

Manuale di laboratorio WHO per l'esame del liquido seminale

QUINTA EDIZIONE



siams
Società Italiana di Andrologia
e Medicina della Sessualità

Manuale di laboratorio WHO per l'esame del liquido seminale

QUINTA EDIZIONE

Traduzione del *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition*, a cura della Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità (SIAMS)



siams
Società Italiana di Andrologia
e Medicina della Sessualità

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition, pubblicato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, 2010.

© Organizzazione Mondiale della Sanità, 2010.

Il Direttore Generale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità ha concesso i diritti di traduzione e pubblicazione per l'edizione italiana alla SIAMS che è la sola responsabile per l'edizione italiana.

Manuale di laboratorio WHO per l'esame del liquido seminale, quinta edizione.

© Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità (SIAMS), 2010.

Tutti i diritti sono riservati. Le pubblicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità possono essere ottenute da WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Ginevra 27, Svizzera (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857, e-mail: bookorders@who.int). Le richieste di autorizzazione a riprodurre o tradurre le pubblicazioni WHO – sia per la vendita che per la distribuzione non commerciale – devono essere indirizzate a WHO Press, all'indirizzo sopra indicato (fax: +41 22 791 4806; e-mail: permissions@who.int).

Le denominazioni usate e la presentazione del materiale in questa pubblicazione non implicano l'espressione di qualsiasi opinione da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, relativa allo status giuridico di qualsiasi paese, territorio, città o area o delle sue autorità, o relative alla delimitazione delle loro frontiere o confini. Le linee tratteggiate sulle cartine rappresentano linee di confine approssimative per le quali potrebbe non esserci pieno accordo.

La menzione di specifiche aziende o di prodotti di determinati costruttori non implica che essi siano approvati o raccomandati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità rispetto ad altri della stessa natura che non sono menzionati. Salvo errori e omissioni, i nomi dei prodotti di proprietà si distinguono per la lettera iniziale maiuscola.

Tutte le precauzioni necessarie sono state prese dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per verificare le informazioni contenute nella presente pubblicazione. Tuttavia, il materiale pubblicato viene distribuito senza garanzie di alcun tipo, sia espressa che implicita. La responsabilità per l'interpretazione e per l'uso del materiale spetta al lettore. In nessun caso l'Organizzazione Mondiale della Sanità è responsabile per i danni derivanti dal suo uso.

Finito di stampare nel dicembre 2010 per i tipi della Eurolit, Roma.

Si ringrazia per il gentile contributo dato alla realizzazione di questo manuale
il Centro Interuniversitario di Andrologia Sperimentale (CASPER).

INDICE

Ringraziamenti	XII
Acronimi e abbreviazioni usati in questo manuale	XIV

Capitolo 1 Stato dell'arte	1
1.1 Introduzione	1
1.2 La quinta edizione	1
1.3 Scopo del manuale	3

PARTE I. ANALISI DEL LIQUIDO SEMINALE

Capitolo 2 Procedure standard	7
2.1 Introduzione	7
2.2 Raccolta del campione seminale	10
2.2.1 Preparazione	10
2.2.2 Raccolta del campione a fini diagnostici o di ricerca	11
2.2.3 Raccolta in contenitore sterile per la riproduzione assistita	11
2.2.4 Raccolta in contenitore sterile per analisi microbiologica	12
2.2.5 Raccolta del campione a casa	12
2.2.6 Raccolta del campione con profilattico	12
2.2.7 Sicurezza nella manipolazione dei campioni	13
2.3 Valutazione macroscopica iniziale	13
2.3.1 Fluidificazione	14
2.3.2 Viscosità del liquido seminale	15
2.3.3 Aspetto dell'eiaculato	15
2.3.4 Volume del liquido seminale	16
2.3.5 pH del liquido seminale	17
2.4 Valutazione microscopica iniziale	18
2.4.1 Accurato miscelamento del campione e prelievo di aliquote rappresentative dell'intero campione seminale	18
2.4.2 Allestimento del preparato a fresco	19
2.4.3 Aggregazione nemaspermica	20
2.4.4 Agglutinazione nemaspermica	20
2.4.5 Componente cellulare non nemaspermica	22
2.5 Motilità nemaspermica	22
2.5.1 Categorie di movimento nemaspermico	23
2.5.2 Preparazione e valutazione di un campione per la motilità	23
2.5.3 Esempi	27
2.5.4 Limiti inferiori di riferimento	27
2.6 Vitalità nemaspermica	27
2.6.1 Test di vitalità mediante eosina-nigrosina	28
2.6.2 Test di vitalità con l'utilizzo della sola eosina	30
2.6.3 Test di vitalità mediante l'uso del rigonfiamento iposmotico	32
2.7 Concentrazione nemaspermica	34
2.7.1 Tipi di camere di conta	35
2.7.2 Emocitometro di Neubauer modificato	35
2.7.3 Utilizzo della griglia dell'emocitometro	36

2.7.4	Manutenzione della camera di conta	37
2.7.5	Fissativo per la diluizione del liquido seminale	37
2.7.6	Importanza di una conta sufficiente di spermatozoi	38
2.8	Procedura di conta di routine	39
2.8.1	Determinazione della diluizione richiesta	39
2.8.2	Preparazione delle diluizioni e caricamento delle camere emocitometriche	41
2.8.3	Valutazione del numero di spermatozoi nelle camere di conta	42
2.8.4	Calcolo della concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale	44
2.8.5	Esempi	45
2.8.6	Limiti di riferimento inferiori per la concentrazione degli spermatozoi	46
2.8.7	Calcolo del numero totale di spermatozoi nell'eiaculato	46
2.8.8	Limiti di riferimento inferiori per la concentrazione totale degli spermatozoi	46
2.9	Numero di spermatozoi basso: criptozoospermia e sospetto di azoospermia	46
2.10	Quando non è necessaria una valutazione accurata del basso numero di spermatozoi	47
2.10.1	Casi che non richiedono ulteriori valutazioni	47
2.10.2	Valutazione dei campioni centrifugati per identificare gli spermatozoi	47
2.10.3	Esame dei campioni non centrifugati per identificare spermatozoi mobili	48
2.11	Quando è richiesta una accurata valutazione di un basso numero di spermatozoi	49
2.11.1	Valutazione di bassi numeri di spermatozoi nell'intera camera Neubauer modificata (con microscopio a contrasto di fase)	50
2.11.2	Valutazione di bassi numeri di spermatozoi in vetrini monouso per grandi volumi (microscopia a fluorescenza)	54
2.12	Conta delle cellule non nemaspermiche	57
2.12.1	Calcolo della concentrazione delle cellule rotonde nel liquido seminale	58
2.12.2	Sensibilità del metodo	58
2.12.3	Esempi	58
2.13	Morfologia nemaspermica	59
2.13.1	Il concetto di spermatozoi normali	59
2.13.2	Preparazione degli strisci seminali	60
2.14	Metodi di colorazione	64
2.14.1	Fissazione tradizionale e colorazione sequenziale	64
2.14.2	Procedimento di colorazione Papanicolaou per la morfologia nemaspermica	65
2.14.3	Procedura di colorazione Shorr per la morfologia nemaspermica	68
2.14.4	Procedura di colorazione rapida per la morfologia nemaspermica	69
2.15	Esame delle preparazioni colorate	70
2.15.1	Classificazione della normale morfologia nemaspermica	70
2.15.2	Classificazione della morfologia degli spermatozoi atipici	71
2.16	Tavole della morfologia 1-14	73
2.17	Analisi morfologica di uno striscio di liquido seminale	103
2.17.1	Valutazione della normale morfologia degli spermatozoi	103
2.17.2	Esempi pratici	104
2.17.3	Limite di riferimento inferiore	105
2.17.4	Valutazione della morfologia degli spermatozoi atipici	105
2.17.5	Esempi	105
2.17.6	Valutazione di particolari difetti degli spermatozoi	106

2.18	Valutazione dei leucociti nel liquido seminale	106
2.18.1	Colorazione della perossidasi cellulare mediante o-toluidina	107
2.19	Valutazione delle cellule germinali immature nel liquido seminale	112
2.20	Analisi degli antigeni di superficie degli spermatozoi	112
2.20.1	Mixed antiglobulin reaction test	113
2.20.2	L'IBT diretto	115
2.20.3	L'IBT indiretto	118
Capitolo 3	Procedure facoltative	120
3.1	Indici di difetti multipli degli spermatozoi	120
3.1.1	Calcolo degli indici di difetti morfologici multipli	120
3.1.2	Esempio	121
3.2	Colorazione immunocitochimica per i globuli bianchi (CD45)	122
3.2.1	Principi	122
3.2.2	Reagenti	123
3.2.3	Procedura	123
3.3	Interazione fra spermatozoi e muco cervicale	126
3.3.1	Test <i>in vivo</i> (post-coital test)	127
3.3.2	Test <i>in vitro</i>	130
3.3.3	Test <i>in vitro</i> semplificato	131
3.3.4	Test del capillare	132
3.4	Saggi biochimici per la funzione delle ghiandole accessorie	135
3.4.1	Misurazione dello zinco nel plasma seminale	136
3.4.2	Dosaggio del fruttosio nel plasma seminale	137
3.4.3	Dosaggio dell'alfa-glucosidasi neutra nel plasma seminale	139
3.5	Analisi computerizzata del liquido seminale	142
3.5.1	Introduzione	142
3.5.2	Uso del CASA per valutare la motilità nemaspermica	143
3.5.3	Uso del CASA per valutare la concentrazione di spermatozoi	146
3.5.4	Valutazione morfometrica computerizzata dello spermatozoo	146
Capitolo 4	Procedure di ricerca	148
4.1	Specie reattive dell'ossigeno	148
4.1.1	Introduzione	148
4.1.2	Misurazione delle specie reattive dell'ossigeno generate da sospensione di spermatozoi	149
4.2	Test di interazione fra spermatozoo e ovocita	152
4.3	Test di legame alla zona pellucida	153
4.4	Valutazione della reazione acrosomiale	153
4.4.1	Procedura mediante fluorescenza per la valutazione dello status acrosomiale	154
4.4.2	Test per la reazione acrosomiale indotta	156
4.5	Hamster test	158
4.5.1	Protocollo	159
4.6	Valutazione della cromatina nemaspermica	164
PARTE II. PREPARAZIONE DEGLI SPERMATOZOI		
Capitolo 5	Tecniche di preparazione degli spermatozoi	167
5.1	Introduzione	167

5.1.1	Quando gli spermatozoi devono essere separati dal plasma seminale	167
5.1.2	Scelta del metodo	167
5.1.3	Efficienza di separazione degli spermatozoi dal plasma seminale e da organismi infettivi	168
5.2	Principi generali	168
5.3	Lavaggio semplice	169
5.3.1	Reagenti	169
5.3.2	Procedura	169
5.4	Swim-up diretto	170
5.4.1	Reagenti	170
5.4.2	Procedura	171
5.5	Gradienti discontinui di densità	171
5.5.1	Reagenti	172
5.5.2	Procedure	172
5.6	Preparazione di campioni seminali con infezione da HIV	173
5.7	Preparazione di spermatozoi testicolari e dell'epididimo	173
5.7.1	Metodo enzimatico	174
5.7.2	Metodo meccanico	174
5.7.3	Preparazione delle sospensioni di spermatozoi per l'iniezione intracitoplasmatica	174
5.8	Preparazione di campioni da eiaculazione retrograda	174
5.9	Preparazione di campioni con eiaculazione stimolata	175
Capitolo 6	Crioconservazione di liquido seminale	176
6.1	Introduzione	176
6.2	Protocolli di crioconservazione del liquido seminale	179
6.2.1	Procedura standard	179
6.2.2	Protocolli di congelamento modificati per campioni oligozoospermici e spermatozoi recuperati chirurgicamente	182
6.2.3	Codifica delle paillettes e registrazione	183
PARTE III. L'ASSICURAZIONE DI QUALITÀ		
Capitolo 7	Assicurazione di qualità e controllo di qualità	187
7.1	Controllo di qualità nel laboratorio di andrologia	187
7.2	La natura degli errori nell'analisi del liquido seminale	187
7.3	Ridurre al minimo l'errore di campionamento statistico	188
7.4	Il programma di assicurazione di qualità	190
7.5	Il manuale delle procedure di laboratorio	191
7.6	Il controllo di qualità interno	191
7.6.1	Campioni per il QC acquistati	191
7.6.2	Campioni per il QC realizzati in laboratorio	192
7.6.3	Campioni conservati (acquistati o prodotti in laboratorio)	192
7.6.4	Campioni freschi per il QC (prodotti in laboratorio)	193
7.7	Procedure statistiche di analisi e registrazione degli errori sistematici intra e inter seminologi	194
7.7.1	La carta X_{bar}	194
7.7.2	La carta S	197
7.8	QC per le percentuali	198
7.9	Valutazione delle carte X_{bar} e S	198

7.9.1	Come riconoscere i valori fuori controllo	199
7.9.2	Cause di valori fuori controllo	200
7.9.3	Risposte ai valori fuori controllo	200
7.10	Procedure statistiche per l'analisi e la registrazione della variabilità fra seminologi	201
7.10.1	Confrontare i risultati tra due o più seminologi	201
7.10.2	Controllo mensile delle medie	203
7.11	Controllo e assicurazione di qualità esterni	204
7.11.1	Valutazione dei risultati EQC	206
7.11.2	Le risposte ai risultati "fuori del controllo"	207
7.12	Frequenza e priorità del controllo di qualità	207
7.13	Addestramento	208
7.13.1	Consigli pratici per quando si incontrano difficoltà nel valutare la concentrazione degli spermatozoi	208
7.13.2	Consigli pratici quando si verificano difficoltà nel valutare la morfologia degli spermatozoi	210
7.13.3	Consigli pratici in caso di difficoltà nella valutazione della motilità degli spermatozoi	211
7.13.4	Consigli pratici quando si verificano difficoltà nel valutare la vitalità degli spermatozoi	213

BIBLIOGRAFIA

217

APPENDICI

Appendice 1	Valori di riferimento e nomenclatura seminale	235
A1.1	Valori di riferimento	235
A1.2	Nomenclatura	237
Appendice 2	Attrezzature e sicurezza	239
A2.1	Forniture di base necessarie in un laboratorio di andrologia	239
A2.2	Possibili rischi biologici in un laboratorio di andrologia	242
A2.3	Procedure di sicurezza per il personale di laboratorio	242
A2.4	Procedure di sicurezza per le apparecchiature di laboratorio	244
A2.5	Procedure di sicurezza per la manipolazione dell'azoto liquido	245
Appendice 3	Microscopia	247
A3.1	Allestimento del campione	247
A3.2	Regolazione degli oculari	249
A3.3	Messa a fuoco dell'immagine	249
A3.4	Messa a fuoco degli oculari	250
A3.5	Messa a fuoco del condensatore di luce	250
A3.6	Centratura del condensatore	250
A3.7	Regolazione degli anelli di fase	251
A3.8	Microscopia a fluorescenza	251
Appendice 4	Soluzioni madre	252
A4.1	Biggers, Whitten e Whittingham	252

A4.2	Tampone fosfato salino Dulbecco	252
A4.3	Soluzione di Earle	253
A4.4	Soluzione di Ham F-10	253
A4.5	Soluzione salina bilanciata di Hanks	254
A4.6	Fluido tubarico umano	254
A4.7	Terreno Krebs-Ringer	255
A4.8	Soluzione salina Tris tamponata	255
A4.9	Soluzione di Tyrode	255
A4.10	Colorante Papanicolaou	255
Appendice 5 Muco cervicale		260
A5.1	Introduzione	260
A5.2	Raccolta e conservazione del muco cervicale	261
A5.3	Valutazione del muco cervicale	262
Appendice 6 Scheda di registrazione per l'analisi del liquido seminale e del muco cervicale		266
A6.1	Modello di registrazione di analisi del liquido seminale	266
A6.2	Modello di registrazione del muco cervicale	268
Appendice 7 Errori di campionamento e controllo di qualità		269
A7.1	Errori nella misurazione della concentrazione di spermatozoi	269
A7.2	L'importanza di comprendere gli errori di campionamento	271
A7.3	Errori nella misurazione delle percentuali	272
A7.4	Produzione di campioni seminali per il controllo di qualità	276
A7.5	Preparazione di una video-registrazione per il controllo di qualità interno dell'analisi della motilità spermatica	277
A7.6	Preparazione del seme diluito per il controllo di qualità interno e determinazione della concentrazione di spermatozoi	281
A7.7	Preparazione dei vetrini per il controllo di qualità interno per la valutazione della morfologia nemaspermica	285
A7.8	Taratura delle apparecchiature	287
Appendice 8 Programmi nazionali di controllo di qualità esterno per l'analisi del liquido seminale		289

FIGURE

Fig. 2.1	Variazione nella concentrazione di spermatozoi per eiaculato e per ml in un periodo di oltre un anno e mezzo	9
Fig. 2.2	Aggregazione non-specifica di spermatozoi nel liquido seminale	20
Fig. 2.3	Schema delle diverse localizzazioni delle agglutinazioni nemaspermiche	21
Fig. 2.4	Supporti alla valutazione della motilità	25
Fig. 2.5	Striscio con colorazione eosina-nigrosina osservato al microscopio ottico in campo chiaro	29
Fig. 2.6	Rappresentazione schematica delle tipiche modificazioni morfologiche in spermatozoi umani sottoposti a stress iposmotico	33
Fig. 2.7	Emocitometro di Neubauer modificato	36
Fig. 2.8	Quali spermatozoi contare nei quadrati della griglia	37

Fig. 2.9	Valutazione dell'intero vetrino coprioggetto per la presenza di spermatozoi mobili	49
Fig. 2.10	Spermatozoi morfologicamente "normali"	60
Fig. 2.11	Metodi di striscio seminale per la morfologia nemaspermica	61
Fig. 2.12	Preparazione di uno striscio di un liquido seminale normale	62
Fig. 2.13	Disegni schematici di alcune forme atipiche di spermatozoi umani	73
Fig. 2.14	Cellule perossidasi-positive e negative in liquido seminale umano	109
Fig. 3.1	Leucociti in liquido seminale	125
Fig. 3.2	La scala di valutazione per il test di Kremer	133
Fig. 3.3	Terminologia standard per le variabili misurate dai sistemi CASA	145
Fig. 4.1	Chemiluminescenza generata in risposta a trattamento con zimosan opsonizzato	151
Fig. 4.2	Rispettivi contributi delle sottopopolazioni di leucociti e spermatozoi alla capacità di generare specie reattive dell'ossigeno da parte di sospensioni cellulari	152
Fig. 4.3	Colorazione degli spermatozoi umani mediante agglutinina fluorescente <i>Pisum sativum</i> (PSA)	156
Fig. 4.4	Microfotografia a contrasto di fase di un ovocita di hamster contenente spermatozoi umani	164
Fig. 7.1	Un diagramma X_{bar} per la concentrazione degli spermatozoi	196
Fig. 7.2	Un diagramma S per la concentrazione degli spermatozoi	198
Fig. 7.3	Una carta Bland-Altman di stime manuali e col sistema CASA della percentuale progressiva di motilità spermatica	201
Fig. 7.4	Un grafico di Youden per la stima delle concentrazioni degli spermatozoi	202
Fig. A2.1	Nomogramma per la determinazione della forza centrifuga relativa (RCF) a partire dal raggio del rotore e dalla velocità di rotazione	243
Fig. A5.1	Esempi di cristallizzazione a foglia di felce nel muco cervicale essiccato all'aria su vetrino	261
Fig. A7.1	Differenze accettabili tra due conte replicate in una funzione del numero totale di spermatozoi valutati	270
Fig. A7.2	Le differenze accettabili tra le percentuali replicate sono funzione della percentuale vera e del numero totale di spermatozoi valutati	274
Fig. A7.3	Supporto alla valutazione della motilità degli spermatozoi	280
Fig. A7.4	Vista attraverso un oculare con reticolo (reticolo rosso)	280
Fig. A7.5	Immagine video-registrata del micrometro sul monitor e la sovrapposizione dei tratti	281

RIQUADRI

Riquadro 2.1	Conferma della qualità del contenitore in cui è stato raccolto il campione	11
Riquadro 2.2	Preparazione della bromelina	15
Riquadro 2.3	Accurato miscelamento del liquido seminale	19
Riquadro 2.4	Spessore del preparato a fresco	19
Riquadro 2.5	Errori nella valutazione delle percentuali	26
Riquadro 2.6	Confronto tra percentuali di replicati	26
Riquadro 2.7	Errori nella valutazione del numero	38
Riquadro 2.8	Ottenere una conta di 200 spermatozoi per replicati nelle tre griglie centrali della camera Neubauer modificata	39
Riquadro 2.9	Volume osservato per pcv in una preparazione a fresco con spessore di 20 μm	40

Riquadro 2.10	Confronto tra conte replicate	44
Riquadro 2.11	Ottenere 200 spermatozoi per replicato in tutte le 9 griglie della camera Neubauer modificata	50
Riquadro 2.12	Ottenere 200 spermatozoi per replicato in una camera monouso per volumi grandi di 100 μm di profondità.	54
Riquadro 2.13	Volume osservato per campo visivo in una camera monouso a grande volume, 100 μm di profondità	56
Riquadro 2.14	Mezzi di montaggio	65
Riquadro 3.1	Preparazione della cera di vaselina	128
Riquadro 3.2	Volume osservato per campo visivo in una preparazione di muco cervicale di profondità 100 μm	128
Riquadro 4.1	Induzione dell'ovulazione in hamster	161
Riquadro 4.2	Preparazione di pipette di vetro	162
Riquadro 6.1	Motivi per la crioconservazione degli spermatozoi	177
Riquadro 6.2	Valutazione del rischio della crioconservazione e dello stoccaggio del liquido seminale umano	178
Riquadro 7.1	Terminologia nell'assicurazione e nel controllo di qualità	188
Riquadro 7.2	Determinazione dei valori per i limiti di controllo di azione e di allarme di una carta X_{bar}	195
Riquadro 7.3	Metodo alternativo per il calcolo dei limiti di controllo X_{bar} dall'insieme delle deviazioni standard	196
Riquadro 7.4	Determinazione dei valori per i limiti di controllo di allarme e di azione di una carta S	197
Riquadro 7.5	Regole di controllo di base per le carte QC	199
Riquadro 7.6	Valutazione delle differenze sistematiche tra seminologi	204
Riquadro 7.7	Principali caratteristiche delle procedure IQC	205
Riquadro 7.8	Calendario per il controllo di qualità	207
Riquadro 7.9	Sommario dei test QC	208
Riquadro A2.1	Calcolo forze centrifughe	242
Riquadro A3.1	L'obiettivo	248
Riquadro A5.1	Misurare il volume del muco raccolto	263
Riquadro A5.2	Volume di un preparato di muco profondo 100 μm osservato al microscopio con un obiettivo a 40x	264

TABELLE

Tabella 2.1	Differenze accettabili tra due percentuali medie, determinate da conte replicate di 200 spermatozoi (400 spermatozoi totali contati)	26
Tabella 2.2	Errori di conta arrotondati (%) secondo il numero totale di spermatozoi contati	38
Tabella 2.3	Diluizioni necessarie del liquido seminale, modalità di preparazione, camere da utilizzare, potenziali aree da valutare	40
Tabella 2.4	Differenze accettabili tra due conte replicate relative ad una data somma	43
Tabella 2.5	Differenza accettabile tra due conte per una data somma: basse concentrazioni	52
Tabella 2.6	Spiegazioni utilizzate nei commenti alle Tavole 1–14	75
Tabella 2.7	Quantità di liquido seminale da utilizzare per l'Immunobead test	116
Tabella 3.1	Calcolo degli indici dei difetti multipli degli spermatozoi	121

Tabella 3.2	Indici dei difetti nemaspermici da uomini di coppie fertili e infertili	122
Tabella 3.3	Grado di densità di penetrazione degli spermatozoi	134
Tabella 3.4	Classificazione dei risultati del test del capillare	135
Tabella 7.1	Fattori per la determinazione dei limiti di controllo per le carte $X_{\bar{c}}$ e S basati sulla deviazione standard media ($S_{\bar{c}}$)	195
Tabella 7.2	Fonti di variazione (errore) nella valutazione della concentrazione nemaspermica e soluzioni proposte	209
Tabella 7.3	Fonti di variazione (errore) nella valutazione della morfologia degli spermatozoi e soluzioni proposte	211
Tabella 7.4	Fonti di variazione (errore) nella valutazione della motilità degli spermatozoi e soluzioni proposte	212
Tabella 7.5	Fonti di variazione (errore) nella valutazione della vitalità degli spermatozoi e soluzioni proposte	213
Tabella A1.1	Valori di riferimento minimi delle caratteristiche seminali (5° percentile e intervallo di confidenza del 95%)	236
Tabella A1.2	Distribuzione dei valori per i parametri seminali relativi a uomini le cui partner sono entrate in gravidanza entro 12 mesi dalla sospensione dell'uso di metodi contraccettivi	237
Tabella A1.3	Nomenclatura seminale	238
Tabella A7.1	Differenze accettabili tra 2 conte replicate relative ad una data somma	271
Tabella A7.2	Differenze accettabili tra due percentuali medie, derivate da conte replicate di 100 spermatozoi (200 contati)	275
Tabella A7.3	Differenze accettabili tra due percentuali medie, derivate da conte replicate di 200 spermatozoi (400 contati)	275
Tabella A7.4	Differenze accettabili tra due percentuali medie, derivate da conte replicate di 400 spermatozoi (800 contati)	276

Ringraziamenti

Questa pubblicazione è stata prodotta dalla UNDP / UNFPA / WHO / Programma Speciale di Ricerca, Sviluppo e Formazione in Riproduzione Umana (HRP) della Banca Mondiale, dall'OMS Dipartimento di Salute Riproduttiva e Ricerca (RHR). Per la partecipazione nella preparazione e redazione di questo manuale si ringraziano le seguenti persone:

Editor

Dr Trevor G Cooper

Centre of Reproductive Medicine and
Andrology of the University,
Münster, Germany
(WHO Collaborating Centre
for Research in Male Reproduction)

Team editoriale

Dr John Aitken

Biological Sciences
School of Life and Environmental Sciences
University Drive
Callaghan, New South Wales, Australia

Dr Jacques Auger

Service de Biologie de la Réproduction
Pavillon Cassini Hôpital Cochin
Paris, France

Dr HW Gordon Baker

University of Melbourne
Department of Obstetrics and Gynaecology
Royal Women's Hospital Carlton, Victoria,
Australia

Dr Chris LR Barratt

Division of Maternal and Child Health Sciences
The Medical School
Ninewells Hospital Dundee, Scotland

Dr Hermann M Behre

Centre for Reproductive Medicine and
Andrology
Martin-Luther-University
Halle, Germany

Dr Lars Björndahl

Andrology Centre,
Karolinska University Hospital and Institute,
Stockholm, Sweden

Ms Charlene Brazil

Center for Health and the Environment
University of California Davis, CA, USA

Dr Christopher De Jonge

University of Minnesota Reproductive
Medicine Center
Minneapolis, MN, USA

Dr Gustavo F Doncel

CONRAD
Department of Obstetrics and Gynecology
Eastern Virginia Medical School
Norfolk, VA, USA

Dr Daniel Franken

Department of Obstetrics and Gynaecology
Tygerberg Hospital
Tygerberg, South Africa

Dr Trine B Haugen

Faculty of Health Sciences
Oslo University College
Oslo, Norway

Dr Aucky Hinting

Andrology Unit,
Department of Biomedicine
School of Medicine
Airlangga University,
Surabaya, Indonesia

Mr Godwin E Imade

Department of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medical Sciences
University of Jos Jos, Nigeria

Dr Thinus F Kruger

Reproductive Biology Unit
Stellenbosch University Tygerberg,
South Africa

Dr Hesbon O Odongo

Department of Zoology
University of Nairobi
Nairobi, Kenya

Ms Elizabeth Noonan

Fred Hutchinson Cancer Research Center
Statistical Center for HIV/AIDS Research
and Prevention
Seattle, WA, USA

Dr Steven M Schrader

National Institute for Occupational
Safety and Health
Centers for Disease Control and Prevention
Cincinnati, OH, USA

Dr Christina CL Wang

Harbor-UCLA Medical Center
Torrance, CA, USA

Dr William Shu-Biu Yeung

Department of Obstetrics and Gynaecology
University of Hong Kong
Hong Kong SAR, China

**Segreteria WHO, Dipartimento di Salute
Riproduttiva e Ricerca****Dr Kirsten M Vogelsong**

Scientist Research
Area Manager

Dr Sigrid von Eckardstein

Former Acting Research
Area Manager

Dr Michael T Mbizvo

Direttore *ad interim*

Ms Maud Keizer

Segretario

Ulteriori ringraziamenti vanno a: Ms Cathy Treece, Ms Charlene Tollner e il Professor Jim Overstreet (University of California, Davis, CA, USA) per la produzione di fotografie della morfologia e il controllo dei terreni di coltura; al Dr Rune Eliasson (Sophiahemmet Hospital, Stockholm, Sweden) per l'aiuto nella definizione di cellule non nemaspermiche; al Dr Timothy Farley (World Health Organization, Geneva, Switzerland) per la revisione delle sezioni sul controllo di qualità; e al Dr Gary N Clarke (The Royal Women's Hospital, Carlton, Australia), al Dr Roelof Menkveld (Tygerberg Academic Hospital and University of Stellenbosch, Tygerberg, South Africa), e al Professor Pieter Wranz (University of Stellenbosch, Tygerberg, South Africa) per aver fornito ulteriori informazioni utilizzate nella compilazione del manuale.

Si ringrazia la Società Internazionale di Andrologia per il sostegno finanziario.

Questa edizione del manuale è dedicata alla memoria del compianto Geoffrey Waites (1928–2005), ex direttore del WHO Task Force sui metodi di regolazione della fertilità maschile e coeditore della seconda, terza e quarta edizione di questo manuale di laboratorio. La devozione del comitato editoriale per la sua missione era guidata dall'apprezzamento per l'onestà, l'equità e l'impegno per i bisognosi di Geoff.

Acronimi e abbreviazioni usati in questo manuale

Ab	anticorpo
AI	inseminazione artificiale
AID	inseminazione artificiale con seme di donatore
AIH	inseminazione artificiale con seme del partner
ALH	ampiezza dello spostamento laterale della testa
ANOVA	analisi della varianza
APAAP	complesso fosfatasi alcalina – anti-fosfatasi alcalina
AR	acrosoma reagito
ART	tecniche di riproduzione assistita
ASA	anticorpo antispermatozoo
BAEE	N-benzoil-L-arginina etil estere
BCF	frequenza del battito laterale (Hz)
BSA	albumina sierica bovina
BWW	Biggers, Whitten e Whittingham
CASA	computer – aided sperm analysis
CASMA	computer – aided sperm morphometric assessment
CBAVD	assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti
CD	compact disk
CD	goccia citoplasmatica
CD45	cluster di determinazione 45 (marker pan-leucocitario)
CD46	cluster di determinazione 46 (antigene acrosomiale)
CO ₂	diossido di carbonio
DMSO	dimetil solfossido
DNA	acido deossiribonucleico
DPBS	tampone fosfato salino di Dulbecco
DS	deviazione standard
DVD	digital versatile disc
EDTA	acido etilendiaminotetracetico
EQA	garanzia di qualità esterna
EQC	controllo di qualità esterno
ERC	eccesso di residuo citoplasmatico
ES	errore standard
FITC	isotiocianato di fluoresceina
FMLP	formil-metionil-leucil-fenilalanina
GIFT	transfer gametico intratubarico
GPC	glicerofosfolcolina
H ₂ O ₂	perossido di idrogeno

HBSS	Hanks' balanced salt solution
HBV	virus epatite B
hCG	gonadotropina corionica umana
HCV	virus epatite C
HIV	virus da immunodeficienza umana
HOP	penetrazione nell'ovocita di hamster
HOS	rigonfiamento iposmotico
HRP	perossidasi di rafano
HSA	albumina serica umana
HTF	fluido tubarico umano
IB	immunobead
IBT	Immunobead test
IC	intervallo di confidenza
ICSI	iniezione intracitoplasmatica di spermatozoo
Ig	immunoglobulina
IM	assenza di motilità
IQC	controllo di qualità interno
IR	indice di rifrazione
IUI	inseminazione intrauterina
IVF	fecondazione <i>in vitro</i>
KRM	Krebs–Ringer Medium
LC	limiti di confidenza
LIN	linearità
LLQ	limite inferiore di quantificazione
MAD	spostamento angolare medio
MAI	indice di anomalie multiple
MAR	mixed antiglobulin reaction
NA	apertura numerica
NP	motilità non progressiva
PBS	tampone fosfato salino
pcv	campo visivo
PDCA	pianificare, fare, controllare, agire
PMA	forbolo 12-miristato 13-acetato
PMSG	gonadotropine di siero di cavalla gravida
PNPG	<i>p</i> -nitrofenolo glucopiranoside
PR	motilità progressiva
PSA	agglutinina <i>Pisum sativum</i>
QA	assicurazione di qualità
QC	controllo di qualità

RCF	forza centrifuga relativa
RNA	acido ribonucleico
ROS	specie reattive dell'ossigeno
r.p.m.	giri al minuto
SDI	indice di alterazione spermatica
SDS	sodio dodecilsolfato
SOP	procedura operativa standard
STR	rettilineità (VSL/VAP)
TBS	Tris-buffered saline
TGG	Tyrode's glucose glycerol
TZI	indice di teratozoospermia
UI	unità internazionale
VAP	velocità media di percorso
VCL	velocità curvilinea
VSL	velocità in linea retta (rettilinea)
WHO	World Health Organization
WOB	oscillazione (VAP/VCL)

CAPITOLO 1 Stato dell'arte

1.1 Introduzione

Il *Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale e dell'interazione spermatozoi-muco cervicale* è stato pubblicato la prima volta nel 1980 per rispondere alle crescenti esigenze di una standardizzazione delle procedure necessarie per l'esame del liquido seminale umano. Da allora è stato aggiornato tre volte e tradotto in numerose lingue. Negli ultimi trent'anni, il manuale ha fornito degli standard globali ed è stato ampiamente impiegato nei laboratori di ricerca e clinici di tutto il mondo.

Nonostante questo successo, ci si è resi progressivamente conto che alcune delle raccomandazioni presenti nelle edizioni precedenti del manuale dovevano essere riviste alla luce delle nuove acquisizioni, e che alcuni concetti dovevano essere spiegati in maniera più approfondita e con maggiori prove a sostegno. Sulla base di queste considerazioni, il WHO ha istituito un comitato di redazione che rivedesse tutti i metodi descritti nel manuale, al fine di confermarli, modificarli o aggiornarli. In molti casi questo si è dimostrato estremamente difficile, in quanto con i metodi descritti nel manuale erano stati ottenuti dati insufficienti. In alcuni casi, i laboratori più accreditati sono stati in grado di ottenere risultati consistenti che, peraltro, non sono stati confermati da altri. Alla luce di tutto questo, il comitato di redazione ha messo a punto una consensus, dopo aver valutato la letteratura pertinente.

Ulteriori raccomandazioni sono state fatte ai seminologi e ai ricercatori, in particolare per quanto riguarda la necessità di maggiori dettagli per molti dei metodi descritti. La mancanza di dettagli nelle precedenti edizioni ha fatto sì che alcuni laboratori hanno utilizzato metodi descritti altrove, o hanno messo a punto personali versioni di tali metodi, pur sostenendo di effettuare l'analisi del liquido seminale secondo i criteri del manuale del WHO. Per tale motivo, al fine di rendere più semplice il confronto fra i laboratori di tutto il mondo, questa edizione del manuale è molto più dettagliata, spiegando approfonditamente il rationale dell'impiego di una particolare tecnica nei casi in cui ci siano più metodi di analisi a disposizione per quel singolo parametro. Raccomandiamo pertanto ai laboratoristi che fanno riferimento a questo manuale, di riportare nella descrizione dei risultati pubblicati negli articoli scientifici il metodo specifico impiegato.

1.2 La quinta edizione

La quinta edizione consta di tre parti: l'analisi del liquido seminale (capitoli 2-4), la preparazione degli spermatozoi (capitoli 5 e 6) e il controllo di qualità (capitolo 7). La Parte I, che riguarda l'analisi del liquido seminale, ricalca le edizioni precedenti, ma è stata divisa in tre capitoli: i metodi standard, rappresentati dalle procedure di routine universalmente accettate per la determinazione della qualità del liquido seminale; i test opzionali, che possono essere utilizzati in determinate situazioni o per scelta del laboratorio; i test di ricerca, che non sono attualmente considerati di routine. Dal momento che la spermocoltura non viene eseguita routinariamente nel laboratorio di seminologia, è stata menzionata solo nella sezione relativa alla raccolta sterile del liquido seminale. La sezione sulla preparazione degli spermatozoi comprende, oltre agli spermatozoi eiaculati, anche gli spermatozoi ottenuti dal testicolo e dall'epididimo. Intercalati agli elenchi puntati delle istruzioni metodologiche, si

trovano Note (spiegazioni della metodologia), Commenti (interpretazione dei risultati) e Riquadri (contenenti ulteriore materiale esplicativo).

Le caratteristiche principali di questa quinta edizione sono le seguenti.

- I capitoli relativi all'analisi del liquido seminale includono dettagli su tutte le soluzioni di lavoro, procedure, calcoli e interpretazioni, in modo che ogni metodologia sia quanto più possibile completa, con rimandi minimi ad altre parti del manuale.
- La sezione sulla preparazione del seme è stata ampliata, ed è stato aggiunto un nuovo capitolo sulla crioconservazione degli spermatozoi. Le procedure per l'analisi del muco cervicale sono state divise tra il capitolo sulle procedure opzionali e un'appendice sulle caratteristiche del muco.
- Ci sono meno appendici rispetto alle edizioni precedenti, e sono limitate alle informazioni altamente specialistiche o raramente impiegate.
- *Valutazione del numero degli spermatozoi.* Le diluizioni del seme e le aree della camera di conta utilizzate per valutare il numero di spermatozoi nel liquido seminale sono state modificate per consentire la conta di 200 spermatozoi per replicato. È stata ribadita l'importanza sia degli errori di campionamento, che della certezza dei risultati numerici ottenuti. Il comitato di redazione ha ritenuto che il numero totale di spermatozoi per eiaculato fornisca una valutazione più accurata della funzionalità del testicolo rispetto alla concentrazione degli spermatozoi, ma è imperativo che il volume del liquido seminale venga misurato con estrema precisione.
- *Valutazione della azoospermia.* Anche se apparentemente semplice, la diagnosi di azoospermia può essere resa difficile da vari fattori, fra cui grossi errori legati al conteggio di pochi spermatozoi, l'elevato numero di campi microscopici da analizzare e le difficoltà nell'esaminare il pellet post-centrifugazione in caso di campioni ricchi di detriti. Modifiche raccomandate includono la necessità di esaminare campioni fissati, non centrifugati, indicando la sensibilità dei metodi di conta utilizzati. Tuttavia, sono previsti anche metodi di centrifugazione per accumulare un numero sufficiente di cellule a fini terapeutici, e metodi per la valutazione di spermatozoi mobili in campioni non fissati di liquidi seminali post-vasectomia.
- *Valutazione della motilità nemaspermica.* Un cambiamento importante rispetto alle precedenti edizioni è la classificazione della motilità degli spermatozoi. Attualmente viene consigliato di classificare gli spermatozoi come progressivamente mobili, non progressivamente mobili e immobili (invece dei gradi a, b, c, d).
- *Valutazione della morfologia nemaspermica.* Alcuni laboratori valutano solo le forme normali, mentre altri considerano più importanti il tipo, la localizzazione e l'estensione delle atipie. È ancora controverso se queste o altri tipi di valutazione o valutazioni semiquantitative rendano più attendibile l'analisi del liquido seminale. Prove a sostegno della relazione tra la percentuale di forme normali (definite dai criteri stretti o dalla valutazione computerizzata della morfologia) e tassi di fecondazione *in vivo* giustificano il tentativo di identificare, nel liquido seminale, una sottopopolazione di spermatozoi morfologicamente distinta. In questa edizione, abbiamo incluso un numero maggiore di fotografie di migliore

qualità di spermatozoi considerati normali e borderline, accompagnate da spiegazioni del perché ogni spermatozoo è stato classificato in quel modo. Questo dovrebbe aiutare i seminologi a classificare gli spermatozoi in maniera uniforme. Dati recenti, provenienti da una popolazione fertile, hanno permesso di fornire valori di riferimento per la percentuale di forme morfologicamente normali.

- *Controllo di qualità.* Questo capitolo è stato completamente riscritto. Affinché i metodi analitici siano attendibili è necessario che ci sia un rigoroso controllo di qualità dell'analisi seminale. Vengono forniti consigli e suggerimenti su come migliorare le prestazioni di laboratorio nei casi in cui i risultati del controllo di qualità siano insoddisfacenti.
- *Range e limiti di riferimento.* I range di riferimento di questo manuale sono stati dedotti dai dati della qualità del liquido seminale di uomini fertili, la cui partner ha ottenuto una gravidanza entro i 12 mesi. Per i valori di riferimento, sono stati impiegati i dati grezzi di un numero variabile da 400 a 1.900 campioni di liquido seminale provenienti da uomini di otto paesi di tre continenti, che sono diventati padri di recente. Per convenzione statistica si considera il 2.5° percentile, di un intervallo di riferimento a due estremi, come soglia sotto la quale i valori possono essere considerati provenienti da una popolazione differente. Tuttavia, un intervallo di riferimento ad un solo estremo è stato ritenuto più opportuno per il liquido seminale, dal momento che elevati valori di qualunque parametro difficilmente sono pregiudizievoli per la fertilità. Il quinto percentile è dato come limite inferiore di riferimento, e la distribuzione completa per ogni parametro seminale è riportata nell'Appendice 1.

1.3 Scopo del manuale

I metodi descritti in questo manuale hanno l'intento di linee guida per migliorare la qualità dell'analisi del liquido seminale e la comparabilità dei risultati. Non dovrebbero essere necessariamente presi come obbligatori da strutture di accreditamento locale, nazionale o internazionale. L'analisi seminale può essere utile sia in campo clinico che di ricerca, per valutare lo stato della fertilità maschile così come per monitorare la spermatogenesi nel follow-up della regolazione della fertilità maschile.

Analisi del liquido seminale

CAPITOLO 2 Procedure standard

2.1 Introduzione

Il liquido seminale è costituito da una sospensione concentrata di spermatozoi, immagazzinata negli epididimi, che, al momento dell'eiaculazione, viene miscelata e diluita con le secrezioni delle ghiandole accessorie del tratto genitale. Tale fluido biologico viene emesso in diversi gettiti eiaculatori. Confrontando il volume del liquido seminale pre e post-vasectomia si rileva che il 90% è costituito dalle secrezioni delle ghiandole accessorie (Weiske, 1994), principalmente dalla prostata e dalle vescicole seminali, mentre un minore contributo proviene dalle ghiandole bulbouretrali (ghiandole di Cowper) e dagli epididimi.

Il liquido seminale ha due principali parametri quantizzabili:

- il numero totale di spermatozoi che riflette la produzione nemaspermica dei testicoli e la pervietà dei dotti eiaculatori post-testicolari;
- il volume del campione, prodotto dalle ghiandole accessorie, che riflette l'attività secretoria delle ghiandole.

Altri parametri importanti per la funzione nemaspermica sono rappresentati da vitalità, motilità, morfologia nonché dalla composizione del liquido seminale.

Durante un rapporto sessuale, la frazione iniziale dell'eiaculato, la prostatica, ricca di spermatozoi, viene a contatto con il muco cervicale che fuoriesce dalla vagina, mentre il resto del fluido seminale rimane nella vagina (Sobrero, MacLeod, 1962). Al contrario, nella pratica di laboratorio, quando l'intero eiaculato viene raccolto in un contenitore, gli spermatozoi vengono intrappolati in un coagulo prodotto dalle proteine derivanti dalle vescicole seminali. Successivamente, il coagulo fluidifica, mediante l'azione di proteasi prostatiche, e l'osmolarità del liquido seminale aumenta (Björndahl, Kvist, 2003; Cooper *et al.*, 2005).

È stato dimostrato che la qualità del liquido seminale varia a seconda della tipologia di raccolta del campione. L'eiaculato prodotto per masturbazione e raccolto in contenitori, in una stanza vicino al laboratorio, può essere di qualità inferiore rispetto a quello che viene recuperato dai profilattici senza spermicidi, utilizzati a casa durante un rapporto (Zavos, Goodpasture, 1989). Questa differenza può indicare una diversa forma di eccitazione sessuale, in quanto il tempo necessario per produrre un campione per masturbazione – che riflette il protrarsi dell'emissione seminale, prima dell'eiaculazione – influenza anche la qualità del liquido seminale (Pound *et al.*, 2002).

In determinate condizioni di raccolta, la qualità del liquido seminale dipende da fattori che normalmente non possono essere modificati, quali la produzione testicolare di spermatozoi, la secrezione delle ghiandole accessorie, patologie recenti (in particolare quelle febbrili), e altri fattori quali i giorni di astinenza, che devono essere segnalati e considerati nell'interpretazione dei risultati.

I risultati della valutazione laboratoristica della qualità seminale dipendono, quindi, da:

- La raccolta completa del campione. Infatti, durante l'eiaculazione la prima fra-

zione del liquido seminale che viene emessa è la prostatica, ricca di spermatozoi, mentre le ultime frazioni sono vescicolari (Björndahl, Kvist, 2003). Per tale motivo, la perdita della prima parte dell'eiaculato (ricca di spermatozoi) influenza maggiormente il risultato dell'analisi, rispetto alla perdita della porzione finale.

- L'attività delle ghiandole accessorie, cioè le secrezioni in cui vengono diluiti, al momento dell'eiaculazione, gli spermatozoi epididimari (Eliasson, 2003). La concentrazione degli spermatozoi, infatti, non è una misura diretta della produzione testicolare, in quanto è influenzata dall'attività di altri organi riproduttivi. La produzione testicolare è indicata, invece, dalla concentrazione totale di spermatozoi eiaculati (concentrazione di spermatozoi per ml moltiplicato il volume testicolare). Per esempio, la concentrazione di spermatozoi per ml, nel liquido seminale di uomini giovani e anziani, può essere simile, ma la concentrazione per eiaculato può cambiare, in quanto, in alcuni casi, sia il volume del fluido seminale che la produzione totale di spermatozoi diminuiscono con l'età (Ng *et al.*, 2004).
- Il periodo di astinenza sessuale. In assenza di eiaculazione, infatti, gli spermatozoi accumulati nell'epididimo, si versano nell'uretra e vengono espulsi nelle urine (Cooper *et al.*, 1993; De Jonge *et al.*, 2004). Una prolungata astinenza sessuale, peraltro, non influenza la vitalità e la cromatina degli spermatozoi (Tyler *et al.*, 1982b; De Jonge *et al.*, 2004), a meno che non venga alterata la funzione epididimaria (Correa-Perez *et al.*, 2004).
- Penultima eiaculazione. Poiché gli epididimi non vengono completamente svuotati con una eiaculazione, possono rimanere alcuni spermatozoi della precedente eiaculazione (Cooper *et al.*, 1993). Ciò influenza l'età e la qualità degli spermatozoi nel liquido seminale (Tyler *et al.*, 1982a). Comunque, il peso di tale fattore è difficile da stabilire e raramente viene preso in considerazione.
- Le dimensioni testicolari, che influiscono sulla concentrazione di spermatozoi totali per eiaculato (Handelsman *et al.*, 1984; WHO, 1987; Behre *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2000). La dimensione del testicolo, infatti, è un indice dell'attività spermatogenetica e influenza la morfologia degli spermatozoi (Holstein *et al.*, 2003).

Commento: La grande varietà biologica del liquido seminale (Castilla *et al.*, 2006) è dovuta ai diversi fattori sopra riportati e richiede che tutte le valutazioni sul campione seminale siano precise.

Tali fattori variabili, e in larga parte incontrollabili, spiegano le note differenze intraindividuali nella composizione del liquido seminale (Baker, Kovacs, 1985; Alvarez *et al.*, 2003). La Fig. 2.1 mostra le variazioni, nel corso del tempo, nella composizione del liquido seminale, valutate con i metodi raccomandati dal WHO di cinque giovani volontari sani che hanno partecipato, nel braccio trattato con placebo, ad uno studio sulla contraccezione ormonale maschile.

Tale variabilità ha conseguenze nell'interpretazione dell'analisi del liquido seminale:

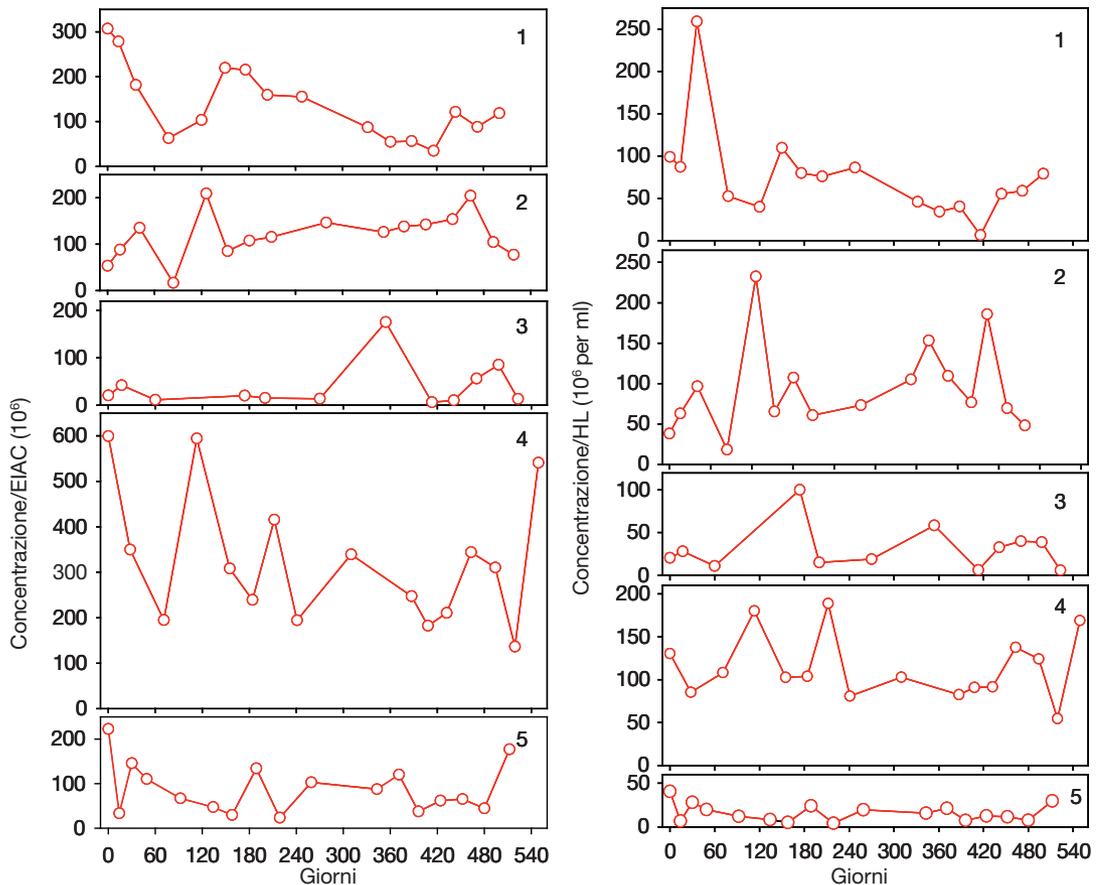
- È impossibile definire i parametri seminali di un uomo basandosi sulla valutazione di un singolo campione seminale.

- È utile esaminare due o tre campioni per ottenere dati di riferimento (Poland *et al.*, 1985; Berman *et al.*, 1996; Carlsen *et al.*, 2004; Castilla *et al.*, 2006; Keel, 2006).

L'esame del liquido seminale, comunque, fornisce informazioni essenziali sullo stato clinico di un individuo, anche se le indagini eseguite sull'intera popolazione di spermatozoi eiaculati non riescono a definire la capacità fecondante di quei pochi gameti che raggiungono l'ovocita.

Al fine di ottenere informazioni valide e utili, sia la raccolta che l'analisi del liquido seminale devono essere effettuate mediante appropriate procedure standardizzate. I test descritti in questo capitolo sono procedure approvate che costituiscono passaggi essenziali per la valutazione del liquido seminale.

Fig. 2.1 Variazione nella concentrazione di spermatozoi per eiaculato e per ml in un periodo di oltre un anno e mezzo



Dati gentilmente concessi da Schering Plough e Bayer Schering Pharma AG.

L'esame del liquido seminale comprende i seguenti passaggi (descritti in dettaglio nella successiva sezione).

Nei primi 5 minuti:

- Porre il contenitore con il campione seminale sul bancone di lavoro o in un incubatore (37°C) per la fluidificazione.

Tra 30 e 60 minuti:

- Valutare la fluidificazione e l'aspetto del campione seminale.
- Misurare il volume del campione seminale.
- Rilevare il pH (se richiesto).
- Valutare a fresco gli aspetti microscopici, la motilità e preparare una diluizione per la valutazione del numero di spermatozoi.
- Valutare la vitalità degli spermatozoi (nel caso in cui la percentuale di cellule mobili sia bassa).
- Allestire strisci del campione seminale per valutare la morfologia.
- Diluire il liquido seminale per valutare la concentrazione degli spermatozoi.
- Valutare il numero di spermatozoi.
- Eseguire il Mixed Antiglobulin Reaction test (MAR) (se richiesto).
- Valutare le cellule perossidasi-positive (se sono presenti cellule rotonde).
- Preparare gli spermatozoi per l'Immunobead test (se richiesto).
- Centrifugare il campione seminale (se devono essere valutati gli indici biochimici).

Entro 3 ore:

- Inviare i campioni al laboratorio di microbiologia (se richiesto).

Dopo 4 ore:

- Fissare, colorare e valutare gli strisci per la morfologia degli spermatozoi.

Più tardi nello stesso giorno (o un giorno successivo se i campioni vengono congelati):

- Dosare gli indici delle ghiandole accessorie (se richiesto).
- Eseguire l'Immunobead test indiretto (se richiesto).

2.2 Raccolta del campione seminale

2.2.1 Preparazione

- Il campione dovrebbe essere raccolto in una stanza riservata vicino al laboratorio, per limitare l'esposizione del liquido seminale ad escursioni termiche e controllare il tempo che intercorre tra la raccolta del campione e l'esecuzione dell'analisi (vedi Sezioni 2.2.5 e 2.2.6 per le eccezioni).

- I campioni seminali dovrebbero essere raccolti dopo un minimo di 2 e un massimo di 7 giorni di astinenza sessuale. Se sono richiesti più campioni, il numero di giorni di astinenza, ad ogni analisi, dovrebbe essere il più possibile costante.
- Le istruzioni riguardanti la raccolta del liquido seminale dovrebbero essere comunicate al paziente, per iscritto e oralmente. Tali istruzioni dovrebbero sottolineare la necessità di una raccolta completa del campione e che non dovrebbe andare persa nessuna frazione dell'eiaculato.
- Le seguenti informazioni dovrebbero essere registrate su una scheda (vedi Appendice 6, Sezione A6.1): nome del paziente, data di nascita e numero di codice personale, giorni di astinenza, data e ora di raccolta, raccolta completa del campione, difficoltà nella raccolta del campione e tempo intercorso tra la produzione del campione e l'inizio dell'analisi del liquido seminale.

2.2.2 Raccolta del campione a fini diagnostici o di ricerca

- Il campione dovrebbe essere raccolto per masturbazione in un contenitore, pulito, dall'apertura larga, di vetro o plastica, proveniente da un lotto certificato come non tossico per gli spermatozoi (vedi Riquadro 2.1).
- Il campione, nel contenitore, dovrebbe essere mantenuto a temperatura ambiente, tra 20°C e 37°C, al fine di evitare escursioni termiche che possono influire negativamente sugli spermatozoi eiaculati. Il contenitore deve essere contrassegnato con il nome del paziente, numero di identificazione, data e ora della raccolta.
- Il contenitore con il campione viene posto sul bancone o in un incubatore (37°C) durante il processo di fluidificazione.
- È necessario segnalare nella scheda se il campione non è stato raccolto interamente, in particolare se è stata persa la prima parte dell'eiaculato, frazione ricca di spermatozoi. Se il campione seminale non è stato raccolto in maniera completa, deve essere eseguita una seconda raccolta dopo un periodo di astinenza di 2-7 giorni.

Riquadro 2.1 Conferma della qualità del contenitore in cui è stato raccolto il campione

Selezionare vari campioni seminali con elevata concentrazione e buona motilità. Porre metà del campione seminale in un contenitore non tossico (contenitore di controllo) e l'altra metà nel contenitore che deve essere testato. Valutare la motilità nemaspermica, in replicati, a temperatura ambiente o a 37°C (vedi Sezione 2.5), a intervalli di un'ora, per 4 ore. Se, ad ogni valutazione, non si rilevano differenze tra il controllo e il campione in esame ($P > 0.05$ come indicato dal t-test), i contenitori analizzati possono essere considerati non tossici per gli spermatozoi e idonei per la raccolta del campione seminale.

2.2.3 Raccolta in contenitore sterile per la riproduzione assistita

Tale raccolta del campione seminale è a fini diagnostici (vedi Sezione 2.2.2), e i contenitori, le punte delle micropipette e le pipette utilizzate per miscelare il campione devono essere sterili.

2.2.4 Raccolta in contenitore sterile per analisi microbiologica

In questo caso, devono essere evitate le contaminazioni provenienti da fonti diverse dal liquido seminale (per es. organismi commensali dell'epidermide). I contenitori per la raccolta del liquido seminale, le punte delle micropipette e le pipette utilizzate per miscelare il campione devono essere sterili.

Il paziente dovrebbe:

- Urinare.
- Lavare accuratamente mani e genitali con sapone per ridurre il rischio di contaminazione del campione biologico con organismi commensali dell'epidermide.
- Sciacquare accuratamente il sapone.
- Asciugare mani e genitali con un asciugamano monouso.
- Raccogliere il campione direttamente nel contenitore sterile.

Nota: Il tempo che intercorre tra la raccolta del campione e l'inizio dell'analisi microbiologica non deve superare le 3 ore.

2.2.5 Raccolta del campione a casa

- Il campione seminale può essere raccolto a casa, in circostanze eccezionali, quali l'impossibilità a produrre un campione per masturbazione in clinica o la mancanza di strutture adeguate vicino al laboratorio.
- Il paziente deve ricevere chiare istruzioni, sia scritte che orali, riguardanti la raccolta e il trasporto del campione seminale. Le istruzioni devono sottolineare la necessità di raccogliere il liquido seminale in maniera completa, cioè deve essere raccolto tutto l'eiaculato, senza perdere alcuna parte, in particolare la prima porzione, ricca di spermatozoi. Se il campione non è stato raccolto completamente, ciò deve essere annotato nella scheda.
- Dovrebbe essere consegnato al paziente un contenitore precedentemente pesato, contrassegnato con il suo nome e codice identificativo.
- Il paziente dovrebbe annotare l'ora di produzione del campione seminale e consegnarlo in laboratorio entro 1 ora dalla raccolta.
- Durante il trasporto in laboratorio, il campione seminale dovrebbe essere mantenuto tra 20°C e 37°C.
- Nella scheda dovrebbe essere riportato se il campione è stato raccolto a casa o in altra sede fuori dal laboratorio.

2.2.6 Raccolta del campione con profilattico

- Un campione seminale può essere raccolto con profilattico durante un rapporto sessuale soltanto in casi eccezionali, come l'impossibilità a produrre un campione per masturbazione.

- In questo caso, possono essere utilizzati solo speciali profilattici non tossici, prodotti per la raccolta di campioni seminali, disponibili in commercio.
- Il paziente dovrebbe ricevere informazioni relative alla casa produttrice e alla modalità d'uso del profilattico; il preservativo deve essere chiuso e trasportato al laboratorio.
- Il paziente dovrebbe annotare l'ora di produzione del campione seminale e consegnarlo in laboratorio entro 1 ora dalla raccolta.
- Durante il trasporto in laboratorio, il campione seminale dovrebbe essere mantenuto tra 20°C e 37°C.
- Nella scheda dovrebbe essere riportato se il campione è stato raccolto mediante un particolare profilattico, durante un rapporto sessuale, a casa o in altra sede fuori dal laboratorio.

Nota: Il comune profilattico in lattice non deve essere utilizzato per la raccolta del liquido seminale, in quanto contiene sostanze che interferiscono con la motilità degli spermatozoi (Jones *et al.*, 1986).

Commento 1: Il *coitus interruptus* non è una modalità di raccolta del campione seminale attendibile, in quanto può andare persa la prima parte dell'eiaculato, che contiene il maggiore numero di spermatozoi. Inoltre, con questa modalità di raccolta il campione seminale può essere sottoposto a contaminazioni cellulari e batteriche e il pH vaginale acido può influire negativamente sulla motilità nemaspermica.

Commento 2: Se il paziente non riesce a raccogliere un campione seminale, il post-coital test (vedi Sezione 3.3.1) può fornire informazioni relative alla sua spermatogenesi.

2.2.7 Sicurezza nella manipolazione dei campioni

I campioni seminali possono contenere agenti infettivi pericolosi (per es. virus dell'immunodeficienza umana - HIV, virus dell'epatite o *herpesvirus simplex*), per tale motivo, ogni campione biologico deve essere trattato come materiale a rischio biologico. Nei casi in cui il campione venga processato per inseminazione intrauterina (IUI), fecondazione *in vitro* (IVF), iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) oppure venga eseguita la spermicoltura (vedi Sezione 2.2.4), devono essere utilizzati materiali e procedure sterili.

È necessario seguire rigorosamente le linee guida relative alla sicurezza nel laboratorio, come descritto in Appendice 2; la buona pratica di laboratorio è fondamentale per la sicurezza nel laboratorio (WHO, 2004).

2.3 Valutazione macroscopica iniziale

L'analisi del liquido seminale dovrebbe iniziare con una semplice valutazione, subito dopo la fluidificazione e preferibilmente dopo 30 minuti e non oltre 1 ora dall'eiaculazione; ciò previene la disidratazione o i cambiamenti di temperatura che possono influenzare la qualità seminale.

2.3.1 Fluidificazione

Immediatamente dopo l'eiaculazione, nel contenitore in cui è stato raccolto il campione, il liquido seminale appare tipicamente come un coagulo semisolido. Entro pochi minuti a temperatura ambiente, ha inizio il processo di fluidificazione del seme, durante il quale il liquido seminale diventa più fluido e contemporaneamente si può osservare una miscela eterogenea di grumi. Con il procedere della fluidificazione, il liquido seminale diventa più omogeneo e piuttosto acquoso, mentre negli stadi finali del processo rimangono solo piccole zone con coaguli. L'intero campione seminale fluidifica solitamente entro 15 minuti, a temperatura ambiente, anche se raramente può impiegare 60 minuti o più. Se la fluidificazione completa non avviene entro 60 minuti, deve essere segnalato. I campioni che vengono raccolti a casa o con profilattico, invece, quando arrivano in laboratorio saranno già fluidificati. Solitamente i campioni seminali normali, alla fine della fluidificazione, possono contenere granuli simili a gelatina (corpi gelatinosi), che non fluidificano; questi granuli non sembrano avere un significato clinico. La presenza di filamenti di muco, comunque, può interferire con l'analisi seminale.

Nota 1: La fluidificazione può essere valutata macroscopicamente come sopra descritto, e microscopicamente. Infatti, gli spermatozoi immobili acquisiscono la capacità di movimento appena il seme fluidifica. Per tale motivo, se mediante un esame microscopico si osservano spermatozoi immobili, sarà necessario attendere un tempo maggiore affinché il processo di fluidificazione sia completato.

Nota 2: Durante la fluidificazione, per migliorare l'omogeneizzazione del campione seminale, è consigliabile miscelare delicatamente e in modo costante il campione seminale o ruotare il contenitore, con il fluido biologico, mediante un agitatore bidimensionale a temperatura ambiente o in un incubatore a 37°C.

Nota 3: Se il campione non fluidifica entro 30 minuti, non bisogna procedere con l'analisi del liquido seminale ma è consigliabile aspettare altri 30 minuti. Nel caso in cui la fluidificazione non si sia completata entro 60 minuti bisogna procedere come descritto in Sezione 2.3.1.1.

2.3.1.1 Fluidificazione ritardata

Alcune volte i fluidi seminali non fluidificano e ciò rende difficoltosa la valutazione del campione. In questi casi sono necessarie ulteriori procedure di miscelazione meccanica o digestione enzimatica.

1. Alcuni campioni possono essere indotti a fluidificare aggiungendo un eguale volume di campione fisiologico (per es. PBS Dulbecco vedi Appendice 4, Sezione A 4.2) e pipettando ripetutamente.
2. La disomogeneità può essere ridotta mediante delicati e ripetuti passaggi (6-10 volte) attraverso una siringa con ago smussato di diametro 18 (diametro interno 0.84 mm) o 19 (diametro interno 0.69 mm).

3. Per promuovere il processo di fluidificazione (vedi Riquadro 2.2) potrebbe essere di aiuto la digestione mediante bromelina, un enzima proteolitico ad ampia specificità (EC 3.4.22.32).

Riquadro 2.2 Preparazione della bromelina

Preparare 10 UI/ml di bromelina in PBS Dulbecco (vedi Appendice 4, Sezione A4.2); la bromelina non si scioglie facilmente, ma mediante miscelazione la maggior parte dell'enzima si dissolve in 15-20 minuti. Diluire il campione seminale 1:2 (1 + 1) con 10 UI/ml di bromelina, miscelare con una micropipetta e incubare a 37°C per 10 minuti. Miscelare bene il campione prima di ogni analisi.

Commento: Questi trattamenti possono modificare la biochimica del plasma seminale, la motilità e la morfologia nemaspermica; per tale motivo si deve segnalare il loro utilizzo. Inoltre, ai fini della conta degli spermatozoi, per la valutazione della concentrazione si deve considerare la diluizione 1:2 (1 + 1) del seme con la bromelina.

2.3.2 Viscosità del liquido seminale

Una volta completata la fluidificazione, la viscosità del campione seminale viene valutata aspirando delicatamente il fluido con una pipetta monouso di plastica, con apertura ampia (approssimativamente 1.5 mm di diametro) in modo da consentire al liquido seminale di gocciolare per gravità, osservando la lunghezza di ogni filamento ottenuto. Un campione seminale normale fuoriesce dalla pipetta formando piccole gocce separate. Se la viscosità è alterata, la goccia formerà un filamento lungo più di 2 cm. In alternativa, la viscosità può essere valutata introducendo una bacchetta di vetro nel campione ed esaminando la lunghezza del filamento che si forma al momento dell'estrazione della bacchetta. La viscosità dovrebbe essere considerata anormale quando la lunghezza del filamento supera i 2 cm. Al contrario di un campione parzialmente non fluidificato, un liquido seminale viscoso mostra una viscosità omogenea e una densità che non cambia nel tempo. Una elevata viscosità si identifica dalle proprietà di elasticità del campione, che si retrae fortemente quando si tenta di pipettarlo. I metodi per diminuire la viscosità sono gli stessi che vengono utilizzati in caso di fluidificazione ritardata (vedi Sezione 2.3.1.1).

Commento: Una elevata viscosità può interferire con la valutazione della motilità, della concentrazione nemaspermica, degli anticorpi antispermatozoo e del dosaggio degli indici biochimici.

2.3.3 Aspetto dell'eiaculato

L'aspetto fisiologico di un campione seminale fluidificato è omogeneo, grigio-opalescente. Il liquido seminale può mostrare un aspetto meno opaco se la concentrazione di spermatozoi è molto bassa; il colore potrebbe essere differente, per es. rosso-bruno indicativo della presenza di emazie (emospermia), o giallo in pazienti con ittero o che assumono alcune vitamine o farmaci.

2.3.4 Volume del liquido seminale

Il volume dell'eiaculato è prodotto principalmente dalle secrezioni delle vescicole seminali e dalla prostata e in minore misura dalle ghiandole bulbouretrali e dagli epididimi. Una misura precisa del volume è essenziale in ogni valutazione dei campioni seminali, in quanto ciò permette il calcolo della concentrazione totale delle cellule nemespermiiche e non nemespermiiche nell'eiaculato.

Il modo migliore per misurare il volume è pesare il campione nel contenitore in cui è stato raccolto.

- Raccogliere il campione seminale in un contenitore pulito, monouso e precedentemente pesato.
- Pesare il contenitore con il campione seminale.
- Sottrarre il peso del contenitore.
- Calcolare il volume del campione seminale utilizzando il peso del campione stesso, assumendo la densità del seme uguale a 1g/ml (Auger *et al.*, 1995). La densità del seme varia tra 1.043 e 1.102 g/ml (Huggins *et al.*, 1942; Brazil *et al.*, 2004a; Cooper *et al.*, 2007).

Nota: I contenitori vuoti possono avere pesi differenti, per tale motivo ogni contenitore dovrebbe essere pesato singolarmente, prima di ogni raccolta. Il peso deve essere annotato sul contenitore prima di essere dato al paziente. È consigliabile utilizzare un pennarello indelebile per scrivere sul contenitore o sulla etichetta. Se il peso viene annotato su una etichetta, quest'ultima deve essere incollata prima che il contenitore vuoto venga pesato.

Un altro modo per valutare il volume è la misura diretta.

- Raccogliere il campione direttamente in un cilindro di vetro graduato, ad ampia apertura. Tali contenitori sono disponibili in commercio.
- Leggere il volume direttamente mediante la scala graduata (accuratezza 0.1 ml).

Nota: I seguenti metodi di misura del volume del campione seminale non vengono raccomandati: trasferire il campione dal contenitore mediante una pipetta o siringa; decantare il campione in un cilindro graduato. Questi metodi, infatti, non permettono di recuperare tutto il campione, determinando una sottostima del volume seminale, che può essere compresa tra 0.3 e 0.9 ml (Brazil *et al.*, 2004a; Iwamoto *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2007).

Commento 1: Un volume seminale basso è indice di una patologia ostruttiva dei dotti eiaculatori o assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti (CBAVD) (de la Taille *et al.*, 1998; Daudin *et al.*, 2000; von Eckardstein *et al.*, 2000; Weiske *et al.*, 2000), una condizione in cui le vescicole seminali sono scarsamente sviluppate.

Commento 2: Un volume seminale basso può essere anche causato da una raccolta non completa del campione seminale (perdita di una frazione dell'eiaculato), da eiaculazione retrograda parziale o deficit androgenico.

Commento 3: Un volume seminale elevato può riflettere, invece, l'essudazione nei casi di infiammazione acuta delle ghiandole accessorie.

2.3.4.1 Valori di riferimento inferiori

Il valore minimo di riferimento del volume seminale è 1.5 ml (5° percentile, intervallo di confidenza (IC) 95%, 1.4-1.7).

2.3.5 pH del liquido seminale

Il pH seminale deriva dal bilanciamento del pH delle secrezioni delle ghiandole accessorie, in particolare le secrezioni alcaline delle vescicole seminali e quelle acide della prostata. Il pH dovrebbe essere misurato, dopo la fluidificazione ad un tempo costante, preferibilmente dopo 30 minuti, ma in qualche caso entro 1 ora dall'eiaculazione, in quanto è influenzato dalla mancanza di CO₂ che si verifica dopo la produzione del campione.

Per la rilevazione del pH si possono utilizzare indicatori di pH con un range da 6.0 a 10.0.

- Miscelare bene il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
- Diffondere, in maniera uniforme, una goccia di liquido seminale nell'indicatore di pH.
- Aspettare che la colorazione della zona imbibita diventi uniforme (<30 secondi).
- Comparare il colore con la striscia di calibrazione e leggere il pH.

Nota: L'accuratezza dell'indicatore del pH dovrebbe essere controllata con uno standard noto.

Nel caso di liquidi seminali viscosi, il pH di piccole aliquote di fluido seminale può essere misurato avvalendosi dell'uso di un pHmetro, messo a punto per la valutazione di soluzioni viscosi (Haugen, Grotmol, 1998).

2.3.5.1 Valori di riferimento

Attualmente, esistono pochi valori di riferimento relativi al pH seminale di uomini fertili. In attesa di ulteriori dati, questo manuale mantiene un valore condiviso di 7.2, come minimo valore soglia.

Commento 1: Un pH minore di 7.0 in campioni seminali con basso volume e basso numero di spermatozoi può essere indicativo di una patologia ostruttiva dei dotti eiaculatori o assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti (de la Taille *et al.*, 1998; Daudin *et al.*, 2000; von Eckardstein *et al.*, 2000; Weiske *et al.*, 2000), una condizione in cui le vescicole seminali sono scarsamente sviluppate.

Commento 2: Il pH del liquido seminale aumenta con il tempo, in quanto diminuisce l'effetto tampone naturale, di conseguenza elevati pH possono fornire scarse informazioni utili al clinico.

2.4 Valutazione microscopica iniziale

Per la valutazione di preparati, a fresco, non colorati, è raccomandato l'utilizzo del microscopio a contrasto di fase (vedi Appendice 3 per come settare un microscopio). Inizialmente si esegue una valutazione generale dei preparati allestiti, a ingrandimento 100x (ciò deriva dal prodotto dell'ingrandimento dell'obiettivo 10x per l'ingrandimento dell'oculare 10x). Questa prima indagine fornisce una visione d'insieme del campione che rileva la presenza di:

- filamenti di muco;
- zone di spermioagglutinazione o di aggregazione nemaspermica;
- altre cellule non nemaspermiche, per esempio cellule epiteliali, "cellule rotonde" (leucociti e cellule germinali immature) e teste o code, isolate, di spermatozoi.

Si procede poi all'osservazione del preparato a ingrandimenti 200x o 400x (derivanti dalla combinazione dell'ingrandimento dell'obiettivo 20x o 40x con l'ingrandimento dell'oculare 10x).

Tale osservazione permette di:

- valutare la motilità degli spermatozoi (vedi Sezione 2.5);
- definire la diluizione necessaria per una accurata valutazione del numero degli spermatozoi (vedi Sezione 2.8).

2.4.1 Accurato miscelamento del campione e prelevamento di aliquote rappresentative dell'intero campione seminale

La natura dell'eiaculato post-fluidificazione rende problematico rilevare un campione rappresentativo dell'intero liquido seminale. Se il campione seminale non viene correttamente miscelato, le analisi di due aliquote separate possono rilevare differenze nella motilità, vitalità, concentrazione e morfologia nemaspermica. Per ottenere dati riproducibili, il campione seminale deve essere accuratamente miscelato prima di prelevare aliquote per la valutazione (vedi Riquadro 2.3), e i risultati per aliquote replicate dovrebbero concordare prima di accettare i valori ottenuti. La concordanza tra i replicati è determinata per il numero di spermatozoi dalla distribuzione di Poisson (vedi Riquadri 2.7 e 2.10 e Tabelle 2.4 e 2.5), e per le percentuali dalla distribuzione binomiale (vedi Riquadri 2.5 e 2.6 e Tabella 2.1).

Riquadro 2.3 Accurato miscelamento del liquido seminale

Prima di prelevare una aliquota di liquido seminale per la valutazione, miscelare accuratamente il campione nel contenitore di origine, delicatamente per evitare la formazione di bolle di aria. A tal fine, è consigliabile aspirare il campione, 10 volte, con pipette monouso di plastica (sterili se necessario) con apertura ampia approssimativamente di 1.5 mm di diametro. Non miscelare con vortex ad elevata velocità, in quanto ciò può danneggiare gli spermatozoi.

2.4.2 Allestimento del preparato a fresco

- Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
- Prelevare una aliquota di liquido seminale, immediatamente dopo aver miscelato, per evitare che gli spermatozoi sedimentino.
- Miscelare di nuovo il campione seminale prima di prelevare le aliquote replicate.

Il volume di liquido seminale prelevato e la dimensione del vetrino coprioggetto devono essere standardizzati. In tal modo le analisi vengono eseguite su un preparato il cui spessore è costante e di circa 20 μm (vedi Riquadro 2.4); ciò consente agli spermatozoi di muoversi liberamente:

- Porre un volume standard di liquido seminale, per es. 10 μl , su un vetrino portaoggetti pulito.
- Coprire la goccia con un vetrino coprioggetto, per es. 22 mm x 22 mm per una goccia di 10 μl , al fine di creare una camera di conta di profondità di circa 20 μm . Il peso del vetrino coprioggetto diffonde la goccia di campione seminale.
- Evitare la formazione di bolle di aria tra i vetrini coprioggetto e portaoggetti.
- Valutare il preparato a fresco, rapidamente, non appena il contenuto si è stabilizzato.

Riquadro 2.4 Spessore del preparato a fresco

Lo spessore di un preparato a fresco (S μm) si ottiene dividendo il volume del campione (V , $\mu\text{l} = \text{mm}^3$) per l'area entro cui si diffonde (A , mm^2): $S = V/A$. Quindi, una goccia di 10 μl di liquido seminale, depositata su un vetrino portaoggetti e coperta con un vetrino coprioggetto 22 mm x 22 mm (area 484 mm^2) forma una camera di spessore pari a 20.7 μm ; una goccia di 6.5 μl di campione seminale, coperta con un vetrino coprioggetto 18 mm x 18 mm (area 324 mm^2) forma uno strato di 20.1 μm di spessore; 11 μl di campione seminale coperti con un vetrino coprioggetto 21 mm x 26 mm (area 546 mm^2) forma uno strato di spessore pari a 20.1 μm . In alcuni casi è necessaria la formazione di una camera con un maggiore spessore: una goccia di 40 μl coperta con un vetrino coprioggetto 24 mm x 50 mm (area 1.200 mm^2) forma uno strato di spessore pari a 33.3 μm .

Nota 1: Una camera di conta di spessore inferiore a 20 μm impedisce i movimenti rotazionali degli spermatozoi (Le Lannou *et al.*, 1992; Kraemer *et al.*, 1998).

Nota 2: Se la camera di conta è troppo profonda, sarà difficile valutare gli spermatozoi e mettere a fuoco il preparato.

Nota 3: Se il numero di spermatozoi, per campo visivo, varia in modo considerevole, il campione non è omogeneo. In tal caso, si deve miscelare di nuovo e accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3), e si deve allestire una nuova preparazione, come descritto sopra.

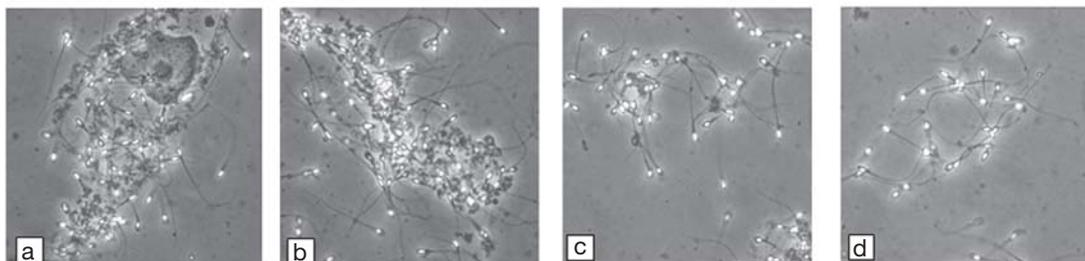
Nota 4: La mancanza di omogeneità nel campione seminale può derivare da una consistenza anormale, da una alterata fluidificazione (vedi Sezione 2.3.1), da aggregati di spermatozoi (vedi Sezione 2.4.3) o zone di spermioagglutinazione (vedi Sezione 2.4.4).

2.4.3 Aggregazione nemaspermica

Si considera una aggregazione non-specifica l'adesione tra di loro di spermatozoi immobili o di spermatozoi mobili a filamenti di muco, alla componente cellulare non nemaspermica o a detriti (Fig. 2.2) e tali quadri dovrebbero essere segnalati.

Fig. 2.2 Aggregazione non-specifica di spermatozoi nel liquido seminale

Quadri di spermatozoi aggregati a cellule epiteliali (a), detriti (b) o spermatozoi (c, d).



Microfotografia gentilmente concessa da C Brazil.

2.4.4 Agglutinazione nemaspermica

Si definiscono agglutinazioni specifiche quelle in cui gli spermatozoi mobili aderiscono tra di loro, testa-testa, coda-coda, o in forma mista. La motilità spesso è vigorosa con un movimento agitato frenetico, ma in alcuni casi gli spermatozoi sono talmente agglutinati che i loro movimenti sono limitati. Gli spermatozoi mobili che si legano tra di loro per la testa, coda o tratto intermedio, dovrebbero essere annotati.

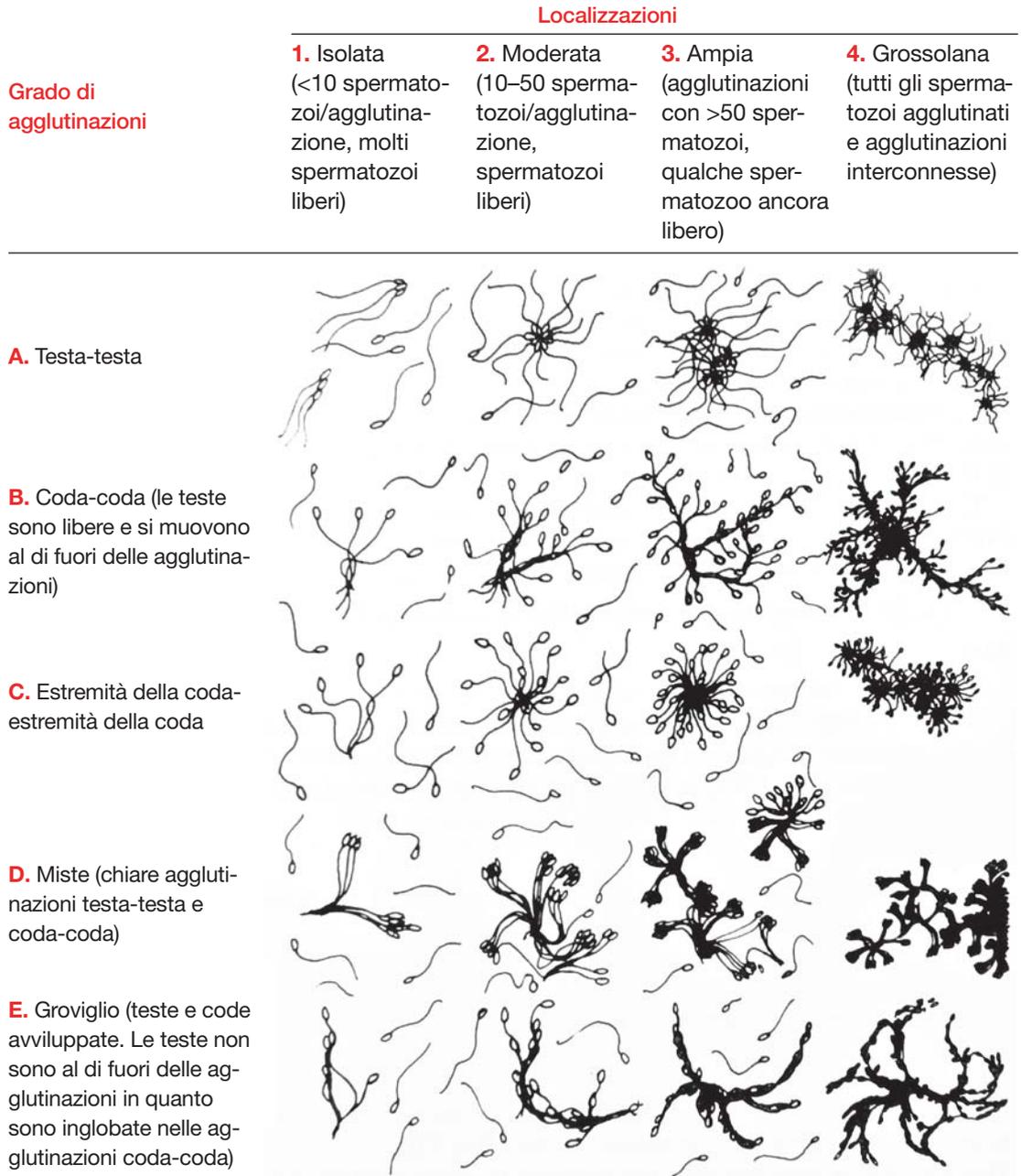
Dovrebbe essere segnalato il tipo principale di agglutinazione che riflette il grado (1-4) e il sito di legame (A-E) (Rose *et al.*, 1976) (vedi Fig. 2.3):

- grado 1: isolata <10 spermatozoi coinvolti in ogni agglutinazione, molti spermatozoi liberi
- grado 2: moderata 10-50 spermatozoi coinvolti in ogni agglutinazione, spermatozoi liberi
- grado 3: ampia agglutinazioni con >50 spermatozoi, qualche spermatozoo ancora libero

- grado 4: grossolana tutti gli spermatozoi sono agglutinati e le agglutinazioni sono interconnesse

Nota: Non devono essere considerati come agglutinazioni gli spermatozoi mobili adesi a cellule o detriti o gli spermatozoi immobili adesi tra di loro (aggregati).

Fig. 2.3 Schema delle diverse localizzazioni delle agglutinazioni nemaspermiche



Riprodotta da Rose et al. (1976) per concessione di Wiley-Blackwell.

Commento 1: La presenza di agglutinazioni non è sufficiente per dedurre una causa immunologica di infertilità, ma è suggestiva della presenza di anticorpi antispermatozoo; in questo caso vengono richieste ulteriori indagini (vedi Sezione 2.20).

Commento 2: Numerose agglutinazioni possono rendere difficoltosa la valutazione delle motilità e della concentrazione nemaspermica.

2.4.5 Componente cellulare non nemaspermica

Il liquido seminale contiene altre cellule, oltre gli spermatozoi, alcune delle quali possono essere clinicamente rilevanti. Tali cellule comprendono le cellule epiteliali provenienti dal tratto genitourinario, i leucociti e le cellule germinali immature; queste ultime due tipologie di cellule vengono definite “cellule rotonde” (Johanisson *et al.*, 2000). Le cellule rotonde possono essere identificate mediante la valutazione di strisci al microscopio ottico a 1000x (vedi Sezione 2.12, Tavole 13 e 14, Sezione 2.19); possono essere rilevate e quantizzate in modo più preciso mediante l'identificazione dell'attività perossidasi (vedi Sezione 2.18) o degli antigeni CD45 (vedi Sezione 3.2). La loro concentrazione può essere stimata, come per gli spermatozoi, mediante un preparato a fresco (vedi Sezione 2.18.1.5) o dal rapporto tra tali cellule e il numero di spermatozoi contati su striscio colorato, per la concentrazione di spermatozoi (vedi Sezione 2.12.1).

2.5 Motilità nemaspermica

Il grado della motilità progressiva degli spermatozoi (vedi Sezione 2.5.1) è correlato alla percentuale di gravidanza (Jouannet *et al.*, 1988; Larsen *et al.*, 2000; Zinaman *et al.*, 2000). I metodi di valutazione della motilità mediante sistemi di analisi computerizzata (CASA) sono descritti in Sezione 3.5.2. La motilità degli spermatozoi nel liquido seminale dovrebbe essere analizzata, appena possibile, dopo la fluidificazione del campione, preferibilmente dopo 30 minuti, al massimo entro 1 ora, dall'ejaculazione, per limitare gli effetti deleteri sulla motilità della disidratazione, del pH o dei cambiamenti di temperatura.

- Miscelare il campione accuratamente (vedi Riquadro 2.3).
- Prelevare una aliquota di liquido seminale subito dopo aver miscelato il campione, per evitare la sedimentazione degli spermatozoi.
- Miscelare nuovamente il campione, prima di allestire una aliquota di replicato.
- Per ogni replicato, allestire un preparato a fresco, approssimativamente dello spessore di 20 µm (vedi Sezione 2.4.2).
- Aspettare che il campione si stabilizzi (entro 60 secondi).
- Esaminare il preparato al microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 200x o 400x.
- Valutare circa 200 spermatozoi in ogni preparato, al fine di effettuare una percentuale per le diverse categorie di motilità.

- Comparare i valori dei preparati replicati, per verificarne la ripetibilità. Se i valori sono accettabili, si procede con i calcoli; in caso negativo si devono preparare altri campioni.

Nota 1: La valutazione deve essere effettuata a temperatura ambiente o a 37°C, con un microscopio con tavolino riscaldato e dovrebbe essere standardizzata per ciascun laboratorio. Se la valutazione della motilità viene eseguita a 37°C, il campione dovrebbe essere incubato a questa temperatura e l'allestimento del preparato dovrebbe essere effettuato con vetrini portaoggetto e coprioggetto pre-riscaldati.

Note 2: È raccomandato l'uso di un reticolo oculare con una griglia (vedi Fig. 2.4a), al fine di limitare l'area di osservazione; ciò consente di valutare la stessa area del vetrino durante l'analisi. Inizialmente viene valutata la motilità progressiva, poi la non-progressiva e infine gli immobili (vedi Sezione 2.5.1). Limitando l'area, e quindi il numero degli spermatozoi valutati, si è sicuri che venga esaminata la motilità di diverse aree del preparato.

2.5.1 Categorie di movimento nemaspermico

È consigliabile un sistema semplice di classificazione della motilità che distingue gli spermatozoi in progressivi, non-progressivi e immobili. La motilità di ogni spermatozoo è classificata nel modo seguente:

- Motilità progressiva (PR): lo spermatozoo si muove attivamente, in modo lineare o in un ampio circolo, indipendentemente dalla velocità.
- Motilità non-progressiva (NP): comprende tutti gli altri tipi di motilità in cui non c'è progressione nello spazio, per es. movimenti che descrivono piccoli circoli oppure quando l'onda flagellare riesce a spostare appena la testa o ancora quando si osserva soltanto il movimento flagellare.
- Immobilità (IM): nessun movimento.

Commento 1: La precedente edizione di questo manuale distingueva la motilità progressiva degli spermatozoi in rapida o lenta, con una velocità $>25 \mu\text{m}/\text{sec}$ a 37°C, definendo gli spermatozoi di "grado a". Tuttavia, è difficile per i seminologi definire la progressione rettilinea in modo così preciso senza commettere errori (Cooper, Yeung, 2006).

Commento 2: Quando si parla di motilità nemaspermica, è importante specificare la motilità totale (PR+NP) o la progressiva (PR).

2.5.2 Preparazione e valutazione di un campione per la motilità

- Se la motilità viene valutata a 37°C, accendere il tavolino riscaldato 10 minuti prima, affinché la temperatura si stabilizzi.
- Allestire un preparato a fresco di 20 μm di spessore (vedi Sezione 2.4.2).

- Esaminare il vetrino con una ottica a contrasto di fase ad ingrandimento 200x o 400x.
- Aspettare che il campione si stabilizzi.
- Osservare gli spermatozoi in una area di almeno 5 mm dal bordo del coprioggetto (vedi Fig. 2.4b), ciò per evitare che artefatti dovuti all'essiccamento alterino la motilità.
- Valutare in modo sistematico tutto il vetrino per evitare di osservare ripetutamente sempre la stessa area. Cambiare spesso i campi microscopici. Evitare di scegliere i campi in base al numero di spermatozoi mobili osservati (la scelta del campo dovrebbe essere casuale).
- Iniziare ad analizzare un determinato campo visivo in modo casuale. Non aspettare che gli spermatozoi entrino nel campo o nella griglia per iniziare la valutazione.
- Valutare la motilità di tutti gli spermatozoi entro un'area definita del campo. Ciò viene effettuato, con più facilità, utilizzando un reticolo oculare (vedi Fig. 2.4a). Selezionare la parte del campo o della griglia che deve essere analizzata sulla base della concentrazione degli spermatozoi, cioè contare soltanto la riga in alto della griglia, se la concentrazione degli spermatozoi è elevata; contare, invece, l'intera griglia se la concentrazione è bassa.
- Analizzare e contare rapidamente per evitare di sovrastimare il numero di spermatozoi mobili. Lo scopo è contare immediatamente tutti gli spermatozoi nella sezione della griglia; evitare di contare quelli che sono presenti all'inizio, più quelli che entrano nella sezione della griglia durante la conta; ciò determinerebbe un errore nel risultato, sovrastimando gli spermatozoi mobili.
- Inizialmente valutare attentamente la sezione della griglia per ricercare le cellule con motilità progressiva (PR) (vedi Sezione 2.5.1). Successivamente, nella stessa sezione di griglia contare gli spermatozoi con motilità NP, e in ultimo gli spermatozoi IM. Acquisendo esperienza, sarà possibile contare tutte e tre le categorie di motilità degli spermatozoi contemporaneamente, e sarà possibile valutare un'area più ampia della griglia.
- Contare il numero degli spermatozoi per ciascuna motilità aiutandosi con un contacellule da laboratorio.
- Valutare almeno 200 spermatozoi, in un totale di almeno cinque campi, per ogni replicato, al fine di ottenere un errore accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.5).
- Calcolare la media della percentuale e la differenza tra le due percentuali relative al grado di motilità più frequente (PR, NP o IM) tra i replicati delle preparazioni a fresco.
- Determinare l'accettabilità della differenza dalla Tabella 2.1 o dalla Fig. A7.2, Appendice 7 (ciascuna mostra la massima differenza tra le due percentuali attese nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento).

