



Non fatevi ingannare ...

Don't be fooled

# Miti ed Idee sbagliate sul seme congelato

frozen semen myths & misconceptions

*I proprietari delle fattrici possono ottimizzare i risultati ottenibili con il seme congelato ed allo stesso tempo ridurre i costi di gestione delle fattrice acquistando seme da proprietari di stalloni che mettono a disposizione due dosi di seme congelato per "calore".*

*Mare owners can maximize results with frozen semen and minimize mare management costs by purchasing frozen semen from stallion owners willing to provide at least 2 doses per cycle.*

**By Sandro Barbacini Select Breeders Service Italia & Paul Loomis**

**Founder & CEO Select Breeders Service, Inc, Maryland, USA - Photos by Joanna Jonientz**

I proprietari di stalloni che vendono e distribuiscono seme congelato si trovano spesso di fronte a resistenze da parte di proprietari di fattrici o veterinari che sono contrari all'utilizzo di questa tecnologia. Queste perplessità derivano da esperienze negative fatte impiegando seme congelato o da miti o da idee sbagliate che si sono insinuate nel tempo all'interno dell'industria allevatoria equina. Questo articolo è stato scritto per affrontare e dissipare questi dubbi in modo da permettere ai proprietari delle fattrici di usare coscientemente la tecnologia del seme congelato ed ai proprietari degli stalloni di commercializzare al meglio i propri cavalli. I punti che riportiamo

Stallion owners marketing frozen semen often are faced with resistance from mare owners or veterinarians who are biased against using frozen semen.

These biases are usually the result of a previous bad experience using frozen semen or myths and misunderstandings that have been propagated over the years.

This article will address those concerns and dispel some myths that may prevent mare owners from taking advantage of current frozen semen technology and stallion owners from maximizing their horse's marketability. The following six issues are frequently misunderstood by breeders and veterinarians:



di seguito sono frequentemente mal interpretati sia dagli allevatori che dai veterinari.

1. Per ottenere percentuali di gravidanza accettabili con il seme congelato, le fattrici devono essere sottoposte da parte del medico veterinario ad una gestione ecografica intensiva per ventiquattro ore su ventiquattro.
2. L'utilizzo del seme congelato comporta spese più elevate di quelle derivate dall'uso di seme refrigerato e trasportato.
3. Un numero considerevole di fattrici manifesta reazioni allergiche nei confronti dei diluitori usati per congelare il seme.
4. La fertilità del seme congelato è nettamente inferiore a quella che si osserva con il seme refrigerato e trasportato.

1. Breeding mares with frozen semen requires extensive "round the clock" veterinary examinations to achieve.
2. Frozen semen is more expensive to use than cooled transported semen.
3. Many mares have allergic reactions to frozen semen extenders.
4. Frozen semen fertility is much lower than cooled semen fertility.
5. Thawing & handling frozen semen is technically very difficult & therefore requires a veterinarian with a lot of previous experience using frozen semen.



5. Lo scongelamento e la manipolazione del seme congelato sono tecnicamente molto indaginosi e necessitano pertanto di essere eseguiti da medici veterinari molto esperti.

6. Se il seme di uno stallone non resiste al processo di refrigerazione (e di conseguenza non può nemmeno essere spedito) non può neppure essere congelato con buoni risultati.

### **Mito # 1**

Per ottenere percentuali di gravidanza accettabili con il seme congelato, le fattrici devono essere sottoposte da parte del medico veterinario ad una gestione ecografica intensiva per ventiquattro ore su ventiquattro

Questo è una delle più comuni idee sbagliate che ci sono nei confronti dell'impiego del seme congelato ed è il risultato di come questa tecnologia è stata commercializzata negli anni. Fin dagli anni 80, infatti, il metodo prevalente di commercializzare seme congelato da parte dell'industria allevatoria del cavallo da salto e/o dressage (Warmblood) è stato quello di vendere il seme "a dose" senza alcuna garanzia di risultato. Gli allevatori di queste razze hanno quasi sempre acquistato 2-3 dosi di seme molto costoso senza ricevere alcuna garanzia. I veterinari che devono utilizzare questo seme hanno sempre cercato di gestire le cavalle in modo da usare una sola dose inseminante per "calore", visto che erano a conoscenza del fatto che il seme a loro disposizione era limitato e molto costoso.

