

Istituto Sperimentale Italiano “Lazzaro Spallanzani”

IL CONTROLLO UFFICIALE DEL SEME

- ANNO 1999 -

Ministero delle Politiche Agricole e Forestali

D.M. 27 dicembre 1994

INDICE

	pag.
CONTROLLI UFFICIALI DEL SEME	5
MODALITA' DI CAMPIONAMENTO DEL SEME	5
VERIFICA CORRETTA AUTOCERTIFICAZIONE	6
VERIFICA CORRETTA IDENTIFICAZIONE	12
RISULTATI:	19
CAMPIONAMENTI	21
VERIFICA CORRETTA AUTOCERTIFICAZIONE	21
VERIFICA CORRETTA IDENTIFICAZIONE	22
TABELLE:	23
PRODUZIONE SEMINALE ED IMPORTAZIONE	27
CAMPIONAMENTI EFFETTUATI E VERIFICA CORRETTA AUTOCERTIFICAZIONE	35
STATISTICHE ANALISI SEMINALI	43
ESTRAZIONI DNA EFFETTUATE E VERIFICA CORRETTA IDENTIFICAZIONE	61

CONTROLLI UFFICIALI DEL SEME

I controlli di qualità del materiale seminale, introdotti dal DM 172/94 (regolamento della Legge n. 30 del 15 gennaio 1991) sono stati operativamente regolamentati dal DM del 27.12.94 e l'attività di controllo è stata demandata all'Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani (di seguito indicato come Istituto).

Il controllo viene eseguito sulle partite di materiale seminale congelato distribuito in Italia (di produzione nazionale o di importazione) utilizzando un campione riguardante almeno il 10% di tali partite.

MODALITA' DI CAMPIONAMENTO DEL SEME

È stata ricercata una modalità di campionamento che consentisse di ottenere i risultati previsti dalla normativa in essere e nello stesso tempo non inficiasse le esigenze operative dei Centri di produzione seme (di seguito indicati come Centri). A tal fine è stato messo a punto, in collaborazione con i Centri, il seguente protocollo.

*Il lunedì di ogni settimana i Centri inviano all'Istituto il listato contenente le partite di seme congelato **prodotte o importate** la settimana precedente. Il listato deve contenere il nome commerciale del riproduttore, la matricola del riproduttore, il numero identificativo della partita ed il numero di paillettes prodotte o importate (per partita).*

Entro il venerdì della settimana d'invio del listato i Centri ricevono l'eventuale comunicazione, in merito alla data di campionamento e alle partite campionate, in caso contrario le partite indicate nel listato non vengono campionate.

Al momento del campionamento, eseguito presso i Centri, devono essere disponibili le autocertificazioni. I risultati delle valutazioni analitiche vengono comunicati ai Centri nel più breve tempo possibile (generalmente in cinque giorni lavorativi). Se al momento del campionamento non sono disponibili le autocertificazioni, queste possono essere inviate all'Istituto successivamente, ma la data di riferimento per l'invio dei risultati analitici parte dalla data di ricevimento delle autocertificazioni da parte dell'Istituto.

L'autocertificazione deve contenere i valori relativi alle seguenti variabili: concentrazione totale (CT) (milioni/paillette), motilità progressiva (MP) (%) e numero di spermatozoi progressivamente mobili (NSPM) (milioni/paillette). Per quest'ultima variabile il Centro può fornire l'intervallo di confidenza al 99% o richiedere che sia calcolato dall'Istituto in base alle misure di variabilità intra-partita eseguite nell'ambito del progetto finalizzato MiRAAF-RAIZ.

Nel seguente schema viene riportato il calendario di lavoro presso un Centro in cui l'Istituto prevede di eseguire un campionamento al mese (eseguito su di un singolo listato settimanale).

SETTIMANA 1	SETTIMANA 2	SETTIMANA 3	SETTIMANA 4	SETTIMANA 5	SETTIMANA 6
Produzione	Invio listati Avviso di campionamento Campionamento Produzione	Trasmissione risultati			
		Invio listati nessun avviso* Produzione	Invio listati nessun avviso* Produzione	Invio listati nessun avviso* Produzione	Invio listati Avviso di campionamento Campionamento

* Nessun campionamento sulla produzione della settimana precedente.

VERIFICA CORRETTA AUTOCERTIFICAZIONE

Presso i laboratori dell'Istituto viene effettuata l'analisi qualitativa del materiale seminale dopo scongelamento per quanto concerne la concentrazione e la motilità progressiva al fine di determinare il numero di spermatozoi progressivamente mobili (NSPM) che rappresenta il parametro di riferimento qualitativo.

I NSPM vengono confrontati con le autocertificazioni prodotte dai Centri: in caso di mancata concordanza tra NSPM calcolato dall'Istituto e il valore minimo per questa partita dichiarato dal Centro, viene effettuata una ulteriore analisi su un secondo campione della stessa partita. In caso di ulteriore mancata concordanza la partita viene definita A.E. (Autocertificazione Errata) ed il Centro deve modificare l'autocertificazione. La correzione dell'autocertificazione errata è l'unico adempimento richiesto al Centro in fase di commercializzazione del seme.

MODALITA' DI ANALISI DEL SEME

La valutazione del materiale seminale congelato prevede le seguenti fasi:

1. Scongelamento del seme;
2. Determinazione della concentrazione;
3. Determinazione della motilità;
4. Analisi dei dati.

Conteggio: viene eseguito il conteggio medio di 5 quadrati piccoli su 4 quadrati grandi, nei due reticoli della camera di Burker, per un totale di 8 quadrati grandi:

$$[(A1...A5 + B1...B5 + C1...C5 + D1...D5) + (A1...A5 + B1...B5 + C1...C5 + D1...D5)] / 8$$

Il conteggio viene effettuato sui due reticoli di 2 camere, con due diverse aliquote di materiale seminale. La distribuzione degli spermatozoi all'interno dei reticoli della camera di Burker dovrebbe seguire una distribuzione di Poisson. Dal momento che non risulta possibile accertare il fatto durante le valutazioni routinarie, vengono scartati, nell'ambito degli otto conteggi eseguiti nei due reticoli di ogni camera, il conteggio più alto e quello più basso. In tal modo la media ottenuta si approssima bene alla mediana della distribuzione delle classi di frequenza delle conte nei quadrati grandi, ottimizzando il risultato.

Calcolo: dato che la superficie di un quadrato piccolo è 0,04 mm², l'altezza di un quadrato piccolo è 0.10 mm, il volume di un quadrato piccolo è 0.004 mm³ e il volume di 5 quadrati piccoli è 0.020 mm³, il calcolo della concentrazione viene eseguito utilizzando la seguente formula:

$$C = N * (1 / V5) * FD * FC$$

dove:

C = concentrazione spermatica / ml;

N = numero di spermatozoi contati in 5 quadrati piccoli;

1 = riferimento ad 1 ml;

V5 = volume di 5 quadrati piccoli (1 / V5 consente il calcolo del numero di

spermatozoi in 1 mm³);

FD = fattore di diluizione (1:20 = 20);

FC = fattore di conversione (mm³ → ml = 1000).

Per il seme congelato, si utilizza un tasso di diluizione di 1:20 (50 µl di seme e 950 µl di NaCl sol. 7%) e pertanto la formula diventa:

$$C = N * (1 / 0.020) * 20 * 1000$$

Coulter Counter

Preparazione del campione: il materiale seminale viene diluito 1+5 con Sodio lauril-solfato sol. 10% (p/v), poi diluito 1+1 con 0.5N di NaOH. Ad una incubazione di 15' a temperatura ambiente segue una diluizione 1+200

in 0.1M di Sodio citrato contenente 0.025% di Sodio azide e 0.1% di Triton X-100.

Strumentazione e settaggio: vengono utilizzati, per la specie bovina, due diversi modelli di contatori elettronici di particelle (Coulter-Counter mod. ZM e mod. Z1) entrambi muniti di un foro capillare da 100 μm . La calibrazione dei due strumenti e':

mod.ZM - rilevazione di particelle con un diametro e volume della sfera equivalente di 2.340 μm e di 6.715 μm^3 (soglia inferiore= 3.8%, soglia superiore= 99.9%).

mod.Z1 - rilevazione di particelle con un diametro e volume della sfera equivalente di 2.485 μm e di 8.035 μm^3 (soglia inferiore= 12.6 %, soglia superiore= 52.6 %). Essendo stata verificata variabilita' nel corretto settaggio fra differenti strumenti, tale settaggio e' da considerarsi corretto solo per lo strumento in uso presso il laboratorio di andrologia dell'Istituto Spallanzani.