- Se la differenza tra le percentuali è accettabile, riportare la media delle percentuali per ciascun grado di motilità (PR, NP e IM). Se la differenza è troppo alta, prelevare due nuove aliquote dal campione seminale, allestire due nuove preparazioni e ripetere la valutazione (vedi Riquadro 2.6).
- Riportare la media della percentuale di ciascun grado di motilità arrotondandola al più vicino numero intero.

Nota 1: Valutare soltanto gli spermatozoi intatti (con testa e coda, vedi Sezione 2.7.3), in quanto solo gli spermatozoi intatti vengono contati per la concentrazione nemaspermica. Non contare le acefalie mobili.

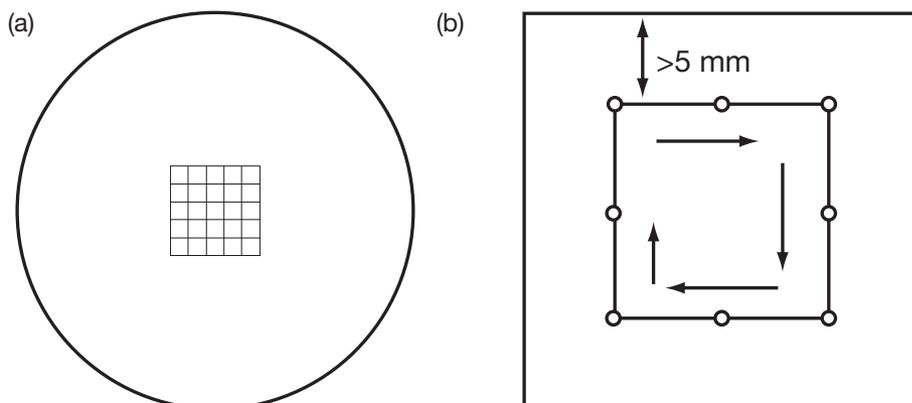
Nota 2: Se gli spermatozoi vengono valutati in due fasi (cioè nella stessa area, prima PR, poi NP e IM) e vengono contati 200 spermatozoi prima di avere analizzato tutte le categorie di motilità nella stessa area di valutazione, il conteggio deve continuare oltre i 200 spermatozoi, fino a che non siano state contate tutte le categorie, in modo da evitare l'errore verso la categoria di motilità analizzata per prima.

Nota 3: È comune sovrastimare la motilità degli spermatozoi, ma ciò si può spesso evitare invertendo l'ordine dell'analisi (prima NP e IM), utilizzando un reticolo oculare, essendo consapevoli delle potenziali fonti di errore e, per quanto possibile, cercando di evitarle (vedi Sezione 7.13.3).

Nota 4: In rari casi, con campioni non omogenei, anche una terza serie di replicati può fornire differenze non accettabili. In questo caso, bisogna calcolare le medie di tutti i replicati e annotarle nella scheda di registrazione.

Fig. 2.4 Supporti alla valutazione della motilità

(a) Un reticolo oculare rende più semplice la conta di spermatozoi mobili e immobili. (b) Selezione sistematica di campi visivi per la valutazione della motilità nemaspermica almeno 5 mm dai bordi del vetrino coprioggetto.



Riquadro 2.5 Errori nella valutazione delle percentuali

Quanto sia sicura la propria valutazione della percentuale dipende non solo dal numero (N) di spermatozoi contati, ma anche dalla esatta, ma non nota, percentuale (p) (distribuzione binomiale). L'errore standard indicativo (ES) è $\sqrt{(p(100-p))/N}$ per le percentuali tra 20 e 80. Al di fuori di questo range, un metodo più appropriato da utilizzare è la trasformazione angolare (radice quadrata arc sin), $z = \sin^{-1}\sqrt{(p/100)}$, con deviazione standard di $1/(2\sqrt{N})$ radianti, che dipende solo dal numero di spermatozoi contati e non dalla percentuale vera.

Tabella 2.1 Differenze accettabili tra due percentuali medie, determinate da conte replicate di 200 spermatozoi (400 spermatozoi totali contati)

Percentuale (%)	Differenza accettabile*	Percentuale (%)	Differenza accettabile*
0	1	66-76	9
1	2	77-83	8
2	3	84-88	7
3-4	4	89-92	6
5-7	5	93-95	5
8-11	6	96-97	4
12-16	7	98	3
17-23	8	99	2
24-34	9	100	1
35-65	10		

*Basati sull'arrotondamento al 95% dell'intervallo di confidenza.

Riquadro 2.6 Confronto tra percentuali di replicati

Le percentuali dovrebbero essere arrotondate al numero intero più vicino. Per convenzione 0.5% si arrotonda al numero pari più vicino, per es. 32.5% può essere arrotondato per difetto a 32% ma 3.5% può essere arrotondato per eccesso a 4%. È da notare che le percentuali arrotondate non possono superare il 100%.

Se la differenza tra le medie percentuali di replicati è minore o uguale a quelle indicate in Tabella 2.1 le valutazioni vengono accettate e come risultato finale vengono considerate le medie.

Valori maggiori rispetto alle differenze considerate accettabili suggeriscono che è stato commesso un errore di conta o di pipettamento, oppure che le cellule non sono state miscelate bene, con una distribuzione non casuale nella camera o sul vetrino. Quando la differenza tra le percentuali è più grande rispetto a quella accettabile, scartare i primi due valori ed effettuare una nuova valutazione (non contare un terzo campione e considerare la media dei tre valori o la media dei due valori più vicini).

Per valutazioni della motilità nemaspermica, della vitalità mediante la sola eosina e del swelling test preparare replicati a fresco da nuove aliquote di liquido seminale. Per la valutazione della vitalità da strisci colorati con eosina-nigrosina e per la morfologia nemaspermica rivalutare i vetrini in replicato.

Con valori di cut off nell'IC del 95%, approssimativamente il 5% dei replicati sarà fuori dai limiti per effetto della sola variabilità casuale (vedi Appendice 7, Sezione A7.3). Possono essere creati con il computer limiti di confidenza binomiali, e questi vengono usati nel manuale per grafici e tabelle forniti per valutare replicati concordanti.

2.5.3 Esempi

Esempio 1. Le motilità nemaspermiche valutate con conte replicate di 200 spermatozoi sono: progressiva, 30% e 50%; non-progressiva, 5% e 15%; immobili, 65% e 35%. La categoria di motilità più rappresentata è quella degli immobili, con una media del 50% e una differenza del 30%. La Tabella 2.1 indica che, per una media del 50%, la differenza attesa, per effetto della sola variabilità casuale, non deve eccedere il 10%. Se le differenze osservate sono maggiori, i risultati devono essere scartati e devono essere allestiti altri due vetrini a fresco e valutati nuovamente.

Esempio 2. Le motilità nemaspermiche valutate con conte replicate di 200 spermatozoi sono: progressiva, 37% e 28%; non-progressiva, 3% e 6%; immobili 60% e 66%. La categoria di motilità più rappresentata è quella degli immobili, con una media del 63% e una differenza del 6%. La Tabella 2.1 indica che, per una media del 63%, la differenza attesa, per effetto della sola variabilità casuale, non deve eccedere il 10%. Se la differenza osservata è minore, i risultati vengono accettati e le medie dei valori saranno: PR 32%, NP 4%, IM 63%.

2.5.4 Limiti inferiori di riferimento

Il limite inferiore di riferimento per la motilità totale (PR+NP) è 40% (5° percentile, IC 95% 38–42).

Il limite inferiore di riferimento per la motilità progressiva (PR) è 32% (5° percentile, IC 95% 31–34).

Commento: Il numero totale di spermatozoi con motilità progressiva nell'eiaculato è biologicamente importante. Tale valore si ottiene moltiplicando il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato (vedi Sezione 2.8.7) per la percentuale di cellule con motilità progressiva.

2.6 Vitalità nemaspermica

La vitalità degli spermatozoi, valutata mediante l'integrità della membrana cellulare, può essere determinata routinariamente su tutti i campioni, ma è particolarmente importante per i campioni con meno del 40% di motilità progressiva. Tale test rappresenta un controllo della valutazione della motilità, dal momento che la percentuale di cellule morte non dovrebbe superare (nei limiti dell'errore di campionamento) la percentuale di spermatozoi immobili. La percentuale di cellule vitali, normalmente, supera quella delle cellule mobili.

La percentuale di spermatozoi vitali viene valutata identificando quelli con membrana cellulare intatta, mediante esclusione del colorante o rigonfiamento iposmo-

tico. L'esclusione del colorante si basa sul principio che le membrane cellulari danneggiate, come si osserva nelle cellule morte, permettono la penetrazione di coloranti che normalmente non permeano la membrana. Il rigonfiamento iposmotico si basa sul presupposto teorico che solo le cellule con membrana intatta (cellule vitali) si rigonfiano in soluzione ipotonica. Esempi di ciascun test sono descritti sotto.

La vitalità nemaspermica dovrebbe essere valutata il più presto possibile dopo la fluidificazione del campione seminale, preferibilmente dopo 30 minuti, ma in alcuni casi entro un'ora dall'eiaculazione, per limitare gli effetti negativi sulla vitalità dovuti alla disidratazione o ai cambiamenti di temperatura.

Commento 1: È clinicamente importante sapere se gli spermatozoi immobili sono vitali o morti. I risultati della vitalità e della motilità dovrebbero essere valutati insieme nello stesso campione seminale.

Commento 2: La presenza di una elevata percentuale di cellule vitali ma immobili può essere indicativa di difetti strutturali del flagello (Chemes, Rawe, 2003); una elevata percentuale di cellule immobili e non vitali (necrozoospermia) può essere attribuita a patologie epididimarie (Wilton *et al.*, 1988; Correa-Perez *et al.*, 2004).

2.6.1 Test di vitalità mediante eosina-nigrosina

La tecnica di colorazione one-step utilizza la nigrosina per aumentare il contrasto tra il fondo e la testa degli spermatozoi, in modo da renderli più evidenti. Inoltre, con questa tecnica è possibile conservare i vetrini per una nuova valutazione o per il controllo di qualità (Björndahl *et al.*, 2003).

2.6.1.1 Preparazione dei reagenti

1. Eosina Y: sciogliere, riscaldando leggermente, 0.67 g di eosina Y (colour index 45380) e 0.9 g di cloruro di sodio (NaCl) in 100 ml di acqua distillata.
2. Eosina-nigrosina: aggiungere 10 g di nigrosina (colour index 50420) a 100 ml di soluzione di eosina Y.
3. Portare ad ebollizione la sospensione e lasciare raffreddare a temperatura ambiente.
4. Filtrare mediante carta da filtro (per es. 90 g/m²) per rimuovere precipitati granulosi e gelatinosi; conservare in una bottiglia di vetro scura sigillata.

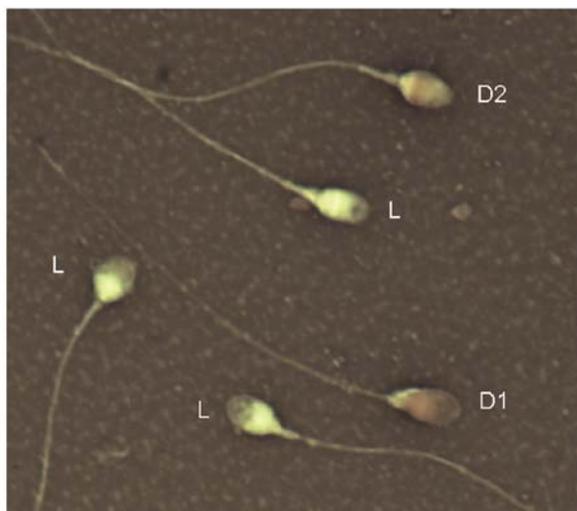
2.6.1.2 Procedura

1. Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Prelevare 50 µl di liquido seminale e miscelare con un eguale volume di sospensione di eosina-nigrosina; porre il tutto, per esempio, in una piastra di porcellana a pozzetti o in una provetta, e aspettare 30 secondi.
3. Miscelare di nuovo il liquido seminale prima di prelevare un'altra aliquota, miscelare con eosina-nigrosina e procedere come nel punto 2.

4. Per ciascuna sospensione fare uno striscio su vetrino (vedi Sezione 2.13.2) e lasciare asciugare all'aria.
5. Dopo che il vetrino si è asciugato, valutare immediatamente il preparato. Oppure, per una valutazione successiva, chiuderlo con mezzo di montaggio permanente non-acquoso (vedi Sezione 2.14.2.5).
6. Esaminare ciascun vetrino con microscopio ottico in campo chiaro ad ingrandimento 1000x ad immersione ad olio.
7. Contare il numero di cellule colorate (morte) o non colorate (vitali) con l'ausilio di un contacellule da laboratorio.
8. Valutare 200 spermatozoi in ciascun replicato, per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.5).
9. Calcolare la media e la differenza delle due percentuali di cellule vitali provenienti da vetrini preparati in replicato.
10. Determinare l'accettabilità delle differenze dalla Tabella 2.1 o dalla Fig. A 7.2, Appendice 7 (ciascuna indica la massima differenza tra due percentuali attese nel 95% dei campioni dovuta al solo errore di campionamento).
11. Se la differenza tra le percentuali è accettabile, considerare la percentuale media degli spermatozoi vitali. Se la differenza è troppo alta, allestire due nuovi preparati a fresco di liquido seminale e ripetere la valutazione (vedi Riquadro 2.6).
12. Riportare la percentuale media degli spermatozoi vitali al numero intero più vicino.

Fig. 2.5 Striscio con colorazione eosina-nigrosina osservato al microscopio ottico in campo chiaro

Spermatozoi con teste rosse (D1) o rosa scuro (D2) sono considerati morti (membrane danneggiate), mentre gli spermatozoi con teste bianche (L) o rosa chiaro sono considerati vitali (membrane intatte).



Microfotografia gentilmente concessa da TG Cooper.

2.6.1.3 Valutazione

1. La nigrosina rende il fondo scuro e ciò permette, in modo più agevole, la distinzione degli spermatozoi debolmente colorati.
2. Al microscopio ottico in campo chiaro, gli spermatozoi vitali presentano teste bianche mentre negli spermatozoi morti le teste si colorano in rosso o rosa scuro (vedi Fig. 2.5). Gli spermatozoi che presentano teste colorate in rosa pallido vengono considerati vitali.
3. Se la colorazione è limitata soltanto ad una parte della regione del collo, e il resto dell'area della testa non è colorata, ciò viene considerato come "perdita membranaria del collo", non come segno di morte cellulare e totale distruzione della membrana. Queste cellule dovrebbero essere valutate come vitali.

2.6.1.4 Limiti di riferimento inferiori

Il limite di riferimento inferiore per la vitalità (membrana degli spermatozoi intatta) è 58% (5° percentile, IC 95% 55–63).

Commento: Il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato con membrana intatta è importante da un punto di vista biologico. Tale parametro viene ottenuto moltiplicando il numero totale di spermatozoi dell'eiaculato (vedi Sezione 2.8.7) per la percentuale di cellule con membrana intatta.

2.6.2 Test di vitalità con l'utilizzo della sola eosina

Tale metodo è semplice e rapido, ma le preparazioni a fresco non possono essere conservate per il controllo di qualità.

2.6.2.1 Preparazione dei reagenti

1. NaCl, 0.9% (p/v): sciogliere 0.9 g di NaCl in 100 ml di acqua distillata.
2. Eosina Y, 0.5% (p/v): sciogliere 0.5 g di eosina Y (colour index 45380) in 100 ml di 0.9% NaCl.

Nota: Alcune soluzioni di eosina, disponibili in commercio, sono soluzioni acquose ipotoniche che possono alterare gli spermatozoi dando dei risultati falsi positivi (Björndahl *et al.*, 2004). Se si utilizza una soluzione di questo tipo, aggiungere 0.9 gr di NaCl a 100 ml di soluzione per aumentare l'osmolarità.

2.6.2.2 Procedura

1. Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Prelevare una aliquota di 5 μ l di liquido seminale e unire a 5 μ l di soluzione di eosina, su un vetrino. Miscelare, con movimenti circolari, le due gocce sul vetrino, utilizzando una punta della micropipetta.

3. Coprire con un coprioggetto 22 mm x 22 mm e aspettare 30 secondi.
4. Miscelare nuovamente il campione seminale, prelevare una aliquota per il replicato, miscelare con eosina e procedere come nei punti 2 e 3.
5. Esaminare ciascun vetrino, preferibilmente con microscopio a contrasto di fase negativo (il microscopio a contrasto di fase positivo rende le teste rosa chiaro difficili da identificare) ad ingrandimento 200x o 400x.
6. Contare il numero di cellule colorate (morte) e non colorate (vitali) con l'ausilio di un contacellule.
7. Valutare 200 spermatozoi per ogni replicato, per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.5).
8. Calcolare la media e la differenza tra le due percentuali di cellule vitali delle preparazioni replicate.
9. Determinare l'accettabilità delle differenze dalla Tabella 2.1 o dalla Fig. A7.2, Appendice 7 (ciascuna indica la massima differenza tra due percentuali attese nel 95% dei campioni dovuta al solo errore di campionamento).
10. Se la differenza tra le percentuali è accettabile, riportare la percentuale media di spermatozoi vitali. Se la differenza è troppo alta, allestire due nuove aliquote di liquido seminale e ripetere la valutazione (vedi Riquadro 2.6).
11. Riportare la media della percentuale di spermatozoi vitali al più vicino numero intero.

2.6.2.3 Valutazione

1. Gli spermatozoi vitali hanno teste bianche o rosa chiaro mentre gli spermatozoi morti hanno teste colorate in rosso o rosa scuro.
2. Se la colorazione è presente solo in una parte della regione del collo, mentre il resto dell'area della testa non è colorata, ciò viene considerato come "perdita membranaria del collo", non come segno di morte cellulare e totale distruzione della membrana. Queste cellule dovrebbero essere valutate come vitali.
3. Se risulta difficile discriminare le teste colorate in rosa pallido, usare la nigrosina per aumentare il contrasto del fondo (vedi Sezione 2.6.1).

2.6.2.4 Limiti di riferimento inferiori

Il limite di riferimento inferiore per la vitalità (membrana degli spermatozoi intatta) è 58% (5° percentile, IC 95% 55-63).

Commento: Il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato con membrana intatta è importante da un punto di vista biologico. Questo viene ottenuto moltiplicando il numero totale di spermatozoi dell'eiaculato (vedi Sezione 2.8.7) per la percentuale di cellule con membrana intatta.

2.6.3 Test di vitalità mediante l'uso del rigonfiamento iposmotico

Il rigonfiamento iposmotico (HOS) può essere utilizzato come test alternativo all'esclusione del colorante per valutare la vitalità (Jeyendran *et al.*, 1984). Tale test è utile quando si deve evitare la colorazione degli spermatozoi, per es. quando si devono scegliere gli spermatozoi per la ICSI. Gli spermatozoi con membrane cellulari intatte si rigonfiano in cinque minuti in un mezzo iposmotico e la forma del flagello si stabilizza in 30 minuti (Hossain *et al.*, 1998).

Quindi, utilizzare:

- 30 minuti di incubazione per diagnostica di routine; ma
- 5 minuti di incubazione quando gli spermatozoi devono essere processati per uso terapeutico.

2.6.3.1 Preparazione dei reagenti

1. Soluzione iposmotica a fini diagnostici: sciogliere 0.735 g di citrato di sodio diidrato e 1.351 g di D-fruttosio in 100 ml di acqua distillata. Congelare aliquote di 1 ml di questa soluzione a -20°C.
2. Per uso terapeutico, diluire il medium 1:2 (1 + 1) con acqua distillata sterile.

2.6.3.2 Procedura

1. Scongela la soluzione iposmotica e miscelare accuratamente prima dell'uso.
2. Riscaldare a 37°C per 5 minuti 1 ml di soluzione iposmotica oppure 1 ml del medium diluito 1:2 (1 + 1) in una provetta da microcentrifuga, chiusa.
3. Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
4. Prelevare una aliquota di 100 µl di liquido seminale e aggiungerla alla soluzione iposmotica. Miscelare delicatamente, aspirando ed espellendo il liquido dalla pipetta.
5. Incubare a 37°C per esattamente 5 o 30 minuti (vedi sopra), successivamente porre una aliquota di 10 µl su un vetrino portaoggetti e coprire con un coprioggetto 22 mm x 22 mm.
6. Mescolare nuovamente il campione, prelevare una aliquota seminale per un replicato, miscelare con la soluzione iposmotica, incubare e preparare un vetrino replicato, come sopra.
7. Esaminare ciascun vetrino con microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 200x o 400x.
8. Contare il numero di cellule non rigonfie (morte) e rigonfie (vitali), con l'ausilio di un contacellule.
9. Valutare 200 spermatozoi per ciascun replicato, per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.5).

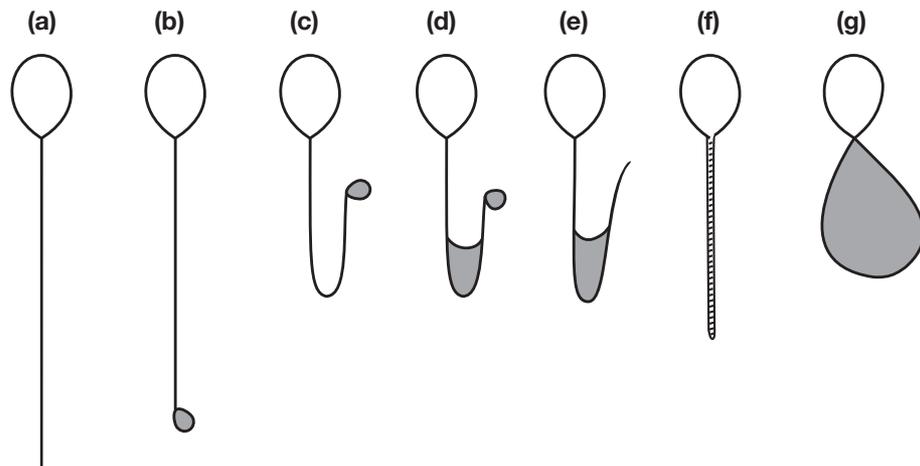
10. Calcolare la media e la differenza delle due percentuali di cellule vitali provenienti dai replicati.
11. Determinare l'accettabilità della differenza dalla Tabella 2.1 o dalla Fig. A7.2, Appendice 7 (ciascuna indica la massima differenza tra due percentuali attese nel 95% dei campioni dovuta al solo errore di campionamento).
12. Se la differenza tra le percentuali è accettabile, riportare la percentuale media di spermatozoi vitali. Se la differenza è troppo alta allestire due nuovi preparati di liquido seminale e ripetere la valutazione (vedi Riquadro 2.6).
13. Riportare la media delle percentuali di spermatozoi vitali al più vicino numero intero.

2.6.3.3 Valutazione

1. Gli spermatozoi rigonfi vengono identificati dalle modificazioni che si verificano nella forma della cellula, come indicato dal rigonfiamento della coda (Fig. 2.6).
2. Gli spermatozoi vitali vengono distinti dalla presenza di code rigonfie; valutare tutti gli spermatozoi con code rigonfie come vitali.

Fig. 2.6 Rappresentazione schematica delle tipiche modificazioni morfologiche in spermatozoi umani sottoposti a stress iposmotico

(a) Nessun cambiamento. (b)-(g) Vari tipi di variazione della coda. Il rigonfiamento della coda è indicato da un'area grigia.



Riprodotta da Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. (1984), *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219-228. © Society for Reproduction and Fertility (1984). Riprodotta con autorizzazione.

2.6.3.4 Limiti di riferimento inferiori

I valori del test HOS sono simili a quelli del test all'eosina (Carreras *et al.*, 1992).

I limiti di riferimento inferiori per la vitalità (spermatozoi con membrana intatta) è 58% (5° percentile, IC al 95% 55-63).

Commento: Il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato con membrana intatta è importante da un punto di vista biologico. Ciò viene ottenuto moltiplicando il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato (vedi Sezione 2.8.7) per la percentuale di cellule con membrana intatta.

2.7 Concentrazione nemaspermica

Il numero di spermatozoi totale per eiaculato e la concentrazione di spermatozoi sono correlati sia al tempo di attesa per la gravidanza (Slama *et al.*, 2002) che alla percentuale di gravidanza (WHO, 1996; Zinaman *et al.*, 2000) e sono predittivi del concepimento (Bonde *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2000). È necessario acquisire un numero maggiore di dati sulla correlazione tra numero totale di spermatozoi e il successo riproduttivo.

Il numero di spermatozoi nell'eiaculato viene calcolato dalla concentrazione di spermatozoi determinata nell'analisi seminale. Se non c'è un'ostruzione nel tratto genitale maschile e il periodo di astinenza non è breve, nel caso di eiaculati normali il numero totale di spermatozoi dell'eiaculato viene correlato con il volume testicolare (Handelsman *et al.*, 1984; WHO, 1987; Andersen *et al.*, 2000; Behre *et al.*, 2000) ed è, quindi, una misura della capacità dei testicoli di produrre spermatozoi (MacLeod, Wang, 1979) e della pervietà delle vie genitali.

La concentrazione di spermatozoi nel liquido seminale, sebbene sia correlata con la percentuale di fecondazione e gravidanza, è influenzata dal volume delle secrezioni provenienti dalle vescicole seminali e dalla prostata (Eliasson, 1975) e non rappresenta un indice specifico della funzione testicolare.

Commento 1: I termini “numero totale di spermatozoi” e “concentrazione di spermatozoi” non sono sinonimi. Concentrazione nemaspermica si riferisce al numero di spermatozoi per unità di volume del liquido seminale ed è funzione del numero di spermatozoi emessi e del volume del fluido in cui sono diluiti. Il numero totale di spermatozoi si riferisce al numero totale di spermatozoi nell'intero eiaculato e si ottiene moltiplicando la concentrazione nemaspermica per il volume del liquido seminale.

Commento 2: La generalizzazione che il numero totale di spermatozoi rifletta la produzione testicolare nemaspermica non è corretta per gli elettro-eiaculati di pazienti con lesioni del midollo spinale, di pazienti con insufficienza androgenica o per campioni raccolti dopo prolungata astinenza o parziale eiaculazione retrograda.

Commento 3: Il termine “densità nemaspermica” (massa per unità di volume) non dovrebbe essere utilizzato per intendere la concentrazione di spermatozoi (numero per unità di volume).

La determinazione del numero di spermatozoi comprende i seguenti passaggi (descritti in dettaglio nelle successive sezioni).

- Valutare una aliquota di liquido seminale fluidificato, ben miscelato, non diluito, posta su vetrino portaoggetti e coperta con coprioggetti, per determinare la di-

luizione e la camera idonea da utilizzare (vedi Sezione 2.8.1). Tale preparazione a fresco viene normalmente utilizzata (vedi Sezione 2.4.2) per la valutazione della motilità.

- Miscelare il liquido seminale e preparare le diluizioni con fissativo.
- Caricare la camera emocitometrica e lasciare riposare il preparato in una camera umida.
- Valutare i campioni entro 10-15 minuti (oltre questo tempo l'evaporazione ha evidenti effetti sulla posizione degli spermatozoi all'interno della camera).
- Contare almeno 200 spermatozoi per replicato.
- Comparare le conte replicate, per vedere se sono accettabilmente simili. In caso positivo, procedere con i calcoli; in caso negativo, preparare nuove diluizioni.
- Calcolare la concentrazione di spermatozoi per ml.
- Calcolare il numero totale di spermatozoi per eiaculato.

2.7.1 Tipi di camere di conta

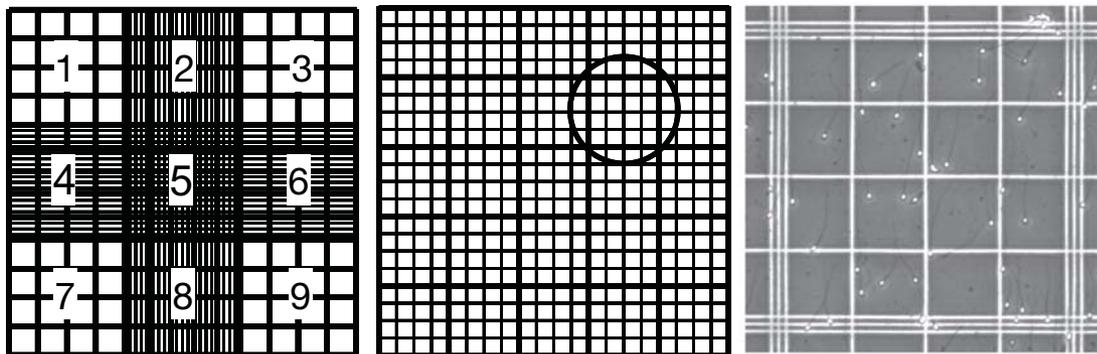
È consigliato l'uso di camere emocitometriche di 100 μm di profondità. In questo manuale verranno descritti i fattori di diluizione per la camera emocitometrica Neubauer modificata. Possono essere utilizzate altre camere emocitometriche, che avendo differenti volumi e tipologie di griglie richiederanno diversi fattori per il calcolo. Sono disponibili camere monouso per la determinazione della concentrazione degli spermatozoi (Seaman *et al.*, 1996; Mahmoud *et al.*, 1997; Brazil *et al.*, 2004b), anche se possono produrre risultati diversi rispetto alla camera emocitometrica Neubauer modificata. Camere poco profonde che vengono riempite per capillarità non permettono una distribuzione uniforme in quanto il liquido può strabordare (Douglas-Hamilton *et al.*, 2005a, 2005b). È possibile effettuare una correzione per tale problema (Douglas-Hamilton *et al.*, 2005a) anche se non è consigliabile (Björndahl, Barratt, 2005). La validità di queste camere di conta alternative deve essere stabilita controllando le dimensioni della camera (vedi Appendice 7, Sezione A7.8), confrontando i risultati con il metodo dell'emocitometro Neubauer modificato e ottenendo risultati soddisfacenti mediante un controllo di qualità esterno. Per una accurata valutazione di basse concentrazioni nemaspermiche, possono essere necessarie camere di conta di volume maggiore (vedi Sezione 2.11.2).

2.7.2 Emocitometro di Neubauer modificato

L'emocitometro di Neubauer modificato ha due camere di conta separate, ciascuna delle quali ha una serie di linee orizzontali e verticali, microscopiche, di 3 mm x 3 mm, incise sulla superficie del vetro. La camera viene utilizzata con uno speciale coprioggetto spesso (spessore numero 4, 0.44 mm), che si posiziona sopra le griglie, appoggiato su guide in vetro, 0.1 mm sopra il pavimento della camera. Ogni superficie di conta viene divisa in nove griglie 1 mm x 1 mm. Tali griglie sono indicate con i numeri riportati in Fig. 2.7.

Fig. 2.7 Emocitometro di Neubauer modificato

Lo schema dell'area inscritta mostra: tutte le nove griglie presenti in una camera dell'emocitometro (*riquadro a sinistra*); la griglia centrale (numero 5) di 25 quadrati grandi (*riquadro al centro*); e una microfotografia di una parte della camera riempita (*riquadro di destra*), che mostra uno dei 25 quadrati della griglia centrale (il quadrato indicato con un circolo nel riquadro centrale) delimitato da triple linee e contenente 16 quadrati più piccoli.



Microfotografia gentilmente concessa da C Brazil.

Con una profondità di 100 μm , ciascuna griglia contiene 100 nl. Quattro di queste griglie (n° 1, 3, 7 e 9), formate da 4 righe ciascuna costituita da 4 quadrati, contengono un volume di 6.25 nl ognuna; due griglie (n° 2 e 8) formate da 4 righe, ciascuna costituita da 5 quadrati, contengono un volume di 5 nl ognuna; due griglie (n° 4 e 6) composte da 5 righe di 4 quadrati ciascuna, contengono 5 nl ognuna; la griglia centrale (n° 5) costituita da 5 righe di 5 quadrati, contiene 4 nl (Fig. 2.7, riquadro centrale). Ciascuno dei 25 quadrati della griglia centrale (numero 5) è suddiviso in 16 quadrati più piccoli (Fig. 2.7, riquadro destro). Quindi, le griglie 1, 2, 3, 7, 8 e 9 sono costituite da 4 righe contenenti 25 nl per riga, mentre le griglie 4, 5 e 6 formate da 5 righe contengono 20 nl per riga. Le differenti aree della camera vengono usate per determinare la concentrazione degli spermatozoi, in funzione della diluizione e del numero di spermatozoi contati. Per diluizioni 1:20 (1 + 19) e 1:5 (1 + 4), vengono valutate le righe della griglia numero 5 e, quando necessario, quelle delle griglie numero 4 e 6 (vedi Sezione 2.8). Per diluizioni 1:2 (1 + 1), possono essere valutate tutte le 9 griglie, se necessario per raggiungere una conta di 200 spermatozoi (vedi Sezione 2.11.1).

2.7.3 Utilizzo della griglia dell'emocitometro

- Contare solo spermatozoi intatti (con teste e code).
- Se uno spermatozoo viene o non viene contato è determinato dalla posizione della sua testa; l'orientamento della coda non è importante. Il limite di un quadrato è indicato dalla linea mediana delle tre; quindi, uno spermatozoo viene contato se la maggior parte della testa si trova tra le due linee interne, ma non viene contato se la maggior parte della sua testa si trova tra le due linee esterne (Fig. 2.8, riquadro a sinistra).
- Per evitare di contare lo stesso spermatozoo in quadrati adiacenti, uno spermatozoo con la testa sulla linea di demarcazione tra due quadrati adiacenti dovrebbe essere contato soltanto se la linea è una delle due linee perpendicolari di demarcazione. Per esempio, le cellule possono essere contate se la maggior

parte della testa dello spermatozoo si trova nella parte centrale in basso o a sinistra nella linea di delimitazione, che forma una "L" (vedi Fig. 2.8, riquadro centrale), ma non devono essere contate se si trovano nella parte centrale in alto o a destra nella linea di demarcazione (Fig. 2.8, riquadro a destra).

Nota: Se ci sono molte code di spermatozoi senza testa (acefalie) o teste senza code, la loro presenza dovrebbe essere riportata nel referto. Se considerato necessario, la loro concentrazione può essere valutata come per gli spermatozoi (vedi Sezione 2.8), oppure può essere determinata la loro prevalenza rispetto agli spermatozoi, mediante allestimento di strisci colorati (vedi Sezione 2.17.6).

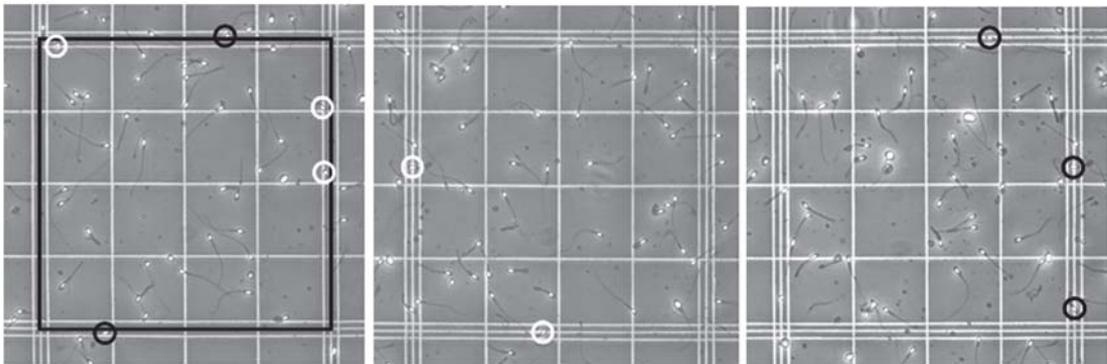
2.7.4 Manutenzione della camera di conta

Le camere di conta emocitometriche devono essere utilizzate con speciali vetrini coprioggetto spessi (spessore numero 4, 0.44 mm).

- Lavare la camera emocitometrica e il vetrino coprioggetto con acqua e asciugare bene con un panno dopo l'uso, in quanto qualsiasi residuo essiccato può impedire il caricamento. Sfregare la superficie della griglia in modo da rimuovere spermatozoi residui del precedente campione.
- Immergere le camere riutilizzabili e i coprioggetti tutta la notte nel disinfettante (vedi Appendice 2, Sezione A2.4) per evitare contaminazioni con potenziali agenti infettivi del liquido seminale.

Fig. 2.8 Quali spermatozoi contare nei quadrati della griglia

La linea mediana delle tre linee definisce il limite del quadrato (linea nera, *riquadro a sinistra*). Vengono contati tutti gli spermatozoi all'interno del quadrato centrale, così come quelli con le teste tra le due linee interne (circoli bianchi), ma non quelli le cui teste si trovano tra le due linee esterne (circoli neri). Uno spermatozoo con la maggior parte della testa nella linea centrale viene contato soltanto se la linea è in basso o a sinistra del quadrato (circoli bianchi, *riquadro centrale*) ma non viene contato se si trova nella linea in alto o a destra del quadrato (circoli neri, *riquadro a destra*).



Microfotografia cortesemente concessa da C. Brazil.

2.7.5 Fissativo per la diluizione del liquido seminale

1. Sciogliere 50 g di bicarbonato di sodio (NaHCO_3) e 10 ml di formalina 35% (v/v) in 1.000 ml di acqua distillata.

2. Se desiderate, aggiungete 0.25 g di trypan blue (colour index 23859) o 5 ml di soluzione acquosa satura di violetto di genziana (>4 mg/ml) (colour index 42555) per evidenziare le teste degli spermatozoi.
3. Conservare a 4°C. Se si formano cristalli nella soluzione, passare con filtro, 0.45 µm, prima dell'uso.

2.7.6 Importanza di una conta sufficiente di spermatozoi

Per ridurre l'errore di campionamento, deve essere contato un numero soglia di spermatozoi (preferibilmente un totale di almeno 400, da conte in replicato di approssimativamente 200 spermatozoi ciascuna) (vedi Riquadro 2.7 e Tabella 2.2).

Riquadro 2.7 Errori nella valutazione del numero

La precisione della valutazione del numero di spermatozoi dipende dal numero di spermatozoi contati. In una distribuzione di Poisson, l'errore standard (ES) di conta (N) è la sua radice quadrata (\sqrt{N}) e l'intervallo di confidenza al 95% (IC) per il numero di spermatozoi nel volume seminale è approssimativamente $N \pm 1.96 \times \sqrt{N}$ (o $N \pm$ approssimativamente $2 \times \sqrt{N}$).

Se vengono contati 100 spermatozoi l'ES è 10 ($\sqrt{100}$), e l'IC del 95% è 80-120 (100 ± 20). Se vengono contati 200 spermatozoi, l'ES è 14 ($\sqrt{200}$) e l'IC del 95% è 172-228 (200 ± 28). Se vengono contati 400 spermatozoi, l'ES è 20 ($\sqrt{400}$) e l'IC del 95% è 360-440 (400 ± 40). Gli errori di conta possono essere adeguatamente espressi come percentuali della conta ($100 \times (\sqrt{N}/N)$). Queste vengono mostrate in Tabella 2.2.

Nota: Questi valori sono solo approssimativi, in quanto gli intervalli di confidenza non sono sempre simmetrici intorno al valore stimato. Gli esatti intervalli di confidenza del 95%, basati sulle proprietà della distribuzione di Poisson, sono 361-441 per una conta di 400, 81.4-121 per una conta di 100, 4.80-18.4 per una conta di 10, 0.03-5.57 per una conta di 1, 0.00-3.70 per una conta di 0.

Tabella 2.2 Errori di conta arrotondati (%) secondo il numero totale di spermatozoi contati

Totale (N)	(%) Errore di campionamento	Totale (N)	(%) Errore di campionamento	Totale (N)	(%) Errore di campionamento
1	100	25	20	85	10.8
2	70.7	30	18.3	90	10.5
3	57.7	35	16.9	95	10.3
4	50	40	15.8	100	10
5	44.7	45	14.9	150	8.2
6	40.8	50	14.1	200	7.1
7	37.8	55	13.5	250	6.3
8	35.4	60	12.9	300	5.8
9	33.3	65	12.4	350	5.3
10	31.6	70	12	400	5
15	25.8	75	11.5	450	4.7
20	22.4	80	11.2	500	4.5

Commento 1: Contare pochi spermatozoi fornirà un risultato non certo (vedi Appendice 7, Sezione A7.1), e ciò può avere conseguenze per la diagnosi e terapia (vedi Appendice 7, Sezione A7.2). Questo può essere inevitabile quando gli spermatozoi sono utilizzati a fini terapeutici e il numero di spermatozoi è basso (vedi Sezione 5.1).

Commento 2: Quando il volume seminale è basso e vengono contati meno spermatozoi di quelli raccomandati, la precisione dei valori ottenuti sarà significativamente ridotta. Se vengono contati meno di 200 spermatozoi per replicato, segnalare l'errore di conta come mostrato in Tabella 2.2.

2.8 Procedura di conta di routine

Le diluizioni 1:5 (1 + 4) e 1:20 (1 + 19) sono adatte per un range di concentrazione nemaspermica flessibile di circa 200 spermatozoi in una o in tutti i numeri di griglia 4, 5 e 6 della camera emocitometrica (vedi Tabella 2.3 e Riquadro 2.8).

Riquadro 2.8 Ottenere una conta di 200 spermatozoi per replicati nelle tre griglie centrali della camera Neubauer modificata

Se nell'iniziale preparazione a fresco di 4 nl (vedi Riquadro 2.9) si rilevano 100 spermatozoi per campo visivo (pcv) teoricamente avremo 25 spermatozoi per nl (25.000 per μ l o 25.000.000 per ml). Poiché la griglia centrale n° 5 della camera Neubauer modificata contiene 100 nl, all'interno della griglia avremo 2.500 spermatozoi.

La diluizione del campione 1:5 (1 + 4) ridurrebbe l'interferenza di fondo e il numero di spermatozoi a circa 500 per griglia e ciò può risultare sufficiente per avere un errore di campionamento accettabilmente basso.

Se nella preparazione a fresco rileviamo 10 spermatozoi pcv, il numero di spermatozoi dovrebbe essere 2.5 per nl e 250 per griglia centrale. La diluizione del campione 1:2 (1 + 1) riduce l'interferenza di fondo e il numero di spermatozoi, che diventa 125 per griglia; quindi 375 nelle tre griglie numero 4, 5 e 6 e anche questo valore è sufficiente per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso.

Nota: Tali calcoli di concentrazioni possono determinare soltanto grossolane valutazioni, in quanto vengono contati pochi spermatozoi e i volumi possono non essere accurati. Le concentrazioni valutate dalle preparazioni non diluite possono essere tra il 30% e il 130% delle concentrazioni derivate dai campioni diluiti in camere di conta.

2.8.1 Determinazione della diluizione richiesta

La diluizione del liquido seminale necessaria per contare il numero di spermatozoi in modo accurato viene valutata dalla preparazione del seme non diluita. Di solito è la preparazione a fresco (vedi Sezione 2.4.2) che viene utilizzata per la valutazione della motilità.

- Esaminare una delle preparazioni a fresco, allestite come descritto in Sezione 2.4.2, per valutare il numero di spermatozoi per campo visivo (200x o 400x).
- Un pcv è equivalente approssimativamente a 16 nl (a 200x) o 4 nl (a 400x) (vedi Riquadro 2.9).

- Una volta che gli spermatozoi sono stati osservati e contati, si può determinare la diluizione necessaria dalla Tabella 2.3, e si procede come nella Sezione 2.8.2.
- Se non si rileva nessuno spermatozoo, esaminare la preparazione a fresco eseguita in doppio. Se anche nella seconda preparazione non si rilevano spermatozoi, procedere come nella Sezione 2.9.

Riquadro 2.9 Volume osservato per pcv in una preparazione a fresco con spessore di 20 μm

Il volume del liquido seminale osservato in ciascun campo microscopico dipende dall'area del campo (πr^2 , dove π è approssimativamente 3.142 e r è il raggio del campo microscopico) e dalla profondità della camera (20.7 μm per una preparazione a fresco). Il diametro del campo microscopico si può misurare con un micrometro o valutare dividendo il diametro di apertura delle lenti oculari per l'ingrandimento delle lenti dell'obiettivo.

Con un obiettivo 40x e un oculare 10x con apertura 20 mm, il diametro del campo microscopico è approssimativamente 500 μm (20 mm/40). In questo caso, $r = 250 \mu\text{m}$, $r^2 = 62.500 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196.375 \mu\text{m}^2$, il volume è 4.064.962 μm^3 o circa 4 nl.

Con un obiettivo 20x e un oculare 10x con apertura di 20 mm, il campo microscopico ha un diametro approssimativamente di 1.000 μm (20 mm/20). In questo caso, $r = 500 \mu\text{m}$, $r^2 = 250.000 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 785.500 \mu\text{m}^2$, il volume è 16.259.850 μm^3 o circa 16 nl.

Tabella 2.3 Diluizioni necessarie del liquido seminale, modalità di preparazione, camere da utilizzare, potenziali aree da valutare

Spermatozoi per campo a 400x	Spermatozoi per campo a 200x	Diluizione necessaria	μl di liquido seminale	μl di fissativo	Camera di conta	Aree da valutare
>101	>404	1:20 (1 + 19)	50	950	Neubauer modificata	Griglie 5, 4, 6
16-100	64-400	1:5 (1 + 4)	50	200	Neubauer modificata	Griglie 5, 4, 6
2-15	8-60	1:2 (1 + 1)	50	50	Neubauer modificata	Griglie 5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1 + 1)	50	50	Neubauer modificata o grande volume	Tutte le 9 griglie o Intero vetrino

Nota 1: Le pipette per le diluizioni dei globuli bianchi e le pipette automatiche che si basano su dispositivi pneumatici non sono abbastanza precise per effettuare diluizioni volumetriche di un liquido viscoso; utilizzare micropipette a spostamento positivo.

Nota 2: Un campione di liquido seminale, valutato a fini diagnostici, non dovrebbe avere un volume inferiore a 50 µl, per evitare l'errore di pipettamento dovuto ai piccoli volumi.

Nota 3: Quando gli spermatozoi, per campo visivo, alla diluizione consigliata sono troppo pochi, preparare un'altra diluizione più bassa. Se, per campo visivo, alla diluizione consigliata ci sono troppi spermatozoi sovrapposti, preparare un'altra diluizione più alta.

Nota 4: Nel caso in cui una diluizione 1:20 (1 + 19) risultasse inadeguata, utilizzare 1:50 (1 + 49).

Commento 1: Quando il numero di spermatozoi in una iniziale preparazione a fresco è basso (<4 pcv a 400x: approssimativamente $1 \times 10^6/\text{ml}$) può non essere necessaria una precisa valutazione del numero di spermatozoi (vedi Sezione 2.10).

Commento 2: Per una accurata valutazione di basse concentrazioni di spermatozoi (<2 pcv a 400x: approssimativamente $< 0.5 \times 10^6/\text{ml}$), è consigliabile l'uso delle 9 griglie della camera Neubauer modificata (vedi Sezione 2.11.1) o camere monouso per grandi volumi con identificazione a fluorescenza (vedi Sezione 2.11.2).

2.8.2 Preparazione delle diluizioni e caricamento delle camere emocitometriche

- Umidificare la superficie dell'emocitometro.
- Posizionare il coprioggetto sulla camera di conta premendo con fermezza sulle guide di vetro. L'iridescenza (anelli di Newton multipli) tra le due superfici di vetro conferma la corretta posizione del coprioggetto. Maggiore è il numero di linee, migliore è il posizionamento; soltanto una o due linee possono indicare problemi con variazione nella profondità della camera.
- Utilizzare micropipette a spostamento positivo per dispensare una idonea quantità di fissativo diluito in due provette (vedi Tabella 2.3).
- Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
- Aspirare un idoneo volume di liquido seminale subito dopo il miscelamento, per evitare che gli spermatozoi sedimentino (vedi Tabella 2.3).
- Eliminare il liquido seminale al di fuori della punta della pipetta, facendo attenzione a non toccare l'apertura della punta.
- Dispensare il liquido nel fissativo e lavare la punta della pipetta aspirando ed espellendo il fissativo.
- Miscelare bene, di nuovo, il campione seminale e preparare diluizioni replicate secondo i passaggi precedenti.
- Miscelare accuratamente la prima diluizione con il vortex, 10 secondi al massimo di velocità. Prelevare rapidamente circa 10 µl di sospensione fissata, per evitare la sedimentazione degli spermatozoi.

- Toccare delicatamente il bordo più basso di una delle camere con la punta della pipetta nella scanalatura a forma di V.
- Premere lo stantuffo della pipetta lentamente, in modo che la camera si riempia per azione della capillarità. Il coprioggetto non deve essere spostato durante il riempimento e la camera non deve essere riempita troppo (in tal caso il coprioggetto può muoversi) o troppo poco (in tal caso si formano bolle di aria).
- Miscelare la seconda diluizione, come sopra, e prelevare, immediatamente, una seconda aliquota di 10 μ l. Caricare la seconda camera dell'emocitometro come nei passaggi precedenti.
- Mantenere l'emocitometro orizzontalmente per almeno 4 minuti a temperatura ambiente in una camera umida (per es. una capsula di Petri chiusa, rivestita con carta di filtro imbibita di acqua) per evitare l'essiccamento. Durante questo periodo di tempo le cellule immobilizzate sedimenteranno sulla griglia.

Nota 1: Alcune camere vengono costruite con guide di vetro smerigliate; in queste, non compaiono gli anelli di Newton. Applicare circa 1.5 μ l di acqua per ciascuna guida di vetro smerigliata per fissare il coprioggetto nel proprio posto (Brazil *et al.*, 2004a), facendo attenzione a non far entrare acqua nella camera di conta.

Nota 2: L'uso di morsetti emocitometrici per fissare il coprioggetto nel proprio posto assicura una profondità costante della camera (Christensen *et al.*, 2005).

Nota 3: In campioni molto viscosi, il liquido seminale nel fluido di diluizione può aggregarsi se si ritarda il miscelamento di 5-10 secondi. In questi casi, agitare con il vortex il campione diluito per 10 secondi, subito dopo aver aggiunto il seme al fissativo.

2.8.3 Valutazione del numero di spermatozoi nelle camere di conta

Il numero degli spermatozoi dovrebbe essere valutato in entrambe le camere dell'emocitometro. Se i due valori sono abbastanza ripetibili, le aliquote prelevate possono essere considerate rappresentative del campione (vedi Sezione 2.4.1).

- Esaminare l'emocitometro con il microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 200x o 400x.
- Contare almeno 200 spermatozoi per ogni preparazione effettuata in replicato per raggiungere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi riquadro 2.7 e Tabella 2.2).
- Valutare prima la griglia centrale (numero 5 in Fig. 2.7), riga per riga, di un lato della camera Neubauer modificata.
- Continuare la conta fino alla valutazione di 200 spermatozoi e al completamento di una riga (composta da 5 quadrati grandi). La conta deve comprendere la riga completa; non fermare la conta a metà della riga. Se nelle 5 righe della griglia centrale non si osservano 200 spermatozoi, continuare la conta nelle righe (costituite da 4 quadrati grandi) delle due griglie adiacenti (n° 4 e 6 in Fig. 2.7).

- Annotare il numero delle righe valutate per raggiungere almeno 200 spermatozoi. Dovrà essere contato, nell'altra camera dell'emocitometro, lo stesso numero di righe.
- Contare il numero di spermatozoi e di righe con l'ausilio di un contacellule.
- Passare alla seconda camera dell'emocitometro e contare nel preparato in replicato lo stesso numero di righe (lo stesso volume) come per il primo preparato, anche se si ottengono meno di 200 spermatozoi.
- Calcolare la somma e la differenza tra i due numeri.
- Determinare l'accettabilità delle differenze dalla Tabella 2.4 o dalla Fig. A7.1, Appendice 7 (ciascuna mostra la massima differenza tra le conte attese nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento).
- Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione (vedi Sezione 2.8.4). Se la differenza è troppo elevata preparare due nuove diluizioni come descritto in Sezione 2.8.2 e ripetere le conte dei preparati replicati (vedi Riquadro 2.10).
- Riportare la media della concentrazione a due cifre significative.
- Calcolare il numero totale di spermatozoi per eiaculato (vedi Sezione 2.8.7)

Nota 1: Se si rilevano meno di 200 spermatozoi nelle griglie 4, 5 e 6, non continuare a contare le griglie 1, 2, 3, 7, 8 o 9, in quanto il volume di ogni riga in queste griglie differisce da quello delle righe 4, 5 e 6 (vedi Sezione 2.7.2). In tal caso, preparare e valutare due diluizioni più basse. Se è necessaria una diluizione 1:2 (1+1), procedere come in Sezione 2.11.

Nota 2: Valutare due volte la stessa camera o due camere caricate con un preparato proveniente da una singola diluizione non viene considerata una valutazione in doppio, in quanto non permette di evidenziare errori di campionamento, miscelamento e diluizione.

Tabella 2.4 Differenze accettabili tra due conte replicate relative ad una data somma

Somma	Differenza accettabile*	Somma	Differenza accettabile*
144-156	24	329-346	36
157-169	25	347-366	37
170-182	26	367-385	38
183-196	27	386-406	39
197-211	28	407-426	40
212-226	29	427-448	41
227-242	30	449-470	42
243-258	31	471-492	43
259-274	32	493-515	44
275-292	33	516-538	45
293-309	34	539-562	46
310-328	35	563-587	47

*Arrotondato all'intervallo di confidenza 95%.

Riquadro 2.10 Confronto tra conte replicate

La differenza tra conte indipendenti dovrebbe essere zero, con un errore standard uguale alla radice quadrata della somma delle due conte. Quindi $(N1-N2)/(\sqrt{N1+N2})$ dovrebbe essere <1.96 in un intervallo di confidenza del 95%, per effetto della sola variabilità casuale.

Se la differenza tra le conte è minore o uguale a quella indicata nelle Tabelle 2.4 o 2.5 per una data somma, i valori vengono accettati e la concentrazione viene calcolata dalle loro medie.

Differenze maggiori indicano che si sono verificati errori di conta, di pipettamento o di miscelamento delle cellule, determinando una distribuzione non casuale nella camera o nel vetrino.

Quando la differenza tra le conte è maggiore rispetto a quella accettabile, scartare il primo dei due valori, preparare e valutare due diluizioni fresche del seme (non contare un terzo campione e fare la media dei tre valori, o dei due valori più vicini).

Ciò si applica alle conte degli spermatozoi e delle cellule perossidasi positive (vedi Sezione 2.18). Per le cellule CD45-positive (vedi Sezione 3.2) e le cellule germinali immature (vedi Sezione 2.19) dovrebbero essere esaminati nuovamente i preparati colorati. Con valori di cut-off nell'IC del 95%, approssimativamente il 5% dei replicati sarà fuori dei limiti, per effetto della sola variabilità casuale.

Nota: In rari casi, con campioni non omogenei, anche un terzo gruppo di replicati può dare differenze non accettabili. In questo caso calcolare la media di tutti i replicati e annotarla nella scheda di registrazione.

2.8.4 Calcolo della concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale

È consigliabile calcolare e annotare la concentrazione di spermatozoi del liquido seminale. Sebbene la concentrazione non è uno specifico indice della funzione testicolare, è correlata alla percentuale di fecondazione e di gravidanza.

La concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale è il loro numero (N) diviso il volume in cui si trovano, cioè il volume del numero totale (n) di righe esaminate per i replicati (20 nl per ogni griglia 4, 5 e 6) moltiplicato il fattore di diluizione. Questo è $C = (N/n) \times (1/20) \times$ fattore di diluizione.

Per una diluizione 1:5 (1 + 4) utilizzando le griglie 4, 5 e 6, la concentrazione corrisponde a $C = (N/n) \times (1/20) \times 5$ spermatozoi per nl = $(N/n) \times (1/4)$ spermatozoi/nl (o 10^6 per ml di liquido seminale).

Per diluizioni 1:20 (1 + 19), utilizzando le griglie 4, 5 e 6, la concentrazione corrisponde a $C = (N/n) \times (1/20) \times 20$ spermatozoi per nl = (N/n) spermatozoi/nl (o 10^6 per ml di liquido seminale).

Per diluizioni 1:50 (1 + 49) utilizzando le griglie 4, 5 e 6, la concentrazione corrisponde a $C = (N/n) \times (1/20) \times 50$ spermatozoi per nl = $(N/n) \times 2.5$ spermatozoi/nl (o 10^6 per ml di liquido seminale).

2.8.5 Esempi

Esempio 1. Con una diluizione 1:20 (1 + 19), nel replicato 1 si rilevano 201 spermatozoi, contando 7 righe, mentre nel replicato 2, 245 spermatozoi contando 7 righe. La somma dei valori (201 + 245) è 446 in 14 righe e la differenza (245 - 201) è 44. Confrontando la Tabella 2.4 questo valore è superiore alla differenza attesa per effetto della sola variabilità casuale (41), quindi si devono eseguire nuove diluizioni replicate.

Esempio 2. Con una diluizione 1:20 (1 + 19), nel replicato 1 si rilevano 220 spermatozoi, contando 4 righe, mentre nel replicato 2, 218 spermatozoi contando 4 righe. La somma dei valori (220 + 218) è 438 in 8 righe e la differenza (220 - 218) è 2. Confrontando la Tabella 2.4 questo valore è inferiore rispetto alla differenza attesa per effetto della sola variabilità casuale (41), quindi i valori vengono accettati.

La concentrazione dei campioni per una diluizione 1:20 (1 + 19) è $C = (N/n) \times 1.0$ spermatozoi per nl, cioè $(438/8) \times 1.0 = 54.75$ spermatozoi/nl, arrotondato a 55×10^6 spermatozoi per ml di liquido seminale.

Nota: Per diluizioni 1:20 (1 + 19) e griglie 4, 5 e 6, la concentrazione è semplice da calcolare. Il numero totale di spermatozoi contati diviso il numero delle righe valutate equivale alla concentrazione in 10^6 /ml. Nell'esempio sopra riportato il calcolo è $(220 + 218)/(4 + 4) = 438/8 = 55 \times 10^6$ spermatozoi/ml di liquido seminale.

Esempio 3. Con una diluizione 1:20 (1 + 19), nel replicato 1 si rilevano 98 spermatozoi contati in 15 righe (griglia 5, 4 e 6), mentre nel replicato 2 si rilevano 114 spermatozoi in 15 righe (griglia 5, 4 e 6). La somma dei due valori (98 + 114) è 212 in 30 righe e la differenza (114 - 98) è 16. Confrontando la Tabella 2.4 questo valore è inferiore rispetto alla differenza attesa per effetto della sola variabilità casuale (29), quindi i valori vengono accettati.

La concentrazione del campione per una diluizione 1:20 (1 + 19) è $C = (N/n) \times 1.0$ spermatozoi per nl o $(212/30) \times 1.0 = 7.07$ spermatozoi/nl, arrotondato a 7.1×10^6 spermatozoi per ml di liquido seminale. Poiché è stato contato un numero di spermatozoi minore di 400, annotare l'errore di campionamento per i 212 spermatozoi ottenuti, vedi Tabella 2.2 (approssimativamente 7%).

Nota: In questo esempio, il campione è stato diluito troppo, poiché sono stati trovati meno di 200 spermatozoi nelle griglie 5, 4 e 6; potrebbe essere più appropriata una diluizione 1:5 (1 + 4).

Esempio 4. Con una diluizione 1:5 (1 + 4), nel replicato 1 si rilevano 224 spermatozoi contati in 4 righe, mentre nel replicato 2 si rilevano 268 spermatozoi in 4 righe. La somma dei due valori (224 + 268) è 492 in 8 righe e la differenza (268 - 224) è 44. Confrontando la Tabella 2.4 questo valore è superiore rispetto alla differenza attesa per effetto della sola variabilità casuale (43), quindi si devono eseguire nuove diluizioni replicate.

Esempio 5. Con una diluizione 1:5 (1 + 4), nel replicato 1 si rilevano 224 spermatozoi contati in 8 righe, mentre nel replicato 2 si rilevano 213 spermatozoi in 8 righe. La somma dei due valori (224 + 213) è 437 in 16 righe e la differenza (224 - 213) è 11. Confrontando la Tabella 2.4 questo valore è inferiore rispetto a quello rilevato per effetto della sola variabilità casuale (41), quindi i valori possono essere accettati.

La concentrazione del campione per una diluizione 1:5 (1 + 4) è $C = (N/n) \times (1/4)$ spermatozoi per nl o $(437/16)/4 = 6.825$ spermatozoi/nl, arrotondato a 6.8×10^6 spermatozoi per ml di liquido seminale.

Nota: Per diluizioni 1:5 (1 + 4) calcolare la concentrazione è ugualmente semplice, ma il numero totale degli spermatozoi contati diviso il numero totale delle righe valutate è, ulteriormente, diviso per 4. Nell'esempio sopra riportato il calcolo è $((224 + 213)/(8 + 8))/4 = (437/16)/4 = 27.3/4 = 6.8 \times 10^6$ spermatozoi/ml di liquido seminale.

2.8.6 Limiti di riferimento inferiori per la concentrazione degli spermatozoi

Il limite inferiore di riferimento per la concentrazione nemaspermica è 15×10^6 spermatozoi per ml (5° percentile, IC al 95% $12-16 \times 10^6$).

2.8.7 Calcolo del numero totale di spermatozoi nell'eiaculato

È consigliabile calcolare e annotare il numero totale di spermatozoi per eiaculato, in quanto questo parametro indica la capacità dei testicoli di produrre spermatozoi e la pervietà del tratto genitale maschile. Tale parametro è ottenuto moltiplicando la concentrazione di spermatozoi per il volume dell'intero eiaculato.

2.8.8 Limiti di riferimento inferiori per la concentrazione totale degli spermatozoi

Il limite di riferimento inferiore per il numero totale di spermatozoi è 39×10^6 spermatozoi per eiaculato (5° percentile, IC al 95% $33-46 \times 10^6$).

2.9 Numero di spermatozoi basso: criptozoospermia e sospetto di azoospermia

Se non si rilevano spermatozoi nelle preparazioni a fresco replicate, si può sospettare l'azoospermia. Sebbene è stato dimostrato che la definizione dovrebbe cambiare (Sharif, 2000; Ezeh, Moore, 2001), l'azoospermia rimane una descrizione dell'eiaculato piuttosto che una spiegazione della sua origine o una base per una diagnosi e terapia. È generalmente accettato che il termine azoospermia si può utilizzare soltanto se non sono stati ritrovati spermatozoi nel sedimento in un campione centrifugato (Eliasson, 1981).

Tuttavia bisogna tenere presente che:

- se si trovano o non si trovano spermatozoi nel pellet dipende dalla velocità e dal tempo di centrifugazione (Lindsay *et al.*, 1995; Jaffe *et al.*, 1998) e da quanto pellet viene esaminato;

- la centrifugazione a 3.000 g per 15 minuti non è in grado di sedimentare tutti gli spermatozoi di un campione (Corea *et al.*, 2005); e
- dopo la centrifugazione, si può perdere la motilità (Mortimer, 1994a) e la concentrazione può essere sottostimata (Cooper *et al.*, 2006).

Il modo in cui vengono gestiti questi campioni dipende dalla sufficienza dei dati soggettivi sulla presenza e motilità degli spermatozoi (vedi Sezione 2.10) o dalla necessità di valutazioni più accurate (vedi Sezione 2.11).

2.10 Quando non è necessaria una valutazione accurata del basso numero di spermatozoi

Se il numero di spermatozoi pcv in una preparazione a fresco è basso (da 0 a 4 a 400x o da 0 a 16 a 200x), sono disponibili alcune opzioni.

2.10.1 Casi che non richiedono ulteriori valutazioni

Se il numero di spermatozoi pcv a 400x è <4 (cioè approssimativamente $1 \times 10^6/\text{ml}$), è sufficiente per la maggior parte degli scopi clinici riportare la concentrazione degli spermatozoi come $<2 \times 10^6/\text{ml}$ (prendere in considerazione l'elevato errore di campionamento associato a un basso numero di spermatozoi); annotare, quindi, se sono presenti spermatozoi mobili o non mobili.

2.10.2 Valutazione dei campioni centrifugati per identificare gli spermatozoi

Quando non si rilevano spermatozoi in nessuna delle preparazioni a fresco, il campione può essere centrifugato per determinare se è presente qualche spermatozoo in campioni di maggior volume.

- Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3). Se il campione è viscoso, ridurre la viscosità come descritto in Sezione 2.3.1.1.
- Prelevare una aliquota di 1 ml di liquido seminale e centrifugare a 3.000 g per 15 minuti.
- Decantare la maggior parte del surnatante e risospendere gli spermatozoi del pellet approssimativamente in 50 μl di plasma seminale.
- Porre una aliquota del pellet di 10 μl in ciascuno dei due vetrini e coprire con coprioggetto 22 mm \times 22 mm. Ciò permetterà di ottenere una preparazione a fresco con uno spessore di circa 20 μm (vedi Riquadro 2.4).
- Esaminare i vetrini con microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 200x o 250x.
- Valutare attentamente l'intero vetrino, in modo sistematico, campo per campo. Iniziare da un angolo e valutare lungo l'asse delle x fino al lato opposto, poi muovere un campo lungo l'asse delle y e valutare indietro lungo l'intera larghezza. Continuare in questo zig-zag per effettuare una ricerca completa e sistematica dell'intera aliquota (vedi Fig. 2.9). Mantenere l'osservazione del vetrino mentre si cambiano i campi.

- Con un obiettivo 20x e un oculare 10x di 20 mm di apertura, il campo microscopico ha un diametro approssimativamente di 1.000 μm (vedi Riquadro 2.9). Ci sarebbero, quindi, da esaminare approssimativamente 484 campi (22 x 22), per coprioggetto 22 mm x 22 mm.
- La presenza di spermatozoi in ciascun replicato indica criptozoospermia.
- L'assenza di spermatozoi in entrambi i replicati suggerisce azoospermia.

Nota 1: Molte centrifughe da banco per provette da 15 ml non raggiungono 3.000 g: usare centrifughe a più elevata velocità per provette da 1.5-2.0 ml. Assicurarsi che il liquido seminale venga ben miscelato prima di prelevare una aliquota.

Nota 2: La valutazione del vetrino può richiedere fino a 10 minuti, poiché il campione potrebbe avere un'elevata interferenza di fondo.

Nota 3: Quando vengono centrifugati campioni per la riproduzione assistita, può essere necessario analizzare l'intero campione seminale e la maggior parte del pellet (per es. 4 aliquote da 10 μl del pellet) al fine di rilevare spermatozoi vitali.

Commento 1: L'assenza di spermatozoi mobili provenienti da aliquote esaminate non necessariamente indica che gli spermatozoi sono assenti nel resto del campione.

Commento 2: Dal momento che la centrifugazione non sedimenta tutti gli spermatozoi, questo metodo non può essere utilizzato per determinare il numero di spermatozoi. Per la quantizzazione, vedi Sezione 2.11.1 o 2.11.2.

2.10.3 Esame dei campioni non centrifugati per identificare spermatozoi mobili

Quando vengono cercati spermatozoi mobili (per es. nel campione post-vasectomia), deve essere evitata la diluizione del campione in fissativo o la centrifugazione ad elevata velocità. In questo caso, può essere valutata soltanto una aliquota di campione non diluito.

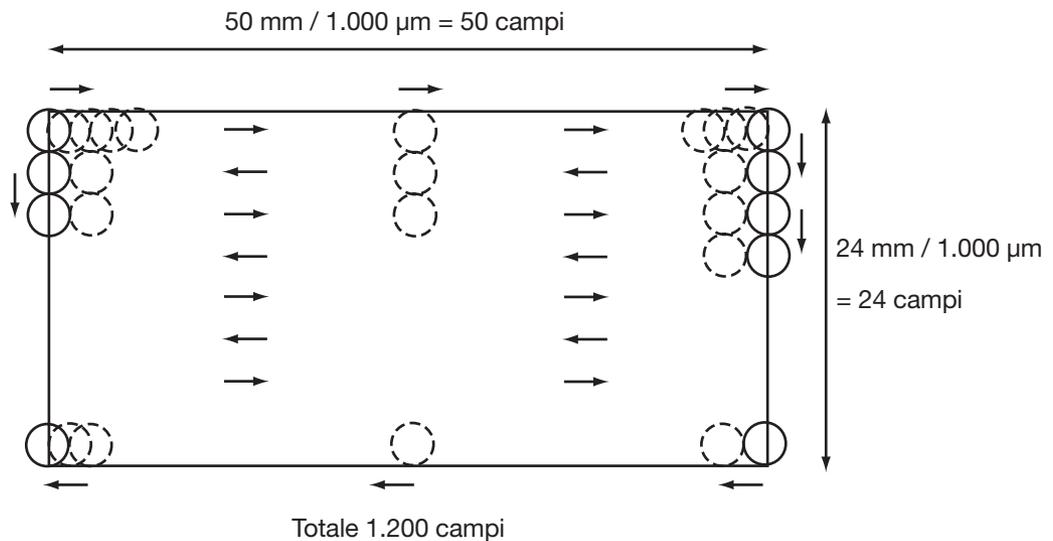
- Miscelare bene il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
- Prelevare una aliquota di 40 μl di liquido seminale e porla sotto un vetrino coprioggetto 24 mm x 50 mm. Questo formerà una preparazione a fresco con spessore di 33 μm (vedi Riquadro 2.4).
- Esaminare il vetrino con il microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 200x o 250x.
- Valutare l'intero coprioggetto in modo sistematico, campo per campo. Iniziare da un angolo e valutare lungo l'asse delle x fino al lato opposto; poi muovere un campo lungo l'asse delle y e valutare indietro lungo l'intera larghezza. Continuare in questo zig-zag per effettuare una ricerca completa e sistematica dell'intera aliquota (vedi Fig. 2.9). Mantenere l'osservazione del vetrino mentre si cambiano i campi.

- Con un obiettivo 20x e un oculare 10x con apertura 20 mm, il campo microscopico ha un diametro approssimativamente di 1.000 μm (vedi Riquadro 2.9). Ci sarebbero, quindi, da esaminare approssimativamente 1.200 campi (24 x 50), per coprioggetto 24 mm x 50 mm.

Nota: Questa procedura può richiedere 10 minuti, in quanto il campione potrebbe avere una elevata interferenza di fondo.

Fig. 2.9 Valutazione dell'intero vetrino coprioggetto per la presenza di spermatozoi mobili

Questo coinvolge la valutazione di circa 1.200 campi visivi ad ingrandimento 200x per coprioggetto 24 mm x 50 mm, e approssimativamente 484 campi visivi ad ingrandimento 200x per coprioggetto 22 mm x 22 mm.



Commento: L'assenza di spermatozoi mobili in una aliquota esaminata non significa necessariamente che non sono presenti nel resto del campione.

2.11 Quando è richiesta una accurata valutazione di un basso numero di spermatozoi

Questa sezione descrive i metodi per la determinazione di basse concentrazioni di spermatozoi, senza l'utilizzo di centrifugazione. L'alternativa alla sedimentazione degli spermatozoi sono l'uso di una bassa diluizione del liquido seminale e l'esame di grandi volumi. Quando si tratta di limiti più bassi di quantificazione (LLQ), viene considerata accettabile una precisione del 20% (Shah *et al.*, 2000). Esaminando l'intera griglia centrale (numero 5 in Fig. 2.7) di una camera Neubauer modificata, riempita con campione seminale diluito 1:2 (1 + 1), teoricamente si può identificare una

concentrazione di 250.000 spermatozoi per ml con un errore di campionamento del 20%. Quando vengono esaminate tutte le 9 griglie, può essere stimata una concentrazione bassa come 27.800 per ml. Per misurare una concentrazione di 1.000 spermatozoi per ml, con lo stesso errore di campionamento, possono essere utilizzate camere monouso per grandi volumi contenenti 25 μ l (Cooper *et al.*, 2006). Per campioni diluiti 1:2 (1 + 1), come raccomandato, questi valori corrispondono alla concentrazione di spermatozoi in campioni seminali non diluiti di 500.000 per ml, 55.600 per ml e 2000 per ml, rispettivamente. Tuttavia, i campioni seminali così poco diluiti possono presentare una grande interferenza di fondo. L'attenta valutazione di grandi camere può richiedere 10-20 minuti, ma una rapida identificazione degli spermatozoi può essere facilitata dall'uso di coloranti fluorescenti (vedi Sezione 2.11.2).

2.11.1 Valutazione di bassi numeri di spermatozoi nell'intera camera Neubauer modificata (con microscopio a contrasto di fase)

Per ridurre l'errore di campionamento, deve essere contato un numero minimo di spermatozoi (preferibilmente un totale di almeno 400, per conte replicate di circa 200) (vedi Riquadro 2.7 e Tabella 2.2).

- Miscelare bene il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
- Prelevare una aliquota di liquido seminale e diluire 1:2 (1 + 1) con fissativo (vedi Sezione 2.7.5), osservando le raccomandazioni riportate in Sezione 2.8.2.
- La diluizione 1:2 (1 + 1), per campioni con meno di due spermatozoi pcv nella iniziale preparazione a fresco (Tabella 2.3), è appropriata per un range di concentrazioni nemaspermiche che producono circa 200 spermatozoi nell'emocitometro (vedi Riquadro 2.11). Sarà necessario valutare tra 1 e 9 griglie.

Riquadro 2.11 Ottenere 200 spermatozoi per replicato in tutte le 9 griglie della camera Neubauer modificata

Se ci sono 2 spermatozoi pcv, nella preparazione iniziale a fresco di 4 nl, ci saranno teoricamente 0.5 spermatozoi per nl (500 spermatozoi per μ l o 500.000 spermatozoi per ml). Poiché tutte le 9 griglie della Neubauer modificata contengono 900 nl, ci dovrebbero essere 450 spermatozoi. La diluizione del campione 1:2 (1 + 1), come suggerito, ridurrebbe l'interferenza di fondo e gli spermatozoi a 225 per camera, sufficiente per un errore di campionamento accettabilmente basso.

Nota: Questo valore può essere solo una stima approssimativa in quanto vengono contati pochi spermatozoi e i volumi possono essere inaccurati.

2.11.1.1 Procedura

1. Diluire due aliquote del campione seminale 1:2 (1 + 1) con fissativo, come sopra.
2. Riempire ciascuna camera dell'emocitometro con le diluizioni replicate, un replicato per camera.

3. Mantenere l'emocitometro in posizione orizzontale per almeno 4 minuti a temperatura ambiente, in camera umida (per es. una capsula di Petri chiusa, rivestita con carta di filtro imbibita di acqua) per prevenire l'essiccamento. Durante questo periodo le cellule immobilizzate sedimenteranno nella griglia.
4. Esaminare l'emocitometro con microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 200x o 400x.
5. Contare almeno 200 spermatozoi in ciascun replicato, al fine di raggiungere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.7 e Tabella 2.2).
6. Esaminare una camera griglia per griglia, e continuare a contare fino a che non siano stati osservati almeno 200 spermatozoi e non sia stata esaminata una griglia completa. Il conteggio deve essere eseguito nella griglia completa; non fermarsi a metà della griglia.
7. Annotare il numero delle griglie valutate per raggiungere almeno 200 spermatozoi. Lo stesso numero di griglie dovrà essere contato nell'altra camera dell'emocitometro.
8. Contare il numero di spermatozoi e le griglie con l'ausilio di un contacellule.
9. Passare alla seconda camera dell'emocitometro ed effettuare la conta del replicato nello stesso numero di griglie (lo stesso volume) come per il primo replicato, anche se questo produrrà meno di 200 spermatozoi.
10. Calcolare la somma e la differenza dei due numeri.
11. Determinare l'accettabilità della differenza dalla Tabella 2.5 (che è l'ampliamento della Tabella 2.4 con numeri di spermatozoi più bassi) o dalla Fig. A7.1, Appendice 7 (ciascuna mostra la massima differenza attesa tra due conte nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento).
12. Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione (vedi Sezione 2.11.1.2). Se la differenza è troppo alta, fare due nuove preparazioni come descritto sopra e ripetere la conte dei replicati (vedi Riquadro 2.10).
13. Riportare la media della concentrazione di spermatozoi a due cifre significative.
14. Calcolare il numero totale di spermatozoi per eiaculato (vedi Sezione 2.11.1.5).

Tabella 2.5 Differenza accettabile tra due conte per una data somma: basse concentrazioni

Somma	Differenza accettabile*	Somma	Differenza accettabile*	Somma	Differenza accettabile*
35–40	12	144–156	24	329–346	36
41–47	13	157–169	25	347–366	37
48–54	14	170–182	26	367–385	38
55–62	15	183–196	27	386–406	39
63–70	16	197–211	28	407–426	40
71–79	17	212–226	29	427–448	41
80–89	18	227–242	30	449–470	42
90–98	19	243–258	31	471–492	43
99–109	20	259–274	32	493–515	44
110–120	21	275–292	33	516–538	45
121–131	22	293–309	34	539–562	46
132–143	23	310–328	35	563–587	47

*Arrotondato all'intervallo di confidenza del 95%.

2.11.1.2 Calcolo di basse concentrazioni degli spermatozoi nel liquido seminale

La concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale è il loro numero (N) diviso il volume nel quale si trovano, cioè il volume del numero totale (n) delle griglie esaminate per i replicati (dove il volume di una griglia è 100 nl), moltiplicato il fattore di diluizione. Quindi, $C = (N/n) \times (1/100) \times$ fattore di diluizione.

Per una diluizione 1:2 (1 + 1), la concentrazione è $C = (N/n) \times (1/100) \times 2$ spermatozoi per nl = $(N/n) \times (1/50)$ spermatozoi/nl.

Quando vengono valutate tutte le 9 griglie in ciascuna camera dell'emocitometro, il numero totale degli spermatozoi è diviso per il numero totale di entrambe le camere (1.8 μ l) e moltiplicato per il fattore di diluizione (2), per ottenere la concentrazione di spermatozoi per μ l (= migliaia per ml di liquido seminale).

2.11.1.3 Sensibilità del metodo

Se ci sono meno di 200 spermatozoi in ciascuna camera, l'errore di campionamento eccederà del 5%. Quando vengono ritrovati meno di 400 spermatozoi in entrambe le camere, riportare l'errore di campionamento per il numero di cellule contate (vedi Tabella 2.2).

Se vengono contati meno di 25 spermatozoi in ciascuna camera, la concentrazione sarà <56.000 spermatozoi per ml; questo è il limite inferiore di quantizzazione per un errore di campionamento del 20% quando vengono valutate tutte le 9 griglie della camera Neubauer modificata e viene utilizzata una diluizione 1:2 (1 + 1) (Cooper *et al.*, 2006). Riportare il numero di spermatozoi osservati con il commento "Contati troppo pochi spermatozoi per una accurata determinazione della concentrazione (<56.000/ml)".

Commento: L'assenza di spermatozoi nelle aliquote esaminate non significa necessariamente che sono assenti nel resto del campione.

2.11.1.4 Esempi

Esempio 1. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), nel replicato 1 vengono rilevati 200 spermatozoi in 2 griglie, mentre il replicato 2 contiene 250 spermatozoi in 2 griglie. La somma dei valori (200 + 250) è 450 in 4 griglie e la differenza (250 - 200) è 50. Dalla Tabella 2.5 questo valore eccede la differenza attesa per la sola variabilità casuale (42), quindi il risultato viene scartato e vengono fatte due nuove diluizioni.

Esempio 2. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), nel replicato 1 vengono rilevati 210 spermatozoi in 3 griglie, mentre il replicato 2 contiene 200 spermatozoi in 3 griglie. La somma dei valori (210 + 200) è 410 in 6 griglie e la differenza (210 - 200) è 10. Dalla Tabella 2.5 questo valore è inferiore rispetto a quello trovato per la sola variabilità casuale (40), quindi i valori vengono accettati. La concentrazione degli spermatozoi nel campione per una diluizione 1:2 (1 + 1) è $C = (N/n) \times (1/50)$ spermatozoi per nl o $(410/6)/50 = 1.37$ spermatozoi/nl, o arrotondato a 1.4×10^6 spermatozoi per ml di liquido seminale.

Esempio 3. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), nel replicato 1 vengono rilevati 120 spermatozoi in tutte le 9 griglie, mentre il replicato 2 contiene 140 spermatozoi in tutte le 9 griglie. La somma dei valori (120 + 140) è 260 in 18 griglie e la differenza (140 - 120) è 20. Dalla Tabella 2.5 questo valore è inferiore rispetto a quello trovato per la sola variabilità casuale (32), quindi i valori vengono accettati. Quando vengono valutate tutte le 9 griglie in ciascuna camera (un totale di 1.8 μ l), la concentrazione degli spermatozoi nel campione per una diluizione 1:2 (1 + 1) è $C = (N/1.8) \times 2$ spermatozoi per μ l = $(260/1.8) \times 2 = 288.8$ spermatozoi/ μ l, o arrotondato 290×10^3 spermatozoi per ml di liquido seminale. Poiché sono stati contati meno di 400 spermatozoi, riportare l'errore di campionamento per 260 spermatozoi come determinato in Tabella 2.2 (approssimativamente 6%).

Esempio 4. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), nel replicato 1 vengono rilevati 10 spermatozoi in tutte le 9 griglie, mentre il replicato 2 contiene 8 spermatozoi in tutte le 9 griglie. Poiché sono stati contati meno di 25 spermatozoi, la concentrazione è $<56.000/\text{ml}$; riportare che "Sono stati osservati 18 spermatozoi nei replicati, troppo pochi per una accurata determinazione di concentrazione ($<56.000/\text{ml}$)".

Esempio 5. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), non viene rilevato nessuno spermatozoo in ciascun replicato. Poiché sono stati contati meno di 25 spermatozoi la concentrazione è $<56.000/\text{ml}$; riportare che "Nessuno spermatozoo è stato rilevato nei replicati, troppo pochi per una accurata determinazione della concentrazione ($<56.000/\text{ml}$)".

2.11.1.5 Calcolo del numero totale degli spermatozoi nell'eiaculato

Si raccomanda di calcolare e riportare il numero totale di spermatozoi per eiaculato, in quanto questo parametro fornisce una misura della capacità dei testicoli di produrre spermatozoi e della pervietà del tratto genitale maschile. Tale valore è ottenuto moltiplicando la concentrazione di spermatozoi per il volume dell'intero eiaculato.

2.11.2 Valutazione di bassi numeri di spermatozoi in vetrini monouso per grandi volumi (microscopia a fluorescenza)

L'uso di camere a grande volume, di profondità di 100 μm , può aumentare la sensibilità della valutazione della concentrazione (Cooper *et al.*, 2006). Il vetrino a grande volume ha due camere con profondità di 100 μm , ognuna contenente 25 μl . Per ridurre l'errore di campionamento, deve essere contato un numero minimo di spermatozoi (preferibilmente un totale di almeno 400, per conte replicate di circa 200 spermatozoi) (vedi Riquadro 2.7 e Tabella 2.2).

- Miscelare bene il campione (vedi Riquadro 2.3).
- Prelevare una aliquota di liquido seminale e diluire 1:2 (1+1) con fissativo (vedi Sezione 2.7.5), contenente il fluorocromo bisbenzimidide Hoechst 33342 (1 mg/l), osservando le raccomandazioni fornite in Sezione 2.8.2.

La diluizione 1:2 (1 + 1) per campioni con meno di 2 spermatozoi alla valutazione iniziale (Tabella 2.3) è appropriata per un range di concentrazioni nemaspermiche contenenti circa 200 spermatozoi nell'intera camera (vedi Riquadro 2.12).

Riquadro 2.12 Ottenere 200 spermatozoi per replicato in una camera monouso per volumi grandi di 100 μm di profondità.

Se c'è solo 1 spermatozoo pcv di 4 nl nella preparazione iniziale, ci saranno teoricamente 0.25 spermatozoi per nl (250 per μl o 250.000 per ml). La camera per grandi volumi contiene 25 μl , quindi ci dovrebbero essere 6.250 spermatozoi all'interno. La diluizione del campione 1:2 (1 + 1) come suggerita dovrebbe ridurre l'interferenza di fondo e il numero di spermatozoi a 3.125 per camera, sufficiente per un errore di campionamento accettabilmente basso.

Nota: Questo valore può essere solo una stima grossolana in quanto vengono contati pochi spermatozoi e i volumi possono essere inaccurati.

2.11.2.1 Procedura

1. Diluire due aliquote di campione seminale 1:2 (1 + 1) con fissativo, come sopra.
2. Riempire ciascuna camera del vetrino con 25 μl di diluizioni dei replicati, un replicato per camera.
3. Mantenere i vetrini orizzontali per 10-15 minuti al buio a temperatura ambiente in una camera umida (per es. una capsula di Petri chiusa, rivestita con carta di filtro imbibita di acqua) per prevenire l'essiccamento. Durante questo tempo il colorante si legherà alle teste degli spermatozoi e le cellule immobilizzate sedimenteranno sul pavimento della camera.
4. Esaminare il vetrino con microscopio a fluorescenza a 250x usando uno specchio dicroico e filtro di sbarramento.
5. Contare almeno 200 spermatozoi in ciascun replicato, al fine di raggiungere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.7 e Tabella 2.2).

6. Esaminare una camera in modo sistematico, campo per campo. Iniziare da un angolo e valutare attentamente lungo l'asse delle x fino al lato opposto; poi muoversi di un campo lungo l'asse delle y e valutare attentamente indietro lungo l'intera larghezza. Continuare in questo modo a zig-zag (vedi Fig. 2.9). Mantenere l'osservazione del vetrino mentre si cambiano i campi. Continuare la conta fino a che non siano stati osservati almeno 200 spermatozoi.
7. Annotare il numero di campi valutati per raggiungere almeno 200 spermatozoi. Lo stesso numero di campi verrà contato nelle altre camere.
8. Contare il numero di spermatozoi e i campi con l'ausilio di un contacellule.
9. Passare alla seconda camera e valutare la conta del replicato sugli stessi numeri di campi (lo stesso volume) come per il primo replicato, anche se questo contiene meno di 200 spermatozoi.
10. Calcolare la somma e la differenza dei due numeri.
11. Determinare l'accettabilità della differenza dalla Tabella 2.5 (che è l'ampliamento della Tabella 2.4 per numeri più bassi) o dalla Fig. A7.1, Appendice 7 (ciascuna mostra la massima differenza tra due conte attese che si rilevano nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento).
12. Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione (vedi Sezione 2.11.2.2). Se la differenza è troppo alta, allestire due nuove preparazioni e ripetere la valutazione (vedi Riquadro 2.10).
13. Riportare la media della concentrazione a due cifre significative.
14. Calcolare il numero totale di spermatozoi per eiaculato (vedi Sezione 2.11.2.5).

Nota 1: Gli spermatozoi appaiono come punti fluorescenti brillanti (nuclei condensati), diversamente dai leucociti e dalle cellule non nemaspermiche, che hanno una fluorescenza più diffusa (relativa ai loro nuclei più grandi) (Zinaman *et al.*, 1996).

Nota 2: Se non si è certi della fonte del segnale di fluorescenza, passare al microscopio a contrasto di fase dove possono essere osservate le code.

2.11.2.2 Calcolo di basse concentrazioni di spermatozoi nel liquido seminale

La concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale è il loro numero (N), diviso il volume del numero totale di campi microscopici (n) esaminati (dove il volume (v) di un campo viene calcolato come nel Riquadro 2.13), moltiplicato per la diluizione. Cioè, $C = (N/n) \times (1/v) \times$ fattore di diluizione.

Ad ingrandimento 250x, il volume del campo è 80 nl (vedi Riquadro 2.13), e per una diluizione 1:2 (1 + 1), la concentrazione è $C = (N/n) \times (1/80) \times 2$ spermatozoi per nl = $(N/n) \times (1/40)$ spermatozoi/nl (10^6 spermatozoi per ml di liquido seminale).

Ad ingrandimento 400x, il volume del campo è 20 nl (vedi Riquadro 2.13), e per una diluizione 1:2 (1 + 1) la concentrazione è $C = (N/n) \times (1/20) \times 2$ spermatozoi per nl = $(N/n) \times (1/10)$ spermatozoi/nl (10^6 spermatozoi per ml di liquido seminale).

Quando è stata valutata l'intera area di entrambe le camere, il numero totale di spermatozoi viene diviso per il volume totale di entrambe le camere (50 μ l), moltiplicato per il fattore di diluizione (2), per ottenere la concentrazione di spermatozoi/ μ l (migliaia per ml di liquido seminale).

Riquadro 2.13 Volume osservato per campo visivo in una camera monouso a grande volume, 100- μ m di profondità

Il volume del liquido seminale in ogni campo microscopico dipende dall'area del campo (πr^2 , dove π è approssimativamente 3.142 e r è il raggio del campo microscopico) e dalla profondità della camera (in questo caso 100 μ m).

Il diametro del campo microscopico può essere misurato con un micrometro o può essere stimato dividendo il diametro dell'apertura oculare per l'ingrandimento dell'obiettivo. Con un obiettivo 40x e un oculare 10x di apertura 20 mm, il campo del microscopio ha un diametro approssimativamente di 500 μ m (20 mm/40). In questo caso, $r = 250$ μ m, $r^2 = 62.500$ μ m², $\pi r^2 = 196.375$ μ m² e il volume è 19.637.500 μ m³ o circa 20 nl.

Con un obiettivo 25x e un oculare 10x di apertura 25 mm, il campo microscopico ha un diametro di circa 1.000 μ m (25 mm/25). In questo caso, $r = 500$ μ m, $r^2 = 250.000$ μ m², $\pi r^2 = 785.500$ μ m² e il volume è 78.550.000 μ m³ o circa 80 nl.

2.11.2.3 Sensibilità del metodo

Se, in ciascuna camera, ci sono meno di 200 spermatozoi l'errore di campionamento eccederà del 5%. Quando vengono trovati meno di 400 spermatozoi in entrambe i replicati, riportare l'errore di campionamento per il numero di cellule contate (vedi Tabella 2.2).

Se, in ciascuna camera, vengono contati meno di 25 spermatozoi, la concentrazione sarà <2000 spermatozoi/ml (questo è il limite inferiore di quantificazione per l'errore di campionamento del 20%, quando viene valutata l'intera camera (25 μ l) e viene utilizzata una diluizione 1:2 (1 + 1) (Cooper *et al.*, 2006). Riportare il numero di spermatozoi osservati con il commento "Troppo pochi spermatozoi contati per una determinazione accurata della concentrazione (<2.000/ml)".

Commento: L'assenza di spermatozoi dalle aliquote esaminate non significa necessariamente che sono assenti nel resto del campione.

2.11.2.4 Esempi

Esempio 1. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), nel replicato 1 vengono rilevati 210 spermatozoi in 300 campi, mentre il replicato 2 contiene 300 spermatozoi in 300 campi. La somma dei valori (210 + 300) è 510 in 600 campi e la differenza (300 - 210) è 90. Dalla Tabella 2.5 questo valore eccede la differenza attesa per effetto della sola variabilità casuale (44), quindi i risultati vengono scartati e vengono allestite due diluizioni replicate.

