



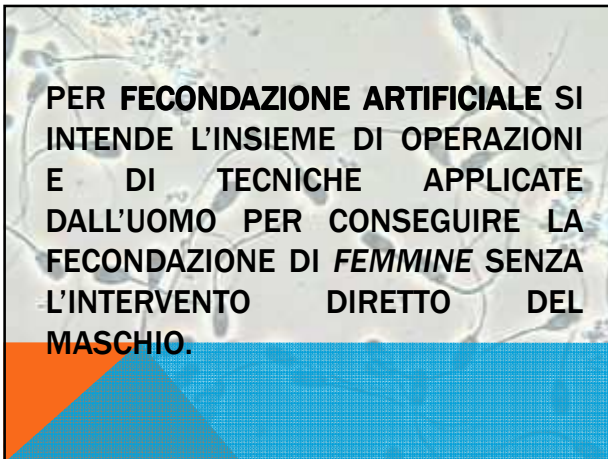
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

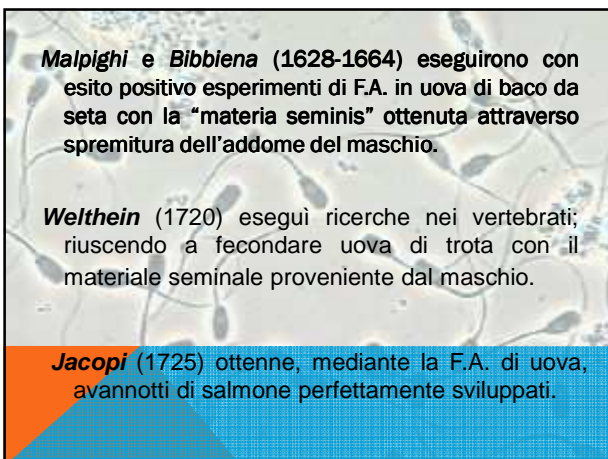
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN MEDICINA E CHIRURGIA DEL CAVALLO

FECONDAZIONE ARTIFICIALE NELLA CAVALLA

Prof. Domenico Robbe



PER FECONDAZIONE ARTIFICIALE SI INTENDE L'INSIEME DI OPERAZIONI E DI TECNICHE APPLICATE DALL'UOMO PER CONSEGUIRE LA FECONDAZIONE DI FEMMINE SENZA L'INTERVENTO DIRETTO DEL MASCHIO.



Malpighi e Bibbiena (1628-1664) eseguirono con esito positivo esperimenti di F.A. in uova di baco da seta con la "materia seminis" ottenuta attraverso spremitura dell'addome del maschio.

Welthein (1720) eseguì ricerche nei vertebrati; riuscendo a fecondare uova di trota con il materiale seminale proveniente dal maschio.

Jacopi (1725) ottenne, mediante la F.A. di uova, avannotti di salmone perfettamente sviluppati.

A PARTIRE DAL 1944, IL TERMINE DI **FECONDAZIONE ARTIFICIALE** VIENE TALVOLTA SOVRAPPOSTO O SOSTITUITO DA QUELLO DI **INSEMINAZIONE ARTIFICIALE**. QUESTA SI RIFERISCE ALLA SEMINA NELL'APPARATO GENITALE FEMMINILE, AFFINCHÉ IN ESSO POSSA AVVENIRE LO SVILUPPO DEI SUDETTI GAMETI E QUINDI IL FENOMENO NORMALE PROCREATIVO.

L'inseminazione artificiale delle specie domestiche prende origine nel 1779, in seguito alle ricerche di Lazzaro Spallanzani.

CON IL XX SECOLO, LA F. A. ENTRA NELLA FASE APPLICATIVA TROVANDO SVILUPPO IN MOLTE SPECIE ANIMALE.

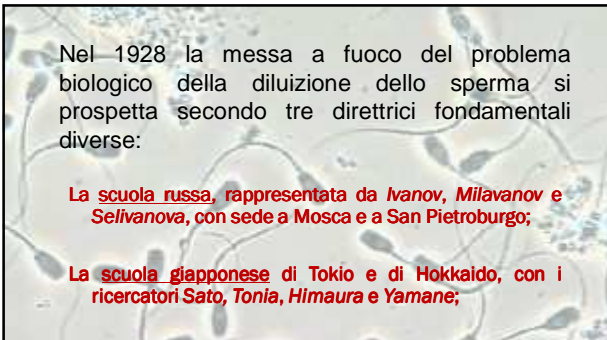
Nelle grandi specie domestiche, tale tecnica si diffuse dopo l'invenzione della *vagina artificiale* del Professor **Amantea**, dell'università di Roma, nel 1914.

Si deve a **Ivanov** la prima impostazione scientifica dell'inseminazione artificiale, grazie allo studio del materiale seminale, della biologia degli spermatozoi, della sperimentazione dei mestruai diluenti per ciascuna specie animale ecc.

Ivanov capì che l'inseminazione artificiale aveva a che fare con altri due aspetti di considerevole interesse biologico:

- *diluizione del materiale fecondante;*
- *conservazione a lungo termine in vitro.*

Kollker e **Waldeyer** (1856), eseguirono la prima diluizione dello sperma; seguiti poi da **Hoffmann** (1905).




Nel 1928 la messa a fuoco del problema biologico della diluizione dello sperma si prospetta secondo tre direttrici fondamentali diverse:

La scuola russa, rappresentata da Ivanov, Milavanov e Selivanova, con sede a Mosca e a San Pietroburgo;

La scuola giapponese di Tokio e di Hokkaido, con i ricercatori Sato, Tonia, Himauro e Yamane;

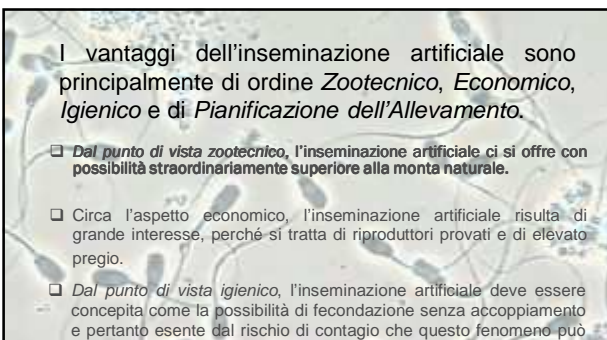
La scuola tedesca di Roemmele e Wolmeister.





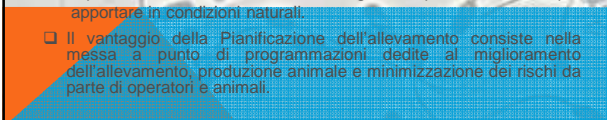
Nel 1955, il problema della diluizione dello sperma non solo viene praticamente risolto con l'ausilio dell'impiego di basse temperature (**refrigerazione**), ma s'incomincia a utilizzare su grande scala lo **sperma congelato** nell'inseminazione artificiale degli animali.





I vantaggi dell'inseminazione artificiale sono principalmente di ordine **Zootecnico, Economico, Igienico** e di **Pianificazione dell'Allevamento**.

- Dal punto di vista zootecnico, l'inseminazione artificiale ci si offre con possibilità straordinariamente superiore alla monta naturale.
- Circa l'aspetto economico, l'inseminazione artificiale risulta di grande interesse, perché si tratta di riproduttori provati e di elevato pregio.
- Dal punto di vista igienico, l'inseminazione artificiale deve essere concepita come la possibilità di fecondazione senza accoppiamento e pertanto esente dal rischio di contagio che questo fenomeno può apportare in condizioni naturali.
- Il vantaggio della Pianificazione dell'allevamento consiste nella messa a punto di programmazioni dedite al miglioramento dell'allevamento, produzione animale e minimizzazione dei rischi da parte di operatori e animali.



RACCOLTA E VALUTAZIONE DEL MATERIALE SEMINALE

Diversi metodi possono essere utilizzati per la raccolta del materiale seminale; ma da esperienza sul campo, quello con **vagina artificiale** offre la migliore garanzia. L'utilizzo della vagina artificiale aumenta l'efficienza della raccolta del seme in un programma di inseminazione artificiale e ottimizza la qualità del seme eiaculato.

Esistono diversi modelli (Missouri, Giapponese, Colorado, CSU, Polacco), ognuno con diverse particolarità, per cui la scelta si basa su specifiche esigenze e sulla preferenza del personale, al punto che si possono anche costruire personalmente secondo le necessità.