Riferimenti bibliografici: Galli et al. (1997) Atti XXIX Congr. Naz. SIB; Parks et al. (1985) J. Dairy Sci., 68:2329.

3. Determinazione della motilita'

La valutazione della motilita' consente di misurare le variabili di tipo cinetico, delle quali quella d'interesse per il controllo ufficiale del seme e' la motilita' progressiva. La misura viene eseguita tramite videomicrografia computerizzata.

Videomicrografia computerizzata

Preparazione del campione e videoregistrazione: 2 aliquote da 10 μl ciascuna vengono poste su 2 diverse camere di Makler preriscaldate a 37° C, dalle quali vengono videoregistrati 8 campi microscopici (15" ciascuno), tramite microscopio a contrasto di fase dotato di obiettivo 20x a contrasto di fase negativo e di tavolinetto termostato tarato a 37° C.

Strumentazione: l'analisi viene eseguita tramite un analizzatore automatico d'immagine: HTM-IVOS v.10.7 (Hamilton Thorne research) per le specie bovina, bufalina, equina e suina e SM-CMA v.4.3 (Stromberg-Mika, Medical equipment) per la specie ovina.

Misure eseguite: vengono misurate: la velocita' lineare (VSL), data dalla distanza fra la prima e l'ultima posizione assunta dallo spermatozoo (percorso rettilineo) diviso il tempo; la velocita' curvilinea (VCL), data dalla

somma dei segmenti sottesi fra le varie posizioni della traiettoria dello spermatozoo (percorso curvilineo) diviso il tempo; la *average-path-velocity* (VAP), data dal rapporto fra la lunghezza della traiettoria dello spermatozoo, calcolata tramite algoritmo utilizzando la media mobile, ed il tempo. Gli spermatozoi sono considerati mobili per VAP superiore ad un valore di riferimento impostato nel settaggio e diverso a seconda della specie (la percentuale di tali spermatozoi rappresenta la motilità totale). La velocità media di spostamento (VM) è la media delle VAP di tutti gli spermatozoi classificati come mobili. La motilità progressiva (MP) viene valutata in modo differente dai due strumenti:

- *HTM-IVOS* - esclude dal numero di spermatozoi mobili quelli che posseggono un rapporto VSL/VAP inferiore a 80%: THRESHOLD STRAIGHTNESS (80%);
- *SM-CMA* - esclude dal numero di spermatozoi mobili quelli che presentano movimento circolare che vengono determinati calcolando il numero di punti d'intersezione fra il percorso rettilineo (calcolato dal punto d'inizio a quello di fine della traiettoria) ed il percorso calcolato tramite algoritmo di media mobile. Se il numero di intersezioni è uguale a due, lo spermatozoo sarà classificato con movimento circolare se il raggio della traiettoria è inferiore al raggio di riferimento definito precedentemente nel settaggio dello strumento. Se invece il numero di intersezioni è maggiore di due o se il raggio della traiettoria è superiore al raggio di riferimento, lo spermatozoo sarà classificato come progressivamente mobile.

Per entrambi gli analizzatori l'analisi viene effettuata su un minimo di quattro campi microscopici analizzando almeno 200 spermatozoi.

Settaggio: per le specie bovina, bufalina, suina ed equina viene utilizzato l'HTM-IVOS mentre per la specie ovina l'SM-CMA. L'HTM-IVOS ha un sistema di discriminazione degli spermatozoi basato sulla determinazione degli oggetti in movimento, pertanto viene definito il valore minimo di taglia (MINIMUM CELL SIZE) e di luminosità (MINIMUM CONTRAST) che un oggetto deve avere per essere riconosciuto. Per l'analisi e la discriminazione degli spermatozoi immobili vengono utilizzate le medie della dimensione e dell'intensità di luce degli oggetti in movimento. Al fine di una corretta discriminazione, risulta di fondamentale importanza la calibrazione dello strumento (MAGNIFICATION) tramite Camera di Makler. Se in un campo ci sono meno di 4 cellule mobili l'analizzatore utilizza i parametri NON-MOTILE HEAD SIZE e NON-MOTILE HEAD INTENSITY. Le cellule ferme di un determinato campione sono soggette ad ulteriore esclusione se la loro dimensione e la loro intensità non rientra nei range definiti con STATIC HEAD SIZE LIMITS e con STATIC HEAD INTENSITY LIMITS. Con il range STATIC ELONGATION LIMITS è possibile eliminare le particelle che hanno forma rotonda.

Lo spermatozoo viene considerato nell'analisi solo se e' seguito per un minimo di 10 tracce (SORT - DATA POINTS= 10-30). Il numero massimo di tracce e' 30 (FRAMES ACQUIRED). La classificazione degli spermatozoi si basa sulla velocità di spostamento degli stessi.

Specie bovina e bufalina:

- MINIMUM CELL SIZE = 25 pix
- MINIMUM CONTRAST = 15
- NON-MOTILE HEAD SIZE = 60 pix
- NON-MOTILE HEAD INTENSITY = 50
- STATIC HEAD SIZE LIMITS = 0.19-5.55
- STATIC HEAD INTENSITY LIMITS = 0.52-10.00
- STATIC ELONGATION LIMITS = 0-50 %
- statiche = ferme
- lente = $VAP < 24.9 \mu\text{m/sec}$ o $VSL < 20 \mu\text{m/sec}$ (LOW VAP CUT-OFF = $24.9 \mu\text{m/sec}$ e LOW VSL CUT-OFF = $20 \mu\text{m/sec}$)
- medie = $24.9 < VAP < 25 \mu\text{m/sec}$ (MEDIUM VAP CUT-OFF= $25 \mu\text{m/sec}$)
- rapide = $VAP > 25 \mu\text{m/sec}$.

Sono considerate mobili le cellule classificate come medie e rapide.

Specie suina:

- MINIMUM CELL SIZE = 30 pix
- MINIMUM CONTRAST = 20
- NON-MOTILE HEAD SIZE = 60 pix
- NON-MOTILE HEAD INTENSITY = 50
- STATIC HEAD SIZE LIMITS = 0.19-5.55
- STATIC HEAD INTENSITY LIMITS = 0.52-10.00
- STATIC ELONGATION LIMITS = 0-50 %
- statiche = ferme
- lente = $VAP < 14.9 \mu\text{m/sec}$ o $VSL < 10 \mu\text{m/sec}$ (LOW VAP CUT-OFF = $14.9 \mu\text{m/sec}$ e LOW VSL CUT-OFF = $10 \mu\text{m/sec}$)
- medie = $14.9 < VAP < 15 \mu\text{m/sec}$ (MEDIUM VAP CUT-OFF= $15 \mu\text{m/sec}$)
- rapide = $VAP > 15 \mu\text{m/sec}$.

Sono considerate mobili le cellule classificate come medie e rapide.

Specie equina:

- MINIMUM CELL SIZE = 28 pix
- MINIMUM CONTRAST = 20
- NON-MOTILE HEAD SIZE = 47 pix
- NON-MOTILE HEAD INTENSITY = 40
- STATIC HEAD SIZE LIMITS = 0.19-5.55
- STATIC HEAD INTENSITY LIMITS = 0.52-3.00
- STATIC ELONGATION LIMITS = 0-72 %
- statiche = ferme
- lente = $VAP < 14.9 \mu\text{m/sec}$ o $VSL < 10 \mu\text{m/sec}$ (LOW VAP CUT-OFF = $14.9 \mu\text{m/sec}$ e LOW VSL CUT-OFF = $10 \mu\text{m/sec}$)
- medie = $14.9 < VAP < 15 \mu\text{m/sec}$ (MEDIUM VAP CUT-OFF= $15 \mu\text{m/sec}$)
- rapide = $VAP > 15 \mu\text{m/sec}$.

Sono considerate mobili le cellule classificate come medie e rapide.

Specie ovina:

viene utilizzato l'SM-CMA. La superficie per il riconoscimento di uno spermatozoo e' compresa tra 15 e 60 pixel (1 pixel=0.492 μm , dopo calibrazione con Camera di Makler); il numero di immagini (FRAME) per singolo spermatozoo varia da un minimo di 14 ad un massimo di 32; la VAP perche' uno spermatozoo sia classificato mobile deve essere superiore a 20 $\mu\text{m/sec}$; il livello di grigio viene settato manualmente all'inizio di ogni analisi.

