcuni consigli importanti per chi vuole attuare il prelievo manuale:

1. far urinare abbondantemente il cane prima del prelievo; tutto il materiale utilizzato per il prelievo deve avere una temperatura di 36 – 37 °C;
2. qualora sia possibile effettuare il prelievo col cane "a terra" e non sul tavolo;
3. qualora sia possibile il proprietario del maschio deve tenere il soggetto ed il prelievo deve essere effettuato da un terzo;
4. non masturbare il maschio sull'asta, la fragilità capillare potrebbe portare a delle micro-lesioni sanguinolente;
5. qualora, per svariati motivi, si assistesse al sanguinamento dell'asta, effettuare un "lavaggio prepuziale" (*) con Betadine ginecologico diluito al 2% con acqua tiepida.

Per attuare il lavaggio prepuziale:**materiale occorrente:**

- n° 1 catetere morbido (monouso);
- n° 1 siringa da 60 ml;
- Betadine Ginecologico

Le fasi del lavaggio:

1. diluire il Betadine in soluzione al 2% (solo la punta della siringa ed il resto acqua tiepida anche di rubinetto);
2. quando l'asta è a riposo introdurre il catetere nel prepuzio;
3. spingere il catetere lungo l'asta in ragione della taglia del cane (es. su cani di taglia media circa dieci centimetri);
4. tenere il prepuzio sigillato con le dita;
5. iniettare il Betadine;
6. estrarre il catetere tenendo chiuso il prepuzio;
7. agitare il prepuzio;
8. lasciare il prepuzio;
9. il Betadine schizzerà per terra, il lavaggio è terminato