I requisiti fondamentali richiesti, però, a tutti i modelli sono:

- maneggevolezza;
- praticità nell'utilizzazione;
- alta qualità dei materiali costitutivi;
- facilità nel montare tutti i pezzi costituenti;
- praticità nel pulirla e disinfettarla dopo l'uso.



MANUTENZIONE DELLA VAGINA ARTIFICIALE

Tutti i componenti che vengono a contatto con il seme devono essere non spermicidi. Le parti riutilizzabili devono essere accuratamente pulite, asciugate e sterilizzate prima di essere nuovamente utilizzate.

Saponi o disinfettanti non possono essere utilizzati per pulire le guaine interne a causa del pericolo dei residui tossici per gli spermatozoi durante la raccolta.

Le guaine di caucciù devono essere, quindi, lavate con acqua corrente subito dopo l'uso, in quanto, se rimangono residui di smegma e non sono lavati subito, si seccano rendendo poi complicata la rimozione.

Le guaine di caucciù possono essere disinfettate immergendole in alcool etilico o isopropilico fino a 24 ore e poi vanno fatte asciugare all'aria.

Per la sterilizzazione si può usare anche l'ossido di etilene in forma gassosa. L'ideale sarebbe utilizzare dei materiali sterili "usa e getta", per evitare contaminazioni chimiche e anche la trasmissione orizzontale di malattie.



PREPARAZIONE DELLA VAGINA ARTIFICIALE PER LA RACCOLTA DEL MATERIALE SEMINALE


Prima della raccolta del seme, la camicia interna della vagina artificiale va riempita con acqua a 45-50°C per ottenere una temperatura interna di 44-48°C.



L'alta temperatura rappresenta un forte stimolo all'erezione dello stallone. La pressione che le pareti del lume eserciteranno sul pene dello stallone dovrà essere aggiustata a seconda del soggetto, e quindi, a seconda delle dimensioni dell'organo, per garantire una pressione uniforme sull'organo copulatore, senza interferire con la sua normale penetrazione.

Le superfici interne della vagina artificiale devono essere lubrificate con un gel sterile non spermicida, per favorire la penetrazione del pene.

Il contenitore per la raccolta del seme deve essere mantenuto a temperatura corporea durante la raccolta e trasportato rapidamente al laboratorio, per evitare shock termici agli spermatozoi, ancor prima dell'aggiunta di mestri diluitori protettivi.



Il seme va anche coperto per proteggerlo dalla luce.

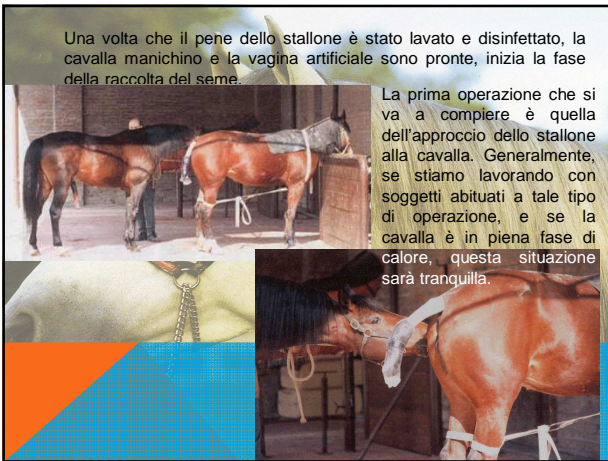
L'eiaculato è sottoposto poi a filtrazione, per eliminare l'ultima porzione eiaculata di gel, con l'intento di ottenere la frazione più ricca di spermatozoi.

La presenza di una femmina intera o ovariectomizzata è indispensabile. Se intera, per essere utilizzata per la raccolta di materiale seminale, deve mostrare segni estrali. Nel caso di cavalle ovariectomizzate, invece, l'uso può essere previsto a seconda delle esigenze e quindi sono spesso preferite proprio perché utilizzabili in ogni momento. Esse vengono trattate con estrogeni esogeni (estradiolo cipionato, 1-2 mg IM).



La "cavalla manichino" viene preparata prima di permettere la monta: si usa applicare delle balze ostetriche di contenimento agli arti posteriori. La coda viene fasciata, per evitare eventuali crini o altro tipo di inquinamento nella vagina artificiale stessa. Sul dorso e sul collo della femmina va sempre posizionata una mantellina di cuoio per proteggerla dai morsi dello stallone durante la monta.







Subito dopo la raccolta, il materiale seminale deve essere rapidamente trasportato in laboratorio e messo in termostato, per minimizzare gli insulti fisici come l'esposizione alla luce e agli shock termici.

Tutti i materiali che vengono a contatto con il materiale seminale, come i mestruai diluitori, devono essere a temperatura corporea.

L'eiaculato è innanzitutto filtrato dal gel e dai detriti estranei. Il seme è poi esaminato e se ne valutano e registrano la concentrazione, il volume e la percentuale di spermatozoi motili in maniera progressiva.

FRAZIONI DELL'EIACULATO

1° frazione: rappresenta circa il 30-40% del volume totale dell'eiaculato. Origina dalle ghiandole accessorie dell'apparato genitale (ghiandole di Cowper, e Prostata) manca di spermatozoi, reazione leggermente acida, è ricca in elettroliti ed ha un'azione stimolante gli spermatozoi;

2° frazione: rappresenta il 15-30% dell'eiaculato, origina dalle ampolle di Henle e dell'epididimo. Ricca in spermatozoi.

3° frazione: rappresenta il 20-30% dell'eiaculato, proveniente dalle ghiandole vescicolari. Ricca in sostanze tampone, dal punto di vista biologico pertanto di protezione biologica nei confronti degli spermatozoi.

EIACULAZIONE E FRAZIONI

Specie	Tempo impiegato per l'eiaculazione	Composizione
Toro	1 secondo	Singola frazione
Ariete	1 secondo	Singola frazione
Verro	5-25 minuti	Frazionato: •Priva di spermatozoi •Ricca di spermatozoi •Coagulo
Stallone	30-60 secondi	Frazionato: •Priva di spermatozoi •Ricca di spermatozoi •Muco
Cane	variabile	•Frazionato: •Seconda frazione ricca di spermatozoi
Gatto	variabile	•Frazionato
Uomo	10-30 secondi	Singola frazione ma coagulato

ESAME MACROSCOPICO

a. Volume: è una valutazione che si deve effettuare immediatamente dopo la raccolta e deve essere riferito ad una sola eiaculazione. Si effettuerà in raccoglitori graduati o immediatamente dopo il travaso dell'eiaculato in una provetta graduata

b. Colore: il colore dell'eiaculato costituisce un dato importante nella valutazione macroscopica dello sperma. Si può riconoscere una tonalità di colore particolare per ciascuna specie

c. Densità (opacità): costituisce un dato fisico di grande importanza e si riferisce alla difficoltà che ha la luce ad attraversare l'eiaculato.

d. pH: corrisponde alla concentrazione di idrogenioni nello sperma (7,2-7,4).

ESAME MICROSCOPICO

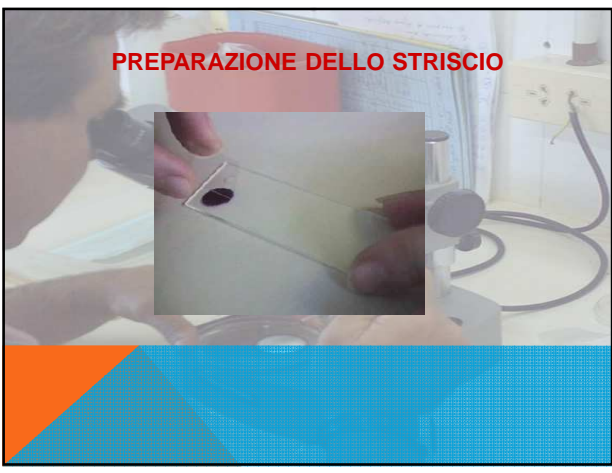
	ESAME SU SEME FRESCO	ESAME SU MATERIALE FISSATO E COLORATO
	A fresco: permette la valutazione della motilità e vitalità degli spermatozoi. Le tecniche di osservazione sono:	Fasi: Preparazione dello striscio; Fissazione (essiccamento o alcol o fiamma); Colorazione.
goccia pendente	ha l'inconveniente nella laboriosità della procedura e nell'ambiente poco idoneo per gli spermatozoi nella goccia situata tra il portaoggettivo e il coprioggettivo incavato;	1. valutazione morfologica degli spermatozoi
goccia distesa	2-3 gocce vengono distese su vetrino portaoggettivo con la pipetta pasteur; è un sistema utile per la valutazione dell'orientamento rispetto alla motilità e concentrazione degli spermatozoi;	2. valutazione, effettuare per valutare il n° di spermatozoi vivi e quelli morti (colorazione vitale); si basa sulle variazioni metaboliche che si producono dopo la morte (azione cromaticologica).
goccia schiacciata	si pone il coprioggettivo sul vetrino portaoggettivo creando quindi una sottile pellicola di materiale spermatico nella quale gli spermatozoi possono muoversi liberamente. È il sistema migliore di osservazione in quanto è possibile effettuare osservazioni con corretta messa a fuoco degli obiettivi (anche ad immersione)	in quest'ultimo tipo di colorazione si da menzionare la colorazione con eosina-nigrosina in cui solo gli spermatozoi morti si colorano (eosina) di rosa su di un fondo azzurro (nigrosina).