Gli studi che sono stati pubblicati nel passato hanno dimostrato che si possono ottenere risultati superiori quando le cavalle vengono fecondate con seme congelato in un periodo compreso fra le 12 ore prima dell'ovulazione e le 6 ore dopo. Nonostante siano stati pubblicati studi che mostrano come sia possibile ottenere ottime percentuali di gravidanza ecografando ed inseminando le cavalle una sola volta al giorno durante il "calore", risulta molto chiaro che le fecondazioni eseguite nel periodo post-ovulazione devono essere effettuate non oltre le 6-8 ore dall'avvenuta ovulazione. Visto che risulta praticamente impossibile predire con accuratezza che l'ovulazione si verificherà nelle "prossime" 12 ore, è logico che un veterinario che abbia a disposizione una sola dose di seme deve ecografare la cavalla ogni 6-8 ore ed eseguire la fecondazione non appena avrà individuato l'avvenuta ovulazione. Esiste inoltre la prova scientifica in vitro che gli spermatozoi congelati di alcuni stalloni riescono a rimanere attaccati

6. If semen from a particular stallion doesn't cool well then it will definitely not freeze well.

### **Myth # 1**

Breeding mares with frozen semen requires extensive "round the clock" veterinary examinations to achieve acceptable pregnancy rates.

This is one of the most common misconceptions about the use of frozen semen. It is primarily a result of how frozen semen has been marketed over the years. Frozen semen sold "by the dose" with no guarantee has been prevalent in the Warmblood Sporthorse industry since the early 1980's. Mare owners would typically purchase 2 or 3 doses frozen semen with no guarantees and take it to their veterinarian to breed their mare. Knowing that the supply of semen was very expensive, the veterinarian tried to manage the mare so that only one dose of semen was used per heat cycle.

Studies show that pregnancy rates are highest for frozen semen when mares are inseminated in the period of 12 hours before to 6 hours after ovulation. Although many fertility studies report very acceptable pregnancy rates for mares examined and inseminated only once daily during estrus up to the time of ovulation, it is quite clear that post-ovulation inseminations must be performed within 6 to 8 hours of ovulation. Since accurately predicting ovulation within 12 hours is very difficult, it is logical that a practitioner with only a single dose available would examine mares at 6 to 8 hour intervals in the periovulatory period, wait until ovulation is detected and inseminate a single dose at that time. There is also in vitro evidence that sperm from some stallions that have been frozen and thawed may have a reduced ability to bind to mare's oviductal epithelium, which could reduce the lifespan of those sperm in the mare.

Recently, SBS developed & tested a simple and effective protocol for managing mares that are being inseminated with frozen semen. The new protocol involves a single daily examination until a 35 mm preovulatory





alle cellule degli ovidotti per un tempo molto limitato, cosa che potrebbe indicare la loro ridotta capacità di sopravvivere all'interno dell'apparato riproduttore della cavalla.

Piuttosto recentemente SBS ha ideato e testato un protocollo molto semplice ed efficace per gestire le fattrici da inseminare con seme congelato. Questo protocollo comporta una sola ecografia al giorno fino a quando non si reperisca sulle ovaie della cavalla un follicolo di 35 mm, a questo punto la fattrice viene trattata con un agente ovulatorio (hCG o Ovuplant™) ed inseminata 24 e 40 ore dopo la somministrazione. L'utilizzo di questo protocollo assicura la presenza di spermatozoi vitali all'interno del tratto riproduttivo della fattrice, in modo da fertilizzare l'oocita fra le 12 ore pre- e le 6 post-ovulazione, in tutte le cavalle che ovulano fra le 18 e le 52 ore dopo la somministrazione di hCG o Ovuplant™.

I dati pubblicati da SBSItalia e Colorado State University e quelli extrapolati dal programma commerciale di SB-SMaryland, dimostrano che l'utilizzo di questo protocollo garantisce risultati pari, se non superiori, a quelli che si

follicle is detected, administration of an ovulation inducing agent (hCG or Ovuplant™), and insemination with two doses of semen; one each at 24 and 40 hours after administering the ovulating agent. Use of this protocol insures that viable sperm are available for fertilization in the mare's reproductive tract during the time of 12 hours before to 6 hours after ovulation for mares ovulating 18 to 52 hours after administration of hCG or Ovuplant™.

