

IL CONTROLLO UFFICIALE DEL SEME

*D.M. 19 luglio 2000 n. 403
D.lgs n.52 del 11 maggio 2018
Regolamento Delegato UE 2020/686 del 17 Dicembre 2019*

Protocollo Operativo Standard 2024 (POS)

Responsabili del servizio CUS

Direttore e Responsabile CUS

Marina Montedoro, tel. 0363 78883
direzione@istitutospallanzani.it

Vice Direttore

Silvia Cenadelli, tel. 0363 78883
silvia.cenadelli@istitutospallanzani.it

Responsabile Gestione Qualità e Responsabile VCI

Graziella Bongioni, tel. 0363 78883 int. 216
graziella.bongioni@istitutospallanzani.it

Responsabile VCA

Valeria Bornaghi, tel. 0363 78883 int. 205
valeria.bornaghi@istitutospallanzani.it

Responsabile Ufficio Amministrativo

Moira Intra, tel. 0363 78883 int. 201
moira.intra@istitutospallanzani.it

A cura di:

Graziella Bongioni
Valeria Bornaghi
Silvia Cenadelli
Marina Montedoro

Indice

1. Premessa	4
2. Campionamento.....	4
3. Verifica Corretta Autocertificazione	7
3.1 Metodologia Analitica	7
• 3.1.1 Scongelamento	7
• 3.1.2 Determinazione della Concentrazione.....	7
• 3.1.3 Determinazione della Motilità	7
3.2 Refertazione ed Informazioni Aggiuntive	9
4 Verifica Corretta Identificazione	9
4.1 Metodologia Analitica	9
• 4.1.1 Estrazione del DNA	9
• 4.1.2 Dosaggio del DNA	9
• 4.1.3 Amplificazione del DNA	10
• 4.1.4 Analisi dei frammenti ed acquisizione dati.....	10
4.2 Refertazione.....	11

1. Premessa

Il Controllo Ufficiale del Seme (CUS), normato dai DDMM 403/2000, prevede tre fasi principali:

- Campionamento,
- verifica corretta autocertificazione (VCA),
- verifica corretta identificazione (VCI).

Di seguito vengono descritte le procedure operative ed i metodi di laboratorio che verranno utilizzati dall'Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani (IS) nell'anno 2023.

2. Campionamento

All'inizio di ogni settimana i Centri di Produzione Seme (CPS) inviano ad IS il listato relativo alle partite di seme congelato prodotte la settimana precedente. Per le partite di seme congelato importato l'invio del listato avviene al momento dell'importazione.

➤ **Listato**

Il listato deve contenere:

- numero identificativo della partita,
- nome commerciale del riproduttore,
- matricola del riproduttore,
- numero di paillettes prodotte o importate per partita,
- razza del riproduttore.

I listati vanno inviati possibilmente in formato Excel o in formato testo con i campi separati da tabulazione, con le seguenti strutture record:

Listati →

Partita	Nome Riproduttore	Matricola	Numero Paillettes	Razze
---------	-------------------	-----------	-------------------	-------

Il listato per le dosi eterospermiche deve contenere:

- numero identificativo della partita,
- nome commerciale del prodotto (mix),
- matricole dei riproduttori contenuti nella dose,
- numero di paillettes prodotte o importate per partita,
- razze.

I listati vanno inviati possibilmente in formato Excel o in formato testo con i campi separati da tabulazione, con le seguenti strutture record:

Listati →

Partita	Nome Prodotto	Matricole Riproduttori	Numero Paillettes	Razze
---------	---------------	------------------------	-------------------	-------

I listati vanno inviati tramite e-mail all'indirizzo cus@istitutospallanzani.it.

Entro una settimana dall'invio del listato, i CPS ricevono l'eventuale **Richiesta di Campionamento/Autocertificazione/Riferimento (RiCAR)**, in caso contrario le partite indicate nel listato non vengono campionate.