Riferimenti bibliografici: Davis R.O. e Katz D.F. (1993) J. Andrology, 15 (5):385; Signori T., Balduzzi D., Bornaghi V., Galli A. (1997) Atti 9° Meet. Nazionale su "Studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico".

4. Analisi dei dati

I dati vengono caricati in apposito database ed analizzati utilizzando procedure automatiche.

VERIFICA CORRETTA IDENTIFICAZIONE

La verifica della corretta identificazione (VCI) viene eseguita mediante il confronto fra specifici marcatori genetici (microsatelliti) del DNA estratto dagli spermatozoi in esame rispetto al DNA di riferimento (prevalentemente estratto dai leucociti del sangue periferico) del riproduttore. Nel caso di mancata concordanza fra i frammenti di DNA della partita in esame l'analisi

viene eseguita su di un secondo campione della stessa partita. Se viene nuovamente a mancare la concordanza fra DNA di riferimento e quello del seme, la partita viene definita I.E. (Identificazione Errata) e dovrà essere distrutta dal Centro produttore.

I campioni biologici per l'estrazione del DNA di riferimento vengono inviati dai Centri all'entrata del riproduttore nei propri impianti. Il DNA estratto viene quindi stoccato in azoto liquido in apposito magazzino. Le VCI vengono eseguite amplificando insieme aliquote di DNA di riferimento e di DNA estratto dal lotto di seme campionato, quindi i risultati dell'amplificazione vengono analizzati "in parallelo", al fine di evitare fonti di variabilità laboratoristica. Se il risultato del confronto fra DNA di riferimento e DNA del seme di un riproduttore campionato per la prima volta risulta non corretto, prima di procedere alla seconda analisi su un ulteriore campione di seme dello stesso lotto (per accertare ufficialmente la I.E.) viene eseguita la verifica del DNA di riferimento, richiedendo al Centro un ulteriore campione biologico, corredato da un ciuffo di peli, del riproduttore.

METODOLOGIA ANALITICA

La metodologia analitica prevede le seguenti fasi:

1. Estrazione del DNA dal sangue (DNA di riferimento) e/o dal seme;
2. Dosaggio del DNA;
3. Amplificazione del DNA;
4. Analisi dei frammenti;
5. Acquisizione ed analisi dei dati.

1. Estrazione del DNA

Viene utilizzato il kit Genomic DNA extraction -Genomix- Talent s.r.l. (1).

Seme

Campioni da 350 µl di materiale seminale scongelato vengono posti in una provetta, miscelati con 800 µl di PBS e centrifugati per 5' a 10000 rpm. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet viene risospeso in 150 µl di PBS e vengono successivamente aggiunti 600 µl di "soluzione di lisi" (1) e 20 µl di Ditionitrito (DTT) 1M. Segue infine una incubazione per 10' a 68°C nel bagnetto termostato. Nel frattempo ad una provetta "gel barrier" centrifugata per 1' a 10000 rpm vengono aggiunti 600 µl di cloroformio e 50 µl di "soluzione acidificante" (1). Terminata l'incubazione dei campioni, il lisato viene trasferito nella "gel barrier" e si agita energicamente in modo da mescolare bene le due fasi. Dopo centrifugazione per 3' a 14000 rpm, la fase

acquosa viene trasferita in una provetta dove vengono aggiunti 900 μl di “soluzione precipitante” (1). Quindi si agita fino ad ottenere un filamento, si elimina il surnatante dopo centrifugazione per 2' a 10000 rpm e si risospende il pellet in 500 μl di “soluzione exchange” (1) e in 1 ml di etanolo assoluto freddo. Si mescola, si centrifuga per 2' a 10000 rpm e si elimina il surnatante. Successivamente il pellet viene lavato con 1 ml di etanolo 70% e ricentrifugato per 2' a 10000 rpm. Dopo eliminazione del surnatante e disidratazione, il pellet viene risospeso in un volume adeguato di una soluzione di TE (Tris-HCl 10mM ed EDTA 0.2mM) pH 8 ed incubato per almeno due ore in termostato a 55°C, prima della fase di dosaggio.

Sangue

Aliquote da 600 μl di sangue, contenuto in provette EDTA (K_3), vengono poste in provette, incubate per 1 ora a 37°C, diluite con 1.2 ml di “soluzione di lavaggio per il sangue modificata” (1), agitate e centrifugate per 15' a 5300 rpm. Dopo eliminazione del surnatante, il pellet viene risospeso in 150 μl di PBS, 150 μl di soluzione di lavaggio e 600 μl di “soluzione di lisi” (1). Si mescola e si incuba per 10' a 68°C nel bagnetto termostato. Per le successive fasi si procede come per il seme. Alla fine, il pellet viene risospeso in 250 μl di TE pH 8 e incubato per almeno due ore in termostato a 55°C, prima della fase di dosaggio.

2. Dosaggio del DNA

La determinazione della quantità di DNA viene eseguita utilizzando 7 μl di DNA.

Spettrofotometro

La determinazione viene eseguita utilizzando uno spettrofotometro (GeneQuant II- Pharmacia) alle seguenti lunghezze d'onda:

- 260 nm per la lettura del DNA (A_{260});
- 280 nm e 320 nm per la lettura delle impurità (A_{280} ; A_{320}).

Prima di procedere alla lettura dei campioni, si esegue il settaggio e la calibrazione dello strumento in modo tale che i valori di assorbanza alle diverse lunghezze d'onda siano 0.0000 AU (Absorbance Units).

Seme

Il dosaggio viene effettuato con lo scopo di diluire i campioni alle concentrazioni comprese tra 20 ng/ μl e 40 ng/ μl , quantità consigliate per la successiva amplificazione (PCR).

Misurazione del campione

I parametri utili per le opportune diluizioni del campione sono:

- concentrazione non inferiore a 10 ng/μl
- *ratio*, che indica il rapporto A_{260}/A_{280} , compresa fra 1.5 e 1.8.

I campioni con valori di concentrazione compresi fra 10 ng/μl e 40 ng/μl non vengono diluiti.

I campioni con valori di concentrazione superiori a 40 ng/μl devono essere diluiti ad una concentrazione finale di 25 ng/μl aggiungendo un volume di TE così calcolato:

$$VTE = (CDNA / 25) * VDNA - VDNA$$

dove:

VTE = volume in μl di TE da aggiungere;

CDNA = concentrazione misurata di DNA

VDNA = Volume di risospensione - volume di DNA usato per la lettura.

Sangue

La concentrazione del DNA ottenuto da sangue viene determinata allo scopo di costituire per ciascun campione una quantità minima di DNA tale da permettere l'effettuazione del test di identità per almeno 10 anni, come previsto dal DM. 27.12.1994.

Misurazione del campione

I parametri utili per le opportune diluizioni del campione sono:

- concentrazione non inferiore a 20 ng/μl
- *ratio*, che indica il rapporto A_{260}/A_{280} , compresa fra 1.5 e 1.8.

I campioni con valori di concentrazione compresi fra 20 ng/μl e 40 ng/μl non vengono diluiti mentre quelli con valori di concentrazione superiori a 40 ng/μl devono essere diluiti. Dei 250 μl di DNA ottenuti dall'estrazione, 100 μl vengono conservati indiluiti mentre 140 μl vengono diluiti ad una concentrazione finale di 25 ng/μl aggiungendo un volume di TE così calcolato:

$$VTE = (CDNA / 25) * 140 \mu l - 140 \mu l$$

dove:

VTE = volume in μl di TE da aggiungere;

CDNA = concentrazione misurata di DNA

3. Amplificazione del DNA

Viene utilizzato il kit Stock Marks for Bovine Paternity PCR Typing - Perkin Elmer Applied Biosystem (2).

L'amplificazione dei microsatelliti del DNA avviene tramite una reazione chiamata PCR (Polimerase chain reaction - reazione a catena della polimerasi), utilizzando come *primers* sequenze oligonucleotidiche specifiche. Per i bovini vengono utilizzati i seguenti *primers*:

TGLA 122: 5'AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C 3'

TGLA 126: 5'TTG GTC TCT ATT CTC TGA ATA TTC C 3'

TGLA 227: 5'ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA 3'

Per il DNA ottenuto da seme vengono utilizzati oligonucleotidi fluorescinati in giallo (HEX) mentre per quello ottenuto da sangue oligonucleotidi fluorescinati in blu (6-carboxyfluoresceina: 6-FAM).