PARAMETRI SEMINALI MICROSCOPICI

- ❖ Motilità
- ❖ Morfologia
- ❖ Durata della motilità
- ❖ Concentrazione
- ❖ Rapporto vivi/morti
 - seme fresco
 - seme con diluente

Viene utilizzato il microscopio ottico a contrasto di fase per ingrandimenti di circa 500-600 volte (obiettivo 40x oculare 15x).





FUNZIONI DEI DILUITORI

AZIONE TAMPONE:
dopo il prelievo il pH del materiale seminale tende all'acidità per effetto dell'intenso metabolismo degli spermatozoi (il **citrato di sodio** è un'ottima sostanza tampone utilizzata allo scopo in molti mestruai diluitori);

1. **PROTEZIONE DAGLI SHOCK DA FREDDO:** il **tuorlo d'uovo** e la **glicerina** sono buone sostanze termostatiche;
2. **PROTEZIONE DEGLI SPERMATOZOI:** **proteine**;
3. **INIBIZIONE CRESCITA BATTERICA:** **antibiotici**;
4. **FORNIRE ENERGIA AI NEMASPERMI:** **zuccheri** (glucosio-fruttosio);
5. **OTTENERE PIU' DOSI DI SEME UTILI ALLA FECONDAZIONE;**
6. **AUMENTO DEI TEMPI DI POSSIBILE UTILIZZAZIONE.**



The image shows a vial of semen extender with a label that reads "SEME SEME ESTENSORE" and "ORIGINAL FORMULA".

**CARATTERISTICHE ESSENZIALI
DEI DILUITORI**

1. **Possedere una pressione osmotica e isotonica** simile a quella del sangue, ed essere idonei a mantenerla durante il tempo di conservazione;
2. **Offrire un equilibrio** adeguato di elementi minerali essenziali per la vita degli spermatozoi;
3. **Apportare le sostanze** nutritive necessarie per gli spermatozoi al fine di un metabolismo aerobico ed anaerobico;
4. **Somministrare lipoproteine** e/o lecitine che proteggano gli spermatozoi dallo "shock termico a frigore";
5. **Mettere a disposizione** sostanze con potere tampone, atte a neutralizzare i prodotti risultanti da metabolismo spermatico;
6. **Essere esenti** da sostanze contaminanti e prodotti batterici (germi) nocivi per gli spermatozoi, per l'apparato genitale delle femmine riceventi ed in definitiva per il processo della fecondazione e sviluppo embrionale successivo.

ANCORA....

- **Potere antibiotico**
- **Garanzia sanitaria di carattere assoluto;**
- **Facile preparazione e maneggevolezza;**
- **Essere formule economiche attuabili**
- **Possibilità di lunga e facile conservazione.**

PRESSIONE OSMOTICA

Bonadonna nel 1949 considerava sufficienti per prevenire gli incidenti da pressione osmotica, l'impiego di sostanze elettrolitiche comprese fra lo **0,8 e 1%**, che daranno soluzioni perfettamente tollerate dagli spermatozoi, tenendo conto che, negli eiaculati di maggiore concentrazione e scarso volume (toro, arieti ed uccelli), la loro povertà in elettroliti permette di utilizzare liquidi di concentrazione un poco maggiore; al contrario, con l'eiaculato proveniente da animali ad eiaculazione intrauterina (cavallo, cane e maiale) bisogna essere cauti a ridurre al minimo l'aggiunta di elettroliti al plasma seminale, già ricco in questi elementi.

APPORTO DI MATERIALE ENERGETICO

1. La principale fonte di energia per gli spermatozoi è rappresentata dagli zuccheri. Lo spermatozoo, come altre cellule, è capace di metabolizzare gli idrati di carbonio, mediante:
- meccanismo ossidativo aerobico, dal quale restano come residui CO_2 ed H_2O
 - meccanismo anaerobico, o di degradazione incompleta, nel quale il ciclo termina nella fase di acido lattico che si accumula.

TUORLO D'UOVO

La composizione del tuorlo è la seguente:

Acqua: 48%; Grassi: 28%; Albuminoidi: 15,27%; Lecitine: 10,7%; Colesterina: 1,7%; Minerali e pigmenti: 0,9%

Il tuorlo d'uovo si comporta come un agente meccanico che tappezza la cellula spermatica con una speciale vernice di protezione contro l'acidità e agenti nocivi di diversa natura con cui possono trovarsi gli spermatozoi nell'apparato genitale femminile, così come contro le variazioni termiche che la refrigerazione e/o il congelamento dello sperma richiede.

Il tuorlo d'uovo, mentre stimola il metabolismo del glucosio (più che quello del fruttosio), aumenta nel mestruo l'acido lattico, che può arrivare a costituire una causa biologica di necrospermia. Da qui la necessità di associare all'aggiunta del tuorlo sostanze ad azione tampone.

SOLUZIONI FOSFATE

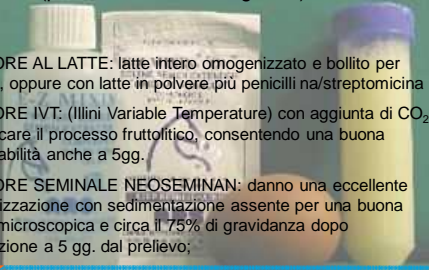
- In principio si osservò che la migliore combinazione tamponante per i mestruai era proprio la risultante dell'associazione di fosfato sodico e potassico. In effetti in questo modo si ottiene un perfetto equilibrio biologico fra ciascuno dei cationi sodio e potassio.
- Per la preparazione del mestruo si mescolano i tuorli con la soluzione di fosfato.
- Le soluzioni impiegate da MADISON erano formate da 2 g di PO_4HNa_2 diluiti in 100 ml d'acqua bidistillata. Le soluzioni di fosfato così impiegate esercitano un'azione tampone stabilizzando il pH intorno a 7, circostanza molto importante per evitare l'azione nociva che, per accumulo di acido lattico, si produrrebbe altrimenti sugli spermatozoi.

**SOLUZIONI CITRATO SODICO
(Salisbury)**



- Pare che il tuorlo d'uovo in contatto con la soluzione citrato sodico si comporti in modo alquanto differente di quanto si comporta nei confronti delle soluzioni fosfato.
- Il citrato sodico aumenta la capacità di diluizione del tuorlo nel mezzo liquido, fenomeno che favorisce l'azione del tuorlo sugli spermatozoi.
- In termini generali il tuorlo d'uovo in soluzione citrato, fa aumentare la capacità fecondante dello sperma.

**VARI TIPI DI DILUITORI
(per FA con seme refrigerato)**



1. DILUITORE AL LATTE: latte intero omogenizzato e bollito per 20'/98°C, oppure con latte in polvere più penicillina/streptomycina
2. DILUITORE IVT: (Illini Variable Temperature) con aggiunta di CO₂ per bloccare il processo fruttolifico, consentendo una buona conservabilità anche a 5gg.
3. DILUITORE SEMINALE NEOSEMINAN: danno una eccellente omogenizzazione con sedimentazione assente per una buona visione microscopica e circa il 75% di gravidanza dopo fecondazione a 5 gg. dal prelievo;

ATTUALMENTE LA FECONDAZIONE CON SEME FRESCO E L'UTILIZZO DI TALI DILUITORI VIENE EFFETTUATA SOLO PER IL CONTROLLO DEI RIPRODUTTORI IN QUANTO SOPPIANTATA DALLA FECONDAZIONE CON SEME CONGELATO.

