

**Utilizzo di una vagina artificiale digitale per il prelievo del seme di coniglio:
risultati preliminari**

Cardinali R.¹, Dal Bosco A.¹, Moscati L.², Castellini C.¹

¹Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia, Italy

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Italy

Corresponding Author: Alessando Dal Bosco, Dipartimento di Biologia Applicata,
Università di Perugia, Borgo XX Giugno 74, 61121 Perugia, Italy -
Tel. +39 075 5857110 - Fax: +39 075 5857122 - Email: dalbosco@unipg.it

ABSTRACT: Application of a digital artificial vagina for semen collection in rabbit buck: preliminary results. Nowadays artificial vagina in rabbitry is widely utilized. The aim of this study was to evaluate the effect of a digital artificial vagina on some quali-quantitative traits on rabbit buck semen. Twenty rabbit bucks were submitted to semen collection twice a week with two different artificial vagina: glass vagina (37-40°C) and digital vagina (47°C). For every ejaculate presence/absence of plug gel, volume, sperm concentration, motility, acrosoma status, lysozyme concentration, antioxidant power and total protein were recorded. The libido showed better values with digital vagina and the lowest percentage of plug gel promoting the use of this technique. Sperm concentration was in the range of good health bucks, as confirmed by lysozyme value and antioxidant power. In conclusion it is confirmed that the use of a digital vagina in rabbitry reduces the time to take off sperm samples and does not compromise the quality of ejaculates.

Keywords: Artificial vagina, Rabbit buck, Spermatozoa.

INTRODUZIONE – Negli anni '20 si è iniziato a parlare di Inseminazione Artificiale (IA) in coniglicoltura (Adams, 1961) come metodo alternativo alla monta naturale. Macimore e Walton nel 1938 furono i primi a proporre l'uso di una vagina artificiale per la raccolta del seme. Successivamente altri Autori (Walton, 1958; Gregoire *et al.*, 1958) apportarono modifiche per indurre un miglior stimolo nel maschio, ma Bredderman *et al.* (1964) proposero per primi una vagina che, messa a scaldare alla temperatura di 50°C per 30 minuti, permetteva di ottenere una miglior libido nel coniglio. Attualmente sono ampiamente utilizzate vagine artificiali in PVC con l'apertura foderata in lattice (Sinkovics *et al.*, 1993) e in vetro (Dal Bosco *et al.*, 1996) che, riempite con acqua a 37°C, permettono di ottenere le migliori performance. Sulla base di queste considerazioni si è voluto analizzare l'effetto dell'utilizzo di una vagina artificiale digitale, la cui temperatura viene mantenuta costante mediante una batteria, su alcuni parametri quali-quantitativi del seme di coniglio.

MATERIALI E METODI – La prova è stata svolta presso la Sezione sperimentale del Dip. Biologia Applicata dell'Università di Perugia su 20 conigli maschi Bianca di Nuova Zelanda di 8 mesi d'età, mantenuti ad una temperatura ambientale compresa tra 16 e 25 °C e con un fotoperiodo di 16/8 ore luce/buio (Theau-Clement *et al.*, 1996) ed alimentati *ad libitum*; gli stessi sono stati sottoposti a prelievo del seme due volte a settimana per 3 mesi consecutivi, alternativamente con vagina artificiale in vetro, la cui

temperatura media è stata di 37-40°C, e con vagina artificiale digitale, la cui temperatura è stata di 47°C.

La libido è stata valutata come il tempo trascorso dalla presentazione del manichino al momento dell'eiaculazione (Boiti *et al.*, 2005). L'assenza dell'eiaculazione entro i 2 minuti è stata considerata come una mancata sollecitazione. Immediatamente dopo il prelievo sono stati valutati la presenza/assenza del tappo mucoso ed il volume mediante provetta graduata. La concentrazione di spermatozoi è stata determinata mediante camera contaglobuli Thoma-Zeiss (Boiti *et al.*, 2005). La valutazione dei parametri cinetici degli spermatozoi è stata effettuata mediante software ISAS[®], a 100 frame rate. L'integrità dell'acrosoma è stata analizzata mediante la metodica Mendoza *et al.* (1992). Inoltre sono stati analizzati lisozima (Osserman e Lawlor, 1996), metaboliti reattivi all'ossigeno (ROMs) e potere antiossidante (PAO), mediante un kit commerciale (Diacron, Grosseto, Italy), e proteine totali, mediante kit commerciale (Total protein, Sclavo, Italy). L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Stata (StataCorp, 2005).

RISULTATI E CONCLUSIONI – La libido ha fatto registrare un minor tempo (-16,38 sec, $P < 0,05$; Tabella 1) quando il seme è stato prelevato mediante la vagina digitale, probabilmente per la maggiore temperatura che meglio stimola il maschio ad eiaculare.

Tabella 1 – Effetto del tipo di vagina artificiale sulle caratteristiche dello sperma.