Data from studies conducted at SBS Italia and Colorado State University as well as evidence from our own commercial distribution program indicate that similar pregnancy rates are achieved for mares bred using protocol and those bred with a single dose of semen within 6 hours of ovulation. Of course, this protocol requires that two doses per cycle are available to the practitioner. SBS encourages stallion owners to provide sufficient doses per cycle to utilize this protocol. Mare owners can maximize results with frozen semen



ottengono fecondando le cavalle una sola volta per “calore” nell’immediato periodo post-ovulazione (entro le 6 ore). Ovviamente questo protocollo può essere impiegato dal veterinario se vengono messe a disposizione due dosi inseminate per “calore”. Da anni SBS suggerisce ai proprietari degli stalloni di mettere a disposizione un numero sufficiente di dosi inseminanti per “calore” in modo che possa essere utilizzato questo protocollo. I proprietari delle fattrici possono ottimizzare i risultati ottenibili con il seme congelato ed allo stesso tempo ridurre i costi di gestione delle fattrici acquistando seme da proprietari di stalloni che mettono a disposizione due dosi di seme congelato per “calore”.

#### **Mito # 2**

L’utilizzo del seme congelato comporta spese più elevate di quelle derivate dall’uso di seme refrigerato e trasportato.

Al contrario di quanto si pensi, il costo totale per il seme congelato o per quello refrigerato sono molto simili, sia per i proprietari di stalloni che per quelli di fattrici.

and minimize mare management costs by purchasing frozen semen from stallion owners willing to provide at least 2 doses per cycle.

#### **Myth # 2**

Frozen semen is more expensive to use than cooled transported semen.

In fact, the total cost for frozen semen to both mare & stallion owner is very similar.

Costs for the stallion owner are primarily for semen production. Cooled semen production requires the building, equipping, and stuffing of a collection and processing facility or contracting with a veterinarian or collection facility to provide the necessary services on an as-needed basis. Outside facilities usually charge 100-150 € to collect and process cooled semen. Since the useful life of cooled semen is 24-48 hours and most collections are for only one or two mares, the cost to the stallion owner can easily exceed 80 € per



I costi a carico del proprietario dello stallone sono soprattutto quelli legati alla produzione del seme. La produzione di seme refrigerato necessita di strutture adatte, di attrezzatura di laboratorio e della presenza di uno staff che si occupi di raccogliere e preparare il seme da spedire. Altresì, il proprietario dello stallone può invece decidere di non investire in strutture, etc. e di usufruire invece dei servizi offerti da un centro di produzione di materiale seminale. La raccolta e preparazione del seme refrigerato eseguita presso una struttura specializzata costa solitamente dai 100 ai 150 €. Visto che il seme refrigerato

dose. Moreover, if the mares do not ovulate as predicted, a second collection for the same heat cycle may be required. Add to this the labor costs to trailer the stallion to a collection facility and the administrative costs to coordinate cooled semen requests, the overall semen production cost per mare bred can easily exceed 150 €. Depending on the number of sperm produced by any given stallion, frozen semen costs a total of 40-80 € per dose (including all labor and board at the collection facility). Typically, 2-3 doses are shipped per

non resta “vivo” oltre le 24-48 ore e che la maggior parte delle raccolte di seme sono fatte per inseminare una o due cavalle, il costo per il proprietario dello stallone si attesta intorno agli 80 € per dose spedita. Inoltre, nel caso in cui una fattrice non ovuli nei tempi pre-determinati, si può rendere necessaria un’ulteriore raccolta di seme per inseminare la cavalla per la seconda volta nello stesso ciclo. Se si aggiungono poi i costi di mantenimento dello stallone ed il tempo necessario a coordinare le richieste e le spedizioni di seme, il costo totale produzione seme per inseminare una cavalla può tranquillamente superare i 150 €. Per quanto riguarda invece il seme congelato, il costo di ogni dose prodotta dipende dal numero di spermatozoi prodotti dallo stallone ed oscilla (compreso tutto il lavoro ed il mantenimento presso un centro di congelamento) fra i 40 e gli 80 €. Visto che solitamente vengono messe a disposizione del proprietario della fattrice un paio di dosi inseminanti per “calore”, il costo per produrre seme congelato sufficiente a fecondare una cavalla è simile se non addirittura inferiore a quello del seme refrigerato.