Esempio 2. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), nel replicato 1 vengono rilevati 200 spermatozoi in 400 campi, mentre il replicato 2 contiene 230 spermatozoi in 400 campi. La somma dei valori (200 + 230) è 430 in 800 campi e la differenza (230 - 200) è 30. Dalla Tabella 2.5 questo valore è minore rispetto a quello rilevato per effetto della sola variabilità casuale (41), quindi il valore viene accettato. La concentrazione degli spermatozoi nel campione, per una diluizione 1:2 (1 + 1) è $C = (N/n) \times (2/v)$ spermatozoi per nl. Se $v = 20$ nl (ingrandimento 400x, vedi Riquadro 2.13), $C = (430/800) \times (2/20) = 0.0538$ spermatozoi/nl o arrotondato a 54.000 spermatozoi per ml di liquido seminale.

Esempio 3. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), nel replicato 1 vengono rilevati 50 spermatozoi nell'intera camera, mentre il replicato 2 contiene 70 spermatozoi nell'intera camera. La somma dei valori, nelle due camere, è 120 (50 + 70) e la differenza (70 - 50) è 20. Dalla Tabella 2.5 tale valore è minore rispetto a quello rilevato per effetto della sola variabilità casuale (21), quindi i valori vengono accettati.

Quando viene valutata l'intera area di entrambe le camere (un totale di 50 μ l), la concentrazione del campione, per una diluizione 1:2 (1 + 1), è $C = (N/50) \times 2$ spermatozoi per μ l = $(120/50) \times 2 = 4.8$ spermatozoi/ μ l o 4.800 spermatozoi per ml di liquido seminale. Se vengono contati meno di 400 spermatozoi, riportare l'errore di campionamento per 120 spermatozoi, come riportato nella Tabella 2.2 (approssimativamente 10%).

Esempio 4. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), nel replicato 1 vengono rilevati 20 spermatozoi nell'intera camera, mentre il replicato 2 contiene 18 spermatozoi nell'intera camera. Poiché vengono contati meno di 25 spermatozoi, la concentrazione sarà di <2.000 spermatozoi/ml. Riportare che "Nei replicati sono stati osservati 38 spermatozoi, troppo pochi per una accurata determinazione della concentrazione (<2.000/ml)".

Esempio 5. Con una diluizione 1:2 (1 + 1), non vengono rilevati spermatozoi in ciascun replicato. Poiché sono stati contati meno di 25 spermatozoi, la concentrazione sarà <2.000 spermatozoi/ml. Riportare "Non è stato rilevato nessuno spermatozoo nei replicati, troppo pochi per una accurata determinazione della concentrazione (<2.000/ml)".

2.11.2.5 Calcolo del numero totale di spermatozoi nell'eiaculato

Si raccomanda di calcolare e riportare il numero totale di spermatozoi per eiaculato, in quanto questo parametro fornisce una misura della capacità dei testicoli di produrre spermatozoi e della pervietà del tratto genitale maschile. Tale valore è ottenuto moltiplicando la concentrazione degli spermatozoi per il volume dell'intero eiaculato.

2.12 Conta delle cellule non nemaspermiche

La presenza nel liquido seminale di cellule non nemaspermiche può essere indicativa di danno testicolare (cellule germinali immature), di patologie dei dotti efferenti (epitelio ciliato) o di infiammazione delle ghiandole accessorie (leucociti). Il numero di cellule non nemaspermiche nel liquido seminale [cellule epiteliali, cellule rotonde (cellule germinali e leucociti) o teste e code di spermatozoi isolate] può essere valutato in preparazioni a fresco fissate mediante l'utilizzo dell'emocitometro, nello stesso modo degli spermatozoi (vedi Sezione 2.8.3). Tuttavia, il campione seminale adeguatamente diluito per la conta di spermatozoi sarà generalmente troppo diluito

per una accurata valutazione delle cellule non nemaspermiche, a meno che non siano presenti in elevate concentrazioni. La prevalenza di cellule rotonde rispetto agli spermatozoi può essere valutata nel vetrino (vedi Sezione 2.12.1). In alternativa, la loro concentrazione può essere valutata durante la stima delle cellule perossidasi positive (vedi Sezione 2.18.1.5).

2.12.1 Calcolo della concentrazione delle cellule rotonde nel liquido seminale

La concentrazione delle cellule rotonde viene calcolata in relazione a quella degli spermatozoi, mediante la valutazione di vetrini fissati e colorati, preparati con liquido seminale non diluito (vedi Sezione 2.13.2). Se N è il numero di cellule rotonde contate nello stesso numero di campi per 400 spermatozoi, ed S è la concentrazione di spermatozoi rilevata (10^6 per ml), la concentrazione (C) di cellule rotonde (10^6 per ml) si può calcolare mediante la formula $C = S \times (N/400)$.

2.12.2 Sensibilità del metodo

Se nel campione ci sono poche cellule rotonde (cioè <400), si accetterà un errore di campionamento del 5%. In questo caso, riportare l'errore di campionamento per il numero di cellule contate (vedi Tabella 2.2). Se vengono contate meno di 25 cellule rotonde, riportare il numero di cellule rotonde osservate con il commento "Troppe poche cellule per una accurata determinazione della concentrazione".

2.12.3 Esempi

Esempio 1. Nel replicato 1 ci sono 21 cellule rotonde per 200 spermatozoi, mentre nel replicato 2 ci sono 39 cellule rotonde per 200 spermatozoi. La somma dei valori (21 + 39) è 60 e la differenza (39 - 21) è 18. Dalla Tabella 2.5 tale valore eccede la differenza attesa per effetto della sola variabilità casuale (15), quindi i risultati vengono scartati e verranno allestiti nuovi preparati.

Esempio 2. Nel replicato 1 ci sono 24 cellule rotonde per 200 spermatozoi, mentre nel replicato 2 ci sono 36 cellule rotonde per 200 spermatozoi. La somma dei valori (24 + 36) è 60 e la differenza (36 - 24) è 12. Dalla Tabella 2.5 tale valore risulta inferiore a quello atteso per effetto della sola variabilità casuale (15), quindi i valori vengono accettati.

Nel caso di 60 cellule rotonde per 400 spermatozoi e concentrazione nemaspermica di 70×10^6 di cellule per ml, la concentrazione di cellule rotonde è $C = S \times (N/400)$ cellule per ml = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10.5 \times 10^6$ cellule per ml o arrotondato a 10×10^6 cellule per ml. Poiché vengono contate meno di 400 cellule, riportare l'errore di campionamento per 60 cellule, come in Tabella 2.2 (approssimativamente 13%).

Commento 1: Se la concentrazione delle cellule rotonde stimata eccede 1×10^6 per ml, dovrebbe essere valutata molto accuratamente la loro natura mediante l'attività perossidasi (vedi Sezione 2.18) o i markers leucocitari (vedi Sezione 3.2) e la loro concentrazione. Può essere possibile identificare cellule germinali immature in preparazioni ben colorate (vedi Sezione 2.19).

Commento 2: Il numero totale di cellule rotonde nell'eiaculato può riflettere la gravità dell'infiammazione o della spermatogenesi. Ciò si ottiene moltiplicando la concentrazione delle cellule rotonde per il volume dell'intero eiaculato.

2.13 Morfologia nemaspermica

La determinazione della morfologia nemaspermica comprende i seguenti punti (che sono descritti in dettaglio nelle successive sezioni).

- Preparare uno striscio di liquido seminale su vetrino (vedi Sezione 2.13.2).
- Asciugare all'aria, fissare e colorare il vetrino (vedi Sezione 2.14).
- Coprire il vetrino con un coprioggetto, se deve essere conservato per lungo tempo (vedi Sezioni 2.14.2.4 e 2.14.2.5).
- Esaminare il vetrino con microscopio ottico in campo chiaro ad ingrandimento 1000x ad immersione ad olio (vedi Sezioni 2.15 e 2.16).
- Valutare approssimativamente 200 spermatozoi per replicato, per la percentuale di forme normali (vedi Sezione 2.15.1) o di forme normali e atipiche (vedi Sezione 2.15.2).
- Comparare i valori del replicato per vedere se sono ripetibili. In quest'ultimo caso, procedere con il calcolo; in caso contrario, leggere nuovamente il vetrino.

2.13.1 Il concetto di spermatozoi normali

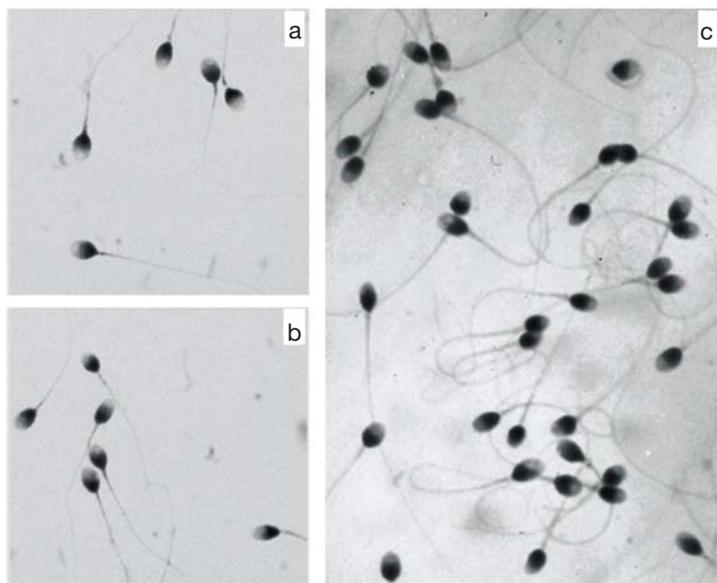
La variabilità morfologica degli spermatozoi umani rende la valutazione della morfologia difficoltosa, ma le osservazioni degli spermatozoi recuperati dalle vie genitali femminili, in particolare nel muco endocervicale dopo coito (Fredricsson, Björk, 1977; Menkveld *et al.*, 1990) e dalla superficie della zona pellucida (Menkveld *et al.*, 1991; Liu, Baker, 1992a) (vedi Fig. 2.10), hanno contribuito a definire l'aspetto degli spermatozoi potenzialmente fecondanti (morfologicamente normali). Mediante la rigida applicazione di alcuni criteri di valutazione della morfologia nemaspermica sono state stabilite (Jouannet *et al.*, 1988; Toner *et al.*, 1995; Eggert-Kruse *et al.*, 1996; Coetzee *et al.*, 1998; Menkveld *et al.*, 2001; Van Waart *et al.*, 2001; Garrett *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003) relazioni tra la percentuale di forme normali e vari endpoints della fertilità [tempo di gravidanza (TTP), percentuale di gravidanza *in vivo* e *in vitro*], che possono essere utili per la prognosi di fertilità].

La teoria alla base del sistema di classificazione qui descritto è limitare ciò che viene identificato come normale ad una sottopopolazione di spermatozoi potenzialmente fecondanti, predominante nel muco endocervicale. Usando queste indicazioni, il range dei valori di percentuale normali per gli uomini fertili e infertili è probabilmente compreso tra 0-30%, con pochi campioni che eccedono il 25% di spermatozoi normali (Menkveld *et al.*, 2001). Tale valore basso produrrà, inevitabilmente, soglie basse; infatti negli studi di fecondazione *in vitro* (Coetzee *et al.*, 1998), di inseminazione intrauterina (Van Waart *et al.*, 2001) e di fertilità *in vivo* (Van der Merwe *et al.*, 2005) sono stati rilevati limiti di riferimento e soglie comprese tra 3-5% di forme normali.

Anche la zona pellucida umana seleziona una sottopopolazione di spermatozoi morfologicamente simili, ma tale “zona-privilegiata” mostra spermatozoi con un più ampio range di forme (Liu *et al.*, 1990; Garrett *et al.*, 1997). Anche la percentuale di spermatozoi mobili nel liquido seminale, proveniente da uomini fertili, che mostra una morfologia “zona-privilegiata” è bassa (8–25%) (Liu *et al.*, 2003).

Fig. 2.10 Spermatozoi morfologicamente “normali”

(a, b) Spermatozoi con colorazione Shorr recuperati dalla zona pellucida in vitro. (c) Spermatozoi colorati con Papanicolaou recuperati dal muco endocervicale dopo rapporto. Si osservano pochissimi spermatozoi con difetti della testa, tratto intermedio e tratto principale. Le code possono essere curve ma non nettamente angolate.



(a, b) Riprodotto da Liu *et al.* (2003) con il permesso della European Society of Human Reproduction and Embryology. (c) Riprodotto da Menkveld, Kruger (1990) con il permesso di Lippincott Williams, Wilkins.

2.13.2 Preparazione degli strisci seminali

Una rapida aggiunta di fissativo al liquido seminale non permette una idonea visualizzazione degli spermatozoi, in quanto vengono mascherati dalle proteine seminali denaturate. Per l’analisi morfologica, è consuetudine preparare strisci seminali che vengono asciugati all’aria prima della fissazione e colorazione. Tuttavia, un tale processo determina artefatti morfologici, dal momento che l’essiccamento all’aria è associato con:

- cambiamenti nelle dimensioni degli spermatozoi: gli spermatozoi asciugati, fissati e colorati sono più piccoli rispetto agli spermatozoi vitali visualizzati nel liquido seminale (Katz *et al.*, 1986);
- espansione delle teste immature degli spermatozoi (Soler *et al.*, 2000) e

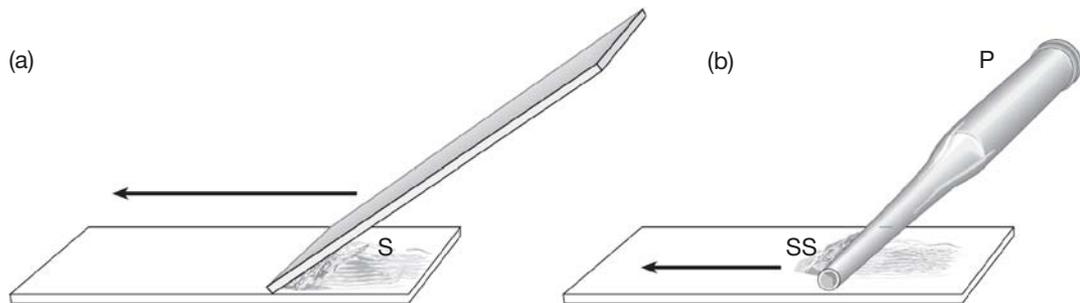
- perdita di residui citoplasmatici osmoticamente sensibili (Abraham-Peskir *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2004), sebbene notevoli quantità di residui citoplasmatici in eccesso vengono conservati.

Dovrebbero essere preparati due o più vetrini dal campione seminale fresco nel caso ci siano problemi con la colorazione o se un vetrino si rompe. La valutazione viene effettuata in replicato, preferibilmente in ciascuno dei due vetrini, in quanto ci possono essere significative variazioni, tra vetrini, nella morfologia nemaspermica.

- Miscelare bene il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
- Prelevare una aliquota immediatamente, prima che gli spermatozoi sedimentino.
- Miscelare di nuovo il campione seminale prima di prelevare aliquote per i replicati.
- Possono essere utilizzati diversi metodi di striscio, in differenti condizioni (Fig. 2.11).

Fig. 2.11 Metodi di striscio seminale per la morfologia nemaspermica

(a) Metodo “a fiamma” per liquido seminale *in toto*. La goccia di liquido seminale (S) si diffonde lungo il bordo posteriore di un vetrino tenuto ad angolo e viene spinta in avanti sul vetrino per formare uno striscio. (b) Metodo della pipetta per campioni lavati. Una goccia di sospensione (SS) viene distesa sulla superficie di un vetrino facendo una lieve pressione con una pipetta tenuta in posizione orizzontale (P).



2.13.2.1 Campioni seminali normali

Con questa procedura una aliquota di liquido seminale viene strisciata sull'intera superficie del vetrino mediante la tecnica a fiamma (vedi Figg. 2.11a, 2.12).

- Pulire entrambe le superfici dei vetrini smerigliati strofinando energicamente con un fazzoletto di carta privo di peli.
- Etichettare la porzione smerigliata con informazioni identificative (per es. numero di identificazione, data) utilizzando una matita con una mina medio dura (HB o N° 2).
- Porre una aliquota di 5-10 μ l di liquido seminale, in funzione della concentrazione nemaspermica, alla fine del vetrino. Usare un secondo vetrino per stendere la goccia di liquido seminale lungo la superficie del vetrino (vedi Figg. 2.11a, 2.12). Se il vetrino che viene utilizzato per strisciare la goccia non è smerigliato, possono essere utilizzati entrambi i bordi esterni del vetrino per fare 4 differenti strisci.
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria e colorarli come descritto in Sezione 2.14.

Nota 1: La mina della matita rimane stabile nei fissativi e coloranti, mentre l'inchiostro e i pennarelli permanenti non lo sono.

Nota 2: Non lasciare le gocce di liquido seminale all'estremità del vetrino per più di un paio di secondi prima di strisciare.

Nota 3: Assicurarsi di posizionare il vetrino davanti alla goccia per strisciare il liquido seminale lungo tutto il vetrino; non utilizzare il vetrino per spingere il campione seminale da dietro la goccia.

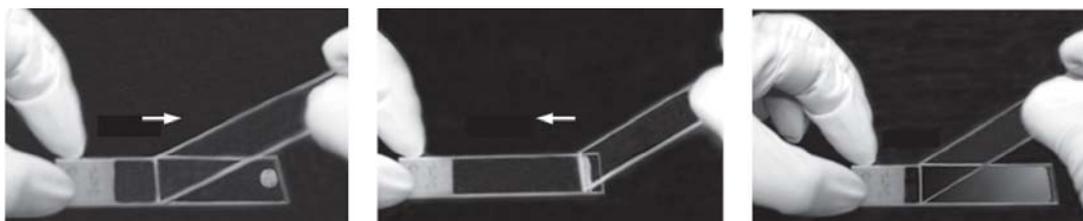
La qualità dello striscio (minima sovrapposizione di spermatozoi sul vetrino) dipende da:

- volume del liquido seminale e dalla concentrazione nemaspermica: meno sono gli spermatozoi, minore è la probabilità che si sovrappongano l'un l'altro;
- angolo del vetrino utilizzato per lo striscio (Hotchkiss, 1945): minore è l'angolo, più sottile sarà lo striscio;
- velocità di striscio (Eliasson, 1971): più rapido è il movimento, più spesso sarà lo striscio.

Iniziare con un volume di 10 µl, un angolo di 45° e uno striscio di circa 1 secondo. Questi parametri possono essere modificati, se necessario, per ridurre la sovrapposizione degli spermatozoi sul vetrino (Menkveld *et al.*, 1990). Lo striscio a fiamma dà buoni risultati quando la viscosità del liquido seminale è bassa, ma spesso non è idoneo in campioni seminali molto viscosi (vedi Fig. 2.12 e Sezione 2.13.2.3).

Fig. 2.12 Preparazione di uno striscio di un liquido seminale normale

Per ottenere la sensibilità del movimento, porre il vetrino utilizzato per strisciare con una angolazione di 45° e spostarlo fino a farlo venire in contatto con la goccia di liquido seminale (riquadro a sinistra), che si diffonderà lungo il bordo del vetrino (riquadro centrale). Spingere il vetrino utilizzato per strisciare lentamente indietro (per più di un secondo) lungo tutta la lunghezza del vetrino per produrre lo striscio (riquadro di destra).



Fotografie per gentile concessione di C Brazil.

Possono essere necessari differenti procedure, in caso di basse concentrazioni di spermatozoi ($<2 \times 10^6/\text{ml}$), campioni viscosi o pieni di detriti o quando deve essere eseguita l'analisi computerizzata della morfologia (vedi Sezione 3.5.4).

2.13.2.2 Campioni con basse concentrazioni di spermatozoi

Se la concentrazione di spermatozoi è bassa (per es. $<2 \times 10^6/\text{ml}$), concentrare il campione:

1. Centrifugare il campione a 600 g per 10 minuti.
2. Decantare la maggior parte del surnatante.
3. Risospendere il pellet nel restante surnatante pipettando delicatamente.
4. Ottenere la più elevata concentrazione possibile, cercando di non superare circa $50 \times 10^6/\text{ml}$.
5. Trattare come un normale campione (vedi Sezione 2.13.2.1).

Nota: La centrifugazione può influenzare negativamente la morfologia e il suo utilizzo deve essere segnalato.

2.13.2.3 Campioni seminali viscosi

Alcune volte è difficile preparare buoni strisci in quanto il plasma seminale è notevolmente viscoso e ciò determina strisci di spessore irregolare. I campioni viscosi possono essere trattati nello stesso modo dei campioni scarsamente fluidificati (vedi Sezione 2.3.1.1) o mediante lavaggio (vedi Sezione 2.13.2.4).

Nota: Queste procedure possono influenzare negativamente la morfologia nemaspermica e il loro utilizzo deve essere segnalato.

2.13.2.4 Lavaggio di campioni seminali viscosi o pieni di detriti e riduzione dell'interferenza di fondo per l'analisi computerizzata della morfologia

I detriti e una grande quantità di materiale particolato (come nei campioni viscosi) possono essere la causa della presenza di spermatozoi con teste sui bordi, rendendoli difficili da catalogare. Questi campioni possono essere lavati nel seguente modo:

1. Diluire una aliquota di liquido seminale (0.2-0.5 ml, a seconda della concentrazione nemaspermica) fino a 10 ml con soluzione fisiologica [0.9 g di cloruro di sodio (NaCl) per 100 ml di acqua distillata] a temperatura ambiente.
2. Centrifugare a 800 g per 10 minuti.
3. Decantare la maggior parte del surnatante.
4. Risospendere il pellet nel restante surnatante (di solito 20-40 μl) pipettando delicatamente.
5. Preparare uno striscio con 5-10 μl di sospensione di spermatozoi su un vetrino da microscopio con una pipetta Pasteur (vedi Fig. 2.11b).

6. Valutare attentamente il vetrino con microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 400x per assicurarsi che lo striscio sia uniformemente distribuito.
7. Controllare che ci siano almeno 40 spermatozoi per campo a 400x senza ammassi o sovrapposizioni.
8. Lasciare asciugare all'aria i vetrini e colorare come descritto in Sezione 2.14.

Nota 1: Se ci sono troppi spermatozoi sovrapposti sul vetrino, preparare un altro striscio usando una aliquota più piccola di liquido seminale.

Nota 2: Se gli spermatozoi sono troppo dispersi sul vetrino, preparare un altro vetrino utilizzando una aliquota maggiore di liquido seminale.

Nota 3: Lavare il campione seminale può alterare la morfologia degli spermatozoi e la procedura deve essere segnalata.

Commento: Lasciare il liquido seminale a fluidificare per un periodo più lungo di 30 minuti prima di effettuare gli strisci può ridurre l'interferenza di fondo nella colorazione.

2.14 Metodi di colorazione

Una volta che gli strisci di liquido seminale vengono fatti asciugare all'aria, dovrebbero essere fissati e colorati per evidenziare i dettagli degli spermatozoi. È consigliato l'uso delle colorazioni Papanicolaou, Shorr o Diff-Quik. Con tutte le tre colorazioni, al microscopio in campo chiaro, la testa viene colorata in blu chiaro nella regione acrosomiale e blu scuro nella regione post-acrosomiale. Il tratto intermedio può presentare una colorazione rossa e la coda blu o rossastra. Il residuo citoplasmatico in eccesso, normalmente localizzato sotto la testa e intorno al tratto intermedio, viene colorato in rosa o rosso (colorazione Papanicolaou) o rossastro arancio (colorazione Shorr).

Commento: Sono disponibili in commercio metodi di colorazione rapida in cui una goccia di liquido seminale viene aggiunta al fissativo e colorata direttamente sul vetrino. Tuttavia, tali metodi non vengono raccomandati, in quanto senza una distribuzione uniforme di spermatozoi, fornita dalla tecnica dello striscio, non è possibile osservare i dettagli necessari per la classificazione morfologica qui descritta.

2.14.1 Fissazione tradizionale e colorazione sequenziale

Comprende i seguenti passaggi:

- etanolo fissa le cellule; le disidrata;
- serie di alcool reidrata gradualmente gli strisci fissati, per consentire la colorazione con ematossilina solubile in acqua;

- acqua distillata reidrata gli strisci essiccati, per consentire la colorazione con ematossilina solubile in acqua;
- ematossilina colora i nuclei in blu;
- acqua di rubinetto rimuove l'ematossilina nucleare non legata;
- etanolo acido rimuove il colorante non legato specificamente dal citoplasma (decolorazione);
- acqua del rubinetto rimuove l'acidità e restituisce il colore blu al nucleo;
- soluzione di Scott rimuove il colore blu al nucleo (se l'acqua di rubinetto è insufficiente);
- etanolo disidrata i vetrini per consentire la colorazione Orange G/EA-50 etanolo solubile;
- Orange G colora il citoplasma rosa;
- EA-50 colora il citoplasma rosa;
- serie di alcool disidrata gradualmente gli strisci colorati per consentire l'utilizzo di mezzi di montaggio etanolo solubili;
- xylene consente l'utilizzo di mezzi di montaggio etanolo insolubili (vedi Riquadro 2.14).

Riquadro 2.14 Mezzi di montaggio

I vetrini possono essere osservati non montati o montati (senza e con coprioggetto adesivo). Montare i vetrini permette la conservazione a lungo termine, in modo tale che possano essere, eventualmente, rivalutati e utilizzati in un programma di controllo di qualità interno. L'indice di rifrazione (IR) del mezzo di montaggio dopo l'essiccamento (da 1.50 a 1.55) è simile a quello del vetro (da 1.50 a 1.58) e la migliore qualità ottica si raggiunge con l'utilizzo di immersione a olio o simili IR (1.52).

2.14.2 Procedimento di colorazione Papanicolaou per la morfologia nemaspermica

La colorazione Papanicolaou fornisce una buona colorazione degli spermatozoi e altre cellule. Colora le regioni acrosomiali e post-acrosomiali della testa, i residui citoplasmatici in eccesso, il tratto intermedio e il tratto principale. La tecnica di colorazione modificata, qui descritta, si è dimostrata utile nell'analisi della morfologia nemaspermica e nell'analisi delle cellule germinali immature e cellule non nemaspermiche (vedi Tavole 1-14). Le procedure di routine sono state modificate per lavorare senza etere (come fissativo) o xylene (per il montaggio) (ESHRE/NAFA, 2002) (vedi Sezione 2.14.2.4). I vetrini colorati utilizzando il metodo Papanicolaou possono essere montati permanentemente e conservati per un utilizzo futuro in programmi di controllo di qualità interno. Se vengono conservati al buio, dovrebbero essere stabili per mesi o anni. I seguenti metodi sono stati utilizzati per preparare le Tavole di questo manuale, provenienti da vetrini che sono stati chiusi con mezzi di montaggio etanolo insolubili.

2.14.2.1 Reagenti

1. Coloranti componenti il Papanicolaou: disponibili in commercio o vedi Appendice 4, Sezione A4.10.
2. Etanolo acido: aggiungere 1.0 ml di acido idrocloridrico concentrato a 200 ml di etanolo 70% (v/v).
3. Xylene: etanolo 1:2 (1 + 1); miscelare parti uguali di etanolo 100% e xylene.

Nota 1: Lo xylene è pericoloso per la salute e dovrebbe essere utilizzato sotto cappa.

Nota 2: Gli strisci dovrebbero essere asciugati all'aria per almeno 4 ore, ma possono essere conservati per 1 settimana, prima di essere fissati e colorati.

2.14.2.2 Fissazione dello striscio seminale asciugato all'aria

1. Immergere i vetrini in etanolo al 95% (v/v) per almeno 15 minuti.

2.14.2.3 Colorazione dello striscio seminale fissato

Successivamente immergere i vetrini in:

- | | |
|---------------------------------------|------------------|
| 1. Etanolo 80% (v/v) | 30 secondi |
| 2. Etanolo 50% (v/v) | 30 secondi |
| 3. Acqua distillata | 30 secondi |
| 4. Ematossilina di Harris | 4 minuti |
| 5. Acqua distillata | 30 secondi |
| 6. Etanolo acido | 4-8 immersioni* |
| 7. Acqua fredda corrente di rubinetto | 5 minuti |
| 8. Etanolo 50% (v/v) | 30 secondi |
| 9. Etanolo 80% (v/v) | 30 secondi |
| 10. Etanolo 95% (v/v) | almeno 15 minuti |
| 11. Orange G-6 | 1 minuto |
| 12. Etanolo 95% (v/v) | 30 secondi |
| 13. Etanolo 95% (v/v) | 30 secondi |
| 14. Etanolo 95% (v/v) | 30 secondi |
| 15. EA-50 green | 1 minuto |
| 16. Etanolo 95% (v/v) | 30 secondi |

17. Etanolo 95% (v/v)	30 secondi
18. Etanolo 100%	15 secondi
19. Etanolo 100%	15 secondi

*Una immersione è di circa 1 secondo.

Nota 1: La fissazione in etanolo causa la disidratazione delle cellule. Quindi gli strisci che passano direttamente dallo step di fissazione in etanolo 95% alla colorazione possono richiedere solo 10 secondi in etanolo 80%, mentre gli strisci che dopo la fissazione vengono asciugati all'aria devono rimanere più a lungo (2-3 minuti) in etanolo 50%.

Nota 2: Al punto 6 cominciare con 4 immersioni; continuare fino a che i risultati sono soddisfacenti. Questo è un punto critico, in quanto la durata della decolorazione altera notevolmente l'intensità della colorazione finale. Se non viene eseguito questo passaggio, gli spermatozoi e il fondo risulteranno scuri. Aumentando il numero delle immersioni, gli spermatozoi e il fondo risulteranno più chiari.

Nota 3: I vetrini possono essere osservati non montati o montati.

2.14.2.4 *Trattamento degli strisci seminali colorati prima del montaggio*

Esistono due tipi di fluidi di montaggio della preparazione: mezzi di montaggio etanolo solubili e etanolo insolubili.

- Utilizzare i mezzi di montaggio etanolo solubili direttamente sugli strisci ancora bagnati di etanolo.
- Per mezzi di montaggio etanolo insolubili, procedere direttamente dal punto 19, sopra descritto, ai seguenti passaggi (da effettuare in cappa):
 1. Xylene: etanolo, 1:2 (1 + 1) 1 minuto
 2. Xylene 100% 1 minuto

Rimuovere un vetrino alla volta dal recipiente di colorazione con xylene e lasciarlo sgocciolare soltanto per 1-2 secondi, in tal modo i vetrini dovrebbero essere abbastanza bagnati con xylene quando vengono montati.

2.14.2.5 *Montaggio degli strisci seminali colorati*

1. Aggiungere 2 o 3 piccole gocce di mezzo di montaggio ai vetrini.
2. Porre un coprioggetto (le misure 24 mm x 50 mm o 24 mm x 60 mm sono più adatte) direttamente sullo striscio.
3. Posizionare il coprioggetto in modo tale che il contatto con il mezzo di montaggio cominci da un lato lungo, al fine di prevenire che le bolle di aria rimangano intrappolate.

4. Se necessario, premere delicatamente sulla superficie del coprioggetto in modo da spingere le bolle verso il bordo del vetrino.
5. Rimuovere l'eccesso di xylene (se utilizzato) dalla parte sottostante del vetrino.
6. Lasciare lo striscio montato ad asciugare, orizzontalmente, su una rastrelliera per vetrini o su carta assorbente per 24 ore sotto cappa.

2.14.3 Procedura di colorazione Shorr per la morfologia nemaspermica

La colorazione Shorr fornisce percentuali di forme normali simili alla colorazione Papanicolaou (Meschede *et al.*, 1993).

2.14.3.1 Reagenti

1. Ematossilina di Harris: Papanicolaou N° 1.
2. Soluzione di Shorr: comprarla già pronta o preparala come segue. Sciogliere 4 g di polvere di Shorr in 220 ml di etanolo 50% (v/v) riscaldato. Lasciare raffreddare, aggiungere 2.0 ml di acido acetico glaciale (sotto cappa) e filtrare.
3. Etanolo acetico: aggiungere 25 ml di acido acetico glaciale a 75 ml di etanolo 95% (v/v).
4. Etanolo ammonio: aggiungere 5 ml di idrossido di ammonio al 25% (v/v) a 95 ml di etanolo al 75% (v/v).

2.14.3.2 Fissazione degli strisci seminali asciugati all'aria

Immergere i vetrini in etanolo acetico o etanolo 75% (v/v) per 1 ora.

2.14.3.3 Colorazione degli strisci seminali fissati

Successivamente immergere i vetrini in:

- | | |
|-----------------------|-------------------|
| 1. Acqua corrente | 12-15 immersioni* |
| 2. Ematossilina | 1-2 minuti |
| 3. Acqua corrente | 12-15 immersioni* |
| 4. Etanolo ammonio | 10 immersioni* |
| 5. Acqua corrente | 12-15 immersioni* |
| 6. Etanolo 50% (v/v) | 5 minuti |
| 7. Colorazione Shorr | 3-5 minuti |
| 8. Etanolo 50% (v/v) | 5 minuti |
| 9. Etanolo 75% (v/v) | 5 minuti |
| 10. Etanolo 95% (v/v) | 5 minuti |

*Una immersione è di circa 1 secondo.

Nota: I vetrini possono essere osservati non montati o montati.

2.14.3.4 Montaggio degli strisci seminali colorati

Vedi Sezioni 2.14.2.4 e 2.14.2.5.

2.14.4 Procedura di colorazione rapida per la morfologia nemaspermica

I metodi di colorazione rapida sono particolarmente utili per i laboratori clinici che necessitano di fornire risultati in giornata. Sono disponibili diverse serie di colorazioni differenziali (Kruger *et al.*, 1987). Alcuni strisci colorati mediante procedure rapide hanno una elevata interferenza di fondo nella colorazione e possono essere di qualità inferiore rispetto a quelli colorati con Papanicolaou.

2.14.4.1 Reagenti

1. Diff-Quik, kit di colorazione rapida costituito da:
 - a) Fissativo (triarilmetano sciolto in metanolo);
 - b) Soluzione di colorazione 1 (xantene eosinofilo);
 - c) Soluzione di colorazione 2 (tiazina basofila).
2. Fissativo: 1.8 mg di triarilmetano sciolto in 1.000 ml di metanolo al 95% (v/v), opzionale.
3. Fissativo: metanolo al 95% (v/v), opzionale.

2.14.4.2 Fissaggio degli strisci asciugati all'aria

Immergere i vetrini nel fissativo triarilmetano (fornito nel kit Diff-Quik o preparato come sopra) per 15 secondi o solo metanolo al 95% per 1 ora. Eliminare l'eccesso di soluzione posizionando i vetrini verticalmente su carta assorbente.

2.14.4.3 Colorazione degli strisci seminali fissati

Immergere in sequenza i vetrini in:

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1. Colorante rapido soluzione 1 | 10 secondi |
| 2. Colorante rapido soluzione 2 | 5 secondi |
| 3. Acqua corrente | da 10 a 15 volte per rimuovere l'eccesso del colorante |

Eliminare la soluzione in eccesso ad ogni passaggio posizionando i vetrini verticalmente su carta assorbente.

Nota 1: I vetrini possono essere osservati non montati o montati.

Nota 2: Se c'è una elevata colorazione di fondo, dovrebbe essere lavata una aliquota di campione seminale (vedi Sezione 2.13.2.4) e dovrebbero essere preparati e colorati nuovi vetrini. Il lavaggio può influenzare la morfologia nemaspermica e il suo utilizzo deve essere segnalato.

2.14.4.4 Montaggio degli strisci seminali colorati

Vedi Sezioni 2.14.2.4 e 2.14.2.5.

2.15 Esame delle preparazioni colorate

Con le preparazioni colorate, deve essere utilizzato un microscopio a campo chiaro con obiettivo 100x ad immersione ad olio e almeno un oculare 10x. Le immagini più pulite vengono ottenute quando viene posto tra la lente e la sezione non montata o sul vetrino coprioggetto un fluido con indice di rifrazione (IR) simile a quello delle cellule (approssimativamente 1.5) e del vetro (1.50-1.58). Comunemente viene utilizzato olio ad immersione (IR 1.52). Il mezzo di montaggio ha un simile indice di rifrazione (da 1.50 a 1.55: vedi Riquadro 2.14).

2.15.1 Classificazione della normale morfologia nemaspermica

La valutazione della morfologia nemaspermica è associata a numerose difficoltà relative alla mancanza di oggettività, alla variazione nell'interpretazione o ai risultati scarsi nelle valutazioni del controllo di qualità esterno (vedi Sezione 7.13.2). Il metodo qui raccomandato è una semplice classificazione normale/atipico, con il conteggio opzionale della localizzazione delle atipie negli spermatozoi. I criteri, riportati di seguito, dovrebbero essere applicati quando si valutano spermatozoi morfologicamente normali (Kruger *et al.*, 1986; Menkveld *et al.*, 1990; Coetzee *et al.*, 1998). Il limite di riferimento dato (Sezione 2.17.3) è valido soltanto quando viene utilizzata la tecnica descritta sotto.

Gli spermatozoi sono costituiti da una testa, un collo, un tratto intermedio, un tratto principale e un tratto finale. Siccome il tratto finale è difficile da vedere con un microscopio ottico, si possono considerare le cellule costituite da una testa (e collo) e una coda (tratto intermedio e tratto principale). Per considerare normale uno spermatozoo sia la testa che la coda devono essere normali. Tutte le forme dubbie dovrebbero essere considerate atipiche.

- La testa dovrebbe essere liscia, con contorni regolari e generalmente di forma ovale. Dovrebbe essere presente una regione acrosomiale ben definita, che comprende il 40-70% dell'area della testa (Menkveld *et al.*, 2001). La regione acrosomiale non dovrebbe contenere grandi vacuoli, e non più di due piccoli vacuoli, che non dovrebbero occupare più del 20% della testa dello spermatozoo. La regione post-acrosomiale non dovrebbe contenere nessun vacuolo.
- Il tratto intermedio dovrebbe essere sottile, regolare e circa della stessa lunghezza della testa. L'asse maggiore del tratto intermedio dovrebbe essere allineato con l'asse maggiore della testa dello spermatozoo. Il residuo citoplasmatico viene considerato una atipia soltanto quando è in eccesso, cioè quando eccede un terzo della dimensione della testa dello spermatozoo (Mortimer, Menkveld, 2001).

- Il tratto principale dovrebbe avere un calibro uniforme lungo tutta la sua lunghezza, essere più sottile rispetto al tratto intermedio e lungo approssimativamente 45 μm (circa 10 volte la lunghezza della testa). Può essere avvolto su se stesso (vedi Fig. 2.10c), sempre che non ci sia un angolo acuto indicativo di una rottura flagellare.

Commento 1: Con questa tecnica la forma della testa dello spermatozoo è più importante delle sue dimensioni, a meno che quest'ultime non siano grossolamente atipiche.

Commento 2: Un oculare micrometrico può essere utile per distinguere gli spermatozoi con teste di dimensione normale o atipica.

Commento 3: Le dimensioni delle teste di 77 spermatozoi colorati con Papanicolaou (colorati con la procedura spiegata nella Sezione 2.14.2 e classificati come normali con i criteri qui riportati), misurate mediante un sistema computerizzato (coefficiente di variazione per misure ripetute 2-7%), presentavano le seguenti dimensioni: lunghezza mediana 4.1 μm , 95% IC 3.7-4.7; larghezza mediana 2.8 μm , 95% IC 2.5-3.2; rapporto lunghezza-ampiezza 1.5, 95% IC 1.3-1.8.

Commento 4: I tratti intermedi di 74 spermatozoi colorati con Papanicolaou (colorati con la procedura spiegata in Sezione 2.14.2 e classificati come normali secondo i criteri qui riportati) e misurati con lo stesso sistema computerizzato presentavano le seguenti dimensioni: lunghezza mediana 4.0 μm , 95% IC 3.3-5.2; larghezza mediana 0.6 μm , 95% IC 0.5-0.7.

Commento 5: Le code arrotolate/rigonfie ($>360^\circ$, vedi Fig. 2.13m) possono indicare una disfunzione dell'epididimo (Pelfrey *et al.*, 1982).

Questa valutazione di spermatozoi morfologicamente normali può essere applicata meglio imparando a riconoscere le variazioni sottili nella forma dell'intero spermatozoo (teste e code degli spermatozoi normali/dubbie; vedi Sezione 2.16, Tavole 1-12 e i loro commenti).

2.15.2 Classificazione della morfologia degli spermatozoi atipici

I campioni di liquido seminale umano presentano spermatozoi con differenti tipi di alterazioni. I difetti della spermatogenesi e alcune patologie epididimarie sono comunemente associate con un aumento della percentuale di spermatozoi con forma anomala. I difetti della morfologia sono di solito misti. Gli spermatozoi anomali generalmente hanno un più basso potenziale di fecondazione, in base alle tipologie di anomalie, e possono contenere anche un DNA alterato. I difetti della morfologia sono stati associati ad un aumento di frammentazione del DNA (Gandini *et al.*, 2000), a un incremento di incidenza di alterazioni strutturali dei cromosomi (Lee *et al.*, 1996), a cromatina immatura (Dadoune *et al.*, 1988) e aneuploidie (Devillard *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003). Notevole importanza, quindi, viene data alla forma della testa, sebbene venga presa in considerazione anche la coda degli spermatozoi (tratto intermedio e principale).

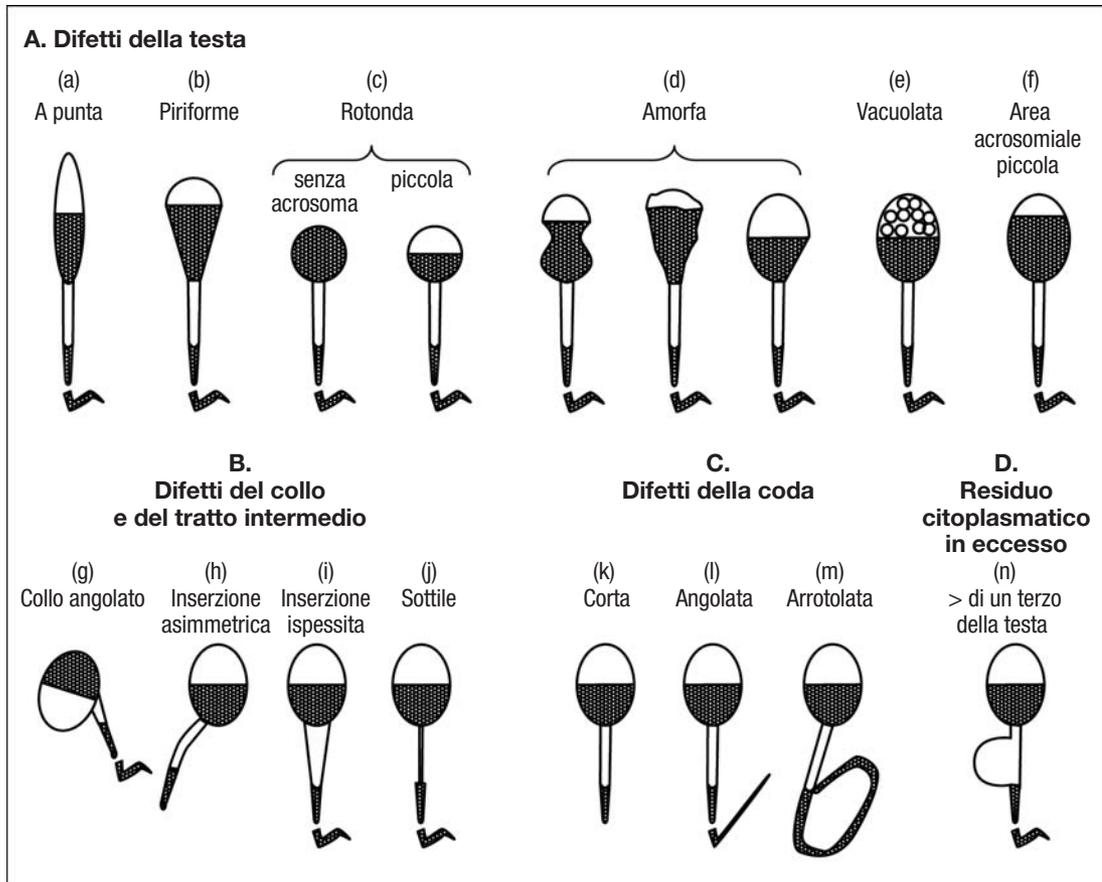
Dovrebbero essere segnalate, le seguenti categorie di difetti (vedi Fig. 2.13).

- Difetti della testa: grande o piccola, a punta, piriforme, rotonda, amorfa, vacuolata (vacuoli >2 o area della testa occupata da aree vacuolari non colorate >20%), vacuoli nella regione post-acrosomiale, acrosoma piccolo o grande (<40% o >70% dell'area della testa), teste doppie o qualsiasi combinazione di queste.
- Difetti del collo e del tratto intermedio: inserzione asimmetrica del tratto intermedio nella testa, tratto intermedio ispessito o irregolare, angolato, eccessivamente sottile o qualsiasi combinazione di queste.
- Difetti del tratto principale: corto, multiplo, rotto, liscio piegato a forcina, fortemente angolato, di spessore irregolare, arrotolato, o qualsiasi combinazione di queste.
- Residui citoplasmatici in eccesso (ERC): questi vengono associati a spermatozoi atipici prodotti da un processo spermatogenetico alterato. Gli spermatozoi caratterizzati da una grande quantità di citoplasma colorato in modo irregolare, che rappresenta un terzo o più della dimensione della testa ed è spesso associato con tratti intermedi alterati (Mortimer, Menkveld, 2001), sono atipici. Questo eccesso di citoplasma dovrebbe essere chiamato goccia citoplasmatica (Cooper, 2005).

Commento 1: Le gocce citoplasmatiche (vescicole legate alla membrana sul tratto intermedio, nella giunzione collo-testa) sono normali componenti degli spermatozoi umani, fisiologicamente funzionali. Se rigonfie, possono estendersi lungo tutto il tratto intermedio, come si può osservare con il microscopio a contrasto di fase, microscopio a contrasto interferenziale differenziale e microscopio a raggi X, in cellule vitali nel liquido seminale, muco cervicale e terreni di coltura (Abraham-Peskir *et al.*, 2002; Fetic *et al.*, 2006).

Commento 2: Le gocce citoplasmatiche sono osmoticamente sensibili e non sono ben conservate dalle procedure di routine di essiccamento all'aria (Chantler, Abraham-Peskir, 2004; Cooper *et al.*, 2004). Non sono evidenti nelle preparazioni colorate, possono presentarsi come piccole dilatazioni del tratto intermedio. Le gocce citoplasmatiche sono meno di un terzo della dimensione della testa dello spermatozoo nelle preparazioni fissate e colorate (Mortimer, Menkveld, 2001) e non vengono considerate atipie.

Fig. 2.13 Disegni schematici di alcune forme atipiche di spermatozoi umani



Adattato da Kruger et al., 1993 e riprodotto con il permesso di MQ Medical.

2.16 Tavole della morfologia 1-14

Tutte le microfotografie delle Tavole 1-14 sono state valutate mediante la rigida applicazione dei criteri morfologici riportati sopra. L'analisi della morfologia nemaspermica è soggettiva e particolarmente difficile da standardizzare, in quanto cerca di tracciare un cut-off artificiale tra le cellule normali e atipiche, sulla base di molteplici caratteristiche della testa e della coda degli spermatozoi. Le tavole che seguono sono state valutate da un singolo esperto, Dr Thinus Kruger. Le valutazioni sono state integrate con ulteriori osservazioni per assicurare l'attendibilità di tutte le atipie riportate.

A fianco di ciascuna tavola a colori c'è una tabella che descrive la valutazione della morfologia di ogni spermatozoo presente nella foto. Le tabelle indicano se la forma

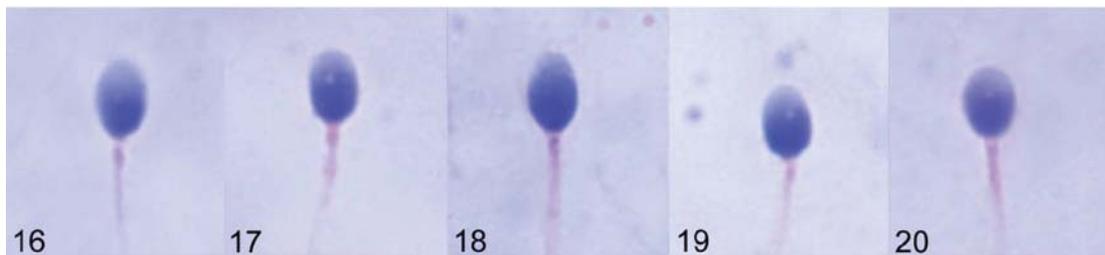
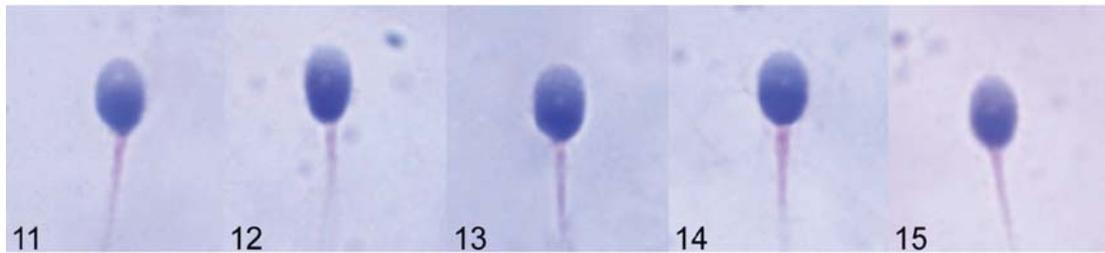
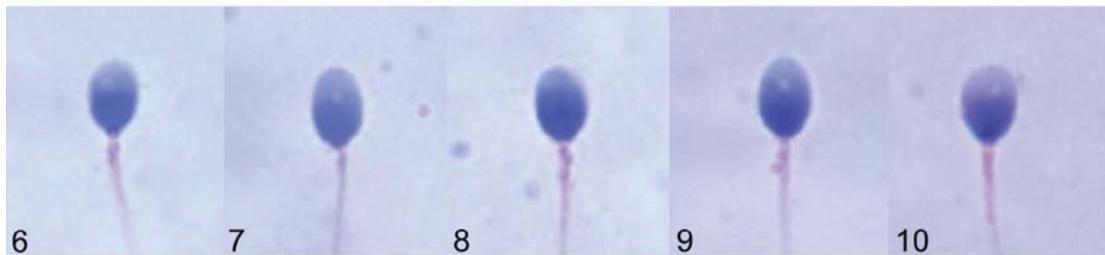
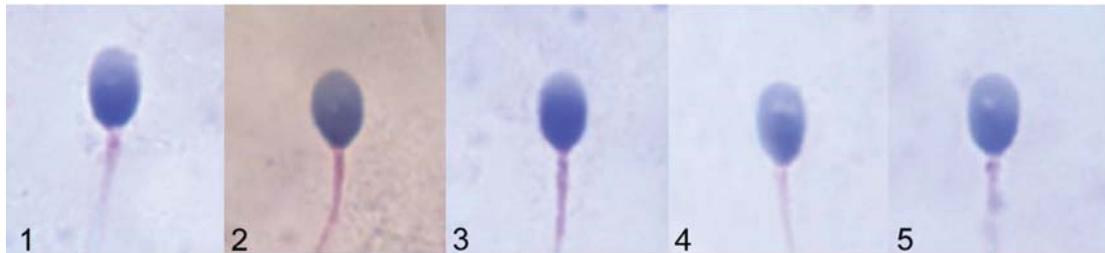
della testa è normale o atipica, forniscono dettagli di alterazioni della testa oltre che nella forma, e indicano se il tratto intermedio o principale è normale nella forma e se lo spermatozoo può essere considerato nel complesso normale. Altre rilevanti osservazioni sono elencate sotto “commenti”. I commenti sono ulteriormente spiegati nella Tabella 2.6.

Tabella 2.6 Spiegazioni utilizzate nei commenti alle Tavole 1–14

acefalie	non sono spermatozoi; non è presente la cromatina
acr <40%	meno del 40% della testa dello spermatozoo è occupata dall'acrosoma
acr >70%	più del 70% della testa dello spermatozoo è occupata dall'acrosoma
ad anello	coda ripiegata su se stessa
amorfa	forma della testa (vedi Fig. 2.13d)
angolata	angolazione acuta innaturale (vedi Fig. 2.13g e j)
a punta	foma della testa (vedi Fig. 2.13a)
arrotolata	auto-esplicativo
atipico	auto-esplicativo
batteri	batteri
CD	goccia citoplasmatica
cellula epiteliale	proveniente dai dotti delle vie genitali maschili
citoplasma	sia residuo citoplasmatico in eccesso o goccia citoplasmatica, in base alla dimensione
difetto	auto-esplicativo
doppia	auto-esplicativo
ERC	residuo citoplasmatico in eccesso (vedi Fig. 2.13n)
fuoco	fuori fuoco (non valutato)
inserzione	il sito di inserzione della coda è di lato rispetto all'asse longitudinale della testa
irreg	contorno irregolare
leucociti degenerati	auto-esplicativo
macrofagi	leucociti macrofagi
monociti	leucociti privi di granuli
no acro	acrosoma assente
non valutato	a causa della sovrapposizione o scarso fuoco
normale	simili a quelli rilevati nel muco endocervicale
osservazione laterale	spermatozoo osservato da un lato
piatto	base della testa dello spermatozoo non ovale
piccola	dimensione della testa
piriforme	forma della testa (vedi Fig. 2.13b)
polimorfo	leucociti polimorfonucleati
rotonda	forma della testa (vedi Fig. 2.13c)
se PP OK	non tutto il tratto principale viene visto nella microfotografia (ma se fosse normale, lo spermatozoo dovrebbe essere considerato tipico)
sovrapposto	teste nascoste dalla coda
spermatidi	cellula germinale immatura
spermatidi degenerati	auto-esplicativo
spermatocita	cellula germinale immatura
spesso	auto-esplicativo
troppo lungo	auto-esplicativo
> un terzo	citoplasma anomalo (più di un terzo della dimensione della testa) (ERC)
< un terzo	citoplasma normale (meno di un terzo della dimensione della testa) (CD)
vac	vacuolo
vac PA	vacuoli nella regione post-acrosomiale
>2 vac	più di 2 vacuoli

Tavola 1

10 micron



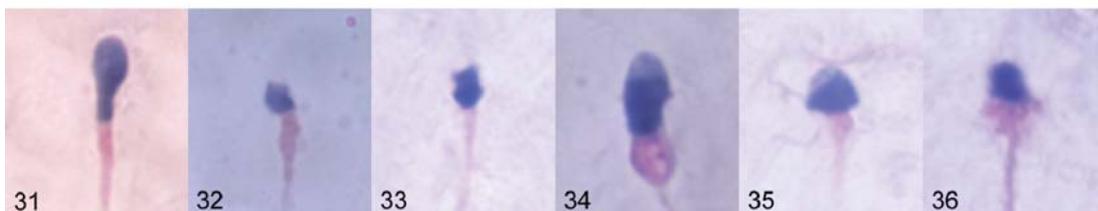
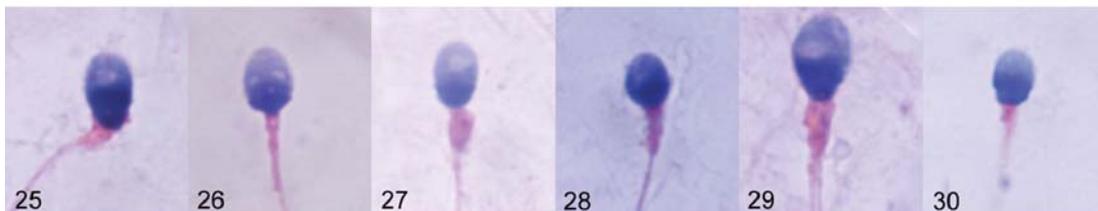
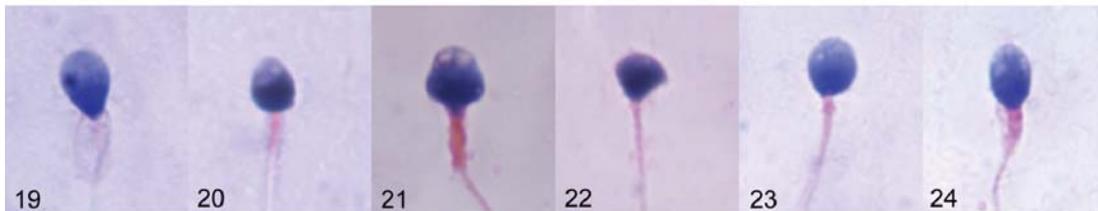
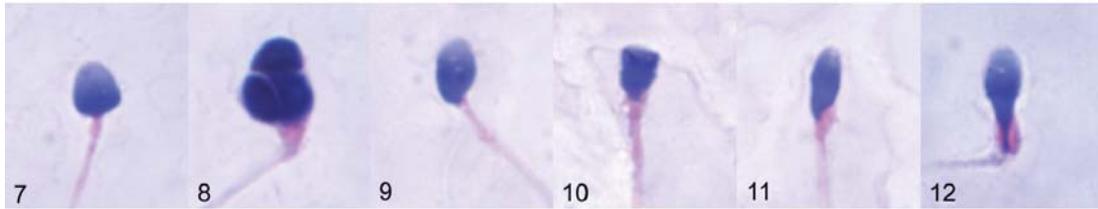
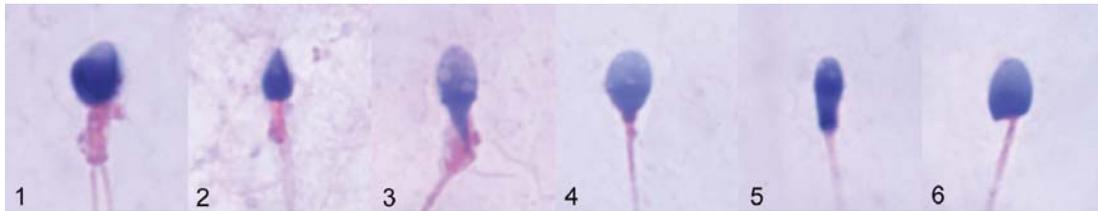
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 1

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	normale		normale		tipico	se PP OK
2	normale		normale		tipico	se PP OK
3	normale		normale		tipico	se PP OK
4	normale		normale		tipico	se PP OK
5	normale		normale		tipico	se PP OK
6	normale		normale		tipico	se PP OK
7	normale		normale		tipico	se PP OK
8	normale		normale		tipico	se PP OK
9	normale		normale		tipico	se PP OK
10	normale		normale		tipico	se PP OK
11	normale		normale		tipico	se PP OK
12	normale		normale		tipico	se PP OK
13	normale		normale		tipico	se PP OK
14	normale		normale		tipico	se PP OK
15	normale		normale		tipico	se PP OK
16	normale		normale		tipico	se PP OK
17	normale		normale		tipico	se PP OK
18	normale		normale		tipico	se PP OK
19	normale		normale		tipico	se PP OK
20	normale		normale		tipico	se PP OK

10 micron

Tavola 2



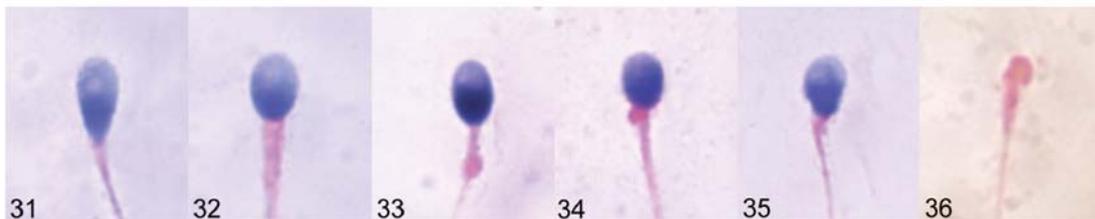
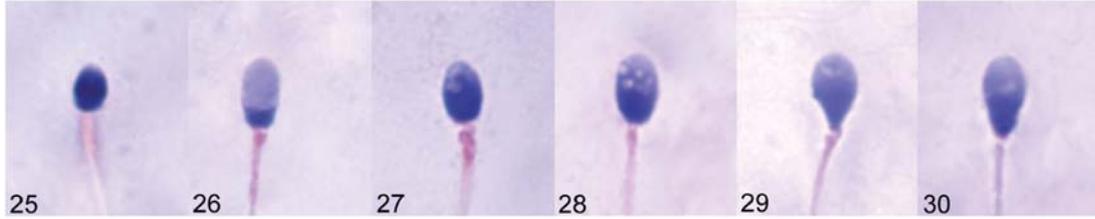
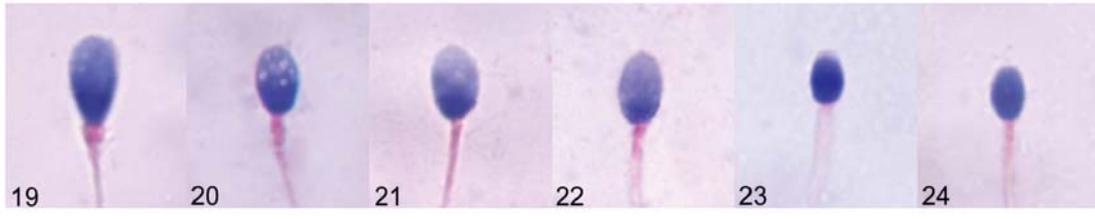
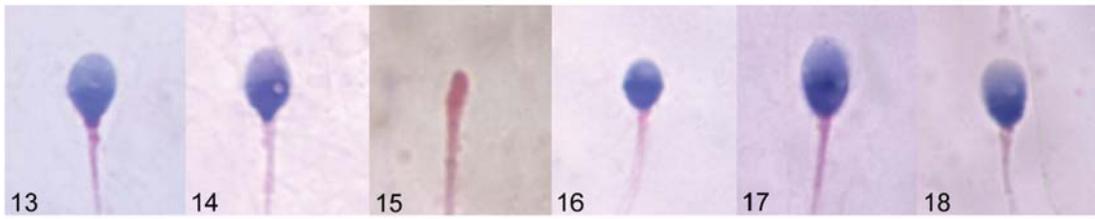
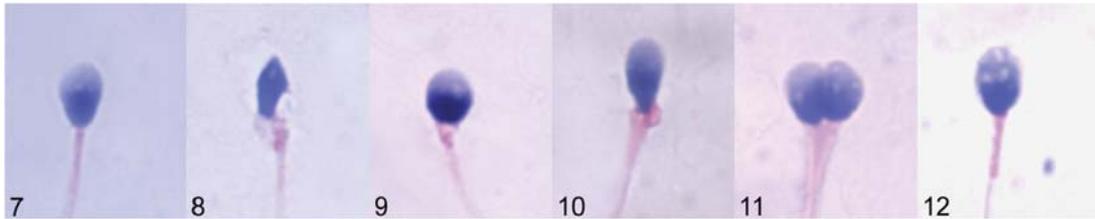
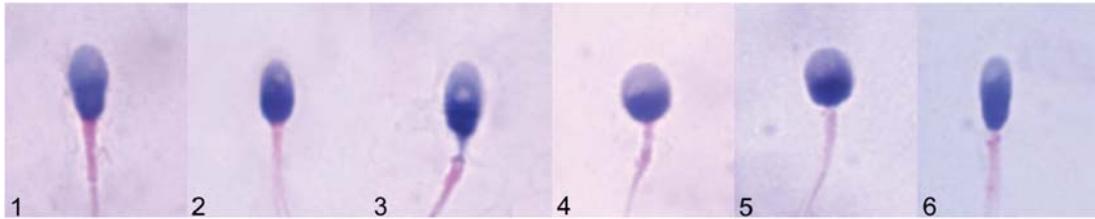
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 2

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	atipica		ispessito	doppio	atipico	
2	atipica		irreg		atipico	visto di lato
3	atipica	piriforme	angolato, irreg, ERC		atipico	> un terzo
4	atipica				atipico	
5	atipica	piriforme			atipico	
6	atipica				atipico	
7	atipica				atipico	
8	atipica		ispessito		atipico	
9	atipica		inserzione		atipico	
10	atipica				atipico	
11	atipica				atipico	
12	atipica	piriforme		angolato	atipico	
13	atipica	>2 vac, vac PA			atipico	
14	atipica		ispessito		atipico	
15	atipica	piriforme	ispessito, ERC		atipico	> un terzo
16	normale	piriforme	ERC		atipico	> un terzo
17	normale	vac PA			atipico	
18	atipica		ispessito, inserzione		atipico	
19	atipica		atipico		atipico	
20	atipica		ispessito		atipico	
21	atipica		ispessito		atipico	
22	atipica				atipico	
23	atipica				atipico	
24	normale	>2 vac	ispessito		atipico	
25	atipica		spesso, angolato		atipico	
26	atipica		ispessito		atipico	
27	atipica	acr >70%	ispessito		atipico	
28	atipica		ispessito		atipico	
29	atipica		ispessito		atipico	
30	atipica		ispessito		atipico	
31	atipica	piriforme	ispessito		atipico	
32	atipica	piccola	ispessito		atipico	
33	atipica	piccola	ispessito		atipico	
34	atipica		ERC		atipico	> un terzo
35	atipica		ispessito		atipico	
36	atipica		ispessito		atipico	

10 micron

Tavola 3



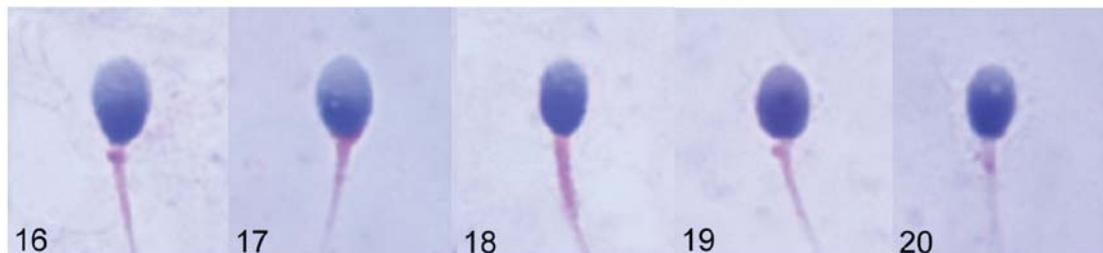
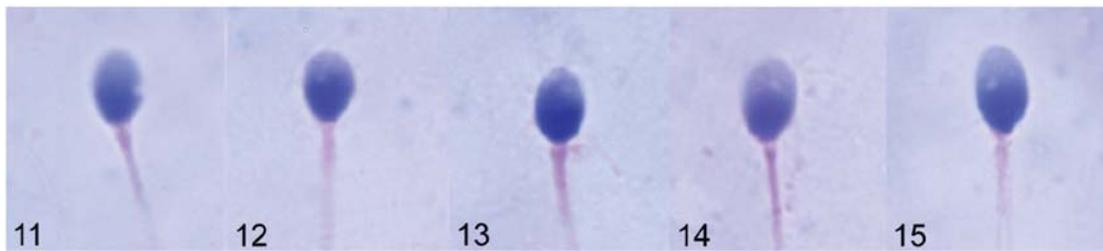
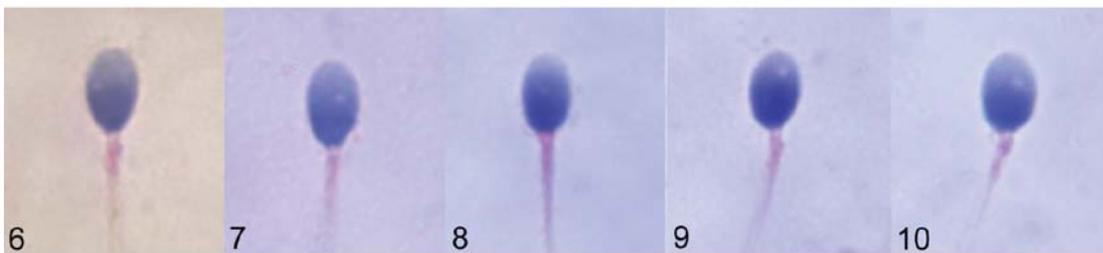
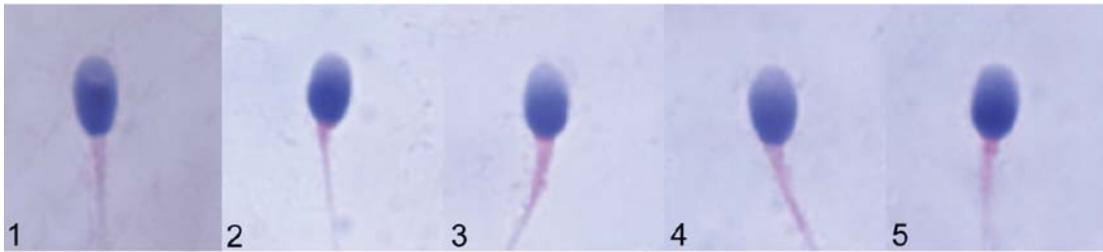
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 3

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	atipica	a punta	ispessito		atipico	
2	atipica				atipico	
3	atipica		irreg		atipico	
4	atipica	rotonda			atipico	
5	atipica	rotonda			atipico	
6	atipica	a punta			atipico	
7	atipica	a punta			atipico	
8	atipica	amorfa	ispessito		atipico	
9	atipica	rotonda	ispessito		atipico	
10	atipica	a punta	irreg, ispessito		atipico	
11	—				—	due cellule
12	atipica	>2 vac, vac PA			atipico	
13	atipica				atipico	
14	normale	vac PA			atipico	
15	—				—	acefalia
16	atipica	piccola			atipico	
17	atipica	grande			atipico	
18	normale		ispessito		atipico	
19	atipica		ispessito		atipico	
20	atipica	>2 vac	inserzione		atipico	
21	normale	acr >70%			atipico	
22	atipica	acr >70%			atipico	
23	atipica	acr <40%, piccola			atipico	
24	atipica	acr <40%, piccola			atipico	
25	atipica	acr <40%, piccola			atipico	
26	atipica	acr >70%			atipico	
27	atipica	acr <40%, >2 vac	irreg		atipico	
28	normale	>2 vac			atipico	
29	atipica	a punta			atipico	
30	atipica	a punta			atipico	
31	atipica	a punta			atipico	
32	normale		ispessito		atipico	
33	normale		ispessito		atipico	
34	atipica	acr <40%	ispessito		atipico	
35	atipica		ispessito, angolato		atipico	
36	—				—	acefalia

Tavola 4

10 micron



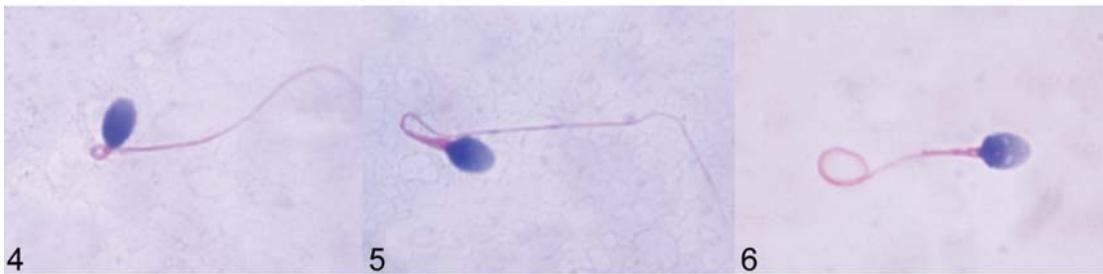
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 4

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	atipica	piatta	ispessito		atipico	
2	normale		ispessito, angolato		atipico	
3	normale		ispessito		atipico	
4	normale		ispessito, angolato		atipico	
5	normale		ispessito		atipico	
6	normale		ispessito		atipico	
7	atipica	irreg			atipico	
8	normale		ispessito		atipico	
9	normale		inserzione, angolato		atipico	
10	normale		ispessito, angolato		atipico	
11	atipica	vac PA			atipico	
12	atipica				atipico	
13	atipica	acr <40%, >2 vac	ispessito		atipico	
14	normale		irreg		atipico	
15	normale		inserzione		atipico	
16	normale		ispessito		atipico	
17	normale		inserzione, ispessito		atipico	
18	normale		ispessito, troppo lungo		atipico	
19	normale	acr <40%	inserzione		atipico	
20	normale	acr <40%	irreg		atipico	

Tavola 5

10 micron



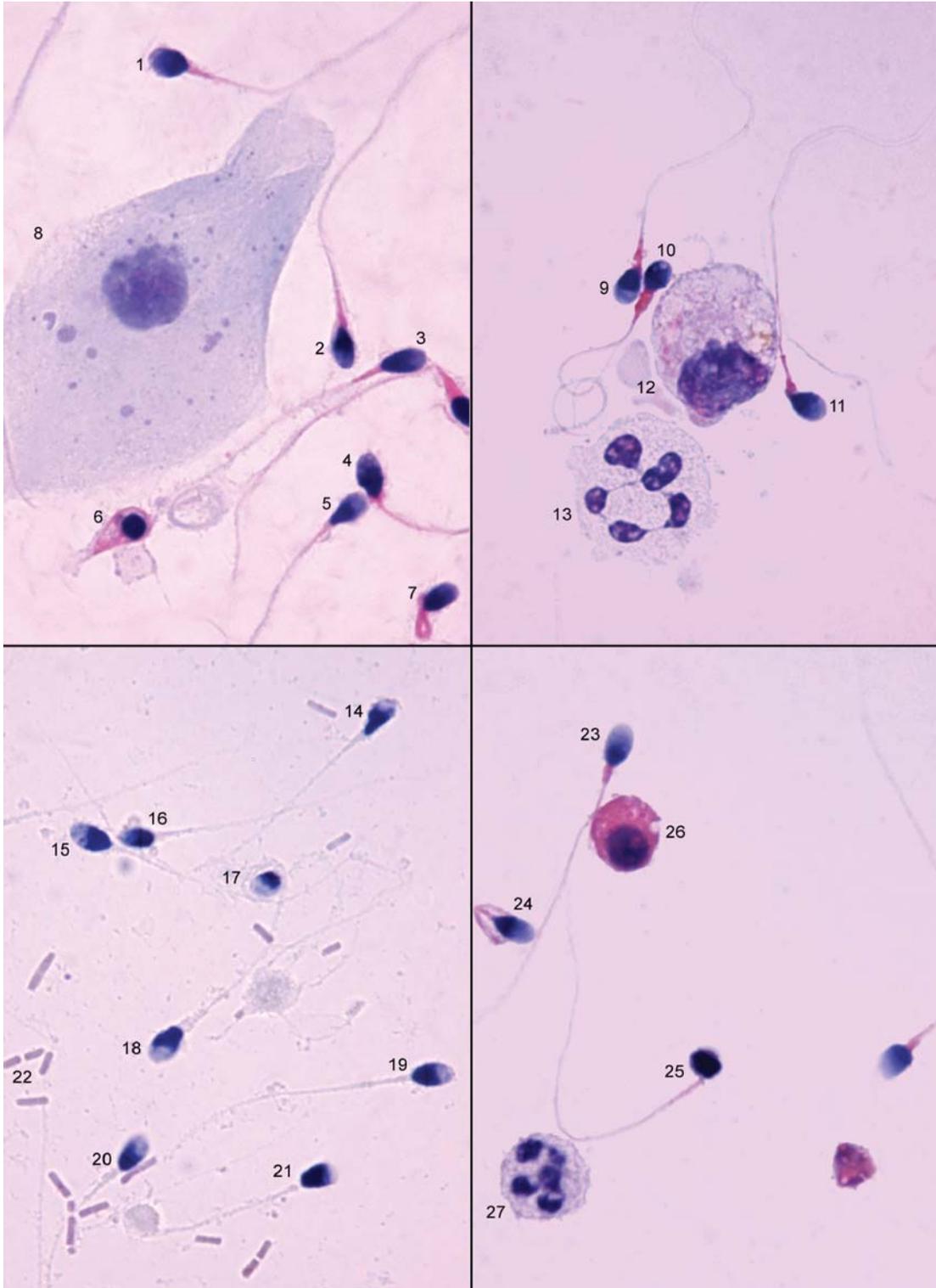
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 5

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	atipica		ERC		atipico	> un terzo
2	normale		angolato	normale	atipico	
3	atipica	acr >70%		ad anello	atipico	
4	normale		angolato	normale	atipico	
5	normale		ispessito	ad anello	atipico	
6	atipica	vac PA		arrotolato/ rigonfio	atipico	
7	normale				tipico	
8	normale			doppio	atipico	
9	atipica			arrotolato	atipico	
10	atipica		angolato, inserzione	arrotolato/ rigonfio	atipico	
11	normale		ispessito	angolato	atipico	
12	normale		angolato	normale	atipico	

10 micron

Tavola 6



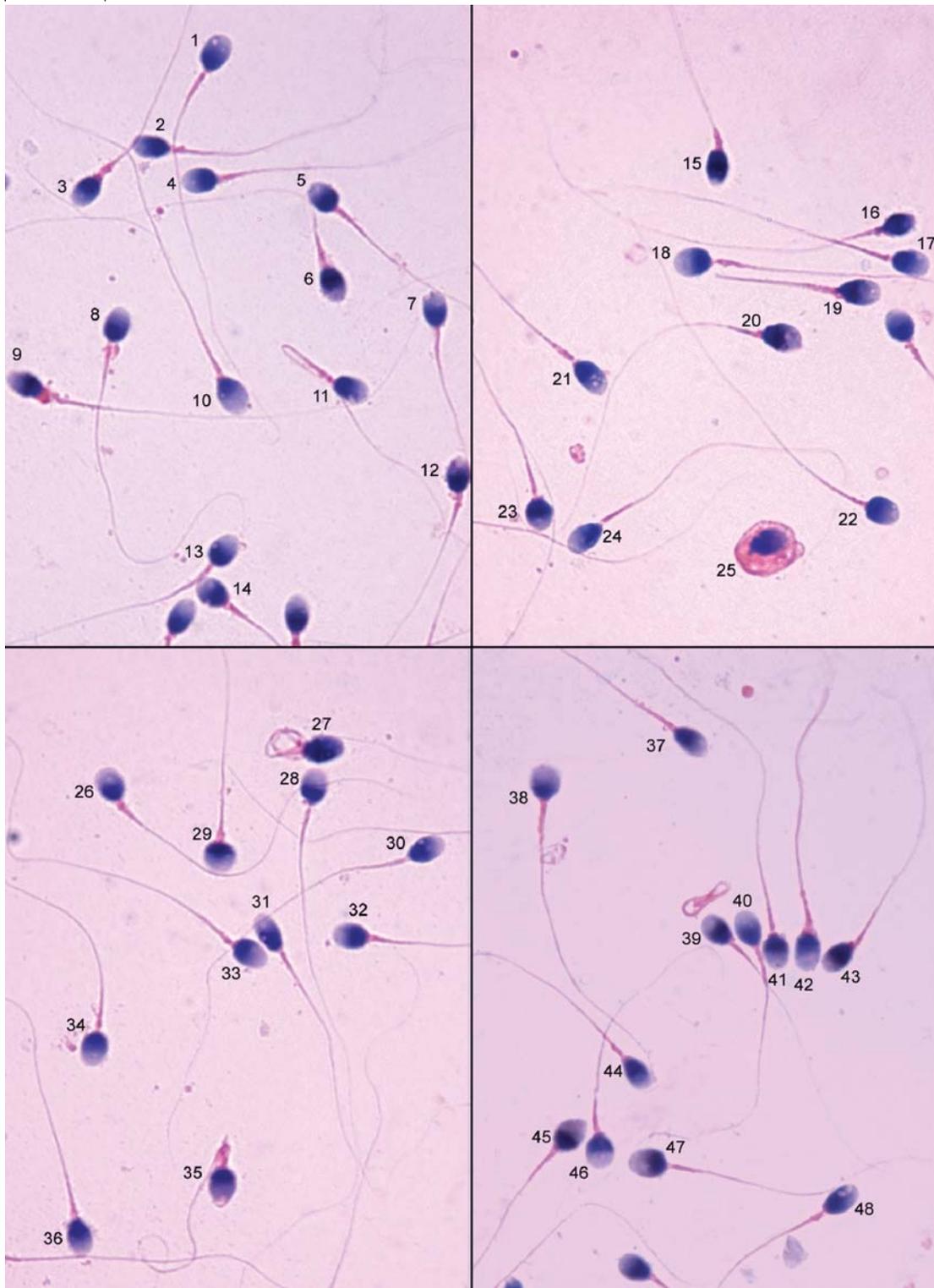
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 6

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	normale	acr <40%	ispessito	normale	atipico	
2	normale		ispessito		atipico	
3	normale				tipico	
4	atipica		ispessito		atipico	
5	atipica	a punta			atipico	
6					non classificabile	spermatozoo atipico
7	atipica		ispessito	arrotondato/ rigonfio	atipico	
8						cellula epiteliale
9	normale		ispessito, inserzione		atipico	
10	atipica	acr <40%	ispessito		atipico	
11	normale		ispessito		atipico	
12						macrofago degenerato?
13						polimorfo-nucleato
14	atipica	piriforme			atipico	
15	normale				tipico	
16	atipica	acr <40%			atipico	
17	atipica	rotonda		non visibile	atipico	testa isolata?
18	atipica		ispessito		atipico	
19	normale				tipico	
20	normale				tipico	se PP OK
21	atipica	piatta			atipico	
22						batteri
23	normale		ispessito		atipico	
24	normale		ispessito	arrotondato/ rigonfio	atipico	
25	atipica	amorfa			atipico	
26						spermatide
27						polimorfo-nucleato

10 micron

Tavola 7



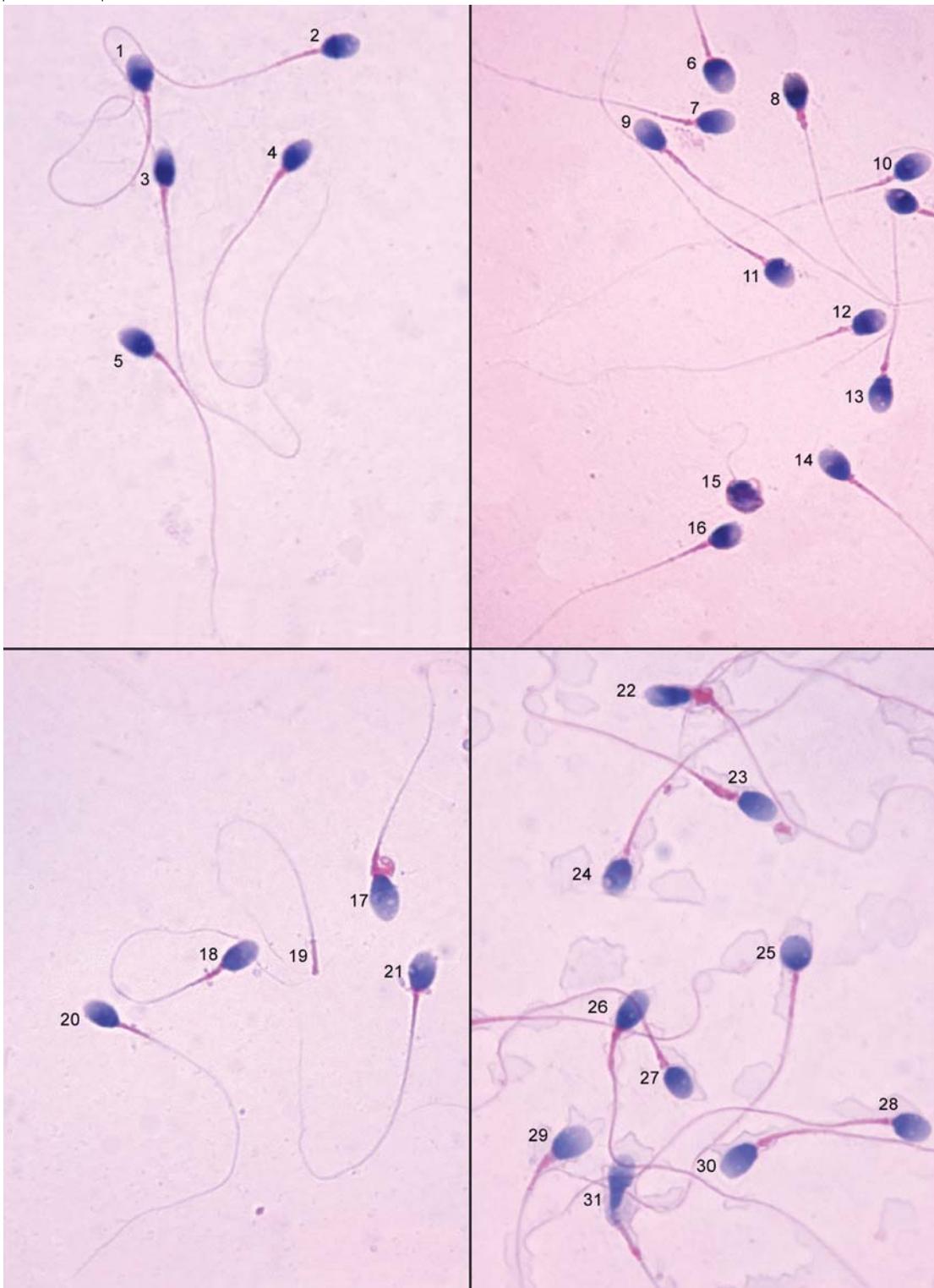
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 7

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	normale	2 vac			tipico	
2	normale				tipico	
3	normale		ispessito		atipico	
4	normale				tipico	
5	normale				tipico	se PP OK
6	normale		ispessito		atipico	
7	normale	vac sulla superficie			tipico	
8	normale		CD		tipico	< un terzo
9	atipica		ispessito, ERC		atipico	> un terzo
10	normale				tipico	
11	normale	vac PA		ad anello	atipico	
12	normale				tipico	se PP OK
13	normale	vac PA			atipico	
14	normale	vac PA			atipico	
15	atipica	acr <40%	ispessito		atipico	
16	atipica	acr <40%			atipico	
17	normale				tipico	
18	normale				tipico	se PP OK
19	normale		ispessito	corto	atipico	
20	atipica		ispessito		atipico	
21	normale	>2 vac			atipico	
22	atipica	rotonda			atipico	
23	atipica	rotonda			atipico	
24	normale				tipico	
25						testa nemaspermica nel citoplasma?
26	normale				tipico	
27	normale	no acro		arrotolato	atipico	
28	normale				tipico	
29	atipica	rotonda			atipico	
30	normale	vac PA			atipico	
31	atipica	a punta, vac PA			atipico	
32	normale				tipico	se PP OK
33	normale				tipico	
34	normale				tipico	se PP OK
35	atipica		ispessito	angolato	atipico	
36	normale				tipico	se PP OK
37	normale				tipico	se PP OK
38	atipica	rotonda			atipico	
39	normale				tipico	
40	normale				tipico	
41	normale				tipico	
42	normale		ispessito		atipico	
43	normale	acr <40%			atipico	
44		fuori fuoco				non valutabile
45	atipica	rotonda			atipico	
46	atipica	rotonda			atipico	
47	normale				tipico	
48	normale				tipico	se PP OK

10 micron

Tavola 8



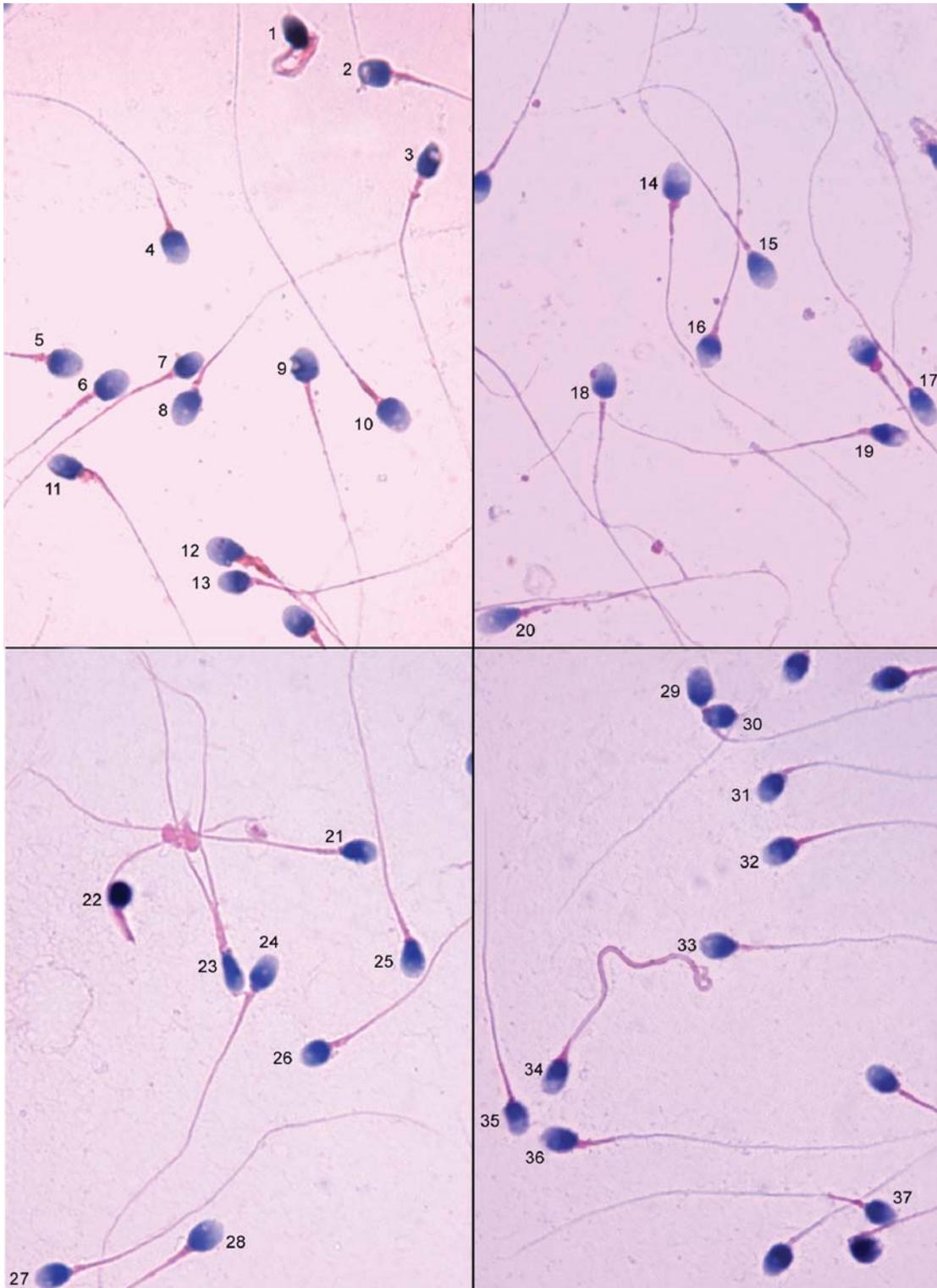
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 8

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	normale			normale	tipico	
2	normale	>2 vac		normale	atipico	
3	atipica	a punta			atipico	
4	normale			normale	tipico	
5	normale				tipico	
6	normale				tipico	se PP OK
7	normale				tipico	se PP OK
8	normale		ispessito		atipico	
9	normale				tipico	
10	normale				tipico	
11	normale	vac PA			atipico	
12	normale				tipico	
13	atipica				atipico	
14	normale				tipico	se PP OK
15	atipica	amorfa		alterato	atipico	
16	normale				tipico	se PP OK
17	atipica	acr >70%	ispessito, ERC		atipico	> un terzo
18	normale				tipico	
19						acefalia
20	normale				tipico	
21	normale	vac PA			atipico	
22	atipica	a punta	ispessito, ERC		atipico	> un terzo
23	atipica	piatta	ispessito		atipico	
24	normale	>2 vac			atipico	
25	atipica	rotonda			atipico	
26	normale		ispessito		atipico	
27	normale		ispessito		atipico	
28	normale	>2 vac, acr >70%			atipico	
29	atipica				atipico	
30	normale	acr >70%			atipico	
31	atipica	piriforme			atipico	