Nella RiCAR vengono indicate le seguenti informazioni:

- data prevista per il campionamento,
- elenco delle partite campionate,
- richiesta di Materiale di Riferimento tramite dicitura ASSENTE.

➤ **Conservazione**

Al momento del campionamento devono essere disponibili le paillettes (2 medie o 4 mini) delle partite campionate.

Al fine di garantire le migliori condizioni di conservazione dei campioni di seme inviati dai CPS, le paillettes devono essere aggregate per riproduttore e partita in un singolo bicchierino. Il bicchiere contenente l'intero campionamento (composto da vari bicchierini) deve essere posto nel *canister* del *dry shipper*, sotto un altro bicchiere vuoto che funge da "blocco" del bicchiere sottostante. In questo modo, alla consegna del seme, l'operatore è in grado di compiere le operazioni di immagazzinaggio nel minor tempo possibile.

Il Dry shipper deve essere accompagnato dal documento di trasporto contenente:

- nome del riproduttore,
- matricola del riproduttore,
- partita di riferimento,
- numero paillettes.

➤ **Autocertificazioni**

Le autocertificazioni possono essere inviate con il campionamento o entro 15 giorni dallo stesso.

Le autocertificazioni devono contenere:

- numero identificativo della partita,
- nome commerciale del riproduttore,
- matricola del riproduttore,
- valori relativi alle seguenti variabili:
 - ✓ Concentrazione Totale (CT) (milioni/paillette),
 - ✓ Motilità Progressiva (MP) (%),
 - ✓ Numero di Spermatozoi Progressivamente Mobili (NSPM) (milioni/paillette),
(la variabile, se non comunicata, viene calcolata come $NSPM = CT * MP/100$).

Le autocertificazioni trasmesse dovranno essere possibilmente inviate in formato Excel o in formato testo con i campi separati da tabulazione, con le seguenti strutture record:

Autocertificaz. →

Partita	Nome Riproduttore.	Matricola	CT	MP	NSPM
---------	--------------------	-----------	----	----	------

Le autocertificazioni dosi eterospermiche devono contenere:

- numero identificativo della partita,
- nome commerciale del prodotto (mix),

- matricole dei riproduttori contenuti nella dose,
- valori relativi alle seguenti variabili:
 - ✓ Concentrazione Totale (CT) (milioni/paillette),
 - ✓ Motilità Progressiva (MP) (%),
 - ✓ Numero di Spermatozoi Progressivamente Mobili (NSPM) (milioni/paillette),
(la variabile, se non comunicata, viene calcolata come $NSPM = CT * MP/100$).

Le autocertificazioni trasmesse dovranno essere possibilmente inviate in formato Excel o in formato testo con i campi separati da tabulazione, con le seguenti strutture record:

Autocertificaz. →

Partita	Nome Riproduttore.	Matricola	CT	MP	NSPM
---------	--------------------	-----------	----	----	------

Le autocertificazioni vanno inviate tramite e-mail all'indirizzo cus@istitutospallanzani.it.

L'intervallo di variabilità di NSPM viene calcolato, in base a misure di variabilità intra-partita preventivamente eseguite da IS. Il volume viene normalizzato a 0,500 ml e a 0,250 ml, rispettivamente per le paillettes medie e mini. Il mancato o incompleto invio dei campioni e/o dell'autocertificazione (quest'ultima entro 15 giorni dalla data del campionamento) comporta la comunicazione alla Regione competente per territorio di inadempienza.

➤ **Materiale di Riferimento**

Tramite la RiCAR viene richiesto il Materiale di Riferimento di quei riproduttori di cui non è ancora pervenuto il materiale. La richiesta è formulata con la dicitura "ASSENTE" nella colonna della RiCAR relativa al materiale biologico di riferimento.

Al fine di consentire lo stoccaggio della quantità adeguata di DNA di Riferimento, il volume del Materiale di Riferimento deve essere:

- almeno 3 ml nel caso di sangue (in provette Vacutainer contenenti EDTA/K₃, tappo viola) o seme congelato (almeno 6 paillettes medie o 12 paillettes mini),
- almeno 1 ml nel caso di seme fresco.