Nel caso in cui si abbiano a disposizione più di una dose inseminante di seme congelato per “calore” e si utilizzi il protocollo descritto nel Mito # 1, i costi veterinari per il management e l’inseminazione delle fattrici sono molto simili sia che si usi seme congelato che refrigerato.

Generalmente i proprietari delle cavalle si fanno carico dei costi di spedizione e gestione sia che si parli di seme congelato che refrigerato. Questi costi sono più elevati per il seme congelato che non per il seme refrigerato; nonostante tutto però i benefici superiori dati dall’uso del seme congelato prevalgono sui costi più alti. Nel caso in cui si impieghi seme congelato, le spedizioni possono essere organizzate con largo anticipo rispetto al giorno della presunta inseminazione: ciò elimina la preoccupazione di dover ordinare il seme all’ultimo momento, di perdere il seme durante la spedizione e del fatto che lo stallone possa essere ad uno show quando la fattrice è pronta per essere fecondata. Inoltre, con una spedizione di seme congelato si può inviare un contenitore che includa abbastanza dosi da fecondare una cavalla per tutta la stagione o più cavalle scuderizzate nello stesso centro di inseminazione.

### **Mito # 3**

La fertilità del seme congelato è nettamente inferiore a

heat cycle, so the production costs per mare bred for frozen semen are similar to or even lower than those for cooled semen.

Veterinary costs for mare management and insemination are comparable for cooled and frozen semen if there is more than one dose per cycle available and the protocol describe in Myth # 1 is utilized.

Mare owners are typically responsible for shipping/handling charges for cooled or frozen semen. These charges are higher for frozen semen than for cooled semen, however the added benefits of using frozen semen outweigh the increased costs. With frozen semen, the shipment can be scheduled well in advance of the anticipated day of breeding, which eliminates concerns about last minute scheduling, shipment delays, or stallion availability when the mare is ready to be inseminated. Moreover, a single of frozen semen can contain enough doses to inseminate a single mare through multiple cycles or multiple mares at a single location.

### **Myth # 3**

Frozen semen fertility is much lower than cooled semen fertility.

Not all stallions produce sperm that can be frozen successfully and selection of stallions for use in commercial frozen semen breeding programs is essential. In general, per cycle pregnancy rates for mares bred with frozen semen are slightly lower (about 10%) than for mares bred with cooled semen. However, seasonal pregnancy rates have been found to be similar. The SBS laboratory based in Maryland, USA, compiled data from three commercial transported cooled semen programs in which semen from 16 stallions was used for insemination of 850 mares throughout North America by local veterinarians.

During the 1999 and 2000 breeding seasons, first cycle and seasonal pregnancy rates of 59.4 and 74.7% were obtained.

During that same period, first cycle and seasonal pregnancy rates of 51.3 and 75.6% were obtained following insemination of 876 mares with frozen semen



quella che si osserva con il seme refrigerato e trasportato

Purtroppo non tutti gli stalloni producono materiale seminale che possa essere congelato con successo e pertanto sarebbe auspicabile che l'industria allevatoria equina selezionasse i riproduttori maschi anche per la loro congelabilità spermatica. Le percentuali di gravidanza ottenibili per ogni ciclo con l'uso di seme congelato sono leggermente inferiori (~10%) a quelle che si osservano dopo aver inseminato una cavalla con seme refrigerato. Nonostante tutto però, le percentuali di gravidanza che si ottengono alla fine della stagione di monta sono molto simili. Alcuni anni fa, il personale del laboratorio SBS del Maryland, USA ha analizzato i dati raccolti in tre centri stallonieri che spedivano seme refrigerato:

from 106 different stallions processed by our laboratory and distributed through our commercial distribution program.

#### Myth # 4

Many mares have allergic reactions to frozen semen extenders.