La reazione di amplificazione si svolge in un termociclatore Gene Amp PCR System 9700 Perkin Elmer seguendo il protocollo fornito dalla stessa ditta. 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) (2)
- miscela di nucleotidi (dNTPs) 1.25 mM (2)
- DNA Polimerasi DNA dipendente (AmpliTaQ Gold - 5U/μl) (2)

4. Analisi dei frammenti

Dopo l'amplificazione, aliquote di ciascuna PCR dello stesso toro vengono miscelate e diluite. A 1μl di questa miscela, vengono aggiunti: standard interno (Genescan Tamra 350) (2), formamide e loading buffer. Lo standard interno viene aggiunto per permettere l'assegnazione automatica delle dimensioni dei microsatelliti e per normalizzare le eventuali differenze date dalla mobilità elettroforetica. Il mix così ottenuto viene caricato in un gel denaturante di poliacrilamide (40%) e la separazione elettroforetica viene condotta in un Sequenziatore automatico 373 DNA Sequencer Stretch (Perkin Elmer).

5. Acquisizione ed analisi dei dati

I dati vengono collezionati ed analizzati in automatico dal software di cui dispone il sequenziatore (Genescan e Genotyper) e la dimensione allelica viene espressa in paia di basi (bp). Successivamente vengono caricati automaticamente in apposito database ed analizzati.

La VCI è corretta quando la differenza allelica fra seme e sangue è inferiore a 2 bp; la VCI è errata quando la differenza allelica risulta uguale/superiore a 2 bp (sul primo e sul secondo campione di seme).

Riferimenti bibliografici: Galli A., Valente N., Bongioni G., Pozzi A., Aleandri R. (1997) Atti XXXII Simposio Internazionale di Zootecnia.

(1) Talent, Genomic DNA Extraction-Genomix Kit, Trieste.

(2) Perkin Elmer Corporation, StockMarks™ for Cattle Paternity Bovine PCR Typing Kit Protocol, Foster City - San Francisco (CA).

RISULTATI

CAMPIONAMENTI

Durante il 1999 sono stati considerati 23 Centri di produzione seme e 12 Importatori funzionalmente collegati ai Centri di produzione seme, come riportato in tabella 1.

Il campionamento ha interessato 2226 partite su di un totale di 18626 prodotte per le specie bovina (tabelle 7 e 2), 36 partite su 295 prodotte per la specie equina (tabelle 8 e 3), 5 partite su 49 prodotte per la specie suina (tabelle 9 e 4), 209 partite su 1836 importate per la specie bovina (tabelle 10 e 5) e 18 partite su 212 importate per la specie equina (tabelle 11 e 6) con delle percentuali di campionamento pari rispettivamente al 12.0%, 12.2%, 10.2%, 11.4% e 8.5%.

I soggetti impiegati per la produzione di seme congelato sono stati 1660. Quelli interessati al campionamento sono stati 1090 , di cui 910 (su 1205) per la specie bovina di produzione nazionale, 22 (su 38) per la specie equina di produzione nazionale, 5 (su 23) per la specie suina di produzione nazionale, 138 (su 333) per l'importazione della specie bovina e 15 (su 61) per l'importazione della specie equina.

I sopralluoghi eseguiti presso i Centri e gli Importatori sono stati complessivamente 249 di cui 160 per la specie bovina (tabella 7), 13 per la specie equina (tabella 8), 2 per la specie suina (tabella 9), 67 per l'importazione della specie bovina (tabella 10) e 7 per l'importazione della specie equina (tabella 11).

VERIFICA CORRETTA AUTOCERTIFICAZIONE

Su un totale di 2495 partite controllate, sono state evidenziate 65 partite (2.6 %) definite ufficialmente A.E. di cui 25 su 2226 (1.1%) per la specie bovina (tabella 7), 2 su 36 (5.6 %) per la specie equina (tabella 8), 33 su 209 (15.8 %) per l'importazione della specie bovina (tabella 10) e 5 su 21 (23.8 %) per l'importazione della specie equina (tabella 11).

Nelle tabelle 12-26 vengono riportate le statistiche descrittive relative ai risultati ottenuti dall'analisi del seme eseguita dall'Istituto ed ai valori di autocertificazione prodotti da ciascun Centro suddivisi per specie e per variabile analizzata.

Nella tabella 27 viene considerata la variabile Δ NSPM calcolata come NSPM(Istituto)-NSPM(Centro). E' stata poi calcolata la differenza fra la media di Δ NSPM per ogni Centro e la media generale e tale scarto e' stato espresso in Unita' di Errore Standard (UES). I Centri con il valore dello scarto

nella fascia di sinistra misurano il NSPM in maniera significativamente maggiore (sovrastimano) a quanto fa l'Istituto, i Centri che ricadono nella fascia centrale misurano in maniera analoga a quanto fa l'Istituto, i Centri con i valori nella fascia di destra misurano il NSPM in maniera significativamente minore (sottostimano) a quanto fa l'Istituto.

VERIFICA CORRETTA IDENTIFICAZIONE

L'attività di estrazione del DNA da utilizzare quale riferimento ufficiale ha permesso la realizzazione di un magazzino di stoccaggio riguardante, alla fine del 1999, 2898 tori interessati alla produzione di seme congelato a livello nazionale (tabella 28) e 247 tori relativi a seme congelato di importazione (tabella 30).

Sono stati eseguiti 2348 confronti fra DNA di riferimento ufficiale e DNA estratto dal seme campionato. In particolare 2218 hanno riguardato il seme congelato di produzione nazionale e 130 il seme congelato d'importazione. Sono state evidenziate 3 partite con Verifica Corretta Autocertificazione Errata per il seme congelato di produzione nazionale.

TABELLE

TABELLA N . : 1
ANNO : 1999
VARIABILE : CENTRI DI PRODUZIONE E IMPORTATORI
SPECIE : BOVINA, CAPRINA, EQUINA, OVINA E SUINA

CENTRO/IMPORTATORE	SPECIE	CODIFICA
ABS ITALIA - CAVATIGOZZI (CR) collegata a COFA	BOVINA	ABS
ANABORAPI - CARRU' (CN)	BOVINA	ANABORAPI
ANABORAVA - GRESSAN (AO)	BOVINA	ANABORAVA
ALL. CENTAURO (FG) collegata a STUDIO VETERINARIO CRISTELLA	EQUINA	CENTAURO
ALL. LE FONTANETTE - VIGONE (TO)	EQUINA	LE FONTANETTE
ALL. TONIATTI - S. MICHELE AL TAGLIAMENTO (VE)	EQUINA	TONIATTI
ALPENSEME - TOSS (TN)	BOVINA	ALPENSEME
BEST SIRES - PESCHIERA BORROMEO (MI) collegata a INTERMIZOO	BOVINA	BEST SIRES
CENTRO PRODUZIONE DOTT. SOCCINI - NUVOLENTO (BS)	EQUINA	SOCCINI
CENTRO REGIONALE DEL FRIULI - MORUZZO (UD)	BOVINA EQUINA	CT-UDINE
CENTRO STALLONI INTERMIZOO - VIGONZA (PD)	EQUINA	CS-INTERMIZOO
CENTRO TORI CHIACCHIERINI - CIVITELLA D'ARNA (PG)	BOVINA	CT-PERUGIA
CENTRO TORI DI MACERATA - MACERATA	BOVINA	CT-MACERATA
CFA ROCCA PRIORA - FALCONARA MAR. (AN)	SUINA	CT-ANCONA
CIZ - CENTRO TORI PARMA	BOVINA	CIZ-PR
CIZ - CENTRO TORI S. MINIATO - LA SERRA (PI)	BOVINA CAPRINA OVINA	CIZ-PI
COFA - TIDOLO DI SOSPIRO (CR)	BOVINA	COFA
COOP. ALLEVATORI SAN FRANCESCO - TORINO collegata a CENTRO REGIONALE DEL FRIULI	BOVINA	S. FRANCESCO
COSAPAM - PESCHIERA BORROMEO (MI) collegato a INTERMIZOO	BOVINA	COSAPAM
CPFA CURTATONE - CURTATONE (MN)	BOVINA	CT-CURTATONE
ELPZOO - ZORLESCO DI CASALPUSTERLENGO (LO)	BOVINA SUINA	ELPZOO
EURO GENETIC - MAZZANO (BS) collegato a STUDIO VETERINARIO CRISTELLA	EQUINA	EURO GENETIC
GENETICA 2000 - BARCO DI BIBBIANO (RE)	BOVINA	GENETICA 2000
INTERMIZOO - S. DONA' DI PIAVE (VE)	BOVINA	INTERMIZOO
ITAL GENETICS - VARESE	BOVINA	ITALGENETICS
LA BASSETTA - CAVRIAGO (RE) collegato a CENTRO PRODUZIONE DOTT. SOCCINI	EQUINA	LA BASSETTA
PONTE ALTO - LENTIGIONE DI BRESCELLO (RE) collegato a STUDIO VETERINARIO CRISTELLA	EQUINA	PONTE ALTO