10 micron

Tavola 9



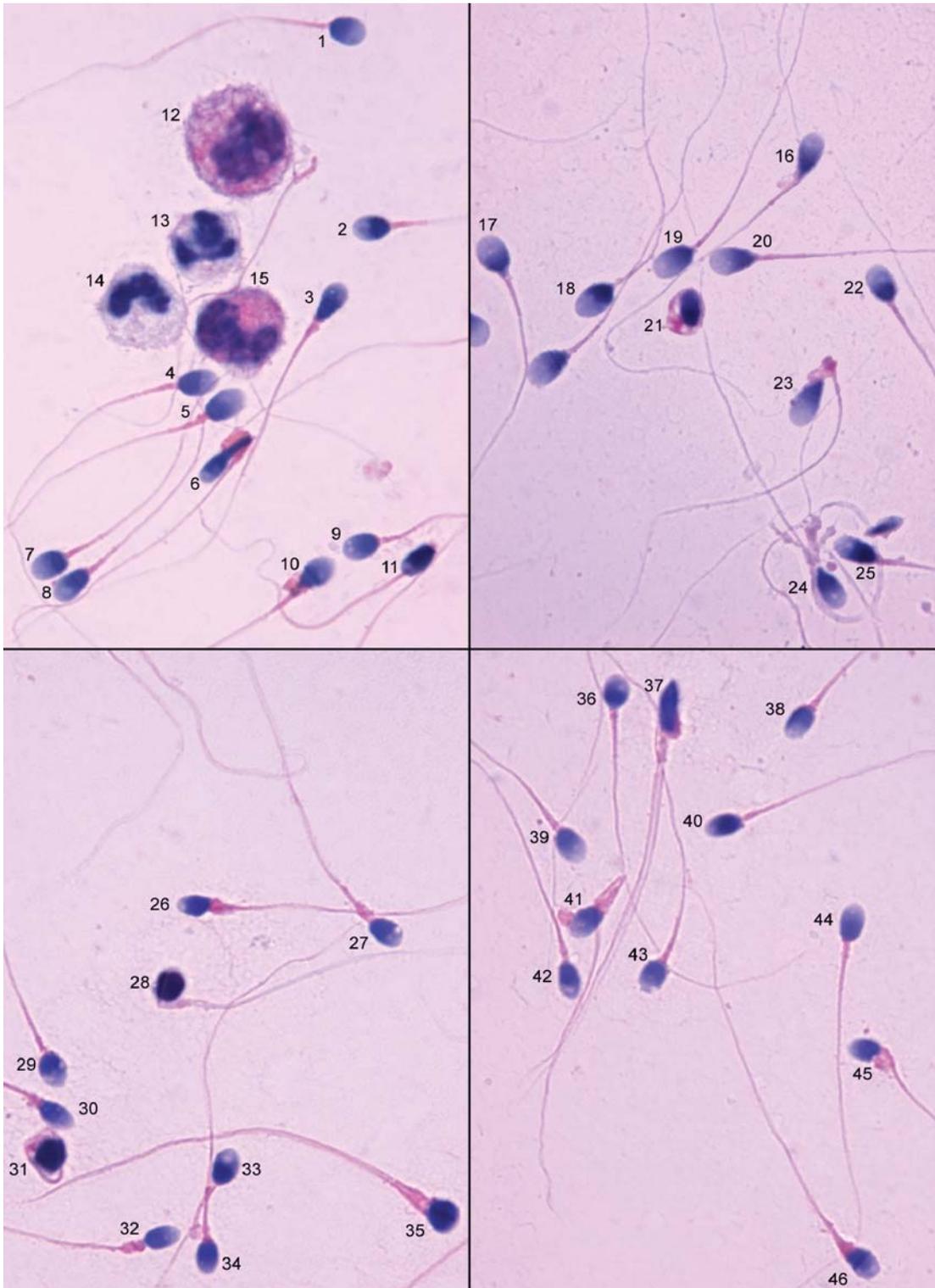
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 9

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	atipica			arrotolato	atipico	
2		sovrapposta				non valutabile
3	atipica	acr <40%			atipico	
4	normale				tipico	se PP OK
5	normale				tipico	se PP OK
6	normale	acr >70%	inserzione		atipico	
7	normale		inserzione		atipico	
8	normale	acr >70%	inserzione		atipico	
9	atipica	vac PA			atipico	
10	normale	>2 vac	ispessito		atipico	
11	atipica		ispessito, ERC		atipico	> un terzo
12	atipica		ispessito, inserzione, ERC		atipico	> un terzo
13	normale				tipico	se PP OK
14	atipica		ispessito		atipico	
15	normale			normale	tipico	
16	atipica				atipico	
17	atipica	a punta, 3 vac, vac PA			atipico	
18	normale				tipico	
19	atipica	vac >20%			atipico	
20	atipica	a punta			atipico	
21	normale	vac PA			atipico	
22	atipica	amorfa		angolato	atipico	
23	atipica	a punta		doppio	atipico	
24	atipica	vac PA			atipico	
25	normale	>2 vac			atipico	
26	normale				tipico	se PP OK
27	normale				tipico	
28	normale				tipico	se PP OK
29		sovrapposta				non valutabile
30		sovrapposta				non valutabile
31	normale				tipico	se PP OK
32	normale				tipico	se PP OK
33	normale				tipico	se PP OK
34	normale		ispessito	ispessito, arrotolato	atipico	
35	atipica	1 lato non ovale			atipico	
36	normale	acr <40%			atipico	
37		sovrapposta				non valutabile

10 micron

Tavola 10



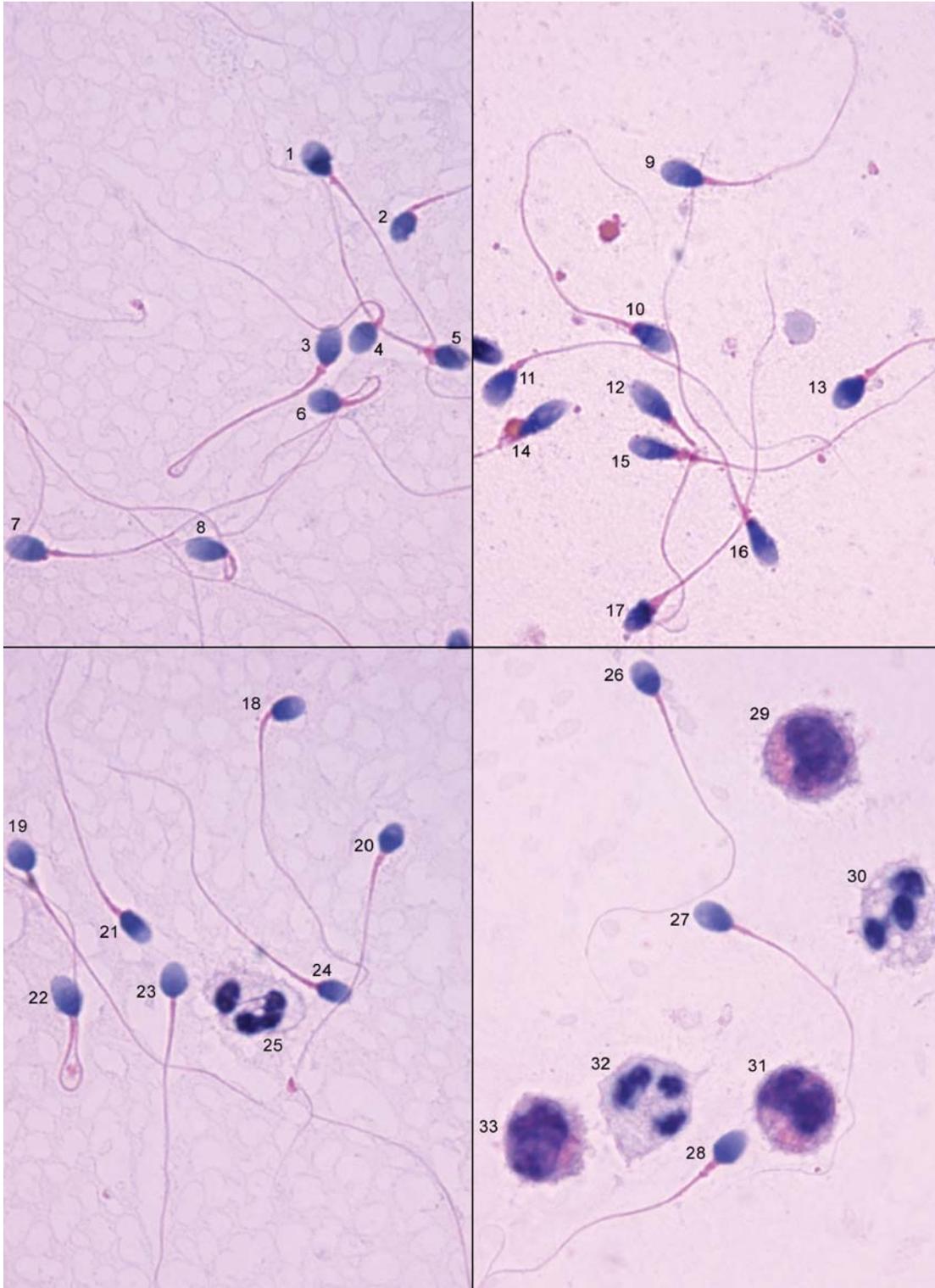
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 10

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	normale		inserzione		atipico	
2	normale				tipico	se PP OK
3	atipica	piriforme			atipico	
4	normale				tipico	
5	normale		ispessito		atipico	
6	atipica	piriforme	ERC	angolato	atipico	> un terzo
7	normale				tipico	
8	normale				tipico	
9	normale	3 vac			atipico	
10	atipica	a punta	ispessito, ERC		atipico	> un terzo
11	atipica	a punta, acr <40%		angolato	atipico	
12						monocita
13						polimorfonucleato
14						polimorfonucleato
15						monocita
16	atipica	a punta			atipico	
17	normale				tipico	se PP OK
18	normale				tipico	
19	normale				tipico	
20	normale				tipico	se PP OK
21	atipica	amorfa			atipico	
22	normale				tipico	se PP OK
23	atipica	a punta	ispessito	angolato	atipico	
24		sovrapposta				non valutabile
25	atipica	a punta			atipico	
26	atipica	amorfa	ispessito, ERC		atipico	> un terzo
27	normale		ispessito		atipico	
28	atipica	amorfa	ispessito		atipico	
29	atipica	vac PA			atipico	
30	atipica		ispessito		atipico	
31	atipica		ispessito	arrotolato/ rigonfio	atipico	
32	normale		ispessito		atipico	
33		sovrapposta				non valutabile
34		sovrapposta				non valutabile
35	atipica	amorfa, no acro	ispessito		atipico	
36	normale	acr <40%			atipico	
37	atipica	piriforme	ispessito	doppio	atipico	
38	normale				tipico	se PP OK
39	normale		ispessito		atipico	
40	atipica	acr <40%			atipico	
41	atipica		ispessito	angolato	atipico	
42	normale				tipico	se PP OK
43	normale	2 vac, acr <40%			atipico	
44	normale				tipico	
45	atipica		ispessito, ECR		atipico	> un terzo
46	atipica		ispessito		atipico	

10 micron

Tavola 11



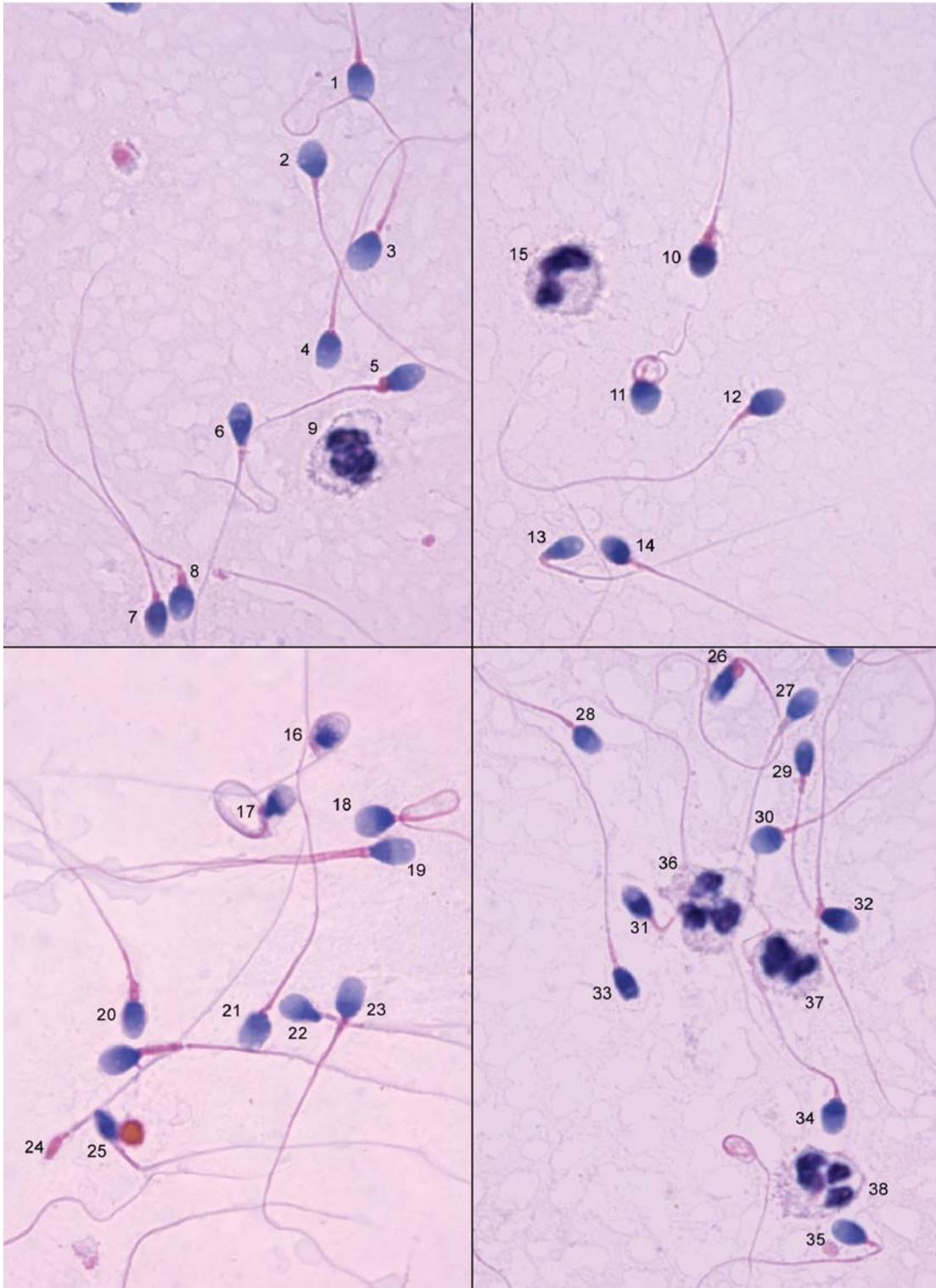
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 11

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	atipica		inserzione		atipico	
2	atipica		inserzione		atipico	
3	normale		ispessito	ad anello	atipico	
4	normale				tipico	
5	atipica	>2 vac, acr <40%	ispessito		atipico	
6	normale			ad anello	atipico	
7	atipica		inserzione		atipico	
8	normale			ad anello	atipico	
9	atipica	acr >70%, a punta			atipico	
10	atipica	a punta			atipico	
11	normale		ispessito		atipico	
12	atipica	a punta			atipico	
13	normale	acr<40%	ispessito		atipico	
14	atipica	a punta	ispessito, ERC		atipico	> un terzo
15	atipica	a punta	ispessito		atipico	
16	atipica	a punta			atipico	
17	atipica	amorfa	ispessito		atipico	
18	normale				tipico	
19	normale				tipico	
20	atipica				atipico	
21	atipica				atipico	
22	normale	acr >70%		ad anello	atipico	
23	normale				tipico	
24	normale				tipico	
25						polimorfo-nucleati
26	normale				tipico	
27	normale				tipico	
28	normale	acr >70%			atipico	
29						monociti
30						polimorfo-nucleati
31						monociti
32						polimorfo-nucleati
33						monociti

10 micron

Tavola 12



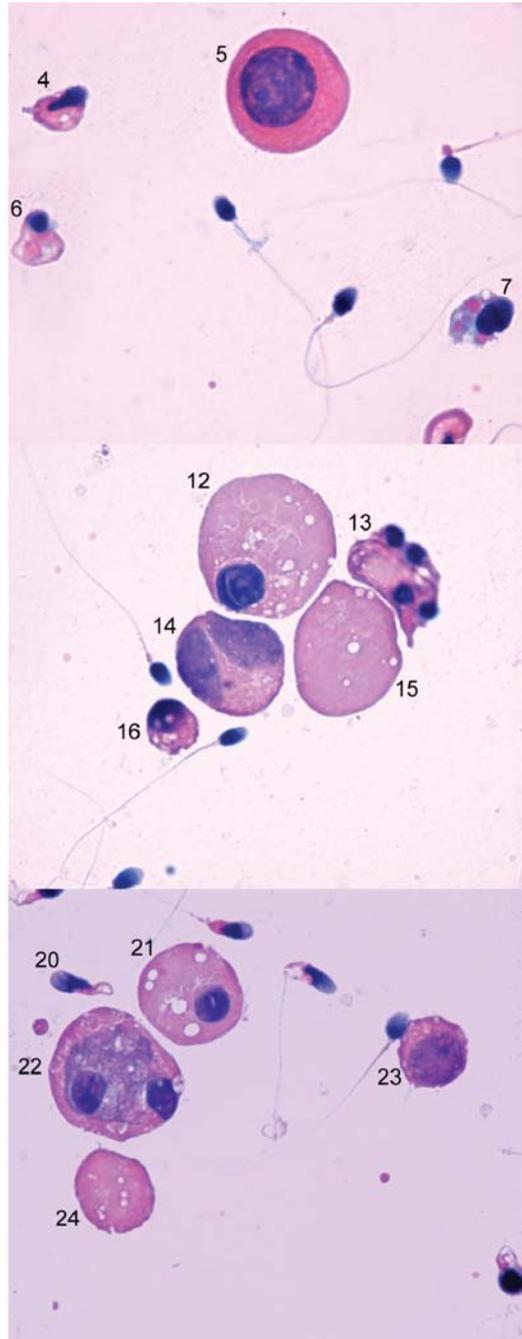
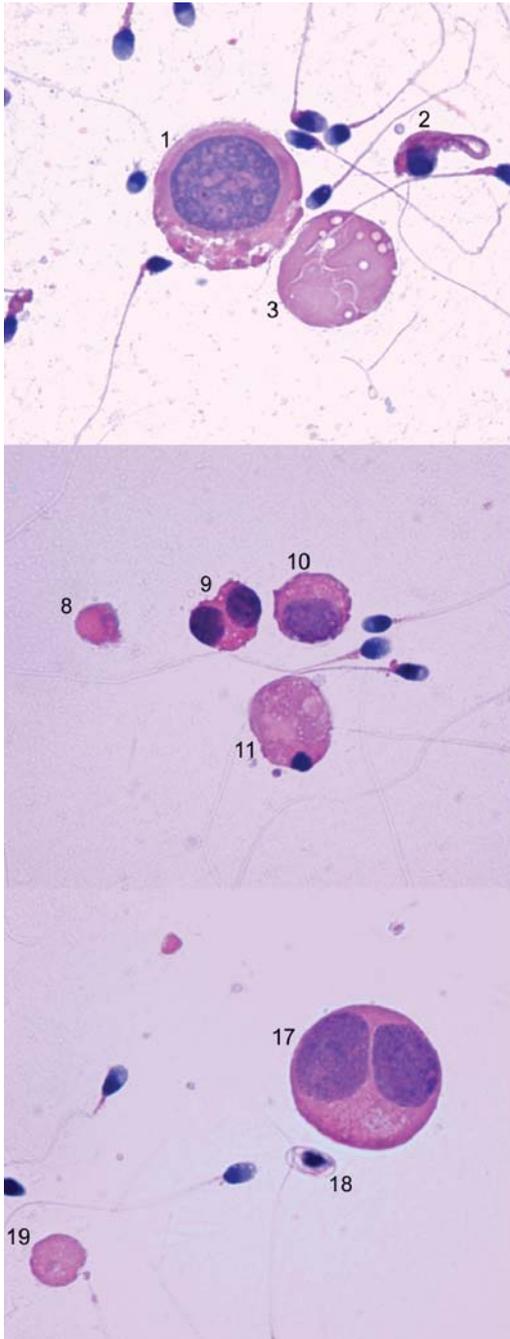
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 12

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	normale	acr >70%			atipico	
2	atipica				atipico	
3	atipica	acr >70%			atipico	
4	normale				tipico	se PP OK
5	atipica		ispessito		atipico	
6	atipica	a punta			atipico	
7		non a fuoco	ispessito			non valutabile
8	atipica		ispessito, angolato		atipico	
9						leucocita degenerato
10	atipica		ispessito		atipico	
11	atipica	rotonda		arrotolato	atipico	
12	normale				tipico	
13	atipica	a punta	angolato		atipico	
14	atipica		inserzione		atipico	
15						polimorfonucleato
16	atipica	amorfa			atipico	
17	atipica			arrotolato/rigonfio	atipico	
18	atipica		ispessito	arrotolato/rigonfio	atipico	
19	normale			doppio	atipico	
20	atipica		ispessito		atipico	
21		sovrapposta				non valutabile
22	atipica	piriforme			atipico	
23	normale				tipico	
24	atipica				atipico	acefalie
25	atipica	amorfa		angolato	atipico	
26	atipica	amorfa	ispessito, angolato		atipico	
27	normale		ispessito		atipico	
28	normale				tipico	se PP OK
29	atipica	a punta			atipico	
30	atipica	rotonda			atipico	
31	normale		angolato	sovrapposto		non valutabile
32	normale		ispessito, angolato		atipico	
33	atipica				atipico	
34	atipica				atipico	
35	normale		angolato		atipico	
36						polimorfonucleato
37						polimorfonucleato
38						polimorfonucleato

Tavola 13

15 micron



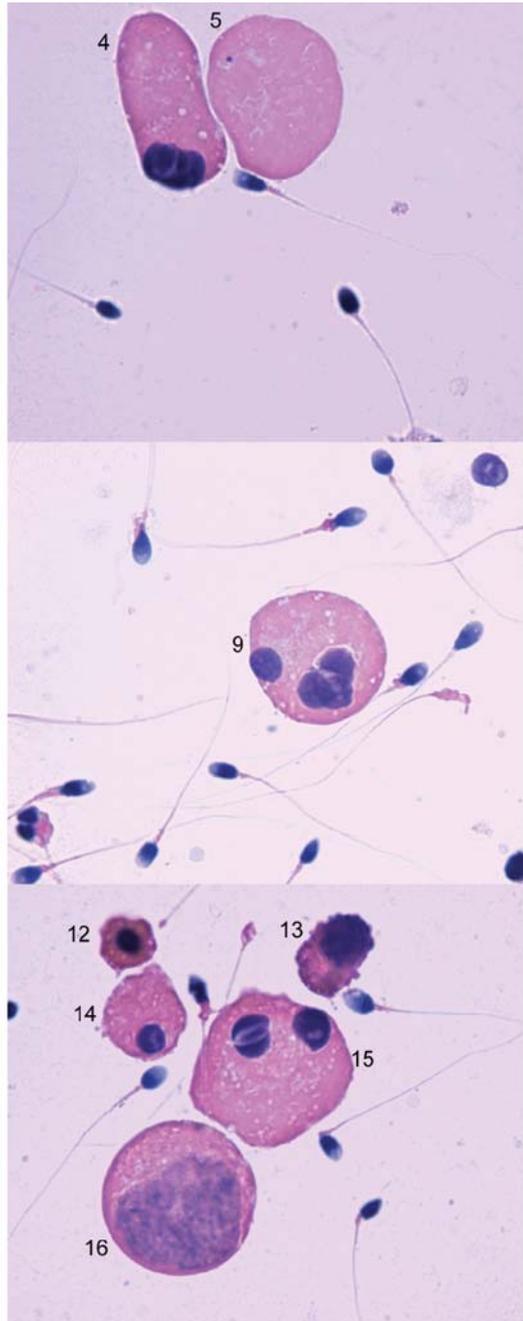
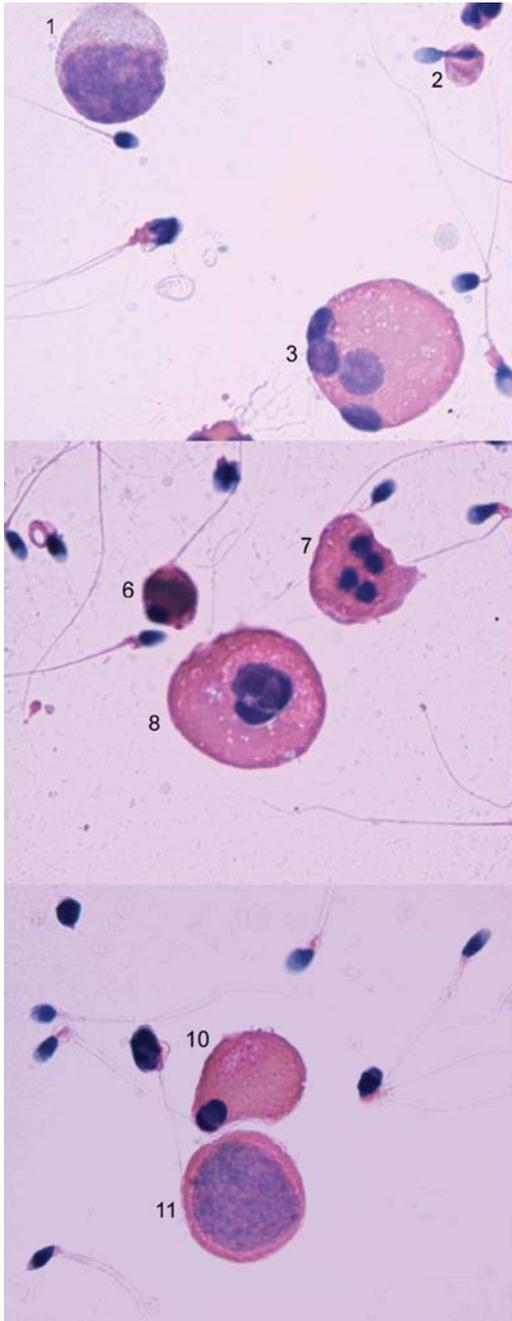
Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 13

Cellula	Tipo cellulare
1	macrofago
2	spermatozoo atipico
3	citoplasma
4	spermatozoo atipico
5	spermatocita
6	spermatozoo atipico
7	spermatozoo atipico? Testa isolata nel citoplasma?
8	citoplasma
9	spermatide in divisione
10	spermatocita
11	spermatide degenerato
12	spermatide
13	spermatide degenerato
14	spermatocita in divisione
15	citoplasma
16	spermatide degenerato
17	spermatocita in divisione
18	spermatozoo atipico
19	citoplasma
20	spermatozoo atipico
21	spermatide
22	macrofago in fagocitosi
23	spermatocita
24	citoplasma

Tavola 14

15 micron



Microfotografie gentilmente concesse da C Brazil.

Valutazione della morfologia nemaspermica della Tavola 14

Cellula	Tipo cellulare
1	macrofago
2	spermatozoo atipico
3	spermatide (in divisione)
4	spermatide (in divisione)
5	citoplasma
6	non classificabile
7	spermatide degenerato
8	spermatide degenerato?
9	spermatide degenerato
10	spermatide degenerato
11	macrofago
12	spermatide degenerato
13	spermatide degenerato
14	spermatide degenerato
15	spermatide degenerato
16	macrofago

2.17 Analisi morfologica di uno striscio di liquido seminale

2.17.1 Valutazione della normale morfologia degli spermatozoi

Può essere sufficiente per determinare la percentuale di spermatozoi normali. Mediante questo paradigma di valutazione della morfologia vengono considerate le regioni funzionali dello spermatozoo. Non è necessario distinguere tutte le variazioni nella forma e dimensione della testa o i difetti del segmento intermedio e/o del segmento principale.

La valutazione della morfologia deve essere effettuata sistematicamente su ogni spermatozoo valutabile in diversi campi del vetrino al fine di prevenire selezioni di particolari spermatozoi.

- Esaminare il vetrino usando un microscopio a campo chiaro, ad immersione ad olio, ad ingrandimento 1.000x.
- Valutare tutti gli spermatozoi per campo spostandosi da un campo visivo ad un altro.
- Valutare almeno 200 spermatozoi in ogni replicato al fine di ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.5)
- Annotare il numero di spermatozoi normali e atipici con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.

- Ripetere la valutazione di almeno 200 spermatozoi, preferibilmente sul vetrino replicato ma in alternativa sullo stesso vetrino.
- Confrontare le percentuali delle forme morfologicamente normali delle due valutazioni indipendenti.
- Calcolare la media e la differenza delle due percentuali di forme normali dei replicati.
- Determinare l'accettabilità della differenza rispetto alla Tabella 2.1 o alla Figura A7.2, Appendice 7 (ciascuna mostra la differenza massima tra due percentuali che dovrebbe verificarsi nel 95% dei campioni per il solo effetto della variabilità casuale).
- Se la differenza tra le percentuali è accettabile, riportare la percentuale media di morfologia normale. Se la differenza è troppo alta, ripetere la valutazione sugli stessi vetrini (vedi Riquadro 2.6).
- Arrotondare la percentuale media di forme normali al numero intero più vicino.

Nota 1: Valutare solo spermatozoi integri, definiti come aventi una testa e una coda (vedi Sezione 2.7.3), in quanto solo gli spermatozoi integri vengono contati per calcolare la concentrazione degli spermatozoi. Non contare le cellule germinali immature (rotonde).

Nota 2: Non valutare gli spermatozoi sovrapposti né quelli che si trovano con la testa vicino al bordo perché non possono essere valutati in maniera adeguata. Questi ultimi non dovrebbero essere presenti in un vetrino correttamente allestito (vedi Sezione 2.13.2.1) ma può accadere quando sono presenti detriti ed una grande quantità di materiale particolato (per esempio in caso di estrema viscosità del seme; vedi Sezione 2.13.2.3). Questi campioni dovrebbero essere lavati (vedi Sezione 2.13.2.4) e i vetrini esaminati dopo la colorazione.

2.17.2 Esempi pratici

Esempio 1. Le percentuali di spermatozoi con normale morfologia in conte replicate di 200 nemaspermi sono 18 e 9. La media arrotondata è 14% e la differenza 9%. Dalla Tabella 2.1, si nota che per una media del 14% ci si può attendere una differenza fino al 7% anche solo per effetto della sola variabilità casuale. Quando la differenza osservata eccede tale limite i risultati devono essere eliminati e i vetrini riallestiti e rivalutati in replicato.

Esempio 2. Le percentuali di spermatozoi con normale morfologia in conte ripetute di 200 nemaspermi sono 10 e 14. La media arrotondata è quindi 12% e la differenza è 4%. Dalla Tabella 2.1 si evince che per una media del 12% ci si può attendere una differenza fino al 7% anche solo per effetto della sola variabilità casuale. Quando la differenza osservata è minore di tale valore i risultati saranno accettati e il valore medio riferito sarà, in questo caso, del 12% di forme normali.

2.17.3 Limite di riferimento inferiore

Il limite inferiore per le forme normali è del 4% (5° percentile, 95% IC 3.0-4.0).

Commento: Il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato è biologicamente importante. Si ottiene moltiplicando il numero totale di nemaspermi dell'eiaculato (vedi Sezione 2.8.7) con la percentuale di forme normali.

2.17.4 Valutazione della morfologia degli spermatozoi atipici

Classificare tutte le forme atipiche di spermatozoi può essere utile a fini diagnostici o di ricerca. Se si desidera, annotare la natura dei difetti e calcolare la percentuale di nemaspermi atipici con difetti della testa (%T), del tratto intermedio (%I), del tratto principale (%P) o, infine, quelli con residui citoplasmatici in eccesso (%RC).

Può essere utilizzato un contatore multiplo con un pulsante per i normali, uno per gli atipici e uno per ciascuna delle quattro categorie di atipie (T, I, P, RC). Questo metodo permette di contare ogni spermatozoo una volta sola e di contare ciascuna delle atipie separatamente.

- Dalla valutazione finale di 400 spermatozoi è possibile ottenere la percentuale di nemaspermi tipici ed atipici (le due categorie devono raggiungere il 100%), così come la percentuale di ciascun tipo di atipia, per esempio: %T %I %P e %RC (in questo caso non si raggiungerà il 100%).
- La percentuale di spermatozoi di ciascuna di queste categorie di atipie si ottiene dividendo il numero totale dei nemaspermi atipici con un difetto specifico per il totale dei nemaspermi normali e atipici e moltiplicando il risultato per 100. Questi valori possono anche essere usati per calcolare gli indici di atipie multiple (vedi Sezione 3.1).

2.17.5 Esempi

Esempio. Di 200 spermatozoi contati con un contatore a sei chiavi per replicato 1, 42 nemaspermi risultano tipici e 158 atipici. Dei 158 atipici, 140 hanno difetti della testa, 102 hanno difetti del segmento intermedio, 30 del segmento principale e 44 hanno residui citoplasmatici in eccesso. Del replicato 2, vi sono 36 spermatozoi normali e 164 atipici di cui 122 hanno difetti della testa, 108 del segmento intermedio, 22 del segmento principale e 36 residui citoplasmatici in eccesso.

Solo la categoria dei tipici viene confrontata per valutare l'accettabilità dei replicati. Il replicato 1 presenta il 21% di spermatozoi normali ed il replicato 2 ne ha il 18%. La media è del 19.5% (arrotondato per eccesso al 20%) e la differenza fra i due è 3%. Dalla Tabella 2.1, si vede come, per una media del 20%, ci si può aspettare una differenza fino ad 8% anche solo per effetto della sola variabilità casuale. Poiché la differenza osservata risulta minore di tale valore, i risultati possono essere accettati ed i valori medi così riportati: forme normali $(42 + 36)/400 = 20\%$, atipie della testa $(140 + 122)/400 = 66\%$, atipie del tratto intermedio $(102 + 108)/400 = 53\%$, atipie del tratto principale $(30 + 22)/400 = 13\%$ e la percentuale di spermatozoi che presenta residui citoplasmatici in eccesso $(44 + 36)/400 = 20\%$.

Nota: Queste categorie non raggiungono il 100% dal momento che ogni atipia è contata separatamente e alcuni spermatozoi presentano difetti multipli.

Commento: Un'analisi più dettagliata degli spermatozoi atipici, con diversi indici che combinano il numero di atipie di ciascuna regione per ciascuno spermatozoo atipico, è riportata nella Sezione 3.1.1.

2.17.6 Valutazione di particolari difetti degli spermatozoi

Talvolta molti spermatozoi possono presentare uno specifico difetto strutturale. Ad esempio, l'acrosoma può non riuscire a svilupparsi, dando origine all'atipia denominata a piccola testa rotonda o "globozoospermia". Se la piastra basale fallisce l'adesione al nucleo, al polo opposto dell'acrosoma durante la spermiogenesi le teste vengono assorbite e nel liquido seminale vengono trovate solo code (acefalia).

Nota 1: Le acefalie (code senza testa) non sono contate come atipie della testa dal momento che queste non contengono cromatina o strutture della testa anteriori alla piastra basale.

Nota 2: Poiché le code isolate (acefalie) e le teste isolate non vengono contate come spermatozoi (definiti come aventi una testa ed una coda, vedi Sezione 2.7.3) non sono considerati spermatozoi atipici.

Gli uomini i cui spermatozoi presentano uno di questi difetti sono generalmente infertili. Si tratta di casi rari, ma è fondamentale che vengano riportati in maniera corretta. Pertanto, occorre riportare la presenza di specifici difetti degli spermatozoi, per esempio teste isolate, code isolate e teste senza acrosoma. Se ci sono molti di questi difetti può essere determinata la loro prevalenza relativa nell'ambito degli spermatozoi.

Se N è il numero di cellule con difetti contate nello stesso numero di campi per 400 spermatozoi ed S è la concentrazione degli spermatozoi rilevata ($10^6 \times \text{ml}$), la concentrazione (C) dei difetti può essere calcolata mediante la formula $C = S \times (N/400)$.

2.18 Valutazione dei leucociti nel liquido seminale

I leucociti, prevalentemente polimorfonucleati (PMN, neutrofili), sono presenti nella maggior parte dei liquidi seminali umani (Tomlinson *et al.*, 1993; Johanisson *et al.*, 2000). Possono essere differenziati dagli spermatidi e dagli spermatozoi su uno striscio seminale colorato con Papanicolaou (vedi Sezione 2.14.2). La distinzione è basata sulle differenze nella colorazione, sulla grandezza e sulla forma del nucleo (Johanisson *et al.*, 2000) (vedi Tavole 6, 10, 11, 12, 13, 14). Morfologicamente, i leucociti polimorfonucleati possono facilmente essere confusi con spermatidi multinucleati ma presentano una colorazione bluastra, in contrasto con la colorazione più rosata degli spermatidi (Johanisson *et al.*, 2000). L'identificazione può essere anche facilitata dalla grandezza del nucleo: i nuclei dei monociti presentano una vasta va-

rietà di dimensioni, da approssimativamente 7 μm per i linfociti ad oltre 15 μm per i macrofagi. Queste dimensioni sono soltanto indicazioni di massima, in quanto degenerazione e divisione influiscono sulla grandezza del nucleo.

Esistono molte altre tecniche per quantificare la popolazione di leucociti nel liquido seminale. Poiché i granulociti perossidasi-positivi sono la forma predominante di leucociti nel liquido seminale, l'analisi di routine dell'attività perossidasi è utile come tecnica di screening iniziale (Wolff, 1995; Johannisson *et al.*, 2000) (vedi Sezione 2.18.1).

I leucociti possono essere ulteriormente differenziati con analisi immunocitochimiche più lunghe e costose rispetto ai comuni antigeni leucocitari e nemaspermici (Homyk *et al.*, 1990; Eggert-Kruse *et al.*, 1992) (vedi Sezione 3.2).

2.18.1 Colorazione della perossidasi cellulare mediante o-toluidina

Questo test è rapido ed economico ed è un utile metodo di screening iniziale per i granulociti.

2.18.1.1 Principio

Tradizionalmente i leucociti nel liquido seminale umano vengono contati mediante una procedura istochimica che identifica l'enzima perossidasi, caratteristico dei granulociti (Fig. 2.14). Questa tecnica ha il vantaggio di essere relativamente di facile esecuzione, ma non individua:

- polimorfonucleati attivati che hanno rilasciato i loro granuli;
- altri tipi di leucociti come linfociti, macrofagi e monociti, che non contengono perossidasi.

Il test può essere utile per la distinzione dei leucociti polimorfonucleati dagli spermatici multinucleati che sono privi di perossidasi (Johannisson *et al.*, 2000). L'analisi che segue si basa su Nahoum, Cardozo (1980). Un kit per questa analisi è disponibile in commercio.

2.18.1.2 Reagenti

1. Buffer fosfato, 67 mmol/l, pH 6.0: sciogliere 9.47 g di idrogeno fosfato di sodio (Na_2HPO_4) in 1.000 ml di acqua distillata e 9.08 grammi di diidrogeno fosfato di potassio (KH_2PO_4) in 1.000 ml di acqua distillata. Aggiungere una soluzione all'altra (approssimativamente 12 ml di soluzione di Na_2HPO_4 a 88 ml di soluzione di KH_2PO_4) fino a raggiungere un pH di 6.0.
2. Soluzione saturata di cloruro di ammonio (NH_4Cl): aggiungere 250 g di NH_4Cl a 1.000 ml di acqua distillata.
3. Acido disodio etilendiaminotetracetico (Na_2EDTA) 148 mmol/l: scioglierne 50 g/l nel buffer fosfato (pH 6.0) preparato al punto 1.
4. Substrato: sciogliere 2.5 mg di o-toluidina in 10 ml di soluzione salina allo 0.9 % (9 g/l).

5. Perossido di idrogeno (H_2O_2) al 30% (v/v): come disponibile in commercio.
6. Soluzione di lavoro: aggiungere a 9 ml di substrato di o-toluidina 1 ml di soluzione saturata di NH_4Cl , 1 ml di 148 mmol/l Na_2EDTA e 10 μl di H_2O_2 al 30% (v/v) e miscelare bene. Questa soluzione può essere usata fino a 24 ore dopo la preparazione.

Nota: L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, 1982) ha stabilito che la o-toluidina debba essere considerata, ai fini pratici, come avente rischio cancerogeno per l'uomo. Prendere le dovute precauzioni (vedi Appendice 2).

2.18.1.3 Procedura

1. Miscelare accuratamente il campione di liquido seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Prelevare una aliquota di 0.1 ml di liquido seminale e miscelarla con 0.9 ml di soluzione di lavoro diluizione 1:10 (1 + 9).
3. Vortexare la sospensione di spermatozoi a bassa velocità per 10 secondi e incubarla a temperatura ambiente per 20-30 minuti. In alternativa, agitare continuamente con un agitatore a rulli.
4. Miscelare nuovamente il campione di spermatozoi prima di prelevare una aliquota di replicato e miscelarla con la soluzione di lavoro come sopra.

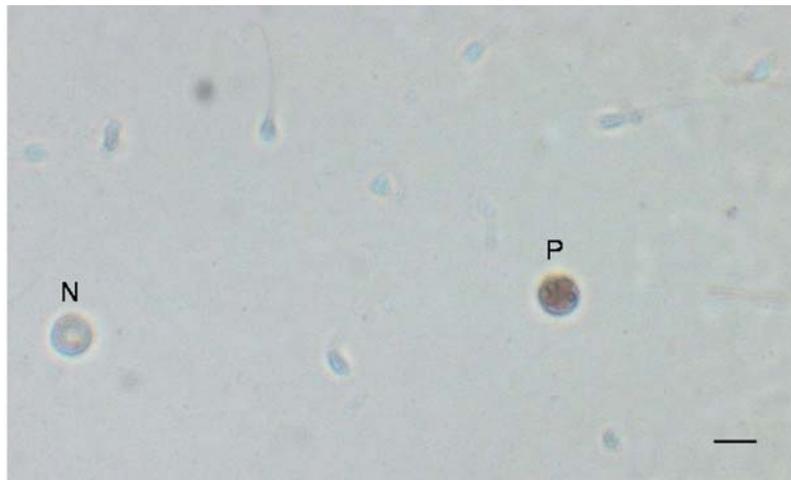
2.18.1.4 Valutazione del numero delle cellule perossidasi-positive nell'emocitometro

1. Miscelare nuovamente la sospensione di liquido seminale dopo 20-30 minuti e riempire ciascun lato dell'emocitometro con una delle preparazioni del replicato.
2. Conservare l'emocitometro in orizzontale per almeno 4 minuti a temperatura ambiente in camera umida (una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua) per prevenirne l'essiccamento e consentire alle cellule di stabilizzarsi.
3. Esaminare la camera con microscopio a contrasto di fase a ingrandimento 200x o 400x.
4. Contare almeno 200 cellule perossidasi-positive in ciascun replicato al fine di ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.7 e Tavola 2.2). Le cellule perossidasi-positive risultano colorate in marrone, mentre le cellule perossidasi-negative non risultano colorate (vedi Fig. 2.14).
5. Esaminare una camera griglia per griglia e continuare il conteggio fino a che non saranno state osservate almeno 200 cellule perossidasi-positive e non sia stata esaminata una griglia completa. Il conteggio dovrebbe essere fatto per griglie complete; non interrompere il conteggio a metà di una griglia.
6. Prendere nota del numero delle griglie analizzate necessarie per arrivare ad almeno 200 cellule perossidasi-positive. Lo stesso numero di griglie andrà contato nell'altra camera dell'emocitometro.

7. Contare il numero delle cellule perossidasi-positivo e delle griglie con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.
8. Passare alla seconda camera dell'emocitometro e ripetere sul secondo replicato il conto dello stesso numero di griglie del primo, anche se in questo campo dovessero esserci meno di 200 cellule perossidasi-positivo.
9. Calcolare la somma e la differenza dei due numeri di cellule perossidasi-positivo.
10. Determinare l'accettabilità della differenza in base alla Tabella 2.5 o alla Fig. A7.1, Appendice 7 (ciascuna mostra la massima differenza tra due conte attese nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento).
11. Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione (vedi Sezione 2.18.1.5). Se la differenza è troppo alta preparare due nuove diluizioni e ripetere la conta del replicato (vedi Riquadro 2.10).
12. Riportare la concentrazione media di cellule perossidasi-positivo a due cifre significative.
13. Calcolare il numero totale di cellule perossidasi-positivo per eiaculato (vedi Commenti della Sezione 2.18.1.8)

Fig. 2.14 Cellule perossidasi-positivo e negativo in liquido seminale umano

Un granulocita perossidasi-positivo (P, colore marrone) e una cellula rotonda perossidasi-negativo (N). Scala 1 a 10 μm .



Per gentile concessione di TG Cooper.

2.18.1.5 Calcolo della concentrazione delle cellule perossidasi-positivo nel liquido seminale

La concentrazione di cellule perossidasi-positivo nel liquido seminale è rappresentata dal loro numero (N) diviso per il volume del numero totale di griglie esaminate (n)

per ciascuno dei replicati (dove il volume di una griglia è 100 nl) e il risultato moltiplicato per il fattore di diluizione.

Per una diluizione 1:10 (1 + 9) la concentrazione è $C = (N/n) \times (1/100) \times 10$ cellule per nl = $(N/n) \times (1/10)$ cellule per nl. Perciò, (N/n) viene diviso per 10 per ottenere la concentrazione delle cellule perossidasi-positive per nl (10^6 cellule per ml).

Dopo la valutazione di tutte e 9 le griglie di ciascuna camera dell'emocitometro, il numero totale delle cellule perossidasi-positive può essere diviso per il volume totale di entrambe le camere (1.8 μ l) e moltiplicato per il fattore di diluizione (10), per ottenere la concentrazione espressa in cellule per μ l (1.000 cellule per ml).

Nota: Questa procedura può essere usata per calcolare la concentrazione di cellule rotonde quando il numero totale di cellule rotonde contate (perossidasi-positive e negative) è usato come N nel calcolo.

2.18.1.6 Sensibilità del metodo

Se ci dovessero essere meno di 200 cellule perossidasi-positive nella camera l'errore di campionamento supererebbe il 5%. Quando meno di 400 cellule perossidasi-positive sono rilevate, in tutte le griglie di ciascuna delle due camere, riportare l'errore di campionamento per il numero di cellule contate (vedi Tabella 2.2).

Se le cellule perossidasi-positive sono meno di 25 per ciascuna camera, la concentrazione sarà <277.000 per ml; questo è il limite più basso di quantificazione per un errore di campionamento del 20% quando tutte le 9 griglie della camera di Neubauer modificata sono valutate ed è utilizzata una diluizione di 1:10 (1 + 9) (Cooper *et al.*, 2006). Riportare il numero di cellule perossidasi-positive osservate con il commento "Troppe poche cellule per una determinazione accurata della concentrazione ($<277.000/\text{ml}$)".

Commento: L'assenza di cellule perossidasi-positive nell'aliquota esaminata non significa necessariamente che siano assenti nel resto del campione.

2.18.1.7 Esempi

Esempio 1. Con una diluizione 1:10 (1 + 9), nel replicato 1 si trovano 60 cellule perossidasi-positive in 9 griglie mentre il replicato 2 presenta 90 cellule perossidasi-positive in 9 griglie. La somma dei valori (60 + 90) è 150 in 18 griglie e la differenza è 30 (90 - 60). Dalla Tabella 2.5 si nota che questo valore eccede la differenza attesa per effetto della sola variabilità casuale (24), quindi i risultati sono scartati e vengono allestiti nuovi replicati.

Esempio 2. Con una diluizione 1:10 (1 + 9), il replicato 1 contiene 204 cellule perossidasi-positive in 5 griglie, mentre il replicato 2 contiene 198 cellule perossidasi-positive in 5 griglie. La somma dei valori (204 + 198) è 402 in 10 griglie, e la differenza (204 - 198) è 6. Dalla Tabella 2.5 si nota che questo valore è inferiore rispetto alla differenza

attesa per effetto della sola variabilità casuale (39), pertanto i valori sono accettati. La concentrazione di cellule perossidasi-positivo nel campione, per una diluizione 1:10 (1 + 9), è $C = (N/n) \times (1/10)$ cellule per nl, o $(402/10)/10 = 4.02$ cellule/nl, o 4.0×10^6 cellule per ml (arrotondato a due cifre significative).

Esempio 3. Con una diluizione 1:10 (1 + 9), il replicato 1 contiene 144 cellule perossidasi-positivo in 9 griglie, mentre il replicato 2 contiene 162 cellule perossidasi-positivo in 9 griglie. La somma dei valori (144 + 162) è 306 in 18 griglie e la differenza (162 - 144) è 18. Dalla Tabella 2.5 si nota che questo valore è inferiore rispetto alla differenza attesa per effetto della sola variabilità casuale (34) e quindi il valore è accettato. Quando tutte le nove griglie di ciascuna camera sono state valutate, la concentrazione del campione per una diluizione di 1:10 (1 + 9) è $C = (N/1.8) \times 10$ cellule per $\mu\text{l} = (306/1.8) \times 10 = 1.700$ cellule per μl oppure 1.7×10^6 cellule per ml arrotondato a due cifre significative. Quando sono contate meno di 400 cellule, andrà riportato l'errore di campionamento per 306 cellule dato in Tabella 2.2 (approssimativamente 6%).

Esempio 4. Con una diluizione 1:10 (1 + 9) nessuna cellula perossidasi-positiva è trovata in ciascun replicato. Quando meno di 25 cellule perossidasi-positivo sono trovate in tutte le nove griglie, la concentrazione è <277.000 per ml; si riporterà che "Non sono state trovate nel campione cellule perossidasi-positivo. Troppe poche cellule per una accurata determinazione della concentrazione ($<277.000/\text{ml}$)".

2.18.1.8 Valore di riferimento

Attualmente non esiste un range di riferimento per le cellule perossidasi-positivo nel liquido seminale degli uomini fertili. In attesa di ulteriori prove, questo manuale mantiene il valore consensuale di 1.0×10^6 cellule perossidasi-positivo per ml come valore limite.

Commento 1: Il numero totale di cellule perossidasi-positivo nell'eiaculato può riflettere una condizione infiammatoria (Wolff, 1995). Questa è ottenuta moltiplicando la concentrazione di cellule perossidasi-positivo per il volume dell'intero eiaculato.

Commento 2: I valori di cut-off riportati per le cellule perossidasi-positivo in uomini fertili variano da 0.5×10^6 fino a 1.0×10^6 PMN leucociti per ml, oppure da 1×10^6 fino a 2×10^6 leucociti totali per ml (Wolff, 1995). Edizioni precedenti di questo manuale hanno considerato 1×10^6 leucociti per ml come il limite per la leucocitospermia. Alcuni autori hanno trovato questo valore troppo basso (Wolff, 1995), mentre altri lo considerano troppo elevato (Sharma *et al.*, 2001; Punab *et al.*, 2003), a seconda degli obiettivi considerati (qualità del liquido, risultati IVF, presenza di batteri, risposta del liquido seminale alle specie reattive dell'ossigeno).

Commento 3: Un numero eccessivo di leucociti nell'eiaculato (leucocitospermia, piospermia) può essere associato ad infezioni e a bassa qualità del liquido seminale.

Commento 4: Il danno agli spermatozoi derivante da leucociti dipende dal numero totale di leucociti nell'eiaculato e dal numero di leucociti relativo al numero di spermatozoi.

Commento 5: I leucociti possono alterare la motilità degli spermatozoi e l'integrità del DNA mediante un'azione ossidativa (vedi Sezione 4.1). Comunque, la possibilità che il livello di infiltrazione leucocitaria osservato sia in grado di provocare danni o meno, dipende da fattori che è impossibile dedurre dal campione di liquido seminale, come la causa, la tempistica, la localizzazione anatomica dell'infiltrazione, la natura dei leucociti coinvolti e se questi siano attivati (Tomlinson *et al.*, 1993; Aitken, Baker, 1995; Rossi, Aitken, 1997).

2.19 Valutazione delle cellule germinali immature nel liquido seminale

Le cellule germinali includono spermatidi rotondi e spermatociti, ma solo raramente spermatogoni. Questi possono essere individuati su strisci di campioni seminali colorati, ma possono risultare difficilmente distinguibili da cellule infiammatorie quando le cellule stanno degenerando.

Spermatidi e spermatociti possono solitamente essere differenziati dai leucociti in uno striscio di liquido seminale colorato con tecnica di Papanicolaou (Johanisson *et al.*, 2000) (vedi Sezione 2.14.2). L'identificazione può basarsi sulla colorazione, sulla grandezza e la forma del nucleo (vedi Tavole 6, 10, 11, 12, 13 e 14), sull'assenza di perossidasi intracellulare (vedi Sezione 2.18) e sull'assenza di antigeni specifici dei leucociti (vedi Sezione 3.2). Sul piano morfologico gli spermatidi multinucleati possono essere facilmente confusi con i leucociti polimorfonucleati ma presentano una colorazione rosata in contrasto con quella più bluastra dei leucociti PMN (Johanisson *et al.*, 2000). Gli spermatidi rotondi possono essere identificati con colorazioni specifiche per l'acrosoma in via di sviluppo (Couture *et al.*, 1976), con lectine (vedi Sezione 4.4.1) o con anticorpi specifici (Homyk *et al.*, 1990; Ezeh *et al.*, 1998).

La dimensione del nucleo può inoltre aiutare nell'identificazione: gli spermatogoni (raramente rilevati nel liquido seminale) hanno un nucleo di approssimativamente 8 μm , gli spermatociti hanno un nucleo di circa 10 μm e gli spermatidi hanno un nucleo di circa 5 μm . Queste dimensioni sono solamente indicative, poiché la degenerazione e le divisioni alterano le dimensioni del nucleo.

2.20 Analisi degli antigeni di superficie degli spermatozoi

Se gli spermatozoi presentano agglutinazione (per es. spermatozoi mobili adesi testa-testa, coda-coda o in forma mista) (vedi Sezione 2.4.4), la causa potrebbe essere legata alla presenza di anticorpi antispermatozoo.

Commento 1: Gli anticorpi antispermatozoo possono essere presenti senza spermio-agglutinazione che allo stesso tempo può essere causata da altri fattori rispetto agli anticorpi antispermatozoo.

Commento 2: La sola presenza di anticorpi antispermatozoo non è sufficiente per fare diagnosi di autoimmunità antispermatozoo. È necessario dimostrare che gli anticorpi interferiscono severamente con la funzione degli spermatozoi; ciò è usualmente fatto mediante un test di penetrazione del muco (vedi Sezione 3.3). Gli anticorpi possono inoltre interferire con il legame alla zona pellucida e con la reazione acrosomiale.

Gli anticorpi antispermatozoo (ASA) del liquido seminale appartengono esclusivamente a due classi di immunoglobuline: IgA e IgG. Gli anticorpi IgM, a causa delle loro maggiori dimensioni, vengono raramente ritrovati nel liquido seminale. Le IgA potrebbero avere un'importanza clinica maggiore rispetto agli anticorpi IgG (Kremer, Jager, 1980). Entrambe le classi possono essere rilevate sulle cellule nemaspermiche o in fluidi biologici mediante i relativi test di screening.

- *Test per anticorpi adesi agli spermatozoi (test diretti).* In questa sede riportiamo due test diretti: il mixed antiglobulin reaction (MAR) test (per una review vedi Bronson *et al.*, 1984) e l'Immunobead test (IBT) (Bronson *et al.*, 1982; Clark *et al.*, 1982-1985). Il MAR test viene eseguito su un campione di liquido seminale *in toto* mentre il test IB utilizza spermatozoi lavati. I risultati dei due test non sempre combaciano (MacMillan, Baker, 1987; Scarselli *et al.*, 1987; Meinertz, Bronson, 1988; Hellstrom *et al.*, 1989), ma i risultati del test IB si correlano bene con i risultati del test di immobilizzazione che individua anticorpi nel siero. I protocolli sperimentali per i test IB e MAR variano, ma la preparazione dello spermatozoo/bead viene valutata usando il microscopio. I beads aderiscono agli spermatozoi mobili ed immobili che presentano anticorpi legati alla superficie; verrà calcolata la percentuale di spermatozoi mobili con anticorpi legati.
- *Test per la ricerca di anticorpi antispermatozoo in fluidi privi di spermatozoi, per esempio plasma seminale, siero di sangue e muco cervicale solubilizzato (test indiretto).* In questi test il fluido, inattivato al calore e diluito, che potrebbe contenere ASA, è incubato con spermatozoi di donatore liberi da anticorpi che sono stati lavati dal plasma seminale. Qualsiasi ASA nel fluido sospetto si legherà in modo specifico agli spermatozoi del donatore i quali saranno poi valutati mediante test diretto. Per avere risultati attendibili è importante consentire un tempo sufficiente all'interazione fra spermatozoo e anticorpi in quanto la visibilità dell'agglutinazione potrebbe impiegare fino a 10 minuti di tempo. Comunque è necessario tenere presente che la motilità degli spermatozoi diminuisce con il tempo e i test dipendono dalla presenza di spermatozoi mobili.

Nota 1: I due test ASA descritti sopra sono disponibili in commercio. Entrambi dipendono dalla presenza di spermatozoi mobili. Se non c'è una quota sufficiente di spermatozoi mobili possono essere effettuati test indiretti su plasma seminale o siero di sangue.

Nota 2: Anticorpi citotossici che possono uccidere gli spermatozoi o inibirne la motilità non possono essere individuati con questi test.

2.20.1 Mixed antiglobulin reaction test

Il mixed antiglobulin reaction test (MAR) è un test di screening economico, rapido e sensibile (Rajah *et al.*, 1992), ma fornisce minori informazioni rispetto all'Immunobead test diretto IBT (vedere Sezione 2.20.2).

Nel MAR test un "anticorpo-ponte" (anti IgG o anti IgA) viene impiegato per fare in modo che i beads ricoperti di anticorpi vengano in contatto con gli spermatozoi non

lavati che hanno sulla loro superficie anticorpi della classe IgG o IgA. I MAR test diretti IgG e IgA vengono effettuati miscelando liquido seminale *in toto* con particelle di latex (beads) o con emazie trattate rivestite con IgG o IgA umane. Alle sospensioni è addizionato un siero monospecifico anti IgG o IgA umane. La formazione di agglutinazioni miste fra beads e spermatozoi mobili indica la presenza di anticorpi IgG o IgA sullo spermatozoo (l'agglutinazione tra beads serve come controllo positivo per il riconoscimento antigene-anticorpo).

2.20.1.1 Procedura

1. Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Prelevare aliquote di 3.5 μ l di liquido seminale in replicato e posizionarle su vetrini separati, al microscopio.
3. Includere un vetrino con 3.5 μ l di seme ASA positivo e 3.5 μ l di seme ASA negativo come controlli in ogni test diretto. Questo liquido seminale dovrebbe appartenere a uomini con e senza anticorpi antispermatozoo, rispettivamente, come dimostrato in precedenti MAR test diretti. Alternativamente, possono essere prodotti spermatozoi positivi mediante l'incubazione in un siero noto per la presenza di anticorpi (vedi Sezione 2.20.3).
4. Aggiungere 3.5 μ l di particelle di latex rivestite di IgG (beads) ad ogni goccia di test e controllare il liquido seminale e miscelare con la punta della pipetta.
5. Aggiungere 3.5 μ l di antisiero contro IgG umane ad ogni miscela di liquido seminale e beads e miscelare con la punta della pipetta.
6. Coprire la sospensione con un vetrino coprioggetto (22 mm x 22 mm) per fornire uno spessore di approssimativamente 20 μ m (vedi Riquadro 2.4).
7. Conservare il vetrino in posizione orizzontale per 3 minuti a temperatura ambiente in camera umida (per esempio una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua) al fine di prevenirne l'essiccamento.
8. Esaminare la preparazione a fresco con microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 200x o 400x dopo 3 minuti e nuovamente dopo 10 minuti.
9. Ripetere la procedura usando beads rivestiti di anti-IgA al posto di beads rivestiti di anti-IgG.

2.20.1.2 Calcolo

Se gli spermatozoi presentano anticorpi sulla loro superficie i beads aderiranno ad essi. Gli spermatozoi mobili inizialmente si muoveranno con poche o anche con un gruppo di particelle adese. Successivamente le zone di agglutinazione diverranno così estese che il movimento degli spermatozoi sarà severamente limitato. Gli spermatozoi che non presentano il rivestimento di anticorpi si muoveranno liberamente tra i beads.

L'obbiettivo dell'esame è quello di determinare la percentuale di spermatozoi mobili aventi i beads adesi. Un problema che si verifica comunemente è il caso in cui ci

siano spermatozoi NP che sono vicini ai beads ma non adesi ad essi. Il caso in cui i beads siano legati è facilmente verificabile picchiando il vetrino coprioggetto con la punta piccola di una pipetta: il movimento dei beads in contemporanea con gli spermatozoi mobili è indice di positività di adesione.

1. Contare solo i nemaspermi mobili e determinare la percentuale di spermatozoi mobili che abbiano due o più beads adesi. Ignorare i legami a livello della punta della coda.
2. Valutare almeno 200 spermatozoi mobili in ogni replicato al fine di raggiungere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.5).
3. Calcolare la percentuale di spermatozoi mobili che abbiano beads adesi.
4. Registrare la classe (IgG o IgA) e il sito di legame dei beads agli spermatozoi (testa, segmento intermedio, segmento principale). Ignorare i legami a livello della punta della coda.

Nota 1: Se il 100% di spermatozoi mobili è legato ai beads dopo 3 minuti andrà calcolato questo come risultato del test e non andrà riletto dopo 10 minuti.

Nota 2: Se meno del 100% di spermatozoi mobili è legato ai beads entro 3 minuti, il vetrino andrà riletto dopo 10 minuti.

Nota 3: Se gli spermatozoi dopo 10 minuti fossero immobili andrà calcolato come risultato il valore percentuale a 3 minuti.

2.20.1.3 Valori di riferimento

Non ci sono attualmente valori di riferimento per gli anticorpi adesi agli spermatozoi nel MAR test su liquido seminale in caso di uomini fertili. Come ulteriore evidenza, questo manuale indica come valore soglia il valore del 50% di spermatozoi mobili con beads adesi.

Commento: La penetrazione degli spermatozoi nel muco cervicale e nella fecondazione *in vivo* tende a essere significativamente alterata quando il 50% o più degli spermatozoi mobili ha anticorpi adesi (Abshagen *et al.*, 1998). Il legame delle particelle limitato a livello della punta della coda non si associa ad alterazione della fertilità e può essere presente in uomini fertili (Chiu, Chamley, 2004).

2.20.2 L'IBT diretto

Questo esame è più lungo rispetto al MAR test ma fornisce informazioni circa gli anticorpi adesi agli spermatozoi che sono stati separati dal plasma seminale e dai suoi possibili interferenti.

Nell'IBT diretto i beads rivestiti con legame covalente con immunoglobuline di coniglio dirette contro IgG e IgA umane, vengono miscelati direttamente con spermato-

zoi lavati. Il legame dei beads con gli anti IgG o anti IgA umani agli spermatozoi mobili indica la presenza di anticorpi della classe IgG o IgA sulla superficie degli spermatozoi.

2.20.2.1 Reagenti

1. PBS Dulbecco – siero albumina bovina (BSA) o soluzione di Tyrode-BSA (vedi Appendice 4, Sezioni A4.2 e A4.9).
2. Buffer 1: aggiungere 0.3 g di V frazione di Cohn BSA a 100 ml di PBS Dulbecco o soluzione di Tyrode.
3. Buffer 2: aggiungere 5 g di V frazione di Cohn BSA a 100 ml di PBS Dulbecco o soluzione di Tyrode.
4. Filtrare tutte le soluzioni attraverso filtri di 0.45 μm e riscaldare a 25-35°C prima dell'uso.

2.20.2.2 Preparazione degli immunobeads

1. Per ogni tipo di immunobeads (IgG, IgA) aggiungere 0.2 ml di sospensione di beads a 10 ml di buffer 1 in provette da centrifuga.
2. Centrifugare a 500 g o 600 g per 5-10 minuti.
3. Decantare ed eliminare il surnatante dopo il lavaggio degli immunobeads lavati.
4. Risospendere delicatamente i beads in 0.2 ml di buffer 2.

2.20.2.3 Preparazione degli spermatozoi

La quantità di liquido seminale necessaria per questi esami è determinata dalla concentrazione e dalla motilità degli spermatozoi, come mostrato in Tabella 2.7.

Tabella 2.7 Quantità di liquido seminale da utilizzare per l'Immunobead test

Concentrazione nemaspermica ($10^6/\text{ml}$)	Motilità nemaspermica (PR) (%)	Volume di liquido seminale richiesto (ml)
>50	-	0.2
21-50	>40	0.4
21-50	<40>10	0.8
10-20	>40	1.0
10-20	<40>10	2.0
<10>5	>10	>2.0

1. Miscelare accuratamente il campione di liquido seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Trasferire la quantità necessaria di liquido seminale in una provetta per centrifuga e portare a 10 ml con buffer 1.
3. Centrifugare a 500 g per 5-10 minuti.

4. Decantare e eliminare il surnatante dopo il lavaggio degli spermatozoi.
5. Risospendere delicatamente il pellet in 10 ml di buffer 1 fresco.
6. Centrifugare nuovamente a 500 g per 5-10 minuti.
7. Decantare ed eliminare il surnatante.
8. Risospendere delicatamente il pellet di spermatozoi in 0.2 ml di buffer 2.

Nota 1: Le aliquote superiori a 1.0 ml richiedono 3 lavaggi.

Nota 2: Campioni con bassa motilità nemaspermica (per es. Il 10% o meno) possono non fornire risultati chiaramente interpretabili. In questo caso, considerare l'IBT indiretto (vedi Sezione 2.20.3).

2.20.2.4 Procedura

Spermatozoi anticorpi antispermatozoo positivi e anticorpi antispermatozoo negativi dovrebbero essere inclusi come controlli in ogni test. Il liquido seminale dovrebbe provenire da uomini con e senza anticorpi antispermatozoo rispettivamente, come identificati nei precedenti IBT diretti.

1. Posizionare 5 μ l di sospensione di spermatozoi lavati prima di eseguire il test al microscopio.
2. Allestire vetrini separati con 5 μ l di nemaspermi anticorpi antispermatozoo positivi e 5 μ l di nemaspermi anticorpi antispermatozoo negativi.
3. Aggiungere 5 μ l di sospensione di immunobeads anti IgG accanto ad ogni goccia di spermatozoi.
4. Miscelare insieme le gocce di immunobeads anti IgG e di spermatozoi con la punta della pipetta.
5. Porre un vetrino coprioggetto 22 mm x 22 mm sopra la goccia miscelata per ottenere uno spessore di approssimativamente 20 μ m (vedi Riquadro 2.4).
6. Conservare i vetrini orizzontalmente per 3-10 minuti a temperatura ambiente in camera umida (per esempio una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua). Non aspettare più di 10 minuti prima di analizzare i vetrini in quanto il legame degli immunobeads diminuisce significativamente durante l'incubazione (Gould *et al.*, 1994).
7. Esaminare i vetrini con microscopio a contrasto di fase con ingrandimento a 200x o 400x.
8. Contare solo spermatozoi mobili che hanno uno o più beads adesi, come descritto nella Sezione 2.20.1.2. Ignorare i legami sulla punta della coda.
9. Interpretare il test come descritto in Sezione 2.20.1.3.

10. Ripetere la procedura usando la sospensione immunobeads anti IgA.

Nota: Al fine di assicurarsi che tutti gli spermatozoi adesi siano esaminati entro 10 minuti è preferibile allestire un preparato per volta.

2.20.2.5 Valori di riferimento

Non ci sono attualmente valori di riferimento per gli anticorpi adesi agli spermatozoi nel MAR test su liquido seminale in caso di uomini fertili. Come ulteriore evidenza, questo manuale indica come valore soglia il valore del 50% di spermatozoi mobili con particelle adese.

Commento: La diagnosi di infertilità immunologica è data quando il 50% o più degli spermatozoi mobili (progressivi e non progressivi) ha particelle adese (Barratt *et al.*, 1992). Il legame delle particelle limitato alla punta della coda non è associato ad infertilità e può essere presente in uomini fertili (Chiu, Chamley, 2004).

2.20.3 L'IBT indiretto

L'Immunobead test indiretto è usato per identificare gli anticorpi antispermatozoo in fluidi senza spermatozoi inattivati al calore (siero, fluido testicolare, plasma seminale o muco cervicale solubilizzato in bromelina). Gli spermatozoi senza anticorpi di donatori legano gli anticorpi antispermatozoo presenti nel fluido in esame e vengono successivamente esaminati come nell'IBT diretto.

2.20.3.1 Reagenti

Vedi Sezione 2.20.2.1 (Reagenti per l'IBT diretto).

Se deve essere analizzato il muco cervicale preparare 10 UI/ml di bromelina, un enzima proteolitico specifico a largo spettro (EC 3.4.22.32) (vedi Riquadro 2.2).

2.20.3.2 Preparazione degli immunobeads

Vedi Sezione 2.20.2.2.

2.20.3.3 Preparazione degli spermatozoi del donatore

Vedi Sezione 2.20.2.3.

2.20.3.4 Preparazione del fluido da esaminare

1. Se si sta analizzando il muco cervicale, diluire 1:2 (1 + 1) con 10 UI/ml di bromelina, miscelare con la punta di una pipetta e incubare a 37°C per 10 minuti. Quando la fluidificazione è completa, centrifugare a 2.000 g per 10 minuti. Usare il surnatante immediatamente per l'analisi o congelarlo a -70°C.

2. Inattivare il complemento in muco cervicale solubilizzato, siero, plasma seminale o fluido testicolare riscaldando a 56°C per 30-45 minuti.
3. Diluire il campione inattivato al calore 1:5 (1 + 4) con buffer 2 (per es. 10 µl del fluido biologico deve essere testato con 40 µl di buffer 2).
4. Includere i campioni positivi e negativi, per esempio siero umano con e senza anticorpi antispermatozoo rispettivamente, come indicato nell'IBT indiretto utilizzati come controllo in ogni test indiretto. Uomini che hanno subito una vasectomia possono essere una fonte di siero se positivo (>50% di spermatozoi mobili con beads adesi escludendo il legame sulla punta della coda).

2.20.3.5 Incubazione degli spermatozoi di donatore con il fluido da esaminare

1. Miscelare 50 µl di sospensione lavata di spermatozoi di donatore con 50 µl di 1:5 (1 + 4) di fluido diluito da esaminare.
2. Incubare a 37°C per un'ora.
3. Centrifugare a 500 g per 5-10 minuti.
4. Decantare ed eliminare il surnatante.
5. Risospendere delicatamente il pellet di spermatozoi in 10 ml di buffer 1 fresco.
6. Centrifugare nuovamente a 500 g per 5-10 minuti.
7. Decantare ed eliminare il surnatante.
8. Ripetere le fasi di lavaggio 5, 6, 7, sopra menzionate.
9. Risospendere delicatamente il pellet di spermatozoi in 0.2 ml di buffer 2.

2.20.3.6 Immunobead test

1. Effettuare l'IBT, come descritto in Sezione 2.20.2.4, con gli spermatozoi di donatore incubati con il fluido in esame.
2. Contare ed interpretare il test come descritto nelle Sezioni 2.20.1.2 e 2.20.1.3.

CAPITOLO 3 Procedure facoltative

I test descritti in questo capitolo non sono necessari per le analisi di routine del liquido seminale, ma possono essere utili in determinate circostanze a fini diagnostici o di ricerca.

3.1 Indici di difetti multipli degli spermatozoi

Gli spermatozoi morfologicamente atipici presentano spesso difetti multipli (della testa, del segmento intermedio o del segmento principale, o anche combinazioni di questi difetti). Una valutazione dettagliata dell'incidenza di alterazioni morfologiche può essere più utile di una semplice valutazione della percentuale di spermatozoi morfologicamente normali, specialmente negli studi sull'entità del danno alla spermatogenesi umana (Jouannet *et al.*, 1988; Auger *et al.*, 2001). Il conteggio, con un sistema a più vie, degli spermatozoi morfologicamente normali, e di quelli con anomalie della testa e del segmento intermedio e principale, fornisce il numero medio di atipie per ciascuno spermatozoo valutato.

Dal conteggio delle atipie dettagliate della testa del segmento intermedio e del principale con un sistema a più vie possono derivare tre indici:

- l'indice di anomalie multiple (MAI) (Jouannet *et al.*, 1988);
- l'indice di teratozoospermia (TZI) (Menkveld, Kruger, 1996; Menkveld *et al.*, 2001);
- l'indice di alterazione spermatica (SDI) (Aziz *et al.*, 1996, 2004).

Questi indici sono stati correlati con la fertilità *in vivo* (MAI e TZI) (Jouannet *et al.*, 1988; Menkveld *et al.*, 2001; Slama *et al.*, 2002) e *in vitro* (SDI) (Aziz *et al.*, 1996) e possono essere utili nelle valutazioni di alcune condizioni patologiche (Auger *et al.*, 2001; Aziz *et al.*, 2004).

3.1.1 Calcolo degli indici di difetti morfologici multipli

Ogni spermatozoo atipico viene contato per quanto riguarda i difetti della testa, del segmento intermedio e del segmento principale e per la presenza di residuo citoplasmatico in eccesso (volume superiore ad un terzo della dimensione della testa dello spermatozoo). È possibile utilizzare il contacellule di laboratorio, con un numero di vie di ingresso adattato al tipo di indice che si sta valutando. Se non è disponibile un contacellule, si può utilizzare un semplice foglio per il punteggio.

- Il MAI è il numero medio di anomalie per spermatozoo atipico. Tutte le anomalie della testa, del segmento intermedio e di quello principale sono incluse nel calcolo. I criteri morfologici usati per queste analisi vengono da David *et al.* (1975), come modificato da Auger, Eustache (2000) e differiscono da quelle presentate in questo manuale (Sezioni 2.15.1 e 2.15.2).
- Il TZI è simile al MAI ma vengono contati un massimo di quattro difetti per spermatozoo atipico: uno per la testa, per il segmento intermedio e per il segmento principale e uno per il residuo citoplasmatico in eccesso, qualunque sia il numero

reale di atipie per spermatozoo atipico. Possono essere utilizzati i criteri morfologici proposti in questo manuale.

- L' SDI è il numero di difetti diviso per il numero totale di spermatozoi (non solo gli spermatozoi atipici). Esso comprende molte categorie di anomalie della testa, ma solo una per ogni difetto del segmento intermedio e principale. Possono essere utilizzati i criteri morfologici proposti in questo manuale.

Tabella 3.1 Calcolo degli indici dei difetti multipli degli spermatozoi

	MAI	TZI*	SDI
Valore massimo		4.00	3.00
Classe	Spermatozoo atipico	Spermatozoo atipico	Tutti gli spermatozoi
(A) N° di spermatozoi contati	200	200	200
Spermatozoi normali (N)	46	46	46
Spermatozoi normali (%)	23	23	23
(B) N° di spermatozoi con difetti (200-46)	154	154	154
(1) N° di difetti della testa (MAI, SDI) o numero di spermatozoi con difetti della testa ≥ 1 (TZI)	284	154	212
(2) N° di difetti del segmento intermedio (MAI) o numero di spermatozoi con difetti del segmento intermedio ≥ 1 (TZI, SDI)	52	52	52
(3) N° di difetti del segmento principale (MAI) o numero di spermatozoi con difetti del segmento principale ≥ 1 (TZI, SDI)	54	46	46
(4) N° di spermatozoi con residuo citoplasmatico in eccesso	14	14	14
(C) Totale difetti MAI: (1) + (2) + (3) = (C)	392		
(D) Totale difetti TZI, SDI: (1) + (2) + (3) + (4) = (D)		266	324
Calcolo dell'indice	C/B	D/B	D/A
Indice	2.55	1.72	1.62

* Questa descrizione del TZI è in accordo con il lavoro originale (Menkveld et al., 2001) e con il manuale della European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) e la Nordic Association for Andrology (NAFA) (ESHRE/NAFA, 2002), che fornisce valori che vanno da 1 a 4. Questo differisce dalla descrizione fornita nella precedente edizione di questo manuale (WHO, 1999), nel quale il residuo citoplasmatico in eccesso era considerato un difetto del segmento intermedio e che forniva valori del TZI che andavano da 1 a 3.

3.1.2 Esempio

Esempio. Di 200 spermatozoi contati con un contacellule a 6 vie per il replicato 1, 42 sono stati contati come normali e 158 come atipici. Dei 158 spermatozoi atipici 140 presentavano difetti della testa, 102 del segmento intermedio, 30 del segmento principale e 44 un residuo citoplasmatico in eccesso. I risultati del replicato 2 erano: 36

normali e 164 atipici, dei quali 122 con difetti della testa, 108 con difetti del segmento intermedio, 22 con difetti del segmento principale e 36 con residuo citoplasmatico in eccesso. Per determinare il TZI, si divide il numero totale di difetti determinati ($140 + 102 + 30 + 44 + 122 + 108 + 22 + 36 = 604$ atipie) per il numero di spermatozoi atipici ($158 + 164 = 322$), cioè $TZI = 604/322 = 1.88$.

La Tabella 3.2 presenta i valori per MAI e TZI di uomini in cura presso cliniche dell'infertilità e uomini che hanno avuto figli negli ultimi 3 anni.

Tabella 3.2 Indici dei difetti nemaspermici da uomini di coppie fertili e infertili

	Coppie infertili		Coppie fertili	
	MAI ¹	TZI ²	MAI ³	TZI ²
Media	1.94	1.81	1.58	1.51
DS	0.37	0.3	0.2	0.2
Minimo	1.12	1.26	1.04	1.17
Massimo	3.9	2.64	2.38	2.07
Centili				
5	1.44		1.27	
10	1.51	1.74	1.34	1.33
25	1.67		1.44	
50	1.88	1.81	1.58	1.54
75	2.14		1.72	
90	2.44		1.86	
95	2.65		1.94	
N	4.930	103	994	107

¹ Dati non pubblicati da J Auger, Paris, con la classificazione morfologica di David (David et al., 1975, modificata da Auger, Eustache, 2000).

² Menkveld et al., 2001.

³ Jørgensen et al., 2001, con la classificazione morfologica di David (David et al., 1975, modificata da Auger, Eustache, 2000).

3.2 Colorazione immunocitochimica per i globuli bianchi (CD45)

I leucociti polimorfonucleati che hanno perso i loro granuli e le altre specie di leucociti, come linfociti, macrofagi o monociti, che non contengono perossidasi, non possono essere rilevati mediante il test alla o-toluidina per le perossidasi cellulari (vedi Sezione 2.18.1) ma possono essere individuati con tecniche di immunocitochimica. La colorazione immunocitochimica è più costosa e più lunga rispetto alla valutazione dell'attività perossidasi dei granulociti tuttavia è utile per la distinzione fra i leucociti e le cellule germinali.

3.2.1 Principi

Tutte le classi di leucociti umani esprimono un antigene (CD45) specifico il quale può essere identificato mediante l'utilizzo di uno specifico anticorpo monoclonale. Sce-

gliendo la tipologia di anticorpo primario questa procedura può essere adattata al fine di consentire l'individuazione di differenti tipi di leucociti, come macrofagi, monociti, neutrofili, cellule B o T quale che sia l'obiettivo.

3.2.2 Reagenti

1. PBS-Dulbecco (DPBS): vedi Appendice 4, Sezione A4. 2.
2. Tris buffer salino (TBS), pH 8.2; vedi Appendice 4, Sezione A4.8.
3. Acido cloridrico tetramisolo (levamisolo) 1.0 mol/l: disciogliere 2.4 g di levamisolo in 10 ml di acqua distillata.
4. Substrato: a 9.7 ml di TBS (pH 8.2) aggiungere 2 mg di naftolo AS-MX fosfato, 0.2 ml di dimetilformammide e 0.1 ml di 1.0 mol/l di levamisolo. Prima dell'uso, aggiungere 10 mg di Fast Red TR salino e filtrare (dimensioni pori filtro 0.45 μm).
5. Fissativo: acetone o acetone/metanolo/formaldeide: a 95 ml di acetone aggiungere 95 ml di metanolo assoluto e 10 ml di formaldeide al 37% (v/v).
6. Anticorpo primario: anticorpo monoclonale di topo verso il comune antigene leucocitario, detto CD45.
7. Anticorpo secondario: immunoglobuline di coniglio antitopo. La diluizione usata dipenderà dal titolo e dall'origine dell'anticorpo.
8. Complesso fosfatasi alcalina-antifosfatasi alcalina (APAAP).
9. Il colorante ematossilina di Harris (come contro-colorazione): vedi Appendice 4, Sezione A4.10.

3.2.3 Procedura

3.2.3.1 Preparazione del liquido seminale

1. Miscelare bene il liquido seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Miscelare una aliquota di circa 0.5 ml con cinque volumi di DPBS.
3. Centrifugare a 500 g per 5 minuti, eliminare il surnatante e risospendere il pellet di spermatozoi in 5 volte il suo volume di DPBS.
4. Centrifugare a 500 g per 5 minuti.
5. Ripetere questa procedura ancora una volta e risospendere il pellet in DPBS fino ad una concentrazione di circa 50×10^6 spermatozoi per ml.

3.2.3.2 Allestimento dello striscio di liquido seminale

1. Allestire strisci replicati su vetrini puliti (vedi Sezione 2.13.2) da aliquote di 5 μl di sospensione e lasciare asciugare all'aria.
2. Fissare le cellule in acetone assoluto per 10 minuti oppure in acetone/etanolo/formaldeide per 90 secondi.

3. Lavare due volte in TBS e scolare i vetrini.
4. I vetrini possono essere colorati immediatamente o avvolti in fogli di alluminio e conservati a -70°C per analizzarli in un secondo tempo.

3.2.3.3 Incubazione con anticorpi

1. Su ogni vetrino, segnare un'area di cellule fissate (un cerchio di circa 1 cm di diametro) con una matita a mina morbida (penna di delimitazione) e coprire l'area con 10 μl di anticorpo monoclonale primario.
2. Conservare orizzontalmente i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente in camera umida (per esempio una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua) per evitare l'essiccamento.
3. Lavare i vetrini due volte con TBS e lasciarli scolare.
4. Coprire la stessa area dello striscio con 10 μl di anticorpo secondario e incubare per 30 minuti in camera umida a temperatura ambiente.
5. Lavare due volte con TBS e lasciare i vetrini a scolare.
6. Aggiungere 10 μl di APAAP sulla stessa area.
7. Incubare per 1 ora in camera umida a temperatura ambiente.
8. Lavare due volte in TBS e lasciare i vetrini a scolare.
9. Incubare con 10 μl di naftolo fosfato come substrato per 20 minuti in camera umida a temperatura ambiente.

Nota: Per intensificare la reazione è possibile ripetere la colorazione con l'anticorpo secondario e l'APAAP con 15 minuti di incubazione per ciascun reagente.

3.2.3.4 Controcolorazione e montaggio

1. Una volta che i vetrini abbiano acquisito una colorazione rossastra, lavare con TBS.
2. Controcolorare per pochi secondi con ematosilina; lavare in acqua corrente e montare in un mezzo di montaggio acquoso (vedi Sezioni 2.14.2.4 e 2.14.2.5).

3.2.3.5 Valutazione del numero di cellule CD45 positive

1. Esaminare l'intera area colorata del vetrino al microscopio in campo chiaro ad ingrandimento 200x o 400x. Le cellule CD45 positive (leucociti) risultano colorate in rosso (vedi Fig. 3.1).
2. Contare separatamente le cellule CD45 positive e gli spermatozoi fino ad aver contato almeno 200 spermatozoi in ciascun replicato al fine di ottenere un errore di campionamento ragionevolmente basso (vedi Riquadro 2.7 e Tabella 2.2).

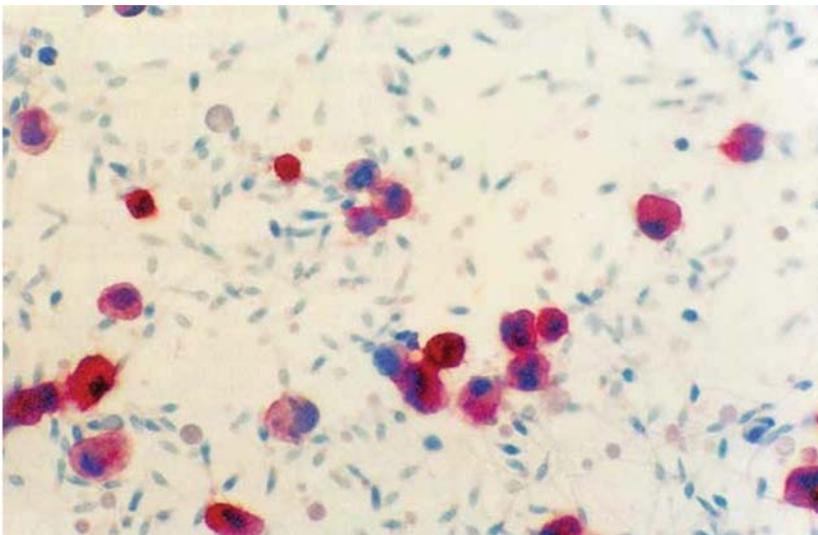
3. Contare il numero di cellule CD45 positive e gli spermatozoi con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.
4. Valutare il secondo striscio nello stesso modo (fino a contare 200 spermatozoi).
5. Calcolare la somma e la differenza delle due conte di cellule CD45 positive.
6. Determinare l'accettabilità della differenza in base alla Tabella 2.5 o Fig. A7.1, Appendice 7 (ciascuna di esse mostra la differenza massima fra due conte che ci si aspetta accada nel 95% dei campioni per il solo effetto della variabilità casuale).
7. Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione (vedi Sezione 3.2.3.6). Se la differenza è troppo alta, riallestire i vetrini in replicato (vedi Riquadro 2.10).
8. Riportare la concentrazione media di cellule CD45 positive arrotondando a due cifre significative.
9. Calcolare il numero totale di cellule CD45 positive per eiaculato (vedi Commento dopo la Sezione 3.2.3.9).

3.2.3.6 Calcolare la concentrazione di cellule CD45 nel liquido seminale

La concentrazione di cellule CD45 positive viene calcolata in relazione al numero di spermatozoi del vetrino. Se N è il numero di cellule CD45 positive contate nello stesso numero di campi per 400 spermatozoi, e S è la concentrazione di spermatozoi (10^6 per ml), allora la concentrazione (C) di cellule CD45 positive (espressa in 10^6 per ml) può essere calcolata con la formula $C = S \times (N/400)$.

Fig. 3.1 Leucociti in liquido seminale

Le cellule CD45 positive (leucociti) sono colorate in rosso.



Per gentile concessione di RJ Aitken.

3.2.3.7 Sensibilità del metodo

Se ci sono meno cellule CD45 positive che spermatozoi nel campione (per esempio <400), l'errore di campionamento sarebbe superiore al 5%. In questo caso riportare l'errore di campionamento per le cellule contate (vedi Tabella 2.2).

Se sono contate meno di 25 cellule CD45 positive riportare il numero di cellule contate ed il commento: "Troppe poche cellule per una corretta determinazione della concentrazione".

3.2.3.8 Esempi

Esempio 1. Nel replicato 1 si trovano 20 cellule CD45 positive per 200 spermatozoi, mentre nel replicato 2 si trovano 40 cellule CD45 positive per 200 spermatozoi. La somma dei valori (20 + 40) è 60 e la differenza (40 - 20) è 20. Dalla Tabella 2.5 si evince che questa supera la differenza che ci si attende per il solo effetto della variabilità casuale (15), quindi i risultati sono scartati e i vetrini nuovamente allestiti.

Esempio 2. Nel replicato 1 si trovano 25 cellule CD45 positive per 200 spermatozoi contati e nel replicato 2 si trovano 35 cellule CD45 positive per 200 spermatozoi. La somma dei valori (25 + 35) è 60 e la differenza (25 - 35) è 10. Dalla Tabella 2.5 si nota che tale valore è minore rispetto a quanto non ci si aspetti per il solo effetto della variabilità casuale (15) e quindi tale valore è accettato.

Per 60 cellule CD45 positive per 400 spermatozoi contati ed una concentrazione di spermatozoi di 70×10^6 per ml la concentrazione di CD45 è calcolata come $C = S \times (N/400)$ cellule per ml = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10.5 \times 10^6$ cellule per ml o 10×10^6 cellule per ml arrotondato a due cifre significative. Se verranno contate meno di 400 cellule, riportare l'errore di campionamento per 60 cellule come indicato in Tabella 2.2 (circa il 13%).

3.2.3.9 Valori di riferimento

Non ci sono attualmente valori di riferimento per le cellule CD45 positive nel liquido seminale di uomini fertili. Il valore soglia accettato di 1.0×10^6 cellule perossidasi positive per ml (vedi Sezione 2.18.1.8) implica che la concentrazione dei leucociti totali sia più alta dato che non tutti i leucociti sono perossidasi positivi.

Commento: Il numero totale di leucociti (numero totale di leucociti nell'eiaculato) può riflettere la severità di una condizione infiammatoria (Wolff, 1995). Il numero totale di cellule CD45 positive nell'eiaculato è ottenuto moltiplicando la concentrazione di cellule CD45 positive per il volume totale dell'eiaculato.

3.3 Interazione fra spermatozoi e muco cervicale

Il muco cervicale è idoneo per gli spermatozoi per un tempo limitato durante il ciclo mestruale (a metà ciclo) quando il muco, influenzato dall'azione degli estrogeni, favorisce la penetrazione degli spermatozoi. Il periodo di tempo durante il quale gli

spermatozoi possono penetrare il muco cervicale varia considerevolmente da donna a donna e può variare nello stesso individuo da un ciclo all'altro.

Nota: Vedi Appendice 5 per i dettagli riguardanti il prelievo, la conservazione e la valutazione delle caratteristiche del muco cervicale.

Commento: Quando un paziente non può raccogliere un campione seminale, il post-coital test (vedi Sezione 3.3.1) può fornire alcune informazioni circa i suoi spermatozoi.

3.3.1 Test *in vivo* (post-coital test)

3.3.1.1 Obiettivo

Gli obiettivi del post-coital test sono di determinare il numero di spermatozoi attivi nel muco cervicale e valutare la sopravvivenza degli stessi (Sombbrero, MacLeod, 1962) e il loro comportamento alcune ore dopo il coito (il ruolo di reservoir del muco) (Moghissi, 1976). Questa informazione potrebbe essere usata per valutare il significato di una positività al test per gli anticorpi antispermatozoo nel partner maschile o in quello femminile.

3.3.1.2 Tempistica

Il post-coital test deve essere effettuato il più vicino possibile, ma prima dell'ovulazione, come indicato dai criteri clinici, per esempio usuale lunghezza del ciclo, temperatura corporea basale, cambiamenti nel muco cervicale, citologia vaginale, valori sierici e urinari di LH ed estrogeni, ecografia ovarica. È importante che il muco sia esaminato in laboratorio a un tempo standard, fra 9 e 14 ore dopo il coito.

3.3.1.3 Istruzioni per la coppia

Nella preparazione del post-coital test la coppia deve scegliere il giorno più consono per il test e deve essere istruita.

1. Astenersi dai rapporti, e l'uomo dalla masturbazione, 2 giorni prima del test.
2. Avere un rapporto vaginale la notte precedente il giorno del test.
3. Non usare nessun lubrificante vaginale durante il rapporto e la donna non dovrà lavarsi dopo il rapporto (fare la doccia ma non il bagno completo è permesso).
4. Dopo aver seguito queste indicazioni, la donna dovrebbe presentarsi al centro per il test la mattina successiva.