Qualora i volumi del Materiale di Riferimento non corrispondessero a quanto indicato verrà fatta richiesta di un secondo invio.

Il Materiale di Riferimento deve essere accompagnato da un documento attestante l'identificazione del campione e riportante:

- identificativo della provetta,
- nome commerciale del riproduttore,
- matricola del riproduttore,
- data di nascita, razza/specie.

Inoltre, per la specie bovina è possibile inviare il certificato del genotipo ISAG, anziché inviare il materiale biologico di riferimento. In questo caso il genotipo ISAG verrà utilizzato come riferimento per la VCI e come materiale biologico del riproduttore verrà stoccato il lotto di seme campionato.

Per i campioni di produzione nazionale, qualora non pervenisse in IS il materiale di riferimento richiesto, al CPS viene comunicato, tramite Referto VCI, che si rimane in attesa del Materiale di Riferimento.

Il CPS ha tempo 15 giorni per l'invio del materiale richiesto. Allo scadere di tale periodo verrà fatta comunicazione al CPS che la partita di seme campionata è stata utilizzata per creare il materiale di riferimento e su questa partita non sarà effettuata la VCI.

Per i campioni di importazione, qualora non pervenisse in IS il Materiale di Riferimento richiesto, si costituisce il riferimento con la prima partita di seme campionata e questa partita non sarà testata per la VCI. Tale operazione viene comunicata al CPS tramite Referto VCI.

3. Verifica Corretta Autocertificazione

Presso IS i campioni di materiale seminale campionati vengono analizzati al fine di determinare il NSPM (NSPM.IS). Tale valore viene confrontato con il Valore Minimo (MinRif) dell'intervallo di variabilità calcolato da IS per il NSPM indicato dai CPS nelle autocertificazioni (NSPM.CPS).

I risultati vengono inviati al CPS tramite un **Referto di VCA (1ª Analisi)** entro i termini previsti dal CUS.

In caso di mancata concordanza tra NSPM misurato da IS ed il valore minimo di riferimento di NSPM del CPS, viene richiesto un secondo campione (tramite il Referto VCA di 1ª Analisi), da inviare entro 15 giorni dalla richiesta, e su questo viene effettuata una seconda analisi. In caso di ritardato o mancato invio del secondo campione verrà comunicata l'Inadempienza alla Regione competente per territorio.

In caso di ulteriore mancata concordanza, la partita viene definita **Autocertificazione Errata (AE)**. I risultati vengono inviati al CPS tramite un Referto di VCA (2ª Analisi).

In caso di AE, viene mandata apposita comunicazione alla Regione competente per territorio.

VCA ok → $MP > 10\%$ e $NSPM.IS > MinRif\ NSPM.CPS$

VCA No / AE → $MP \leq 10\%$ e/o $NSPM.IS < MinRif\ NSPM.CPS$

In caso di AE, il CPS deve modificare l'autocertificazione utilizzando i valori rilevati da IS.

3.1 Metodologia Analitica

• 3.1.1 Scongellamento

Due paillettes medie o quattro paillettes mini vengono scongelate in bagno termostato a 37°C per 1 minuto e incubate nello stesso per 14 minuti.

• 3.1.2 Determinazione della Concentrazione

La **concentrazione (CT)** rappresenta la misura del numero di spermatozoi per unità di volume e viene eseguita tramite NucleoCounter SP100 (ChemoMetec).

Tale strumento è un microscopio a fluorescenza integrato, dotato di un accurato campionatore e di un sistema di analisi d'immagini. Gli spermatozoi, dopo un trattamento lisante, sono colorati con Ioduro di Propidio che, legandosi al DNA delle cellule, emette fluorescenza rossa. Lo strumento rileva e conteggia gli spot rossi in un volume fisso di sospensione (spermatozoi e lisante).