TABELLA N . : 1 (segue)
ANNO : 1999
VARIABILE : CENTRI DI PRODUZIONE E IMPORTATORI
SPECIE : BOVINA, CAPRINA, EQUINA, OVINA E SUINA

CENTROIMPORTATORE	SPECIE	CODIFICA
QUALITY SEMEN - PODENZANO (PC) collegato a GENETICA 2000	BOVINA EQUINA	QUALITY SEMEN
SCUDERIA ORSI MANGELLI - SAN GIOVANNI IN PERSICETO (BO)	EQUINA	ORSI MANGELLI
SEMENITALY - DIEGARO DI CESENA (FO)	BOVINA	SEMENITALY-FO
SEMENITALY - SALICETA S. GIULIANO (MO)	BOVINA	SEMENITALY-MO
SEMEX ITALIA - CODOGNO (MI) collegato a GENETICA 2000	BOVINA	SEMEX ITALIA
STUDIO GENETICO - S. ZENONE DEGLI EZELINI (TV) collegato a STUDIO VETERINARIO CRISTELLA	EQUINA	STUDIO GENETICO
STUDIO VETERINARIO CRISTELLA - S. DANIELE PO (CR)	EQUINA	CRISTELLA
TRESAC GENESI - PONTERANICA (BG) collegato a STUDIO VETERINARIO CRISTELLA	EQUINA	TRESAC

PRODUZIONE SEMINALE ED IMPORTAZIONE

TABELLA N. : 2
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : PAILLETTES E PARTITE DICHIARATE
SPECIE : BOVINA

CENTRO	PAILLETTES PRODOTTE	PARTITE PRODOTTE
ALPENSEME	514629	1023
ANABORAPI	388942	1043
ANABORAVA	59068	238
CIZ-PI	1000445	2012
CIZ-PR	245986	635
COFA	543761	1541
CT-CURTATONE	207320	1277
CT-MACERATA	23144	111
CT-PERUGIA	304535	814
CT-UDINE	263840	819
ELPZOO	1036339	2198
GENETICA 2000	550265	2121
INTERMIZOO	411749	1594
ITALGENETICS	37311	249
SEMENITALY-FO	235779	880
SEMENITALY-MO	701919	2071
TOTALE	6525032	18626

TABELLA N. : 3
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : PAILLETES E PARTITE DICHIARATE
SPECIE : EQUINA

CENTRO	PAILLETES PRODOTTE	PARTITE PRODOTTE
CRISTELLA	11080	57
CS-INTERMIZOO	731	9
CT-UDINE	2039	20
LE FONTANETTE	3412	36
ORSI MANGELLI	5073	86
SOCCINI	1399	22
TONIATTI	4538	65
TOTALE	28272	295

TABELLA N. : 4
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : PAILLETES E PARTITE DICHIARATE
SPECIE : SUINA

CENTRO	PAILLETES PRODOTTE	PARTITE PRODOTTE
CT-ANCONA	3542	28
ELPZOO	922	21
TOTALE	4464	49

TABELLA N. : 5
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : PAILLETTES E PARTITE DICHIARATE
SPECIE : BOVINA

CENTRO\ IMPORTATORE	CENTRO COLLEGATO	PAILLETTES IMPORTATE	PARTITE IMPORTATE
ALPENSEME		5136	20
ABS	COFA	154816	313
BEST SIRES	INTERMIZOO	45807	151
CIZ-PI		7768	35
CIZ-PR		27246	98
COSAPAM	INTERMIZOO	85749	236
CT-UDINE		19920	102
ELPZOO		20393	67
GENETICA 2000		29424	143
INTERMIZOO		17276	54
ITALGENETICS		49207	103
QUALITY SEMEN	GENETICA 2000	43491	82
SEMENITALY-MO		21873	102
SEMEX ITALIA	GENETICA 2000	143389	312
S.FRANCESCO	CT-UDINE	1295	18
TOTALE		672790	1836

TABELLA N. : 6
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : PAILLETTES E PARTITE DICHIARATE
SPECIE : EQUINA

CENTRO\ IMPORTATORE	CENTRO COLLEGATO	PAILLETTES IMPORTATE	PARTITE IMPORTATE
CENTAURO	CRISTELLA	240	2
CRISTELLA		342	21
EURO GENETIC	CRISTELLA	599	12
LA BASSETTA	SOCCINI	9027	97
LE FONTANETTE		406	14
PONTE ALTO	CRISTELLA	40	2
QUALITY SEMEN	CRISTELLA	2282	29
STUDIO GENETICO	CRISTELLA	358	4
TRESAC	CRISTELLA	2909	31
TOTALE		16203	212

**CAMPIONAMENTI EFFETTUATI E VERIFICA
CORRETTA AUTOCERTIFICAZIONE**

TABELLA N. : 7
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : CAMPIONAMENTI EFFETTUATI E PARTITE A.E.
SPECIE : BOVINA

CENTRO	NUMERO CAMPIONAMENTI	PARTITE PRODOTTE CAMPIONATE	PARTITE PRODOTTE A.E.
ALPENSEME	12	120	4
ANABORAPI	11	127	0
ANABORAVA	4	22	0
CIZ-PI	12	240	1
CIZ-PR	11	76	1
COFA	11	182	4
CT-CURTATONE	11	154	5
CT-MACERATA	6	14	0
CT-PERUGIA	11	93	0
CT-UDINE	11	108	0
ELPZOO	11	259	5
GENETICA 2000	11	255	0
INTERMIZOO	11	189	1
ITALGENETICS	7	34	4
SEMENITALY-FO	9	106	0
SEMENITALY-MO	11	247	0
TOTALE	160	2226	25

TABELLA N. : 8
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : CAMPIONAMENTI EFFETTUATI E PARTITE A.E.
SPECIE : EQUINA

CENTRO	NUMERO CAMPIONAMENTI	PARTITE PRODOTTE CAMPIONATE	PARTITE PRODOTTE A.E.
CRISTELLA	3	6	2
CS-INTERMIZOO	1	1	0
CT-UDINE	2	3	0
LE FONTANETTE	2	6	0
ORSI MANGELLI	3	9	0
SOCCINI	1	3	0
TONIATTI	1	8	0
TOTALE	13	36	2

TABELLA N. : 9
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : CAMPIONAMENTI EFFETTUATI E PARTITE A.E.
SPECIE : SUINA

CENTRO	NUMERO CAMPIONAMENTI	PARTITE PRODOTTE CAMPIONATE	PARTITE PRODOTTE A.E.
ELPZOO	1	2	0
CT-ANCONA	1	3	0
TOTALE	2	5	0

TABELLA N. : 10
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : CAMPIONAMENTI EFFETTUATI E PARTITE A.E.
SPECIE : BOVINA

CENTRO\ IMPORTATORE	NUMERO CAMPIONAMENTI	PARTITE IMPORTATE CAMPIONATE	PARTITE IMPORTATE A.E.
ALPENSEME	1	2	0
ABS	8	37	5
BEST SIRES	7	16	5
CIZ-PI	1	3	0
CIZ-PR	4	10	0
COSAPAM	7	26	11
CT-UDINE	5	11	0
ELPZOO	4	8	0
GENETICA 2000	5	18	0
INTERMIZOO	3	7	0
ITALGENETICS	6	12	8
QUALITY SEMEN	3	8	0
SEMENITALY-MO	4	11	0
SEMEX ITALIA	8	37	4
S. FRANCESCO	1	3	0
TOTALE	67	209	33

TABELLA N. : 11
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : CAMPIONAMENTI EFFETTUATI E PARTITE A.E.
SPECIE : EQUINA

CENTRO\ IMPORTATORE	NUMERO CAMPIONAMENTI	PARTITE IMPORTATE CAMPIONATE	PARTITE IMPORTATE A.E.
EURO GENETIC	1	2	0
LA BASSETTA	3	11	5
LE FONTANETTE	1	2	0
QUALITY SEMEN	1	2	0
STUDIO GENETICO	1	1	0
TOTALE	7	18	5