Practitioners and mare owners have reported that some mares inseminated with frozen semen exhibited a post-breeding endometritis, presumably in response to some component of the frozen semen extender. Because frozen semen extenders are different than other semen extenders in that they contain egg yolk and





i dati sono stati ottenuti analizzando le percentuali di gravidanza di 850 fattrici inseminate con il seme di 16 stalloni da veterinari dislocati in tutti gli Stati Uniti. Le percentuali di gravidanza per ciclo e stagionale osservate durante le stagioni di monta 1999 e 2000 sono state rispettivamente del 59.4 e 74.7%. Viceversa, le percentuali di gravidanza per ciclo e stagionale ottenute fecondando 876 cavalle con il seme congelato di 106 stalloni prodotto dal laboratorio SBSMaryland e spedito in tutti gli USA sono state del 51.3 e 75.6%.

#### **Mito # 4**

Un numero considerevole di fattrici manifesta reazioni allergiche nei confronti dei diluitori usati per congelare il seme

Nel tempo, veterinari e proprietari di fattrici hanno osservato l'insorgenza di infiammazioni endouterine post-inseminazione in alcune fattrici inseminate con seme congelato ed hanno attribuito questo fenomeno al fatto che la mucosa uterina possa reagire in modo anomalo ad alcuni componenti dei diluitori impiegati per congelare il seme. Il fatto che i diluitori utilizzati per

glycerol, it was thought that the mares were adversely reacting to one of these components. Recent studies have proven this not to be the case. It has been clearly demonstrated that all mares have an immediate inflammatory response to the deposition of sperm in the uterus. This occurs with natural mating and artificial insemination of fresh, cooled or frozen semen. The seminal plasma present in semen plays a role in mediating this inflammatory response and promotes uterine clearance. With frozen semen inseminations there appears to be a delayed clearance of this normal, sterile, inflammatory fluid in some mares. This is likely due to the fact that prior to freezing, a majority of the seminal plasma is removed from semen by centrifugation as a necessary step for successful cryopreservation. Delayed uterine clearance of post-mating induced inflammatory fluids is most prevalent in older mares that have large uteruses, with poor tone that do not contract well making it difficult to



congelare siano diversi da quelli usati per altri scopi (es: seme fresco) e che contengano tuorlo d'uovo e glicerolo, ha creato la convinzione che le fattrici possano reagire in modo anomalo a questi componenti. Alcuni studi realizzati recentemente hanno invece dimostrato che questa teoria non ha assolutamente alcun valore. E' stato chiaramente documentato che le fattrici hanno una reazione infiammatoria uterina in risposta alla deposizione degli spermatozoi all'interno della cavità uterina che si manifesta indipendentemente dal fatto che si sia impiegata la monta naturale, il seme fresco, quello refrigerato od il congelato. Il plasma

physically clear fluid. Older maiden mares may also have a problem with mechanical clearance of fluid due to cervical dysfunction. It is recommended that mares exhibiting clear fluid in the uterus post-insemination be treated with oxytocin to promote uterine contractions and aid mechanical clearance.

#### **Myth # 5**

Thawing and handling frozen semen is technically very difficult and therefore requires a veterinarian



seminale presente nel seme gioca un ruolo molto importante nel modulare questa risposta infiammatoria e stimola l'utero ad "auto" pulirsi dal liquido sterile che si è formato in seguito all'infiammazione. Pare comunque che alcune cavalle, dopo essere state fecondate con seme congelato, mostrino un ritardo nell'"auto" pulirsi da questo liquido infiammatorio. Questo fenomeno è sicuramente dovuto al fatto che, prima di eseguire il congelamento, la maggior parte del plasma seminale viene eliminato tramite centrifugazione, tecnica che non può non essere utilizzata per produrre seme congelato di buona qualità. Il ritardo nell'

with a lot of previous experience using frozen semen.