CONSERVAZIONE DELLO SPERMA

La conservazione dello sperma dovrebbe essere fatta secondo dei tempi ben precisi e prestabiliti tra la raccolta e l'inseminazione.

I fattori che determinano la longevità degli spermatozoi e la fertilità potenziale sono riassumibili in:

- a) qualità dello sperma non diluito;
- b) percentuale di diluizione;
- c) temperatura di conservazione;
- d) tempo di conservazione e contenitore di deposito;
- e) tipo di sostanza usata nella diluizione.



Qualità dell'eiaculato:

1. volume;
2. numero di spermatozoi per millilitro;
3. numero totale di cellule seminali;
4. numero totale di cellule motili progressive;
5. numero totale di spermatozoi morfologicamente normali.

È importante massimizzare il numero di cellule morfologicamente normali e motili; e per ottenere questo è importante avere, nel centro di raccolta, stalloni sessualmente attivi. Si è visto, infatti, che questi soggetti produrranno sperma di gran lunga migliore da quello prodotto da cavalli a riposo sessuale.

Percentuale di diluizione:

- > La longevità dello sperma è riferita alla concentrazione di seme per millilitro e la percentuale alle quali è diluito.
- > Sperma molto concentrato dovrebbe essere diluito ad una percentuale maggiore rispetto alle diluizioni fatte ad un eiaculato meno concentrato.
- > È importante diluire lo sperma per ridurre gli effetti dannosi del plasma seminale; così come diluire i prodotti metabolici rilasciati dallo sperma attivo.
- > Eiaculato con meno di 100 milioni di spermatozoi/ml ed un volume alto (>150 ml) dovrebbe essere centrifugato a 300-500 giri per 10-15 minuti per recuperare lo sperma sufficiente. Si allontana, così, il plasma seminale, potendo lasciare anche un 5-10% di questo, e, a questo punto, risospendere il seme con una soluzione di diluizione e preparare le dosi fecondanti.

Il calcolo di dosi inseminanti e volume:

E' accettato, che la minima dose capace di massimizzare la fertilità nei cavalli è di 500 milioni di spermatozoi progressivamente motili.

La dose inseminante per cavalli è più sensibile alla concentrazione di sperma e alla qualità degli spermatozoi, che al volume del seme.

È suggerito che volumi maggiori di 100 ml sono troppo grandi, particolarmente nelle giovani primipare, dando luogo ad un riflesso abbastanza grande di sperma nella vagina.

D'altra parte cavalle inseminate con sperma congelato, con volumi che variano tra 0,5 a 5 ml, hanno percentuali di gravidanza accettabili nella maggior parte dei casi.

Perciò, il volume della dose del seme non sembra essere un importante fattore riguardante la fertilità.

Temperature del seme fresco, refrigerato e congelato:

La tecnica della F.A. equina, come sopra accennato, dispone di tre metodologie fecondative: con seme fresco, refrigerato e congelato

1. Seme fresco (Fresch semen): quando lo sperma è raccolto nel centro di monta e, lo stesso eiaculato, usato immediatamente nel suo stato naturale o diluito con soluzioni adatte ed usato al massimo dopo alcune ore (di solito 1 o max 3 ore) dalla raccolta.

- ✓ Nello sperma non diluito, la temperatura di mantenimento dovrebbe essere fra i 35°C ai 38°C.
- ✓ Il tempo di deposito dello sperma fresco non diluito non dovrebbe essere maggiore di 15-20 minuti.
- ✓ Se lo sperma rimarrà inutilizzato per più di 20 minuti, il seme dovrà essere assolutamente diluito con una concentrazione di 1:1 o 1:2 e messo in un ambiente senza luce e a temperatura ambiente di 18°C-20°C.



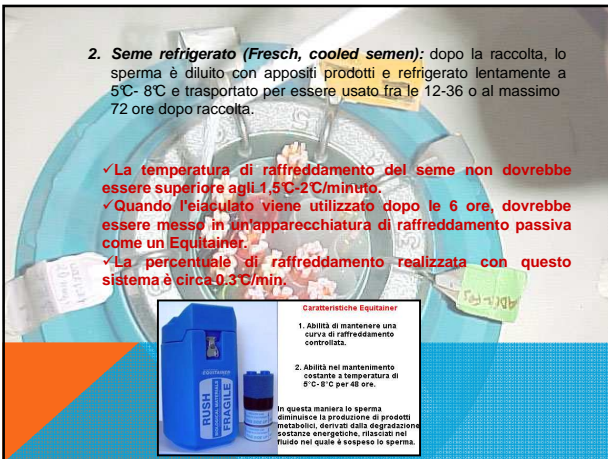
2. Seme refrigerato (Fresch, cooled semen): dopo la raccolta, lo sperma è diluito con appositi prodotti e refrigerato lentamente a 5°C- 8°C e trasportato per essere usato fra le 12-36 o al massimo 72 ore dopo raccolta.

- ✓ La temperatura di raffreddamento del seme non dovrebbe essere superiore agli 1,5°C-2°C/minuto.
- ✓ Quando l'eiaculato viene utilizzato dopo le 6 ore, dovrebbe essere messo in un'apparecchiatura di raffreddamento passiva come un Equitainer.
- ✓ La percentuale di raffreddamento realizzata con questo sistema è circa 0.3°C/min.

Caratteristiche Equitainer

1. Abilità di mantenere una curva di raffreddamento controllata.
2. Abilità nel mantenimento costante a temperatura di 5°C-8°C per 48 ore.

In questa maniera lo sperma diminuisce la produzione di prodotti metabolici, derivati dalla degradazione sostanze energetiche, miscelati nel fluido nel quale è sospeso lo sperma.

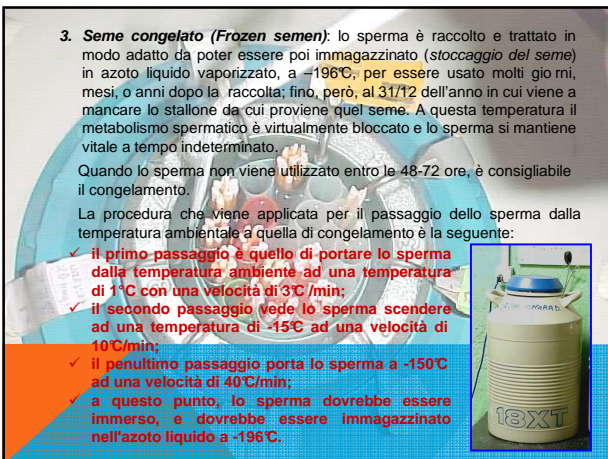


3. Seme congelato (Frozen semen): lo sperma è raccolto e trattato in modo adatto da poter essere poi immagazzinato (stoccaggio del seme) in azoto liquido vaporizzato, a -196°C, per essere usato molti giorni, mesi, o anni dopo la raccolta; fino, però, al 31/12 dell'anno in cui viene a mancare lo stallone da cui proviene quel seme. A questa temperatura il metabolismo spermatico è virtualmente bloccato e lo sperma si mantiene vitale a tempo indeterminato.

Quando lo sperma non viene utilizzato entro le 48-72 ore, è consigliabile il congelamento.

La procedura che viene applicata per il passaggio dello sperma dalla temperatura ambientale a quella di congelamento è la seguente:

- ✓ il primo passaggio è quello di portare lo sperma dalla temperatura ambiente ad una temperatura di 1°C con una velocità di 3°C/min;
- ✓ il secondo passaggio vede lo sperma scendere ad una temperatura di -15°C ad una velocità di 10°C/min;
- ✓ il penultimo passaggio porta lo sperma a -150°C ad una velocità di 40°C/min;
- ✓ a questo punto, lo sperma dovrebbe essere immerso, e dovrebbe essere immagazzinato nell'azoto liquido a -196°C.



METODOLOGIE FECONDATIVE

L'inseminazione artificiale è la tecnica che consiste nel deporre un numero adeguato di spermatozoi normali e vitali nell'utero igienicamente pulito con una durata ottimale delle cellule seminali. Anche se questa procedura possa sembrare semplice, la coordinazione adeguata di eventi dà luogo a percentuali di gravidanza ottimali.