STATISTICHE ANALISI SEMINALE

TABELLA N. : 12
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : CONCENTRAZIONE TOTALE (CT) (milioni/paillette)
SPECIE : BOVINA

CENTRO	CT (CENTRO) (media±dev.std)	CT (CENTRO) (min-max)	CT (ISTITUTO) (media±dev.std)	CT (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
ALPENSEME	14.03±1.67	11.42-19.94	13.30±3.77	5.10-29.80	126
ANABORAPI	17.25±2.10	13.40-24.80	17.06±3.92	9.30-30.60	127
ANABORAVA	13.17±0.55	12.08-13.80	15.87±3.57	7.80-21.60	23
CIZ-PI	15.90±1.55	8.00-20.00	15.40±5.44	5.40-41.60	248
CIZ-PR	14.73±1.92	9.00-19.00	15.95±6.32	6.10-42.60	79
COFA	16.21±2.12	10.00-26.00	15.92±4.33	5.10-35.20	190
CT-CURTATONE	25.64±9.97	9.00-69.00	22.55±10.60	5.40-57.30	163
CT-MACERATA	40.89±0.91	39.40-42.45	38.21±6.60	31.90-54.20	14
CT-PERUGIA	11.63±2.13	8.00-20.00	22.13±10.07	8.10-67.40	93
CT-UDINE	21.10±2.40	16.06-28.60	22.62±4.08	12.70-44.80	108
ELPZOO	15.67±2.29	7.41-21.25	13.81±2.38	6.60-21.00	269
GENETICA 2000	22.16±3.07	12.00-30.00	25.69±6.86	10.80-48.20	255
INTERMIZOO	15.76±2.43	7.90-24.00	17.32±3.17	9.70-27.70	190
ITALGENETICS	10.86±0.88	8.00-12.50	16.52±8.29	7.30-46.50	40
SEMENITALY-FO	28.08±10.57	10.90-56.20	25.35±8.49	11.30-55.40	109
SEMENITALY-MO	16.75±4.88	8.00-38.20	16.41±4.73	6.50-33.8	240
TOTALE	18.00±6.28	7.41-69.00	18.44±7.38	5.10-67.40	2274

TABELLA N. : 13
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : CONCENTRAZIONE TOTALE (CT) (milioni/paillette)
SPECIE : EQUINA

CENTRO	CT (CENTRO) (media±dev.std)	CT (CENTRO) (min-max)	CT (ISTITUTO) (media±dev.std)	CT (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
CRISTELLA	88.13±5.30	75.00-90.00	58.55±12.53	43.20-78.80	8
CS-INTERMIZOO	60.00	60.00	66.20	66.20	1
CT-UDINE	105.57±20.97	86.00-127.70	106.33±5.13	102.00-112.00	3
LE FONTANETTE	50.00	50.00	88.15±31.28	45.50-122.00	6
ORSI MANGELLI	103.33±30.41	90.00-180.00	125.54±54.41	63.00-209.00	9
SOCCINI	64.00±10.50	52.00-71.50	ND	ND	3
TONIATTI	159.50±51.69	107.00-253.00	107.76±30.46	67.40-149.80	8
TOTALE	99.47±45.77	50.00-253.00	96.41±41.29	43.20-209.00	38

ND = non determinato

TABELLA N. : 14
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : CONCENTRAZIONE TOTALE (CT) (milioni/paillette)
SPECIE : SUINA

CENTRO	CT (CENTRO) (media±dev.std)	CT (CENTRO) (min-max)	CT (ISTITUTO) (media±dev.std)	CT (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
CT-ANCONA	499.33±209.56	287.00-706.00	419.50±28.25	391.00-447.50	3
ELPZOO	460.00±56.57	420.00-500.00	433.70±38.04	406.80-460.60	2
TOTALE	483.60±152.39	287.00-706.00	425.18±28.66	391.00-460.60	5

TABELLA N. : 15
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : CONCENTRAZIONE TOTALE (CT) (milioni/paillette)
SPECIE : BOVINA

CENTRO\ IMPORTATORE	CT (CENTRO) (media±dev.std)	CT (CENTRO) (min-max)	CT (ISTITUTO) (media±dev.std)	CT (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
ALPENSEME	15.05±0.21	14.90-15.20	17.55±0.21	17.40-17.70	2
ABS	14.37±2.20	11.00-18.00	7.98±1.67	4.30-11.90	46
BEST SIRES	16.33±3.42	10.00-20.00	11.05±2.72	6.20-16.20	24
CIZ-PI	11.50±1.73	9.00-13.00	6.95±1.24	5.30-8.00	4
CIZ-PR	16.10±3.03	12.00-20.00	18.11±4.28	15.00-29.00	10
COSAPAM	18.30±4.74	10.00-35.00	12.01±3.32	6.30-20.70	40
CT-UDINE	14.70±2.31	11.10-18.80	14.25±3.42	10.30-21.80	11
ELPZOO	18.78±7.92	12.00-39.00	15.03±8.64	8.10-36.30	9
GENETICA 2000	26.66±14.73	12.00-55.70	24.44±9.48	10.00-38.00	18
INTERMIZOO	24.06±8.69	11.40-36.20	20.57±7.54	9.20-33.70	7
ITALGENETICS	13.37±4.38	6.51-20.25	7.54±3.00	3.50-15.80	21
QUALITY SEMEN	15.56±2.97	7.50-15.00	11.03±2.06	8.20-15.30	8
SEMENITALY-MO	16.62±8.98	5.20-33.30	15.25±7.78	3.60-26.00	11
SEMEX ITALIA	15.15±2.89	10.00-25.00	9.49±3.59	4.80-20.20	47
S. FRANCESCO	27.00±5.20	21.00-30.00	25.07±4.70	19.90-29.10	3
TOTALE	16.67±6.63	5.20-55.70	12.14±6.51	3.50-38.00	261

TABELLA N. : 16
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : CONCENTRAZIONE TOTALE (CT) (milioni/paillette)
SPECIE : EQUINA

CENTRO\ IMPORTATORE	CT (CENTRO) (media±dev.std)	CT (CENTRO) (min-max)	CT (ISTITUTO) (media±dev.std)	CT (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
EUROGENETIC	90.00	90.00	57.05±9.26	50.50-63.60	2
LA BASSETTA	102.72±32.26	36.60-159.50	79.38±50.85	33.30-183.50	16
LE FONTANETTE	35.00±21.21	20.00-50.00	165.75±146.72	62.00-269.50	2
QUALITY SEMEN	59.25±26.52	40.50-78.00	147.00±50.20	111.50-182.50	2
STUDIO GENETICO	97.00	97.00	77.50	77.50	1
TOTALE	91.70±35.21	20.00-159.50	90.75±62.16	33.30-269.50	23

TABELLA N. : 17
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : MOTILITA' PROGRESSIVA (MP) (%)
SPECIE : BOVINA

CENTRO	MP (CENTRO) (media±dev.std)	MP (CENTRO) (min-max)	MP (ISTITUTO) (media±dev.std)	MP (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
ALPENSEME	45.90±4.75	30.00-57.00	43.33±10.22	11.00-67.00	126
ANABORAPI	44.88±5.32	30.00-56.00	48.79±9.15	22.00-70.00	127
ANABORAVA	37.83±5.61	30.00-45.00	35.09±12.12	12.00-56.00	23
CIZ-PI	46.16±8.46	28.00-66.00	44.40±10.61	18.00-69.00	248
CIZ-PR	37.44±2.84	30.00-45.00	41.29±11.51	17.00-70.00	79
COFA	43.06±8.42	16.00-68.00	39.53±9.97	14.00-62.00	190
CT-CURTATONE	33.01±6.12	15.00-45.00	35.19±7.79	16.00-53.00	163
CT-MACERATA	37.57±4.50	25.00-45.00	40.86±7.50	30.00-52.00	14
CT-PERUGIA	39.81±4.37	25.00-48.00	40.88±10.44	14.00-60.00	93
CT-UDINE	36.47±5.84	22.00-49.00	37.84±9.11	14.00-56.00	108
ELPZOO	36.46±7.38	18.00-59.00	34.01±10.30	10.00-62.00	269
GENETICA 2000	47.35±5.73	25.00-60.00	53.58±9.42	21.00-76.00	255
INTERMIZOO	43.57±6.68	28.00-65.00	41.71±8.86	19.00-61.00	190
ITALGENETICS	44.85±3.66	35.00-50.00	32.80±15.60	2.00-61.00	40
SEMENITALY-FO	32.94±6.87	20.00-52.00	42.54±9.38	0.10-64.00	109
SEMENITALY-MO	42.95±6.45	25.00-63.00	46.38±9.54	23.00-69.00	240
TOTALE	41.49±8.10	15.00-68.00	42.33±11.46	0.10-76.00	2274