Tipo di vagina artificiale		Vetro	Digitale	DSE
Libido	sec	84,12 ^b	67,74 ^a	12,88
Volume eiaculato	ml	0,86	0,77	0,24
Tappo mucoso	%	22,22 ^b	6,06 ^a	35,46
Concentrazione	$10 \times 10^6/ml$	255,04	296,55	74,01
Acrosoma integro	%	13,41	11,64	6,36
Spermatozoi immobili	%	25,70	14,95	10,60
Spermatozoi rapidi	%	72,72	82,73	16,29
VCL (velocità curvilinea)	$\mu m/sec$	241,14	237,56	42,09
VAP(velocità media)	$\mu m/sec$	132,89	131,35	22,74
LIN (linearità)	%	24,37	25,30	4,33
ALH (ampiezza dello spostamento laterale della testa)	μm	2,63	2,73	1,01
Lisozima	$\mu g/ml$	10,69	11,85	8,39
ROMs	mM H ₂ O ₂	0,66	1,00	0,58
PAO (potere antiossidante)	μmol di HClO	250,79 ^b	212,24 ^a	28,81
Proteine Tot.	gr/l	23,78	23,72	5,38

n=240; $P < 0,05$: a,b

Tale risultato non è stato accompagnato da variazioni significative a livello di volume e concentrazione spermatica, ma la più bassa percentuale di campioni seminali con tappo mucoso (6,06 vs. 22,22%; $P < 0,05$) nel gruppo sperimentale conferma che l'utilizzo della vagina digitale permette la raccolta di un maggior numero di campioni di seme senza interruzioni per il cambio dell'acqua e l'eventuale manipolazione del seme per la diluizione. Passando ad analizzare le caratteristiche qualitative dei campioni seminali è possibile evincere che nessun parametro è stato modificato in maniera significativa dal

tipo di vagina artificiale usata. La concentrazione spermatica ha fatto registrare valori che rientrano nel range della specie e di animali in buono stato sanitario (Brecchia *et al.*, 2010). Il lisozima è un forte enzima antibatterico, normalmente presente nei liquidi fisiologici che presenta un'azione anti Gram⁺ (Carrol e Martinez, 1979). Il fatto che tale parametro non sia variato dimostra che l'uso della vagina digitale non va a pregiudicare i parametri immunitari del liquido seminale. Per ciò che concerne lo stress ossidativo, è possibile affermare che l'utilizzo della vagina digitale ha determinato una riduzione significativa della PAO ed un tendenziale aumento dei ROMs, probabilmente in virtù della maggiore temperatura di prelievo. La quantità di proteine totali non ha risentito della tecnica utilizzata.

In conclusione l'utilizzo di una vagina artificiale digitale, con temperatura costante a 47°C, permette di ottimizzare i tempi di prelievo e di ridurre la presenza di tappo mucoso, senza modificare le caratteristiche quali-quantitative dell'ejaculato. Ulteriori studi sono necessari per l'individuazione della temperatura ottimale al fine di ridurre lo stress ossidativo del seme.

BIBLIOGRAFIA – **Adams**, C.E., 1961. Artificial insemination in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 2:521-522. **Adams**, C.E., 1987. The laboratory rabbit. In: T. Poole (ed.) *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*, 6th Edn., Longman Scientific and Technical, Avon, UK, pp. 415-35. **Boiti**, C., Castellini, C., Besenfelder, U., Theau-Clément, M., Liguori, L., Renieri, T., Pizzi, F., 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Sci.* 13:71-91. **Brecchia**, G., Cardinali, R., Mourvaki, E., Collodel, G., Moretti, E., Dal Bosco, A., Castellini, C., 2010. Short- and long-term effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on rabbit sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 118:310-316. **Bredderman**, P.J., Foote, R.H., Yassen, A.M., 1964. An improved artificial vagina for collecting rabbit semen. *J. Reprod. Fertil.* 7:401-403. **Carroll**, S.F., Martinez, R.J., 1979. Role of rabbit lysozyme in *in vitro* serum and plasma serum bactericidal reactions against *Bacillus subtilis* infect. *Immun.* 2:810-819. **Dal Bosco**, A., Scuota, S., Castellini, C., Cenci, T., 1996. Study of an artificial vagina to reduce the microbial contamination of rabbit semen. *World Rabbit Sci.* 4:201-204. **Gregoire**, A.T., Bratton, R.W., Foote, R.H., 1958. Sperm output and fertility of rabbits ejaculated either once a week or once a day for forty-three weeks. *J. Anim. Sci.* 17:243. **Macirone**, C., Walton, A., 1938. Fecundity of male rabbits as determined by "dummy matings". *J. Agric. Sci.* 28:122. **Mendoza**, C., Carreras, A., Moos, J., Tesarik, J., 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* 95:755-763. **Osserman**, E.F., Lawlor, D.P., 1996. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 124:921-952. **Sinkovics**, G., Cenci, T., Scuota, S., Dal Bosco, A., 1993. Un'idea per la F.A. *Coniglicoltura* 30(9):35-36. **StataCorp**, 2005. *Stata Statistical Software: Release 9.0*, College Station, Texas, USA. **Theau-Clement**, M., Lattaioli, P., Roustan, A., Castellini, C., 1996. A comparison between computerised semen image analyses and visual methods to evaluate various biological parameters in rabbit semen. In: *Proc. 6th World Rabbit Congress*, Toulouse, France, 2:133-137. **Walton**, A., 1958. Improvement in the design of an artificial vagina for the rabbit. *J. Physiol.* 143: 26-34.