L'inseminazione artificiale, e quindi l'utilizzo di seme fresco, refrigerato o congelato, in Italia, sono regolamentati dalla legislazione di sanità veterinaria.

Normalmente, per una diagnosi di gravidanza positiva, sono necessarie, durante un ciclo estrale, da 4 a 6 dosi di seme congelato; oppure 1-2 dosi di seme refrigerato e trasportato.

Le fattrici dovrebbero essere inseminate nel momento più vicino possibile all'ovulazione: da 0 a 24 ore prima, fino a 6 ore dopo. La fertilità, con l'utilizzo di **seme congelato**, di solito risulta più bassa che non con il seme fresco o refrigerato.

Lo **sperma refrigerato**, come del resto accade per quello **fresco**, trova il suo utilizzo o direttamente nel centro di raccolta seme, oppure viene inviato ad altri allevamenti per essere usato in un lasso di tempo che va da poche ore dalla raccolta, per il fresco, alle 48-72 ore, per il refrigerato.

Dopo raccolta, lo sperma che viene utilizzato per una inseminazione immediata o in un lasso di tempo di poche ore, viene diluito con delle sostanze adatte.

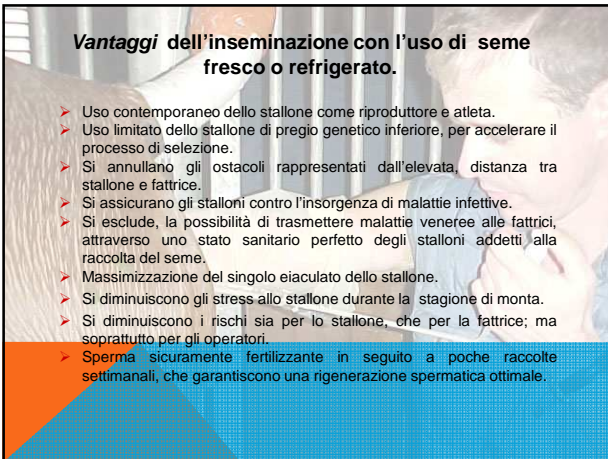
Per eiaculati che, invece, saranno utilizzati dopo sei ore, si procede attraverso una diluizione di 1:1 o 1:2 con mantenimento dello sperma a temperatura ambiente (20°) che garantirebbe agli spermatozoi un buon mantenimento della vitalità, motilità progressiva e capacità fertilizzante.

Per inseminazioni che avverranno, invece, 12-24 o, addirittura 48-72 ore dopo la raccolta dell'eiaculato, il materiale seminale deve assolutamente essere diluito con concentrazioni maggiori, dipendenti, però, sempre dalla **qualità dell'eiaculato**, dalla **concentrazione degli spermatozoi**, dalla **morfologia**, **motilità**, ecc.

Generalmente, dipendentemente dalla qualità del seme, le diluizioni possono andare da 1:3 fino ad arrivare, addirittura ad 1:10 per eiaculati altamente concentrati con spermatozoi di ottima qualità.

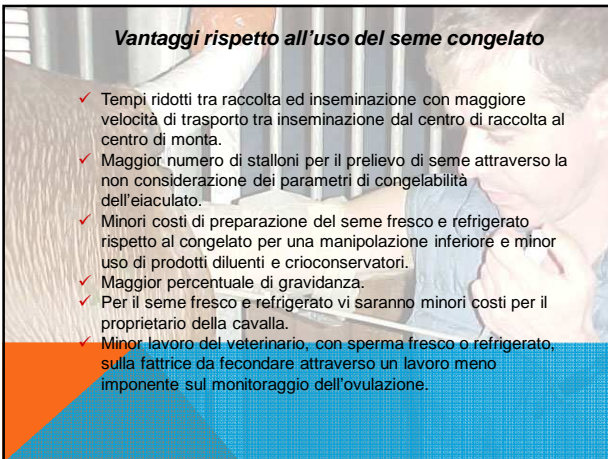
Il materiale seminale da trasportare all'esterno del centro di raccolta, dovrebbe essere diluito così che la concentrazione finale di ogni dose fecondante sarà di 25-50 milioni di cellule/ml.

Dopo raccolta e diluizione, questo dovrebbe essere refrigerato lentamente ad una velocità di 0,3°C/minuto e portato ad una temperatura finale di refrigerazione di 5°C a 8°C, così che l'attività metabolica dello sperma sia ridotta.



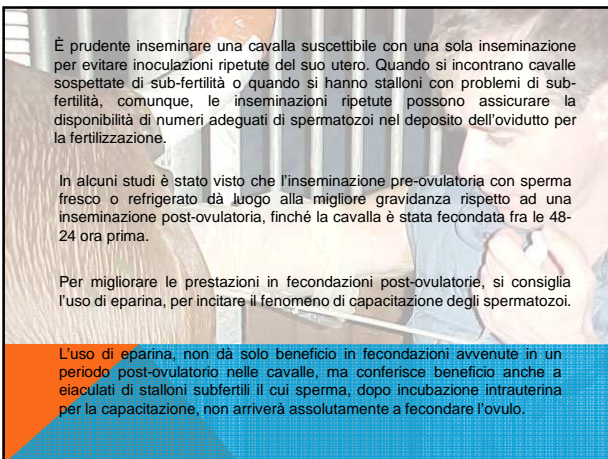
Vantaggi dell'inseminazione con l'uso di seme fresco o refrigerato.

- Uso contemporaneo dello stallone come riproduttore e atleta.
- Uso limitato dello stallone di pregio genetico inferiore, per accelerare il processo di selezione.
- Si annullano gli ostacoli rappresentati dall'elevata, distanza tra stallone e fattrice.
- Si assicurano gli stalloni contro l'insorgenza di malattie infettive.
- Si esclude, la possibilità di trasmettere malattie veneree alle fattrici, attraverso uno stato sanitario perfetto degli stalloni addetti alla raccolta del seme.
- Massimizzazione del singolo eiaculato dello stallone.
- Si diminuiscono gli stress allo stallone durante la stagione di monta.
- Si diminuiscono i rischi sia per lo stallone, che per la fattrice; ma soprattutto per gli operatori.
- Spermatozoi sicuramente fertilizzanti in seguito a poche raccolte settimanali, che garantiscono una rigenerazione spermatica ottimale.



Vantaggi rispetto all'uso del seme congelato

- ✓ Tempi ridotti tra raccolta ed inseminazione con maggiore velocità di trasporto tra inseminazione dal centro di raccolta al centro di monta.
- ✓ Maggior numero di stalloni per il prelievo di seme attraverso la non considerazione dei parametri di congelabilità dell'eiaculato.
- ✓ Minori costi di preparazione del seme fresco e refrigerato rispetto al congelato per una manipolazione inferiore e minor uso di prodotti diluenti e crioconservatori.
- ✓ Maggior percentuale di gravidanza.
- ✓ Per il seme fresco e refrigerato vi saranno minori costi per il proprietario della cavalla.
- ✓ Minor lavoro del veterinario, con sperma fresco o refrigerato, sulla fattrice da fecondare attraverso un lavoro meno imponente sul monitoraggio dell'ovulazione.



È prudente inseminare una cavalla suscettibile con una sola inseminazione per evitare inoculazioni ripetute del suo utero. Quando si incontrano cavalle sospettate di sub-fertilità o quando si hanno stalloni con problemi di sub-fertilità, comunque, le inseminazioni ripetute possono assicurare la disponibilità di numeri adeguati di spermatozoi nel deposito dell'ovidutto per la fecondazione.

In alcuni studi è stato visto che l'inseminazione pre-ovulatoria con sperma fresco o refrigerato dà luogo alla migliore gravidanza rispetto ad una inseminazione post-ovulatoria, finché la cavalla è stata fecondata fra le 48-24 ora prima.

Per migliorare le prestazioni in fecondazioni post-ovulatorie, si consiglia l'uso di eparina, per incitare il fenomeno di capacitazione degli spermatozoi.

L'uso di eparina, non dà solo beneficio in fecondazioni avvenute in un periodo post-ovulatorio nelle cavalle, ma conferisce beneficio anche a eiaculati di stalloni subfertili il cui sperma, dopo incubazione intrauterina per la capacitazione, non arriverà assolutamente a fecondare l'ovulo.