TABELLA N. : 18
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : MOTILITA' PROGRESSIVA (MP) (%)
SPECIE : EQUINA

CENTRO	MP (CENTRO) (media±dev.std)	MP (CENTRO) (min-max)	MP (ISTITUTO) (media±dev.std)	MP (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
CRISTELLA	36.25±4.43	30.00-40.00	27.75±11.30	10.00-41.00	8
CS-INTERMIZOO	20.00	20.00	31.00	31.00	1
CT-UDINE	29.67±4.51	25.00-34.00	39.33±10.79	27.00-47.00	3
LE FONTANETTE	38.33±13.29	30.00-60.00	24.83±11.23	11.00-42.00	6
ORSI MANGELLI	34.44±6.35	20.00-40.00	34.00±10.38	21.00-50.00	9
SOCCINI	40.00±10.00	30.00-50.00	ND	ND	3
TONIATTI	37.50±8.14	24.00-48.00	16.75±9.25	6.00-29.00	8
TOTALE	35.76±8.29	20.00-60.00	27.43±12.13	6.00-50.00	38

ND = non determinato

TABELLA N. : 19
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : MOTILITA' PROGRESSIVA (MP) (%)
SPECIE : SUINA

CENTRO	MP (CENTRO) (media±dev.std)	MP (CENTRO) (min-max)	MP (ISTITUTO) (media±dev.std)	MP (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
CT-ANCONA	20.00±8.66	15.00-30.00	8.70±7.51	0.10-14.00	3
ELPZOO	45.00	45.00	44.50±26.16	26.00-63.00	2
TOTALE	30.00±15.00	15.00-45.00	23.02±24.16	0.10-63.00	5

TABELLA N. : 20
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : MOTILITA' PROGRESSIVA (MP) (%)
SPECIE : BOVINA

CENTRO\ IMPORTATORE	MP (CENTRO) (media±dev.std)	MP (CENTRO) (min-max)	MP (ISTITUTO) (media±dev.std)	MP (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
ALPENSEME	43.00±1.41	42.00-44.00	50.00±8.49	44.00-56.00	2
ABS	49.98±8.46	35.00-67.00	55.20±8.27	32.00-75.00	46
BEST SIRES	61.88±6.89	50.00-75.00	47.42±6.34	35.00-59.00	24
CIZ-PI	48.00±8.87	41.00-61.00	51.75±6.75	46.00-59.00	4
CIZ-PR	44.40±2.95	35.00-45.00	52.70±10.32	38.00-68.00	10
COSAPAM	63.83±6.88	50.00-85.00	48.83±9.15	29.00-65.00	40
CT-UDINE	38.73±4.73	31.00-46.00	41.27±8.08	31.00-53.00	11
ELPZOO	56.11±14.69	30.00-70.00	51.00±17.15	21.00-71.00	9
GENETICA 2000	38.89±9.40	25.00-57.00	46.61±6.18	28.00-58.00	18
INTERMIZOO	36.86±9.08	25.00-46.00	39.14±4.60	32.00-45.00	7
ITALGENETICS	62.86±6.24	45.00-70.00	43.62±10.26	24.00-58.00	21
QUALITY SEMEN	41.25±3.54	35.00-45.00	36.50±9.35	22.00-50.00	8
SEMENITALY-MO	30.73±8.21	21.00-47.00	39.05±5.54	31.00-47.00	11
SEMEX ITALIA	43.83±5.78	30.00-55.00	48.28±8.08	32.00-68.00	47
S. FRANCESCO	40.00±5.00	35.00-45.00	37.67±8.62	30.00-47.00	3
TOTALE	50.10±12.56	21.00-85.00	47.93±9.79	21.00-75.00	261

TABELLA N. : 21
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : MOTILITA' PROGRESSIVA (MP) (%)
SPECIE : EQUINA

CENTRO\ IMPORTATORE	MP (CENTRO) (media±dev.std)	MP (CENTRO) (min-max)	MP (ISTITUTO) (media±dev.std)	MP (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
EUROGENETIC	46.00±12.73	37.00-55.00	49.50±16.26	38.00-61.00	2
LA BASSETTA	38.63±5.97	35.00-54.00	31.31±14.36	7.00-50.00	16
LE FONTANETTE	31.00±5.66	27.00-35.00	29.00±5.66	25.00-33.00	2
QUALITY SEMEN	54.00±5.66	50.00-58.00	34.00±8.49	28.00-40.00	2
STUDIO GENETICO	32.00	32.00	57.00	57.00	1
TOTALE	39.65±8.19	27.00-58.00	34.04±14.51	7.00-61.00	23

TABELLA N. : 22
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : NUMERO SPERMI PROGRESSIVAMENTE MOBILI
 (NSPM) (milioni/paillette)
SPECIE : BOVINA

CENTRO	NSPM (CENTRO) (media±dev.std)	NSPM (CENTRO) (min-max)	NSPM(ISTITUTO) (media±dev.std)	NSPM(ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
ALPENSEME	6.42±0.81	4.04-9.07	5.77±2.12	1.05-14.60	126
ANABORAPI	7.68±0.91	5.10-10.15	8.18±1.86	2.95-14.54	127
ANABORAVA	4.99±0.80	3.68-6.18	5.52±2.19	1.79-10.80	23
CIZ-PI	7.30±1.37	4.40-11.70	6.55±2.09	3.02-15.99	248
CIZ-PR	5.52±0.85	2.97-7.20	6.47±3.08	2.55-20.80	79
COFA	6.99±1.68	2.88-12.22	6.20±2.08	1.02-16.19	190
CT-CURTATONE	8.54±3.78	1.50-21.38	7.81±3.83	1.84-21.42	163
CT-MACERATA	15.35±1.75	10.61-18.25	15.38±2.65	10.69-21.17	14
CT-PERUGIA	4.64±1.07	2.70-9.00	8.69±3.58	2.29-21.06	93
CT-UDINE	7.67±1.35	3.83-12.00	8.41±2.03	3.76-13.95	108
ELPZOO	5.70±1.37	2.30-10.47	4.62±1.45	1.32-10.96	269
GENETICA 2000	10.49±1.90	4.80-15.40	13.65±4.09	5.59-30.32	255
INTERMIZOO	6.80±1.14	3.87-9.84	7.20±2.01	3.32-14.52	190
ITALGENETICS	4.88±0.65	3.20-6.00	4.88±2.83	0.55-12.32	40
SEMENITALY-FO	8.94±2.96	3.55-15.60	10.50±3.62	0.04-21.81	109
SEMENITALY-MO	7.15±2.21	3.52-18.34	7.58±2.61	2.54-17.70	240
TOTALE	7.35±2.47	1.50-21.38	7.77±3.75	0.04-30.32	2274

TABELLA N. : 23
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : NUMERO SPERMI PROGRESSIVAMENTE MOBILI (NSPM) (milioni/paillette)
SPECIE : EQUINA

CENTRO	NSPM (CENTRO) (media±dev.std)	NSPM (CENTRO) (min-max)	NSPM (ISTITUTO) (media±dev.std)	NSPM (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
CRISTELLA	32.06±5.07	22.50-36.00	15.69±6.30	6.60-25.22	8
CS-INTERMIZOO	12.00	12.00	20.52	20.52	1
CT-UDINE	30.92±4.69	25.80-35.02	41.49±10.00	30.24-49.35	3
LE FONTANETTE	19.17±6.65	15.00-30.00	21.17±11.32	9.67-41.07	6
ORSI MANGELLI	35.83±12.93	18.00-63.00	43.06±23.97	13.86-85.60	9
SOCCINI	26.15±9.56	15.60-34.25	ND	ND	3
TONIATTI	58.86±23.10	42.80-113.85	17.91±12.27	6.13-40.37	8
TOTALE	35.48±18.48	12.00-113.85	26.52±18.50	6.13-85.60	38

ND = non determinato

TABELLA N. : 24
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : NUMERO SPERMI PROGRESSIVAMENTE MOBILI
 (NSPM) (milioni/paillette)
SPECIE : SUINA