3.3.1.4 Procedura

1. Inserire uno speculum non lubrificato nella vagina.
2. Con una siringa da insulina senza ago, una pipetta o un catetere di polietilene aspirare la maggior quantità possibile di liquido seminale nel fornice vaginale posteriore.

3. Con un'altra siringa o un catetere aspirare quanto più muco possibile dal canale endocervicale.
4. Porre il campione di muco su un vetrino e coprire con un vetrino coprioggetto (22 mm x 22 mm). Lo spessore di questo preparato può essere standardizzato sollevando il vetrino coprioggetto con gel di silicone o con gelatina di cera di vaselina (vedi Riquadro 3.1) contenenti sferule di vetro di 100 μm di diametro (Drobnis *et al.*, 1988).
5. Esaminare la preparazione con un microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 400x.

Nota: Per risultati affidabili è cruciale che il campione di muco sia di buona qualità e non contaminato dal sangue.

Riquadro 3.1 Preparazione della cera di vaselina

Preparare in anticipo la cera di vaselina. Può essere conservata a temperatura ambiente fino a che non sia pronta all'uso. Sciogliere la cera in un beaker (punto di fusione 48-66°C) e miscelare in vaselina liquida (circa una parte di cera e due parti di vaselina) con una bacchetta di vetro. Una volta che l'impasto è omogeneo, lasciare raffreddare lentamente. Mentre è ancora caldo, versare in una siringa da 3 ml o 5 ml (senza ago). Una volta che la miscela si è solidificata, montare sulla siringa un ago smussato 18 gauge.

3.3.1.5 Il campione di liquido seminale vaginale

Gli spermatozoi solitamente muoiono dopo 2 ore in vagina. Esaminare una preparazione a fresco del campione prelevato dalla vagina (vedi Sezione 2.4.2) per assicurarsi che il liquido seminale sia stato depositato in vagina.

3.3.1.6 Il campione di muco cervicale

Il numero di spermatozoi nella parte inferiore del canale cervicale dipende dal tempo trascorso dal rapporto sessuale. In alcuni casi 2-3 ore dopo il coito c'è un abbondante accumulo di spermatozoi nella parte inferiore del canale cervicale.

La valutazione del numero di spermatozoi presenti nel muco cervicale è tradizionalmente basata sul numero contato per campo visivo (vedi Riquadro 3.2). La concentrazione di spermatozoi nel muco deve essere espressa come numero di spermatozoi per μl .

Riquadro 3.2 Volume osservato per campo visivo in una preparazione di muco cervicale di profondità 100 μm

Il volume di muco in ogni campo microscopico dipende dall'area del campo (πr^2 , dove π è circa 3.142 e r^2 è il raggio del campo microscopico) e dalla profondità della camera (100 μm). Il diametro del campo microscopico può essere misurato con un micrometro o può essere misurato dividendo il diametro dell'apertura dell'oculare per

l'ingrandimento dell'obiettivo. Con un obiettivo 40x ed un oculare 10x di apertura 20 mm, il campo microscopico ha un diametro di circa 500 μm (20 mm/40). In questo caso $r = 250 \mu\text{m}$, $r^2 = 62.500 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196.375 \mu\text{m}^2$ e il volume è di 19.637.500 μm^3 o circa 20 nl.

Così, un conteggio di 10 spermatozoi pcv a 400x in un preparato di spessore 100 μm è equivalente a circa 10 spermatozoi per 20 nl di muco o 500 spermatozoi per μl . Tuttavia, poiché il numero totale di cellule contate è bassa, l'errore di campionamento è alto. Riportare l'errore di campionamento di 10 cellule come indicato in Tabella 2.2 (circa il 32%).

La motilità degli spermatozoi nel muco cervicale è indicata come segue:

- PR = motilità progressiva.
- NP = motilità non progressiva.
- IM = assenza di motilità.

L'indicatore della normale funzione cervicale più importante è la presenza di uno spermatozoo con motilità progressiva.

3.3.1.7 Interpretazione

- Il test è negativo se non si trovano spermatozoi nel muco.
- La presenza di eventuali spermatozoi con motilità progressiva rapida nel muco endocervicale 9-14 ore dopo il rapporto sessuale esclude come possibile causa di infertilità il fattore cervicale e l'autoimmunità antispermatozoo (Oei *et al.*, 1995).
- Quando spermatozoi NP mostrano una motilità agitata (shacking phenomenon) *in loco* potrebbe dipendere dalla presenza di anticorpi antispermatozoo nel muco o sugli spermatozoi.

Nota: Se il risultato iniziale è negativo o anomalo il post-coital test deve essere ripetuto.

Commento 1: Se non vengono trovati spermatozoi nel campione vaginale si dovrebbe chiedere alla coppia di confermare che sia avvenuta una eiaculazione intravaginale.

Commento 2: Un test negativo può essere dovuto ad una tempistica non corretta. Un test eseguito in una fase troppo precoce o tardiva del ciclo mestruale può risultare negativo in una donna fertile. In alcune donne il test potrebbe risultare positivo solamente in 1 o 2 giorni dell'intero ciclo mestruale. Quando l'ovulazione non può essere prevista con un ragionevole grado di accuratezza, potrebbe essere necessario ripetere il post-coital test più volte durante un ciclo o eseguire ripetuti test *in vitro*.

Commento 3: Sono necessari ripetuti post-coital test negativi con ottima temporizzazione nel ciclo mestruale per stabilire se i fattori cervicali possono essere considerati come cause di infertilità.

3.3.2 Test *in vitro*

Una valutazione dettagliata dell'interazione spermatozoi-muco cervicale può essere effettuata utilizzando i test di penetrazione *in vitro*. Questi test sono di solito eseguiti dopo un post-coital test con esito negativo e forniscono maggiori informazioni se effettuati con un test crociato con liquido seminale di donatore e muco cervicale di donatrice come controlli. Questi possono anche essere utilizzati per valutare la significatività di un test anticorpale positivo nel partner maschile o femminile.

- Quando lo scopo del test di interazione fra spermatozoi e muco cervicale è quello di confrontare la qualità di vari campioni di muco cervicale dovrebbe essere utilizzato un unico campione di liquido seminale normozoospermico.
- Quando lo scopo è la valutazione di molti campioni di liquido seminale si dovrebbe utilizzare un buon campione di muco cervicale prelevato a metà ciclo.

Nota: Vedere Appendice 5 per i dettagli sul prelievo, conservazione e valutazione delle caratteristiche del muco cervicale.

Commento 1: Il campione di muco cervicale di donatrice può essere recuperato da donne per le quali è prevista una inseminazione artificiale o il prelievo di ovociti per una fecondazione assistita. Il muco cervicale dovrebbe essere raccolto prima dell'inseminazione, in cicli naturali o in cicli stimolati con gonadotropine.

Commento 2: Le donne possono assumere etinil estradiolo per 7-10 giorni al fine di produrre muco estrogenizzato per il test (vedi Appendice 5, Sezione A5.2.1).

Commento 3: Le donne che assumono clomifene per induzione dell'ovulazione non dovrebbero diventare donatrici di muco a causa dei possibili effetti di questi antiestrogeni sulla cervice.

- Dovrebbe essere utilizzato muco cervicale prelevato a metà del ciclo.
- Il test *in vitro* dovrebbe essere effettuato entro un'ora dalla raccolta del liquido seminale al fine di prevenire disidratazione o cambiamenti della temperatura che possono alterare la qualità seminale.
- Il pH del muco cervicale prelevato dal canale endocervicale dovrebbe essere misurato con una cartina tornasole, con range 6.0-10.0, *in situ* o immediatamente dopo la raccolta. Se il pH viene misurato *in situ*, questa misurazione dovrà essere effettuata con cura perché sia corretta dal momento che il pH del muco esocervicale è sempre più basso rispetto a quello del muco endocervicale. La stessa attenzione dovrà essere applicata al fine di evitare la contaminazione del campione ad opera delle secrezioni vaginali che hanno un pH più basso.
- Gli spermatozoi sono suscettibili ai cambiamenti del pH del muco cervicale. Il muco acido immobilizza gli spermatozoi mentre il muco alcalino può aumentarne la motilità. L'eccessiva alcalinità del muco cervicale (pH >8.5) può influire negativamente sulla motilità degli spermatozoi. Il valore di pH ottimale per la migrazione degli spermatozoi e per la loro sopravvivenza nel muco cervicale è

compreso fra 7.0 e 8.5 che è il range di normalità del pH del muco cervicale a metà del ciclo mestruale. Mentre il valore di pH compreso fra 6.0 e 7.0 può essere compatibile con la penetrazione degli spermatozoi ma la loro motilità è spesso alterata per pH inferiori a 6.5 e il test spermatozoi-muco cervicale, spesso, non viene effettuato se il pH risulta minore di 7.0.

Nota: Gel surrogati come il muco cervicale bovino o i gel sintetici non possono essere considerati come equivalenti al muco cervicale umano per test *in vitro* per l'interazione fra spermatozoi e muco cervicale. Tuttavia l'uso di questi materiali fornisce informazioni circa la motilità degli spermatozoi in un mezzo viscoso (Neuwinger *et al.*, 1991; Ivic *et al.*, 2002).

3.3.3 Test *in vitro* semplificato

3.3.3.1 Procedura

1. Porre una goccia di muco cervicale su un vetrino e distenderla coprendola con un coprioggetto (22 mm x 22 mm). Lo spessore di questo preparato può essere standardizzato sollevando il vetrino coprioggetto con gel di silicone o con gelatina di cera di vaselina (vedi Riquadro 3.1) contenenti sferule di vetro di 100 µm di diametro (Drobnis *et al.*, 1988).
2. Porre una goccia di liquido seminale su ciascun lato del coprioggetto e a contatto con il bordo così che il liquido seminale si distribuisca per capillarità sotto il coprioggetto. In tal modo si ottiene una netta interfaccia fra muco cervicale e liquido seminale.
3. Conservare il vetrino in orizzontale per 30 minuti a 37°C in camera umida (per esempio una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua) per prevenirne l'essiccamento.
4. Esaminare l'interfaccia con un microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 400x.

3.3.3.2 Osservazioni

Osservare se sono presenti le seguenti caratteristiche:

1. In pochi minuti, si sviluppano delle falangi di spermatozoi che penetrano nel muco. Questa è una proprietà fisica dei fluidi e può talvolta accadere anche in liquidi seminali azoospermici (Perloff, Steinberg, 1963; Moghissi *et al.*, 1964).
2. Molti spermatozoi penetrano le falangi prima di entrare nel muco. In molti casi, un singolo spermatozoo sembra condurre una colonna di spermatozoi nel muco.
3. Una volta nel muco cervicale, gli spermatozoi si dispongono a ventaglio e sembrano muoversi senza una direzione precisa. Alcuni tornano verso il plasma seminale ma molti migrano profondamente nel muco cervicale fino a quando non incontrano resistenza da parte di detriti cellulari o leucociti.

4. Gli spermatozoi progrediscono nel muco per 500 μm o più (circa la lunghezza di 10 spermatozoi) dall'interfaccia spermatozoi-muco.
5. Gli spermatozoi sono mobili (annotare approssimativamente la percentuale di spermatozoi mobili e se sono dotati di motilità progressiva).

3.3.3.3 Interpretazione

L'interpretazione del test con vetrino semplificato è soggettiva poiché è impossibile standardizzare le dimensioni e la forma dell'interfaccia seme-muco in una preparazione su vetrino. Di conseguenza questo test può fornire una valutazione solo qualitativa dell'interazione muco-spermatozoi. Ciò nonostante si può fare un certo numero di utili osservazioni.

1. *Risultato normale:* gli spermatozoi penetrati nella fase mucosa sono mobili progressivi per più del 90%. Ciò suggerisce che non vi è problema nell'interazione spermatozoo-muco cervicale.
2. *Risultato povero:* gli spermatozoi penetrano nella fase mucosa ma molti non progrediscono per più di 500 μm (per es. circa la lunghezza di 10 spermatozoi) dall'interfaccia seme-muco. Ciò suggerisce che possono esserci problemi nell'interazione spermatozoo-muco cervicale.
3. *Risultato anomalo:* sia quando (1) gli spermatozoi penetrano nel muco ma rapidamente diventano immobili o mostrano un movimento "agitatorio" (shacking), sia quando (2) gli spermatozoi non penetrano l'interfaccia seme-muco. Le falangi possono formarsi o meno ma gli spermatozoi si allineano lungo il lato seminale dell'interfaccia. Ciò suggerisce la presenza di anticorpi antispermatozoo nel muco o sulla superficie degli spermatozoi.

Commento: Quando si ha un risultato anomalo utilizzando campioni di liquido seminale e muco della coppia, un controllo crociato – utilizzando spermatozoi o muco cervicale di donatore – può identificare quale dei due fra seme o muco cervicale sia responsabile del risultato anomalo.

3.3.4 Test del capillare

Il test del capillare venne originariamente ideato da Kremer (1965) e ne sono state proposte varie modifiche. Il test misura la capacità dello spermatozoo di penetrare una colonna di muco cervicale in un capillare. La procedura qui di seguito raccomandata è basata sul test originale.

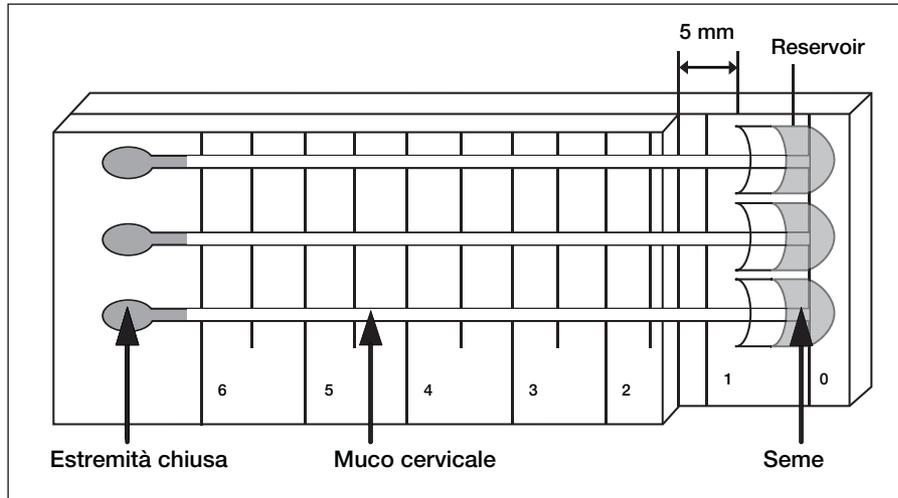
3.3.4.1 Materiali

Sono stati utilizzati vari tipi di capillari ma sono raccomandati i capillari piatti lunghi 5 cm con un diametro interno di 0.3 mm.

Può essere costruita in laboratorio, come segue, una scala centimetrata di penetrazione nemaspermica di Kremer (Fig. 3.2).

1. Incollare su un vetrino tre reservoirs (R) ottenuti tagliando un tubo di plastica da test (raggio circa 3.5 mm).
2. Incollare un secondo vetrino sul primo. Il secondo vetrino dovrebbe essere più corto di 1.5 cm e posizionato ad una distanza di 5 mm dal reservoir. Questo allestimento previene lo scivolamento del liquido seminale fra il capillare e il vetrino.
3. Attaccare una scala centimetrica al vetrino.

Fig. 3.2 La scala di valutazione per il test di Kremer



3.3.4.2 Procedura

1. Introdurre approssimativamente 100 μ l di liquido seminale liquefatto, ottenuto non più tardi di un'ora dall'eiaculazione, in ciascuno dei reservoirs seminali.
2. Aspirare il muco cervicale in ciascun capillare assicurandosi che non vengano introdotte bolle d'aria.
3. Sigillare l'estremità di ciascun tubo con un sigillante per capillari, plastilina o materiali simili. Dovrebbe essere utilizzata una quantità sufficiente di sigillante affinché la colonna di muco fuoriesca leggermente dall'estremità aperta del capillare.
4. Porre l'estremità aperta del capillare sul vetrino così che sporga di circa 0.5 cm nel reservoir contenente liquido seminale.
5. Conservare il dispositivo orizzontalmente per 2 ore a 37°C in una camera umida (per esempio una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua) per prevenire l'essiccamento del liquido seminale e del muco.
6. Esaminare il capillare con un microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 100x come sottolineato in Sezione 3.3.4.3.
7. Rimettere il dispositivo in un incubatore a 37°C e controllare i capillari dopo 24 ore per valutare la presenza di spermatozoi mobili progressivi.

3.3.4.3 Osservazioni

Dopo 2 ore valutare la distanza di migrazione, la densità di penetrazione, la riduzione di migrazione e la presenza di spermatozoi con motilità progressiva.

1. *Distanza di migrazione.* Annotare la distanza dalla fine del capillare nel reservoir del liquido seminale fino all'ultimo spermatozoo.
2. *Densità di penetrazione.* Misurare questa a 1 e a 4.5 cm dalla fine del capillare nel reservoir del liquido seminale. Ad ogni punto, annotare il numero medio di spermatozoi pcv (100x). Il numero medio è ottenuto dalla stima su 5 campi visivi adiacenti ed è espresso come un grado di densità di penetrazione come mostrato in Tabella 3.3. Per la classificazione del test, viene annotato il grado più alto di densità di penetrazione di spermatozoi che sia ad 1 o a 4.5 cm.

Tabella 3.3 Grado di densità di penetrazione degli spermatozoi

Media di spermatozoi pcv	Grado
0	1
0-5	2
6-10	3
11-20	4
21-50	5
51-100	6
>100	7

3. *Riduzione della migrazione.* Questa è calcolata come la diminuzione di densità di penetrazione a 4.5 cm paragonata con quella ad 1 cm. È espressa come la differenza di grado.

Esempio 1. La densità di penetrazione a 1 cm è 51-100 pcv e a 4.5 cm è 6-10. Il valore di riduzione della migrazione è 3 (da grado 6 a grado 3) (Tabella 3.3).

Esempio 2. La densità di penetrazione a 1 cm è 21-50 pcv e a 4.5 cm è 51-100. Il valore di riduzione della migrazione è 0 perché la densità della penetrazione è di fatto aumentata (da grado 5 a grado 6) (Tabella 3.3).

4. *Gli spermatozoi con motilità progressiva.* Determina la presenza nel muco cervicale di spermatozoi con motilità progressiva a 2 e a 24 ore.

3.3.4.4 Interpretazione

I risultati sono classificati come negativo, povero o buono in accordo con la Tabella 3.4.

3.4 Saggi biochimici per la funzione delle ghiandole accessorie

Tabella 3.4 Classificazione dei risultati del test del capillare

Distanza di migrazione (cm)		La più alta densità di penetrazione (numero di spermatozoi pcv a 1 o 4.5 cm)		Riduzione di migrazione da 1 a 4.5 cm (diminuzione nel grado)		Durata di movimenti progressivi nel muco (ore)	Classificazione
1		0		-		-	Negativo
<3	o	<10	o	>3	o	2	Povero
4.5	e	>50	e	<3	e	>24	Buono
Tutte le altre combinazioni dei risultati del test							Sufficiente

La scarsa qualità seminale può dipendere dalla produzione testicolare di spermatozoi atipici o dal danno post-testicolare agli spermatozoi nell'epididimo o da secrezioni alterate delle ghiandole accessorie nell'eiaculato. Le secrezioni delle ghiandole accessorie possono essere misurate per valutare la funzione della ghiandola. Per esempio, acido citrico, zinco, gamma glutamil-transpeptidasi e fosfatasi acida per la prostata, fruttosio e prostaglandine per le vescichette seminali, L-carnitina libera, glicerofosforilcolina (GPC) e alfa-glucosidasi neutra per l'epididimo.

Un'infezione può a volte causare la diminuzione nella secrezione di questi marker, ma il totale dei marker presenti può ancora rientrare nei valori normali. Un'infezione può anche causare un danno irreversibile all'epitelio secretivo, tanto che anche dopo una terapia la secrezione potrebbe rimanere bassa (Cooper *et al.*, 1990a; von der Kammer *et al.*, 1991).

- La capacità secretoria della prostata. La quota di zinco, acido citrico (Möllerling, Gruber, 1966) o fosfatasi acida (Heite, Wetterauer, 1979) nel liquido seminale fornisce una misura affidabile della secrezione della ghiandola prostatica e ci sono buone correlazioni fra questi markers. Un saggio spettrofotometrico per lo zinco è descritto in Sezione 3.4.1.
- La capacità secretoria delle vescicole seminali. Il fruttosio nel liquido seminale rispecchia la funzione secretoria delle vescicole seminali. Un metodo spettrofotometrico per il dosaggio è descritto in Sezione 3.4.2.
- La capacità secretoria dell'epididimo. L-carnitina, glicerofosforilcolina (GPC) e alfa-glucosidasi neutra sono marker epididimari usati in clinica. L'alfa-glucosidasi neutra ha dimostrato di essere più specifica e sensibile per i disordini epididimari rispetto all'L-carnitina e al GPC (Cooper *et al.*, 1990a). Nel plasma seminale sono presenti due isoforme di alfa-glucosidasi: la principale, la forma neutra, si origina unicamente dall'epididimo e la minore, forma acida, principalmente dalla prostata. Un semplice metodo spettrofotometrico per il dosaggio dell'alfa-glucosidasi neutra è descritto in Sezione 3.4.3.

Commento: Il contenuto totale di ogni secrezione della ghiandola accessoria nell'eiaculato riflette la funzione secretoria complessiva di quella ghiandola (Eliasson, 1975). Questo valore è ottenuto moltiplicando la concentrazione del marker della ghiandola accessoria per il volume totale dell'eiaculato.

3.4.1 Misurazione dello zinco nel plasma seminale

3.4.1.1 Premessa

È in commercio un kit per il dosaggio dello zinco sierico con metodo spettrofotometrico che può essere adattato per il liquido seminale. Il metodo qui di seguito descritto è basato su quello di Johnsen ed Eliasson (1987) modificato per usare un lettore a piastra a 96 pozzetti con una sensibilità di 4 $\mu\text{mol/l}$ (Cooper *et al.*, 1991). I volumi del liquido seminale e dei reagenti possono essere adattati proporzionalmente per gli spettrofotometri usando le cuvette da 3 ml o da 1 ml. Nel calcolare i risultati è necessario effettuare le appropriate correzioni.

3.4.1.2 Principio

Il componente 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilammina)-fenolo (5-Br-PAPS) si lega allo zinco producendo un cambiamento nel colore.

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow \text{Complesso } 5\text{-Br-PAPS-Zn}$ il quale assorbe luce a lunghezza d'onda 560 nm.

3.4.1.3 Reagenti

1. È presente in commercio un kit per la valutazione dello zinco nel siero. Usare solo il colore reagente A (due bottiglie da 60 ml) e colore reagente B (una da 30 ml).
2. Lo zinco standard (100 $\mu\text{mol/l}$). Sciogliere 0.144 g di $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 50 ml di acqua distillata e diluirlo 100 volte aggiungendo 1 ml a 99 ml di acqua distillata. Conservare in freezer a -20°C .
3. La curva standard. Diluire i 100 $\mu\text{mol/l}$ di zinco standard, preparati al punto 2 con acqua distillata per ottenere 5 standard 80, 60, 40, 20 e 10 $\mu\text{mol/l}$.
4. Coloranti. Miscelare 4 parti di reagente di colore A con una parte di reagente di colore B (sono necessari circa 25 ml per una piastra a 96 pozzetti). Questa soluzione cromogena è stabile per 2 giorni a temperatura ambiente o per una settimana a 4°C .
5. Congelare i campioni di plasma seminale per il controllo di qualità interno (Vedi Sezione 3.4.1.4, punto 1).

3.4.1.4 Procedura

1. Centrifugare il campione seminale dopo l'analisi per 10 minuti a 1.000 g. Decantare e conservare il plasma seminale privo di spermatozoi a -20°C all'analisi. Il plasma seminale privo di spermatozoi può essere conservato con altri campioni al fine di fornire uno standard per il controllo di qualità interno per saggi futuri.

2. Scongela il plasma seminale e miscelarlo con un vortex. Inoltre, scongelare e miscelare una aliquota del plasma seminale per il controllo di qualità interno.
3. Preparare le diluizioni di ogni campione di plasma seminale in replicato: a 300 µl di acqua distillata in ogni tubo da 1.5 ml aggiungere 5 µl di plasma seminale (con una micropipetta) e vortexare per 5 secondi.
4. Aggiungere aliquote in replicato da 40 µl di plasma seminale diluito come al punto 3 in una piastra a 96 pozzetti. Includere dei replicati bianchi (40 µl di acqua distillata) e replicati di 40 µl per ciascuno degli standard.
5. Aggiungere 200 µl di colorante a ogni pozzetto e miscelare per 5 minuti su un agitatore per piastra.
6. Leggere la piastra a lunghezza d'onda di 560 nm, usando il bianco per definire lo zero.

3.4.1.5 Calcolo

1. Leggere la concentrazione di zinco nel campione dalla curva standard (mmol/l) paragonando i valori di assorbenza.
2. Escludere i risultati che sono superiori al valore più alto e riesaminare questi campioni con una diluizione maggiore (per diluire usare acqua distillata).
3. Moltiplicare i risultati per il fattore di diluizione di 61 (5 µl di plasma seminale diluiti con 300 µl di acqua) per ottenere la concentrazione di zinco (mmol/l) in plasma seminale non diluito.
4. I replicati non dovrebbero differire più del 10%. Per esempio, la differenza tra valori/media dei valori $\times 100 \leq$ al 10%. Se non concordano, ripetere l'esame su due nuove aliquote di plasma seminale.
5. Moltiplicare la concentrazione di zinco per il volume totale di liquido seminale (ml) per ottenere il contenuto totale di zinco (µmol) nell'eiaculato.

3.4.1.6 Il limite di riferimento inferiore

Il limite di riferimento inferiore per lo zinco è 2.4 µmol per eiaculato (Cooper *et al.*, 1991 e dati non pubblicati da TG Cooper).

3.4.2 Dosaggio del fruttosio nel plasma seminale

3.4.2.1 Premessa

Il metodo descritto qui di seguito è basato su quello di Karvonen, Malm (1955), modificato per l'uso di un lettore a piastra con sensibilità di 74 µmol/l (Cooper *et al.*, 1990a). I volumi di liquido seminale e i reagenti possono essere proporzionalmente adattati per gli spettrofotometri usando cuvette da 3 ml o 1 ml. Nel calcolare i risultati devono essere effettuate le opportune correzioni.

3.4.2.2 Principio

Per azione del calore e del basso pH il fruttosio forma con l'indolo un complesso colorato.

Fruttosio + indolo $\xrightarrow{\text{calore + acido}}$ complesso, che assorbe la luce a lunghezza d'onda 470 nm.

3.4.2.3 Reagenti

È disponibile un kit in commercio per il dosaggio del fruttosio nel plasma seminale. In alternativa preparare i seguenti reagenti.

1. Agente deproteinizzante 1 (63 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4): sciogliere 1.8 g di $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml di acqua distillata.
2. Agente deproteinizzante 2 (1 mol/l NaOH): sciogliere 0.4 g di NaOH in 100 ml di acqua distillata.
3. Colorante (indolo 2 $\mu\text{mol/l}$ in conservante benzoato 16 $\mu\text{mol/l}$): sciogliere 200 mg di acido benzoico in 90 ml di acqua distillata agitando in bagnomaria a 60°C. Sciogliere 25 mg di indolo in questo e arrivare fino a 100 ml con acqua distillata. Filtrare (pori di 0.45 μm) e conservare a 4°C.
4. Il fruttosio standard (2.24 mmol/l): sciogliere 40 mg di D-fruttosio in 100 ml di acqua distillata. Conservare a 4°C o congelare in aliquote.
5. Curva standard: diluire 2.24 mmol/l standard con acqua distillata per ottenere 4 standard alle seguenti concentrazioni 1.12, 0.56, 0.28 e 0.14 mmol/l.
6. Congelare i plasma seminali per il controllo di qualità interno (vedi Sezione 3.4.2.4, Punto 1).

3.4.2.4 Procedura

1. Centrifugare il campione seminale dopo l'analisi per 10 minuti a 1.000 g. Decantare e conservare il plasma seminale privo di spermatozoi a -20°C fino all'analisi. Il plasma seminale privo di spermatozoi può essere conservato con altri campioni al fine di fornire uno standard per il controllo di qualità interno per saggi futuri.
2. Scongela il plasma seminale e miscelarlo con un vortex. Inoltre, scongelare e miscelare una aliquota dei plasma seminali per il controllo di qualità interno.
3. Preparare le diluizioni di ogni campione di plasma seminale in replicato: a 50 μl di acqua distillata in ogni tubo da 1.5 ml, aggiungere 5 μl di plasma seminale (con una micropipetta) e miscelare.
4. Deproteinizzare: a 55 μl di campione diluito aggiungere 12.5 μl di ZnSO_4 63 $\mu\text{mol/l}$ e 12.5 μl di NaOH 0.1 mol/l e miscelare. Lasciare riposare per 15 minuti a temperatura ambiente poi centrifugare a 8.000 g per 5 minuti.
5. Trasferire 50 μl di surnatante ad ogni campione in una provetta. Includere i replicati bianchi (50 μl di acqua) e 50 μl di replicati di ogni standard.

6. Aggiungere 50 μl di indolo ad ogni provetta e miscelare.
7. Aggiungere 0.5 ml di acido cloridrico concentrato (32% v/v) (HCl) ad ogni campione, coprire con parafilm e mescolare accuratamente sotto cappa.
8. Riscaldare per 20 minuti a 50°C a bagnomaria. Miscelare e raffreddare in acqua ghiacciata per 15 minuti.
9. Trasferire con cura sotto cappa 250 μl di preparato con una micropipetta in una piastra a 96 pozzetti.
10. Sigillare la piastra a 96 pozzetti con una pellicola adesiva per proteggere lo spettrofotometro dall'acido.
11. Leggere la piastra a 470 nm di lunghezza d'onda usando il bianco per definire lo zero.

3.4.2.5 Calcolo

1. Leggere la concentrazione di fruttosio nel campione dalla curva standard (mmol/l) ricavandolo dai valori di assorbanza.
2. Scartare i risultati che sono al di sopra dello standard più elevato e rivalutare questi campioni ad una diluizione maggiore (usare acqua distillata per diluire).
3. Moltiplicare i risultati di ogni campione per un fattore di diluizione 16 (5 μl di plasma seminale diluito con 75 μl di acqua ed agenti deproteinizzanti) al fine di ottenere la concentrazione di fruttosio (mmol/l) nel plasma seminale non diluito.
4. La differenza tra replicati non dovrebbe essere superiore al 10%, per esempio (la differenza tra i valori/media dei valori) $\times 100 \leq 10\%$. Se non concordano, ripetere il dosaggio su due nuove aliquote di seme.
5. Moltiplicare la concentrazione di fruttosio per il volume totale di liquido seminale (ml) per ottenere il contenuto totale di fruttosio (μmol) dell'eiaculato.

3.4.2.6 Limite di riferimento inferiore

Il valore minimo di riferimento per il fruttosio è 13 μmol per eiaculato (Cooper *et al.*, 1991 e dati non pubblicati da TG Cooper).

Commento: Un basso livello di fruttosio nel liquido seminale è caratteristico dell'ostruzione del dotto eiaculatore, assenza congenita bilaterale dei dotti deferenti (de la Taille *et al.*, 1998; Daudin *et al.*, 2000; von Eckardstein *et al.*, 2000), eiaculazione parziale retrograda e deficit androgenico.

3.4.3 Dosaggio dell'alfa-glucosidasi neutra nel plasma seminale

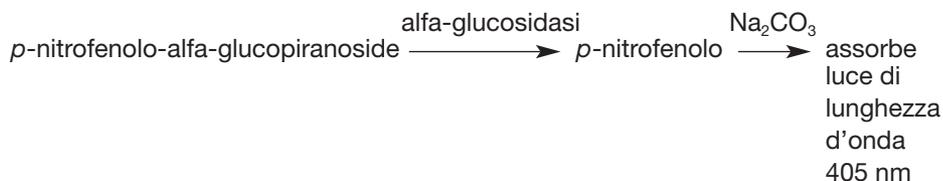
3.4.3.1 Considerazioni generali

Il plasma seminale contiene sia un isoenzima alfa-glucosidasi neutro che ha origine

nell'epididimo che un isoenzima acido prodotto dalla prostata. Quest'ultimo può essere selettivamente inibito dal sodio dodecilsolfato (SDS) (Paquin *et al.*, 1984) al fine di consentire la misurazione dell'alfa-glucosidasi neutra che riflette la funzione epididimaria. Calcolare l'esaurimento del substrato non glucosidasi correlato, utilizzando l'inibitore castanospermina rende l'esame più sensibile. Il metodo descritto qui di seguito è utilizzato per un lettore a piastra a 96 pozzetti con sensibilità 1.9 mU/ml (Cooper *et al.*, 1990b). I volumi del liquido seminale e dei reagenti possono essere proporzionalmente aggiustati per lo spettrofotometro con le cuvette da 3 o da 1 ml. Nel calcolare i risultati devono essere effettuate le appropriate correzioni.

3.4.3.2 Principio

La glucosidasi converte il substrato glucopiranoside sintetico in *p*-nitrofenolo che diventa giallo con l'aggiunta di carbonato di sodio.



3.4.3.3 Reagenti

È disponibile in commercio un kit per il dosaggio nel seme dell'alfa-glucosidasi neutra epididimaria. Solo i kit che includono SDS e castanospermina sono consigliati per il dosaggio di questo enzima nel liquido seminale. In alternativa preparare i seguenti reagenti.

1. Buffer 1 (0.2 mol/l fosfato, pH 6.8): sciogliere 4.56 g di $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml di acqua distillata. Sciogliere 2.72 g di KH_2PO_4 in una aliquota separata di 100 ml di acqua distillata. Miscelare approssimativamente uguali volumi di ogni soluzione fino a un pH di 6.8.
2. Buffer 2: sciogliere 1g di SDS in 100 ml di buffer 1. SDS precipita se conservato a 4°C, ma torna in soluzione riscaldandolo leggermente.
3. Reagente 1 (per bloccare la reazione, 0.1 mol/l di carbonato di sodio): sciogliere 6.20 g di $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 500 ml di acqua.
4. Reagente 2: sciogliere 0.1 g di SDS in 100 ml del colorante 1.
5. Substrato *p*-nitrofenolo glucopiranoside (PNPG) (5 mg/ml): sciogliere 0.1 g di PNPG in 20 ml di buffer 2 e riscaldare la soluzione su un agitatore a circa 50°C miscelando per circa 10 minuti. Alcuni cristalli potrebbero rimanere insoluti. La soluzione dovrebbe essere tenuta a 37°C durante l'uso. Fare una soluzione fresca per ogni dosaggio.
6. Inibitore di glucosidasi per il bianco (castanospermina, 10mmol/l): sciogliere 18.9 mg di castanospermina in 10 ml di acqua distillata. Diluire 10 volte in acqua distillata per ottenere una soluzione di lavoro 1mmol/l. Congelare aliquote di circa 1ml a -20°C.

7. Curva standard del *p*-nitrofenolo (PNP) (5mmol/l): sciogliere 69.5 mg di PNP in 100 ml di acqua distillata riscaldando la soluzione se necessario. Conservare a 4°C al buio in una bottiglia di vetro scuro o ricoperta con un foglio di alluminio. Preparare una soluzione standard fresca ogni 3 mesi.
8. Preparare una curva standard (entro l'ultima ora di incubazione): porre 400 µl di soluzione madre di PNP 5 mmol/l in una fiasca graduata da 10 ml e arrivare fino a 10 ml con il reagente 2 (200 µmol/l). Diluire i 200 µmol/l standard con il reagente 2 per ottenere 4 standard addizionali di 160, 120, 80 e 40 µmol/l PNP.
9. Congelare, per il controllo di qualità interno, un pool di campioni di plasma seminale (vedi Sezione 3.4.3.4, Passaggio 1).

3.4.3.4 Procedura

1. Centrifugare il campione di liquido seminale per 10 minuti a 1.000 g. Decantare e conservare il plasma seminale privo di spermatozoi a -20°C fino al dosaggio. Il plasma seminale privo di spermatozoi può essere miscelato con altri campioni al fine di fornire uno standard interno per il controllo di qualità per successivi dosaggi.
2. Scongela il plasma seminale e miscelare con un vortex. Scongela anche e miscelare una aliquota del campione di plasma seminale per il controllo di qualità interno.
3. Porre 15 µl di campioni replicati in ognuna delle 2 provette da 1.5 ml utilizzando una micropipetta. Includere i replicati dei bianchi (15 µl di acqua) e i campioni di plasma seminale quadruplicati (15 µl) per il controllo di qualità interno.
4. Aggiungere a due campioni del controllo di qualità interno 8 µl di 1mmol/l di castanospermina per ottenere il valore del bianco del plasma seminale.
5. Aggiungere 100 µl del substrato PNPG, ad ogni provetta, a circa 37°C.
6. Miscelare con il vortex ogni provetta e incubare a 37°C per 2 ore (il controllo dell'esatta temperatura e del tempo sono importanti).
7. Bloccare l'incubazione dopo 2 ore aggiungendo 1 ml di reagente 1 e miscelare.
8. Trasferire 250 µl di campioni e di standard in una piastra a 96 pozzetti.
9. Leggere la piastra con uno spettrofotometro a piastra a 405 nm di lunghezza d'onda entro 60 minuti usando il bianco per definire lo zero.

3.4.3.5 Calcolo

1. Leggere la concentrazione di PNP prodotto dal campione (µmol/l), comparando l'assorbanza con la curva standard.
2. Scartare i campioni che si trovano al di sopra dello standard più elevato e rivalutare questi campioni dopo diluizione (usare buffer 1 per diluire).
3. Moltiplicare per il fattore di correzione (0.6194; vedi Nota) al fine di ottenere l'attività di glucosidasi neutra nel plasma seminale non diluito (UI/l).

4. Sottrarre l'attività (UI/l) della castanospermina del bianco del plasma seminale da ogni campione per ottenere l'attività corretta (relativa alla glucosidasi).
5. La differenza tra replicati non dovrebbe essere superiore al 10%, per esempio (la differenza tra i valori/media dei valori) $\times 100 \leq 10\%$. Se non concordano ripetere il dosaggio su due nuove aliquote di seme.
6. Moltiplicare l'attività corretta di glucosidasi per il volume totale di liquido seminale (ml) per ottenere l'attività di glucosidasi (mU) dell'eiaculato.

Nota: Una Unità Internazionale (UI) dell'attività di glucosidasi è definita come la produzione di 1 μmol di prodotto (PNP) per minuto a 37°C. In questo esame l'attività proviene da 15 μl di plasma seminale in un volume totale di 1.115 μl in 120 minuti, quindi il fattore di correzione è $(1.115/15) / 120 = 0.6194$.

3.4.3.6 Limite di riferimento

Il limite di riferimento minimo per la alfa-glucosidasi neutra è 20 mU per eiaculato (Cooper *et al.*, 1991 e dati non pubblicati da TG Cooper).

3.5 Analisi computerizzata del liquido seminale

3.5.1 Introduzione

Fino a poco tempo fa non era possibile misurare la concentrazione di spermatozoi mediante l'analisi computerizzata del liquido seminale (CASA) a causa delle difficoltà nel distinguere gli spermatozoi dai detriti (ESHRE, 1998). Tuttavia i progressi nella tecnologia ed in particolare l'utilizzo di colorazioni fluorescenti del DNA e algoritmi per l'individuazione della coda, consentono di determinare la concentrazione degli spermatozoi e quindi la concentrazione di spermatozoi con motilità progressiva (Zinaman *et al.*, 1996; Garrett *et al.*, 2003).

Premesso che venga posta adeguata attenzione nella preparazione dei campioni e nell'utilizzo dello strumento, il CASA può essere utilizzato per alcune applicazioni diagnostiche di routine. Le procedure di controllo di qualità sono necessarie per stabilire e mantenere uno standard elevato di operatività dello strumento (vedi Capitolo 7).

I sistemi CASA vengono prodotti da numerose aziende. Queste macchine sono in grado di misurare la cinetica nemaspermica ed alcune possono anche essere utilizzate per valutare la concentrazione degli spermatozoi. Qualcuna di queste possiede moduli per la valutazione semiautomatica della morfologia. Il CASA, per la valutazione di motilità, concentrazione e morfologia presenta due vantaggi rispetto ai metodi manuali: esso ha una elevata precisione e fornisce dati quantitativi dei parametri cinetici del liquido seminale (motilità progressiva rettilinea e motilità iperattivata, caratteristica delle cellule capacitate).

Alcuni studi hanno suggerito che i dati di concentrazione e delle caratteristiche di

motilità progressiva ottenuti con il CASA siano correlati in modo significativo con le percentuali di fecondazione *in vitro* ed *in vivo*, così come il tempo di attesa al concepimento (Liu *et al.*, 1991a; Barratt *et al.*, 1993; Irvine *et al.*, 1994; Krause, 1995; Donnelly *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2000; Garrett *et al.*, 2003; Shibahara *et al.*, 2004).

L'uso del CASA per la valutazione della motilità e della concentrazione degli spermatozoi è descritto rispettivamente nelle Sezioni 3.5.2 e 3.5.3, mentre la Sezione 3.5.4 contiene una riflessione sullo status dell'analisi morfologica computerizzata.

3.5.2 Uso del CASA per valutare la motilità nemaspermica

I sistemi CASA sono utilizzati per l'analisi cinetica nemaspermica poiché sono in grado di individuare le cellule mobili. Le valutazioni della percentuale di motilità possono essere non affidabili perché dipendono dalla determinazione del numero di spermatozoi immobili e i detriti possono essere confusi con spermatozoi immobili. Molti fattori possono influire sulle prestazioni degli strumenti CASA, per esempio preparazione del campione, frequenza dei fotogrammi, concentrazione degli spermatozoi, profondità della camera di conteggio (Davis, Katz, 1992; Mortimer, 1994a e b; Kraemer *et al.*, 1998).

Nonostante tutto se vengono rispettate le appropriate procedure è possibile ottenere risultati affidabili e riproducibili (Davis, Katz, 1992).

È necessario consultare le linee guida sull'utilizzo del CASA (Mortimer *et al.*, 1995; ESHRE, 1998).

Se si utilizza il CASA per ottenere i parametri di movimento dovrebbero essere analizzate almeno 200 tracce di spermatozoi mobili per campione. Questo implica che dovranno essere individuati molti più spermatozoi. Se gli spermatozoi devono essere classificati per tipo di motilità o se sono previste altre analisi di variabilità nel campione saranno necessarie le tracce di almeno 200 spermatozoi mobili e se possibile 400. Il numero di spermatozoi analizzati in ogni campione dovrebbe essere standardizzato.

Lo strumento CASA dovrebbe essere connesso ad un software che consenta l'organizzazione dei dati e l'analisi statistica. Le distribuzioni di molti dei parametri di movimento non sono di tipo gaussiano. La mediana piuttosto che la media è quindi più appropriata come tendenza di ogni variabile. Le misurazioni sul singolo spermatozoo potrebbero dover essere trasformate matematicamente prima che vengano effettuate analisi statistiche.

3.5.2.1 Procedura

Per assicurare prestazioni ottimali, prima del suo utilizzo, ogni apparecchio CASA deve essere impostato correttamente. I produttori indicano i settaggi ottimali ma gli utilizzatori dovrebbero controllare che lo strumento stia funzionando entro il grado richiesto di affidabilità e ripetibilità. L'utilizzo di materiali appropriati per il controllo di qualità, per esempio videoregistrazione, è fondamentale (vedi Appendice 7, Sezione A7.5). Molti autori hanno discusso i settaggi del CASA in un contesto generale (Davis, Katz, 1992; Mortimer, 1994b; ESHRE, 1998).

3.5.2.2 Preparazione dei campioni

I campioni di liquido seminale per il CASA dovrebbero essere raccolti e preparati come spiegato nel Capitolo 2. Il CASA system deve mantenere il campione a 37°C poiché il movimento nemaspermico è sensibile alla temperatura. Le caratteristiche di motilità e concentrazione degli spermatozoi possono essere valutate nel liquido seminale non diluito. La motilità degli spermatozoi può essere valutata su campioni con concentrazioni di spermatozoi fra i 2×10^6 per ml e 50×10^6 per ml (Garrett *et al.*, 2003).

Nei campioni con alte concentrazioni di spermatozoi (per esempio maggiori di 50×10^6 per ml) possono verificarsi con alta frequenza collisioni e ciò può facilmente indurre errori. Tali campioni dovrebbero essere diluiti con plasma seminale proveniente dallo stesso soggetto.

1. Centrifugare una aliquota del campione a 16.000 g per 6 minuti per ottenere plasma seminale privo di spermatozoi.
2. Diluire il campione di liquido seminale con il plasma seminale privo di spermatozoi per portare la concentrazione al di sotto dei 50×10^6 per ml.

Le camere di conta monuso con profondità di 20 μm forniscono risultati affidabili. Questo è un sistema a camera doppia; entrambe le camere dovrebbero essere riempite e analizzate. Dovrebbero essere esaminati numerosi campi rappresentativi: leggere 6 campi per camera (12 campi totali) usualmente fornisce risultati affidabili. Dovrebbero essere valutati come minimo 200 spermatozoi in ogni camera. Si applicano gli stessi principi del controllo di qualità per la valutazione standard della motilità (vedi Sezione 2.5.2). I campioni possono essere analizzati sia in modo diretto che con videoregistrazione. L'analisi di videoregistrazione (da una videocassetta, cd-rom o DVD) consente una migliore standardizzazione e l'implementazione di procedure a garanzia di qualità (vedi Appendice 7, Sezione A7.5). Solitamente il produttore raccomanderà il tipo di strumento di registrazione da utilizzare e la regolazione dell'illuminazione necessaria per ottenere il massimo contrasto fra le teste degli spermatozoi e lo sfondo.

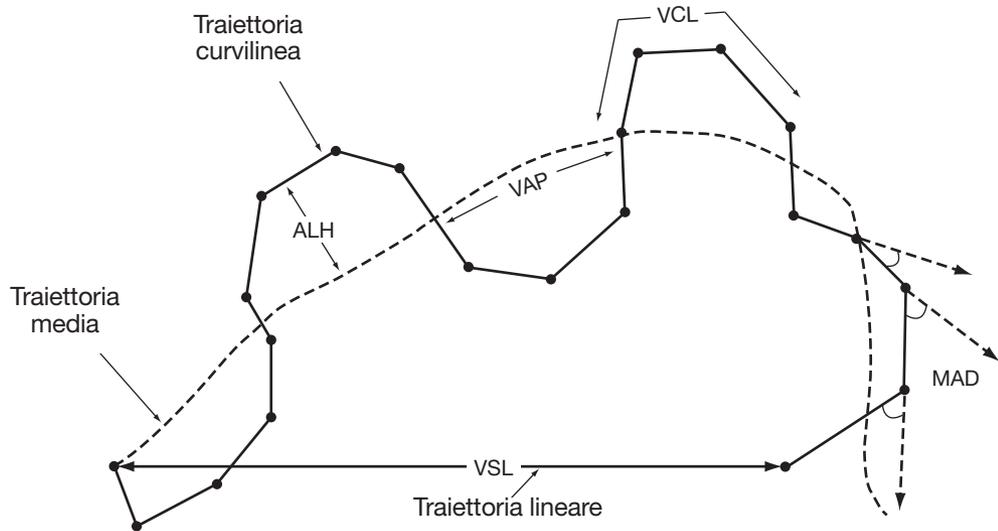
Esiste un po' di disaccordo in merito al tempo per il quale gli spermatozoi dovrebbero essere seguiti per ottenere risultati accurati, ma un minimo di un secondo dovrebbe essere sufficiente per le misurazioni CASA basali (Mortimer, 1994b).

3.5.2.3 Terminologia CASA

Alcune terminologie standard per le variabili misurate da sistemi CASA sono illustrate nella Figura 3.3.

1. VCL, velocità curvilinea ($\mu\text{m/s}$). Velocità media della testa di uno spermatozoo lungo la sua traiettoria curvilinea come percepito in due dimensioni al microscopio. Una misura del vigore della cellula.
2. VSL, velocità ($\mu\text{m/s}$) in linea retta (rettilinea). Velocità media della testa di uno spermatozoo lungo la linea retta dalla sua posizione di partenza all'ultima.

Fig. 3.3 Terminologia standard per le variabili misurate dai sistemi CASA



3. VAP, velocità media della traiettoria ($\mu\text{m/s}$). Velocità media della testa di uno spermatozoo lungo la sua traiettoria media. Questa traiettoria viene calcolata arrotondando la traiettoria curvilinea secondo gli algoritmi dello strumento CASA; questi algoritmi variano a seconda della strumentazione per cui i valori possono non essere comparabili tra sistemi.
4. ALH, ampiezza dello spostamento laterale della testa (μm). Grandezza dello spostamento laterale della testa di uno spermatozoo lungo la sua traiettoria media. Può essere espresso come un massimo o una media di tali spostamenti. Strumentazioni CASA differenti calcolano l'ALH utilizzando algoritmi differenti per cui i valori possono non essere comparabili tra sistemi.
5. LIN, linearità. La linearità di una traiettoria curvilinea VSL/VCL .
6. WOB, oscillazione. Una misura dell'oscillazione della reale traiettoria lungo la traiettoria media, VAP/VCL .
7. STR, rettilineità. Linearità della traiettoria media, VSL/VAP .
8. BCF, frequenza dei battiti (Hz). La frequenza media in cui la traiettoria curvilinea interseca la traiettoria media.
9. MAD, spostamento angolare medio (gradi). I valori assoluti della media dell'angolo di curvatura della testa dello spermatozoo lungo la sua traiettoria curvilinea.

Nota: Strumenti CASA differenti utilizzano algoritmi matematici differenti per calcolare molte di queste variabili di movimento. La comparabilità di misurazioni effettuate con questi strumenti non è ancora nota.

3.5.3 Uso del CASA per valutare la concentrazione di spermatozoi

L'impiego di colorazione fluorescente del DNA tramite CASA consente di determinare in modo accurato la concentrazione di spermatozoi mobili e la percentuale di motilità, ma è richiesta una metodologia molto scrupolosa (Garrett *et al.*, 2003). Per esempio, se si utilizzano le camere monouso, è importante valutare il campione a diverse distanze dal sito di caricamento della camera, poiché la distribuzione degli spermatozoi attraverso la camera non sarà uniforme (Douglas-Hamilton *et al.*, 2005b). È essenziale una conferma con un emocitometro.

È possibile misurare concentrazioni di spermatozoi fra 2×10^6 per ml e 50×10^6 per ml (Garrett *et al.*, 2003). Campioni con una concentrazione di spermatozoi superiori a 50×10^6 per ml dovranno essere diluiti (vedi Sezione 3.5.2.2).

Commento: La strumentazione CASA individua e conteggia le teste degli spermatozoi fluorescenti. Senza una valutazione microscopica non vi è modo di sapere se gli spermatozoi sono intatti (cioè se la testa è attaccata alla coda).

3.5.4 Valutazione morfometrica computerizzata dello spermatozoo

L'analisi di immagine ha la potenzialità di fornire avanzamenti considerevoli nella quantificazione, oggettività e riproducibilità della valutazione morfologica del liquido seminale. Sono disponibili sistemi commerciali per quantizzare la morfologia della testa e del tratto intermedio dello spermatozoo, e possibilmente del tratto principale. Tuttavia, difetti della coda che alterano la motilità possono essere valutati più direttamente utilizzando il CASA per misurare motilità e movimento.

I sistemi CASA classificano generalmente la testa e il tratto intermedio dello spermatozoo come normale o atipico e forniscono la media e la deviazione standard o la mediana per le dimensioni della testa e tratto intermedio, l'ellitticità e regolarità della testa e una misurazione dell'area acrosomiale in funzione della colorazione.

I sistemi automatizzati potenzialmente forniscono maggiore obiettività, precisione e riproducibilità rispetto ai sistemi manuali (Menkveld *et al.*, 1990). Precisione e riproducibilità possono essere inferiori al 7% (Garrett, Baker, 1995), che è superiore alla valutazione manuale effettuata da un tecnico esperto. La riproducibilità e l'accuratezza dei risultati di una valutazione morfometrica computerizzata del liquido seminale (CASMA) può tuttavia essere compromessa da variabili metodologiche quali la messa a fuoco, l'illuminazione, la preparazione e colorazione del campione (Lacquet *et al.*, 1996; Menkveld *et al.*, 1997) e da difficoltà tecniche nel differenziare correttamente le teste degli spermatozoi dai detriti inseminali, in particolare quando la concentrazione nemaspermica è bassa (Garrett, Baker, 1995; Menkveld *et al.*, 1997; Coetzee *et al.*, 1999a, b). La natura della valutazione automatica significa che non c'è modo di compensare difetti e artefatti della preparazione. Dunque, piccole differenze nell'ombreggiatura di fondo relative alle cellule colorate possono produrre una classificazione inesatta o l'impossibilità di identificare la cellula come uno spermatozoo, con un conseguente errore nei risultati.

Come per la valutazione manuale della morfologia, procedure e strumenti devono

essere standardizzati e deve essere fatto un controllo della qualità al fine di assicurare risultati affidabili e comparabili. Il liquido seminale può essere trattato come nella Sezione 2.13.2.4 per ridurre il fondo per le registrazioni CASMA. Se la concentrazione di spermatozoi è bassa ($<2 \times 10^6$ per ml), i campioni dovranno essere concentrati mediante centrifugazione (vedi Sezione 2.13.2.2).

Nota: La centrifugazione può influire sulla morfologia degli spermatozoi e il suo impiego deve essere annotato.

Due studi hanno riportato relazioni significative fra i risultati CASMA e fertilità. Coetzee *et al.* (1999c) hanno dimostrato che i risultati della valutazione automatizzata della morfologia degli spermatozoi normali sono indicatori significativi sia di percentuale di fecondazione *in vitro* che di gravidanza. Garrett *et al.* (2003) hanno dimostrato che gli spermatozoi nel seme che mostrano una morfologia della testa tipica di quelli che si legano alla zona pellucida ("zona preferred", %Z) insieme con la velocità rettilinea (VSL) nel liquido seminale erano significativamente ed indipendentemente correlati ai tassi di gravidanza naturali in un ampio gruppo di coppie infertili. Le relazioni di %Z e VSL con la fertilità sembrano essere continue e non è stato identificato alcun valore soglia oltre il quale non vi è un ulteriore incremento del tasso di gravidanza. Sono necessari più studi sulla fertilità di ampie popolazioni al fine di migliorare l'applicazione del CASA alla misurazione della morfologia nemaspermica.

I sistemi automatizzati possono ricoprire un ruolo nel fornire i dati per sistemi di controllo della qualità, ma per dimostrare i loro benefici negli studi clinici sono necessarie ulteriori ricerche.

CAPITOLO 4 Procedure di ricerca

Quando si devono effettuare dei test sulla funzione del liquido seminale, è fondamentale che gli spermatozoi vengano separati dal plasma seminale entro un'ora dall'ejaculazione, questo per limitare qualsiasi danno allo spermatozoo proveniente da prodotti di cellule non nemaspermiche. Così come aumenta la nostra conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano la funzione seminale, allo stesso modo aumenteranno anche le opportunità per lo sviluppo di nuovi test diagnostici. Per esempio, dati recenti enfatizzano l'importanza della compattazione e dell'integrità nucleare del DNA nel determinare la competenza funzionale dello spermatozoo umano. Vari studi suggeriscono associazioni fra l'integrità del DNA e l'organizzazione della cromatina negli spermatozoi e la fertilità (Sakkas *et al.*, 1998; Aitken, Krausz, 2001; Virro *et al.*, 2004).

Allo stesso modo, progressi nella comprensione delle vie di segnali di trasduzione che regolano la funzione degli spermatozoi avranno implicazioni per lo sviluppo di test diagnostici capaci di generare informazioni dettagliate sulla precisa natura dei processi che sono alterati negli spermatozoi degli uomini infertili.

Allo scopo di capire più approfonditamente le basi biologiche dell'infertilità maschile è stata sviluppata una serie di test funzionali mirati alla valutazione della capacità dello spermatozoo umano di andare incontro a processi essenziali per il concepimento: adesione alla zona pellucida, esocitosi dell'acrosoma e fusione con la membrana vitellina dell'ovocita.

4.1 Specie reattive dell'ossigeno

4.1.1 Introduzione

L'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la presenza di elevata attività enzimatica citoplasmatica come la creatinfosfochinasi possono essere legate alla presenza di spermatozoi atipici con un eccesso di residuo citoplasmatico nel tratto intermedio (Rao *et al.*, 1989; Gomez *et al.*, 1996; Aitken *et al.*, 2004).

Le specie reattive dell'ossigeno sono metaboliti dell'ossigeno e includono l'anione superossido, il perossido di idrogeno, i radicali idrossilici e idroperossilici e l'ossido nitrico. Quando presenti in eccesso possono indurre dei cambiamenti patologici determinando un danno da ossidazione ai lipidi cellulari, alle proteine e al DNA (Grievau, Le Lannou, 1997; Aitken *et al.*, 2003; Henkel *et al.*, 2004). Molte cellule sono fornite di sistemi di antiossidanti enzimatici (superossido dismutasi, glutatione perossidasi e catalasi) o di sistemi antiossidanti non enzimatici (acido urico, acido ascorbico, α -tocoferolo), e quando queste difese vengono sopraffatte la funzione degli spermatozoi è alterata (Agarwal *et al.* 2004).

Nell'ejaculato umano le specie reattive dell'ossigeno sono prodotte sia dagli spermatozoi (Aitken, Klarkson, 1987; Alvarez *et al.*, 1987; Iwasaki, Gagnon, 1997) che dai leucociti (Aitken, West, 1990).

Il plasma seminale possiede scavengers antiossidanti dei radicali liberi ed enzimi

antiossidanti che possono essere carenti in alcuni uomini (Jones *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1996). Quindi la rimozione del plasma seminale durante la preparazione degli spermatozoi per la fecondazione assistita (vedi Capitolo 5) può rendere queste cellule vulnerabili ad un attacco ossidativo. Una produzione elevata di ROS può causare danno perossidativo e perdita della funzione nemaspermica come danno al DNA nei genomi nucleari e mitocondriali (Sawyer *et al.*, 2003). I test di sopravvivenza nemaspermica sono frequentemente utilizzati per valutare la qualità dello spermatozoo umano. I risultati di tali test sono altamente correlati con lo status di perossidazione lipidica degli spermatozoi (Gomez *et al.*, 1998).

Una procedura di chemiluminescenza, utilizzando sonde come luminolo o lucigenina, può essere usata per misurare la produzione di ROS e l'attività redox degli spermatozoi umani.

4.1.2 Misurazione delle specie reattive dell'ossigeno generate da sospensione di spermatozoi

4.1.2.1 Principio

In questa procedura è utilizzato un luminometro sensibile per misurare bassi quantitativi di luce generata da spermatozoi umani in presenza di una sonda chemiluminescente quale è il luminolo.

La metodologia descritta utilizza una miscela di luminolo e perossidasi di rafano per effettuare misurazioni sensibili della produzione di perossido di idrogeno. È possibile utilizzare altre sonde (per esempio la lucigenina) per valutare la produzione di ROS da liquidi seminali umani lavati (Aitken *et al.*, 1992; McKinney *et al.*, 1996).

I segnali generati in risposta alla sonda formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) sono specifici per la popolazione leucocitaria poiché sulla superficie degli spermatozoi umani non sono presenti recettori FMLP (Krausz *et al.*, 1992). Le risposte possono essere calibrate con sospensioni contenenti numeri conosciuti di leucociti polimorfonucleati (vedi Fig. 4.1).

Commento 1: La precisa attività misurata da queste sonde è tuttora argomento di discussione (Aitken *et al.*, 2004) ma i dati generati riflettono la funzione degli spermatozoi (Zorne *et al.*, 2003; Said *et al.*, 2004).

Commento 2: Un singolo leucocita può generare come minimo 100 volte più ROS di uno spermatozoo. Un basso livello di contaminazione leucocitaria può quindi avere una maggiore influenza sui segnali chemiluminescenti generati da una sospensione di spermatozoi.

4.1.2.2 Reagenti

1. Soluzione salina bilanciata di Hanks (HBSS), senza rosso fenolo (vedi Appendice 4, Sezione A4.5).
2. Krebs-Ringer medio (KRM), senza rosso fenolo (vedi Appendice 4, Sezione A4.7).

3. Luminolo, 25 mmol/l: sciogliere 29 mg di luminolo (5-amino-2.3-diidro-1.4-ftalazinedione) in 10 ml di dimetil sulfossido (DMSO).
4. Perossidasi di rafano (HRP) (tipo VI, 310 UI/mg proteina): sciogliere 5 mg (1.550 UI) in 1 ml di KRM.
5. FMLP (sonda specifica per leucociti, 10 mmol/l): sciogliere 44 mg di FMLP in 10 ml di DMSO.
6. Forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA), 1 mmol/l di soluzione madre: sciogliere 6.2 mg di PMA in 10 ml di DMSO. Diluire 1 mmol/l di PMA 100 volte in DMSO per ottenere una soluzione di lavoro di 10 μ mol/l.
7. Zimosan.
8. Gelatina: 0.1% (1 g/l) in HBSS

4.1.2.3 Opsonizzazione dello zimosan

1. Sospendere 500 mg di zimosan in 10 ml di HBSS.
2. Miscelare vigorosamente con un vortex.
3. Bollire per 20 min in un contenitore coperto per prevenirne l'evaporazione.
4. Centrifugare a 500 g per 5 minuti.
5. Lavare il pellet con 10 ml di HBSS.
6. Ripetere il lavaggio.
7. Risospendere il pellet in 5 ml di siero umano fresco pipettando delicatamente.
8. Incubare per 20 minuti.
9. Centrifugare a 500 g per 5 minuti.
10. Lavare il pellet con 10 ml di HBSS.
11. Ripetere il lavaggio.
12. Risospendere il pellet fino ad una concentrazione di 50 mg/ml in 10 ml di HBSS + 0.1% (1 g/l) di gelatina pipettando delicatamente.
13. Conservare a -20°C fino all'utilizzo.

4.1.2.4 Determinazione della generazione spontanea di ROS

1. Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3) e prelevare un volume contenente almeno 10×10^6 spermatozoi per la valutazione dei ROS.
2. Lavare gli spermatozoi (vedi Sezione 5.3) in KRM e portare fino ad una concentrazione di 10×10^6 spermatozoi per ml.
3. Pipettare 400 μ l della sospensione di spermatozoi lavati risospesi in KRM senza rosso fenolo in una cuvetta per luminometrico. Fare attenzione a non creare bolle d'aria.

4. Aggiungere 4 μl di luminolo 25 mmol/l.
5. Aggiungere 8 μl di soluzione di perossidasi di rafano (1.550 UI/ml).
6. Monitorare il segnale chemioluminescente nel luminometro a 37°C per 5 minuti fino a che non si sia stabilizzato.

La generazione di ROS da parte dei leucociti seminali può essere stimolata mediante aggiunta di FMLP, zimosan o PMA, peraltro PMA stimola anche la produzione di ROS da parte degli spermatozoi.

4.1.2.5 Generazione di ROS da leucociti provocata da FMLP

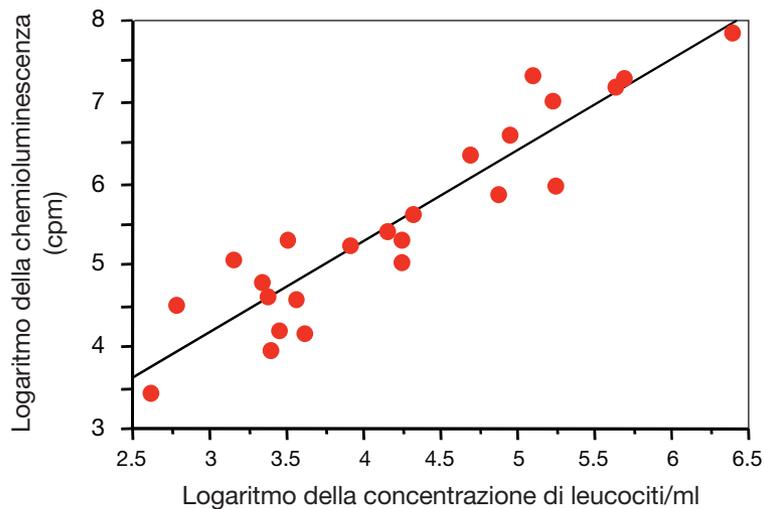
Aggiungere 2 μl di FMLP 10 mmol/l al campione di cui sopra per stimolare un segnale di chemioluminescenza dai leucociti presenti nella sospensione nemaspermica (vedi Fig. 4.2).

4.1.2.6 Generazione di ROS da leucociti provocata da zimosan

Aggiungere 20 μl di zimosan opsonizzato al campione di cui sopra per stimolare un segnale di chemioluminescenza dai leucociti presenti nella sospensione nemaspermica. La dimensione del segnale generato successivamente è direttamente proporzionale al livello di contaminazione di leucociti (vedi Fig. 4.1).

Fig. 4.1 Chemioluminescenza generata in risposta a trattamento con zimosan opsonizzato

Esiste una relazione logaritmica lineare fra la concentrazione di leucociti e il segnale di chemioluminescenza.



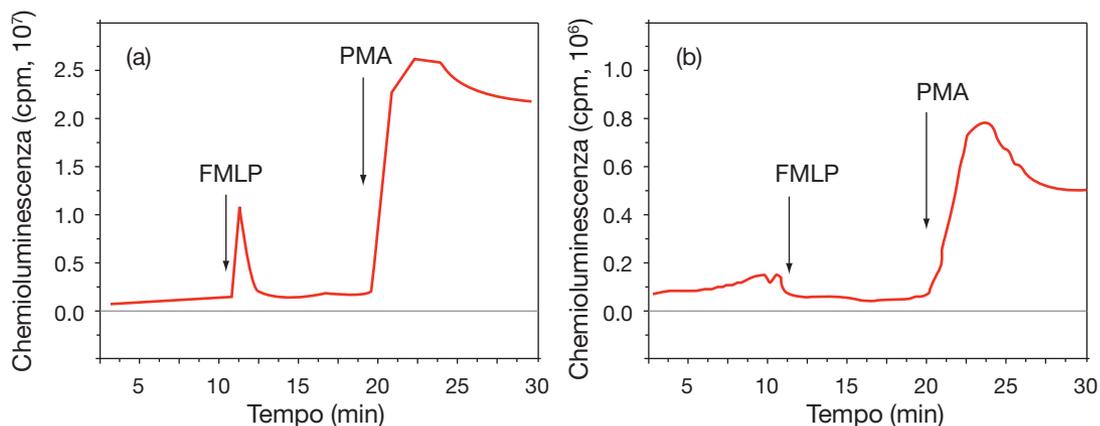
Dati gentilmente concessi da RJ Aitken.

4.1.2.7 Test di generazione di ROS da leucociti e spermatozoi PMA indotto

1. Diluire la soluzione madre di PMA 100 volte in DMSO per ottenere una soluzione di lavoro 10 $\mu\text{mol/l}$.
2. Attendere che il segnale FMLP o zimosan opsonizzato si estingua.
3. Aggiungere 4 μl di PMA 10 $\mu\text{mol/l}$ alla stessa sospensione di spermatozoi (concentrazione finale 100 nmol/l) per stimolare un segnale di chemiluminescenza dagli spermatozoi (vedi Fig. 4.2).

Fig. 4.2 Rispettivi contributi delle sottopopolazioni di leucociti e spermatozoi alla capacità di generare specie reattive dell'ossigeno da parte di sospensioni cellulari

(a) In presenza di contaminazione di leucociti, si osserva la generazione di un picco di ROS in seguito all'aggiunta di una sonda FMLP leucocito-specifica. La conseguente aggiunta di PMA genera un persistente intenso segnale di chemiluminescenza sia dalla popolazione di spermatozoi che dai leucociti.
 (b) In assenza di contaminazione di leucociti la risposta FMLP è persa mentre PMA induce un segnale marcato di chemiluminescenza dagli spermatozoi (vedi anche Krausz *et al.*, 1992).



Dati gentilmente concessi da RJ Aitken.

4.1.2.8 Risultati

Esaminare l'andamento grafico dopo stimolazione per evidenziare la contaminazione leucocitaria.

4.2 Test di interazione fra spermatozoo e ovocita

Il legame dello spermatozoo alla zona pellucida dà inizio alla reazione acrosomiale, al rilascio degli enzimi litici acrosomiali sia liberi che legati e consente allo spermatozoo di penetrare attraverso la matrice della zona mediante l'aumento delle spinte flagellari della motilità iperattivata. Per valutare gli eventi di legame possono essere utilizzati ovociti non vitali, ovociti umani non fecondabili prelevati da autopsia, da ovaie rimosse chirurgicamente o da tentativi di fecondazioni *in vitro* falliti. Questi

test possono essere svolti utilizzando ovociti conservati in soluzione salina ma di solito la fattibilità è limitata dalla carente disponibilità di ovociti umani (Yanagimachi *et al.*, 1979; Kruger *et al.*, 1991; Liu, Baker, 1992b; Liu *et al.*, 2004).

4.3 Test di legame alla zona pellucida

Un test di legame alla zona pellucida, il test dell'emizona (Burkman *et al.*, 1988), coinvolge la microdissezione della zona pellucida in 2 metà uguali e l'esposizione di ogni metà alla stessa concentrazione di spermatozoi del paziente o del controllo. Un altro test di legame alla zona pellucida (Liu *et al.*, 1988, 1989) consiste nel marcare gli spermatozoi del campione con un colorante fluorescente (per es. fluoresceina) e un campione seminale di controllo con un altro colorante (per es. rodamina). Il numero di spermatozoi, sia del test che del controllo legati alla stessa zona intatta, viene contato e riportato come percentuale. È stato dimostrato che i risultati di entrambi i test di legame alla zona sono correlati con i tassi di fecondazione *in vitro* (Liu, Baker, 2003).

Può essere clinicamente utile valutare il numero di spermatozoi adesi nei casi di fecondazione *in vitro* fallimentare, infertilità idiopatica e teratozoospermia (Franken *et al.*, 1989; Liu, Baker, 1992a, 2004). L'adesione di nessuno o pochi spermatozoi alla zona pellucida indica solitamente un difetto dello spermatozoo.

4.4 Valutazione della reazione acrosomiale

La reazione acrosomiale fisiologica avviene nella zona pellucida in seguito al legame dello spermatozoo. La reazione acrosomiale indotta dalla zona pellucida può essere valutata su spermatozoi rimossi dalla superficie della zona pellucida o esposti a proteine disaggreganti della zona pellucida umana (Liu, Baker, 1994, 1996; Franken *et al.*, 2000). Nei casi di teratozoospermia e oligozoospermia alcuni pazienti possono presentare analisi seminali normali ma spermatozoi con reazioni acrosomiali, zona pellucida indotte, alterate. Altri pazienti possono avere spermatozoi che presentano un legame normale alla zona pellucida ma che hanno una reazione acrosomiale zona pellucida indotta povera (Liu *et al.*, 2004). Questi test sono limitati dalla scarsa disponibilità di zone pellucide umane. Non è possibile utilizzare come surrogati zone pellucide provenienti da altri primati per via della loro specificità di legame (Bedford, 1977; Liu *et al.*, 1991b; Oehninger *et al.*, 1993). Altri stimoli, come gli ionofori del calcio, possono produrre la reazione acrosomiale ma i risultati non sono correlabili a quelli ottenuti dalla reazione acrosomiale zona pellucida indotta (Liu, Baker, 1996). Lo status acrosomiale dopo l'induzione della reazione acrosomiale può essere valutato mediante microscopio o citofluorimetro (Fenichel *et al.*, 1989; Henley *et al.*, 1994; Cooper, Yeung, 1998), con lectine fluorescenti come il *Pisum sativum* (agglutinina di pisello) (vedi Sezione 4.4.1) o l'*Arachis hypogaea* (lectina di arachide), o gli anticorpi monoclonali contro l'antigene acrosomiale CD46 (Cros, 1995).

4.4.1 Procedura mediante fluorescenza per la valutazione dello status acrosomiale

Questo metodo venne originariamente sviluppato da Cros *et al.* (1986) e in seguito modificato da Liu, Baker (1988). La procedura modificata è più semplice, riproducibile e fornisce immagini molto chiare (Fig 4.3). È preferibile utilizzare una preparazione di spermatozoi con elevata motilità, priva di contaminanti quali leucociti, cellule germinali e spermatozoi morti. Quindi il campione dovrebbe essere lavato (vedi Sezione 5.3) o separato mediante swim-up (vedi Sezione 5.4) o mediante gradiente di densità (vedi Sezione 5.5), in funzione della qualità del campione.

4.4.1.1 Reagenti

1. Agglutinina *Pisum sativum* (PSA) marcato con isotiocianato di fluoresceina (FITC) (PSA-FITC).
2. Buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4.
3. NaCl 0.9% (9g/l): sciogliere 0.9 g di NaCl in 100 ml di acqua distillata.
4. Etanolo 95% (v/v).
5. Soluzione madre di PSA: diluire 2 mg di PSA-FITC in 4 ml di PBS. Conservare aliquote di 0.5 ml a -20°C.
6. Soluzione di lavoro PSA: diluire 0.5 ml di soluzione madre di PSA in 10 ml di PBS e conservare a 4°C. Questa soluzione è stabile fino a 4 settimane.

4.4.1.2 Lavaggio semplice degli spermatozoi

1. Miscelare bene il campione seminale (vedi Riquadro 2.3) e rimuovere una aliquota di circa 0.2 ml.
2. Diluire fino a 10 ml con soluzione salina allo 0.9% (9g/l).
3. Centrifugare a 800 g per 10 minuti.
4. Decantare il surnatante eccetto 20-40 µl.
5. Risospendere delicatamente con una pipetta il pellet di spermatozoi nel surnatante rimanente.
6. Ripetere la procedura di lavaggio.

4.4.1.3 Trattamento di purificazione del seme

1. Diluire le preparazioni ottenute con il swim-up (vedi Sezione 5.4) o le preparazioni per gradiente di densità dopo lavaggio (vedi Sezione 5.5), portando a 10 ml con soluzione salina.
2. Centrifugare a 800 g per 10 minuti.
3. Decantare tutto eccetto 20-40 µl di surnatante.
4. Risospendere delicatamente con una pipetta il pellet di spermatozoi nel surnatante rimanente.

4.4.1.4 Allestimento di uno striscio

1. Allestire strisci replicati di liquido seminale di circa 1 cm di lunghezza da circa 5 μ l di sospensione.
2. Valutare gli strisci ancora umidi attraverso un microscopio a contrasto di fase (400x).
3. Assicurarsi che gli spermatozoi siano uniformemente distribuiti sui vetrini senza sovrapposizioni.
4. Lasciare asciugare i vetrini all'aria.
5. Fissare in etanolo al 95% (v/v) per 30 minuti.
6. Lasciare asciugare all'aria.

4.4.1.5 Colorazione con PSA-FITC

1. Porre 10 ml di soluzione di lavoro PSA-FITC in una vaschetta per colorazione verticale.
2. Immergere i vetrini fissati ed asciutti nel colorante PSA-FITC.
3. Lasciare a colorare per più di un'ora a 4°C.
4. Lavare ciascun vetrino con acqua distillata e utilizzare un mezzo di montaggio etanolo solubile (vedi Sezioni 2.14.2.4 e 2.14.2.5).

Nota: Tempi di colorazione più lunghi (fino a 18 ore) non altereranno i risultati PSA. Tempi più brevi (meno di un'ora) renderanno difficile la valutazione del vetrino.

4.4.1.6 Valutazione

Osservare il vetrino con ottiche a fluorescenza ad ingrandimento 400x ad immersione ad olio con filtro di eccitazione 450-490 nm. Classificare gli spermatozoi come segue:

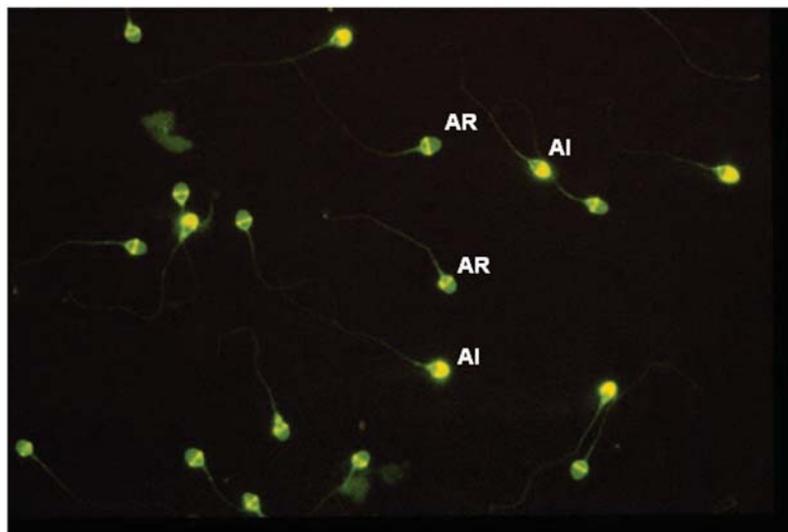
1. Acrosomi intatti (AI): spermatozoi con oltre metà della testa uniformemente fluorescente (vedi Fig. 4.3).
2. Acrosomi reagiti (AR): spermatozoi con solo una banda fluorescente al segmento equatoriale o del tutto privi di colorazione fluorescente nella regione dell'acrosoma (vedi Fig. 4.3).
3. Acrosomi atipici: tutti gli altri spermatozoi.

4.4.1.7 Contare gli spermatozoi reagiti

1. Contare il numero di spermatozoi in ogni categoria acrosomiale (AI e AR) con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.
2. Valutare 200 spermatozoi in ogni replicato in modo da ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso (vedi Riquadro 2.5).
3. Calcolare la media e la differenza delle due percentuali di spermatozoi con acrosoma reatto dai vetrini replicati.
4. Determinare l'accettabilità della differenza dalla Tabella 2.1 o dalla Fig. A7.2, Appendice 7 (ciascuna mostra la massima differenza fra le due percentuali attese nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento).
5. Se la differenza fra le percentuali è accettabile, riportare la percentuale media degli spermatozoi con acrosoma reatto. Se la differenza è troppo alta riallestire i due vetrini (vedi Riquadro 2.6).
6. Riportare la percentuale di spermatozoi reatti contati al numero intero più vicino.

Fig. 4.3 Colorazione degli spermatozoi umani mediante agglutinina fluorescente *Pisum sativum* (PSA)

Vengono mostrati AI, spermatozoi con la regione prossimale della testa (acrosoma) colorata, e AR, spermatozoi con bande equatoriali colorate o regioni post-acrosomiali.



Microfotografia gentilmente concessa da HWG Baker.

4.4.2 Test per la reazione acrosomiale indotta

La reazione acrosomiale è un processo di esocitosi che avviene in seguito al legame degli spermatozoi con la zona pellucida e deve avere luogo prima che lo spermatozoo possa penetrare la parete dell'ovocita e unirsi con esso. L'influsso di calcio viene considerato come un evento di innesco di una normale reazione acro-

somiale. Indurre il flusso di calcio utilizzando uno ionoforo del calcio è un modo di valutare la competenza degli spermatozoi capacitati di andare incontro alla reazione acrosomiale (Aitken *et al.*, 1993). Questo è la base del test denominato anche test della reazione acrosomiale dopo stimolo ionoforo (ARIC). Comunque sono necessarie maggiori valutazioni prima di considerare il test dello status acrosomiale come un test clinico di routine.

4.4.2.1 Reagenti

1. Ham F-10 (vedi Appendice 4, Sezione A4.4) con 3.5% (35 g/l) di albumina sierica umana (HSA).
2. BWW (Biggers, Whitten e Whittingham) soluzione madre: vedi Appendice 4. Sezione A4.1.
3. DMSO (Dimetil solfossido).
4. Ionoforo A23187, 1 mmol/l di soluzione madre: sciogliere 5.23 mg di A23187 in 10 ml di DMSO.
5. Glutaraldeide 3% (v/v) o etanolo 70% (v/v).

4.4.2.2 Procedura

1. Attendere 30-60 minuti per la completa fluidificazione del campione seminale.
2. Preparare per ogni test il terreno capacitante di Ham F-10-HSA.
3. Scaldare il terreno a 37°C prima dell'uso, preferibilmente in un incubatore 5% (v/v) CO₂.
4. Preparare una popolazione di spermatozoi con elevata motilità, senza contaminanti come leucociti, cellule germinali e spermatozoi morti, mediante gradiente di densità (vedi Sezione 5.5), usando Ham F-10-HSA.
5. Preparare controllo e replicati in provette, ciascuna delle quali contenente approssimativamente 1 ml di sospensione con 1×10^6 di spermatozoi mobili.
6. Incubare la sospensione di spermatozoi per 3 ore a 37°C in 5% (v/v) CO₂ per indurre la capacitazione (togliere il tappo alla provetta e permettere lo scambio di gas). Se non è disponibile un incubatore a CO₂ utilizzare un terreno tamponato con HEPES (vedi Appendice 4, Sezione A4.1, Nota 1), tappare la provetta saldamente e incubare a 37°C.
7. Aggiungere 10 µl di soluzione madre A23187 (1mmol/l) alle provette di replicato al fine di ottenere una concentrazione di 10 µmol/l.
8. Aggiungere 10 µl di DMSO nella provetta di controllo.
9. Incubare tutte le provette a 37°C per 15 minuti.
10. Prelevare una piccola aliquota da ogni provetta per la valutazione della motilità.
11. Bloccare la reazione aggiungendo 100 µl di glutaraldeide al 3% (v/v) o di etanolo al 70% (v/v).

12. Trasferire gli spermatozoi fissati su un vetrino precedentemente pulito e asciugato all'aria.
13. Colorare gli spermatozoi usando un marcatore fluorescente (vedi Sezione 4.4.1.5).
14. Valutare al microscopio a fluorescenza a 400x con immersione ad olio a 450-490 nm di eccitazione.
15. Valutare la percentuale di spermatozoi con acrosomi reagiti nei campioni in esame (la %AR del test) e nei campioni di controllo (%AR controllo).

4.4.2.3 Valutazione

1. La reazione acrosomiale dopo ionoforo (ARIC) è la %AR del test meno la %AR del controllo.
2. La differenza di norma è circa 15% AR.
3. I valori al di sotto del 10% AR sono considerati alterati.
4. Valori fra 10% AR e 15% AR suggeriscono che la funzione nemaspermica potrebbe essere alterata.
5. Valori di controllo superiori al 15% indicano una prematura e spontanea AR.

4.4.2.4 Controllo di qualità

1. Un campione di controllo positivo (seme di un uomo i cui spermatozoi avevano precedentemente risposto bene allo ionoforo (>15%)) dovrebbe essere preparato ogni volta che viene effettuato il test.
2. Ogni volta che si prepara un lotto di colorante, effettuare un test crociato con il precedente colorante, usando come controllo positivo spermatozoi con una risposta nota, per assicurarsi che il colorante sia stato preparato in modo idoneo.

4.5 Hamster test

La fusione dello spermatozoo umano all'ovocita di hamster è, dal punto di vista funzionale, identica a quella con la membrana vitellina umana poiché ha inizio dalla membrana plasmatica sottostante il segmento equatoriale dello spermatozoo umano con acrosoma reagito. Il test di penetrazione in ovocita di hamster (HOP) o test di penetrazione nemaspermico, è differente dalla situazione fisiologica in quanto la zona pellucida è assente. Un protocollo standard per questo test è spiegato di seguito.

Commento: Il test di penetrazione di ovocita di hamster convenzionale dipende dalla reazione acrosomiale spontanea in popolazioni di spermatozoi incubati per lunghi periodi *in vitro*. Dal momento che questa procedura è meno efficace rispetto al processo biologico e può coinvolgere diversi meccanismi, sono stati frequentemente registrati risultati falsi negativi (pazienti i cui spermatozoi falliscono nell'hamster test ma hanno

successo nel fertilizzare gli ovociti umani *in vitro* o *in vivo*) (WHO, 1986). Malgrado questo limite potenzialmente confondente, il test fornisce informazioni sulla natura della fusione delle membrane della testa degli spermatozoi capacitati.

Due dei segnali chiave intracellulari che iniziano la reazione acrosomiale successiva all'interazione spermatozoo-zona pellucida sono l'ingresso di calcio e l'alcalinizzazione del citoplasma. Poiché entrambi possono essere generati artificialmente con un catione ionoforo bivalente (Aitken *et al.*, 1993), viene descritto anche un metodo alternativo che utilizza spermatozoi stimolati con lo ionoforo.

4.5.1 Protocollo

4.5.1.1 Reagenti

1. Soluzione madre BWW (vedi Appendice 4, Sezione A4.1).
2. Ialuronidasi (300-500 UI/mg).
3. Tripsina tipo I (10.000 BAEE UI/mg).
4. Cera (punto di fusione 48-66°C).
5. Paraffina.
6. Olio minerale.
7. Ovociti di hamster: questi possono essere acquistati in commercio o ottenuti dalla superovulazione di hamster (vedi Riquadro 4.1).
8. Dimetil sulfossido (DMSO).
9. Soluzione madre di ionoforo 1 mmol/l (per protocollo alternativo): sciogliere 5.23 mg di catione bivalente ionoforo A23187 in 10 ml di DMSO.

4.5.1.2 Protocollo standard senza induzione con ionoforo

1. Miscelare accuratamente il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Preparare i campioni seminali mediante centrifugazione per gradiente di densità (vedi Sezione 5.5) o swim-up (vedi Sezione 5.4).
3. Decantare la maggior parte del surnatante dal pellet.
4. Rompere delicatamente il pellet con una pipetta e valutare la concentrazione di spermatozoi nel pellet (vedi Sezioni 2.7, 2.8).
5. Diluire il pellet fino ad una concentrazione di circa 10×10^6 spermatozoi per ml con approssimativamente 0.5 ml di terreno.
6. Inclinare la provetta con un angolo di 45° per incrementare l'area della superficie.
7. Incubare le sospensioni di spermatozoi per 18-24 ore a 37°C in 5% (v/v) CO₂ per indurre la capacitazione (allentare il tappo della provetta per consentire lo

scambio di gas). Se non fosse disponibile un incubatore CO₂ utilizzare un terreno tamponato Hepes (vedi Appendice 4, Sezione A4.1, Nota 1), tappare accuratamente le provette e incubare a 37°C.

8. Riposizionare le provette in posizione verticale per 20 minuti per consentire alle cellule immobili di depositarsi dopo la capacitazione.
9. Aspirare gli spermatozoi dotati di motilità da 1/3 della sommità del surnatante prestando attenzione a non toccare gli spermatozoi morti all'*interfacie* e trasferirli in una nuova provetta.
10. Portare la concentrazione a 3.5×10^6 spermatozoi mobili per ml di terreno.
11. Con una micropipetta aspirare volumi noti (50-150 μ l) di sospensione seminale e distribuirli lentamente in una piccola piastra di Petri. Con una pipetta di plastica monouso coprire ogni goccia con olio minerale preriscaldato equilibrato in CO₂ prestando attenzione a non toccare la sospensione seminale. Aggiungere sufficiente quantità di olio per circondare e coprire adeguatamente ogni goccia di spermatozoi.

4.5.1.3 Protocollo alternativo con ionoforo Ca²⁺

1. Preparare una popolazione di spermatozoi con elevata motilità mediante gradiente di densità come descritto in Sezione 5.5.
2. Aspirare il pellet dalla fine della frazione 80% del gradiente e trasferirlo in 8 ml di BWW.
3. Centrifugare a 500 g per 5 minuti.
4. Decantare la maggior parte del surnatante dal pellet e risospendere delicatamente il pellet con una pipetta.
5. Valutare la concentrazione di spermatozoi nel pellet (vedi Sezioni 2.7 e 2.8) e diluire a circa 5×10^6 spermatozoi per ml con BWW.
6. Aggiungere 1.25 e 2.5 μ l di soluzione madre A23187 (1 mmol/l) ad aliquote separate di 1 ml di sospensione seminale, per ottenere due concentrazioni finali di rispettivamente 1.25 e 2.5 μ mol/l.
7. Incubare gli spermatozoi con lo ionoforo per 3 ore a 37°C.
8. Centrifugare le cellule a 500 g per 5 minuti.
9. Decantare la maggior parte del surnatante dal pellet e risospendere delicatamente il pellet con una pipetta.
10. Valutare la percentuale di spermatozoi mobili.
11. Diluire a circa 3.5×10^6 spermatozoi mobili per ml con BWW. Risultati validi possono essere ottenuti utilizzando anche concentrazioni basse come 1×10^6 spermatozoi mobili per ml (Aitken, Elton, 1986).
12. Porre il campione seminale sotto olio minerale come descritto in 4.5.1.2, Passaggio 11.

Nota: La curva dose-risposta per il trattamento con ionoforo varia a seconda degli individui per cui è preferibile analizzare entrambe le concentrazioni di ionoforo.

Riquadro 4.1 Induzione dell'ovulazione in hamster

Assicurarsi che le normative relative al trattamento iniettivo di animali vivi siano soddisfatte. Preparare soluzioni di dosi idonee di gonadotropina sierica di cavalla gravida (PMSG) e di gonadotropina corionica umana (hCG). Aliquotare in provette piccole. Conservare a -20°C fino all'uso. Iniettare intraperitonealmente (i.p.) 30 UI di PMSG in hamster non maturi o maturi, nel giorno 1 del ciclo estrale. Dopo 48-72 ore iniettare 40 UI di hCG i.p. Afferrare il dorso dell'animale e tirare la pelle addominale oltre il ventre con una mano; con l'altra inserire l'ormone nella cavità addominale (appena sopra le articolazioni delle anche) utilizzando una siringa da 1 ml con un ago da 21 gauge. Cambiare gli aghi fra un animale e l'altro per assicurare una penetrazione più semplice della pelle e minimizzare il fastidio per gli animali.

4.5.1.4 Recupero delle ovaie

1. Recuperare gli ovociti entro 18 ore dall'iniezione di hCG sacrificando gli animali secondo metodi approvati dai comitati competenti per la cura e l'utilizzo degli animali.
2. Posizionare gli hamster sul dorso e inumidire il pelo addominale con etanolo al 95% (v/v).
3. Afferrare la pelle con delle pinze e tagliare pelle e muscoli con delle forbici per esporre utero e ovaie.
4. Detergere le pinze e le forbici dai peli con etanolo al 95% (v/v).
5. Spingere gli intestini fuori dalla cavità addominale per esporre i corni uterini.
6. Afferrare un corno uterino con la pinza e sollevarlo fuori dalla cavità addominale per esporre l'ovaio, il legamento ovarico e l'ovidotto.
7. Trattene la porzione distale del corno uterino con la pinza e tagliare la sommità dell'utero appena sotto la pinza. Asportare l'ovaio e posizionarlo in BWW caldo (37°C) in una piccola piastra di Petri.
8. Raccogliere il secondo ovaio nello stesso modo.

4.5.1.5 Recupero del cumulo

1. Esaminare le ovaie tramite transilluminazione in un microscopio da dissezione per localizzare le cellule del cumulo contenenti gli ovociti nella porzione rigonfia dell'ovidotto.
2. Bloccare l'ovidotto con le pinze e bucare l'area rigonfia con un ago da 21 gauge. Il cumulo fuoriuscirà dalla puntura.
3. Aspirare il cumulo con l'ago. Spremere l'ovidotto con la pinza per recuperare tutto il cumulo.