Una volta che si fa richiesta, al centro di monta, di materiale seminale, per la fecondazione di una fattrice, arriverà, nell'allevamento della cavalla da fecondare, attraverso un serbatoio di spedizione, due dosi fecondanti, conservate in paillette, pellett o altro contenitore di contenimento dello sperma.



Generalmente, gli operatori addetti alla inseminazione opereranno attraverso una prima inseminazione nel momento stesso dell'ovulazione; mentre, la seconda dose verrà immagazzinata nel contenitore della spedizione.

Teoricamente, se la prima dose è stata effettuata perfettamente nel momento dell'ovulazione, o più di lì, non avrebbe alcun senso inseminare la cavalla con la seconda dose, in quanto, anche nel giorno seguente alla prima inseminazione, si dovrebbe essere sperma disponibile a sufficienza, nelle vie genitali della cavalla, che riuscirebbe tranquillamente a fecondare l'ovocita entro il giorno prima. L'inseminazione supplementare (cioè quella necessaria) viene effettuata, 24 ore più tardi (contenendo 500 x 10⁶ di spermatozoi progressivamente motili). La seconda inseminazione offre un numero adeguati di spermatozoi per 48 ore supplementari.



L'inseminazione artificiale nella specie equina con **seme congelato** incontra, quindi, forti limitazioni oltre che per le difficoltà tecniche delle operazioni di congelamento /scongelo, anche per le peculiarità riproduttive della cavalla e per l'enorme variabilità nella congelabilità del seme non solo tra i differenti stalloni, ma anche tra eiaculati dello stesso riproduttore.

Ci sono variazioni significative nella congelabilità del seme equino anche in relazione al periodo di raccolta: *autunno, inverno, primavera ed estate*.

Attualmente, le percentuali di gravidanza per ciclo delle fattrici fecondate con seme congelato è piuttosto variabile e compresa fra valori maggiori del 70% e meno del 10%. Anche se il limite più alto potrebbe far pensare ad una applicazione su larga scala della tecnica, per molti stalloni, il tasso di gravidanza per ciclo risulta compreso fra il 25% e il 40% e questo costituisce un forte deterrente all'utilizzo del loro seme congelato.

E' innegabile che i vantaggi derivati dall'uso di seme equino congelato siano molteplici e di gran lunga superiori agli svantaggi.

Vantaggi e Svantaggi dell'inseminazione con l'uso di seme congelato.

Vantaggi	Svantaggi
uno stallone può funzionare contemporaneamente sia come riproduttore che come atleta;	percentuali di gravidanze sicuramente più basse rispetto ad inseminazioni con seme fresco o refrigerato;
uno stallone può essere utilizzato anche dopo l'insorgenza di qualsiasi forma di sterilità temporanea o definitiva e anche entro lo stesso anno dalla sua morte;	aumento del costo al proprietario della cavalla per una fecondazione con seme congelato rispetto al fresco o refrigerato;
si facilitano gli scambi di materiale genetico fra vari e paesi e vari continenti;	aumento del lavoro del veterinario sulla fattrice da fecondare attraverso un lavoro importante sul monitoraggio dell'ovulazione;
si limita l'uso di stalloni di pregio genetico inferiore, e, di conseguenza, si accelera il processo di selezione;	rischio di contaminazione delle cavalle con malattie veneree se gli stalloni non sono controllati;
si annullano gli ostacoli rappresentati dall'elevata distanza tra stallone e fattrice;	manca di protocolli standard che descrivono una procedura ufficiale per l'inseminazione delle cavalle con sperma congelato;
si assicurano gli stalloni contro l'insorgenza di malattie infettive;	
preservazione a lungo termine del seme di stalloni importanti;	
aumento della distanza raggiungibile del seme congelato rispetto a quello refrigerato;	
diminuzione dei rischi e dei costi di trasporto delle fattrici;	
riduzione della diffusione delle malattie contagiose;	
possibilità di scelta del seme di un numero maggiore di stalloni compresi quelli deceduti;	

Ogni dose inseminante dovrebbe contenere, allo scongelamento, come requisito minimo, da 100 a 400 milioni di spermatozoi con motilità progressiva. Recentemente, però, si stanno sviluppando tecniche di inseminazione profonda, mediante isteroscopio, con deposizione di microdosi di sperma (5-10 milioni) all'apice del corno, sulla papilla utero tubarica.

Il materiale seminale viene solitamente trasportato impiegando contenitori a vapori di azoto (*dry shippers*). Questi contenitori criogenici mantengono per giorni o settimane temperature vicine a quelle dell'azoto liquido (-196°C) senza che, però, ci sia, al loro interno, la presenza di azoto in forma liquida.




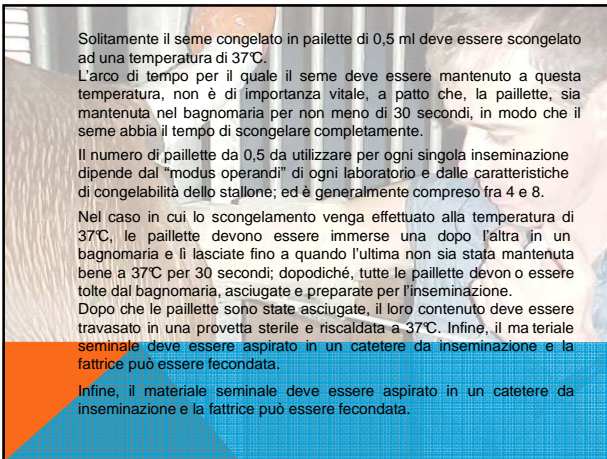

I contenitori a vapore di azoto funzionano inglobando azoto liquido in uno spessore di materiale assorbente che circonda la parete interna del contenitore nel quale è mantenuto il seme .

I processi di scongelamento espongono in modo diametralmente opposto gli spermatozoi agli stessi tipi di stress osservati durante il congelamento. Gli spermatozoi si reidratano non appena l'acqua attraversa nuovamente la membrana cellulare in modo da bilanciare lo squilibrio osmotico creato dallo scioglimento del ghiaccio intracellulare, le proteine ed i lipidi della membrana cellulare si riorganizzano ed infine le sostanze crioprotettici fuoriescono dalle cellule spermatiche.

Nel caso in cui lo scongelamento del materiale seminale sia fatto in modo improprio (troppo velocemente o troppo lentamente rispetto al protocollo di congelamento) si incorre in un decremento della vitalità spermatica, nonché in una riduzione della probabilità di ottenere una gravidanza.

Per questo motivo, il materiale seminale congelato, dovrebbe sempre essere spedito **assieme** ad istruzioni dettagliate su come effettuare lo scongelamento.





Solitamente il seme congelato in paillette di 0,5 ml deve essere scongelato ad una temperatura di 37°C.

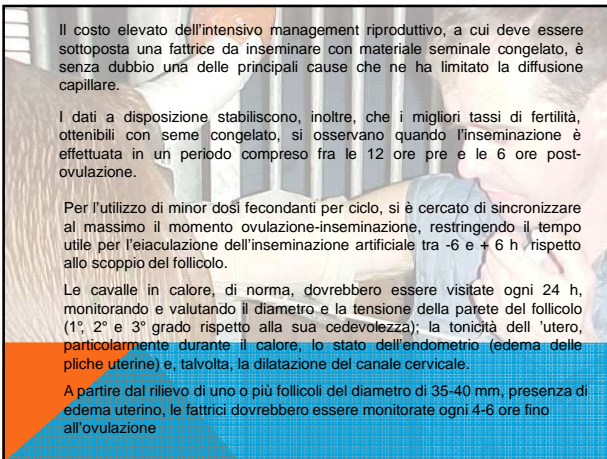
L'arco di tempo per il quale il seme deve essere mantenuto a questa temperatura, non è di importanza vitale, a patto che, la paillette, sia mantenuta nel bagnomaria per non meno di 30 secondi, in modo che il seme abbia il tempo di scongelare completamente.

Il numero di paillette da 0,5 da utilizzare per ogni singola inseminazione dipende dal "modus operandi" di ogni laboratorio e dalle caratteristiche di congelabilità dello stallone; ed è generalmente compreso fra 4 e 8.