CENTRO	NSPM (CENTRO) (media±dev.std)	NSPM (CENTRO) (min-max)	NSPM (ISTITUTO) (media±dev.std)	NSPM (ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
CT-ANCONA	110.20±89.49	43.05-211.80	37.63±32.35	0.39-58.80	3
ELPZOO	207.00±25.46	189.00-225.00	197.98±130.40	105.77-290.18	2
TOTALE	148.92±83.53	43.05-225.00	101.77±111.75	0.39-290.18	5

TABELLA N. : 25
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : NUMERO SPERMI PROGRESSIVAMENTE MOBILI
 (NSPM) (milioni/paillette)
SPECIE : BOVINA

CENTRO\ IMPORTATORE	NSPM (CENTRO) (media±dev.std)	NSPM (CENTRO) (min-max)	NSPM(ISTITUTO) (media±dev.std)	NSPM(ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
ALPENSEME	6.47±0.13	6.38-6.56	8.77±1.38	7.79-9.74	2
ABS	7.20±1.72	4.40-9.86	4.39±1.12	2.71-7.50	46
BEST SIRES	10.23±2.88	5.00-15.00	5.18±1.24	2.91-7.61	24
CIZ-PI	5.61±1.75	3.69-7.93	3.65±1.06	2.44-4.60	4
CIZ-PR	6.51±1.30	4.20-8.00	9.30±1.51	7.10-11.34	10
COSAPAM	11.69±3.50	6.60-24.50	5.81±193.00	3.15-13.25	40
CT-UDINE	5.69±1.13	3.55-8.09	5.93±1.93	3.36-9.12	11
ELPZOO	9.80±2.14	7.65-14.00	6.77±2.31	3.61-11.98	9
GENETICA 2000	10.09±5.70	4.03-25.07	11.31±4.61	4.60-18.51	18
INTERMIZOO	8.28±1.91	5.13-10.95	7.89±2.60	4.14-12.13	7
ITALGENETICS	8.39±2.83	3.91-12.18	3.46±1.80	1.16-7.02	21
QUALITY SEMEN	4.70±0.96	3.38-6.00	4.06±1.46	2.31-6.43	8
SEMENTALY-MO	5.02±2.79	1.46-10.62	6.27±3.89	1.37-11.70	11
SEMEX ITALIA	6.61±1.32	3.90-10.00	4.61±2.04	1.77-10.80	47
S. FRANCESCO	10.80±2.56	8.40-13.50	9.23±1.31	7.86-10.48	3
TOTALE	8.23±3.39	1.46-25.07	5.70±2.94	1.16-18.51	261

TABELLA N. : 26
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : NUMERO SPERMI PROGRESSIVAMENTE MOBILI
 (NSPM) (milioni/paillette)
SPECIE : EQUINA

CENTRO\ IMPORTATORE	NSPM (CENTRO) (media±dev.std)	NSPM (CENTRO) (min-max)	NSPM(ISTITUTO) (media±dev.std)	NSPM(ISTITUTO) (min-max)	N. CASI
EUROGENETIC	41.40±11.46	33.30-49.50	29.00±13.87	19.19-38.80	2
LA BASSETTA	39.45±15.33	19.76-70.18	26.07±25.80	3.19-86.25	16
LE FONTANETTE	11.45±8.56	5.40-17.50	52.22±51.93	15.50-88.94	2
QUALITY SEMEN	32.75±17.67	20.25-45.24	47.85±4.60	44.60-51.10	2
STUDIO GENETICO	31.04	31.04	44.18	44.18	1
TOTALE	36.24±15.87	5.40-70.18	31.28±26.05	3.19-88.94	23

Carta di Controllo in Unità di Errore Standard

TABELLA N. : 27
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : Δ NSPM=NSPM (Istituto) - NSPM (Centro) (milioni/paill.)
SPECIE : BOVINA

	-10.00	-3.00	3.00	10.00
	Sovrastima		Sottostima	
-3.74 [-] ALPENSEME		*		
0.04 ANABORAPI			*	
0.22 ANABORAVA			*	
-6.23 [-] PI	*			CIZ-
1.73 PR			*	CIZ-
-5.39 [-] CURTATONE	*			COFA
-4.36 [-] MACERATA		*		CT-
-0.57 PERUGIA			*	CT-
11.72 [+] UDINE				> CT-
0.92 ELPZOO			*	CT-
-8.24 [-] GENETICA2000	*			>
14.55 [+] INTERMIZOO			*	
-0.28 ITALGENETICS			*	
-0.08 SEMENITALY-FO			*	
3.86 [+] SEMENITALY-MO				*
-0.32			*	

Il diagramma considera la variabile Δ NSPM=NSPM(Istituto)-NSPM(Centro); e' stata poi calcolata la differenza fra la media di Δ NSPM per ogni Centro e la media generale, e tale scarto e' stato espresso in Unità di Errore Standard (UES). I Centri con il valore dello scarto nella fascia di sinistra misurano il NSPM in maniera significativamente maggiore (sovrastimano) a quanto fa l'Istituto, i Centri che ricadono nella fascia centrale misurano in maniera analoga a quanto fa l'Istituto, i Centri con i valori nella fascia di destra misurano NSPM in maniera significativamente minore (sottostimano) a quanto fa l'Istituto.

**ESTRAZIONI DNA EFFETTUATE E VERIFICA
CORRETTA IDENTIFICAZIONE**

TABELLA N. : 28
ANNO : dal 1997
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : ESTRAZIONI DNA DI RIFERIMENTO
SPECIE : BOVINA

CENTRO	NUMERO ESTRAZIONI DNA DI RIFERIMENTO
ALPENSEME	294
ANABORAPI	125
ANABORAVA	116
CIZ-PI	331
CIZ-PR	76
COFA	201
CT-CURTATONE	111
CT-MACERATA	9
CT-PERUGIA	69
CT-UDINE	106
ELPZOO	307
GENETICA 2000	262
INTERMIZOO	419
ITALGENETICS	41
SEMENITALY-FO	46
SEMENITALY-MO	385
TOTALE	2898

TABELLA N. : 29
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : PRODUZIONE NAZIONALE
VARIABILE : VERIFICHE CORRETTA IDENTIFICAZIONE E PARTITE I.E.
SPECIE : BOVINA

CENTRO	VERIFICHE CORRETTA IDENTIFICAZIONE	PARTITE PRODOTTE I.E.
ALPENSEME	120	2
ANABORAPI	127	0
ANABORAVA	22	0
CIZ-PI	237	1
CIZ-PR	76	0
COFA	177	0
CT-CURTATONE	154	0
CT-MACERATA	14	0
CT-PERUGIA	93	0
CT-UDINE	108	0
ELPZOO	259	0
GENETICA 2000	255	0
INTERMIZOO	189	0
ITALGENETICS	34	0
SEMENITALY-FO	106	0
SEMENITALY-MO	247	0
TOTALE	2218	3

TABELLA N. : 30
ANNO : dal 1997
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : ESTRAZIONI DNA DI RIFERIMENTO
SPECIE : BOVINA

CENTRO\ IMPORTATORE	NUMERO ESTRAZIONI DNA DI RIFERIMENTO
ALPENSEME	4
ABS	22
BEST SIRES	14
CIZ-PI	1
CIZ-PR	14
COSAPAM	24
CT-PERUGIA	2
CT-UDINE	11
ELPZOO	8
GENETICA 2000	23
INTERMIZOO	12
ITALGENETICS	15
QUALITY SEMEN	23
SEMENITALY-MO	20
SEMEX ITALIA	54
TOTALE	247

TABELLA N. : 31
ANNO : 1999
PROVENIENZA SEME : IMPORTAZIONE
VARIABILE : VERIFICHE CORRETTA IDENTIFICAZIONE E PARTITE I.E.
SPECIE : BOVINA

CENTRO\ IMPORTATORE	VERIFICHE CORRETTA IDENTIFICAZIONE	PARTITE PRODOTTE I.E.
ABS	26	0
ALPENSEME	2	0
BEST SIRES	14	0
CIZ-PI	2	0
CIZ-PR	5	0
CT-UDINE	4	0
COSAPAM	15	0
ELPZOO	4	0
GENETICA 2000	12	0
ITALGENETICS	7	0
QUALITY SEMEN	4	0
SEMENITALY-MO	3	0
SEMEX ITALIA	32	0
TOTALE	130	0

Testo ed elaborazioni statistiche a cura di Dr.ssa D. Balduzzi e Dr. A. Galli.