4.5.1.6 Recupero e trattamento degli ovociti

1. Raccogliere le cellule del cumulo con ago e pinza e porle in un vetrino da orologio, piastra a pozzetti o un altro contenitore poco profondo, contenente 0.1% (1 g/l) di ialuronidasi (300-500 UI/ml) in BWW caldo ed equilibrato con CO₂.
2. Incubare il contenitore coperto con un foglio di alluminio per proteggere le cellule dalla luce per 10 minuti a temperatura ambiente. Osservare la separazione delle cellule del cumulo in un microscopio settore.
3. Utilizzare una pipetta di vetro tirata alla fiamma (vedi Riquadro 4.2) per trasferire gli ovociti liberati dalla ialuronidasi in BWW caldo equilibrato.
4. Sciacquare due volte in BWW gli ovociti recuperati trasferendoli in altre gocce di BWW caldo equilibrato. Si può utilizzare una piastra di vetro multipozzetto o una piastra a pozzetti. Sciacquare la pipetta con BWW fra ogni trasferimento di ovociti.
5. Trattare gli ovociti con tripsina 0.1% (1 g/l) (10.000 UI/ml) per circa 1 minuto a temperatura ambiente per rimuovere le zone pellucide. Osservare la digestione della zona in un microscopio settore e rimuovere gli ovociti non appena la zona si sia dissolta.
6. Lavare gli ovociti tre volte con BWW.
7. Riscaldare gli ovociti isolati a 37°C e inserirli nella sospensione di spermatozoi. In alternativa si possono conservare a 4°C fino 24 ore prima dell'uso.

Riquadro 4.2 Preparazione di pipette di vetro

Porre e ruotare un tubo di vetro capillare o una pipetta Pasteur appena sopra la fiamma di un becco Bunsen, tenendo le estremità della pipetta di vetro con entrambe le mani e ruotare avanti e dietro sopra la fiamma fino al riscaldamento del vetro. Rompere con un colpo secco il filamento sottile di vetro alla lunghezza desiderata (circa 1 mm) oltre l'apertura della pipetta. Attaccare l'estremità non tirata della pipetta ad una siringa da 1 ml con un tubino.

4.5.1.7 Co-incubazione dei gameti

1. Distribuire gli ovociti di hamster in alcune gocce, con circa cinque ovociti per goccia (per esempio, per 20 ovociti per campione di seme preparare 4 aliquote di 5 ovociti per goccia).
2. Caricare gruppi di circa 5 ovociti nella pipetta di vetro con poco terreno così da non diluire troppo la sospensione di seme.
3. Inserire la punta della pipetta direttamente nel centro di una goccia di sospensione seminale e dispensare lentamente gli ovociti. Mantenere la pressione positiva per prevenire l'ingresso dell'olio minerale nella pipetta e fare attenzione a non introdurre bolle di aria nella sospensione seminale.

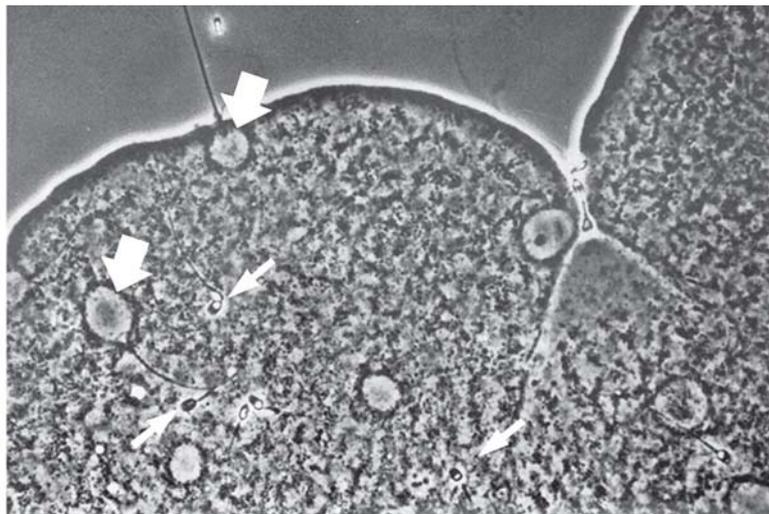
4. Pulire ogni eccesso di olio dalla punta della pipetta dopo averla rimossa dalla sospensione seminale.
5. Ripetere il punto 3, fino a che tutti gli ovociti siano stati trasferiti nelle sospensioni di spermatozoi.
6. Sciacquare la pipetta in BWW dopo ogni trasferimento di ovociti per evitare la contaminazione crociata di spermatozoi.
7. Incubare i gameti per 3 ore a 37°C al 5% (v/v) di CO₂.
8. Recuperare gli ovociti dalle gocce di olio. Fare attenzione a pulire tutto l'olio residuo dalla punta della pipetta prima di trasferire gli ovociti in BWW.
9. Lavare gli ovociti liberi da spermatozoi adesi con una pipetta Pasteur tirata alla fiamma, mediante lavaggio in BWW.

4.5.1.8 Analisi degli ovociti

1. Porre quattro piedini di cera di vaselina (vedi Riquadro 3.1) di forma rettangolare per sostenere il vetrino coprioggetto (22 mm x 22 mm, spessore 1.5, 0.17 mm) ai suoi angoli.
2. Porre una piccola goccia di BWW con l'ovocita al centro dei quattro piedini.
3. Poggiare il vetrino coprioggetto sopra i piedini di cera e premere delicatamente per cominciare a schiacciare gli ovociti. Per una ottimale osservazione delle teste di spermatozoi decondensati è necessario schiacciare l'ovocita.
4. Se necessario, aggiungere ulteriore BWW che fuoriesca dal vetrino al fine di proteggere gli ovociti.
5. Esaminare la preparazione mediante microscopio a contrasto di fase a 200x.
6. Contare il numero di teste di spermatozoi decondensati con la coda attaccata (vedi Fig. 4.4).
7. Registrare la percentuale di ovociti penetrati da almeno uno spermatozoo e il numero di spermatozoi per ovocita penetrato.
8. Registrare la presenza di ogni spermatozoo che rimane legato alla superficie dell'ovocita dopo l'iniziale procedura di lavaggio dato che questo può fornire indicazioni relative alla popolazione di spermatozoi che è andata incontro alla reazione acrosomiale.

Fig. 4.4 Microfotografia a contrasto di fase di un ovocita di hamster contenente spermatozoi umani

Le frecce larghe indicano la presenza di teste nemaspermiche decondensate all'interno dell'ooplasma; le frecce strette indicano gli spermatozoi non penetrati sulla superficie degli ovociti.



Riproduzione da Aitken et al. (1983) per gentile concessione di Springer Science + Business Media.

4.5.1.9 Controllo di qualità

I test devono essere effettuati con un campione di seme che mostra una penetrazione > del 50% come controllo positivo.

4.6 Valutazione della cromatina nemaspermica

Sono stati utilizzati molti metodi per valutare la normalità della cromatina nemaspermica e del DNA. Tutti utilizzano coloranti che si legano all'istone (blu di anilina) o all'acido nucleico (arancio di acridina o cromomicina) e sono analizzati istologicamente o mediante citofluorimetria. I metodi più recenti includono quelli basati sulla valutazione delle rotture del filamento di DNA come il Terminal TdT-mediated dUTP-nick-end labelling (TUNEL (in situ end labelling, ISEL)), comet assay o la dispersione della cromatina nemaspermica (SCD). I risultati di questi test sono correlati tra loro (Chohan *et al.*, 2006) e con morfologia, motilità e vitalità nemaspermica. Essi possono fornire informazioni ulteriori circa le percentuali di fecondazione con IVF e le percentuali di gravidanze spontanee. Lo sperm chromatin structure assay (SCSA) può essere predittivo del fallimento della fecondazione *in vitro* e *in vivo* (Evenson, Wixon, 2006). Non è ancora chiaro se esista una relazione fra i risultati di questi test e l'aborto o altre esiti della gravidanza.

PARTE II.

Preparazione degli spermatozoi

CAPITOLO 5 Tecniche di preparazione degli spermatozoi

5.1 Introduzione

Gli spermatozoi possono essere separati dal plasma seminale per diversi motivi, come test diagnostici di funzione o recupero per l'inseminazione e per le tecniche di riproduzione assistita (ART). Se devono essere effettuati i test di funzione nemaspermica, è fondamentale che gli spermatozoi vengano separati dal plasma seminale entro un'ora dall'eiaculazione, per limitare eventuali danni da prodotti di cellule non spermatiche.

Commento 1: Il conteggio di un basso numero di spermatozoi produrrà un risultato incerto (vedi Appendice 7, Sezione A7.1.1) con possibili conseguenze sulla diagnosi e la terapia (vedi Appendice 7, Sezione A7.2). Questo potrebbe risultare inevitabile quando gli spermatozoi vengono richiesti per scopi terapeutici ma solo pochi sono disponibili.

Commento 2: Quando si utilizza un basso volume di liquido seminale e viene contato un numero di spermatozoi minore rispetto ai parametri raccomandati, la precisione dei valori ottenuti sarà significativamente ridotta. Quando vengono contati meno di 400 spermatozoi, viene riportato l'errore di campionamento per il numero di cellule contate (vedi Tabella 2.2).

5.1.1 Quando gli spermatozoi devono essere separati dal plasma seminale

Sebbene il plasma seminale sia utile agli spermatozoi per penetrare il muco cervicale (Overstreet *et al.*, 1980), alcuni dei suoi componenti (come le prostaglandine e lo zinco) diventano un ostacolo al raggiungimento della gravidanza nel caso in cui le barriere naturali vengano superate dalla ART, come nell'inseminazione intrauterina (IUI) o nella fecondazione *in vitro* (IVF). È importante per la pratica clinica la separazione degli spermatozoi dal plasma seminale al fine di ottenere una preparazione finale contenente un'alta percentuale di cellule mobili, morfologicamente normali, priva di detriti, cellule non germinali e spermatozoi morti. La diluizione del liquido seminale con terreni di coltura e la centrifugazione sono ancora utilizzate per la preparazione dei campioni normozoospermici per la IUI (Boomsma *et al.*, 2004). Tuttavia, la centrifugazione con gradiente di densità e lo swim-up diretto sono in genere preferiti per campioni con una o più alterazioni dei parametri seminali (vedi per es. Morshedi *et al.*, 2003). Le colonne di lana di vetro sono segnalate per essere efficaci quanto il gradiente di densità nella separazione di spermatozoi da liquido seminale con caratteristiche subottimali (Rhemrev *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1996).

5.1.2 Scelta del metodo

La scelta della tecnica di preparazione dello sperma è dettata dalla natura del campione seminale (vedi Canale *et al.*, 1994). Per esempio, la tecnica dello swim-up diretto è spesso utilizzata quando i campioni seminali sono considerati in gran parte normali, mentre nei casi di severa oligozoospermia, teratozoospermia o astenozoospermia.

spermia, i gradienti di densità sono generalmente preferiti a causa del maggior numero di spermatozoi mobili recuperati. I gradienti di densità possono essere modificati al fine di ottimizzare le caratteristiche dei singoli campioni: il volume del materiale utilizzato per il gradiente può essere ridotto, riducendo la distanza di migrazione dello spermatozoo e migliorando così il recupero degli spermatozoi mobili, oppure si può incrementare il tempo di centrifugazione per i campioni con elevata viscosità.

Ogni laboratorio dovrebbe determinare la forza centrifuga e il tempo di centrifugazione necessari per formare un pellet sufficiente di spermatozoi. Quando il numero di spermatozoi è estremamente basso, potrebbe essere necessario modificare la forza centrifuga o il tempo, al fine di aumentare le possibilità di recuperare il massimo numero di spermatozoi. Modifiche ai tempi e alle forze centrifughe dovrebbero essere rigorosamente testati prima dell'applicazione. Il metodo più adeguato di preparazione può essere identificato dalla capacità funzionale degli spermatozoi preparati, determinata, ad esempio, dal test di penetrazione zona-free nell'ovocita di hamster (vedi Sezione 4.5).

5.1.3 Efficienza di separazione degli spermatozoi dal plasma seminale e da organismi infettivi

L'efficienza di una tecnica di selezione degli spermatozoi è di solito espressa come numero assoluto di spermatozoi, numero totale di spermatozoi mobili, o recupero di spermatozoi mobili morfologicamente normali. Lo swim-up generalmente produce un recupero minore di spermatozoi mobili (<20%) rispetto alla centrifugazione in gradiente di densità (> 20%) (vedi Ng *et al.*, 1992). Lo swim-up e la centrifugazione in gradiente di densità producono anche diversi livelli di contaminazione con componenti seminali nella preparazione finale. Utilizzando lo zinco prostatico come marcatore di componenti solubili seminali, Björndahl *et al.* (2005) hanno dimostrato la diffusione tempo-dipendente dello zinco dal liquido seminale al terreno dello swim-up. La concentrazione finale di zinco nei preparati di swim-up era maggiore di quella dei preparati con gradiente di densità.

I campioni seminali possono contenere pericolosi agenti infettivi, e i tecnici dovrebbero trattarli con estrema cura come un rischio biologico. Le tecniche di preparazione del seme non possono essere considerate efficaci al 100% nella rimozione di agenti infettivi da liquido seminale (vedi Sezione 5.6). Le linee guida di sicurezza, come indicato nell'Appendice 2, devono essere rigorosamente osservate. La buona pratica di laboratorio è fondamentale per la sicurezza nei laboratori (WHO, 2004).

5.2 Principi generali

Vengono descritte nelle sezioni seguenti tre semplici tecniche di preparazione degli spermatozoi. Per tutte queste tecniche, il terreno di coltura suggerito è una soluzione salina bilanciata integrata con proteine e contenente un tampone appropriato per le condizioni ambientali in cui gli spermatozoi saranno processati. Per le procedure di fecondazione assistita, come l'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI), la fecondazione *in vitro* (IVF), l'inseminazione artificiale (AI) o il trasferimento gametico intratubarico (GIFT), è imperativo che l'albumina sierica umana sia altamente purificata e priva da contaminazioni virali, batteriche e prioniche. Sono di-

sponibili in commercio albumine specificamente prodotte per tali procedure. Se l'incubatore contiene solo aria atmosferica e la temperatura è di 37°C, il terreno dovrebbe essere tamponato con Hepes o con un buffer simile, e i tappi dei tubi devono essere chiusi ermeticamente. Se l'atmosfera dell'incubatore è del 5% (v/v) di CO₂ nell'aria e la temperatura è di 37°C, allora il terreno migliore è tamponato con bicarbonato di sodio o con un buffer simile, e i tappi dei tubi devono essere non chiusi per permettere lo scambio dei gas. Il rispetto di queste norme permetterà che il pH della coltura sia compatibile con la sopravvivenza degli spermatozoi. L'utilizzo finale degli spermatozoi trattati influenzerà la scelta del terreno di coltura più appropriato. Ad esempio, i saggi di funzione nemaspermica, in generale, richiederanno un terreno che solitamente contiene bicarbonato di sodio (25 mmol/l) per consentire la capacitazione degli spermatozoi.

Il liquido seminale dovrebbe essere raccolto in maniera sterile (vedi Sezione 2.2.3). Tecniche e materiali sterili sono fondamentali quando si applica una tecnica di preparazione del seme a scopi terapeutici.

5.3 Lavaggio semplice

Questa semplice procedura di lavaggio fornisce un recupero più alto di spermatozoi ed è adeguata se i campioni di liquido seminale sono di buona qualità. È spesso usata per la preparazione di spermatozoi per l'inseminazione intrauterina.

5.3.1 Reagenti

1. BWW, Earle, Ham F-10 o fluido tubarico umano (HTF) (disponibile in commercio oppure vedi Appendice 4, Sezioni A4.1, A4.3, A4.4 e A4.6) supplementato preferibilmente con albumina sierica umana (HSA), o con siero, come descritto di seguito.
2. HSA, altamente purificata e priva di contaminazioni virali, batteriche e prioniche e da endotossine.
3. Addizione di HSA: a 50 ml di terreno aggiungere 300 mg di HSA, 1.5 mg di piruvato di sodio, 0.18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.
4. Addizione di siero: a 46 ml di terreno di coltura aggiungere 4 ml di siero del paziente inattivato al calore (56°C per 20 minuti), 1.5 mg di piruvato di sodio, 0.18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.

5.3.2 Procedura

1. Miscelare bene il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Diluire l'intero campione seminale 1:2 (1 + 1) con terreno per facilitare la rimozione del plasma seminale.
3. Trasferire la sospensione diluita in provette, preferibilmente non più di 3 ml per tubo.

4. Centrifugare a 300-500 g per 5-10 minuti.
5. Aspirare delicatamente e scartare il surnatante.
6. Risospendere i pellet insieme, in 1 ml di terreno pipettando delicatamente.
7. Centrifugare a 300-500 g per 3-5 minuti.
8. Aspirare delicatamente e scartare il surnatante.
9. Risospendere il pellet, pipettando delicatamente, in un volume di terreno idoneo per lo scopo finale, ad esempio per l'inseminazione, in modo da poterne determinare concentrazione e motilità (vedi Sezioni 2.5 e 2.7).

Nota: Il numero di lavaggi per rimuovere il plasma seminale può essere ridotto utilizzando un minor numero di tubi e aumentando il volume di ciascun tubo. Se ciò viene fatto, dovrebbero essere aumentate la forza centrifuga e la durata della centrifugazione, per garantire la formazione completa del pellet di spermatozoi, ad esempio 500-600 g per 8-10 minuti.

5.4 Swim-up diretto

Gli spermatozoi possono essere selezionati per la loro capacità di migrare dal plasma seminale al terreno di coltura. Questa è nota come la tecnica dello "swim-up". Il liquido seminale preferibilmente non dovrebbe essere diluito e centrifugato prima dello swim-up, perché questo può provocare danni perossidativi alle membrane degli spermatozoi (Aitken, Clarkson, 1988). Così, lo swim-up diretto è il metodo preferito per separare spermatozoi mobili (vedi ad esempio Mortimer, 1994a, b). La tecnica dello swim-up diretto può essere effettuata sia attraverso la stratificazione del terreno di coltura sopra il liquido seminale fluidificato e sia attraverso la stratificazione del liquido seminale fluidificato sotto il terreno di coltura. Gli spermatozoi mobili migrano così nel terreno di coltura. Questa procedura dà una resa più bassa di spermatozoi rispetto al lavaggio, ma li seleziona per la loro motilità ed è utile quando la percentuale di spermatozoi mobili nel liquido seminale è bassa, ad esempio, per la IVF e la ICSI.

5.4.1 Reagenti

1. BWW, Earle, Ham F-10 o HTF (Appendice 4, Sezioni A4.1, A4.3, A4.4 e A4.6) addizionato preferibilmente con HSA, o con siero, come descritto di seguito.
2. HSA, altamente purificata e priva da contaminazioni virali, batteriche e prioniche e da endotossine.
3. Addizione di HSA: a 50 ml di terreno aggiungere 300 mg di HSA, 1.5 mg di piruvato di sodio, 0.18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.
4. Addizione di siero: a 46 ml di terreno di coltura aggiungere 4 ml di siero del paziente inattivato al calore (56°C per 20 minuti), 1.5 mg di piruvato di sodio, 0.18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.

5.4.2 Procedura

1. Miscelare bene il campione seminale (vedi Riquadro 2.3).
2. Porre 1 ml di liquido seminale in una provetta conica sterile da 15 ml e stratificare delicatamente 1.2 ml di terreno. In alternativa, pipettare con cura il liquido seminale sotto il terreno di coltura addizionato.
3. Inclinare la provetta con un angolo di circa 45°, per aumentare la superficie dell'interfaccia liquido seminale-terreno di coltura, e incubare per 1 ora a 37°C.
4. Riportare delicatamente la provetta in posizione verticale e rimuovere 1 ml della frazione più in alto del terreno. Questo conterrà spermatozoi altamente mobili.
5. Diluire tale frazione con 1.5-2.0 ml di terreno.
6. Centrifugare a 300-500 *g* per 5 minuti e scartare il surnatante.
7. Risospendere il pellet di spermatozoi in 0.5 ml di terreno per la valutazione della concentrazione, della motilità totale e della motilità progressiva (vedi Sezioni 2.5, 2.7).
8. Il campione può essere usato direttamente per scopi terapeutici o di ricerca.

5.5 Gradienti discontinui di densità

I gradienti discontinui di densità sono in grado di fornire la migliore selezione di spermatozoi di buona qualità, consentendo una buona separazione da altri tipi di cellule e detriti. È più facile da standardizzare rispetto alla tecnica dello swim-up, e quindi i risultati sono più consistenti. Questa tecnica viene utilizzata per recuperare e preparare gli spermatozoi per l'uso in IVF e ICSI.

Questo metodo utilizza la centrifugazione del plasma seminale su gradienti di densità costituiti da silice colloidale rivestita con silano, che separa le cellule per la loro densità. Inoltre, gli spermatozoi mobili migrano attivamente attraverso il gradiente per formare un pellet morbido al fondo della provetta. Un semplice metodo di preparazione di un gradiente di densità discontinuo a due strati è il più diffuso, in genere con un 40% (v/v) di densità nello strato più alto e un 80% (v/v) di densità nello strato più basso. La preparazione del seme mediante centrifugazione in gradiente di densità in genere permette di ottenere una frazione con spermatozoi altamente mobili, priva di debris e leucociti, cellule non germinali e cellule germinali degenerate.

Sono disponibili in commercio materiali per la costituzione di gradienti di densità utili per la preparazione del seme. Questi prodotti dovrebbero essere utilizzati conformemente alle raccomandazioni del produttore. Ogni variazione dalle procedure raccomandate dovrebbe essere basata su dimostrazioni scientifiche. La maggior parte dei terreni per gradiente di densità contiene componenti ad alta massa molecolare relativa che hanno bassa osmolalità, quindi di solito sono preparati in un terreno che è iso-osmotico con i fluidi del tratto riproduttivo femminile.

5.5.1 Reagenti

1. BWW, Earle, Ham F-10 o HTF (vedi Appendice 4, Sezioni A4.1, A4.3, A4.4 e A4.6) addizionato preferibilmente con HSA, o con siero, come descritto di seguito.
2. HSA, altamente purificata e priva da contaminazioni virali, batteriche e prioniche e da endotossine.
3. Addizionato con HSA: a 50 ml di terreno aggiungere 300 mg di HSA, 1.5 mg di piruvato di sodio, 0.18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.
4. Addizionato con siero: a 46 ml di terreno di coltura aggiungere 4 ml di siero del paziente inattivato al calore (56°C per 20 minuti), 1.5 mg di piruvato di sodio, 0.18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.
5. Terreno isotonico per gradiente di densità: a 10 ml di terreno di coltura concentrato 10 x (disponibile in commercio oppure vedi Appendice 4, Sezioni A4.1, A4.3, A4.4 e A4.6), aggiungere 90 ml di terreno per gradiente di densità, 300 mg di HSA, 3 mg di piruvato di sodio, 0.37 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 200 mg di bicarbonato di sodio.
6. Gradiente 80% (v/v): a 40 ml di terreno isotonico per gradiente aggiungere 10 ml di terreno addizionato.
7. Gradiente 40% (v/v): a 20 ml di terreno isotonico per gradiente aggiungere 30 ml di terreno addizionato.

Nota: Sebbene questi terreni isotonici per gradiente di densità vengano spesso definiti come 100%, 80% e 40% (v/v), in realtà sono 90%, 72% e 36% (v/v).

5.5.2 Procedure

1. Preparare il terreno per gradiente di densità in una provetta stratificando 1 ml di terreno per gradiente 40% (v/v) su 1 ml di terreno per gradiente 80% (v/v).
2. Miscelare bene il campione di liquido seminale (vedi Riquadro 2.3).
3. Porre 1 ml di seme sopra il terreno per gradiente di densità, centrifugare a 300-400 g per 15-30 minuti. Se necessario possono essere utilizzate più provette per campione di liquido seminale.
4. Rimuovere la maggior parte del surnatante dal pellet.
5. Risospendere il pellet in 5 ml di terreno addizionato pipettando delicatamente (al fine di rimuovere la contaminazione del terreno per gradiente di densità) e centrifugare a 200 g per 4-10 minuti.
6. Ripetere la procedura di lavaggio (punti 4 e 5).
7. Risospendere il pellet finale in un terreno addizionato pipettando delicatamente al fine di poter determinare la concentrazione e la motilità (vedi Sezioni 2.5, 2.7).

5.6 Preparazione di campioni seminali con infezione da HIV

Se il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è presente nel liquido seminale, l'RNA virale e il DNA provirale si possono trovare liberi nel plasma seminale e nelle cellule non nemaspermatiche. Dato che i recettori per l'HIV (CD4, CCR5, CXCR4) sono espressi solo nelle cellule non nemaspermatiche, una combinazione di centrifugazione in gradiente di densità seguita da swim-up è stata proposta come un modo per prevenire l'infezione del partner femminile non infetto (Gilling-Smith *et al.*, 2006; Savasi *et al.*, 2007). Tali procedure sono state sviluppate per separare il plasma seminale e le cellule non nemaspermatiche infettate dal virus (nel surnatante del gradiente di densità) dagli spermatozoi mobili privi di HIV nello swim-up (dal pellet del gradiente di densità). I campioni preparati dovrebbero essere testati prima dell'uso con la reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa (RT-PCR), e solo i campioni non infettati dovrebbero essere utilizzati per l'ART. Anche se i risultati finora sono incoraggianti, non vi sono prove sufficienti dell'eliminazione del rischio di infezione da HIV attraverso la preparazione del liquido seminale.

Nota: Questa tecnica dovrebbe essere utilizzata solo con attrezzature di sicurezza per minimizzare il rischio di contaminazione crociata di campioni non infetti da HIV.

5.7 Preparazione di spermatozoi testicolari e dell'epididimo

Gli spermatozoi recuperati dal tessuto testicolare e dall'epididimo richiedono una preparazione particolare.

L'indicazione tipica per l'aspirazione epididimaria è l'azoospermia ostruttiva, piuttosto che una disfunzione testicolare. Di conseguenza, un numero relativamente elevato di spermatozoi può essere recuperato a fini terapeutici. Gli aspirati epididimari possono essere spesso ottenuti con una minima contaminazione da globuli rossi e da cellule non germinali, rendendo l'isolamento e la selezione degli spermatozoi epididimari mobili relativamente semplici. Se si ottiene un gran numero di spermatozoi epididimari, la centrifugazione in gradiente di densità è un metodo di preparazione efficace per un uso successivo (vedi Sezione 5.5). Se il numero di spermatozoi è basso, può essere eseguito un semplice lavaggio (vedi Sezione 5.3).

Gli spermatozoi testicolari possono essere recuperati mediante biopsia (con o senza microdissezione) o aspirazione percutanea. I campioni testicolari sono sempre contaminati da cellule non germinali e da un gran numero di globuli rossi, quindi sono necessari dei passaggi aggiuntivi per ottenere una preparazione pulita di spermatozoi. Al fine di liberare il tubulo seminifero dagli spermatidi allungati-legati ai tubuli seminiferi ("spermatozoi testicolari"), sono necessari metodi enzimatici o meccanici. Gli spermatozoi testicolari vengono preparati per la ICSI, essendo molto pochi e dotati di scarsa motilità.

5.7.1 Metodo enzimatico

1. Incubare il tessuto testicolare con collagenasi (ad esempio, 0.8 mg di *Clostridium histolyticum*, tipo 1A per ml di terreno) per 1.5-2 ore a 37°C, agitando con vortex ogni 30 minuti.
2. Centrifugare a 100 g per 10 minuti ed esaminare il pellet.

5.7.2 Metodo meccanico

1. Sminuzzare il tessuto testicolare in terreno di coltura con vetrini coprioggetto fino a quando il tessuto non è finemente disgregato.
2. In alternativa, staccare le cellule dai tubuli seminiferi usando aghi sottili (delle siringhe di tuberculina monouso) tagliati parallelamente alla base della piastra da coltura.

5.7.3 Preparazione delle sospensioni di spermatozoi per l'iniezione intracitoplasmatica

1. Lavare i campioni ottenuti con 1.5 ml di terreno di coltura.
2. Centrifugare a 300 g per 8-10 minuti.
3. Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet in 0.5 ml di terreno di coltura fresco.
4. Valutare la motilità e il numero di spermatozoi nel pellet (per alcuni campioni con un basso numero di spermatozoi può essere necessario risospendere in un volume minore di terreno).
5. Porre una goccia di 5-10 µl di terreno di coltura in una piastra.
6. Coprirla con olio minerale (pre-equilibrato con CO₂).
7. Inserire 5-10 µl della sospensione di spermatozoi nel terreno di coltura.
8. Aspirare delicatamente gli spermatozoi mobili posizionati nell'interfaccia tra il terreno di coltura e l'olio con una pipetta da ICSI.
9. Trasferirli in una goccia di soluzione viscosa, ad esempio polivinilpirrolidone (7-10% (100 g/l) nel terreno).

5.8 Preparazione di campioni da eiaculazione retrograda

In alcuni uomini, il liquido seminale durante l'eiaculazione passa nella vescica, con conseguente aspermia, o assenza di eiaculato. La conferma di questa situazione si ottiene esaminando un campione di urina post-eiaculazione per la ricerca di spermatozoi. Se il trattamento farmacologico non è possibile o non ha successo, gli spermatozoi possono essere recuperati dalle urine. L'alcalinizzazione delle urine per assunzione di bicarbonato di sodio, per esempio, aumenta la possibilità che eventuali spermatozoi che passano nelle urine conservino la loro motilità (Mahadevan *et al.*, 1981).

In laboratorio, al paziente dovrebbe essere chiesto di:

- urinare senza svuotare completamente la vescica;
- raccogliere l'eiaculato in un contenitore sterile tramite masturbazione;
- urinare di nuovo in un secondo contenitore contenente terreno di coltura (per alcalinizzare le urine successive).

Sia l'eiaculato, se presente, che le urine dovrebbero essere analizzati. Poiché può essere prodotto un elevato volume di urina, si rende spesso necessario concentrare il campione con una centrifugazione (500 g per 8 minuti). Il campione retrogrado, una volta concentrato, e quello anterogrado, se prodotto, possono essere processati, in modo più efficace, utilizzando il metodo di preparazione con gradiente di densità (vedi Sezione 5.5).

5.9 Preparazione di campioni con eiaculazione stimolata

Il liquido seminale di uomini con disturbi dell'eiaculazione, o che non possono eiaculare, possono essere raccolti mediante vibrostimolazione del pene o elettrostimolazione rettale degli organi accessori. Gli eiaculati di uomini con lesioni al midollo spinale presentano generalmente elevate concentrazioni di spermatozoi con ridotta motilità e contaminazioni da globuli bianchi e rossi. I campioni ottenuti con elettroeiaculazione possono essere processati, in modo più efficace, mediante centrifugazione con gradiente di densità (vedi Sezione 5.5). Indipendentemente dal metodo di preparazione, questi tipi di eiaculato spesso contengono una elevata percentuale di spermatozoi immobili.

Capitolo 6 Crioconservazione di liquido seminale

6.1 Introduzione

La crioconservazione degli spermatozoi è una parte importante del lavoro per molti laboratori di seminologia, in particolare quelli associati con le cliniche per l'infertilità.

La storia della criobiologia degli spermatozoi umani inizia alla fine degli anni '40. La scoperta che il glicerolo proteggeva gli spermatozoi dai danni prodotti dal congelamento ha consentito di conservare gli spermatozoi umani in ghiaccio secco a -79°C (Polge *et al.*, 1949; Bunge, Sherman, 1953; Bunge *et al.*, 1954). Successivamente, è stato utilizzato l'azoto liquido e la crioconservazione del liquido seminale si è diffusa rapidamente in molti paesi con l'istituzione di banche del seme commerciali o di servizi nazionali coordinati (Perloff *et al.*, 1964; David *et al.*, 1980; Clarke *et al.*, 1997; Leibo *et al.*, 2002).

Numerosi protocolli di crioconservazione sono attualmente utilizzati con differenti crioprotettori e procedure di congelamento. La sopravvivenza cellulare dopo il congelamento e lo scongelamento dipende in larga misura dalla capacità di ridurre al minimo la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari. Questo viene fatto utilizzando adeguati crioprotettori e applicando tassi di raffreddamento e di riscaldamento che riducono al minimo la quantità di acqua intracellulare soggetta alla formazione di ghiaccio (Sherman, 1990; Keel, Webster, 1993; Watson, 1995). Se gli spermatozoi permangono per lungo tempo sopra i -130°C (temperatura di transizione vetrosa), in particolare durante il processo di scongelamento, si può verificare una ricristallizzazione, con un aumento di cristalli di ghiaccio intracellulari potenzialmente dannosi.

Gli spermatozoi umani tollerano una serie di variazioni di temperature di raffreddamento e riscaldamento. Essi non sono molto sensibili ai danni causati da un rapido raffreddamento iniziale (shock da freddo), forse a causa della elevata fluidità di membrana dovuta agli acidi grassi insaturi del doppio strato lipidico (Clarke *et al.*, 2003). Essi possono anche essere più resistenti di altre cellule ai danni da crioconservazione per il loro basso contenuto di acqua (circa il 50%). Tuttavia, la crioconservazione ha effetti dannosi sulla funzionalità degli spermatozoi umani, in particolare sulla motilità. Mediamente, solo il 50% degli spermatozoi mobili sopravvive a congelamento e scongelamento (Keel, Webster, 1993). L'ottimizzazione del processo di crioconservazione ridurrà al minimo questi danni e ciò potrebbe comportare un aumentato dei tassi di gravidanza (Woods *et al.*, 2004).

I tassi di gravidanza dopo l'inseminazione artificiale con seme crioconservato di donatore sono spesso legati alla qualità degli spermatozoi dopo lo scongelamento, al momento dell'inseminazione e, soprattutto, a fattori propri della ricevente quali l'età, precedenti gravidanze con inseminazione da donatore e disturbi ovulatori e tubarici (Le Lannou, Lansac, 1993). Se il seme viene conservato in condizioni adeguate, non vi è un peggioramento evidente della qualità degli spermatozoi con il tempo; bambini sono nati a seguito di fecondazione con liquido seminale conservato per oltre 28 anni (Feldschuh *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006).

Gli spermatozoi possono essere conservati per varie ragioni (vedi Riquadro 6.1). In

alcuni casi le procedure di crioconservazione possono essere modificate (vedi Sezione 6.2.2).

Riquadro 6.1 Motivi per la crioconservazione degli spermatozoi

Seme da donatore

Il liquido seminale di donatori sani, fertili o presunti, può essere conservato per usi futuri. Questi donatori possono essere reclutati da una clinica o da una banca del seme e i loro spermatozoi utilizzati in forma anonima. In alternativa, le riceventi possono conoscere i donatori. Gli spermatozoi da donatori possono essere utilizzati per AI, IUI, IVF o ICSI:

- per la partner di un uomo infertile senza spermatozoi vitali o spermatidi allungati adatti per la ICSI, o dove il trattamento è fallito o troppo costoso;
- per prevenire la trasmissione di una malattia ereditaria;
- per prevenire l'anemia emolitica fetale dovuta a incompatibilità del gruppo sanguigno;
- dopo aborti spontanei ricorrenti, l'inseminazione da donatore può tradursi in una gravidanza con successo;
- per le donne che desiderano concepire, ma non hanno un partner maschile.

Le legislazioni nazionali e locali in materia di screening infettivo e genetico dovrebbero sempre essere rispettate.

Conservazione della fertilità

Il liquido seminale può essere ottenuto e conservato prima che un uomo subisca un trattamento o una procedura che potrebbe impedire o compromettere la sua fertilità, come:

- vasectomia (nel caso di un cambiamento futuro della situazione coniugale o se desidera più figli);
- trattamento con agenti citotossici o radioterapia, tale da alterare la spermatogenesi in modo permanente (Meseguer *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2004);
- professione pericolosa, ad esempio nelle forze armate, nei paesi dove la procreazione postuma è consentita.

Trattamento dell'infertilità

Gli spermatozoi possono essere conservati per il trattamento della partner femminile mediante inseminazione artificiale con seme del marito (AIH), IUI, IVF o ICSI, in caso di:

- severa oligozoospermia o presenza intermittente di spermatozoi mobili nel liquido seminale (come supporto per la ICSI) (Bourne *et al.*, 1995);
- trattamento dell'infertilità che può non essere persistente, come nella chirurgia per l'ostruzione del tratto genitale o nel trattamento con gonadotropine per l'ipogonadismo ipotalamo-ipofisario;
- necessità di raccolte particolari, come nell'eiaculazione indotta in pazienti con lesioni del midollo spinale, spermatozoi nelle urine da eiaculazione retrograda, o prelievo chirurgico dal tratto genitale;

- pazienti che non sono in grado di fornire seme fresco il giorno di una procedura di ART.

Minimizzare la trasmissione delle malattie infettive

Per gli uomini con HIV controllato con terapia antiretrovirale, i campioni con una carica virale non rilevabile possono essere conservati per IUI, IVF o ICSI, per tentare il concepimento riducendo il rischio di trasmissione dell'HIV alla partner femminile.

Nota 1: Per la preservazione della fertilità o il trattamento dell'infertilità, campioni abbastanza buoni devono essere conservati per 10 o più inseminazioni, per garantire una migliore probabilità di gravidanza. In caso di seme patologico, il raggruppamento di più campioni per AIH non si è dimostrato efficace.

Nota 2: Poiché nella ICSI è necessario un solo spermatozoo per ovocita, può essere utile la crioconservazione di ogni singolo spermatozoo vitale.

Nota 3: Lo stoccaggio di liquido seminale raccolto prima di una procedura potenzialmente sterilizzante ha spesso un importante valore psicologico, perché dà la speranza di una futura paternità. Per i pazienti in procinto di sottoporsi a terapia con agenti alchilanti o a radioterapia, il seme deve essere raccolto prima dell'inizio della terapia, a causa del rischio di mutagenesi negli spermatozoi. A tutti i pazienti cui è richiesta chemio o radioterapia, compresi gli adolescenti (Kamischke *et al.*, 2004), dovrebbe essere offerta la possibilità di crioconservare gli spermatozoi.

La crioconservazione e il successivo stoccaggio degli spermatozoi umani è un processo molto complesso, che pone una responsabilità particolare e un rischio potenziale per il personale di laboratorio. È raccomandata una valutazione globale del rischio (vedi Riquadro 6.2).

Riquadro 6.2 Valutazione del rischio della crioconservazione e dello stoccaggio del liquido seminale umano

Nel valutare i rischi associati alla crioconservazione e allo stoccaggio del seme, devono essere considerati i seguenti aspetti.

Risorse

- Sicurezza fisica di contenitori, campioni e camera di stoccaggio per ridurre il rischio di perdita per furto o incendio, difetti nelle paillettes, provette e recipienti per crioconservazione, fornitura di azoto liquido.
- Idoneità delle attrezzature per l'uso proposto.
- Sistemi di contenimento e rimozione dell'azoto. Sicurezza e protezione del personale.
- Equipaggiamento per la protezione del personale.
- Sistemi di allarme per la rilevazione di bassi livelli di azoto liquido e ossigeno atmosferico.

Rischio di contaminazione incrociata

Per ridurre il rischio di contaminazione incrociata con agenti infettivi tra i campioni conservati (ad esempio, la trasmissione dell'HIV, dell'epatite B o C attraverso un contenitore per crioconservazione), si consideri:

- tipo di contenitore di stoccaggio: provette o paillettes e il metodo di chiusura delle paillettes (calore o polimero);
- natura dello stoccaggio: azoto in fase liquida o di vapore;
- protocollo e metodo di stoccaggio di campioni ad alto rischio (campioni sicuri o sospetti di contenere virus).

Sicurezza dei campioni congelati

- Separare i campioni e conservarli in luoghi diversi per ridurre il rischio di perdita totale.
- Doppio controllo identità dei campioni ad ogni passaggio.
- Usare marcature evidenti e codici di identificazione.
- Avere procedure di verifica periodiche di utilizzo del materiale e dei campioni in deposito.

Fonti: Tedder, 1995; Mortimer, 2004; Gilling-Smith *et al.*, 2005; Tomlinson, 2005.

Nota 1: Conservare in fase di vapore piuttosto che in fase di azoto liquido può ridurre le possibilità di contaminazione incrociata. Tuttavia, elevati gradienti di temperatura possono esistere in recipienti di stoccaggio di vapore, a seconda della forma, del carico di campione e del tipo di contenitori. In casi estremi, una temperatura inferiore a -100°C non può essere raggiunta (Tomlinson, 2005). Se viene usata per lo stoccaggio la fase di vapore, assicurarsi che la temperatura dei campioni non vada al di sopra di -130°C (la temperatura di trasformazione vetrosa) poiché ciò potrebbe danneggiare gli spermatozoi (Clarke, 1999).

Nota 2: Sono disponibili per la conservazione in azoto liquido paillettes sicure a base di resina ionomerica termosigillante. Queste sono a perfetta tenuta stagna, a prova di batteri e virus, e resistenti meccanicamente a -196°C (Mortimer, 2004; Gilling-Smith *et al.*, 2005; Tomlinson, 2005).

6.2 Protocolli di crioconservazione del liquido seminale

Sono disponibili diversi protocolli di gestione della banca del seme e di congelamento (Wolf, 1995; Mortimer, 2004). In commercio si trovano diversi crioprotettori. Sono riportati di seguito dettagli di un crioprotettore più comunemente usato, glicero-tuorlo d'uovo-citrato (GEYC), e del congelamento in vapori rapido o lento.

6.2.1 Procedura standard

6.2.1.1 Preparazione del crioprotettore GEYC

1. A 65 ml di acqua sterile purificata aggiungere 1.5 g di glucosio e 1.3 g di sodio citrato tribasico diidrato.

2. Aggiungere 15 ml di glicerolo e miscelare vigorosamente.
3. Aggiungere 1.3 g di glicina. Una volta sciolta, filtrare la soluzione con un filtro da 0.45 μm .
4. Aggiungere 20 ml di tuorlo d'uovo fresco (preferibilmente ottenuti da specifiche uova prive di organismi patogeni): lavare l'uovo e rimuovere il guscio. Perforare la membrana che circonda il tuorlo e raccoglierlo con una siringa (circa 10 ml di tuorlo saranno ottenuti per ogni uovo).
5. Porre l'intera sospensione a bagnomaria a 56°C per 40 minuti, agitando.
6. Controllare il pH della soluzione. Se è al di fuori del range 6.8-7.2, scartare la soluzione e prepararne una nuova, nel caso in cui siano stati aggiunti ingredienti o quantità sbagliate.
7. Una coltura batterica per test di sterilità può essere eseguita in questa fase.
8. Prove per la tossicità del seme possono essere eseguite in questa fase.
9. Distribuire la soluzione in aliquote da 2 ml sotto cappa sterile e conservare a -70°C.
10. Utilizzare entro 3 mesi.

Sono disponibili in commercio crioprotettori simili al GEYC.

6.2.1.2 Aggiunta del crioprotettore al liquido seminale

1. Scongela il crioprotettore, riscaldarlo a temperatura ambiente e miscelare. Un riscaldamento iniziale a 37°C può essere utile.
2. Elevate concentrazioni di glicerolo sono dannose per gli spermatozoi. È quindi indispensabile prestare particolare attenzione quando si aggiunge e si miscela il crioprotettore con il seme.
3. Aggiungere un volume di GEYC per due volumi di seme, o goccia a goccia, agitando, o pipettando dolcemente su e giù, o progressivamente in cinque aggiunte con delicati miscelamenti per 10 minuti a temperatura ambiente.
4. Dopo che il GEYC è stato aggiunto, incubare la miscela a 30-35°C per 5 minuti.

6.2.1.3 Riempimento delle paillettes con il liquido seminale

1. Le paillettes di plastica da 0.5 ml sono molto usate per la loro proprietà di trasferire il calore e per la facilità di stoccaggio. Le provette di plastica possono essere utilizzate per lo stoccaggio di grandi volumi.
2. Aspirare la miscela seme-GEYC in paillettes di plastica da 0.5 ml o porla in provette per criogenia. Le paillettes possono essere riempite con un collettore su una pompa a vuoto o con un adattatore che si inserisce nell'estremità della paillette.

6.2.1.4 Sigillatura delle paillettes

Le paillettes con un tappo di polvere di polivinilalcol vengono chiuse automaticamente quando la polvere entra in contatto con il seme.

1. Lasciare 1 cm di aria nell'estremità inferiore picchiando l'estremità aperta della paillette.
2. Chiudere questa estremità mediante la polvere sigillante di polivinilalcol e porre le paillettes in acqua ad una profondità di 1 cm.
3. È preferibile termosigillare le paillettes, poiché le chiusure con la polvere potrebbero essere permeabili agli agenti infettivi.
4. In alternativa, i campioni possono essere conservati in provette di plastica o in fiale. Queste devono essere riempite non oltre il 90% della loro capacità.
5. Pulire la parte esterna delle paillettes e sterilizzare con alcool al 70% (v/v) o con altri decontaminanti microbici.

6.2.1.5 Raffreddamento e congelamento del seme in congelatori programmabili

Sono disponibili congelatori programmabili che controllano l'iniezione di vapore di azoto liquido nella camera di congelamento.

1. Posizionare le paillettes o le provette da criogenia in un congelatore programmabile e seguire le istruzioni del produttore per attivare il programma.
2. Un programma comune è quello di raffreddare le paillettes a 1.5°C al minuto da 20°C a -6°C e poi a 6°C al minuto fino a -100°C. Questa operazione richiede circa 40 minuti. La macchina conserverà poi la camera a -100°C fino a 30 minuti prima del trasferimento in azoto liquido.
3. Altre e più complesse procedure possono essere utilizzate, a seconda delle esperienze dei singoli laboratori (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994).

6.2.1.6 Raffreddamento e congelamento manuale del seme

I metodi manuali sono meno controllabili dei congelatori programmabili, ma possono dare buoni risultati. Ci sono molte alternative a questa procedura.

1. Porre le paillettes in un congelatore (-20°C) per 30 minuti, poi in ghiaccio secco (-79°C) per 30 minuti prima di trasferirle in azoto liquido (-196°C).
2. Le paillettes possono essere trasferite da un congelatore a -20°C in un altro congelatore a -70°C, oppure in un contenitore con una miscela di vapori di azoto liquido e aria, nel collo di un piccolo contenitore di azoto liquido da -80°C a -100°C per 10-15 minuti, prima di essere immerse in azoto liquido. Possono anche essere inserite in un rack 10-20 cm sopra l'azoto liquido in un contenitore largo, e lasciate per 1 ora per creare un gradiente di temperatura sopra il livello di azoto.

6.2.1.7 Stoccaggio di seme congelato

1. Posizionare le paillettes congelate in provette di stoccaggio di plastica e inserirle in bicchieri di stoccaggio.
2. Posizionare le provette da criogenia nelle stecche di metallo o in scatole che si inseriscono nei contenitori di stoccaggio, preferibilmente in fase di vapore, perché i tappi delle provette da criogenia non forniscono una tenuta completa.
3. Stoccare i bicchieri con le paillettes o le stecche nei contenitori di azoto liquido (Dewar).

6.2.1.8 Trasporto del seme congelato

Gli spermatozoi congelati possono essere trasferiti in contenitori da trasporto disponibili in commercio raffreddati con azoto liquido. A seconda delle dimensioni del contenitore da trasporto, possono essere mantenute temperature sufficientemente basse da alcuni giorni a diverse settimane.

Nota: Assicurarsi che siano rispettate le norme locali, nazionali e internazionali in materia di trasporto di azoto liquido e di campioni biologici umani.

6.2.1.9 Scongelo del seme congelato

1. Prima dell'uso, rimuovere dall'azoto liquido o dai vapori le paillettes richieste e porle su carta assorbente o in una rastrelliera per consentire loro di raggiungere la temperatura ambiente (questa fase richiede circa 6 minuti). Le provette da criogenia richiedono più tempo per lo scongelamento (10-20 minuti).
2. Entro 10 minuti, tagliare l'estremità delle paillettes con forbici sterili e caricare il dispositivo di inseminazione (per uso terapeutico) o espellere il contenuto per determinare la motilità post-scongelo (per controllare il processo di congelamento).
3. Uno scongelamento più rapido può essere migliore se il processo di congelamento è rapido (Verheyen *et al.*, 1993).
4. La rimozione del crioprotettore mediante diluizione sequenziale in piccoli volumi evita stress osmotici (Gao *et al.*, 1995) e può migliorare i risultati di una gravidanza.

6.2.2 Protocolli di congelamento modificati per campioni oligozoospermici e spermatozoi recuperati chirurgicamente

- Un liquido seminale che contiene solo pochi spermatozoi mobili e le sospensioni di spermatozoi ottenute dal tratto genitale possono essere conservati per successive ICSI.
- Se necessario, centrifugare il seme a 1.500 g per 10 minuti per concentrare gli spermatozoi in un volume minimo di circa 0.4 ml. Aggiungere GEYC e processare come descritto in precedenza.

- Possono essere crioconservati con crioprotettore Tyrode's glicerolo glucosio (TGG), o con un crioprotettore commerciale contenente albumina umana, il fluido epididimario, estratti testicolari o altre sospensioni di spermatozoi preparate in laboratorio con lo swim-up o con la centrifugazione con gradienti di densità (vedi Sezioni 5.4 e 5.5) e risospese in un terreno di preparazione del seme con Hepes e albumina sierica umana 4 mg/ml.

6.2.2.1 Crioprotettore modificato (TGG)

1. A 40 ml di Tyrode sterile (vedi Appendice 4, Sezione A4.9) aggiungere 5 ml di albumina umana sterile (100 mg/ml), 0.9 g di glucosio e 5 ml di glicerolo. Filtrare la soluzione attraverso un filtro con pori da 0.45- μ m.
2. Conservare in aliquote da 2 ml a -70°C.

6.2.2.2 Procedura

1. Se il volume del campione è superiore a 2.0 ml e sono presenti pochi spermatozoi mobili, centrifugare a 1.500 g per 5 minuti a temperatura ambiente.
2. Decantare il surnatante lasciando circa 1.0 ml e risospendere gli spermatozoi in esso. Valutare la percentuale di spermatozoi mobili (PR + NP); se sono presenti pochissimi spermatozoi mobili, calcolare il numero di cellule mobili.
3. Scongellare un'aliquota di 2 ml di TGG.
4. Aggiungere gradualmente e miscelando un volume di TGG a un volume di preparazione finale di liquido seminale.
5. Preparare le paillettes o provette da criogenia e congelare come sopra. Se alcune paillettes non risultano piene, chiudere i recipienti per impedire che queste paillettes galleggino quando vengono congelate.

6.2.3 Codifica delle paillettes e registrazione

È essenziale un solido sistema che codifichi le paillettes o provette. Utilizzare il codice in tutte le schede del laboratorio e le banche dati del computer per mantenere l'anonimato dei donatori. Tenere la chiave per il codice con l'identità del donatore separatamente e in modo sicuro. Esistono molti potenziali sistemi di codifica, il requisito importante è avere un codice unico per ogni donatore o paziente. Il seguente sistema di codifica funziona in modo soddisfacente.

- Ad ogni nuovo donatore anonimo è assegnato un codice a due lettere (AA, AB, AC ... BA ... ecc., per finire con ZZ, dopo di che è necessario un nuovo metodo).
- Un sistema di codifica a tre lettere è usato per i pazienti e donatori noti: AAA, AAB, ecc.
- Ogni campione proveniente da un particolare donatore è indicato da un numero posto dopo il suo codice personale. Ad esempio, l'ottava donazione del donatore BT è etichettata come BT-8.
- Il codice a lettere e il numero dei campioni devono essere scritti su ciascuna

paillette o provetta utilizzando un pennarello nero indelebile. In alternativa, utilizzare un'etichetta stampata per azoto liquido.

- Il bicchiere in cui sono conservate le paillettes deve contenere marker con il codice e il numero del campione.
- Per una rapida identificazione è utile un codice a colori per bicchieri, mini bicchieri, paillets e polvere sigillante.
- Quando sono utilizzati gli spermatozoi conservati, il conteggio delle paillettes o delle provette nella banca dati viene modificato.

Nota: Tutte le procedure che coinvolgono l'identità dei campioni del donatore o del paziente, inclusi l'accettazione dei campioni, la preparazione e la codifica delle paillettes, il posizionamento nei contenitori e lo scongelamento delle paillettes per l'uso o l'eliminazione, devono essere controllati da due persone e le prove di questo controllo incrociato annotate nei registri di laboratorio. Idealmente un tecnico dovrebbe processare un solo campione di seme per volta.

PARTE III.

L'assicurazione di qualità

CAPITOLO 7 Assicurazione di qualità e controllo di qualità

7.1 Controllo di qualità nel laboratorio di andrologia

I laboratori di andrologia hanno bisogno di produrre risultati affidabili per poter prendere decisioni corrette in diagnostica e assistenza sanitaria. Dal momento che l'analisi del liquido seminale è molto complessa e difficile da standardizzare a livello procedurale, il controllo di qualità (QC) diventa essenziale per rilevare e correggere gli errori sistematici e l'elevata variabilità di risultati. Le grandi differenze tra le valutazioni di concentrazione e morfologia degli spermatozoi rilevate in differenti laboratori (Neuwinger *et al.*, 1990; Matson, 1995; Cooper *et al.*, 1999, 2002) sottolineano la necessità di un miglior controllo di qualità e una migliore standardizzazione.

Qualunque sia la sua dimensione, ogni laboratorio dovrebbe applicare un programma di controllo della qualità, basato su metodi e procedure standardizzati, per garantire accuratezza e precisione dei risultati (De Jonge, 2000; Mortimer, Mortimer, 2005). In alcuni paesi, i programmi di controllo della qualità sono richiesti dalla legge, in altri, da organismi di accreditamento o sistemi di assicurazione sanitaria. In alcuni casi, le risorse disponibili possono non consentire la piena attuazione delle procedure descritte qui. Tuttavia, i parametri fondamentali di concentrazione, morfologia e motilità nemaspermica devono essere sempre monitorati da un controllo di qualità interno e, dove possibile, da un controllo di qualità esterno.

Esistono diversi testi che descrivono il controllo di qualità (ad esempio, Wheeler e Chambers, 1992; Wheeler, 1993) e qualcuno specializzato nel controllo di qualità in laboratorio che fornisce una descrizione più approfondita del processo del controllo di qualità (ad esempio, Cembrowski, Carey, 1989; Carey, Lloyd, 1995; Westgard, 2002). Le attività di controllo di qualità eseguite all'interno di un laboratorio sono indicate come controllo di qualità interno (IQC) (vedi Sezione 7.6). Il controllo di qualità esterno (EQC) è la valutazione dei risultati per gli stessi campioni in differenti laboratori (vedi Sezione 7.11).

7.2 La natura degli errori nell'analisi del liquido seminale

La gestione delle procedure di controllo di qualità richiede la comprensione della causa e dell'entità degli errori di misura. Ogni misura ha un grado di errore, la cui entità è definita da un intervallo di confidenza con un limite superiore e uno inferiore. Una misurazione precisa è quella in cui i limiti sono vicini e un risultato è tanto più accurato quanto più è vicino al valore reale. Ci sono due classi di errore: casuale e sistematico. Gli errori casuali, che riguardano la precisione, derivano da differenti possibilità nelle letture o nel campionamento, e può essere valutato con misurazioni ripetute dallo stesso osservatore e con le stesse attrezzature. Gli errori sistematici (a volte indicati come *bias*) sono più insidiosi, in quanto derivano da fattori che alterano il risultato in una sola direzione, e quindi non possono essere rilevati con misurazioni ripetute.

Anche quando il campione è ben miscelato, la distribuzione casuale degli spermatozoi nel liquido seminale, o nel fissativo o nel terreno di coltura, è la causa princi-

pale della mancanza di precisione nei risultati dell'analisi del liquido seminale. La valutazione della concentrazione, motilità, vitalità e morfologia degli spermatozoi si esegue contando un numero limitato di spermatozoi, che si presume essere rappresentativo della totalità del campione. La variazione di campionamento generata selezionando o un volume fisso (per la stima della concentrazione) o un numero fisso di spermatozoi (per la valutazione della motilità, morfologia o vitalità) è un errore casuale comunemente indicato come errore statistico o di campionamento. Alcuni termini impiegati in questo ambito sono indicati nel Riquadro 7.1. Ulteriori errori possono essere introdotti quando il campione viene miscelato o le aliquote vengono rimosse. Questi errori possono essere ridotti al minimo migliorando la tecnica (vedi Sezione 7.13).

L'obiettivo del controllo di qualità nell'analisi di routine del liquido seminale è di seguire costantemente la dimensione di entrambi gli errori, casuali e sistematici, e ridurre dove ciò è possibile. Tutti questi errori devono essere ridotti al minimo per avere risultati credibili e utilizzabili da clinici e ricercatori.

7.3 Ridurre al minimo l'errore di campionamento statistico

Mentre l'errore di campionamento può essere ridotto esaminando un maggior numero di spermatozoi (vedi Tabella 2.2, Riquadri 2.5 e 2.7), un giusto equilibrio deve essere trovato tra il guadagno nella precisione statistica, il tempo necessario per ottenerlo, e la possibile perdita di precisione nel lavoro del tecnico dovuta all'affaticamento. Utilizzando intervalli di confidenza del 95% per valutare l'accettabilità dei replicati significa che, per circa il 5% dei campioni, differenze maggiori di 1.96 volte l'errore standard si verificheranno come risultato della variazione casuale, e la misurazione sarà stata ripetuta inutilmente. Questo lavoro supplementare può essere accettabile; in alternativa, limiti più ampi (2.6 o 3 volte l'errore standard) potrebbero essere scelti per ridurre la frequenza che questo accada (circa l'1% e lo 0.2% rispettivamente).

Riquadro 7.1 Terminologia nell'assicurazione e nel controllo di qualità

Accuratezza	Grado di concordanza del risultato del test con il valore reale.
Bias	La deviazione del risultato di un test dal valore assegnato. Le imprecisioni riproducibili che vanno costantemente nella stessa direzione (errore sistematico).
Buona pratica di laboratorio (GLP)	Un insieme di principi che fornisce un quadro nel quale vengono programmati, eseguiti, controllati, registrati, riportati e archiviati gli studi di laboratorio.
Campioni prodotti per QC	Campioni disponibili in commercio, costruiti e analizzati secondo le linee guida di produzione.
Carta Bland-Altman	Un grafico della differenza tra una serie di osservazioni appaiate verso il loro valore medio.
Carta di controllo	Un grafico tempo-sequenza che mostra una serie di misure singole, con una linea centrale e limiti di controllo.
Carta S	Una carta di controllo di deviazioni standard dei valori misurati contro il tempo. È utilizzata per controllare l'uniformità dei processi e la precisione delle misurazioni.

Carta $X_{\bar{a}}$	Un grafico che mostra le medie dei valori misurati contro il tempo. Esso è utilizzato per controllare la variabilità dei processi e individuare le modifiche a partire dai valori target (valuta l'accuratezza).
Causa comune di variazione	Una fonte di variazione naturale che interessa tutti i singoli valori del processo in fase di studio.
Causa speciale di variazione	Una fonte di variazione che è grande, intermittente o imprevedibile, e che interessa solo alcuni dei valori individuali del processo oggetto di studio (variazione casuale).
Ciclo di Shewhart	Vedi PDCA.
Controllo di qualità esterno	Test di Qualità eseguiti da un organismo esterno che compie comparazioni tra differenti laboratori per alcune procedure. Utile per rilevare variazioni sistematiche e per valutare l'accuratezza.
Controllo di qualità interno	Test di Qualità per misurare la variabilità di una procedura esistente all'interno di un laboratorio. Tali test valutano la precisione delle operazioni giorno per giorno. Sono utili per rilevare variazioni casuali (servono per la valutazione della precisione).
Deriva	Successive piccole variazioni nei valori che determinano con il tempo un cambiamento della precisione.
Diagramma di Youden	Un grafico utilizzato per rappresentare i valori ottenuti da due campioni.
Distribuzione binomiale	Una distribuzione teorica utilizzata per eventi campione che rientrano in due categorie, ad esempio mobile/immobile, vitale/non vitale.
Distribuzione di Poisson	Una distribuzione teorica usata per modelli matematici.
Errore di campionamento	L'errore che avviene nella conta di un numero limitato di spermatozoi; è inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero ottenuto. L'errore di campionamento (% SE) è l'errore standard di una conta (\sqrt{N}), espresso come percentuale della conta ($100 \times (\sqrt{N}/N)$). (Errore casuale, errore di precisione, errore statistico di campionamento).
Errore statistico di campionamento	Vedi errore di campionamento.
Errore di precisione	Vedi errore di campionamento.
Errore random	Vedi errore di campionamento.
Errore sistematico	Vedi bias.
Fuori controllo	Un processo è fuori controllo quando il valore misurato supera i limiti di controllo attesi, o è entro i limiti di controllo, ma mostra una tendenza significativa nei valori. Un processo che è fuori controllo deve essere valutato.
Intervallo di confidenza 95%	Un intervallo calcolato a partire dai dati osservati, che comprende il valore vero nel 95% delle repliche (media $\pm 1.96 \times SE$ oppure $N \pm 1.96 \times \sqrt{N}$ per conta).

ISO	Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione. Un organismo che definisce gli standard internazionali, anche per la qualità in laboratorio.
Limiti di controllo	La variazione massima consentita di un processo dovuto a sole cause comuni. Una variazione al di là di un limite di controllo è la prova che cause speciali possano incidere sul processo.
PDCA	Pianificare, fare, controllare, agire (ciclo di Shewhart).
Precisione	Scarsa variabilità tra misure ripetute. Comunemente espressa come imprecisione (deviazione, intra e inter dosaggio, lotto, analisi, o variazione di laboratorio). Le misurazioni di precisione non sono affette da bias (vedi anche errore di campionamento).
Procedure operative standard	Set di istruzioni su come i processi e i metodi devono essere effettuati.
Sotto controllo	Un processo è sotto controllo quando tutti i valori rientrano nei limiti di controllo attesi.
Valore assegnato	Stima del valore reale, spesso derivato dalla media dei risultati di diversi laboratori (valore target, valore consenso e valore vero convenzionale).
Valore consenso	Vedi valore assegnato.
Valore target	Vedi valore assegnato.
Valore vero convenzionale	Vedi valore assegnato.
Variazione	La differenza tra i singoli risultati di un processo. La causa di variazione (errore) può essere comune o speciale.

7.4 Il programma di assicurazione di qualità

Il modo migliore per ottenere risultati accettabili è quello di sviluppare e attuare un programma continuo di assicurazione di qualità (QA). Un programma di QA valuta, su base regolare, la qualità e l'adeguatezza dei dati e dei servizi che il laboratorio fornisce. Gestione, amministrazione, analisi statistiche, azioni correttive e preventive costituiscono il nucleo del piano di QA. La sorveglianza continua, non solo rileva e corregge i problemi, ma aiuta anche a prevenirli.

Il programma di QA dovrebbe essere descritto in un manuale della qualità (QM) contenente procedure operative standard (SOP) e una serie dettagliata di istruzioni per i diversi processi e metodi utilizzati in laboratorio. Legate a tali istruzioni sono una serie di moduli e documenti, come le note di rinvio, i moduli di riferimento per le relazioni di laboratorio e gli opuscoli informativi per i clienti e i clinici di riferimento. Il QM descrive la struttura organizzativa del laboratorio, con l'elenco delle competenze richieste (formazione) necessarie nelle diverse posizioni (descrizioni dei posti di lavoro), nonché gli orari per i meeting tra personale di controllo e supervisori, e piani per la formazione continua, lo sviluppo e la formazione del personale.

7.5 Il manuale delle procedure di laboratorio

Le procedure operative standard scritte (SOP) devono essere rigorosamente rispettate da tutti i tecnici di laboratorio. Esse sono anche utili per la formazione e sono un importante riferimento per le procedure non di routine e per i processi di risoluzione dei problemi che non producono risultati accettabili.

Questi protocolli includono note di riferimento, procedure di informazione dei pazienti, gli orari degli appuntamenti dei pazienti, l'esecuzione di analisi, il registro dei risultati delle analisi, la formazione di nuovi membri del personale di laboratorio, le verifiche e i controlli delle attrezzature, l'uso di tabelle di controllo e le procedure da seguire quando i valori di queste tabelle indicano un problema (analisi fuori controllo). Le SOP dovrebbero riguardare le procedure per verificare che tutte le apparecchiature sono in condizioni operative adeguate, compresi il controllo di routine delle procedure, il calendario e il registro di taratura e la documentazione sulla manutenzione delle apparecchiature scientifiche, come microscopi, centrifughe, pipette, bilance, congelatori, frigoriferi e attrezzature di emergenza (ad esempio, colliri e docce). Il metodo di base è quello di tenere un registro per ciascun apparecchio, in cui sono registrate tutte le regolazioni e le tarature. Questi registri sono utili se una procedura di laboratorio inizia a produrre risultati fuori controllo.

7.6 Il controllo di qualità interno

Il controllo di qualità interno (IQC) monitorizza la precisione e indica, attraverso i risultati al di fuori dei limiti di controllo, quando il test potrebbe essere difettoso. La procedura di QC utilizzata dipende dalla valutazione da controllare poiché diverse valutazioni sono sensibili a diversi tipi di errori. Le valutazioni che coinvolgono la diluizione, il pipettamento e il riutilizzo delle camere richiedono test regolari, mentre la valutazione di un vetrino fissato o di una videocassetta può essere controllata meno spesso, in quanto ci sono meno passaggi in cui si possono verificare errori.

Un modo pratico per implementare l'IQC è di includere i campioni per l'IQC nel carico di lavoro normale del laboratorio e di seguire costantemente i risultati di questi campioni utilizzando le carte di controllo. In questo modo, l'IQC entra a far parte della routine di laboratorio e si svolge secondo gli standard locali o regionali. È importante che i campioni del QC vengano analizzati come parte del lavoro di laboratorio di routine e non trattati in modo speciale, ciò potrebbe fornire un risultato più preciso e accurato di quello dei campioni di routine. I vari campioni per l'IQC utilizzati per verificare la variazione inter e intra operatore possono essere acquistati o realizzati in laboratorio; per ogni approccio esistono vantaggi e svantaggi.

7.6.1 Campioni per il QC acquistati

I campioni disponibili in commercio per l'IQC sono dotati di un valore medio con limiti di variazione stabiliti per ogni prodotto. Il vantaggio di questi è che possono essere valutate sia l'accuratezza che la precisione. La variazione dei risultati nell'analisi del liquido seminale in laboratorio può essere confrontata con la variazione associata ai campioni provenienti da una fonte conosciuta. Con questi campioni, il laboratorio dovrebbe stabilire una propria tabella di controllo per valutare la preci-

sione e dovrebbe usare i limiti raccomandati dal fabbricante per valutare la precisione (Westgard, 2002). Gli svantaggi di acquistare campioni per l'IQC sono i loro costi e il fatto che non sono universalmente disponibili. Dovrebbe essere riportata una nota su come i valori target indicati dal costruttore sono stati ottenuti (valutazioni multiple, analisi del seme computerizzata, valori di consenso, medie aggiustate).

7.6.2 Campioni per il QC realizzati in laboratorio

I vantaggi dei campioni per l'IQC prodotti in laboratorio sono i costi ridotti e il fatto che i campioni possono essere generati specificamente per particolari esigenze di laboratorio. Molti campioni, che coprono una vasta gamma di risultati, possono essere preparati e conservati per lunghi periodi. Il loro svantaggio è che i valori target sono sconosciuti. Si raccomanda, e talvolta è necessario, che ci siano campioni di controllo per valutare un intervallo medio di valori (ad esempio, concentrazione degli spermatozoi 50×10^6 per ml), nonché un intervallo di valori critici (ad esempio, le concentrazioni di spermatozoi inferiori a 15×10^6 per ml).

7.6.3 Campioni conservati (acquistati o prodotti in laboratorio)

I campioni seminali conservati possono essere utilizzati in programmi di IQC per valutare la concentrazione, la motilità, la morfologia e la vitalità degli spermatozoi. Questi hanno il vantaggio che il valore target è noto (per i campioni acquistati), o fornito (dai programmi EQC) o stimato con valutazioni multiple (per il materiale prodotto in laboratorio), in modo che gli errori sistematici possano essere rilevati con misurazioni ripetute.

7.6.3.1 Concentrazione spermatica

I campioni seminali con diverse concentrazioni di spermatozoi possono essere diluiti e conservati. Alcuni campioni possono essere uniti per raggiungere una determinata concentrazione o un volume maggiore di sospensione diluita, ma si può verificare l'agglutinazione degli spermatozoi.

Vedi Appendice 7, Sezione A7.6, per le istruzioni sulla preparazione e la conservazione di sospensioni seminali non agglutinate per l'IQC della misura della concentrazione di spermatozoi.

7.6.3.2 Morfologia e vitalità degli spermatozoi

Possono essere utilizzati per la morfologia vetrini asciugati all'aria, strisci seminali fissati (vedi Sezione 2.13.2.1) o strisci seminali fissati e colorati (vedi Sezione 2.14), e per la vitalità strisci di eosina-nigrosina (vedi Sezione 2.6.1). Gli strisci dovrebbero essere scelti dai campioni di routine di laboratorio, con codici identificativi occultati. I campioni dovrebbero essere preparati da liquidi seminali di buona, media e bassa qualità. I vetrini possono essere riutilizzati; una volta che iniziano a deteriorarsi, dovrebbero esserne preparati di nuovi. È meglio utilizzare una serie di vetrini per eliminare la possibilità che i seminologi familiarizzino con alcuni vetrini, poiché ciò potrebbe portare ad analisi errate.

Vedi Appendice 7, Sezione A.7.7, su come preparare i vetrini per il QC di valutazione della morfologia. Se i vetrini vengono preparati e conservati correttamente, rimangono stabili per molti mesi o addirittura anni. Differenti set di vetrini possono essere alternati o sovrapposti tra loro durante la transizione da un set di QC all'altro.

7.6.3.3 Motilità degli spermatozoi

Per la valutazione del controllo di qualità possono essere utilizzati i campioni per il QC registrati su videocassetta, CD o DVD, dalla clinica, da distribuzioni EQC, o eseguiti specificamente. Le videoregistrazioni dovrebbero avere un ingrandimento simile a quello osservato al microscopio quando vengono analizzati campioni reali. L'utilizzo di una telecamera e di uno schermo per tutte le valutazioni di routine quotidiane, con lo stesso ingrandimento e contrasto delle registrazioni video, aumenta la validità delle videoregistrazioni per il QC.

Vedi Appendice 7, Sezione A7.5, su come effettuare le registrazioni video per il controllo di qualità per le misurazioni della motilità.

7.6.4 Campioni freschi per il QC (prodotti in laboratorio)

Un metodo semplice di IQC è per uno o più seminologi quello di eseguire ripetute misurazioni su aliquote diverse di un campione seminale. Le valutazioni delle repliche dovrebbero essere effettuate nello stesso modo come nell'analisi di routine del seme. Questa forma di controllo di qualità può essere applicata nella valutazione della concentrazione, motilità, morfologia e vitalità degli spermatozoi. La natura soggettiva delle valutazioni di agglutinazione e di aggregazione, e la variabilità del test di reazione mista all'antiglobulina (Bohring, Krause, 1999), insieme con la necessità di cellule mobili e controlli positivi, rende il controllo di qualità per questi test molto difficile.

L'IQC della misura della motilità degli spermatozoi in campioni a fresco presenta particolari problemi, poiché la motilità può diminuire nel tempo, e deve quindi essere valutata per prima, e circa nello stesso momento, da tutti i seminologi. Le preparazioni del vetrino e del coprioggetto per la motilità sono stabili solo per pochi minuti, per cui sono state impiegate camere di conta a profondità fissa, che sono stabili per 30 minuti. L'uso di un microscopio a ponte, o di un microscopio con una videocamera collegata a uno schermo, permette ai diversi seminologi di esaminare lo stesso campo della stessa preparazione nello stesso momento. Una griglia di acetato può essere posizionata sopra il monitor per mimare la griglia dell'oculare utilizzata durante l'analisi a fresco della motilità (vedi Appendice 7, Sezione A7.5).

I laboratori che utilizzano sistemi CASA dovrebbero seguire le procedure dei produttori per lo svolgimento dei controlli di qualità. Questo comporta spesso la riproduzione di immagini memorizzate di spermatozoi in movimento che sono identificati perché dotati di determinati tipi di velocità.

7.7 Procedure statistiche di analisi e registrazione degli errori sistematici intra e inter seminologi

La creazione e l'interpretazione di tabelle di controllo sono parte integrante dell'assicurazione di qualità in laboratorio. Quali sistemi di controllo di qualità vengano utilizzati dipende dalla natura del problema e del materiale disponibile.

7.7.1 La carta X_{bar}

La carta X_{bar} è progettata principalmente per rilevare i risultati che si discostano molto dal valore target, o per rilevare un aumento complessivo delle variazioni. Gli errori sistematici possono essere rilevati attraverso la misurazione sequenziale degli stessi campioni. Vengono effettuate ripetute misurazioni su un campione e i valori medi riportati in funzione del tempo. I campioni conservati devono essere utilizzati in quanto la procedura si basa sulla conoscenza dei valori reali o target, che possono essere forniti dal costruttore (campioni acquistati), o da un programma EQC, o stimati (con misurazioni multiple del materiale).

Commento: La carta X_{bar} è meno sensibile della carta S nel rilevare se i seminologi stanno producendo risultati molto differenti (vedi Sezione 7.7.2). Per controllare la variabilità, l'intervallo di valori per ciascun campione QC può essere seguito costantemente su una carta S in maniera simile alla carta X_{bar} , con limiti di allarme e limiti di azione definiti di conseguenza.

7.7.1.1 Calcolo dei limiti di controllo della carta X_{bar}

Una serie di campioni di QC dalla stessa preparazione di IQC viene misurata in modo sequenziale. Dopo che i primi 10 campioni sono stati analizzati, vengono calcolati i limiti di controllo per ogni seminologo. Questi limiti rappresentano l'intervallo di misure ripetute su un campione, per una procedura specifica effettuata dagli analisti stessi. Le stime della media e della deviazione standard vengono ricalcolate ogni 10 campioni e i limiti di controllo aggiornati utilizzando i nuovi valori per X_{bar} e S_{bar} , a condizione che non ci siano stati problemi con QC. Prima che i campioni QC si esauriscano, dovrebbe essere preparato un nuovo pool e i primi 10 campioni del nuovo lotto analizzati insieme ai rimanenti campioni del lotto vecchio per stabilire i nuovi limiti di controllo. I fattori utilizzati per calcolare i limiti di controllo sono riportati nella Tabella 7.1 e alcuni esempi sono indicati nei Riquadri 7.2 e 7.3.

Tabella 7.1 Fattori per la determinazione dei limiti di controllo per le carte X_{bar} e S basati sulla deviazione standard media (S_{bar})

No. di seminologi (n)	DS stimata (c_n)	Limiti di controllo X_{bar}		Limiti di controllo S_{bar}			
		Limite di allarme (A_2)	Limite di azione (A_3)	Limite di azione minore ($S_{0.999}$)	Limite di allarme minore ($S_{0.975}$)	Limite di allarme maggiore ($S_{0.025}$)	Limite di azione maggiore ($S_{0.001}$)
2	1.253	1.772	2.659	0.002	0.039	2.809	4.124
3	1.128	1.303	1.954	0.036	0.180	2.167	2.966
4	1.085	1.085	1.628	0.098	0.291	1.916	2.527
5	1.064	0.952	1.427	0.160	0.370	1.776	2.286
6	1.051	0.858	1.287	0.215	0.428	1.684	2.129
7	1.042	0.788	1.182	0.263	0.473	1.618	2.017
8	1.036	0.733	1.099	0.303	0.509	1.567	1.932
9	1.032	0.688	1.032	0.338	0.539	1.527	1.864
10	1.028	0.650	0.975	0.368	0.563	1.495	1.809

Riquadro 7.2 Determinazione dei valori per i limiti di controllo di azione e di allarme di una carta X_{bar}

La tabella mostra le concentrazioni spermatiche misurate da quattro seminologi su 10 campioni QC dalla stessa preparazione IQC, insieme con la media e la deviazione standard calcolate per ogni campione.

campione:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Concentrazione spermatica (10⁶ per ml)</i>										
Seminologo A:	38	35	40	34	38	36	44	43	39	43
Seminologo B:	42	36	42	40	40	40	43	43	46	40
Seminologo C:	38	43	40	51	38	33	39	45	35	39
Seminologo D:	34	36	36	37	36	39	42	43	46	34
Media	38.0	37.5	39.5	40.5	38.0	37.0	42.0	43.5	41.5	39.0
DS	3.27	3.70	2.52	7.42	1.63	3.16	2.16	1.00	5.45	3.74

Per i 10 campioni di QC, la media delle medie (X_{bar}) è:

$$(38.0 + 37.5 + \dots + 39.0)/10 = 39.7, \text{ e la media delle DS } (S_{bar}) \text{ è:}$$

$$(3.27 + 3.70 + \dots + 3.74)/10 = 3.40.$$

I valori dei coefficienti di $A_{2,n}$ e $A_{3,n}$ (vedi Tabella 7.1) per $n = 4$ sono 1.085 e 1.628, rispettivamente. Così i limiti di controllo di allarme (due errori standard dalla media) sono dati da:

$$X_{bar} \pm A_{2,n} \times S_{bar} = 39.7 \pm (1.085 \times 3.40) = 39.7 \pm 3.7, \text{ oppure } 36.0 \text{ e } 43.3 \times 10^6 \text{ per ml.}$$

Allo stesso modo, i limiti di controllo di azione (tre errori standard dalla media) sono dati da:

$$X_{bar} \pm A_{3,n} \times S_{bar} = 39.7 \pm (1.628 \times 3.40) = 39.7 \pm 5.5, \text{ oppure } 34.2 \text{ e } 45.2 \times 10^6 \text{ per ml.}$$

Riquadro 7.3 Metodo alternativo per il calcolo dei limiti di controllo X_{bar} dall'insieme delle deviazioni standard

La stima della deviazione standard tra-seminologi può anche essere ottenuta moltiplicando S_{bar} per C_n ($= 1.085$ per le dimensioni del campione 4, vedi Tabella 7.1) a dare 3.69. Questa è vicino al valore di 3.84 calcolato direttamente dall'insieme delle deviazioni standard, $s = \sqrt{((S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_{10}^2)/10)}$, dove S_i è la deviazione standard del campione QC i-esimo. Questo risultato può essere utilizzato per calcolare direttamente i limiti di controllo e di allarme, a 2 e 3 errori standard (s/\sqrt{n}) da entrambi i lati della media. In questo esempio, i limiti di allarme sono 35.8 e 43.5×10^6 per ml, e i limiti di azione sono 33.9 e 45.5×10^6 per ml, rispettivamente, molto vicini a quelli ottenuti impiegando S_{bar} , $A_{2,n}$ e $A_{3,n}$.

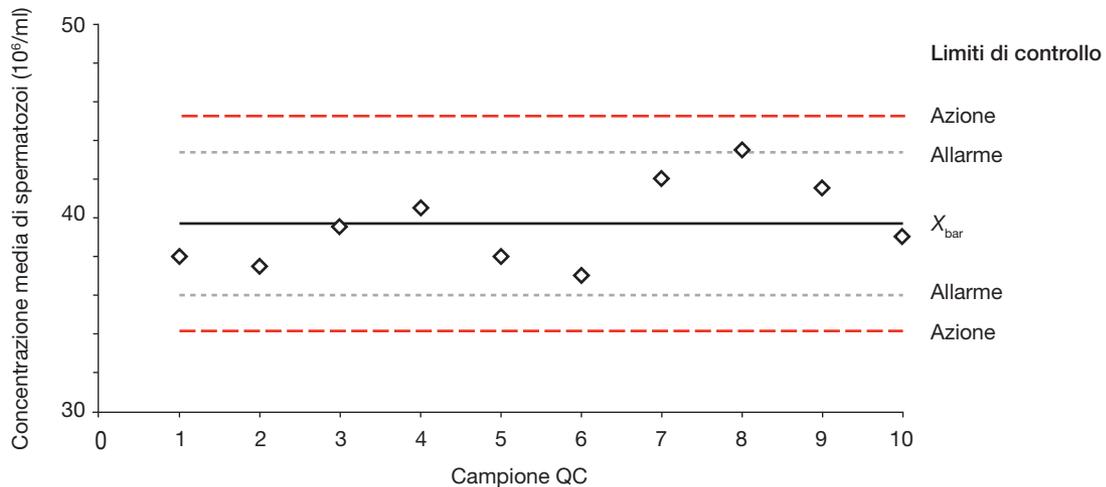
7.7.1.2 Tracciare la carta X_{bar}

Ogni seminologo dovrebbe analizzare i campioni IQC e contribuire alla carta di controllo IQC. Una volta che una procedura del test è a posto con una variazione accettabile, i campioni IQC dovrebbero essere analizzati di routine e i risultati confrontati con i valori stabiliti. Questo viene fatto riportando i valori medi rilevati per i campioni IQC in ogni saggio sulla carta di controllo e osservando se questi si trovano al di fuori della variabilità (errore) stabilita per il metodo di laboratorio (vedi Fig. 7.1 per un esempio).

Le carte X_{bar} con i limiti di allarme e di azione possono essere costruite per la valutazione della motilità, morfologia e vitalità nemaspermica, seguendo la procedura descritta per la concentrazione, con la differenza che vengono valutate le percentuali (vedi Sezione 7.8).

Fig. 7.1 Un diagramma X_{bar} per la concentrazione degli spermatozoi

I valori medi per le misurazioni sequenziali (\diamond) sono tracciati su un grafico che mostra il valore target (X_{bar}) e i limiti di azione e allarme.



7.7.2 La carta S

Questa carta rileva se i seminologi stanno producendo risultati molto variabili. Vengono effettuate ripetute misurazioni e riportate le deviazioni standard nel tempo. Dal momento che i campioni QC provengono tutti dallo stesso pool stoccato, non sono previste differenze tra i campioni, così ogni differenza significativa fra i seminologi dovrebbe suggerire un errore sistematico nella valutazione da parte di uno o più tecnici.

7.7.2.1 Calcolo dei limiti di controllo per la carta S

I limiti di controllo vengono aggiunti alla carta S nello stesso modo come per le carte X_{bar} . Tuttavia, poiché la distribuzione della deviazione standard non è simmetrica, i limiti di azione e di allarme sono scelti in modo tale che la probabilità che una nuova osservazione vada fuori dai limiti di controllo sia la stessa come per la carta X_{bar} , se non vi fossero cambiamenti nell'accuratezza e nella precisione. Pertanto, i limiti di allarme e di azione si incroceranno nel 5% e nello 0.2%, rispettivamente, dei campioni futuri a seguito di sole variazioni casuali. Questi limiti sono determinati dalla distribuzione χ^2 , e i fattori $s_{\alpha,n}$ usati per moltiplicare la deviazione standard media S_{bar} sono riportati nella Tabella 7.1. Un esempio pratico è illustrato nel Riquadro 7.4. I risultati che non raggiungono i limiti inferiori sulla carta S suggeriscono una variazione inaspettatamente piccola, che può indicare un effettivo miglioramento del livello di intesa tra i seminologi, o un loro possibile accordo.

Riquadro 7.4 Determinazione dei valori per i limiti di controllo di allarme e di azione di una carta S

Utilizzando i risultati del riquadro 7.2, la deviazione standard media per campione S_{bar} è 3.40×10^6 per ml.

I valori per $s_{\alpha,n}$ per $n = 4$ si leggono dalla Tabella 7.1 per dare:

il limite di azione inferiore $S_{bar} \times s_{0.999,4} = 3.40 \times 0.098 = 0.33 \times 10^6$ per ml,

il limite di allarme inferiore $S_{bar} \times s_{0.975,4} = 3.40 \times 0.291 = 0.99 \times 10^6$ per ml,

il limite di allarme superiore $S_{bar} \times s_{0.025,4} = 3.40 \times 1.916 = 6.51 \times 10^6$ per ml, e

il limite di azione superiore $S_{bar} \times s_{0.001,4} = 3.40 \times 2.527 = 8.59 \times 10^6$ per ml.

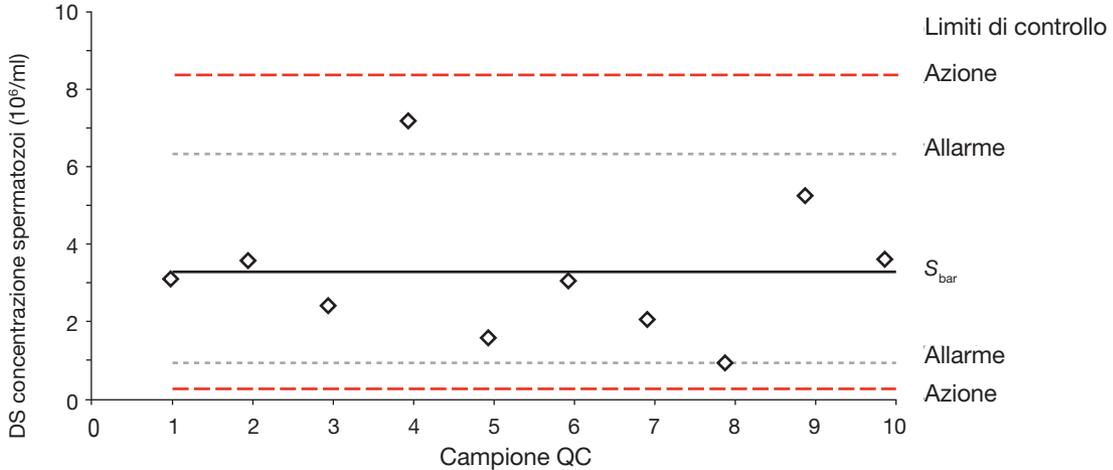
7.7.2.2 Tracciare la carta S

Valori di deviazione standard successivi vengono tracciati sulla carta di controllo per determinare se essi si trovano al di fuori della variabilità (errore) stabilita per il metodo di laboratorio (vedi Fig. 7.2 per un esempio).

Le carte S con i limiti di allarme e di azione possono essere costruite per la valutazione della motilità, morfologia e vitalità nemaspermica, seguendo la procedura descritta per la concentrazione, con la differenza che vengono valutate le percentuali (vedi Sezione 7.8).

Fig. 7.2 Un diagramma S per la concentrazione degli spermatozoi

Le deviazioni standard per le misurazioni sequenziali (\diamond) sono tracciate su un grafico che mostra il valore medio precedentemente misurato (S_{bar}) e i limiti di azione e allarme.



7.8 QC per le percentuali

Quando gli spermatozoi sono classificati in due o più classi (come morfologia normale o anormale, motilità progressiva o non progressiva, spermatozoi vivi o morti), l'errore standard della percentuale stimata all'interno di una classe dipende sia dalla percentuale vera, ma sconosciuta, come pure dal numero di spermatozoi contati (N). La stima approssimata comune dell'errore standard di una proporzione, p , è $\sqrt{(p(100-p)/N)}$ per valori compresi tra il 20% e l'80%. Al di fuori di questo intervallo, un metodo più appropriato da utilizzare è la trasformazione angolare (radice quadrata dell'arco seno), $z = \sin^{-1}\sqrt{(p/100)}$, per cui la deviazione standard è $1/(2\sqrt{N})$ radianti, cioè dipendente solo dal numero di spermatozoi contati e non dalla percentuale vera (vedi Kuster *et al.*, 2004).

Mentre la deviazione standard di singole letture dovrebbe essere vicina a questi valori, la deviazione standard media (S_{bar}) li supererà del 2.5%, a causa della variazione aggiuntiva tra i diversi seminologi. In questo caso l'obiettivo sarà di ridurre S_{bar} .

7.9 Valutazione delle carte X_{bar} e S

I seminologi e il responsabile del laboratorio dovrebbero riesaminare insieme le carte di controllo. Se i valori di controllo non sono accettabili, una valutazione sistematica di tutta la procedura dovrebbe essere effettuata per determinare le possibili fonti di variazione.

7.9.1 Come riconoscere i valori fuori controllo

Ci sono linee guida di base per il monitoraggio del controllo di qualità delle procedure. Le carte QC dovrebbero essere esaminate alla luce di queste linee guida ed intervenire quando indicato. Ci sono diverse regole per dichiarare un metodo fuori controllo, tra cui le seguenti:

- Un unico punto si trova al di fuori dei limiti di controllo 3 DS. Questa è la regola più semplice, e sembra essere universalmente adottata. Può indicare un cambiamento improvviso di grandi dimensioni nel processo.
- Due di tre punti consecutivi si trovano al di fuori dei limiti di controllo di azione.
- Quattro su cinque punti consecutivi si trovano al di fuori dei limiti di controllo di allarme.
- Due risultati consecutivi si trovano sopra il livello superiore, o sotto quello inferiore, dei limiti di controllo di allarme.
- Due risultati consecutivi si trovano l'uno sopra il livello superiore e l'altro sotto quello inferiore dei limiti di controllo di allarme.
- Otto punti consecutivi sono sullo stesso lato della linea centrale. Questa regola è interessante perché è semplice da applicare ed è sensibile ai cambiamenti o alle tendenze graduali che con la prima regola si potrebbero perdere.

In pratica, è generalmente accettato l'uso della prima e dell'ultima di queste regole. Se il campione QC viene "rifiutato", la sensibilità di allarme per i diversi tipi di errore (casuale o sistematico) dovrebbe guidare l'indagine verso possibili cause (vedi Riquadro 7.5). Il responsabile del laboratorio dovrebbe esaminare i risultati QC regolarmente.

Riquadro 7.5 Regole di controllo di base per le carte QC

Regola di controllo	Errore indicato
Un risultato al di fuori dei limiti di azione	Casuale
Due di tre punti consecutivi si trovano al di fuori dei limiti di controllo di azione	Sistematico
Quattro su cinque punti consecutivi si trovano al di fuori dei limiti di controllo di allarme	Sistematico
Due risultati consecutivi, entrambi al di sopra o al di sotto dei limiti superiore/inferiore di allarme	Sistematico
Due risultati consecutivi, uno sopra e uno sotto i limiti superiore/inferiore di allarme	Casuale
Otto risultati consecutivi, tutti al di sopra o al di sotto della media	Sistematico

7.9.2 Cause di valori fuori controllo

I segnali della procedura QC devono essere attentamente valutati e individuati gli eventuali errori procedurali. Gli errori possibili includono:

- incompleto miscelamento del campione (frequente nel caso di campioni viscosi e agglutinati);
- stress del seminologo (per esempio, campionamento incostante ed errori di registrazione);
- scarsa tecnica (per esempio, trascuratezza nel pipettamento o nella manipolazione durante la preparazione di camere o vetrini) (vedi Sezione 7.13);
- percorso formativo inadeguato (per esempio, differenze sistematiche nella valutazione di conta nemaspermica, morfologia normale, teste di spermatozoi rosa e bianche o code rigonfie per la vitalità, ricerca di spermatozoi mobili; errori dovuti a consistenti errori di calcolo (vedi Sezione 7.13);
- variazione degli strumenti (per esempio, pipette automatiche usurate o non calibrate, che possono ridurre la riproducibilità durante il campionamento e la diluizione; microscopi disallineati, che possono ridurre la nitidezza ottica e impedire la corretta valutazione della vitalità o della morfologia; bilance o cilindri graduati inaccurati) (vedi Appendice 7, Sezione A7.8);
- deterioramento dei campioni QC;
- cambio della strumentazione, in particolare pipette e camere di conta;
- cambio nelle procedure o nell'ambiente di laboratorio.

7.9.3 Risposte ai valori fuori controllo

Quando i risultati sono al di fuori dei limiti di controllo, devono essere registrate la probabile causa e le azioni correttive adottate. Se il problema non è ovvio, rianalizzare i campioni QC per verificare se il primo risultato era inusuale. Se il risultato del controllo di qualità resta al di fuori dei limiti di controllo, deve essere trovata e corretta la causa prima che vengano eseguiti ulteriori test.

Per fare questo:

- creare un diagramma di flusso di tutto il processo, passo dopo passo. Il SOP e le Tabelle 7.2-7.5 possono aiutare questo processo;
- dal diagramma di flusso, identificare le aree di potenziale variazione, dedurre le possibili cause ed elaborare un piano per ridurre la variazione;
- raccogliere maggiori dati, fare nuove carte di controllo e riesaminarle per determinare se la variabilità è accettabile per la procedura. Questa sequenza di identificazione di un problema, di sviluppo e sperimentazione di un'ipotesi, e di rivalutazione del processo è nota come ciclo di Shewhart o PDCA (pianifica, fai, controlla e agisci).