Nel caso in cui lo scongelamento venga effettuato alla temperatura di 37°C, le paillette devono essere immerse una dopo l'altra in un bagnomaria e li lasciate fino a quando l'ultima non sia stata mantenuta bene a 37°C per 30 secondi; dopodiché, tutte le paillette devono essere tolte dal bagnomaria, asciugate e preparate per l'inseminazione.

Dopo che le paillette sono state asciugate, il loro contenuto deve essere travasato in una provetta sterile e riscaldata a 37°C. Infine, il materiale **seminale deve essere aspirato in un catetere da inseminazione e la fattrice può essere fecondata.**

Infine, il materiale seminale deve essere aspirato in un catetere da inseminazione e la fattrice può essere fecondata.



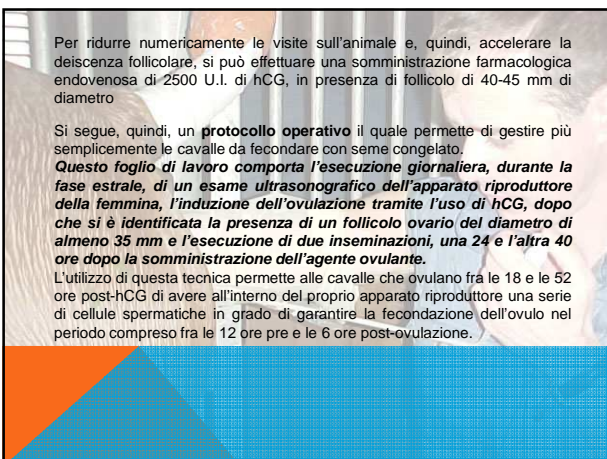
Il costo elevato dell'intensivo management riproduttivo, a cui deve essere sottoposta una fattrice da inseminare con materiale seminale congelato, è senza dubbio una delle principali cause che ne ha limitato la diffusione capillare.

I dati a disposizione stabiliscono, inoltre, che i migliori tassi di fertilità, ottenibili con seme congelato, si osservano quando l'inseminazione è effettuata in un periodo compreso fra le 12 ore pre e le 6 ore post-ovulazione.

Per l'utilizzo di minor dosi fecondanti per ciclo, si è cercato di sincronizzare al massimo il momento ovulazione-inseminazione, restringendo il tempo utile per l'ejaculazione dell'inseminazione artificiale tra -6 e + 6 h rispetto allo scoppio del follicolo.

Le cavalle in calore, di norma, dovrebbero essere visitate ogni 24 h, monitorando e valutando il diametro e la tensione della parete del follicolo (1°, 2° e 3° grado rispetto alla sua cedevolezza); la tonicità dell'utero, **particolarmente durante il calore, lo stato dell'endometrio (edema delle pliche uterine) e, talvolta, la dilatazione del canale cervicale.**

A partire dal rilievo di uno o più follicoli del diametro di 35-40 mm, presenza di edema uterino, le fattrici dovrebbero essere monitorate ogni 4-6 ore fino all'ovulazione.

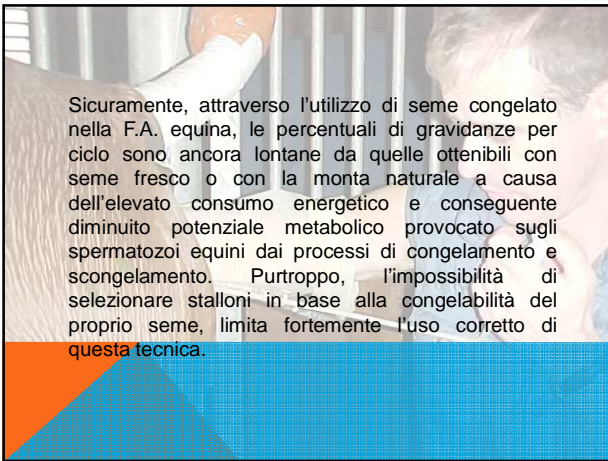


Per ridurre numericamente le visite sull'animale e, quindi, accelerare la deiscenza follicolare, si può effettuare una somministrazione farmacologica endovenosa di 2500 U.I. di hCG, in presenza di follicolo di 40-45 mm di diametro.

Si segue, quindi, un **protocollo operativo** il quale permette di gestire più semplicemente le cavalle da fecondare con seme congelato.

Questo foglio di lavoro comporta l'esecuzione giornaliera, durante la fase estrale, di un esame ultrasonografico dell'apparato riproduttore della femmina, l'induzione dell'ovulazione tramite l'uso di hCG, dopo che si è identificata la presenza di un follicolo ovarico del diametro di almeno 35 mm e l'esecuzione di due inseminazioni, una 24 e l'altra 40 ore dopo la somministrazione dell'agente ovulante.

L'utilizzo di questa tecnica permette alle cavalle che ovulano fra le 18 e le 52 ore post-hCG di avere all'interno del proprio apparato riproduttore una serie di cellule spermatiche in grado di garantire la fecondazione dell'ovulo nel periodo compreso fra le 12 ore pre e le 6 ore post-ovulazione.



Sicuramente, attraverso l'utilizzo di seme congelato nella F.A. equina, le percentuali di gravidanze per ciclo sono ancora lontane da quelle ottenibili con seme fresco o con la monta naturale a causa dell'elevato consumo energetico e conseguente diminuito potenziale metabolico provocato sugli spermatozoi equini dai processi di congelamento e scongelamento. Purtroppo, l'impossibilità di selezionare stalloni in base alla congelabilità del proprio seme, limita fortemente l'uso corretto di questa tecnica.

MODUS OPERANDI NELL'INSEMINAZIONE DELLA CAVALLA

A differenza della vacca, la cavalla viene fecondata per via transvaginale e la cannula da fecondazione viene guidata dalla mano dell'operatore, protetta da un guanto sterile lubrificato con gel non spermicida, fino alla cervice ed introdotta in utero.

Le metodologie impiegate per l'inseminazione artificiale della cavalla sono le seguenti:

- ❖ **METODO ITALIANO:**
- ❖ **METODO RUSSO:**
- ❖ **METODO PORTOGHESE**

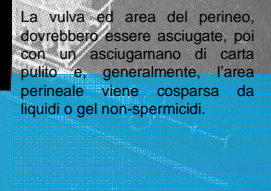

	Metodo italiano	Metodo russo	Metodo portoghese
promotori	Bonadonna	Salaman	Guerriero
Strumentario	Siringa tipo Luer raccordata ad un catetere lungo 40 cm che termina a forma di olio; Speculum; Pinza a forcompressione.	Siringa raccordata ad un catetere di gomma di una certa consistenza.	Sonde speciali (portacapsule).
Procedure	Non è necessario pinzare il canale cervicale, come si raccomanda per l'A. bovina. Basta introdurre uno speculum nella vagina e localizzato il canale cervicale, introdurre attraverso questo, il catetere e depositare nell'utero la dose di sperma spinto a mezzo della siringa. Fra la siringa ed il catetere esiste un raccordo in gomma che, protegge il catetere dalla rottura in seguito a movimenti dell'animale; sul raccordo si applica una pinza a forcompressione che verrà allentata nel momento di iniettare lo sperma. Successivamente si richiude la pinza attorno al raccordo per evitare il reflusso dello sperma, e carica la siringa con aria, dopo avere allentato di nuovo la pinza per permettere all'aria, passando, di iniettare anche lo sperma contenuto nel catetere.	L'operatore introduce la mano munita di guanto nella vagina, localizza il canale cervicale e apprezza in questo modo direttamente il grado di rilassamento del canale cervicale stesso, ecc. Successivamente si introduce il catetere di gomma che, orientato e portato fra le dita dell'operatore, passa attraverso il canale cervicale, mentre con le dita lo si dilata, dando così passaggio fra queste, con facilità, al catetere. L'iniezione di sperma spinto dalla siringa si esegue con assoluta facilità in quanto tale operazione è estremamente semplice. Per ultimo, le dita che hanno dato passaggio al catetere, lo comprimono; il catetere che passa fra le dita, viene così spremuto, spingendo nell'utero il materiale contenuto; è tuttavia raccomandabile anche l'iniezione di aria per lo svuotamento di tutto lo sperma contenuto nel catetere stesso. Viene raccomandato, una volta ritirato il catetere di gomma dal canale cervicale, di afferrare la porzione vaginale della cervice fra le dita e compriamla con movimenti bruschi di scuotimento verso l'alto. Lo scopo è di favorire la proiezione dell'ejaculato verso l'estremità cervicale delle corna uterine. L'inseminazione termina ritirando il braccio dalla vagina e rimuovendo l'aria che può restare in essa, mediante un movimento obliquo della mano che comprime la vulva e il vestibolo vulvare verso il basso.	Mediante sonde speciali (portacapsule), si collocano in utero capsule che contengono la dose di sperma adeguata per l'inseminazione. Alorché queste capsule si sciolgono nell'ambiente uterino, lo sperma resta in libertà e pronto alla fecondazione.