While it is true that equine spermatozoa are very sensitive to temperature change, and improper thawing and handling can damage the sperm, the actual process is very simple. Each shipment of frozen semen is accompanied by detailed thawing and handling instructions and arrives in a nitrore container that will maintain the semen for several days after arrival. A water bath maintained at 37°C with an accurate thermometer, a pair of hemostats or tweezers to remove the



“auto” pulizia del liquido infiammatorio post-inseminazione si osserva più frequentemente nelle cavalle anziane che presentano uteri di grandi dimensioni e con scarso tono e che quindi non si contraggono sufficientemente da espellere il fluido. Inoltre, le cavalle anziane che vengono inseminate per la prima volta nella loro vita possono avere problemi meccanici legati a disfunzioni della cervice e che impediscono loro di “auto” pulirsi in modo adeguato. E’ solitamente consigliabile trattare con ossitocina le cavalle che mostrano accumulo di liquido uterino post-inseminazione, in modo da stimolare le contrazioni ed aiutare l’evacuazione del fluido.

straws and a sterile test tube or all-plastic syringe is all that is needed to thaw semen properly that has been frozen in 0.5 ml straws.

For the past several years all protocols used by SBS for semen freezing utilize 0.5 ml straws. Semen frozen in large volume (4 or 5 ml) makrotubes requires the water bath temperature to be set at 50°C. When thawing at this temperature, the duration of time that the straw remains in the water bath is critical and therefore accurate timing (45 seconds) is essential. A veterinarian with a solid background in reproduc-



### **Mito # 5**

Lo scongelamento e la manipolazione del seme congelato sono tecnicamente molto indaginosi e necessitano pertanto di essere eseguiti da medici veterinari molto esperti

La tecnica di scongelamento è estremamente semplice, nonostante gli spermatozoi equini siano molto sensibili alle variazioni di temperatura e possano quindi essere seriamente danneggiati durante l'esecuzione di questa procedura. Il seme congelato viene spedito in contenitori criogenici (ad azoto liquido) che sono in grado di mantenere la temperatura necessaria per diversi giorni ed è solitamente accompagnato da istruzioni dettagliate per il suo scongelamento e la sua manipolazione. L'attrezzatura necessaria per scongelare seme che è stoccato in paillette da 0.5 ml è costituita solamente da un bagno-maria che possa mantenere la temperatura dell'acqua a 37°C, da un paio di pinze che servono ad estrarre le paillette dal contenitore e da una provetta sterile. Per ottenere buoni risultati con il seme congelato è comunque necessario che il proprietario della fattrice si affidi ad un medico veterinario che abbia una buona esperienza in riproduzione e che sappia gestire al meglio le cavalle da inseminare.

### **Mito # 6**

Se il seme di uno stallone non resiste al processo di refrigerazione (e di conseguenza non può nemmeno essere spedito) non può neppure essere congelato con buoni risultati

Non è assolutamente detto che uno stallone che non produce seme refrigerato di buona qualità non possa al contrario sopportare positivamente i processi di congelamento. Esistono diversi fattori che possono impedire la produzione di seme refrigerato di qualità accettabile ma alcuni di questi non interferiscono negativamente sulla possibilità di poter congelare con successo il materiale seminale. Ad esempio gli stalloni che regolarmente producono eiaculati a bassissima concentrazione spermatica sono molto difficili "da refrigerare", a meno che il loro seme non venga centrifugato prima di essere adeguatamente diluito. Al contrario, la tecnica del congelamento spermatico prevede che tutti gli eiaculati "lavorati" vengano sottoposti a centrifugazione. In questo caso gli spermatozoi possono quindi sopportare molto meglio i processi di congelamento e scongelamento che quelli di refrigerazione eseguita senza centrifugare il seme.

tion, artificial insemination and mare management is critical to the success of any breeding program using frozen semen.

### **Myth # 6**

If semen from a particular stallion doesn't cool well then it will definitely not freeze well.

A stallion whose semen does not cool well using standard procedures is not necessarily a poor candidate for semen freezing. There are many different factors that may negatively affect how well semen from a particular stallion will cool. Some of those factors do not adversely affect the ability of sperm to be successfully frozen. For example, stallions that typically ejaculate semen with a very low sperm concentration are difficult to cool successfully without concentrating the sperm via centrifugation prior to dilution with an extender.

All ejaculates processed for freezing undergo centrifugation as a normal part of the protocol and may survive the process of freezing and thawing much better than cooling without centrifugation.