7.10 Procedure statistiche per l'analisi e la registrazione della variabilità fra seminologi

Le procedure di controllo di qualità basate sulla valutazione di campioni seminali freschi sono simili a quelle per i campioni conservati e consentono di valutare la variabilità all'interno e tra i seminologi. Tuttavia, poiché il vero valore non è noto, non può essere utilizzata la carta X_{bar} , e non può essere stimato l'errore sistematico (*bias* del seminologo). Qui, le procedure di controllo di qualità primarie sono la carta S per valutare la variabilità tra i seminologi, e l'analisi della varianza a due vie (ANOVA) per valutare differenze sistematiche tra seminologi dopo ogni 5 o 10 campioni QC.

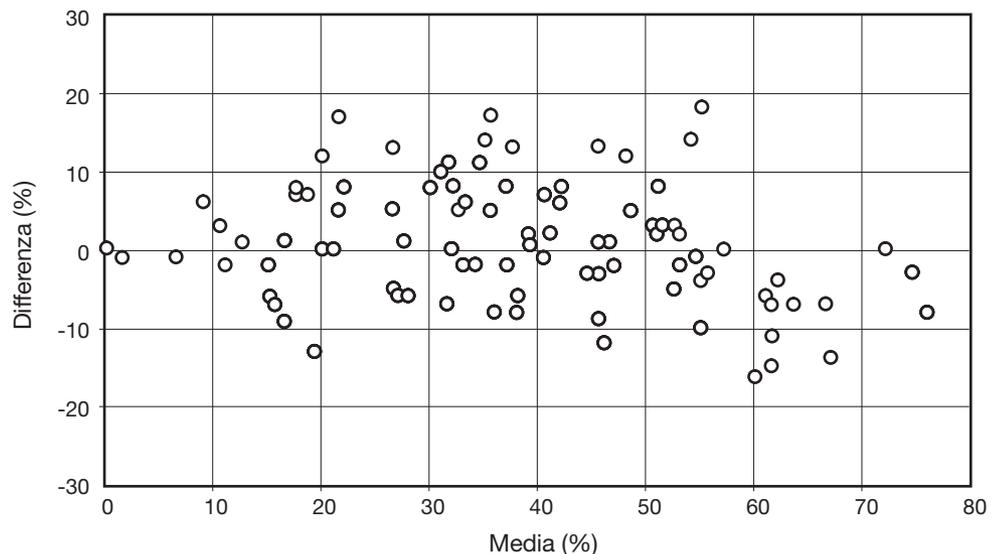
7.10.1 Comparare i risultati tra due o più seminologi

I risultati tra due o più seminologi possono essere comparati in diversi modi.

- *Tracciare la differenza tra due stime rispetto alla loro media* (Bland, Altman, 1986). Un confronto delle stime di due seminologi sulla concentrazione di spermatozoi dello stesso campione dovrebbe produrre un modello analogo a quello in Fig. 7.3, dove sono confrontate le stime della motilità degli spermatozoi tra un seminologo e un computer.

Fig. 7.3 Una carta Bland-Altman di stime manuali e col sistema CASA della percentuale progressiva di motilità spermatica

La carta riporta la differenza tra i risultati con i due metodi (manuale - CASA) rispetto alla media ((manuale + CASA)/2).



Dati cortesemente forniti da HWG Baker.

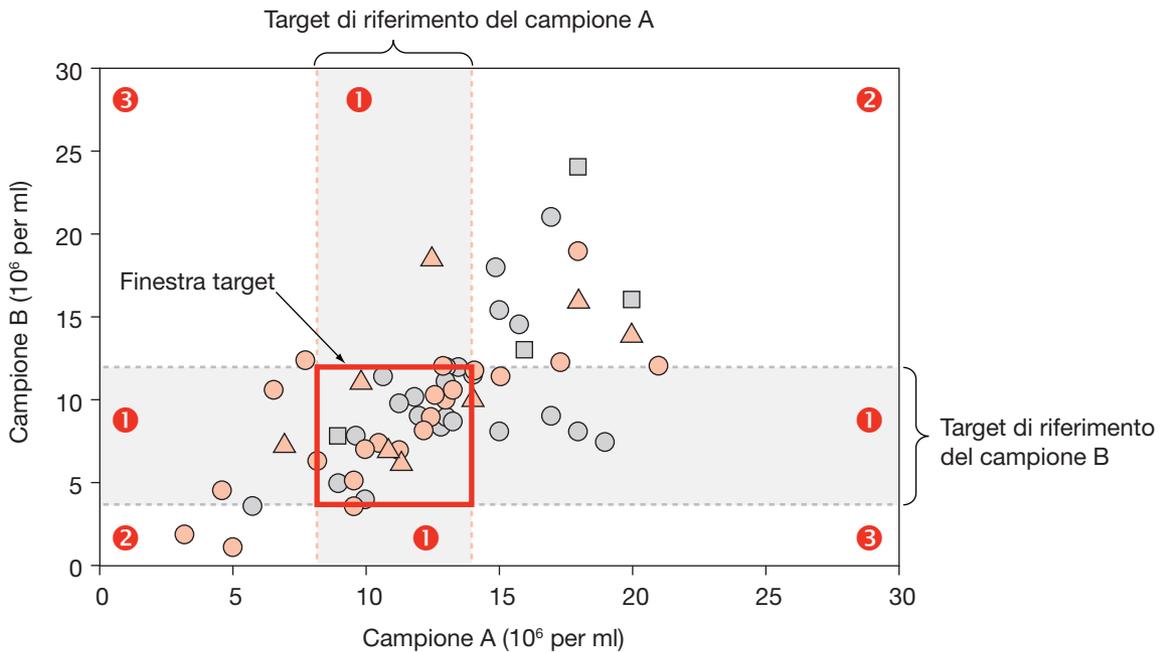
- *Calcolo della media e della DS delle differenze (comparazione appaiata)*. Poiché lo stesso campione viene analizzato da entrambi i seminologi, la differenza tra le medie dovrebbe essere zero. Qualsiasi differenza significativa dallo zero,

come valutato da un t-test accoppiato, rivela un errore (differenza sistematica) tra i due seminologi.

- *Rappresentazione grafica dei risultati di due campioni testati l'uno verso l'altro (diagramma di Youden).* Un confronto delle stime di concentrazione da parte di diversi seminologi, ciascuno che esamina due campioni separati, dovrebbe produrre un modello analogo a quello in Fig. 7.4. Per ciascun seminologo (per l'IQC) o centro (per l'EQC), i valori per i due campioni sono riportati uno rispetto all'altro. Le linee tratteggiate orizzontali e verticali indicano i limiti di confidenza al 95% dei risultati di seminologi esperti (IQC) o di laboratori di riferimento (EQC). L'area definita dalla intersezione di queste linee è la finestra target in cui i valori dovrebbero diminuire. Questa carta rivela gli errori casuali quando il valore di un campione è nel range corretto, mentre il valore per l'altro campione non lo è (designato come 1) e gli errori sistematici quando entrambe le stime del campione sono troppo elevate (in alto a destra del riquadro, designato come 2) o troppo basse (riquadro in basso a sinistra, designato come 2). Gli errori casuali molto probabilmente contribuiscono perché un campione risulti troppo basso e l'altro troppo elevato (designato come 3).

Fig. 7.4 Un grafico di Youden per la stima delle concentrazioni degli spermatozoi

I risultati dell'analisi dei due campioni (A, B) da parte di vari seminologi tracciati uno contro l'altro. I risultati per ciascun seminologo (o laboratorio in EQC) possono essere indicati da differenti simboli e colori. I risultati nei riquadri indicati con 2 sono probabilmente dovuti ad errori sistematici, mentre quelli nei riquadri contrassegnati con 1 e 3 sono probabilmente dovuti a errori casuali.



- *Analisi a due vie della varianza.* Questa tecnica è descritta in molti libri di statistica (per esempio, Armitage *et al.*, 2002) ed è disponibile nei programmi informatici, insieme con test statistici per la significatività delle differenze fra i seminologi. Come nel caso del confronto appaiato citato sopra, le differenze tra le stime di tutti i seminologi dovrebbero essere pari a zero. Pertanto, le differenze dal valore medio vengono calcolate per ogni campione e per ogni seminologo, e la media e la deviazione standard di queste differenze vengono calcolate per ogni seminologo. L'errore viene indicato per i seminologi per i quali il valore assoluto della differenza è più di 3 errori standard della differenza media.

Un test statistico utilizzato per valutare le differenze fra i diversi seminologi che si basa sul test F di Fisher dall'analisi della varianza a due vie, che può essere ottenuto direttamente dalla maggior parte dei programmi di statistica per computer. Lo scarto quadratico medio è la radice quadrata della varianza (residuo) ottenuta dalla tabella riassuntiva dell'analisi della varianza. Differenze medie maggiori di circa 2.5 errori standard sono difficilmente il risultato di una sola variazione casuale (<1.2%). Sia che le differenze fra i seminologi siano significative o non significative, è necessario rivedere le medie dei seminologi, o le differenze medie per identificare quali sono quelle maggiori del previsto. Non tutti i programmi per computer forniscono l'errore standard delle differenze tra i seminologi, che però possono essere calcolate separatamente. Le differenze sostanziali tra i seminologi dovrebbero indurre una revisione di tutte le procedure per identificare in che modo può essere migliorata la consistenza dei dati.

L'esempio riportato nel riquadro 7.6 illustra come calcolare direttamente l'errore standard delle differenze tra i seminologi per la concentrazione degli spermatozoi, e valutare, se questi sono superiori a quello che ci si sarebbe aspettato se questa fosse una variazione solamente di tipo casuale. Quando si eseguono calcoli direttamente dalle osservazioni, deve essere mantenuto un numero sufficiente di cifre decimali per evitare errori di arrotondamento.

7.10.2 Controllo mensile delle medie

Mentre le procedure primarie di IQC sono basate sulla valutazione delle differenze intra e inter operatore, ulteriori informazioni possono essere ottenute dal controllo continuo dei risultati dell'analisi seminale.

I valori medi di ciascuna variabile per tutti i pazienti esaminati per un certo periodo (ad esempio mensilmente) possono essere rappresentati su una carta X_{bar} , con i limiti di allarme e di azione di 2 e 3 errori standard da entrambi i lati della media. L'errore standard può essere stimato dalla deviazione standard delle osservazioni originali diviso la radice quadrata del numero di analisi seminali in ciascun intervallo, o direttamente dalla distribuzione osservata della media. I limiti di controllo dovrebbero essere determinati dopo almeno 6 mesi di osservazioni e dovrebbero essere revisionati regolarmente. Ci dovrebbero essere almeno 20 valori per ogni media, un piccolo laboratorio può ottenere tali risultati in più di 1 mese. Perfezionamenti a questo metodo includono il monitoraggio delle medie mensili di pazienti con valori normali e l'uso di carte a somma cumulativa (CUSUM), per l'individuazione rapida di eventuali scostamenti dalla media sistematica (Barnett, 1979).

Deviazioni dai valori attesi possono riflettere le diverse caratteristiche del paziente (variazioni tempo-dipendente nei pazienti da analizzare, un cambiamento del numero di prove ripetute sugli stessi pazienti, modificazioni nelle caratteristiche di assegnazione di pazienti con diversi tipi di infertilità) o fattori tecnici (cambi di seminologi, materiale di laboratorio, le variazioni stagionali di temperatura ecc.).

7.11 Controllo e assicurazione di qualità esterni

Il controllo di qualità esterno (EQC) è parte integrante del completo processo di QC (Cekan *et al.*, 1995) che verifica i risultati del test, mentre l'assicurazione esterna di qualità (EQA) controlla tutte le procedure di laboratorio relative alla raccolta e trasmissione di dati al fine di garantire che i processi di laboratorio siano sotto controllo. L'EQC permette ad un laboratorio di confrontare i suoi risultati con quelli degli altri e di valutare e confrontare su larga scala metodi diversi altrimenti imparagonabili per un singolo laboratorio.

L'EQC e l'IQC sono processi complementari. L'EQC può rivelare con precisione i problemi che non possono essere colti dall'IQC se i campioni di controllo non sono adeguatamente occultati o selezionati. L'EQC ha il vantaggio di permettere ad un laboratorio di controllare l'accuratezza e la stabilità dei suoi metodi (Plaut, Westgard, 2002). Tuttavia, poiché i campioni EQC sono chiaramente di origine esterna, possono essere manipolati in modo speciale, in ogni caso occorre che questi campioni vengano analizzati come quelli di routine.

Riquadro 7.6 Valutazione delle differenze sistematiche tra seminologi

La tabella mostra le concentrazioni di spermatozoi valutate da tre seminologi su cinque campioni QC.

Concentrazione degli spermatozoi (10^6 per ml)

Campione	1	2	3	4	5
Seminologo A	108	45	100	50	92
Seminologo B	103	47	102	50	96
Seminologo C	104	46	89	41	88
Media del campione	105	46	97	47	92

Le differenze dalla media del campione (d_{ij}) sono calcolate sottraendo la media del campione seminale da ogni osservazione:

Campione	1	2	3	4	5
Seminologo A	3.0	-1.0	3.0	3.0	0.0
Seminologo B	-2.0	1.0	5.0	3.0	4.0
Seminologo C	-1.0	0.0	-8.0	-6.0	-4.0

La media, $m_j = \sum_i d_{ij} / n$, e la deviazione standard, $s_j = \sqrt{(\sum_i d_{ij}^2 / (n - 1))}$, di queste differenze sono calcolate per ogni seminologo, dove n è il numero dei campioni seminali.

	Media (m_j)	DS (s_j)	Media/errore standard ($m_j / ES(m_j)$)
Seminologo A	1.600	1.949	1.836
Seminologo B	2.200	2.775	1.773
Seminologo C	-3.800	3.347	-2.539

Per il seminologo C, la differenza media dalla media del campione è -3.8×10^6 per ml, ovvero $5.7 (-3,8 - (1.6 + 2.2) / 2) \times 10^6$ per ml meno rispetto alla media degli altri due seminologi. Per valutare se il grado di sottostima è compatibile con variazioni casuali, lo scarto quadratico medio $\hat{\sigma} = \sqrt{(\sum_i s_i^2 / (t-1))}$, dove t è il numero di seminologi, viene calcolato dalle deviazioni standard dei singoli seminologi. In questo esempio, $\hat{\sigma} = 3.369 \times 10^6$ per ml. L'errore standard della differenza media di ogni seminologo è dato dalla $ES(m_j) = \hat{\sigma} \sqrt{((1-1/t)/n)}$, o 1.230×10^6 per ml. Il valore assoluto della differenza media del seminologo C (3.8×10^6 per ml) è maggiore di 3 errori standard, ed è quindi significativamente diversa dal valore atteso pari a zero (supponendo che non vi siano differenze sistematiche tra i seminologi).

Un test statistico formale delle differenze fra i seminologi si basa sull'F-test dall'analisi a due vie della varianza per i seminologi e per i campioni di QC. L'analisi della tabella di varianza, utilizzando le concentrazioni degli spermatozoi citate sopra, è la seguente.

Origine	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Media degli scarti	F-rapporto	P-valore
Campioni QC	9807.6	4	2451.90	216.03	<0.001
Tecnici	109.2	2	54.60	4.81	0.042
Errore	90.8	8	11.35		
Totale	10007.6	14			

Lo scarto quadratico medio è $\sqrt{11.35} = 3.369 \times 10^6$ per ml, lo stesso ottenuto prima. Come previsto, le differenze tra i campioni di QC sono molto grandi ($P < 0.001$) dal momento che sono tratti da differenti campioni di liquido seminale fresco. L'F-test per le differenze tra seminologi ($F = 4.81$ con 2 e 8 gradi di libertà, $P = 0.042$) è significativo a livello 0.05 e suggerisce che queste differenze sono maggiori di quanto previsto dalle sole variazioni casuali.

Riquadro 7.7 Principali caratteristiche delle procedure IQC			
Procedura	Errori rilevati	Materiale QC	No. di seminologi
Carta X_{bar}	Errore, variabilità complessiva, accuratezza	Conservato	Individuale, alcuni
Carta S	Errore/precisione	Conservato/fresco	Alcuni
Analisi della varianza a due vie	Errore/precisione	Conservato/fresco	Alcuni
Bland-Altman	Errore/precisione	Conservato/fresco	Due
Test appaiati	Errore/precisione	Conservato/fresco	Due
Diagramma di Youden	Errore/precisione	Conservato/fresco	Alcuni

L'EQC comprende programmi di test comparativi e valutativi nei quali i campioni che si presume siano identici vengono inviati a tutti i laboratori partecipanti per l'analisi (Cembrowski, Carey, 1989). I laboratori inviano i loro risultati ad un impianto centralizzato in cui vengono esaminati i dati per valori anomali, e sono calcolate le medie e le deviazioni standard per caratterizzare le prestazioni dei laboratori partecipanti. In Appendice 8 viene fornito un elenco di programmi nazionali di EQC per l'analisi del liquido seminale.

7.11.1 Valutazione dei risultati EQC

Gli schemi EQC forniscono ai laboratori informazioni sia sui loro risultati che su quelli degli altri laboratori partecipanti. Si dovrebbe verificare se i valori target specifici sono stati ottenuti con misurazioni accurate, con conte multiple all'emocitometro della concentrazione di spermatozoi, con analisi computerizzata della motilità degli spermatozoi, e se i risultati sono stati ottenuti da un gruppo di laboratori di riferimento ben controllati o sono medie sfrondate di tutti i centri partecipanti. I risultati sono spesso presentati graficamente, ad esempio in un grafico a barre. Se lo stesso campione EQC viene utilizzato in diverse occasioni, saranno anche segnalati l'errore e la variabilità dei risultati del laboratorio su questo campione.

Quando sono previsti due campioni per analisi, viene spesso costruito un diagramma di Youden in cui vengono tracciati sugli assi x e y i valori di ciascun campione (vedi Fig. 7.4). La misura in cui i centri si differenziano per la loro valutazione è chiaramente visibile dalla dispersione e dalla distribuzione dei valori tracciati. Possono essere visualizzati ulteriori dati, ad esempio, utilizzando simboli e colori diversi per indicare l'uso di metodi diversi (camere di conta, colorazioni o criteri di valutazione) o centri diversi.

Quando vengono distribuiti più di due campioni, si possono manifestare vari aspetti del bias (la differenza dal valore designato). Questi includono:

- l'indice di punteggio *bias* (BIS): *bias* diviso un coefficiente di variazione scelto $\times 100$, che può essere positivo o negativo;
- il punteggio dell'indice di varianza (VIS): questo è simile al BIS, ma è sempre positivo;
- il punteggio medio di esecuzione del BIS o del VIS (MRBIS, MRVIS), che aiutano a verificare i trend.

Un basso MRBIS e un basso MRVIS indicano che i risultati sono vicini ai valori designati, un MRBIS basso ma un MRVIS elevato potrebbero indicare errori casuali e un MRBIS e un MRVIS alti potrebbero indicare errori sistematici. I risultati riportati come successo/insuccesso o come ranghi sono utili per il controllo e la certificazione di laboratorio.

Un modo semplice per controllare le prestazioni è quello di segnare i risultati del laboratorio (sull'asse y) rispetto al valore target (sull'asse x) per ogni parametro. Ciò mostra chiaramente quanto vicino alla linea di identità cadono i valori del laboratorio. In alternativa, le differenze rispetto ai valori target possono essere visualizzate con una carta di Bland-Altman (vedi Fig. 7.3).

7.11.2 Le risposte ai risultati “fuori del controllo”

Le informazioni essenziali derivate da programmi EQC riguardano la precisione o l'errore dei laboratori e i metodi di laboratorio. Il risultato desiderato per i laboratori è quello di mantenere o migliorare la precisione dei loro metodi (Plaut, Westgard, 2002). I laboratori con risultati che sono costantemente superiori o inferiori al valore assegnato o alla media dello schema EQC necessitano di rivalutare i loro metodi. Una varietà così ampia di risultati EQC è di solito associata ad ampie variazioni nei risultati IQC e indica incongruenze nelle procedure di valutazione da campione a campione. Le procedure tecniche dovrebbero essere attentamente rivisitate per assicurarsi che siano conformi alle raccomandazioni contenute nel presente manuale.

Azioni adeguate comprendono quelle discusse per IQC (vedi Sezione 7.9.3) con nuove esercitazioni e nuovi test. Le Tabelle 7.2-7.5 indicano anche le potenziali fonti di variazione nell'analisi del liquido seminale e le soluzioni proposte. Lo scambio di personale scientifico tra i laboratori è spesso utile e può portare vantaggi la formazione dei seminologi nei laboratori che ottengono buoni risultati EQC. Un consulente di un laboratorio con buoni risultati EQC sarà spesso in grado di valutare quali metodi potrebbero essere modificati per migliorare la riproducibilità.

7.12 Frequenza e priorità del controllo di qualità

I campioni per il controllo di qualità devono essere analizzati sistematicamente. La frequenza delle analisi può essere determinata da raccomandazioni nazionali o locali o imposte dalle leggi per le licenze di laboratorio o da agenzie di accreditamento. Alcuni regolamenti richiedono che i campioni per il controllo di qualità siano analizzati ogni giorno che viene valutata la concentrazione di spermatozoi dei pazienti; in caso contrario tra l'1% e il 5% dei campioni dovrebbe essere analizzato per IQC.

I campioni QC dovrebbero essere usati per:

- controllare costantemente il personale neoassunto e quello già presente;
- ogni volta che sono introdotte nuove attrezzature di laboratorio, forniture, procedure, o partite di campioni di IQC.

Il Riquadro 7.8 contiene una guida generale alla programmazione di QC; in pratica, il programma dipenderà dal carico di lavoro del laboratorio. Il riquadro 7.9 indica la priorità dei diversi protocolli di QC; alcune procedure possono non essere eseguibili per i laboratori con finanziamenti limitati.

Riquadro 7.8 Calendario per il controllo di qualità

Sempre	Sorveglianza e correlazione dei risultati dei campioni
Settimanale/mensile	Analisi delle misurazioni in replicato da parte di differenti seminologi
Mensile/trimestrale	Analisi dei risultati medi
Trimestrale/semestrale	Partecipazione all'EQC
Semestrale/annuale	Calibrazione di pipette, camere di conta e altre attrezzature

Riquadro 7.9 Sommario dei test QC

Parametri	Materiale	Valore target	Accuratezza, errore	Precisione	Priorità (1>2>3)
Concentrazione	IQC fresco	No		carta S, ANOVA 2-vie	1
	IQC conservato	Sì	carta X_{bar}	carta S	3
	EQC	Sì	carta X_{bar}	carta S	2
Morfologia	IQC fresco	No		carta S, ANOVA 2-vie	1
	IQC conservato	Sì	carta X_{bar}	carta S	3
	EQC	Sì	carta X_{bar}	carta S	2
Motilità	IQC fresco	No		carta S, ANOVA 2-vie	1
	IQC conservato	Sì	carta X_{bar}	carta S	3
	EQC	Sì	carta X_{bar}	carta S	2
Vitalità	IQC fresco	No		carta S, ANOVA 2-vie	1
	IQC conservato	Sì	carta X_{bar}	carta S	3
	EQC	Sì	carta X_{bar}	carta S	2

7.13 Addestramento

Un approccio simile al controllo di qualità può essere utilizzato quando si formano nuovi seminologi, si introducono nuovi test, o si valutano modifiche alla metodologia già esistente. L'addestramento dei seminologi dovrebbe includere la consapevolezza dei metodi descritti qui di seguito.

7.13.1 Consigli pratici per quando si incontrano difficoltà nel valutare la concentrazione degli spermatozoi

- Rivedere le procedure di miscelazione e diluizione, le griglie della camera e i calcoli.
- Leggere i campioni entro 10-15 minuti dal caricamento della camera, dopo di che l'evaporazione produrrà effetti notevoli sulla posizione degli spermatozoi all'interno della camera.
- Due seminologi dovrebbero lavorare insieme, usando un microscopio a ponte o un microscopio equipaggiato con una videocamera e un televisore, mettendo a confronto la diluizione, il caricamento e le procedure di conta. Essi dovrebbero contare la stessa camera caricata, confrontando i valori per le righe o le griglie, per trovare la fonte delle divergenze.
- Utilizzare un microscopio a ponte in una sessione di conta e allenamento, o esaminare gli spermatozoi nella griglia oculare, per decidere se gli spermatozoi devono essere considerati sulla linea e quindi debbano essere inclusi nel conteggio.
- Rivedere la Tabella 7.2.

Tabella 7.2 Fonti di variazione (errore) nella valutazione della concentrazione nemaspermica e soluzioni proposte

Procedura	Prevenzione	Controllo
Incompleto miscelamento dei campioni seminali prima di effettuare la diluizione	Addestramento, SOP	Ripetere le diluizioni
Errori di diluizione (per esempio assumendo che una diluizione 1:20 è di 1 + 20, quando in realtà è 1 + 19)	Addestramento, SOP	IQC
Pipetta fuori calibrazione (per esempio la pipetta è tarata a 100 µl ma dispensa 95 µl o 110 µl)	manutenzione delle attrezzature, SOP	Ripetere le diluizioni, IQC, EQC
Uso di pipette inappropriate (per esempio una pipetta ad aria piuttosto che una a spostamento positivo)	Addestramento, SOP	Ripetere le diluizioni, IQC, EQC
Uso di un volume basso per diluire, che comporta un alto rischio di campioni non rappresentativi	Addestramento, SOP	Ripetere le diluizioni, IQC, EQC
Mancata pulizia dei residui seminali dalla punta della pipetta prima di dispensarlo nel diluente	Addestramento, SOP	IQC
Camera non pulita e non asciutta	Addestramento, SOP	Ripetere le misurazioni
Camera non correttamente caricata o assemblata (per esempio particelle di sporco sulle colonne possono modificare l'altezza della camera)	Addestramento, SOP	Ripetere le misurazioni
Intervallo di tempo eccessivo tra il miscelamento del seme e la rimozione di un'aliquota per la diluizione (gli spermatozoi nel seme iniziano a sedimentare immediatamente)	Addestramento, SOP	Replicare le diluizioni e le misurazioni
Intervallo di tempo eccessivo tra l'agitazione con vortex della diluizione e il caricamento in camera (gli spermatozoi nel seme iniziano a sedimentare immediatamente)	Addestramento, SOP	Replicare le diluizioni e le misurazioni
Microscopio non pulito o allineato. Ingrandimento non corretto	Addestramento, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Attesa non abbastanza lunga dopo il caricamento in camera e prima dell'analisi (tempo insufficiente per la sedimentazione)	Addestramento, SOP	Ripetere le misurazioni, IQC, EQC
Camera emocitometrica non orizzontale durante la sedimentazione del seme, o non mantenuta in ambiente umido durante la sedimentazione	Addestramento, SOP	Ripetere le misurazioni, IQC, EQC
Errata identificazione degli spermatozoi (ad esempio residui valutati come spermatozoi o spermatozoi difficili da riconoscere non valutati)	Addestramento, SOP	IQC, EQC

Valutare troppe o troppo poche righe sulla griglia (cioè calcoli errati), arrestarsi nel mezzo di una riga	Addestramento, SOP	IQC, EQC
Conteggio di troppo pochi spermatozoi, con conseguente elevato errore di campionamento	Addestramento, SOP	IQC, EQC
Conteggio errato degli spermatozoi sulle linee dei riquadri all'interno della camera di conta (per esempio, sopravvalutando la concentrazione se vengono conteggiati spermatozoi sul bordo superiore, inferiore, sinistro e destro)	Addestramento, SOP	IQC, EQC
Malfunzionamento del contatore multichave	Manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Errore matematico nel calcolo o nella correzione della diluizione	Addestramento, SOP	IQC, EQC
Uso della camera a riempimento capillare (ineguale distribuzione di spermatozoi durante il riempimento)	Addestramento, SOP	IQC, EQC

7.13.2 Consigli pratici quando si verificano difficoltà nel valutare la morfologia degli spermatozoi

- Rispettare le linee guida di questo manuale: studiare le micrografie e i relativi commenti per ogni spermatozoo.
- Prestare particolare attenzione agli spermatozoi con morfologia borderline, che devono essere classificati come anormali.
- Condurre una sessione di formazione e di misurazione utilizzando un microscopio a ponte o un microscopio equipaggiato con una videocamera e uno schermo TV.
- Rivedere la Tabella 7.3.

Tabella 7.3 Fonti di variazione (errore) nella valutazione della morfologia degli spermatozoi e soluzioni proposte

Procedura	Prevenzione	Controllo
Microscopio non pulito o allineato. Ingrandimento non corretto	Addestramento, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Addestramento inadeguato prima di eseguire l'analisi	Addestramento	IQC, EQC
Tecniche soggettive, senza linee guida chiare	Addestramento, SOP	IQC, EQC
Impercettibili influenze dei colleghi sui sistemi di classificazione (possono causare cambiamenti durante l'analisi)	Addestramento	IQC (carte di controllo)
Liquido seminale non adeguatamente miscelato quando si prepara lo striscio	Addestramento, SOP	IQC
Scadente preparazione dello striscio (troppo spesso o troppo sottile)	Addestramento, SOP	IQC
Scadente tecnica di colorazione (chiara, scura, o troppo colore di fondo)	Addestramento, SOP	IQC
Valutazione degli spermatozoi sul bordo del vetrino	Addestramento, SOP	IQC
Tentativo di valutare spermatozoi che non sono piatti, o che si sovrappongono ad altri spermatozoi	Addestramento, SOP	IQC
Non valutare tutti gli spermatozoi dell'area ma solo quelli selezionati	Addestramento, SOP	IQC
Perdita dell'intensità di colore nel tempo (per campioni conservati per IQC)	Addestramento, SOP	IQC (carte di controllo)
Errori nel calcolo delle percentuali, se non conteggiato in multipli di 100	Addestramento, SOP	IQC, EQC
Malfunzionamento del contatore multichave	Manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC

7.13.3 Consigli pratici in caso di difficoltà nella valutazione della motilità degli spermatozoi

- Eseguire la preparazione subito prima della valutazione. Leggere solo dopo la stabilizzazione per ridurre gli errori nella motilità totale.
- Selezionare il campo in modo casuale e non selezionare deliberatamente i campi con un numero alto o basso di spermatozoi mobili. Un modo per farlo è quello di evitare di guardare attraverso gli oculari fino a quando non è stato selezionato un campo.

- Non aspettare che entrino nel campo spermatozoi mobili prima di iniziare a contare.
- Analizzare rapidamente e solo una piccola parte della griglia per volta, a seconda della concentrazione degli spermatozoi.
- Ridurre il tempo per l'esame di un settore della griglia, per evitare di contare spermatozoi che entrano nell'area durante l'analisi.
- Contare gli spermatozoi con motilità progressiva, non progressiva e immobili in due fasi. Se ci sono problemi con la tecnica, invertire l'ordine dell'analisi.
- Rivedere la Tabella 7.4

Tabella 7.4 Fonti di variazione (errore) nella valutazione della motilità degli spermatozoi e soluzioni proposte

Procedura	Prevenzione	Controllo
Miscelamento improprio del campione prima che l'aliquota venga rimossa	Addestramento, SOP	Replicare il campionamento e la misurazione, IQC
Attendere troppo dopo la preparazione del vetrino e prima dell'analisi (gli spermatozoi perdono velocemente vigore)	Addestramento, SOP	Replicare il campionamento e la misurazione, IQC
Temperatura errata del tavolino riscaldato (per esempio, una temperatura troppo alta uccide gli spermatozoi)	Addestramento, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC
Microscopio non pulito o allineato. Ingrandimento non corretto	Addestramento, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Assenza della griglia oculare	Attrezzatura	IQC (carta di controllo)
Analisi effettuata intorno ai bordi del coprioggetto (gli spermatozoi muoiono o diventano lenti al di fuori di 5 mm dal coprioggetto)	Addestramento, SOP	Replicare la misurazione, IQC
Valutazione effettuata troppo lentamente (altri spermatozoi entrano nell'area stabilita durante il periodo di valutazione)	Addestramento, SOP	IQC
Malfunzionamento del contatore multichave	Manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Errori nel calcolo delle percentuali, se non conteggiato come multipli di 100	Addestramento, SOP	IQC, EQC
Errore soggettivo (per esempio, percentuale di motilità costantemente troppo alta o troppo bassa)	Addestramento, SOP	IQC, EQC

Procedure di preparazione che riducono la motilità (per esempio, cambi di temperatura, miscelamento vigoroso, contaminazioni con tossine)	SOP	IQC
Selezione non casuale dei campi per l'analisi. Ritardo nell'analisi (per esempio, attendere che spermatozoi mobili entrino nel campo o nella griglia prima di iniziare l'analisi)	Addestramento, SOP	IQC, EQC

7.13.4 Consigli pratici quando si verificano difficoltà nel valutare la vitalità degli spermatozoi

- Prestare particolare attenzione nel distinguere tra teste di spermatozoi rosse (morti) e rosa (vivi) (gli spermatozoi con la testa di una debole colorazione rosa sono valutati come vivi). Se la colorazione è limitata a una parte della regione del collo, e il resto della zona della testa non è colorata, questa è considerata una “membrana del collo fessurata”, ma non un segno di morte cellulare e di completa disintegrazione della membrana.
- Considerare l'uso del metodo eosina-nigrosina (vedi Sezione 2.6.1).
- Rivedere la Tabella 7.5.

Tabella 7.5 Fonti di variazione (errore) nella valutazione della vitalità degli spermatozoi e soluzioni proposte

Procedura	Prevenzione	Controllo
Microscopio non pulito o allineato. Ingrandimento non corretto	Addestramento, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Colorazione impropria: alcune ricette portano a condizioni ipo-osmotiche che uccidono gli spermatozoi	Addestramento, SOP	Comparazione con la motilità
Attendere troppo per la colorazione	Addestramento, SOP	Comparazione con la motilità
La reidratazione di strisci essiccati, se non montati direttamente, consentirà al colorante di penetrare in tutti gli spermatozoi	Addestramento, SOP	Comparazione con la motilità
Sovrastima degli spermatozoi morti (per esempio, considerare spermatozoi morti quelli con teste con una leggera colorazione rosa)	Addestramento, SOP	IQC, EQC
Considerare morti gli spermatozoi con la colorazione rosa limitata alla sola regione del collo	Addestramento, SOP	IQC, EQC

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- Abraham-Peskir JV *et al.* (2002). *Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress*. *Human Reproduction*, 17:375-382.
- Abshagen K *et al.* (1998). *Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates*. *Fertility and Sterility*, 70:355-356.
- Agarwal A *et al.* (2004). *Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature*. *Reproductive Biomedicine Online*, 8:616-627.
- Aitken RJ, Baker HW (1995). *Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans?* *Human Reproduction*, 10:1736-1739.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1987). *Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81:459-469.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1988). *Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques*. *Journal of Andrology*, 9:367-376.
- Aitken RJ, Elton RA (1986). *Application of a Poisson-gamma model to study the influence of gamete concentration on sperm-oocyte fusion in the zona-free hamster egg penetration test*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78:733-739.
- Aitken RJ, Krausz CG (2001). *Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome*. *Reproduction*, 122:497-506.
- Aitken RJ, West KM (1990). *Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients*. *International Journal of Andrology*, 13:433-451.
- Aitken RJ *et al.* (1983). *Methods for assessing the functional capacity of human spermatozoa; their role in the selection of patients for in-vitro fertilization*. In: Beier H, Lindner H, eds, *Fertilization of the human egg in vitro: Biological basis and clinical application*. Berlin, Springer: 147-168.
- Aitken RJ *et al.* (1992). *Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence*. *Journal of Cellular Physiology*, 151:466-477.
- Aitken RJ *et al.* (1993). *Analysis of the response of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction*. *Journal of Andrology*, 14:132-141.
- Aitken RJ *et al.* (2003). *Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease*. *Reproductive Biomedicine Online*, 7:65-70.
- Aitken RJ *et al.* (2004). *Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology*. *Journal of Andrology*, 25:455-465.
- Alvarez C *et al.* (2003). *Biological variation of seminal parameters in healthy subjects*. *Human Reproduction*, 18:2082-2088.
- Alvarez JG *et al.* (1987). *Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity*. *Journal of Andrology*, 8:338-348.
- Andersen AG *et al.* (2000). *High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men*. *Human Reproduction*, 15:366-372.

- Armitage P *et al.* (2002). *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell Science.
- Auger J, Eustache F (2000). *Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée*. *Andrologia*, 10:358-373.
- Auger J *et al.* (1995). *Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years*. *New England Journal of Medicine*, 332:281-285.
- Auger J *et al.* (2001). *Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities*. *Human Reproduction*, 16:2710-2717.
- Aziz N *et al.* (1996). *The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro*. *Fertility and Sterility*, 66:1000-1008.
- Aziz N *et al.* (2004). *Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index*. *Fertility and Sterility*, 81:349-354.
- Baker HW, Kovacs GT (1985). *Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean*. *International Journal of Andrology*, 8:421-426.
- Barnett RN (1979). *Clinical laboratory statistics*, 2nd ed. Boston, Little, Brown.
- Barratt CLR *et al.* (1992). *The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies*. *Human Reproduction*, 7:95-98.
- Barratt CLR *et al.* (1993). *Prognostic significance of computerized motility analysis for in-vivo fertility*. *Fertility and Sterility*, 60:520-525.
- Bedford JM (1977). *Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa*. *Anatomical Record*, 188:477-487.
- Behre HM *et al.* (2000). *Diagnosis of male infertility and hypogonadism*. In: Nieschlag E, Behre HM, eds. *Andrology, male reproductive health and dysfunction*. Berlin, Springer: 92.
- Berman NG *et al.* (1996). *Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data*. *Journal of Andrology*, 17:68-73.
- Biggers JD *et al.* (1971). *The culture of mouse embryos in vitro*. In: Daniel JC, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco, WH Freeman: 86-116.
- Björndahl L, Barratt CL (2005). *Semen analysis: setting standards for the measurement of sperm numbers*. *Journal of Andrology*, 26:11.
- Björndahl L, Kvist U (2003). *Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message*. *Reproductive Biomedicine Online*, 7:440-448.
- Björndahl L *et al.* (2003). *Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment*. *Human Reproduction*, 18:813-816.
- Björndahl L *et al.* (2004). *Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change*. *Journal of Andrology*, 25:671-678.
- Björndahl L *et al.* (2005). *Contamination by seminal plasma factors during sperm selection*. *Journal of Andrology*, 26:170-173.
- Bland JM, Altman DG (1986). *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement*. *Lancet*, 1:307-310.
- Bohring C, Krause W (1999). *The intra- and inter-assay variation of the indirect mixed antiglobulin reaction test: is a quality control suitable?* *Human Reproduction*, 14:1802-1805.

- Bonde JP *et al.* (1998). *Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners*. *Lancet*, 352:1172-1177.
- Boomsma CM *et al.* (2004). *Semen preparation techniques for intrauterine insemination*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD004507.
- Bourne H *et al.* (1995). *Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results*. *Reproduction, Fertility, Development*, 7:177-183.
- Brazil C *et al.* (2004a). *Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study*. *Journal of Andrology*, 25:635-644.
- Brazil C *et al.* (2004b). *Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study*. *Journal of Andrology*, 25:645-656.
- Bronson RA *et al.* (1982). *Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding*. *Archives of Andrology*, 9:61.
- Bronson RA *et al.* (1984). *Sperm antibodies: their role in infertility*. *Fertility and Sterility*, 42:171-183.
- Bunge RGT, Sherman JK (1953). *Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa*. *Nature*, 172:767-768.
- Bunge RG *et al.* (1954). *Clinical use of frozen semen: report of four cases*. *Fertility and Sterility*, 5:520-529.
- Burkman LJ *et al.* (1988). *The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to human hemizona pellucida to predict fertilization potential*. *Fertility and Sterility*, 49:688-697.
- Canale D *et al.* (1994). *Inter- and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different techniques: layering, swimup from pellet and Percoll*. *Journal of Endocrinological Investigation*, 17:729-732.
- Carey RG, Lloyd RC (1995). *Measuring quality improvement in healthcare: a guide to statistical process control applications*. New York, Quality Resources.
- Carlsen E *et al.* (2004). *Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality*. *Fertility and Sterility*, 82:358-366.
- Carreras A *et al.* (1992). *Sperm plasma membrane integrity measurement: a combined method*. *Andrologia*, 24:335-340.
- Castilla JA *et al.* (2006). *Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters*. *Human Reproduction*, 21:847-851.
- Cekan SZ *et al.* (1995). *Principles of external quality assessment: a laboratory manual*. Geneva, World Health Organization.
- Cembrowski GS, Carey RN (1989). *Laboratory quality management*. Chicago, ASCP Press.
- Chantler E, Abraham-Peskir JV (2004). *Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress*. *Andrologia*, 36:87-93.
- Chemes HE, Rawe YV (2003). *Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men*. *Human Reproduction Update*, 9:405-428.
- Chiu WW, Chamley LW (2004). *Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies*. *Fertility and Sterility*, 82:529-535.

- Chohan KR *et al.* (2006). *Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm.* Journal of Andrology, 27:53-59.
- Christensen P *et al.* (2005). *Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers.* Theriogenology, 63:992-1003.
- Clarke GN (1999). *Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination?* Human Reproduction 14:2941-2943.
- Clarke GN *et al.* (1982). *Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen.* In: Bratanov K, ed. *Immunology of reproduction.* Sofia, Bulgarian Academy of Sciences Press: 482-485.
- Clarke GN *et al.* (1985). *Detection of sperm antibodies in semen using the Immunobead test: a survey of 813 consecutive patients.* American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology, 7:118-123.
- Clarke GN *et al.* (1997). *Artificial insemination and in-vitro fertilization using donor spermatozoa: a report on 15 years of experience.* Human Reproduction, 12:722-726.
- Clarke GN *et al.* (2003). *Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant.* Reproduction, Fertility, Development, 15:377-381.
- Clarke GN *et al.* (2006). *Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen.* Fertility and Sterility, 86:721-722.
- Coetzee K *et al.* (1998). *Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review.* Human Reproduction Update, 4:73-82.
- Coetzee K *et al.* (1999a). *Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings.* Andrologia, 31:163-168.
- Coetzee K *et al.* (1999b). *Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer.* Fertility and Sterility, 71:80-84.
- Coetzee K *et al.* (1999c). *Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS).* Fertility and Sterility, 71:222-225.
- Cooper TG (2005). *Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing?* Human Reproduction, 20:9-11.
- Cooper TG, Yeung CH (1998). *A flow cytometric technique using peanut agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa.* Journal of Andrology, 19:542-550.
- Cooper TG, Yeung CH (2006). *Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians.* Fertility and Sterility, 85:220-224.
- Cooper TG *et al.* (1990a). *The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers α -glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid.* International Journal of Andrology, 13:329-335.
- Cooper TG *et al.* (1990b). *Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of α -glucosidase in seminal plasma.* International Journal of Andrology, 13:297-305.
- Cooper TG *et al.* (1991). *Variations in semen parameters from fathers.* Human Reproduction, 6:859-866.
- Cooper TG *et al.* (1993). *Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland se-*

- cretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Human Reproduction*, 8:1251-1258.
- Cooper TG *et al.* (1999). *Experience with external quality control in spermatology*. *Human Reproduction*, 14:765-769.
- Cooper TG *et al.* (2002). *Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization*. *International Journal of Andrology*, 25:306-311.
- Cooper TG *et al.* (2004). *Cytoplasmic droplets are normal structures of human spermatozoa but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology*. *Human Reproduction*, 19:2283-2288.
- Cooper TG *et al.* (2005). *Changes in osmolality during liquefaction of human semen*. *International Journal of Andrology*, 28:58-60.
- Cooper TG *et al.* (2006). *Azoospermia: virtual reality or possible to quantify?* *Journal of Andrology*, 27:483-490.
- Cooper TG *et al.* (2007). *Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel*. *Journal of Andrology*, 28:1-4.
- Cooper TG *et al.* (2010). *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. *Human Reproduction Update*, 16:231-245.
- Corea M *et al.* (2005). *The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation*. *Fertility and Sterility*, 83:920-922.
- Correa-Perez JR *et al.* (2004). *Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospermia*. *Fertility and Sterility*, 81:1148-1150.
- Couture M *et al.* (1976). *Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid*. *Andrologia*, 8:61-66.
- Cross NL (1995). *Methods for evaluating the acrosomal status of human sperm*. In: Fenichel P, Parinaud J, eds. *Human sperm acrosome reaction*. Paris, John Libbey Eurotext (Colloques INSERM): 277-285.
- Cross NL *et al.* (1986). *Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm*. *Gamete Research*, 15:213-226.
- Dadoune JP *et al.* (1988). *Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics*. *Andrologia*, 20:211-217.
- Daudin M *et al.* (2000). *Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling*. *Fertility and Sterility*, 74:1164-1174.
- David G *et al.* (1975). *Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. I. Propositions pour un système de classification*. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Réproduction*, 4(Suppl. 1):17-36.
- David G *et al.* (1980). *The success of A.I.D. and semen characteristics: study of 1489 cycles and 192 ejaculates*. *International Journal of Andrology*, 3:613-619.
- Davis RO, Katz DF (1992). *Standardization and comparability of CASA instruments*. *Journal of Andrology*, 13:81-86.

- De Jonge C (2000). *Commentary: forging a partnership between total quality management and the andrology laboratory*. Journal of Andrology, 21:203-205.
- De Jonge C et al. (2004). *Influence of the abstinence period on human sperm quality*. Fertility and Sterility, 82:57-65.
- de la Taille A et al. (1998). *Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens*. Progress in Urology, 8:370-376.
- Devillard F et al. (2002). *Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases*. Human Reproduction, 17:1292-1298.
- Donnelly ET et al. (1998). *In-vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome*. Fertility and Sterility, 70:305-314.
- Douglas-Hamilton DH et al. (2005a). *Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers*. Journal of Andrology, 26:107-114.
- Douglas-Hamilton DH et al. (2005b). *Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration*. Journal of Andrology, 26:115-122.
- Drobnis EZ et al. (1988). *Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications*. Developmental Biology, 130:311-323.
- Eggert-Kruse W et al. (1989). *Prognostic value of in-vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus*. Fertility and Sterility, 51:317-323.
- Eggert-Kruse W et al. (1992). *Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility*. Fertility and Sterility, 58:1046-1055.
- Eggert-Kruse W et al. (1993). *The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction*. Fertility and Sterility, 59:617-628.
- Eggert-Kruse W et al. (1996). *Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception*. Human Reproduction, 11:139-146.
- Eliasson R (1971). *Standards for investigation of human semen*. Andrologia, 3:49-64.
- Eliasson R (1975). *Analysis of semen*. In: Behrman SJ, Kistner RW, eds. *Progress in Infertility*, 2nd ed. New York, Little, Brown: 691-713.
- Eliasson R (1981). *Analysis of semen*. In: Burger H, de Kretser D, eds. *The testis*. New York, Raven Press: 381-399.
- Eliasson R (2003). *Basic semen analysis*. In: Matson P, ed. *Current topics in andrology*. Perth, Ladybrook Publishing: 35-89.
- Eliasson R et al. (1970). *Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie*. Andrologia, 2:1257.
- ESHRE (1998). *Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa*. Human Reproduction, 13:142-145.
- ESHRE/NAFA (2002). *Manual on basic semen analysis (ESHRE Monographs #2)*. Oxford, Oxford University Press.
- Evenson DP, Wixon R (2006). *Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility*. Theriogenology, 65:979-991.
- Ezeh UI, Moore HM (2001). *Redefining azoospermia and its implications*. Fertility and Sterility, 75:213-214.

- Ezeh UI *et al.* (1998). *Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization.* Human Reproduction, 13:3061-3065.
- Feldschuh J *et al.* (2005). *Successful sperm storage for 28 years.* Fertility and Sterility, 84:1017.
- Fenichel P *et al.* (1989). *Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter.* Journal of Reproduction and Fertility, 87:699-706.
- Fetic S *et al.* (2006). *Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa.* Journal of Andrology, 27:294-301.
- Franken DR *et al.* (1989). *The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in in-vitro fertilization (IVF) treatment.* Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 6:44-50.
- Franken DR *et al.* (2000). *Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida.* Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 17:374-378.
- Fredricsson B, Björk G (1977). *Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance.* Fertility and Sterility, 28:841-845.
- Gandini L *et al.* (2000). *Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa.* Human Reproduction, 15:830-839.
- Gao DY *et al.* (1995). *Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol.* Human Reproduction, 10:1109-1122.
- Garrett C, Baker HWG (1995). *A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads.* Fertility and Sterility, 63:1306-1317.
- Garrett C *et al.* (1997). *Selectivity of the human sperm–zona pellucida binding process to sperm head morphometry.* Fertility and Sterility, 67:362-371.
- Garrett C *et al.* (2003). *Automated semen analysis: “zona pellucida preferred” sperm morphology and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples.* Human Reproduction, 18:1643-1649.
- Gilling-Smith C *et al.* (2005). *Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses.* Human Reproduction, 20:1433-1438.
- Gilling-Smith C *et al.* (2006). *HIV and reproductive care – a review of current practice.* British Journal of Gynaecology, 113:869-878.
- Gomez E *et al.* (1996). *Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function.* Journal of Andrology, 17:276-287.
- Gomez E *et al.* (1998). *Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function.* International Journal of Andrology, 21:81-94.
- Gould JE *et al.* (1994). *Sperm-immunobead binding decreases with in-vitro incubation.* Fertility and Sterility, 62:167-171.
- Grimes DA, Lopez LM (2007). *“Oligozoospermia,” “azoospermia,” and other semen-analysis terminology: the need for better science.* Fertility and Sterility, 88:1491-1494.

- Griveau JF, Le Lannou D (1997). *Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology*. International Journal of Andrology, 20:61-69.
- Handelsman DJ *et al.* (1984). *Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele*. International Journal of Andrology, 7:369-382.
- Haugen TB, Grotmol T (1998). *pH of human semen*. International Journal of Andrology, 21:105-108.
- Heite H-J, Wetterauer W (1979). *Acid phosphatase in seminal fluid: method of estimation and diagnostic significance*. Andrologia, 11:113-122.
- Hellstrom WJG *et al.* (1989). *A comparison of the usefulness of SpermMar and Immunobead tests for the detection of antisperm antibodies*. Fertility and Sterility, 52:1027-1031.
- Henkel R *et al.* (2004). *Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy*. Fertility and Sterility, 81:965-972.
- Henley N *et al.* (1994). *Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain*. International Journal of Andrology, 17:78-84.
- Holstein AF *et al.* (2003). *Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment*. Reproductive Biology and Endocrinology, 1:107.
- Homyk M *et al.* (1990). *Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10*. Fertility and Sterility, 53:323-330.
- Hossain AM *et al.* (1998). *Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes*. Human Reproduction, 13:1578-1583.
- Hotchkiss RS (1945). *Fertility in men*. London, William Heineman Medical Books.
- Huggins C *et al.* (1942). *Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles*. American Journal of Physiology, 136:467-473.
- IARC (1982). *Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 4): 169-170.
- Insler V *et al.* (1972). *The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle*. International Journal of Gynaecology and Obstetrics, 10:223-228.
- Irvine DS *et al.* (1994). *A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo*. Human Reproduction, 9:2324-2334.
- Ivic A *et al.* (2002). *Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests*. Human Reproduction, 17:143-149.
- Iwamoto T *et al.* (2006). *Semen quality of 324 fertile Japanese men*. Human Reproduction, 21:760-765.
- Iwasaki A, Gagnon C (1992). *Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients*. Fertility and Sterility, 57:409-416.
- Jaffe TM *et al.* (1998). *Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis*. Journal of Urology, 159:1548-1550.

- Jeyendran RS *et al.* (1984). *Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics*. Journal of Reproduction and Fertility, 70:219-228.
- Johanisson E *et al.* (2000). *Evaluation of "round cells" in semen analysis: a comparative study*. Human Reproduction Update, 6:404-412.
- Johnsen O, Eliasson R (1987). *Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma*. International Journal of Andrology, 10:435-440.
- Johnson DE *et al.* (1996). *Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples*. Fertility and Sterility, 66:459-462.
- Jones DM *et al.* (1986). *Immobilization of sperm by condoms and their components*. Clinical Reproduction and Fertility, 4:367-372.
- Jones R *et al.* (1979). *Peroxidative breakdown of phospholipids by human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma*. Fertility and Sterility, 31:531-537.
- Jørgensen N *et al.* (2001). *Regional differences in semen quality in Europe*. Human Reproduction, 16:1012-1019.
- Jouannet P *et al.* (1988). *Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics*. International Journal of Andrology, 11:379-394.
- Kamischke A *et al.* (2004). *Cryopreservation of sperm from adolescents and adults with malignancies*. Journal of Andrology, 25:586-592.
- Karvonen MJ, Malm M (1955). *Colorimetric determination of fructose with indol*. Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation, 7:305-307.
- Katz DF *et al.* (1986). *Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility*. Journal of Andrology, 7:203-210.
- Keel BA (2006). *Within - and between - subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors*. Fertility and Sterility, 85:128-134.
- Keel BA, Webster BW (1993). *Semen cryopreservation methodology and results*. In: Barratt CLR, Cooke ID, eds. *Donor insemination*. Cambridge, Cambridge University Press: 71-96.
- Kraemer M *et al.* (1998). *Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system*. Human Reproduction, 13:611-619.
- Krause W (1995). *Computer-assisted sperm analysis system: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction*. Human Reproduction, 10 (Suppl. 1): 60-66.
- Krausz C *et al.* (1992). *Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leucocytes*. Fertility and Sterility, 57:1317-1325.
- Kremer J (1965). *A simple sperm penetration test*. International Journal of Fertility, 10:209-215.
- Kremer J, Jager S (1980). *Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon, with special regard to immunoglobulin class and antigen-reactive sites*. International Journal of Andrology, 3:143-152.
- Kruger TF *et al.* (1986). *Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization*. Fertility and Sterility, 46:1118-1123.

- Kruger TF *et al.* (1987). *A quick, reliable staining technique for human sperm morphology*. Archives of Andrology, 18:275-277.
- Kruger TF *et al.* (1991). *Hemizona assay: use of fresh versus salt-stored human oocytes to evaluate sperm binding potential to the zona pellucida*. Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 8:154-156.
- Kruger TF *et al.* (1993). *The self teaching programme for strict sperm morphology*. Bellville, South Africa, MQ Medical.
- Kuster CE *et al.* (2004). *Determining sample size for the morphological assessment of sperm*. Theriogenology, 61:691-703.
- Lacquet FA *et al.* (1996). *Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology*. Archives of Andrology, 36:133-138.
- Larsen L *et al.* (2000). *Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team*. Human Reproduction, 15:1562-1567.
- Le Lannou D, Lansac J (1993). *Artificial procreation with frozen donor semen: the French experience of CECOS*. In: Barratt CLR, Cooke ID, eds. *Donor insemination*. Cambridge, Cambridge University Press: 152-169.
- Le Lannou D *et al.* (1992). *Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium*. Human Reproduction, 7:1417-1421.
- Lee JD *et al.* (1996). *Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes*. Human Reproduction, 11:1942-1946.
- Leibo SP *et al.* (2002). *Cryopreservation of human spermatozoa*. In: Vayena E *et al.*, eds. *Current practices and controversies in assisted reproduction*. Geneva, World Health Organization: 152-165.
- Lentner C (1981). *Geigy scientific tables*. Vol. 1: *Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition*. Basel, Ciba-Geigy: 50.
- Lindsay KS *et al.* (1995). *Classification of azoospermic samples*. Lancet, 345:1642.
- Liu DY, Baker HWG (1988). *The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with Pisum sativum agglutinin correlates with fertilization in vitro*. Fertility and Sterility, 50:288-293.
- Liu DY, Baker HWG (1992a). *Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility, 94:71-84.
- Liu DY, Baker HW (1992b). *Tests of human sperm function and fertilization in vitro*. Fertility and Sterility, 58:465-483.
- Liu DY, Baker HWG (1994). *Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro*. Human Reproduction, 9:1694-1700.
- Liu DY, Baker HWG (1996). *Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction with the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding*. Fertility and Sterility, 66:312-315.
- Liu DY, Baker HWG (2003). *Disordered zona pellucida induced acrosome reaction and failure of in-vitro fertilization in patients with unexplained infertility*. Fertility and Sterility, 79:74-80.

- Liu DY, Baker HW (2004). *High frequency of defective sperm–zona pellucida interaction in oligozoospermic infertile men*. Human Reproduction, 19:228-233.
- Liu DY et al. (1988). *A human sperm–zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro*. Fertility and Sterility, 50:782-788.
- Liu DY et al. (1989). *A sperm–zona pellucida binding test and in vitro fertilization*. Fertility and Sterility, 52:281-287.
- Liu DY et al. (1990). *Use of oocytes that failed to be fertilized in vitro to study human sperm–oocyte interactions: comparison of sperm–olemma and sperm–zona pellucida binding, and relationship with results of IVF*. Reproduction, Fertility, Development, 2:641-650.
- Liu DY et al. (1991a). *Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro*. Journal of Andrology, 12:231-239.
- Liu DY et al. (1991b). *Horse and marmoset sperm bind to the zona pellucida of salt stored human oocytes*. Fertility and Sterility, 56:764-767.
- Liu DY et al. (2003). *Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes*. Human Reproduction, 18:2382-2389.
- Liu DY et al. (2004). *Clinical application of sperm–oocyte interaction tests in in-vitro fertilization—embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs*. Fertility and Sterility, 82:1251-1263.
- MacLeod J, Wang Y (1979). *Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present*. Fertility and Sterility, 31:103-116.
- MacMillan RA, Baker HW (1987). *Comparison of latex and polyacrylamide beads for detecting sperm antibodies*. Clinical Reproduction and Fertility, 5:203-209.
- Mahadevan M et al. (1981). *Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation*. Fertility and Sterility, 36:243-247.
- Mahmoud AM et al. (1997). *The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration*. Fertility and Sterility, 68:340-345.
- Martin RH et al. (2003). *A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia*. Biology of Reproduction, 69:535-539.
- Matson PL (1995). *External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme*. Human Reproduction, 10:620-625.
- McKinney KA et al. (1996). *Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probe*. Archives of Andrology, 36:119-125.
- Meinertz H, Bronson R (1988). *Detection of antisperm antibodies on the surface of motile spermatozoa. Comparison of the immunobead binding technique (IBT) and the mixed antiglobulin reaction (MAR)*. American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology, 18:120-123.
- Menkveld R, Kruger TF (1990). *Basic semen analysis*. In: Acosta AA et al., eds. *Human spermatozoa in assisted reproduction*. Baltimore, Williams, Wilkins: 68-84.
- Menkveld R, Kruger TF (1996). *Evaluation of sperm morphology by light microscopy*. In: Acosta AA, Kruger TF, eds. *Human spermatozoa in assisted reproduction*, 2nd ed. London, Parthenon Publishing: 89-107.
- Menkveld R et al. (1990). *The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria*. Human Reproduction, 5:586-592.

- Menkveld R *et al.* (1991). *Sperm selection capacity of the human zona pellucida*. *Molecular Reproduction and Development*, 30:346-352.
- Menkveld R *et al.* (1997). *Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology by manual and computerized methods*. *Andrologia*, 29:1-7.
- Menkveld R *et al.* (2001). *Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds*. *Human Reproduction*, 16:1165-1171.
- Meschede D *et al.* (1993). *Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis*. *International Journal of Andrology*, 16:362-369.
- Meseguer M *et al.* (2006). *Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study*. *Fertility and Sterility*, 85:640-645.
- Moghissi KS (1976). *Post-coital test: physiological basis, technique and interpretation*. *Fertility and Sterility*, 27:117-129.
- Moghissi KS *et al.* (1964). *Mechanism of sperm migration*. *Fertility and Sterility*, 15:15-23.
- Möllering H, Gruber W (1966). *Determination of citrate with citrate lyase*. *Analytical Biochemistry*, 17:369-376.
- Morshedi M *et al.* (2003). *Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study*. *Fertility and Sterility*, 79 (Suppl. 3): 1625-1632.
- Mortimer D (1994a). *Practical laboratory andrology*. Oxford, Oxford University Press.
- Mortimer D (1994b). *Laboratory standards in routine clinical andrology*. *Reproductive Medicine Review*, 3:97-111.
- Mortimer D (2004). *Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking*. *Reproductive Biomedicine Online*, 9:134-151.
- Mortimer D, Menkveld R (2001). *Sperm morphology assessment – historical perspectives and current opinions*. *Journal of Andrology*, 22:192-205.
- Mortimer D, Mortimer S (2005). *Quality and risk management in the IVF laboratory*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Mortimer D *et al.* (1995). *Workshop report: clinical CASA – the quest for consensus*. *Reproduction, Fertility and Development*, 7:951-959.
- Nahoum CRD, Cardozo D (1980). *Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostate-vesicular fluid*. *Fertility and Sterility*, 34:68-69.
- Neuwinger J *et al.* (1990). *External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial*. *Fertility and Sterility*, 54:308-314.
- Neuwinger J *et al.* (1991). *Hyaluronic acid as a medium for human sperm migration tests*. *Human Reproduction*, 6:396-400.
- Ng FL *et al.* (1992). *Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples*. *Human Reproduction*, 7:261-266.
- Ng KK *et al.* (2004). *Sperm output of older men*. *Human Reproduction*, 19:1811-1815.
- Oehninger S *et al.* (1993). *The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under hemi-zona assay conditions*. *Molecular Reproduction and Development*, 35:57-61.

- Oei SG *et al.* (1995). *When is the post-coital test normal? A critical appraisal.* Human Reproduction, 10:1711-1714.
- Overstreet JW *et al.* (1980). *In-vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus.* Fertility and Sterility, 34:604-606.
- Paquin R *et al.* (1984). *Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal α 1,4-glucosidase.* Journal of Andrology, 5:277-282.
- Pelfrey RJ *et al.*, (1982). *Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal.* Fertility and Sterility, 38:112-114.
- Pérez-Sánchez F *et al.* (1994). *Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing.* International Journal of Andrology, 17:115-120.
- Perloff WH, Steinberger E (1963). *In-vitro penetration of cervical mucus by spermatozoa.* Fertility and Sterility, 14:231-236.
- Perloff WH *et al.* (1964). *Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technique.* Fertility and Sterility, 15:501-504.
- Plaut DA, Westgard JOW (2002). *QC external quality assessment.* In: Westgard JO, ed. *Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories.* Madison, WI, QC Publishing: 125-163.
- Poland ML *et al.* (1985). *Variation of semen measures within normal men.* Fertility and Sterility, 44:396-400.
- Polge C *et al.* (1949). *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.* Nature, 164:626-627.
- Pound N *et al.* (2002). *Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates.* Physiology and Behavior, 76:685-689.
- Punab M *et al.* (2003). *The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint.* Andrologia, 35:271-278.
- Quinn P *et al.* (1985). *Improved pregnancy rate in human in-vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid.* Fertility and Sterility, 44:493-498.
- Rajah SV *et al.* (1992). *Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct Immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males.* Fertility and Sterility, 57:1300-1303.
- Rao B *et al.* (1989). *Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility.* Gamete Research, 24:127-134.
- Rhemrev J *et al.* (1989). *Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer discontinuous Percoll gradient centrifugation.* Fertility and Sterility, 51:685-690.
- Rose NR *et al.* (1976). *Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa.* Clinical and Experimental Immunology, 23:175-199.
- Rossi AG, Aitken RJ (1997). *Interactions between leukocytes and the male reproductive system. The unanswered questions.* Advances in Experimental Medicine and Biology, 424:245-252.
- Said TM *et al.* (2004). *Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility.* Fertility and Sterility, 82:871-877.
- Sakkas D *et al.* (1998). *Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development.* Human Reproduction, 13(Suppl. 4):11-19.

- Savasi V et al. (2007). *Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples*. Human Reproduction, 22:772-777.
- Sawyer DE et al. (2003). *Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa*. Mutation Research, 529:21-34.
- Scarselli G et al. (1987). *Approach to immunological male infertility: a comparison between MAR test and direct Immunobead test*. Acta Europea Fertilitatis, 18:55-57.
- Schmidt KL et al. (2004). *Assisted reproduction in male cancer survivors: fertility treatment and outcome in 67 couples*. Human Reproduction, 19:2806-2810.
- Seaman EK et al. (1996). *Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads*. Fertility and Sterility, 66:662-665.
- Shah VP et al. (2000). *Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress*. Pharmacological Research, 17:1551-1557.
- Sharif K (2000). *Reclassification of azoospermia: the time has come?* Human Reproduction, 15:237-238.
- Sharma RK et al. (2001). *Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic*. Journal of Andrology, 22:575-583.
- Sherman JK (1990). *Cryopreservation of human semen*. In: Keel BA, Webster BW, eds. *CRC handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Boca Raton, CRC Press: 229-259.
- Shibahara H et al. (2004). *Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility*. International Journal of Andrology, 27:63-68.
- Slama R et al. (2002). *Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities*. Human Reproduction, 17:503-515.
- Smith R et al. (1996). *Total antioxidant capacity of human seminal plasma*. Human Reproduction, 11:1655-1660.
- Sobrero AJ, MacLeod J (1962). *The immediate postcoital test*. Fertility and Sterility, 13:184-189.
- Soler C et al. (2000). *Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads*. International Journal of Andrology, 23:77-84.
- Tedder RS (1995). *Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank*. Lancet, 346:137-140.
- Tomlinson M (2005). *Managing risk associated with cryopreservation*. Human Reproduction, 20:1751-1756.
- Tomlinson MJ et al. (1993). *Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility*. Fertility and Sterility, 60:1069-1075.
- Toner JP et al. (1995). *Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination*. Andrologia, 27:143-148.
- Tyler JP et al. (1982a). *Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics*. Clinical Reproduction and Fertility, 1:273-285.
- Tyler JP et al. (1982b). *Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation II. Spermatozoal vitality and storage*. Clinical Reproduction and Fertility, 1:287-293.

- Van der Merwe FH et al. (2005). *The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population*. Gynecologic and Obstetric Investigation, 59:86-91.
- Van Waart J et al. (2001). *Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review*. Human Reproduction Update, 7:495-500.
- Verheyen G et al. (1993). *Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm*. Human Reproduction, 8:1678-1684.
- Virro MR et al. (2004). *Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles*. Fertility and Sterility, 81:1289-1295.
- von der Kammer H et al. (1991). *The evaluation of markers of prostatic function*. Urological Research, 19:343-347.
- von Eckardstein S et al. (2000). *Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia*. Fertility and Sterility, 73:1226-1231.
- Watson PF (1995). *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. Reproduction Fertility and Development, 7:871-891.
- Weiske WH (1994). *Minimal invasive Vasektomie mittels Fulgurationstechnik. Erfahrungen bei 1000 Patienten in 12 Jahren*. Urologe, B34:448-452.
- Weiske WH et al. (2000). *Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia*. Andrologia, 32:13-18.
- Westgard JO (2002). *Foreword to the second edition*. In: Westgard JO, ed. *Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories*. Madison, WI, QC Publishing.
- Wheeler DJ (1993). *Understanding variation: the key to managing chaos*. Knoxville, TN, SPC Press.
- Wheeler DJ, Chambers DS (1992). *Understanding statistical process control*, 2nd ed. Knoxville, TN, SPC Press.
- WHO (1986). *Consultation on the zona-free hamster oocyte penetration test and the diagnosis of male fertility*. International Journal of Andrology, (Suppl. 6).
- WHO (1987). (prepared by Comhaire F et al.) *Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility*. International Journal of Andrology, (Suppl. 7): 22-24.
- WHO (1996). *Task Force for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men*. Fertility and Sterility, 65:821-829.
- WHO (1999). *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- WHO (2004). *Laboratory biosafety manual*, 3rd ed. Geneva, World Health Organization (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.pdf>, last accessed 25 February 2010).
- Wilton LJ et al. (1988). *Human male infertility caused by degeneration and death of sperms in the epididymis*. Fertility and Sterility, 49:1051-1058.

- Wolf DP (1995). *Semen cryopreservation*. In: Keye WR et al., eds. *Infertility evaluation and treatment*. Philadelphia, WB Saunders: 686-695.
- Wolff H (1995). *The biologic significance of white blood cells in semen*. *Fertility and Sterility*, 63:1143-1157.
- Woods EJ et al. (2004). *Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues*. *Cryobiology*, 48:146-156.
- Yanagimachi R et al. (1979). *Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa*. *Fertility and Sterility*, 31:562-574.
- Zavos PM, Goodpasture JC (1989). *Clinical improvements of specific seminal deficiencies via intercourse with a seminal collection device versus masturbation*. *Fertility and Sterility*, 51:190-193.
- Zinaman MJ et al. (1996). *Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration*. *Journal of Andrology*, 17:288-292.
- Zinaman MJ et al. (2000). *Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples*. *Journal of Andrology*, 21:145-153.
- Zorn B et al. (2003). *Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. *International Journal of Andrology*, 26:279-285.

Appendici

APPENDICE 1 Valori di riferimento e nomenclatura seminale

A1.1 Valori di riferimento

Le valutazioni eseguite su campioni seminali devono essere confrontate con valori di riferimento che consentano di decidere in merito alla gestione del paziente e ai protocolli diagnostici e clinici. I valori di riferimento qui riportati derivano dai risultati di numerosi studi prospettici trasversali sulla qualità del seme e sulla fertilità. Sono stati ottenuti da una selezione diretta e retrospettiva di uomini fertili definiti come uomini le cui partner hanno concepito 12 mesi dalla sospensione di metodi contraccettivi (Cooper *et al.*, 2010).

- Sono stati inclusi in questa analisi solo campioni seminali completi – uno per ogni uomo (il primo, laddove sono stati effettuati più campioni) e in seguito a 2-7 giorni di astinenza.
- Il volume di liquido seminale è stato misurato utilizzando metodi indicati dal WHO attualmente in uso, vale a dire pesandolo o trasferendolo in pipette o in provette graduate. Il numero totale di spermatozoi è stato calcolato dalle concentrazioni misurate dall'emocitometro su campioni fissati e diluiti. La motilità totale (PR + NP), la motilità progressiva (PR), la motilità non progressiva (NP) e gli spermatozoi immobili (IM) sono stati misurati a temperatura ambiente oppure a 37°C. I dati relativi alla morfologia normale degli spermatozoi derivano solo dai laboratori che hanno fornito valori non superiori ai limiti massimi previsti dal metodo dei criteri stretti (Tygerberg) (circa il 35% di forme normali). La vitalità è stata determinata per esclusione del colorante vitale (eosina) dalla membrana della testa dello spermatozoo.
- La statistica considera il 2.5° percentile da un intervallo di riferimento a due code come la soglia sotto la quale i valori possono essere considerati provenienti da una diversa popolazione. Tuttavia, l'intervallo di riferimento a una coda è stato considerato essere più appropriato per i parametri seminali, poiché i valori elevati sono negativi per la fertilità. I limiti di riferimento più bassi del 5° percentile sono riportati nella Tabella A1.1, e le distribuzioni di frequenza sono riportate nella Tabella A1.2.

Commento 1: Le distribuzioni dei valori di riferimento riportate nella Tabella A1.2 forniscono una descrizione delle caratteristiche seminali di neopadri, la cui partner è rimasta incinta entro 12 mesi dalla sospensione di metodi contraccettivi.

Commento 2: I padri costituiscono un gruppo selezionato di individui e i loro parametri seminali possono essere diversi da quelli della popolazione generale di uomini sani.

Commento 3: Le caratteristiche seminali sono estremamente variabili, sia nel singolo uomo che tra uomini diversi, e non sono le uniche a determinare la fertilità di una coppia, quindi i valori di riferimento forniscono solo una indicazione relativa allo stato di fertilità dell'uomo.

Commento 4: I parametri seminali che si trovano all'interno dell'intervallo di confidenza del 95% non garantiscono la fertilità.

Commento 5: Gli uomini le cui caratteristiche seminali scendono al di sotto dei limiti inferiori riportati qui non sono necessariamente inferti; le loro caratteristiche seminali sono al di sotto del range di riferimento per i neopadri, che sono, per definizione, quelli relativi al 5% degli uomini fertili che hanno fornito i dati utilizzati nel calcolo dei range di riferimento.

Commento 6: Le caratteristiche seminali di un uomo devono essere interpretate insieme alle informazioni cliniche.

Commento 7: Ci possono essere differenze regionali in termini di qualità seminale o differenze tra laboratori; questi ultimi dovrebbero fornire i loro range di riferimento, utilizzando le tecniche descritte in questo manuale.

Commento 8: Il tempo di attesa alla gravidanza è influenzato anche dallo stato di fertilità della partner femminile.

Tabella A1.1 Valori di riferimento minimi delle caratteristiche seminali (5° percentile e intervallo di confidenza del 95%)

Parametri	Valori di riferimento minimi
Volume (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Numero spermatozoi/eiaculato (10^6 /eiaculato)	39 (33-46)
Numero spermatozoi/ml (10^6 /ml)	15 (12-16)
Motilità totale (PR + NP,%)	40 (38-42)
Motilità progressiva (PR,%)	32 (31-34)
Vitalità (spermatozoi vitali,%)	58 (55-63)
Morfologia (forme normali,%)	4 (3.0-4.0)
<i>Altri valori di riferimento</i>	
pH	≥ 7.2
Leucociti perossidasi-positivi (10^6 /ml)	< 1.0
MAR test (% di spermatozoi mobili con particelle adese)	< 50
Immunobead test (% di spermatozoi mobili con sferule adese)	< 50
Zinco seminale (μmol /eiaculato)	≥ 2.4
Fruttosio seminale (μmol /eiaculato)	≥ 13
Glucosidasi neutra seminale (mU/eiaculato)	≥ 20

Tabella A1.2 Distribuzione dei valori per i parametri seminali relativi a uomini le cui partner sono entrate in gravidanza entro 12 mesi dalla sospensione dell'uso di metodi contraccettivi

Parametri (unità)	N	Percentile								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Volume (ml)	1941	1.2	1.5	2.0	2.7	3.7	4.8	6.0	6.8	7.6
Numero spermatozoi/eiaculato (10 ⁶ /eiaculato)	1859	23	39	69	142	255	422	647	802	928
Numero spermatozoi/ml (10 ⁶ /ml)	1859	9	15	22	41	73	116	169	213	259
Motilità totale (PR + NP, %)	1781	34	40	45	53	61	69	75	78	81
Motilità progressiva (PR, %)	1780	28	32	39	47	55	62	69	72	75
Motilità non progressiva (NP, %)	1778	1	1	2	3	5	9	15	18	22
Spermatozoi immobili (IM, %)	1863	19	22	25	31	39	46	54	59	65
Vitalità (%)	428	53	58	64	72	79	84	88	91	92
Forme normali (%)	1851	3	4	5.5	9	15	24.5	36	44	48

Fonte: Cooper et al., 2010.

A1.2 Nomenclatura

Questo manuale mantiene la nomenclatura introdotta per descrivere le deviazioni dai valori seminali di riferimento, usando parole più che numeri (vedi Tabella A1.3), anche se alcuni hanno preferito abbandonare tale terminologia (Grimes, Lopez, 2007). La nomenclatura classifica semplicemente la qualità del liquido seminale e non suggerisce alcuna causa biologica (Eliasson *et al.*, 1970). Questi termini sono usati per descrivere i campioni con valori situati al di fuori dei valori di riferimento, e quindi possibilmente derivanti da una popolazione differente. Gran parte della nomenclatura seminale si riferisce ad un singolo parametro. Tuttavia, la normozoospermia fa riferimento a tre parametri seminali – numero, motilità e morfologia. Così le deviazioni dai valori di riferimento per ogni parametro possono essere descritte individualmente.

Riferimenti

Cooper TG *et al.* (2010). *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. Human Reproduction Update, 16:231-245.

Grimes DA, Lopez LM (2007). “*Oligozoospermia*”, “*azoospermia*”, and other semen-analysis terminology: the need for better science. Fertility and Sterility, 88:1491-1494.

Eliasson R *et al.* (1970). *Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie*. Andrologia, 2:1257.

Tabella A1.3 Nomenclatura seminale

aspermia	assenza di liquido seminale (assenza o eiaculazione retrograda)
astenoteratozoospermia	percentuale di spermatozoi con motilità progressiva (PR) e morfologia normale al di sotto dei valori minimi di riferimento
astenozoospermia	percentuale di spermatozoi con motilità progressiva (PR) al di sotto dei valori minimi di riferimento
azoospermia	assenza di spermatozoi nell'eiaculato
criptozoospermia	spermatozoi assenti nei preparati a fresco, ma osservati nel pellet dopo centrifugazione
emospermia (ematospermia)	presenza di eritrociti nell'eiaculato
leucospermia (leucocito- spermia, piospermia)	presenza di leucociti nell'eiaculato sopra il valore limite
necrozoospermia	bassa percentuale di spermatozoi vitali e alta percentuale di spermatozoi immobili nell'eiaculato
normozoospermia	concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml)* e percentuali di motilità progressiva (PR) e di spermatozoi morfologicamente normali pari o al di sopra dei valori minimi di riferimento
oligoastenoterato- zoospermia	concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml)* e percentuali di motilità progressiva (PR) e di spermatozoi morfologicamente normali al di sotto dei valori minimi di riferimento
oligoastenozoospermia	concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml)* e percentuali di spermatozoi con motilità progressiva (PR) al di sotto dei valori minimi di riferimento
oligoteratozoospermia	concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml)* e percentuali di spermatozoi morfologicamente normali al di sotto dei valori minimi di riferimento
oligozoospermia	concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml)* di spermatozoi al di sotto dei valori minimi di riferimento
teratozoospermia	percentuale di spermatozoi morfologicamente normali al di sotto dei valori minimi di riferimento

* Dovrebbe essere sempre preferita la concentrazione/eiaculato

NOTA: Il suffisso “spermia” si riferisce all'eiaculato e “zoospermia” allo spermatozoo. Per questo i seguenti termini non dovrebbero essere utilizzati: astenospermia, astenoteratospermia, criptospermia, oligoastenospermia, oligoteratospermia, oligospermia, teratospermia.

APPENDICE 2 **Attrezzature e sicurezza**

A2.1 Forniture di base necessarie in un laboratorio di andrologia

Di seguito è riportato un elenco delle forniture e delle attrezzature necessarie in un laboratorio di andrologia per effettuare i test di base descritti in questo manuale.

Consultate la letteratura scientifica pubblicata a cui si fa riferimento in questo manuale o altrove, se avete bisogno di assistenza nella ricerca di una qualsiasi delle seguenti forniture.

A2.1.1 Il laboratorio dovrebbe avere le seguenti attrezzature generali e forniture:

- bilancia;
- banconi con piani di lavoro impermeabili;
- contenitori:
 - per lo smaltimento di oggetti taglienti;
 - per rifiuti pericolosi;
- una copia del *Laboratory biosafety manual* (WHO, 2004);
- congelatore;
- ipoclorito di sodio o disinfettante, 0.1% (v/v) e 1% (v/v) in acqua distillata;
- sapone disinfettante o detergente antisettico della pelle;
- guanti monouso;
- soluzioni per il lavaggio oculare o per il risciacquo;
- kit di primo soccorso;
- cappa per la conservazione di, e per lavorare con, reagenti tossici, prodotti chimici o coloranti;
- frigorifero;
- doccia.

A2.1.2 Le seguenti forniture e attrezzature sono necessarie per l'analisi del liquido seminale:

- tubi capillari e sigillante (per l'analisi di penetrazione del muco);
- sistema CASA (opzionale);
- centrifughe:
 - centrifuga da banco in grado di raggiungere 300-500 g (per il trattamento del liquido seminale di routine e per le urine), 1.000 g (per i markers biochimici) e 2.000 g (per campioni viscosi);

- centrifuga ad alta velocità con una portata di 3.000 g (per la preparazione di sospetti campioni azoospermici) o microcentrifuga che può raggiungere fino a 16.000 g (per l'ottenimento di plasma seminale senza spermatozoi) (vedi Riquadro A2.1);
- attrezzature per la crioconservazione (opzionale);
- preservativi: senza spermicida, non tossici (opzionale);
- provette da diluizione;
- microscopio per dissezione (opzionale; per la raccolta di ovociti di hamster);
- carta da filtro, 90 g/m² (per filtrare il colorante);
- microscopio a fluorescenza e obiettivi (opzionale; per i test di reazione acrosomiale);
- emocitometro: camera di conta Neubauer improved o, in alternativa, camera di 100 µm di profondità, con coprioggetto spesso (spessore numero 4, 0.44 mm);
- incubatore (37°C), preferibilmente con il 5% (v/v) di CO₂ (opzionale);
- parafilm;
- contatore da laboratorio multichave (sei o nove chiavi);
- camera di conta di grande volume (opzionale; per la valutazione del liquido seminale a bassa concentrazione);
- luminometro (opzionale; per l'analisi ROS);
- vetrini per microscopio:
 - vetrini molati o smerigliati per scrivere e coprioggetti (spessore numero 1.5, 0.16-0.19 mm);
 - vetrini lisci per strisciare la goccia di liquido seminale o un altro vetrino per strisciare il seme;
- penne/matite:
 - per la scrittura su vetrini smerigliati, è adeguata una matita di morbidezza HB (numero 2 americana);
 - una matita con mina di cera (penna delimitatrice, opzionale, per delimitare l'area della soluzione anticorpale sul vetrino);
 - pennarello indelebile;
- piaccametro (ISFET) (opzionale; per i campioni di sperma viscoso);
- cartine tornasole per il pH (range 6-10);
- microscopio a contrasto di fase (per la valutazione della concentrazione, motilità, morfologia degli spermatozoi) con una sorgente di luce almeno 50w e i seguenti accessori (vedi Appendice 3):

- obiettivi a fase positiva 10×, 20× (o 25×), 40× (o 63×), obiettivo ad immersione ad olio 100×;
- obiettivo a fase negativa 40× (opzionale; per il test di vitalità all'eosina);
- oculare a 10× (o 12.5×);
- reticolo oculare (per valutare la motilità);
- tavolino micrometrico (per valutare la morfologia);
- Inghilterra Finder (vetrino con griglia, opzionale, per CQ)
- tavolino riscaldato (opzionale; per la valutazione della velocità);
- pipette e punte:
 - pipette Pasteur con tettarella di lattice o pipette monouso di plastica, o pipettratrice automatica per miscelare il liquido seminale;
 - pipette automatiche;
 - pipette automatiche a volume variabile da 10 a 100 µl;
- supporti per registrare i risultati delle analisi del liquido seminale e del muco (vedi Appendice 6);
- apparecchiature per miscelare i campioni:
 - agitatore a due dimensioni o rotante per miscelare il seme (opzionale);
 - vortex per miscelare il liquido seminale diluito;
- fogli adesivi per piastre a 96 pozzetti (opzionale; per l'analisi del fruttosio);
- contenitori per la raccolta del liquido seminale:
 - contenitori monouso a bocca larga con coperchio;
 - cilindri di vetro autoclavabili;
- vetrini di conta monouso (opzionale, per la valutazione della motilità nel CQ);
- spettrofotometro (opzionale; per i dosaggi biochimici del seme);
- piastra con spot di porcellana o vetro borosilicato (per i test di eosina e nigrosina);
- marcatore di tempo (opzionale, per il CQ);
- carta da laboratorio;
- piastra riscaldante da banco (opzionale; per preriscaldare i vetrini per la valutazione della motilità).

A2.1.3 I seguenti prodotti possono essere utili:

- anticorpi (CD45 per leucociti);

- agenti antischiuma (opzionale, per il CQ);
- kit per la perossidasi cellulare (opzionale);
- terreni crioprotettivi (opzionale);
- terreni per gradiente di densità (per la preparazione del seme);
- kit per il test del fruttosio (opzionale);
- glutaraldeide (opzionale; per Hamster test);
- olio minerale (opzionale; per Hamster test);
- kit per il test dell'alfa-glucosidasi neutra (opzionale);
- colorante Papanicolaou (opzionale);
- olio di paraffina (opzionale; per Hamster test);
- kit di colorazione rapida (opzionale; per la morfologia degli spermatozoi);
- cera (punto di fusione 48-66°C) (opzionale; per Hamster test);
- kit di analisi dello zinco (opzionale).

Riquadro A2.1 Calcolo forze centrifughe

La forza a cui sono sottoposti gli spermatozoi durante la centrifugazione (forza centrifuga relativa, RCF) dipende dalla velocità di rotazione (N , giri per minuto, r.p.m.) e dalla distanza dal centro del rotore al punto in cui la forza deve essere misurata (in genere sul fondo della provetta da centrifuga) (raggio, R , cm). RCF è calcolata mediante la formula: $1.118 \times 10^{-5} \times R \times N^2$. Per esempio, con un raggio del rotore di 8.6 cm, una centrifugazione a 5.000 r.p.m. produrrà una forza di 2.404 g; con un raggio del rotore di 13.5 cm, una centrifugazione a 3.900 r.p.m. produrrà 2.296 g. Fig. A2.1 è un nomogramma per determinare RCF dal raggio del rotore e dalla velocità di rotazione.

A2.2 Possibili rischi biologici in un laboratorio di andrologia

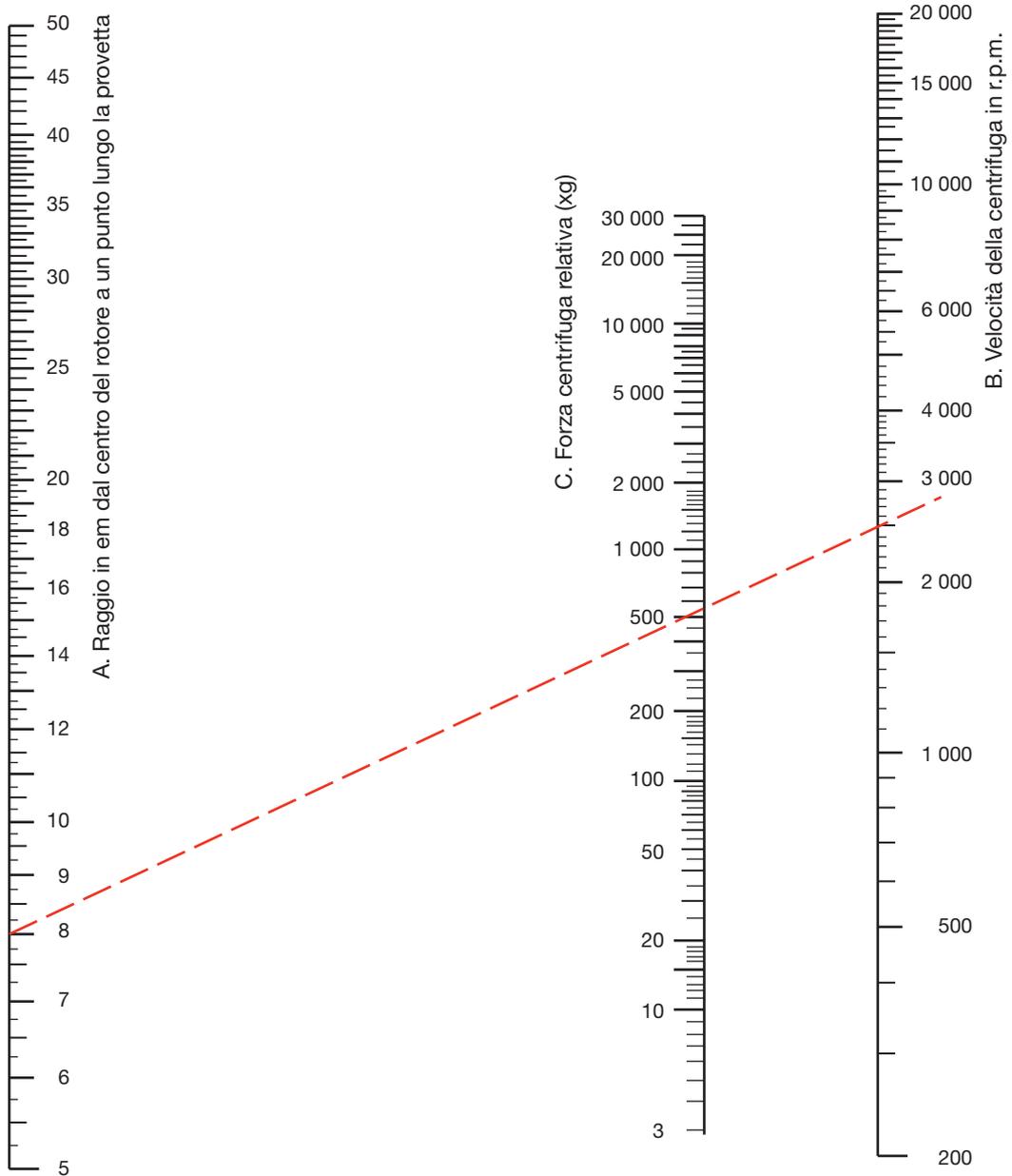
I fluidi biologici umani, come il seme, sono potenzialmente infettivi, pertanto dovrebbero essere maneggiati e smaltiti con particolare attenzione. Nell'ambito del laboratorio andrologico i più importanti microrganismi che possono ritrovarsi nel liquido seminale sono il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e i virus dell'epatite B e C (HBV e HCV). Il personale di laboratorio dovrebbe considerare tutti i campioni biologici come potenzialmente infetti e adottare le opportune cautele nel loro trattamento.

A2.3 Procedure di sicurezza per il personale di laboratorio

- Tutto il personale di laboratorio che lavora con campioni umani deve essere immunizzato verso il virus dell'epatite B.

Fig. A2.1 Nomogramma per la determinazione della forza centrifuga relativa (RCF) a partire dal raggio del rotore e dalla velocità di rotazione

Una linea retta che congiunge il raggio del rotore (cm, asse di sinistra) e la velocità di rotazione (giri/min, asse di destra) interseca l'asse mediano in RCF. Nell'esempio, un raggio di 8 cm con una velocità di rotazione di 2.500 r.p.m. dà un RCF di circa 550 g (il valore calcolato è 559 g (vedi Riquadro A2.1)).



- Nel laboratorio andrologico non è possibile mangiare, bere, fumare, truccarsi o conservare cibo.
- Il pipettaggio a bocca non è consentito. Per la manipolazione di liquidi si deve ricorrere al pipettaggio mediante dispositivi meccanici.
- Tutto il personale deve indossare indumenti da laboratorio, o camici monouso, che saranno tolti al momento dell'uscita. Inoltre il personale di laboratorio dovrebbe usare guanti monouso (in gomma, lattice, vinile, con o senza talco) soprattutto quando si maneggia lo sperma o il plasma seminale, sia esso fresco o congelato, o qualsiasi altro campione biologico o contenitore venuto a contatto con il campione. I guanti devono essere tolti e gettati quando si esce dal laboratorio, quando si toccano il telefono e le maniglie delle porte. I guanti non devono essere riutilizzati.
- Il personale dovrebbe lavarsi le mani regolarmente, in particolare prima di lasciare il laboratorio, dopo aver maneggiato i campioni e dopo essersi tolto camice e guanti.
- Il personale dovrebbe prendere precauzioni per evitare ferite accidentali con strumenti affilati che possono essere contaminati con il seme, ed evitare il contatto del seme con pelle, ferite, abrasioni o lesioni.
- Sarebbe indispensabile adottare opportune precauzioni per prevenire e, ove necessario, contenere fuoriuscite di sperma, di sangue o di urina.
- Tutti gli oggetti appuntiti (aghi, lame ecc.), dopo il loro uso, devono essere gettati in un apposito contenitore, che dovrebbe essere sigillato prima del completo riempimento e smaltito come materiale pericoloso.
- Tutti gli elementi potenzialmente pericolosi (guanti, contenitori per il seme ecc.) dovrebbero essere raccolti e avviati allo smaltimento specifico.
- Sarebbe indispensabile indossare mascherine chirurgiche durante l'esecuzione di procedure che comportano il rischio di formazione di gocce e aerosol, per esempio durante le procedure di vortex e centrifugazione di recipienti aperti. Le ultime gocce di liquido seminale presenti nelle pipette non dovrebbero essere espulse con forza perché questo passaggio potrebbe portare alla formazione di goccioline e aerosol.
- Il personale dovrebbe indossare occhiali protettivi, guanti e scarpe isolanti chiuse quando necessario, per esempio quando si utilizza l'azoto liquido (vedi Sezione A2.5).