La diluizione iniziale dell'aliquota di materiale seminale con il lisante viene eseguita secondo le indicazioni del manuale d'uso dello strumento. Il valore della concentrazione viene ottenuto per ml, quindi convertito al valore nominale delle paillettes. L'utilizzo del NucleoCounter è stato validato da IS ed i risultati ottenuti sono risultati congruenti.

• 3.1.3 Determinazione della Motilità

La valutazione della motilità viene eseguita tramite sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). Dal campione da analizzare vengono predisposte 2 aliquote di seme in 2 camere di Makler, preriscaldate a 37°C. L'analisi viene effettuata su un minimo di quattro campi microscopici analizzando almeno 200 spermatozoi totali.

I parametri considerati sono di seguito descritti:

Motilità Totale (MT) percentuale di spermatozoi con VAP superiore ad un valore di riferimento.

Rev. 7 del 12/01/2024

7

Motilità Lineare (ML) percentuale di spermatozoi mobili con rapporto VSL/VAP superiore a 0.75 (THRESHOLD STRAIGHTNESS=75%).

Motilità Progressiva (MP) per i bovini, bufali, ovini e caprini ed equini viene calcolata come motilità lineare, mentre per i suini viene calcolata come motilità totale.

Gli strumenti in uso sono l'HTM-IVOS v.14 e HTM-IVOSII (Hamilton-Thorne) dotati di microscopio integrato con obiettivi 10x a contrasto di fase negativo e a fluorescenza e tavolinetto termostato a 37°C.

Tali strumenti, possedendo un sistema di discriminazione degli spermatozoi basato sulla determinazione degli oggetti in movimento, definiscono il valore minimo di taglia e di luminosità che un oggetto deve avere per essere riconosciuto. Al fine di una corretta discriminazione delle cellule, risulta di fondamentale importanza la calibrazione dello strumento (MAGNIFICATION) tramite Camera di Makler. Ciascuno spermatozoo nell'analisi viene seguito per un massimo di 30 tracce.

La classificazione degli spermatozoi si basa sulla velocità di spostamento degli stessi.

L'utilizzo dello strumento si differenzia, in base al tipo di extender utilizzato per il congelamento del seme ed alla specie, come riportato nello schema sottostante.

Extender Trasparenti	Extender Opachi	
IVOS	IVOS Ident Stain (*)	(*) L'utilizzo del Kit Ident Stain prevede una pre-diluizione del colorante con 4 µl di acqua bidistillata e 46 µl di PBS senza calcio e magnesio, preriscaldati a 37°C, quindi 50 µL di seme (dopo 1 minuto di scongelamento a 37°C) vengono diluiti con 10 µL di colorante; segue poi un'incubazione a 37°C di 14 minuti.
Camera di Makler	Camera di Makler	

Settaggio del sistema CASA IVOS 14, per ciascuna specie analizzata

PARAMETRO		IDENT	STANDARD		
		BOVINA BUFALINA	BOVINA BUFALINA	EQUINA	SUINA
IMAGE CAPTURE	FRAMES PER SEC. Ns. OF FRAMES	60 Hz 30	60 Hz 30	60 Hz 30	60 Hz 30
PROGRESSIVE CELLS	PATH VELOCITY (VAP) STRAIGHTNESS (STR)	25.0 µm/s 75.0%	25.0 µm/s 75.0%	15.0 µm/s 45.0%	15.0 µm/s 45.0%
SLOW CELLS	VAP CUTOFF VSL CUTOFF	24.9 µm/s 20.0 µm/s	24.9 µm/s 20.0 µm/s	14.9 µm/s 10.0 µm/s	14.9 µm/s 10.0 µm/s

Settaggio del sistema CASA IVOSII, per specie Bovina e Bufalina

PARAMETRO		IDENT	STANDARD		
		BOVINA BUFALINA	BOVINA BUFALINA	EQUINA	SUINA
IMAGE CAPTURE	FRAMES PER SEC. Ns. OF FRAMES	60 Hz 30	60 Hz 30	60 Hz 30	60 Hz 30
PROGRESSIVE CELLS	PATH VELOCITY (VAP) STRAIGHTNESS (STR)	25.0 µm/s 75.0%	25.0 µm/s 75.0%	15.0 µm/s 45.0%	15.0 µm/s 45.0%
SLOW CELLS	VAP CUTOFF VSL CUTOFF	24.9 µm/s 20.0 µm/s	24.9 µm/s 20.0 µm/s	14.9 µm/s 10.0 µm/s	14.9 µm/s 10.0 µm/s