PROCEDURA INSEMNATIVA

La coda della cavalla è bendata ed allacciata per toglierla dal contatto con la vulva ed il perineo .

La vulva è lavata bene con sapone liquido e sciacquata completamente con acqua.

Questa procedura è ripetuta per un minimo di tre volte anche l'area sarà completamente liberata anche dai più piccoli frammenti di sporcizia.



La vulva ed area del perineo, dovrebbero essere asciugate, poi con un asciugamano di carta pulito e, generalmente, l'area perineale viene cosparsa da liquidi o gel non-spermicidi.



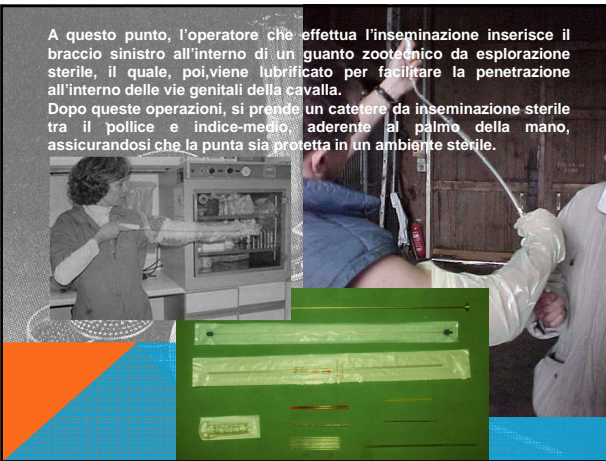
Classificazione endometrite cavalla secondo Kenney

- **Categoria I** (endometrio normale): non atrofia e ipoplasia ghiandolare. Eventuali alterazioni infiammatorie di lieve entità. Possibilità di gravidanza a termine **90%**.
- **Categoria II A** (alterazioni endometiali di lieve entità): moderata infiltrazione nello strato compatto. La fibrosi riguarda ramificazioni ghiandolari con nidi di 1 o 2 per 5 mm di mucosa. Moderata distensione cistica ghiandolare con atrofia e lacune linfatiche. Possibilità di gravidanza a termine **40-50%**.

- **Categoria II B** (moderate alterazioni endometriali): diffusa moderata infiltrazione dello strato compatto. La fibrosi è più accentuata con 2 o 4 nidi per 5 mm di superficie endometriale. Distensione e atrofia ghiandolare più evidenti. Possibilità di gravidanza a termine **10-40%**.
- **Categoria III** (alterazioni endometriali severe): flogosi diffusa con grave infiltrazione dello strato compatto. Fibrosi diffusa con nidi in numero di 5 per 5 mm di superficie. Diffusa e severa degenerazione cistica e atrofia ghiandolare. Possibilità di gravidanza a termine **minore del 10%**.

A questo punto, l'operatore che effettua l'inseminazione inserisce il braccio sinistro all'interno di un guanto zootecnico da esplorazione sterile, il quale, poi, viene lubrificato per facilitare la penetrazione all'interno delle vie genitali della cavalla.

Dopo queste operazioni, si prende un catetere da inseminazione sterile tra il pollice e indice-medio, aderente al palmo della mano, assicurandosi che la punta sia protetta in un ambiente sterile.



È importantissimo che la sostanza che si utilizza per la lubrificazione del guanto e della pipetta sia non-spermicida. Lo sperma preparato dovrebbe essere contenuto, anch'esso, in una siringa non-spermicida e protetto nella mano dalle condizioni ambientali e dai raggi della luce, raggi ultravioletti (UV), freddo, calore, ed aria.

L'operatore inserisce il guanto attraverso le labbra della vulva della cavalla, nella volta vaginale ed inserisce uno o due dita attraverso l'ostio cervicale, continuando sempre a proteggere la punta del catetere da inseminazione. Le dita che mantengono il catetere si comportano come una guida per l'avanzamento del catetere da inseminazione attraverso la cervice, e, subito dopo nell'utero, per circa 1 cm.

Se l'avanzamento della pipetta non ha incontrato nessuna resistenza nell'utero, può avanzare in maniera attenta e dolce nel corno uterino desiderato (di solito in quello dove c'è il follicolo in sviluppo).

Sembra ragionevole in un programma di inseminazione artificiale mimare gli eventi dell'accoppiamento naturale. Così, chiusura manuale gentile dell'ostio cervicale esterno durante la rimozione del catetere e massaggio vigoroso della volta vaginale, può impedire il reflusso di sperma dell'utero.

EVENTI FISIOLGICI

L'incontro tra l'occita della cavalla e lo spermatozoo (evento fertilizzante) ha luogo nell'ampolla dell'ovidotto. Di fronte ad interazione tra l'occita e lo spermatozoo, hanno luogo numerosi eventi fisiologici che devono verificarsi affinché abbia luogo la fusione tra i due gameti. Lo sperma che è stato depositato nell'utero della cavalla, è spinto verso l'ovidotto da forti contrazioni uterine.

A questo punto, gli spermatozoi devono subire la capacitazione, fenomeno che prevede una reazione a livello dell'acrosoma, attraverso una serie complessa di eventi che danno luogo ad un rimodellamento della membrana plasmatica dello sperma con conseguente rilascio di specifici enzimi che abilitano lo sperma a penetrare l'occita.

Dopo ovulazione, l'occita rimane nell'ovidotto per un corto periodo che è di circa 12 ore; come indicato dalle percentuali di gravidanza basse di cavalle inseminate con un lasso di tempo maggiore di 12 ore dopo ovulazione.

FATTORI CHE CONTRIBUISCONO AL SUCCESSO

Breeding Soundness Examination (BSE)	Fertilità propria dello sperma	Esperienza dell'operatore
<p>L'età di una cavalla è un fattore importante sulla sua fertilità, non solo attraverso il cambiamento strutturale età-associata del suo utero, ma anche attraverso la produzione qualitativa scadente e meno numerosa di oociti vitali, con conseguente produzione di embrioni di qualità scadente.</p> <p>Nell'inseminazione artificiale, un punto fondamentale è la scelta di soggetti adatti per massimizzare la riuscita della fecondazione, attraverso un'attenta valutazione delle cavalle con esami sanitari adeguati sulla procreazione.</p> <p>Un BSE di una cavalla non solo consiste della sua storia e segnalamento, ma anche della sua salute attuale e dello stato riproduttivo generale.</p> <p>Altre prove routinarie di BSE include esami vaginali e cervicali, con l'ausilio di uno speculuto, esame transrettale per l'esplorazione dell'apparato riproduttore, studio citologico culturale delle cellule dell'endometrio; ed una biopsia dello stesso. Risultati di queste prove possono eliminare candidate che trasportano in se alcune patologie di procreazione che fino ad ora non erano mai state visualizzate. Risultati di un esame di biopsia dell'epitelio endometriale rappresentano un obiettivo importante per stabilire le percentuali di gravidanza a termine.</p>	<p>La fertilità dello sperma è valutata nel migliore dei modi attraverso l'esame delle percentuali di gravidanza per ciclo. Comunque, perché questi dati non sono disponibili sempre, molti ricercatori stanno esaminando altre tecniche di valutazione per stimare la fertilità dello stallone (Fertility Test).</p>	<p>Anche se le tecniche d'inseminazione attuali sono procedure relativamente semplici, il tempismo preciso della fecondazione e gli eventi che seguono tale operazione richiedono molta esperienza veterinaria e pratiche specializzate. La persona responsabile all'inseminazione della cavalla deve essere al corrente, anche, delle nozioni sulle tecniche di valutazione dello sperma. Anche il professionista più specializzato deve usare l'attrezzatura corretta per la pratica riproduttiva, come un ecografo, un incubatorio, un microscopio di buona qualità, e bagni di acqua a temperatura controllata. La familiarità con la manipolazione ormonale del ciclo estrale è un attrezzo di gestione prezioso.</p>