3.2 Refertazione ed Informazioni Aggiuntive

I dati di CT e di MP vengono elaborati e il valore di NSPM viene confrontato con quello calcolato sui dati di Autocertificazione del CPS, come precedentemente indicato. I dati analitici (CT, MP, NSPM) di IS e del CPS, insieme al valore di Riferimento Minimo di NSPM.CPS, vengono riportati nel Referto VCA.

Nel Referto VCA vengono inoltre indicate eventuali Inadempienze e/o Non Conformità di processo.

Insieme al Referto VCA vengono fornite "Informazioni Aggiuntive" (IA) relative a statistiche calcolate tramite i listati ricevuti dal CPS, i campionamenti effettuati da IS e le analisi seminali condotte da IS. Le IA rappresentano uno strumento di controllo di gestione offerto ai CPS, derivante dalle attività previste dal CUS.

4 Verifica Corretta Identificazione

La Verifica Corretta Identificazione (VCI) viene eseguita mediante il confronto fra il profilo genetico del DNA estratto dagli spermatozoi della partita in esame rispetto a quello del DNA estratto dal Materiale di Riferimento del riproduttore, utilizzando come marcatori genetici i microsatelliti.

I risultati vengono inviati al CPS tramite un **Referto di VCI** (1^a Analisi) entro i termini previsti dal CUS.

Nel caso di mancata concordanza fra i frammenti di DNA (seme /riferimento) si richiede un secondo campione (tramite il Referto VCI di 1^a Analisi), da inviare entro 15 giorni dalla richiesta e, su questo, viene effettuata la seconda analisi (2^a Analisi); nel caso non vi sia concordanza, la partita viene definita **IE** (Identificazione Errata). IS da comunicazione sia al CPS tramite il Referto VCI (2^a Analisi) che alla Regione competente per territorio.

VCI ok → quando la differenza allelica fra i frammenti del DNA del campione di seme e quelli del Materiale di Riferimento è inferiore a 2 pb.

VCI No / IE → quando la differenza allelica risulta uguale/superiore a 2 pb.

In caso di **IE**, il CPS deve distruggere la partita entro sette giorni dalla comunicazione.

4.1 Metodologia Analitica

• 4.1.1 Estrazione del DNA

Il DNA viene isolato a partire da differenti matrici biologiche quali seme, sangue e bulbo pilifero.

L'estrazione del DNA da seme e da sangue viene prevalentemente effettuata mediante l'ausilio di sistemi semiautomatici: BIOSPRINT 96 (Qiagen) o KINGFISHER-APEX (Thermoscientific). In particolare, per il sangue è prevista una fase iniziale di precipitazione delle cellule mediante lavaggio con una soluzione specifica. Al materiale seminale o al pellet di cellule del sangue si aggiunge la specifica soluzione di lisi. Nel caso degli spermatozoi viene impiegato anche DTT per decompattare la cromatina e permettere la solubilizzazione del DNA. Successivamente si aggiungono i reagenti previsti dai protocolli per l'estrazione del DNA. Il lisato così ottenuto viene opportunamente trattato per isolare il DNA dalla fase contenente proteine. Il DNA viene poi purificato da contaminanti, quali sali e sostanze inorganiche, mediante ripetuti lavaggi con soluzioni contenenti etanolo. Alla fine, il DNA viene recuperato con la soluzione di eluizione.

La metodica utilizzata per l'estrazione del DNA da pelo (bulbo) prevede l'impiego della soluzione PrepMAN Ultra partendo da 10/15 bulbi piliferi.

L'estrazione del DNA può essere effettuata anche manualmente tramite kit commerciali.

• 4.1.2 Dosaggio del DNA

La determinazione della concentrazione del DNA estratto da materiale biologico (seme e materiale di riferimento) viene eseguita tramite spettrofotometro, sfruttando la proprietà delle basi eterocicliche di assorbire la luce ultravioletta (spettrofotometria di assorbimento).

La concentrazione del DNA ottenuto dal materiale biologico di riferimento viene determinata allo scopo di costituire, per ciascun campione, una quantità di DNA tale da permettere l'effettuazione del test di identità per almeno 10 anni. La determinazione viene eseguita tramite il Nanodrop (Thermo Scientific), strumento specificatamente sviluppato per misurare sia campioni di RNA che di DNA utilizzando luce UV a diverse lunghezze d'onda. Le lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm vengono usate per calcoli relativi alla quantificazione e al controllo del grado di purezza ($ratio = A_{260}/A_{280}$) del campione.

• 4.1.3 Amplificazione del DNA

L'amplificazione dei microsatelliti del DNA avviene tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*), che consente la replicazione e la marcatura di regioni specifiche del DNA, tramite l'ausilio di *primers* (sequenze oligonucleotidiche) specifici per le regioni indagate. Routinariamente, per ciascuna specie vengono amplificati almeno 3 *loci*, evidenziati nella tabella seguente. Se nello stesso campionamento sono presenti riproduttori con genotipi uguali per i tre microsatelliti normalmente analizzati, l'analisi viene condotta utilizzando gli altri loci.

Bovini	Bufali	Equini	Suini
BM2113	MAF65	VHL20	SW1823
TGLA53	CSSM47	HTG4	SWR153
ETH10	D5S2	AHT4	S0017
SPS115	CYP21	HMS7	SW1928
TGLA122	HCOMP	HTG6	SW1873
TGLA126		HMS6	SW1695
TGLA227		HTG7	SW1495
INRA23		HMS3	S0301
ETH3		AHT5	
ETH225		ASB2	
BM1824		HTG10	
		HMS2	

Il DNA in esame viene amplificato utilizzando *primers* fluorescinati. La reazione di amplificazione si svolge in termociclatori Gene Amp PCR System 9700 e/o 9800 (Applied Biosystems) utilizzando differenti protocolli messi a punto da IS a seconda della specie in esame.

In particolare, 20 ng di DNA estratto vengono amplificati in una miscela contenente:

- 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- miscela di nucleotidi (dNTPs) 1.25 mM
- DNA Polimerasi (AmpliTaq Gold - 5U/μl)
- *primers* specie-specifici

• 4.1.4 Analisi dei frammenti ed acquisizione dati

Dopo l'amplificazione i prodotti PCR vengono diluiti e preparati per la successiva corsa elettroforetica. L'elettroforesi viene eseguita per poter visualizzare e dimensionare i frammenti prodotti nella fase di amplificazione. Gli strumenti utilizzati per l'elettroforesi sono il sequenziatore 3130x/ Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a 16 capillari e il sequenziatore 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a 8 capillari. I dati vengono collezionati ed analizzati tramite software dedicati (Genescan e GeneMapper) e la dimensione allelica viene espressa in classi. Successivamente vengono caricati nell'apposito database per il confronto.

4.2 Refertazione

Il **Referto VCI** riporta il profilo del genotipo del seme campionato e del suo Materiale di Riferimento per i tre loci analizzati routinariamente.

Nei casi particolari, precedentemente illustrati, in cui non perviene in IS il Materiale di Riferimento, sul Referto VCI viene indicato che la prima partita di seme campionata è stata utilizzata per la costituzione del Riferimento stesso.

Nel Referto VCI vengono inoltre indicate eventuali Non Conformità di processo.

Tramite il Referto VCI viene anche richiesto l'invio di un secondo Materiale di Riferimento (sangue e pelo) per quei lotti di seme che alla prima VCI risultano incompatibili con il genotipo del primo riferimento inviato.