A2.4 Procedure di sicurezza per le apparecchiature di laboratorio

Le superfici di lavoro e i recipienti non monouso che sono entrati in contatto con lo sperma o con altri campioni biologici dovrebbero essere sterilizzati o disinfettati. Devono essere eseguite le seguenti procedure:

Quotidianamente, al termine delle analisi:

- Lavare le superfici di lavoro con un disinfettante, ad esempio ipoclorito di sodio allo 0.1% (1 g/l) o disinfettanti simili, attendere almeno 1 ora (o una notte intera), poi risciacquare con acqua.
- Mettere a bagno le camere di conta e i coprioggetto in ipoclorito di sodio allo 0.1% (1 g/l), o prodotti simili, per tutta la notte. Risciacquare con acqua.

In caso di fuoriuscita:

- Se il contenitore del campione viene contaminato esternamente, lavarlo con un disinfettante, ad esempio ipoclorito di sodio 0.1% (1 g/l) o simili, poi risciacquare con acqua.
- Immediatamente dopo la fuoriuscita del campione, lavare la parte superiore del banco di lavoro con un disinfettante, per esempio ipoclorito di sodio 1.0% (10 g/l) o disinfettanti simili, attendere almeno 4 ore, poi sciacquare con acqua.

Se necessario, l'inattivazione a mezzo calore del virus HIV presente nei contenitori può essere ottenuta mediante:

- Sterilizzazione a calore secco per almeno 2 ore a 170°C (340°F). Coprire il contenitore con un foglio prima del riscaldamento e lasciare raffreddare prima dell'uso.
- Sterilizzazione a vapore (in autoclave) per almeno 20 minuti a 121°C (250°F) a 101 kPa (15 psi o 1 atmosfera) a pressione atmosferica.
- Ebollizione continua per 20-30 minuti.

A2.5 Procedure di sicurezza per la manipolazione dell'azoto liquido

- L'azoto liquido è pericoloso. Manipolare sempre con molta cura, usare esclusivamente contenitori idonei e non tentare di sigillare i contenitori. Per recuperare gli oggetti immersi in azoto, utilizzare pinze apposite.
- Proteggere gli occhi con una visiera o con occhiali protettivi, le mani con guanti isolanti e i piedi con scarpe chiuse.
- Quando l'azoto liquido è versato su una superficie tende a ricoprirla completamente e a raffreddare una vasta area. Oggetti che a temperatura ambiente sono morbidi e flessibili, a contatto con l'azoto liquido di solito diventano duri e fragili.
- La temperatura estremamente bassa può causare gravi lesioni. Il contatto con la pelle può determinare un effetto simile a una scottatura. Il gas che si origina dal liquido è estremamente freddo. Una breve esposizione al gas può non intaccare la pelle del viso e delle mani, ma può danneggiare i tessuti più delicati, come quelli degli occhi.
- Mantenersi al riparo da schizzi di azoto liquido, dalla sua ebollizione e dall'emissione di gas freddo. L'ebollizione e la fuoriuscita di schizzi si verificano soprattutto quando viene saturato un contenitore caldo, o quando vengono inseriti oggetti nel liquido. Eseguire sempre queste operazioni molto lentamente per ridurre l'ebollizione e gli schizzi.

- Evitare di toccare tubature contenenti azoto, non isolate. Non permettere che parti del corpo non protette entrino in contatto con tubature o recipienti contenenti azoto liquido. Il metallo reso estremamente freddo dall'azoto può attaccarsi velocemente alla pelle e si corre il rischio di lesionare la cute quando si tenta di staccarlo.
- Lavorare in zone ben ventilate. Piccole quantità di azoto liquido possono formare una grande quantità di gas (a temperatura ambiente è nove volte il suo volume liquido). Se l'azoto evapora dal liquido in una stanza chiusa, la percentuale di ossigeno nell'aria può diminuire creando un rischio di asfissia. Esistono rilevatori che attivano un allarme quando il livello di ossigeno scende al di sotto del 17% (v/v) e dovrebbero essere utilizzati quando si lavora con azoto liquido.
- Utilizzare solo visotubi e paillettes apposite per il congelamento in azoto liquido. Bisogna prestare particolare attenzione perché anche questi elementi possono esplodere quando diventano caldi.

Riferimenti

WHO (2004). *Laboratory biosafety manual*, 3rd ed. Geneva, World Health Organization (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.pdf>, last accessed 25 February 2010).

APPENDICE 3 Microscopia

La miglior fonte di informazioni tecniche relative ad un microscopio è il manuale d'istruzioni fornito dal produttore, che dovrebbe essere corredato da un diagramma utile ad identificare tutte le sue parti. Qualora il manuale non dovesse essere disponibile, è possibile ottenere le informazioni sul set-up del microscopio cercandole su Internet.

Per lo studio del liquido seminale di cui si parla in questo manuale si raccomanda l'utilizzo di un microscopio a contrasto di fase. Il microscopio, provvisto di una fonte di luce di almeno 50 watt, dovrebbe essere preferibilmente binoculare, dotato di un condensatore di fase, di una serie completa di obiettivi 10x, 20 o 25x, 40 o 63x (per la valutazione di motilità, vitalità e conta di spermatozoi e di cellule non ne-maspermiche) e di un obiettivo in campo chiaro 100x ad immersione ad olio (per la valutazione di morfologia e vitalità). Una lente a contrasto di fase negativa può essere necessaria per la valutazione della vitalità e per alcuni sistemi CASA, mentre la microscopia a fluorescenza richiede un obiettivo a fluorescenza.

- La qualità ed i costi degli obiettivi variano notevolmente (vedi Riquadro A3.1). Gli obiettivi più costosi offrono una risoluzione d'immagine migliore, ma anche gli obiettivi di minore qualità possono essere adeguati.
- I reticoli oculari (reticoli e micrometri oculari) sono dischi di vetro con scale di dimensioni conosciute, di solito 5 o 10 mm, o griglie di varie forme. Alcuni oculari sono dotati di reticoli permanenti, altri invece possono essere svitati per consentire di inserire un reticolo. Sono disponibili in diametri diversi, e dovrebbero corrispondere esattamente al diametro dell'oculare. Possono essere calibrati con un micrometro per determinare le dimensioni dello spermatozoo. Sono utilizzati anche per delimitare l'area del campo nella valutazione della motilità degli spermatozoi. Nelle Figg. 2.4 (a) e A7.4 (a) è mostrata una griglia di 5 x 5 mm, che è una buona dimensione per la valutazione della motilità con un ingrandimento sia di 20x e 40x. Alcuni tecnici, per valutare concentrazione e morfologia preferiscono questa dimensione rispetto a una griglia di 10 x 10 mm.
- Il vetrino micrometrico è un vetrino modificato sul quale è stata incisa una scala graduata, generalmente lunga 1 mm e divisa in intervalli di 10 μm . Può essere utile per calibrare il micrometro oculare o il reticolo di griglia e, per esempio, per lo studio della motilità (vedi Fig. A7.5).

La procedura descritta di seguito garantisce la possibilità di ottenere immagini microscopiche di ottima qualità. Se la luce è correttamente allineata e regolata, l'immagine risulterà chiara, nitida e difficilmente gli occhi ne verranno affaticati. Le seguenti procedure devono essere rispettate quando si utilizza un nuovo microscopio o quando le immagini sono di scarsa qualità.

A3.1 Allestimento del campione

- Porre 10 μl di liquido seminale (o altro volume, vedi Riquadro 2.4) su un vetrino portaoggetto, coprire quindi con un coprioggetto da 22 x 22 mm (spessore numero 1.5, 0.17 mm) (o altra dimensione, vedi Riquadro 2.4) e porre il vetrino

sullo stativo. Per regolare il microscopio è possibile utilizzare un vetrino micro-metrico, invece di un vetrino di liquido seminale.

- Accendere la luce e regolarla ad un'intensità tale da fornire il massimo contrasto senza che gli occhi si affatichino.
- Selezionare l'obiettivo 10x a contrasto di fase positiva. Ruotare il condensatore per ottenere la stessa potenza della lente dell'obiettivo scelto.

Nota: Se il microscopio è trinoculare (cioè ha un terzo oculare al quale è possibile collegare una camera per la fotografia o la videoregistrazione), ci sarà anche una manopola per la deviazione della luce che di solito si trova a destra degli oculari. Questa manopola consente tre impostazioni: una che orienta tutta la luce verso gli oculari, una che la orienta tutta verso la camera e una terza che devia metà luce agli oculari e metà alla camera.

Riquadro A3.1 L'obiettivo

Ogni obiettivo riporta delle informazioni come queste:

UPlanFI	Plan Apo	Plan Neofluor	Plan	S Fluor
20x/0.80 imm corr	40x/0.75 Ph2	100x/1.35 oil iris	100x/1.25 oil Ph3	20x/0.75
160/0.17	∞/0.17	∞/-	∞/0.17 WD 1.0	

La spiegazione delle varie sigle è riportata di seguito.

Plan: obiettivo planare, permette un campo di vista piatto in cui tutto è a fuoco.

Apo: obiettivo apocromatico, che corregge le aberrazioni cromatiche.

F, FI, FL, Neofluor, Fluo, Fluotar, UV, S-Fluor: obiettivi che trasmettono la luce UV, utilizzati per la microscopia a fluorescenza.

100x, 63x, 40x, ecc.: ingrandimento dell'obiettivo.

0.30, 0.50, 0.80, 1.30, 1.40, ecc.: apertura numerica (NA) dell'obiettivo. Questo è un indicatore della capacità dell'obiettivo di convogliare la luce. Insieme alla lunghezza d'onda della luce utilizzata (λ lambda), la NA ne determina la risoluzione (la più piccola distanza tra due oggetti che possono essere distinti come separati). $NA = \eta \times \sin \alpha$, dove η (eta) è l'indice di rifrazione del mezzo di immersione e α (alfa) è l'angolo tra il bordo del cono di illuminazione e la verticale. Poiché il valore massimo del $\sin \alpha$ è 1.00, teoricamente il valore massimo di NA è pari a η , ma in pratica il valore massimo è 1.4. Per una migliore risoluzione scegliere la NA più alta.

Ph, Ph1, Ph2, Ph3, NP, N: indicano un obiettivo con un anello in fase. Ph indica anelli di fase positiva e NP o N indicano quelli in fase negativa. Gli obiettivi Ph1, Ph2 e Ph3 richiedono un anello di fase diversa nel condensatore. L'ottica a contrasto di fase positiva permette di visualizzare strutture intracellulari (è utilizzata per preparati a fresco e per la motilità), mentre quella a contrasto di fase negativa fornisce immagini chiare su sfondo scuro (usata per preparati a fresco, o nei sistemi CASA).

Imm, immersione, olio, W: indicano un obiettivo progettato per lavorare con l'interposizione di un fluido – olio, acqua (W) o glicerolo – posto tra l'oggetto e la lente stessa, con lo scopo di fornire un'immagine più nitida (se non è indicato l'obiettivo è considerato "ad aria" e non dovrebbe essere usato con un liquido).

Iris: indica una lente con un diaframma controllato da un anello zigrinato.

Corr: indica una lente con un collare di correzione zigrinato che consente l'utilizzo di mezzi di immersione con diversi indici di rifrazione.

160, ∞: indica la lunghezza del tubo o la distanza tra l'oculare e l'obiettivo. Solitamente è di 160 mm, ma nelle lenti moderne può essere infinito (∞).

0.17, -: lo spessore del coprioggetto richiesto per l'obiettivo. Un vetrino coprioggetto di numero 1.5 (spessore 0.16-0.19 mm) è utile per molti scopi. Gli emocitometri necessitano di coprioggetto numero 4 (spessore di 0.44 mm). “-” significa che lo spessore del coprioggetto non è importante o che il liquido di immersione può essere aggiunto direttamente sul vetrino.

WD: distanza di lavoro; la distanza dalla lente frontale dell'obiettivo più vicino alla superficie del coprioggetto quando il campione è a fuoco. WD generalmente diminuisce con l'ingrandimento e NA aumenta, ciò determina lenti con distanze di lavoro che sono normali (NWD, fino a 5 mm), lunghe (LWD, 5.25-9.75 mm), extra-lunghe (ELWD, 10-14 millimetri) e super-lunghe (SLWD, 15-30 mm). Alcuni microscopi possono richiedere una lente LWD per l'utilizzo con una camera di Neubauer.

Indice di rifrazione: l'entità del ritardo di fase della luce che passa attraverso un mezzo. L'indice di rifrazione (IR, n , n_d) del vuoto è 1.0000, dell'aria è di circa 1.0 (1.0008), dell'acqua è 1.33, del glicerolo è 1.47 e quello della maggior parte degli oli di immersione è di 1.515. I mezzi di montaggio dopo l'essiccazione hanno indici di rifrazione simili (1.488-1.55) a quello del vetro (1.50-1.58).

A3.2 Regolazione degli oculari

- Regolare lo spazio tra gli oculari adattandolo ai propri occhi, muovendoli separatamente o insieme.

A3.3 Messa a fuoco dell'immagine

- Ruotare la messa a fuoco per portare il tavolino più vicino possibile all'obiettivo 20x o 40x. Per evitare di rompere l'obiettivo e il vetrino, osservare l'obiettivo e il tavolino dalla parte anteriore o laterale e non attraverso gli oculari. Utilizzare la messa a fuoco per regolare l'altezza del tavolino in modo che il vetrino sia quasi a contatto con l'obiettivo. Notare che la messa a fuoco deve essere rivolta a ridurre la distanza del tavolino dall'obiettivo.
- Guardando attraverso entrambi gli oculari, ruotare lentamente la messa a fuoco per muovere gradualmente il tavolino dall'obiettivo, fino a quando il campione non è approssimativamente a fuoco. Usare poi la manopola micrometrica per ottenere la miglior messa a fuoco.

Nota: Se il fuoco è difficile da trovare, provare a mettere a fuoco il bordo molato del vetrino per ottenere il giusto piano focale.

A3.4 Messa a fuoco degli oculari

- Con alcuni microscopi gli oculari possono essere messi a fuoco in modo indipendente. Con altri, invece, un oculare è fisso e l'altro può essere messo a fuoco.
- Gli oculari regolabili sono in genere contrassegnati con un scala "+ / 0 / -". Regolare l'oculare a "0" prima di iniziare questo procedimento.
- Se un oculare è fisso guardare solamente attraverso l'oculare fisso (coprire o chiudere l'altro occhio).
- Mettere a fuoco l'immagine del campione regolando la micrometrica. È utile mettere a fuoco un oggetto immobile, ad esempio, uno spermatozoo morto, particelle di polvere o la griglia del micrometro.
- Mettere a fuoco l'oculare regolabile guardando attraverso la lente e coprendo l'occhio sull'oculare fisso. Ruotare la ghiera zigrinata alla base dell'oculare a "+" o "-" fino a quando non si ottiene un fuoco appropriato per il vostro occhio.

A3.5 Messa a fuoco del condensatore di luce

- Chiudere il diaframma (sulla fonte di luce alla base del microscopio).
- Alzare o abbassare il condensatore utilizzando le piccole manopole poste a sinistra o a destra del condensatore finché i bordi del diaframma non siano a fuoco nel miglior modo possibile, e il cerchio di luce non risulti piccolo e chiaro. Questa posizione, generalmente, verrà raggiunta quando il condensatore è nella posizione più alta. Il bordo dell'immagine può cambiare da blu a rosso a seconda di come è focalizzato il condensatore (aberrazione cromatica), e i bordi del condensatore possono rimanere leggermente sfocati. La luce può o non può essere centrata.

Nota: Se l'apertura del campo non ha un diaframma a iride, concentrarsi su un oggetto appuntito posto sulla fonte di luce (per esempio, una punta di matita).

A3.6 Centrazione del condensatore

- Centrare il diaframma di campo con le manopole di centraggio del condensatore. Queste generalmente sono due (di solito zigrinate) e vengono fuori diagonalmente sotto al condensatore, o di fronte o di lato.
- Una volta che l'immagine è centrata sulla luce, aprire il diaframma di campo in modo che la luce riempi solo il campo visivo. Non aprire il diaframma di campo oltre quel punto.
- Chiudere l'apertura del condensatore fino a quando la luce scompare.

Nota: Subito dietro il regolatore del condensatore di destra, ci possono essere delle piccole viti che bloccano il condensatore in posizione. Fare attenzione a non ruotarle quando si centra il condensatore perché allentandole si può rimuovere l'intero condensatore dal microscopio.

A3.7 Regolazione degli anelli di fase

- Viene eseguita usando un telescopio di centraggio, disponibile dal produttore del microscopio.
- Evidenziare l'anello di fase nel condensatore per l'obiettivo utilizzato.
- Rimuovere un oculare e sostituirlo con il telescopio di centraggio. Mettere a fuoco l'anello del telescopio di centraggio tenendo la base con una mano e ruotando la parte superiore con l'altra, e guardando attraverso di essa. Girare fino a che i due anelli sono a fuoco: un anello è scuro (anello di fase) e un anello chiaro (anello chiaro).
- Allineare questi due anelli in modo che siano concentrici, ruotando la regolazione delle manopole poste sul condensatore di fase. Queste manopole si trovano generalmente verso la parte posteriore del condensatore.
- Sostituire il telescopio di centraggio con oculare.

A3.8 Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è utilizzata per rilevare i nuclei degli spermatozoi durante le procedure di conta con colorante Hoechst 33342 (vedi Sezione 2.11.2) e la reazione acrosomiale con lectina marcata con FITC (vedi Sezione 4.4.1). L'eccitazione spettrale massima del colorante Hoechst 33342 e del FITC è rispettivamente di 346 nm e 494 nm, e i valori massimi di emissione sono 460 nm e 520 nm. È necessario un obiettivo a fluorescenza (vedi Riquadro A3.1). Ogni modello di microscopio avrà, come equipaggiamento opzionale, un set di specchi dicroici e di filtri di sbarramento necessari per esaminare tali coloranti.

APPENDICE 4 Soluzioni madre

Per tutte le soluzioni è richiesta acqua purificata (distillata, bidistillata o deionizzata).

A4.1 Biggers, Whitten e Whittingham

BWW soluzione madre (Biggers *et al.*, 1971).

1. Aggiungere a 1.000 ml di acqua distillata 5,54 g di cloruro di sodio (NaCl), 0.356 g di cloruro di potassio (KCl), 0.294 g di solfato di magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.250 g di cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0.162 g di fosfato monopotassico (KH_2PO_4).
2. Aggiustare il pH a 7.4 con idrossido di sodio (NaOH) 1 mol/l.
3. Aggiungere 1.0 ml (0.04%, 0.4 g/l) di rosso fenolo per litro.

Nota: Questa soluzione può essere conservata per diverse settimane a 4°C.

BWW soluzione di lavoro.

Il giorno di utilizzo:

1. Aggiungere a 100 ml di soluzione madre 210 mg di bicarbonato di sodio (NaHCO_3), 100 mg di D-glucosio, 0.37 ml di sciroppo di lattato di sodio al 60% (v/v), 3 mg di piruvato di sodio, 350 mg di albumina sierica bovina frazione V, 10.000 unità di penicillina e 10 mg di solfato di streptomicina.
2. Riscaldare la soluzione a 37°C prima dell'utilizzo in atmosfera al 5% di CO_2 (v/v) e 95% (v/v) di aria.

Nota 1: Per l'incubazione in aria aggiungere 20 mmol/l di HEPES (Na: 5.21 g/l) e ridurre NaHCO_3 a 0.366 g/l.

Nota 2: Per i gradienti di densità (vedi Sezione 5.5.1) preparare una soluzione madre concentrata 10X, utilizzando 10 volte i pesi indicati dei composti, ad eccezione del rosso fenolo.

A4.2 Tampone fosfato salino Dulbecco

1. PBS-glucosio Dulbecco: aggiungere a 750 ml di acqua distillata 0.2 g di cloruro di potassio (KCl), 0.2 g di fosfato monopotassico (KH_2PO_4), 0.1 g di cloruro di magnesio esaidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 8.0 g di cloruro di sodio (NaCl), 2.16 g di sodio fosfato bibasico eptaidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 1.00 g di D-glucosio.
2. Sciogliere 0.132 g di cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in 10 ml di acqua distillata ed aggiungere lentamente la soluzione precedente miscelando.

3. Aggiustare il pH a 7.4 con idrossido di sodio (NaOH) 1 mol/l.
4. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

Nota 1: Per prevenire la formazione di precipitati aggiungere CaCl_2 separatamente, lentamente e mescolando.

Nota 2: Se necessario, aggiungere prima dell'uso 0.3 g di albumina sierica bovina (BSA) (sostanzialmente acidi grassi liberi) per 100 ml.

A4.3 Soluzione di Earle

1. Aggiungere a 750 ml di acqua distillata 6.8 g di cloruro di sodio (NaCl), 2.2 g di bicarbonato di sodio (NaHCO_3), 0.14 g di sodio fosfato monobasico monoidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$), 0.4 g di cloruro di potassio (KCl), 0.20 g di solfato di magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 1.0 g di D-glucosio.
2. Sciogliere lentamente 0.20 g di cloruro di calcio anidro (CaCl_2) nella soluzione precedente mescolando.
3. Aggiustare il pH a 7.4 con acido cloridrico (HCl) 1 mol/l o idrossido di sodio (NaOH) 1 mol/l.
4. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

Nota 1: Per l'incubazione in aria aggiungere 20 mmol/l di HEPES (Na: 5.21 g/l) e ridurre NaHCO_3 a 0.366 g/l.

Nota 2: Per i gradienti di densità (vedi Sezione 5.5.1) preparare una soluzione madre concentrata 10X, utilizzando 10 volte i pesi indicati dei composti, ad eccezione del bicarbonato. Supplementare 100 ml con 0.22 g di NaHCO_3 .

A4.4 Soluzione di Ham F-10

1. Aggiungere a 750 ml di acqua distillata 7.4 g di cloruro di sodio (NaCl), 1.2 g di bicarbonato di sodio (NaHCO_3), 0.285 g di cloruro di potassio (KCl), 0.154 g di sodio fosfato monobasico (Na_2HPO_4), 0.153 g di solfato di magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.083 g di potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4), 0.044 g di cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 1.1 g di D-glucosio.
2. Aggiustare il pH a 7.4 con idrossido di sodio (NaOH) 1 mol/l.
3. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

Nota 1: Per l'incubazione in aria aggiungere 20 mmol/l di HEPES (Na: 5.21 g/l) e ridurre NaHCO_3 a 0.366 g/l.

Nota 2: Per i gradienti di densità (vedi Sezione 5.5.1) preparare una soluzione madre concentrata 10X, aumentando 10 volte i pesi indicati dei composti, ad eccezione del bicarbonato. Supplementare 100 ml con 0.12 g di NaHCO_3 .

A4.5 Soluzione salina bilanciata di Hanks

1. Aggiungere a 750 ml di acqua purificata 8.0 g di cloruro di sodio (NaCl), 0.4 g di cloruro di potassio (KCl), 0.35 g di bicarbonato di sodio (NaHCO_3), 0.185 g di cloruro calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.1 g di cloruro di magnesio esaidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0.1 g di solfato di magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.06 g di potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4), 0.048 g di sodio fosfato monobasico (NaH_2PO_4) e 1.0 g di D-glucosio.
2. Aggiustare il pH a 7.4 con idrossido di sodio (NaOH) 1 mol/l.
3. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

A4.6 Fluido tubarico umano

Composizione originale (Quinn *et al.*, 1985):

1. Aggiungere a 750 ml di acqua distillata 5.931 g di cloruro di sodio (NaCl), 0.35 g di cloruro di potassio (KCl), 0.05 g di solfato di magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.05 g di potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4), 2.1 g di bicarbonato di sodio (NaHCO_3), 0.5 g di D-glucosio, 0.036 g di piruvato sodio, 0.3 g di cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 4.0 g di DL-lattato di sodio (sciroppo v/v al 60%).
2. Aggiungere ad 1 ml del terreno precedente 10 μg di rosso fenolo, 100 U di penicillina e 50 μg di di solfato di streptomicina.
3. Aggiustare il pH a 7.4 con acido cloridrico (HCl) 1 mol/l.
4. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

Nota 1: Per l'incubazione in aria aggiungere 20 mmol/l Hepes (Na: 5.21 g/l) e ridurre NaHCO_3 a 0.366 g/l.

Nota 2: Per i gradienti di densità (vedi Sezione 5.5.1) preparare una soluzione madre concentrata 10X, utilizzando 10 volte i pesi indicati dei composti, ad eccezione del bicarbonato, piruvato e lattato. Supplementare 100 ml con 0.21 g di NaHCO_3 , 0.0036 g di piruvato di sodio e 0.4 g di lattato di sodio.

A4.7 Terreno Krebs-Ringer

KRM senza rosso fenolo:

1. Aggiungere a 750 ml di acqua distillata 6.9 g di cloruro di sodio (NaCl), 2.1 g di bicarbonato di sodio (NaHCO₃), 0.35 g di cloruro di potassio (KCl), 0.32 g di cloruro di calcio diidrato (CaCl₂·2H₂O), 0.18 g di fosfato monosodico diidrato (NaH₂PO₄·2H₂O), 0.1 g di cloruro di magnesio esaidrato (MgCl₂·6H₂O) e 0.9 g di D-glucosio.
2. Aggiustare il pH a 7.4 con idrossido di sodio (NaOH) 1 mol/l.
3. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

A4.8 Soluzione salina Tris tamponata

1. Aggiungere a 750 ml di acqua distillata 6.055 g di Tris base e 8.52 g di cloruro di sodio (NaCl).
2. Aggiustare il pH a 8.2 con acido cloridrico (HCl) 1 mol/l.
3. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

Nota: Una soluzione madre concentrata 10X può essere fatta utilizzando 10 volte i pesi indicati dei composti. Per l'uso, diluire 10 volte con acqua distillata e aggiustare il pH con HCl 1 mol/l.

A4.9 Soluzione di Tyrode

1. Aggiungere a 750 ml di acqua distillata 0.2 g di cloruro di calcio anidro (CaCl₂), 0.2 g di cloruro di potassio (KCl), 0.05 g di sodio fosfato monobasico (Na₂HPO₄), 0.2 g di cloruro di magnesio esaidrato (MgCl₂·6H₂O), 8.0 g di cloruro di sodio (NaCl), 1.0 g di bicarbonato di sodio (NaHCO₃) e 1.0 g di D-glucosio.
2. Aggiustare il pH a 7.4 con acido cloridrico (HCl) 1 mol/l o idrossido di sodio (NaOH) 1 mol/l.
3. Portare a 1.000 ml con acqua distillata
4. Se necessario, aggiungere 0.3 g di BSA (essenzialmente acidi grassi liberi) per 100 ml prima dell'uso.

A4.10 Colorante Papanicolaou

I coloranti disponibili in commercio di solito sono soddisfacenti, ma possono essere anche preparati in laboratorio.

Nota: Controllare l'acidità dell'acqua distillata prima di preparare la serie di alcool. Il pH dovrebbe essere 7.0.

EA-36 (equivalente a EA-50)*Componenti*

1. Eosina Y (colour index 45380)	10 g
2. Bismarck brown Y (colour index 21000)	10 g
3. Light-green SF, giallastro (colour index 42095)	10 g
4. Acqua distillata	300 ml
5. Etanolo al 95% (v/v)	2.000 ml
6. Acido fosfotungstico	4 g
7. Carbonato di litio acquoso saturato (>1.3 g/100 ml)	0.5 ml

Soluzioni madre

Preparare separatamente soluzioni al 10% (100 g/l) di ciascuno dei coloranti come segue:

1. Sciogliere 10 g di eosina Y in 100 ml di acqua distillata.
2. Sciogliere 10 g di Bismarck brown Y in 100 ml di acqua distillata.
3. Sciogliere 10 g di light-green SF in 100 ml di acqua distillata.

Preparazione

1. Per preparare 2 litri di colorante, miscelare 50 ml di soluzione madre eosina Y con 10 ml di soluzione madre Bismarck brown Y e aggiungere 12.5 ml di soluzione madre light-green SF.
2. Portare a 2.000 ml con etanolo al 95% (v/v).
3. Aggiungere 4 g di acido fosfotungstico.
4. Aggiungere 0.5 ml di soluzione saturata di carbonato di litio.
5. Miscelare bene e conservare a temperatura ambiente in bottiglie scure ben chiuse.

Nota 1: La soluzione è stabile per 2-3 mesi.

Nota 2: Filtrare con un filtro da 0.45 µm prima dell'uso.

Orange G6

Componenti

- | | |
|--|----------|
| 1. Cristalli orange G (colour index 16230) | 10 g |
| 2. Acqua distillata | 100 ml |
| 3. Etanolo 95% (v/v) | 1.000 ml |
| 4. Acido fosfotungstico | 0.15 g |

Soluzione madre numero 1 (orange G6, soluzione 10% (100 g/l))

1. Sciogliere 10 g di cristalli di orange G in 100 ml d'acqua distillata.
2. Agitare bene. Far riposare in una bottiglia scura o ricoperta da un foglio di alluminio a temperatura ambiente per 1 settimana prima dell'uso.

Soluzione madre numero 2 (orange G6, soluzione 0.5%)

1. Aggiungere a 50 ml di soluzione madre numero 1 950 ml di etanolo 95% (v/v).
2. Aggiungere 0.15 g di acido fosfotungstico.
3. Miscelare bene. Conservare in bottiglie scure o coperte da un foglio di alluminio a temperatura ambiente.

Nota 1: Filtrare prima dell'uso.

Nota 2: La soluzione è stabile per 2-3 mesi.

Ematossilina di Harris senza acido acetico

Componenti

1. Ematossilina (cristalli scuri; colour index 75290).
2. Etanolo 95% (v/v).
3. Solfato di ammonio alluminio dodecaidrato ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).
4. Ossido di mercurio (HgO).

Preparazione

1. Sciogliere, riscaldando, 160 g di solfato di ammonio alluminio dodecaidrato in 1.600 ml di acqua distillata.
2. Sciogliere 8 g di cristalli di ematossilina in 80 ml di etanolo 95% (v/v).
3. Aggiungere la soluzione ematossilina alla soluzione di solfato di ammonio alluminio dodecaidrato.
4. Riscaldare a 95°C.
5. Rimuovere la soluzione dal calore e aggiungere lentamente 6 g di ossido di mercurio, miscelando.

Nota: La soluzione sarà di colore porpora scuro.

6. Immergere rapidamente il contenitore in acqua fredda.
7. Quando la soluzione è fredda, filtrare.
8. Conservare a temperatura ambiente in bottiglie scure o coperte da un foglio di alluminio.
9. Far decantare per 48 ore prima dell'uso.
10. Diluire la quantità richiesta con una uguale quantità di acqua distillata.
11. Filtrare di nuovo.

Soluzione di Scott

Nota: La soluzione di Scott viene utilizzata solo quando l'acqua di rubinetto è insufficiente per far tornare i nuclei di colore blu, ma dovrebbe essere sostituita frequentemente, ad esempio, dopo 20-25 vetrini lavati.

Componenti

- | | |
|--|----------|
| 1. Bicarbonato di sodio (NaHCO ₃) | 3.5 g |
| 2. Solfato di magnesio eptaidrato (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 20.0 g |
| 3. Cristalli di timolo (se richiesto come conservante). | |
| 4. Acqua distillata | 1.000 ml |

Soluzione di etanolo acido*Componenti*

1. Etanolo 99.5% (v/v)	300 ml
2. Acido cloridrico concentrato (HCl)	2.0 ml
3. Acqua distillata	100 ml

Riferimenti

Biggers JD *et al.* (1971). *The culture of mouse embryos in vitro*. In: Daniel JC, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco, WH Freeman: 86-116.

Quinn P *et al.* (1985). *Improved pregnancy rate in human in-vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid*. *Fertility and Sterility*, 44:493-498.

APPENDICE 5 Muco cervicale

A5.1 Introduzione

Gli spermatozoi nel muco cervicale sono sospesi nel fluido. L'interazione degli spermatozoi con le secrezioni del tratto riproduttivo femminile è di importanza critica per la loro sopravvivenza e la loro funzione. Non esiste attualmente alcun metodo pratico per valutare gli effetti dei fluidi uterino e tubarico sugli spermatozoi. Tuttavia, il muco cervicale è facilmente disponibile per il campionamento e per lo studio.

La natura e la quantità dei granuli secretori è variabile nelle differenti parti della cervice. I secreti di queste cellule contribuiscono alla formazione del muco cervicale. Gli ormoni ovarici regolano la secrezione del muco cervicale: il 17 β -estradiolo stimola la produzione di una notevole quantità di muco acquoso, mentre il progesterone inibisce l'attività secretoria delle cellule epiteliali. La quantità del muco cervicale secreto mostra variazioni cicliche. In donne in età riproduttiva, con un normale ciclo mestruale, la produzione giornaliera di muco varia da 500 μ l a metà ciclo fino a meno di 100 μ l negli altri periodi. Piccole quantità di fluidi endometriali, tubarici e follicolari possono contribuire a costituire il muco cervicale. Inoltre sono presenti leucociti e residui cellulari dell'epitelio uterino e cervicale.

Il muco cervicale è una secrezione eterogenea, composta per oltre il 90% da acqua. Esso mostra numerose proprietà reologiche:

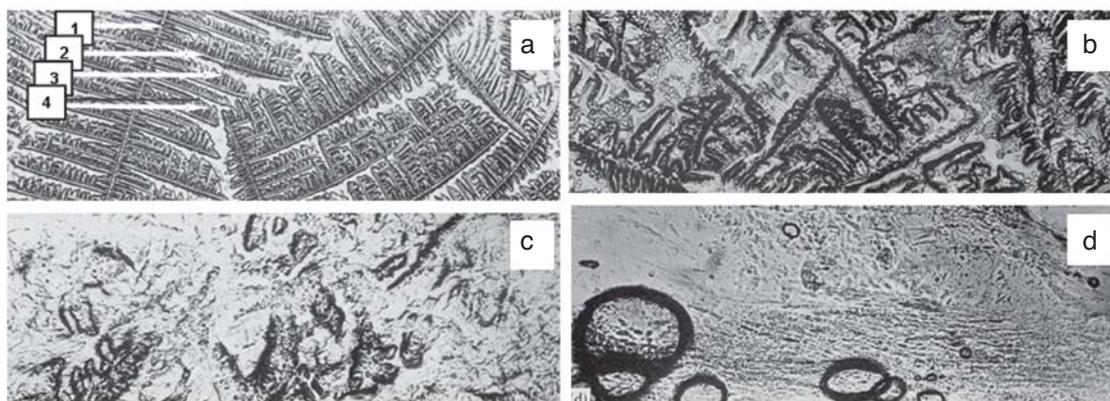
- *La viscosità (consistenza)* è influenzata dalla disposizione molecolare e dalla concentrazione di proteine e ioni del muco cervicale. Il muco varia durante il ciclo; da altamente viscoso (spesso ricco di cellule) nella fase premenstruale, assume invece una consistenza acquosa a metà ciclo, subito prima dell'ovulazione. Appena avvenuta l'ovulazione, la viscosità del muco comincia nuovamente ad aumentare.
- *Lo spinnbarkeit (filanza)* è il termine utilizzato per descrivere la fibrosità, la filanza o l'elasticità caratteristiche del muco cervicale.
- *Il ferning (cristallizzazione)* si riferisce al grado e alle caratteristiche delle cristallizzazioni che si formano quando il muco cervicale si essicca su una superficie di vetro (vedi Fig. A5.1).

Il muco cervicale è un idrogel, formato da una componente ad alta viscosità e da una componente a bassa viscosità, che comprende elettroliti, composti organici e proteine solubili. La componente ad alta viscosità è una rete macromolecolare di mucina, che influenza le caratteristiche reologiche del muco. La mucina cervicale è un sistema fibrillare formato da subunità costituite da un core peptidico e da catene laterali oligosaccaridiche. Le alterazioni cicliche dei costituenti del muco cervicale possono influenzare la capacità degli spermatozoi di penetrarlo e di sopravvivere. Gli spermatozoi possono penetrare nel muco cervicale approssimativamente dalla nona giornata di un normale ciclo di 28 giorni; la penetrabilità aumenta gradualmente per raggiungere il massimo subito prima dell'ovulazione. Successivamente, la penetrabilità inizia a diminuire, prima ancora che siano evidenti cambiamenti delle caratteristiche del muco. Sono comuni variazioni indivi-

duali della durata e del grado di penetrabilità degli spermatozoi. Gli spermatozoi mobili vengono guidati dai filamenti di muco verso le cripte cervicali, dove sono conservati e lentamente rilasciati gradualmente nell'utero e nelle tube di Falloppio.

Fig. A5.1 Esempi di cristallizzazione a foglia di felce nel muco cervicale essiccato all'aria su vetrino

(a) Ferning: 1, ramo primario; 2, ramo secondario, 3, ramo terziario, 4, ramo quaternario; (b) steli primari e secondari (score 2), ma sono presenti anche alcuni steli terziari; (c) atipica cristallizzazione a felce (score 1); (d) nessuna cristallizzazione (score 0). Le strutture rotonde sono bolle d'aria. Vedi la Sezione A5.3.3 per la spiegazione del punteggio (score).



Commento: È importante valutare l'interazione tra spermatozoi e muco cervicale come criterio che deve essere incluso in ogni studio completo sull'infertilità. Una alterata interazione tra sperma e muco cervicale può rappresentare un'indicazione per l'inseminazione artificiale o per altre tecniche di riproduzione assistita.

A5.2 Raccolta e conservazione del muco cervicale

A5.2.1 Procedura di raccolta

Esporre la cervice con uno speculum e detergere delicatamente l'orifizio esterno con un tampone di cotone per rimuovere eventuali contaminanti vaginali esterni. Rimuovere il muco esocervicale con un tampone o con una pinza. Prelevare il muco endocervicale dal canale cervicale aspirandolo con una siringa da muco, con una siringa da tubercolina (senza ago), o una pipetta. Il modo in cui si applica la pressione di aspirazione agli strumenti per la raccolta dovrebbe essere standardizzato. Introdurre la punta dello strumento per circa 1 cm nel canale cervicale, prima di applicare l'aspirazione. Mantenere l'aspirazione fino a quando il dispositivo non viene ritirato. Solamente prima di estrarre lo strumento dalla bocca esterna della cervice bisogna interrompere l'azione di aspirazione. È consigliabile serrare il catetere piegandolo, per evitare l'accumulo di bolle o materiale vaginale nel muco raccolto quando il dispositivo viene rimosso dal canale cervicale. Ove possibile, la

qualità del muco dovrebbe essere valutata immediatamente dopo la sua raccolta. Se ciò non è possibile, il muco deve essere conservato fino a quando potrà essere valutato (vedi Sezione A5.2.2).

Quando il muco cervicale è stato prelevato in un momento diverso dalla metà del ciclo, la sua produzione può essere aumentata dalla somministrazione di 20-80 µg di etinil estradiolo ogni giorno per 7-10 giorni prima della raccolta. Questa procedura induce la produzione di un muco più idratato, e quindi meno viscoso (Eggert-Kruse *et al.*, 1989). Per quanto questo approccio possa essere utile per lo studio *in vitro* delle interazioni tra spermatozoi e muco cervicale, non necessariamente rifletterà la situazione della coppia quando non vengono somministrati ormoni.

A5.2.2 Stoccaggio e conservazione

Il muco può essere conservato sia nel dispositivo di raccolta originale o in piccole provette sigillate con un tappo o con parafilm per evitare la disidratazione. Si deve prestare attenzione a ridurre al minimo la quantità di aria nel contenitore per la conservazione. I campioni dovrebbero essere conservati in frigorifero a 4°C fino a 5 giorni. Se possibile, i campioni di muco dovrebbero essere usati entro 2 giorni dalla raccolta; deve essere sempre registrato l'intervallo tra la raccolta e l'utilizzo. Non devono essere eseguiti test di penetrazione nemaspermica e valutazioni reologiche su campioni di muco che siano stati congelati e scongelati.

A5.3 Valutazione del muco cervicale

La valutazione delle proprietà del muco cervicale comprende lo studio di spinnbarkeit (filanza), del ferning (cristallizzazione), viscosità e pH. L'Appendice 6 propone un modulo per il punteggio e la registrazione delle proprietà del muco cervicale in accordo al sistema definito da Moghissi (1976), basato sulla proposta originaria di Insler *et al.* (1972). Il punteggio (score) deriva dal volume del muco cervicale raccolto (vedi Sezione A5.3.1) e da quattro variabili (vedi Sezioni A5.3.2-A5.3.5) che descrivono il suo aspetto e le sue caratteristiche. Il pH del muco non è incluso nel punteggio totale del muco cervicale, ma dovrebbe essere misurato essendo un importante fattore nell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale (Eggert-Kruse *et al.*, 1993). Il punteggio massimo è 15. Un punteggio superiore a 10 è generalmente indice di una buona qualità di muco, capace cioè di favorire la penetrazione degli spermatozoi; un punteggio inferiore a 10, invece, indica un muco non favorevole alla penetrazione nemaspermica.

A5.3.1 Volume

La viscosità del muco rende difficile una misurazione precisa del volume. Può essere valutato dalla lunghezza del muco nel catetere di diametro noto (vedi Riquadro A5.1).

Riquadro A5.1 Misurare il volume del muco raccolto

Il volume di un prelievo di muco ($V, \mu\text{l} = \text{mm}^3$) si ottiene moltiplicando l'area della sezione trasversale del tubo contenente il muco (A, mm^2) per la lunghezza (L, mm): $V = A \times L$. L'area della sezione trasversale del tubo $A = \pi r^2$, dove π è di circa 3.142 e r è il raggio del tubo. Quindi un muco di lunghezza 10 cm (100 mm) in tubi da due millimetri di diametro ($A = 3.142 \times 1 \times 1 = 3.142 \text{ mm}^2$) ha un volume di $A \times L = 3.142 \times 100 = 314 \text{ mm}^3 = 314 \mu\text{l}$ o 0.31 ml.

Il volume viene calcolato come segue:

0 = 0 ml

1 = 0.01–0.10 ml o circa 0.1 ml

2 = 0.11–0.29 ml o circa 0.2 ml

3 = >0.3 ml o circa 0.3 ml o più

A5.3.2 Viscosità (consistenza)

La viscosità del muco cervicale è il più importante dei fattori che influenzano la penetrazione degli spermatozoi. C'è poca resistenza alla migrazione degli spermatozoi attraverso il muco cervicale, a metà ciclo, ma un muco viscoso – come quello osservato durante la fase luteale – forma una barriera impenetrabile.

La viscosità è calcolata come segue:

0 = compatto, altamente viscoso, muco premenstruale

1 = muco di viscosità intermedia

2 = muco leggermente viscoso

3 = acquoso, con bassa viscosità, muco di metà ciclo (preovulatorio)

A5.3.3 Ferning (cristallizzazione)

Il ferning (vedi Fig. A5.1) viene valutato esaminando il muco essiccato all'aria sopra un vetrino portaoggetti. Questa preparazione può evidenziare diversi tipi di cristallizzazione che possono avere un aspetto simile ad una felce. In funzione della composizione del muco, la "foglia di felce" può avere solo un ramo primario, o il ramo può essere ramificato una, due o tre volte, per formare, rispettivamente, rami secondari, terziari e quaternari. Dovrebbero essere osservati diversi campi nel preparato, ed il punteggio indica il più alto grado di cristallizzazione del campione.

Le foglie di felce possono essere molto diverse, in funzione, ad esempio, dello spessore della preparazione e del numero di cellule presenti. Una preparazione può visualizzare più di una fase di cristallizzazione: a volte tutti gli stadi si possono trovare in un unico preparato.

Il ferning è calcolato come segue:

- 0 = nessuna cristallizzazione
- 1 = cristallizzazione atipica
- 2 = cristallizzazione con ramificazioni primarie e secondarie
- 3 = cristallizzazione con ramificazioni terziarie e quaternarie

A5.3.4 Spinnbarkeit (filanza)

Porre una goccia di muco cervicale su un vetrino portaoggetti e toccarlo con un coprioggetto o con un secondo vetrino, che viene poi delicatamente sollevato e tenuto trasversalmente. Calcolare la lunghezza del filamento di muco cervicale che si forma tra i due vetrini.

Lo spinnbarkeit è calcolato come segue:

- 0 = <1 cm
- 1 = da 1 a 4 cm
- 2 = da 5 a 8 cm
- 3 = 9 cm o più

A5.3.5 Cellularità

Si raccomanda che il conteggio di tutte le cellule venga espresso in cellule per μl . Una stima del numero dei leucociti e di altre cellule nel muco cervicale, tradizionalmente, si basa sul numero contato in campo microscopico con un obiettivo a 40x (vedi Riquadro A5.2.).

Riquadro A5.2 Volume di un preparato di muco profondo 100 μm osservato al microscopio con un obiettivo a 40x

Il volume di muco osservato in ogni campo microscopico dipende dall'area del campo (πr^2 dove π è di circa 3.142 e r è il raggio del campo microscopico) e dalla profondità della camera (100 μm). Il diametro del campo microscopico può essere misurato con un micrometro o può essere stimato dividendo il diametro dell'apertura dell'oculare per ingrandimento dell'obiettivo.

Con un obiettivo a 40x e un oculare 10x di apertura 20 mm, il campo microscopico ha un diametro di circa 500 μm (20 mm / 40). In questo caso, $r = 250 \mu\text{m}$, $r^2 = 62.500 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196.375 \mu\text{m}^2$ e il volume è di 19.637.500 μm^3 o circa 20 nl.

Così, un conteggio di 10 cellule per campo visivo corrisponde a circa 10 cellule per 20 nl, o 500 cellule per μl . Se il numero di cellule contate è basso, l'errore di campionamento è alto, una conta replicata 10 volte ha un errore di campionamento del 22% (vedi Tabella 2.2), quindi il valore potrebbe essere compreso fra 280 e 720 cellule per μl .

I punteggi per la classificazione delle cellule sono:

0 = >20 cellule pcv o >1.000 cellule per μ l

1 = 11-20 cellule pcv o 501-1.000 cellule per μ l

2 = 1-10 cellule pcv o 1-500 cellule per μ l

3 = 0 cellule

A5.3.6 pH

Il pH del muco endocervicale dovrebbe essere misurato con una apposita cartina, range 6.0-10.0, *in situ* oppure subito dopo la raccolta. Se il pH viene misurato *in situ*, bisogna fare attenzione a non toccare il muco esocervicale, che ha sempre un pH più basso (più acido) del muco endocervicale. È necessario inoltre prendere precauzioni per evitare la contaminazione con le secrezioni vaginali, che hanno un pH basso.

Gli spermatozoi sono sensibili alle variazioni di pH del muco cervicale. Un muco acido immobilizza gli spermatozoi, mentre un muco alcalino può aumentare la motilità. Una eccessiva alcalinità del muco cervicale (pH superiore a 8.5) può avere un effetto negativo sulla vitalità degli spermatozoi. Il valore ottimale del pH per la migrazione e la sopravvivenza degli spermatozoi nel muco cervicale è compreso tra 7.0 e 8.5, che è il range normale di pH del muco preovulatorio. Tuttavia un valore di pH compreso tra 6.0 e 7.0 può essere compatibile con la penetrazione degli spermatozoi, la motilità è spesso compromessa sotto il pH 6.5 e prove di interazione spermamuco cervicale spesso non sono effettuate se il pH del muco è inferiore a 7.0.

In alcuni casi il muco cervicale può essere sensibilmente più acido. Questo è dovuto sia per una alterata secrezione, sia per la presenza di un'infezione batterica o per la contaminazione con il fluido vaginale.

Riferimenti

Eggert-Kruse W *et al.* (1989). *Prognostic value of in-vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus*. Fertility and Sterility, 51:317-323.

Eggert-Kruse W *et al.* (1993). *The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction*. Fertility and Sterility, 59:617-628.

Insler V *et al.* (1972). *The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle*. International Journal of Gynaecology and Obstetrics, 10:223-228.

Moghissi KS (1976). *Post-coital test: physiological basis, technique and interpretation*. Fertility and Sterility, 27:117-129.

APPENDICE 6 Scheda di registrazione per l'analisi del liquido seminale e del muco cervicale

A6.1 Modello di registrazione di analisi del liquido seminale

Qui di seguito è indicato uno schema modello che permette di registrare le osservazioni fatte durante l'analisi del liquido seminale, con i metodi descritti in questo manuale. Lo schema può essere modificato per includere le variabili derivate, che sono combinazioni dei risultati a partire dai dati primari (per esempio, il numero totale di cellule perossidasi-positivo per eiaculato). Quando viene utilizzato per scopi di ricerca, i dati del campione registrati possono essere inseriti direttamente in un database informatico, e qualsiasi variabile derivata può essere calcolata elettronicamente.

Lo schema ha più colonne per la registrazione dei risultati delle analisi del liquido seminale svolte in tempi diversi. Questo è un modo conveniente di presentare i risultati di una serie di campioni di liquido seminale. Può essere utile aggiungere uno spazio extra in alcune parti del modulo per consentire la registrazione di ulteriori commenti e osservazioni. I limiti di riferimento, se disponibili, sono indicati tra parentesi quadre (vedi Appendice 1, Tabella 1.1 e Commenti).

Nome:			
Codice:			
Data (giorno/mese/anno)			
Raccolta (1, presso il laboratorio; 2, a casa)			
Ora di raccolta (ore : minuti)			
Consegna campione (ore : minuti)			
Inizio analisi (ore : minuti)			
Paziente			
Tempo di astinenza (giorni)			
Terapie			
Difficoltà nella raccolta			
Liquido seminale			
Trattamento (per es. bromelina)			
Campione completo? (1, completo; 2, incompleto)			
Aspetto (1, normale; 2, anormale)			
Viscosità (1, normale; 2, anormale)			
Fluidificazione (1, normale; 2, anormale) (minuti)			
Agglutinazione (1-4, A-E)			
pH $[\geq 7.2]$			
Volume (ml) $[\geq 1.5]$			
Spermatozoi			
Numero totale (10^6 per eiaculato) $[\geq 39]$			
Concentrazione (10^6 per ml) $[\geq 15]$			
Errore (%) se si conta meno di 400 cellule			
Vitalità (% vivi) $[\geq 58]$			
Motilità totale PR + NP (%) $[\geq 40]$			
Progressiva PR (%) $[\geq 32]$			
Non progressiva NP (%)			
Immobile IM (%)			
Forme normali (%) $[\geq 4]$			
Atipie testa (%)			
Atipie tratto intermedio (%)			
Atipie tratto principale (%)			
Residui citoplasmatici in eccesso (%)			
MAR-test diretto IgG (%) (3 o 10 minuti) $[< 50]$			
MAR-test diretto IgA (%) (3 o 10 minuti) $[< 50]$			
IB-test diretto IgG (% con sferule) $[< 50]$			
IB-test diretto IgA (% con sferule) $[< 50]$			
Cellule non nemaspermiche			
Cellule perossidasi-positive, concentrazione (10^6 per ml) $[< 1.0]$			
Funzione ghiandole accessorie			
Zinco (μmol per eiaculato) $[\geq 2.4]$			
Fruttosio (μmol per eiaculato) $[\geq 13]$			
Alfa-glucosidasi (neutra) (mU/eiaculato) $[\geq 20]$			
Seminologo:			

A6.2 Modello di registrazione del muco cervicale

Nome:
Codice:
Data dell'ultima mestruazione (giorno / mese / anno):

Punteggio giornaliero del muco cervicale				
Data (giorno/mese/anno)				
Giorno del ciclo				
Volume (0, 1, 2, 3)				
Viscosità (0, 1, 2, 3)				
Ferning (0, 1, 2, 3)				
Spinnbarkeit (0, 1, 2,3)				
Cellularità (0, 1, 2, 3)				
Punteggio totale (max. 15)				
pH				

Test dopo il coito						
Data (giorno/mese/anno)						
Tempo dopo il coito (ore)						
	Pool vaginale	Pool endocervicale	Pool vaginale	Pool endocervicale	Pool vaginale	Pool endocervicale
Concentrazione (spermatozoi per µl)						
Motilità						
PR (%)						
NP (%)						
IM (%)						
Seminologo:						

APPENDICE 7 Errori di campionamento e controllo di qualità

A7.1 Errori nella misurazione della concentrazione di spermatozoi

A7.1.1 Errori nella valutazione del conteggio

Per misurare la concentrazione degli spermatozoi, il numero di spermatozoi in un volume fisso di liquido seminale diluito è stimato in una camera di conta. Tuttavia, una previsione è di scarsa utilità senza una qualche indicazione della sua precisione. Ciò è previsto dall'intervallo di confidenza, che ha una probabilità specifica (il coefficiente di confidenza o possibilità di copertura) di contenere il valore vero. La probabilità più comunemente usata è 0.95. L'intervallo è quindi chiamato l'intervallo di confidenza al 95%, e le estremità di questo intervallo sono i limiti del 95% di confidenza (Armitage *et al.*, 2002).

Se gli spermatozoi sono distribuiti a caso in tutta la camera, il numero in un dato volume segue la distribuzione di Poisson, con variazione uguale al numero contato. L'errore standard (ES) di un conteggio (N) è la sua radice quadrata (\sqrt{N}), l'errore di campionamento (% ES) è di $100 \times (\sqrt{N} / N)$ e l'intervallo di confidenza del 95% (IC) è circa $N \pm 1.96 \times ES$ (o $N \pm$ di circa $2 \times ES$).

Nota: Questi valori sono puramente indicativi, in quanto i limiti di confidenza non sono sempre simmetrici rispetto alla stima. L'esatto intervallo di confidenza al 95%, in base alle proprietà della distribuzione di Poisson, è pari a 361.76-441.21 per un conteggio di 400, 81.36-121.66 per un conteggio di 100, 4.80-18.39 per un conteggio di 10, 0.025-5.572 per un conteggio di 1, e di 0.0-3.7 per un conteggio di 0.

A7.1.2 Corrispondenza tra calcoli ripetuti

È consigliabile replicare le conte su due diluizioni separate di ciascun campione di liquido seminale, per tenere conto di un'eventuale distribuzione non uniforme di spermatozoi nonostante il campione sia stato ben miscelato (vedi Sezione 2.4.1). La valutazione della stessa camera due volte, o la valutazione di entrambe le griglie di una camera riempita con una stessa diluizione, non costituisce una vera replica, in quanto ciò non consente di rilevare errori di preparazione, miscelazione o diluizione.

La differenza tra conte indipendenti dovrebbe essere zero, con l'errore standard pari alla radice quadrata della somma dei due conteggi. Così $z = (N1 - N2) / \sqrt{N1 + N2}$ dovrebbe essere <1.96 solo per effetto della variabilità casuale; se lo è, i valori sono accettati. Se z è >1.96 , è necessario replicare nuove diluizioni. Fig. A7.1 riporta i valori accettabili arrotondati per $N1-N2$.

Ad esempio, per un conteggio medio di 200 spermatozoi (somma 400), la differenza tra i due conteggi replicati potrebbe essere 39, così i due conteggi potrebbero essere 180.5 (200-19.5) e 219.5 (200 + 19.5) per un solo effetto della variabilità casuale.

La Tabella A7.1 riassume i dati di Fig. A7.1 e può essere utilizzata per valutare la concordanza tra le conte replicate (vedi Sezioni 2.8.3 e 2.11).

Per il conteggio di routine degli spermatozoi, si consiglia di contare almeno 200 spermatozoi in ogni replicato, in modo che siano contate un totale di circa 400 cellule, l'errore semplice è quindi inferiore al 5% (vedi Tabella 2.2). Con un numero di spermatozoi molto basso, gli errori di campionamento più elevati possono essere inevitabili (vedi Sezioni 2.11.1 e 2.11.2), nel qual caso dovrebbe essere riportato l'errore di campionamento (% ES) per il numero di spermatozoi contati (vedi Tabella 2.2).

Fig. A7.1 Differenze accettabili tra due conte replicate in una funzione del numero totale di spermatozoi valutati

La linea mostra la differenza massima tra le conte replicate che possono verificarsi per la sola variabilità casuale.



Tabella A7.1 Differenze accettabili tra 2 conte replicate relative ad una data somma

Somma	Differenza*	Somma	Differenza*	Somma	Differenza*
35–40	12	144–156	24	329–346	36
41–47	13	157–169	25	347–366	37
48–54	14	170–182	26	367–385	38
55–62	15	183–196	27	386–406	39
63–70	16	197–211	28	407–426	40
71–79	17	212–226	29	427–448	41
80–89	18	227–242	30	449–470	42
90–98	19	243–258	31	471–492	43
99–109	20	259–274	32	493–515	44
110–120	21	275–292	33	516–538	45
121–131	22	293–309	34	539–562	46
132–143	23	310–328	35	563–587	47

*Arrotondata all'intervallo di confidenza 95%.

A7.2 L'importanza di comprendere gli errori di campionamento

Il manuale segnala l'importanza della conta di un sufficiente numero di spermatozoi e di effettuare stime ripetute che concordino entro certi limiti. Questo è necessario affinché tali procedure aumentino la certezza che concentrazioni o conte totali rilevate siano vicine al valore vero (ma sconosciuto). Se si contano troppo pochi spermatozoi, la concentrazione calcolata sarà imprecisa. Se non è possibile contare un totale di almeno 400 spermatozoi, questo dovrebbe essere indicato nel referto e potrebbe incidere sull'errore rilevato (vedi Tabella 2.2).

La precisione si raggiunge meglio se il conteggio viene realizzato con camere di conta profonde, con ampie griglie che contengano un elevato numero di spermatozoi, piuttosto che in camere con minore profondità e piccole griglie contenenti pochi spermatozoi. Per facilitare il conteggio, il seme dovrebbe essere diluito sufficientemente con un fissativo in modo che ci sia una scarsa sovrapposizione di cellule non mobili. L'esempio che segue illustra la differenza tra le camere per ottenere una misurazione accurata di un campione di seme con una bassa concentrazione di spermatozoi.

Per una camera a basso volume in una griglia di 1 mm × 1 mm riempita con seme non diluito:

- Se la effettiva concentrazione degli spermatozoi è di 1×10^6 per ml ci sono 1.000 spermatozoi per μl o 1 spermatozoo per nl.
- In una camera profonda 10 μm , con una griglia di 1 mm × 1 mm sul fondo, ci saranno 10 spermatozoi in tutta la griglia da 10 nl.
- L'errore relativo alla conta di soli 10 spermatozoi è del 32% e l'intervallo di confidenza del 95% $10 \pm 1.96 \sqrt{N}$ ($= 10 \pm 6.2$) (vedi Tabella 2.2).

- Questo ampio intervallo di confidenza significa che il numero reale potrebbe essere tra 4 spermatozoi ($10 - 6$) e 16 spermatozoi ($10 + 6$) in un volume totale di 10 nl.
- Pertanto, il valore effettivo della concentrazione è compresa tra 400.000 e 1.600.000 spermatozoi per ml di seme.
- In pratica, questo significa che la migliore stima per un volume di 50 μ l è che contenga tra 20.000 e 80.000 spermatozoi.
- Se sono stati esaminati due preparati replicati, i valori corrispondenti per i 20 spermatozoi osservati sarebbero, con un errore del 22%, un intervallo di confidenza di 20 ± 8.8 , un numero effettivo di 11 ($20 - 9$) o 29 ($20 + 9$) in un volume di 20 nl; la stima del valore vero sarà tra 550.000 spermatozoi/ml e 1.450.000 spermatozoi/ml e tra 27.500 e 72.500 spermatozoi per una aliquota di 50 μ l di seme.

Per una camera di ampio volume con nove griglie da 1 mm \times 1 mm riempite con seme diluito 1:2 (1 + 1):

- Se la concentrazione reale dello sperma è di 1×10^6 per ml e la diluizione fatta è di 1:2 (1 + 1) (vedi Sezione 2.8), ci saranno 500.000 spermatozoi per ml, 500 spermatozoi per μ l o 0.5 spermatozoi per nl.
- In una camera profonda 100 μ m con diverse griglie sul fondo da 1 mm \times 1 mm (100 nl per griglia) ci saranno 200 spermatozoi in quattro griglie (400 nl), 400 nelle due repliche (800 nl).
- L'errore associato nel conteggio di 400 spermatozoi è del 5% e l'intervallo di confidenza al 95% di $400 \pm 1.96 \times \sqrt{N}$ ($= 400 \pm 39$) (vedi Tabella 2.2).
- Questo intervallo di confidenza significa che la conta reale potrebbe essere tra 360 spermatozoi ($400 - 40$) e 440 spermatozoi ($400 + 40$) in un volume totale di 800 nl di seme diluito 1:2 (1 + 1).
- Pertanto, la stima della concentrazione è compresa tra 900.000 e 1.100.000 spermatozoi per ml di seme non diluito.
- In pratica, ciò significa che un volume di 50 μ l contiene tra 45.000 e 55.000 spermatozoi.

A7.3 Errori nella misurazione delle percentuali

A7.3.1 Errori nelle valutazioni percentuali

Quando gli spermatozoi vengono classificati in due classi (con morfologia normale o anormale, mobili o immobili, vivi o morti, con reazione acrosomiale o meno, penetrati o non negli ovociti di hamster), le percentuali seguono la distribuzione binomiale. Per questa distribuzione l'errore standard della percentuale (p) stimata entro una classe dipende dalla percentuale reale, ma sconosciuta, così come dal numero di spermatozoi contati (N). L'errore standard stimato è pari a $\sqrt{(p(100-p)/N)}$, e un approssimativo intervallo di confidenza può essere derivato da una distribuzione normale. Questa è una buona approssimazione per i valori nel range 20-80%.

- Se sono stati contati 100 spermatozoi, e la percentuale con morfologia normale è del 20%, l'errore standard della percentuale stimata di spermatozoi normale è $\sqrt{(20(100-20)/100)} = \sqrt{(20 \times 80)/100} = \sqrt{1.600/100} = 4\%$. Il limite di confidenza del 95% è di $\pm 1.96 \times 4\% \text{ o } \pm 7.8\%$, e l'intervallo di confidenza corrispondente è 12.2-27.8%.
- Se sono stati contati 200 spermatozoi, l'errore standard è $\sqrt{(20(100-20)/200)} = \sqrt{(20 \times 80)/200} = \sqrt{1.600/200} = 2.8\%$. Il limite di confidenza del 95% è di $\pm 1.96 \times 2.8\% \text{ o } \pm 5.5\%$ e l'intervallo di confidenza corrispondente è 14.5-25.5%.
- Se sono stati contati 400 spermatozoi, l'errore standard è $\sqrt{(20(100-20)/400)} = \sqrt{(20 \times 80)/400} = \sqrt{1.600/400} = 2.0\%$. Il limite di confidenza del 95% è di $\pm 1.96 \times 2\% \text{ o } \pm 3.9\%$ e l'intervallo di confidenza corrispondente è 16.1-23.9%.

Al di fuori del range 20-80%, è più opportuno utilizzare la trasformazione angolare (arco seno radice quadrata) $z = \sin^{-1} \sqrt{p/100}$. Questa ha la proprietà che la deviazione standard di z è $1 / (2\sqrt{N})$ e dipende quindi solo dal numero di spermatozoi contati e non dalla reale percentuale (sconosciuta). Un'alternativa è calcolare i limiti di confidenza binomiali usando uno dei diversi software statistici disponibili.

A7.3.2 Corrispondenza tra percentuali replicate

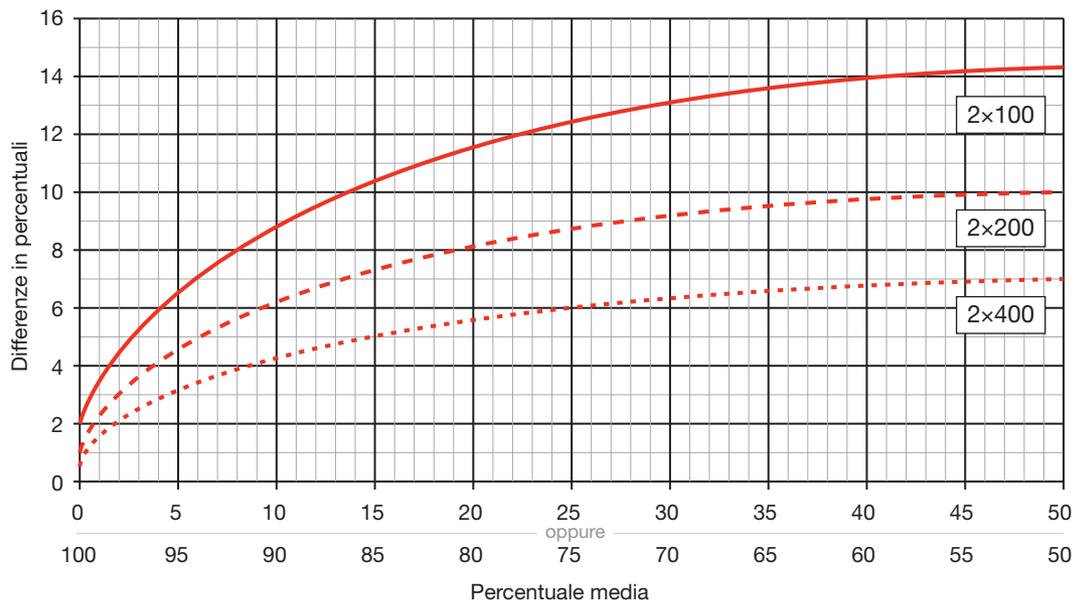
Si consiglia di replicare le valutazioni di percentuali (p_1 e p_2) effettuate su N spermatozoi in ciascun campione e confrontarli. Il limite atteso di differenza d (dove $d = |p_1 - p_2|$) è $1.96 \sqrt{(2p_{ave}(100 - p_{ave}) / N)}$ dove $p_{ave} = (p_1 + p_2) / 2$. La differenza tra conteggi indipendenti dovrebbe essere zero, con l'errore standard che dipende dalla percentuale stimata e il numero totale di spermatozoi contati.

Grandi errori statistici associati contando meno di 200 spermatozoi per replica sono indicati nella fig. A7.2, che mostra l'esatto intervallo di confidenza al 95% tra percentuali di conte replicate di 100, 200 e 400 spermatozoi (per esempio, numero di spermatozoi totale di 200, 400 e 800).

Esso dimostra inoltre che l'errore è simmetrico intorno al 50%, con un massimo del 50% e minimo dello 0% e 100%.

Fig. A7.2 Le differenze accettabili tra le percentuali replicate sono funzione della percentuale vera e del numero totale di spermatozoi valutati

Le linee mostrano le differenze attese per la sola variabilità casuale (limiti di confidenza al 95%) per percentuali ripetute determinate da 100 (totale 200: in alto, linea continua), 200 (totale 400: nel mezzo, linea tratteggiata) e 400 (totale 800: in basso, linea puntinata) spermatozoi.



Le differenze accettabili tra replicati possono essere valutate con questo grafico. Per un totale di 200 spermatozoi (100 per replicato) e una percentuale reale del 5% (o 95%), il limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% della differenza è del 6.6%. In media, 19 su 20 valutazioni ripetute di uno stesso campione sarà in un intervallo compreso tra 2.42% e 9.00%; uno su 20 darà un risultato fuori da questi limiti solo per la variabilità casuale. Per un totale di 800 spermatozoi (400 per replicato: linea puntinata) ed una percentuale reale del 5% (o 95%), il limite superiore di confidenza della differenza è 3.1%, e i limiti di confidenza al 95% sono 3.1% e 7.6%. Analogamente, se viene contato un totale di 400 spermatozoi (200 per replicato; linea tratteggiata), per un valore vero di 20% (o 80%) il limite massimo di confidenza al 95% è 8.1%, con limiti 16.2% e 24.3%.

Le Tabelle A7.2, A7.3 e A7.4 presentano i dati sulle differenze accettabili tra replicati (che si verificano solo per la variabilità casuale) per percentuali stimate da differenti numeri di spermatozoi totali contati. Questi possono essere più utili del grafico per valutare la concordanza tra percentuali replicate di spermatozoi che sono morfologicamente normali, mobili, vitali o con acrosoma reagito.

Tabella A7.2 Differenze accettabili tra due percentuali medie, derivate da conte replicate di 100 spermatozoi (200 contati)

Media (%)	Differenza*	Media (%)	Differenza*
0	2	67-74	13
1	3	75-80	12
2	4	81-84	11
3	5	85-87	10
4	6	88-90	9
5-6	7	91-93	8
7-9	8	94-95	7
10-12	9	96	6
13-15	10	97	5
16-19	11	98	4
20-25	12	99	3
26-33	13	100	2
34-66	14		

* Arrotondata all'intervallo di confidenza 95%.

Tabella A7.3 Differenze accettabili tra due percentuali medie, derivate da conte replicate di 200 spermatozoi (400 contati)

Media (%)	Differenza*	Media (%)	Differenza*
0	1	66-76	9
1	2	77-83	8
2	3	84-88	7
3-4	4	89-92	6
5-7	5	93-95	5
8-11	6	96-97	4
12-16	7	98	3
17-23	8	99	2
24-34	9	100	1
35-65	10		

* Arrotondata all'intervallo di confidenza 95%.

Tabella A7.4 Differenze accettabili tra due percentuali medie, derivate da conte replicate di 400 spermatozoi (800 contati)

Media (%)	Differenza*	Media (%)	Differenza*
0	0	70–81	6
1–3	2	82–88	5
4–6	3	89–93	4
7–11	4	94–96	3
12–18	5	97–99	2
19–30	6	100	0
31–69	7		

*Arrotondata all'intervallo di confidenza 95%.

A7.4 Produzione di campioni seminali per il controllo di qualità

I campioni del controllo qualità dovrebbero essere idealmente rappresentativi della serie dei campioni seminali processati in laboratorio. Se solo un piccolo numero di campioni CQ deve essere analizzato, dovrebbe essere quello più rilevante per l'attività principale nel laboratorio. Ad esempio, nel laboratorio di un servizio di infertilità, potrebbero essere scelti intervalli clinicamente significativi (concentrazione di 15×10^6 - 50×10^6 per ml, motilità progressiva 30-50%, e morfologia normale al di sotto del 5%).

- Aliquote di campioni seminali miscelate insieme possono essere conservate congelate, oppure a 4°C con un conservante e analizzate per la concentrazione degli spermatozoi in tempi diversi.
- Gli spermatozoi possono non sopravvivere sufficientemente bene alla crioconservazione da essere una fonte utile di materiale per il controllo di qualità interno ed esterno per la valutazione della motilità e i test anticorpali.
- Videocassette, CD e DVD possono essere utilizzati anche per la motilità.
- Fotografie, videocassette, CD e DVD possono essere utilizzati per la morfologia.
- Video-registrazioni sono particolarmente utili per imparare a valutare la motilità e la morfologia, ma il loro impiego deve integrare e non sostituire la valutazione in replicato dei campioni seminali.
- Vetrini di liquido seminale colorato possono essere usati per il controllo di qualità della morfologia. Strisci fissati possono anche essere conservati e utilizzati per controllare la colorazione. I vetrini colorati possono deteriorarsi con il tempo, a seconda della qualità della fissazione o delle procedure di colorazione. Tuttavia, i vetrini colorati con la procedura Papanicolaou descritta in questo manuale, e conservati al buio a temperatura ambiente, dovrebbero durare per mesi o anche anni.
- Sieri positivi agli anticorpi antispermatozoo possono essere utilizzati per il con-

trollo di qualità dell'Immunobead test indiretto, ma non sono consigliati per l'Immunobead test diretto.

A7.5 Preparazione di una video-registrazione per il controllo di qualità interno dell'analisi della motilità spermatica

Questo protocollo descrive come preparare una video-registrazione da utilizzare per il controllo di qualità del manuale delle procedure per la valutazione della motilità.

- Registrare almeno cinque e fino a 10 campi per simulare i molti campi valutati per l'analisi della motilità durante l'esame seminale e per consentire la valutazione di almeno 400 spermatozoi.
- La video-registrazione dovrebbe contenere immagini da diversi campioni seminali, in modo da comprendere le motilità normalmente osservate durante l'esame seminale.
- La videocassetta può semplicemente avere cinque campi di pochi campioni di sperma diversi o, in altri casi, può essere necessaria una registrazione più complessa, ad esempio per la standardizzazione tra laboratori o in uno studio multicentrico. In questo caso, potrebbero essere utilizzati diversi campioni di sperma, e gli esempi potrebbero essere ripetuti in modo random lungo tutta la videocassetta. Campioni ripetuti consentono di valutare la precisione intra-operatore.

A7.5.1 Altre attrezzature

Oltre alle attrezzature di routine per stimare la motilità, la preparazione di registrazioni per il controllo di qualità richiede:

- un video-registratore o un computer con un CD-RW o DVD-RW;
- un dispositivo di marcatura per codificare la registrazione video, come ad esempio una diapositiva con numeri incisi sulla sua superficie o un marcatore di tempo.

A7.5.2 Procedura

- Se diversi campioni di seme sono disponibili, l'intera video-registrazione può essere preparata in un'unica sessione, in caso contrario, i campioni possono essere registrati non appena saranno disponibili.
- Se la motilità è valutata solitamente a temperatura ambiente, le registrazioni devono essere effettuate a temperatura ambiente. Allo stesso modo, se la motilità è valutata di solito a 37°C, anche le registrazioni devono essere effettuate alla stessa temperatura.

Nota: Se la registrazione deve essere fatta a 37°C, il tavolino termostato dovrebbe essere acceso e portato alla temperatura stabile almeno 10 minuti prima dell'uso.

- Preparare una registrazione di campi sufficiente a garantire che 400 spermatozoi siano registrati da diversi campioni seminali.
- Per i campioni con una bassa concentrazione, possono essere necessari più di 10 campi per dare un numero sufficiente di spermatozoi da contare. La video-registrazione dei 10 campi richiederà alcuni minuti.
- La video-registrazione può essere fatta quando vengono utilizzati per l'analisi sia un vetrino con coprioggetti che una camera fissa profonda 20 μm .

Nota 1: Quando si usano camere di conta monouso, la motilità sarà stabile per un periodo di tempo più lungo rispetto a quando sono utilizzati vetrini, portaoggetto e coprioggetto. Ciò consentirà che 10 (o più) campi possono essere registrati dalla stessa preparazione.

Nota 2: Quando si usano vetrini, portaoggetto e coprioggetto può essere necessario utilizzarne diversi nel corso della video-registrazione per evitare un notevole calo della motilità nel tempo.

- Individuare alcuni campioni di sperma con vari tipi di motilità.
- Ogni campione deve avere un codice unico per la video-registrazione. La codificazione può variare dalla semplice marcatura per ogni campione, alla marcatura per ogni campo di ogni campione. Ad esempio, il primo esemplare di marcatura potrebbe essere l'inizio del primo campo, senza che appaiano altre codifiche fino al secondo campione. In alternativa, il codice potrebbe includere le marcature di ogni singolo campo, vale a dire il primo campo del primo campione dovrebbe essere contrassegnato 01-01, il secondo campo del primo campione 01-02, ecc. Questo sistema più elaborato di marcatura aiuta i seminologi durante l'analisi.

Nota 1: È utile avere brevi quadri bianchi sulla video-registrazione tra campi o tra campioni. Questo permette al seminologo di riconoscere l'inizio del nuovo segmento.

Nota 2: Il modo più semplice per ottenere un'immagine bianca durante la registrazione è quello di coprire la fonte di luce.

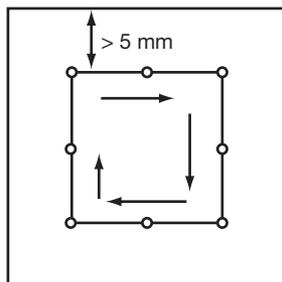
Nota 3: Questo può essere fatto anche prima di mettere in pausa il video-registratore; dovrebbe sempre essere utilizzato il tasto "pausa", piuttosto che il tasto "stop", poiché il tasto "stop" può provocare rumore o interferenza sulla videocassetta.

- Registrare un'immagine di un micrometro per 10 secondi all'ingrandimento che verrà utilizzato per la registrazione dei campioni. L'ingrandimento dovrebbe fornire un'immagine sul monitor simile a quella utilizzata per l'analisi visiva al microscopio. Questa immagine fornisce un modello permanente dell'ingrandimento, che consente di allineare la griglia di acetato con lo schermo da usare durante l'analisi della videocassetta o per la calibratura di un sistema CASA.

- Registrare l'immagine che codifica il primo campione per 5-7 secondi. Alla fine di questo tempo, bloccare la fonte di luce per 3 secondi per avere un'immagine bianca che può servire come marcatore, poi mettere in pausa la registrazione.
- Identificare il primo campione di sperma che sarà utilizzato per la registrazione. Porre 10 μ l di seme miscelato su un vetrino portaoggetti e coprire con un coprioggetto 22 mm x 22 mm, o caricare una camera con 7 μ l di seme miscelato. Consentire al campione di stabilizzarsi per pochi secondi (a una temperatura di 37°C se necessario) fino a che non si sia fermato. Registrare 10 (o più) campi, seguendo lo schema indicato in Fig. A7.3. Per il CQ CASA, la concentrazione di spermatozoi non dovrebbe superare 50×10^6 / ml; i campioni più concentrati possono essere diluiti nel plasma seminale omologo (vedi Sezione 3.5.2).
- Scegliere il primo campo vicino alla parte superiore sinistra del coprioggetto o della camera, almeno 5 mm dal bordo. Registrare il campo per 15 secondi, mantenendo il microscopio e il tavolino più fermi possibile. Dopo 15 secondi, registrare 3 secondi in bianco e mettere in pausa la registrazione. Se si devono codificare i singoli campi, modificare il numero di codice e registrare immagini che contengano solo il numero di codice per 5-7 secondi.
- Seguendo lo schema in Fig. A7.3, individuare un secondo campo mobile sul vetrino o sulla camera, e registrare questo campo per 15 secondi. Registrare ancora per 3 secondi un'immagine bianca alla fine dei 15 secondi. Mettere in pausa la registrazione e, se lo si desidera, modificare il numero di codice per indicare il terzo campo. Continuare la registrazione in questo modo fino a che non siano stati registrati almeno 400 spermatozoi (10 o più campi, a seconda della concentrazione). Dopo aver registrato il campo finale e un'immagine bianca di 3 secondi, interrompere la registrazione.
- Preparare un secondo campione. Registrare l'immagine codificata del secondo campione per 5-7 secondi, seguito da un'immagine bianca di 3 secondi.
- Registrare il secondo campione secondo la procedura descritta sopra, registrando 10 o più campi per 15 secondi ciascuno, con un'immagine bianca tra ogni campo e un'immagine bianca al termine del campo finale.
- Ripetere questa procedura fino a quando non sia stato video-registrato il numero desiderato di campioni.

Fig. A7.3 Supporto alla valutazione della motilità degli spermatozoi

Eeguire una scansione sistematica dei campi per la video-registrazione della motilità ad almeno 5 mm dal bordo del vetrino coprioggetto.



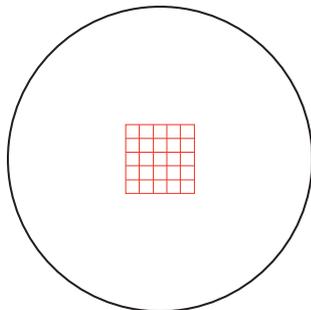
Nota: Se si desidera una video-registrazione più complessa per il controllo di qualità interno della motilità, con campioni ripetuti casualmente, è obbligatorio sia un secondo registratore che un computer dotato di software specializzato in video-editing. In questo caso, ogni campione dovrebbe essere video-registrato separatamente, con solo i campi segnati. Il numero del campione non dovrebbe essere registrato, in quanto questo cambierà quando il campione verrà registrato di nuovo. Se è disponibile un computer dotato di software di video-editing, le immagini per ogni campione potranno essere digitalizzate e combinate a piacere su un DVD.

A7.5.3 Analisi della video-registrazione

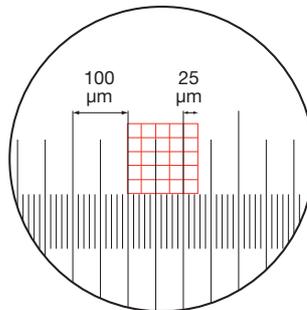
- Disegnare un griglia di acetato e posizionarla sul monitor per utilizzarla durante l'analisi della video-registrazione come specificato di seguito. Questo simulerà la griglia utilizzata per l'oculare nel corso dell'analisi microscopica (vedi Fig. A7.4a).

Fig. A7.4 Vista attraverso un oculare con reticolo (reticolo rosso)

(a) solo oculare



(b) vista del vetrino micrometrico

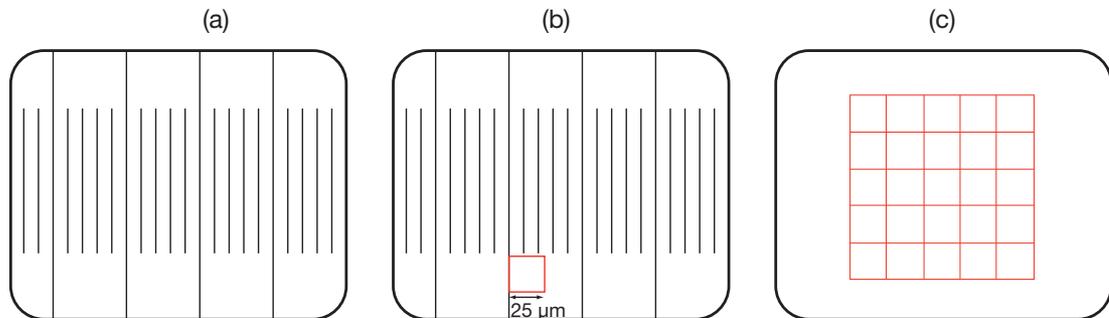


- Porre il micrometro sul tavolino del microscopio all'ingrandimento utilizzato per l'analisi della motilità. Guardando attraverso l'oculare con il reticolo (vedi

Fig. A7.4), misurare le dimensioni delle sezioni della griglia con il micrometro. In questo esempio il reticolo della griglia è di $125\ \mu\text{m} \times 125\ \mu\text{m}$ e ogni quadrato è di $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ (Fig. A7.4b). Prendere nota di queste misurazioni.

- Far partire la registrazione attraverso il monitor video e mettere in pausa l'immagine del micrometro (Fig. A7.5a).
- Posizionare un foglio di carta acetata sopra lo schermo e disegnare un quadrato delle dimensioni di quello della griglia del reticolo dell'oculare, misurata come sopra (Fig. A7.5b).
- Completare l'immagine di tutta la griglia del reticolo oculare (25 quadrati) (Fig. A7.5c).
- Per analizzare la registrazione video, assicurarsi che la griglia di acetato sia sovrapposta al monitor. L'analisi dovrebbe essere fatta su una sezione standard della griglia sovrapposta, ad esempio, le due righe in alto o le tre righe di mezzo.
- Contare le valutazioni replicate di 200 spermatozoi per ogni segmento registrato.

Fig. A7.5 Immagine video-registrata del micrometro sul monitor e la sovrapposizione dei tratti; vedi il testo per la spiegazione



A7.6 Preparazione del seme diluito per il controllo di qualità interno e determinazione della concentrazione di spermatozoi

A7.6.1 Considerazioni generali

- Alcuni passaggi della procedura per determinare la concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale possono essere controllati usando campioni seminali diluiti preparati e conservati in laboratorio.
- I campioni CQI dovrebbero essere rappresentativi delle diverse concentrazioni normalmente rilevate in laboratorio durante la valutazione di routine del liquido seminale.
- Diluire il liquido seminale con un conservante, e dispensare aliquote in provette

di stoccaggio. Queste possono essere congelate e utilizzate in seguito per il conteggio.

- Fare attenzione durante la preparazione delle sospensioni di miscelare il campione accuratamente, per garantire che provette preparate dallo stesso campione contengano concentrazioni identiche di spermatozoi. In questo modo, le differenze nella conta dei campioni CQI possono essere attribuite a problemi nella procedura di conteggio.
- Diluire i campioni conservati CQI prima di valutare la concentrazione con un emocitometro. Usare la diluizione finale che viene utilizzata in laboratorio durante il conteggio di routine. Ciò assicura che la concentrazione dei detriti di fondo e di altre cellule non spermatiche sarà simile a quella osservata durante la valutazione di routine. Ad esempio, se il seme è inizialmente diluito con un uguale volume di conservante, un'ulteriore diluizione 1:10 (1+ 9) darebbe una diluizione finale di 1:20.
- Quando è necessario un campione conservato con bassa concentrazione nemaspermica, è meglio iniziare con un campione con bassa concentrazione di spermatozoi piuttosto che fare una diluizione maggiore di un campione più concentrato. Questo assicurerà che l'interferenza di fondo sia simile a quella osservata durante l'analisi seminale di routine.
- Le preparazioni di spermatozoi mediante Swim-up senza impurità, teste senza coda e contaminazione di cellule frammentate osservate durante la valutazione di routine del liquido seminale sono le migliori per monitorare la conta di sospensioni di spermatozoi selezionati.
- Il numero di spermatozoi per sospensioni CQI preparato in una sola volta dipende dal numero di seminologi e dalla frequenza di conteggio.
- Lo sperma diluito conservato in frigorifero dovrebbe essere stabile per almeno 4 mesi.

A7.6.2 Reagenti

Può essere utilizzato uno dei tre conservanti:

- formalina: 10% (v/v) formaldeide. Aggiungere a 27 ml di acqua distillata 10 ml formaldeide al 37% (v/v).
- Azide (Jørgensen *et al.*, 2001): 3 mol/l di sodio azide (NaN_3). Sciogliere 19.5 g di NaN_3 in 100 ml di acqua distillata.
- Soluzione per prevenire l'agglutinazione (APSYS) (Brazil *et al.*, 2004). Aggiungere a 100 ml di acqua distillata 1.0 g di albumina sierica bovina (BSA), 2.0 g di polivinilpirrolidone (PVP), 0.90 g di cloruro di sodio (NaCl), 0.1 ml di detergente Triton X-100, 0.004 ml di silicone antischiuma e 0.10 g di sodio azide. Miscelare accuratamente e filtrare con un filtro 0.45 μm per eliminare i detriti. Conservare a 4°C.

Nota: Il battericida sodio azide può essere escluso da APSIS per rendere la soluzione non tossica. Tuttavia, tali soluzioni devono essere scartate se contaminate.

A7.6.3 Forniture aggiuntive

Oltre alle attrezzature di routine per la stima della concentrazione spermatica, la preparazione dei campioni CQ richiede:

- provette criogeniche o altri piccoli tubi con coperchi sigillanti per lo stoccaggio;
- marcatori permanenti per l'etichettatura dei tubi.

A7.6.4 Procedura

1. Identificare i campioni di seme con la concentrazione desiderata. Il volume di seme conservato varierà a seconda delle esigenze del laboratorio; utilizzare l'intero volume di sperma disponibile o preparare 4 ml di sospensione di liquido seminale diluito per ciascuna concentrazione.
2. Appena possibile dopo la raccolta del seme, diluirlo con conservanti. Se si utilizza APSIS per la diluizione e la conservazione, maggiore è sia il tempo prima della diluizione, che la probabilità di formazione di cristalli dopo la diluizione. Questi cristalli possono interferire con il caricamento della camera e la conta degli spermatozoi.
3. Trasferire il volume di seme necessario in un tubo da centrifuga da 15 ml. Per ogni ml di seme, aggiungere 0.1 ml di formalina 10% (v/v), 0.1 ml di azide 3 mol/l, o 1 ml di APSIS.
4. Etichettare tutte le provette utilizzate per lo stoccaggio dei campioni indicando le informazioni e la data di preparazione. I coperchi o i tappi dovrebbero essere rimossi e le provette collocate in un porta-provette per consentire un facile e veloce riempimento.
5. Assicurarsi che il seme diluito e conservato sia miscelato accuratamente mentre si aliquota, per garantire che tutte le provette contengano concentrazioni simili di liquido seminale. Anche ritardi minori dopo la miscelazione possono permettere agli spermatozoi di cominciare a depositarsi, alterando la concentrazione nelle aliquote. Un modo per assicurare il miscelamento costante è quello di posizionare il tubo da centrifuga di liquido seminale diluito in un porta-provette, quindi miscelare il seme continuamente con una mano, utilizzando una pipetta di plastica, mentre si prelevano le aliquote con una pipetta con l'altra mano.
6. A seconda delle esigenze del laboratorio, ogni provetta dovrebbe contenere 0.5-1.0 ml. La conservazione dei campioni in aliquote da 0.5 ml permette di fare numerosi conteggi per ciascuna provetta.
7. Una volta che la sospensione di seme conservato è stata distribuita in tutte le provette, queste ultime dovrebbero essere ben chiuse. A seconda del tipo di provetta utilizzata, il coperchio può essere sigillato con parafilm, che non è necessario se vengono utilizzate provette criogeniche.

8. Ripetere l'intero processo per i campioni del seme rimanenti.
9. Conservare le provette a 4°C.

Nota: La concentrazione delle soluzioni di CQI dovrebbe essere determinata dopo che sono state preparate le diluizioni, e non dovrebbe essere presunto dalla concentrazione del seme *in toto*. Una volta che sono state preparate le sospensioni conservate di spermatozoi, una provetta può essere rimossa, se necessario, e valutata (vedi Sezioni 2.7 e 2.8). I risultati possono essere tracciati utilizzando la procedura descritta nella Sezione 7.7. Tutti i conteggi devono essere effettuati utilizzando il metodo di conteggio tipicamente in uso in laboratorio. La sezione seguente descrive la procedura utilizzando l'emocitometro.

A7.6.5 Utilizzando i campioni conservati CQI

- Le soluzioni conservate devono essere ulteriormente diluite prima del conteggio; la diluizione dipende dal conservante usato.
- La diluizione iniziale di seme con formalina e azide è minima, quindi non è necessario prenderla in considerazione. Il liquido seminale conservato in APSIS è inizialmente diluito due volte (cioè 1:2 (1 + 1)) e questo deve essere preso in considerazione nel calcolo finale di concentrazione.
- Per le sospensioni diluite con APSIS da seme con una concentrazione iniziale superiore ai 25×10^6 per ml, il conteggio è migliore, utilizzando una ulteriore diluizione 1:10 (1 + 9). Questo può essere ottenuto aggiungendo 50 µl di sospensione di spermatozoi conservati in 450 µl di acqua distillata. Si ottiene così una diluizione finale di seme 1:20. Non utilizzare APSIS come diluente, perché questo potrebbe interferire con il seme sedimentato sulla griglia dell'emocitometro.
- Per le seguenti operazioni, tutte le pipette devono essere preparate per un volume adeguato e precaricate con una punta pulita per il prelievo rapido di una aliquota subito dopo il miscelamento.
- Una provetta di diluizione deve essere preparata con un appropriato volume di acqua (cioè 450 µl se si sta facendo una diluizione 1:10, come suggerito sopra). Il contenuto della provetta di conservazione del seme dovrebbe essere ben miscelato in un agitatore per circa 30 secondi alla massima velocità. Una aliquota di 50 µl dovrebbe poi essere trasferita nella provetta di diluizione contenente acqua. La provetta di diluizione dovrebbe quindi essere agitata per 20 secondi alla massima velocità. L'emocitometro deve essere caricato con 10 µl di sospensione, e gli spermatozoi contati come descritto nelle Sezioni 2.8.2 e 2.8.3.
- Se il campione di seme iniziale utilizzato per preparare il seme conservato avesse una bassa concentrazione di spermatozoi, la diluizione per la conta dovrebbe essere aggiustata di conseguenza. Ad esempio, se la concentrazione di seme iniziale cadesse nell'intervallo di $4-25 \times 10^6$ ml, per fare una diluizione finale di 1:5 come in laboratorio, la diluizione supplementare di seme conservato con APSIS sarebbe 2:5 (2 + 3: dal momento che il seme è già stato diluito 1:2 (1 + 1) con APSIS). Questo può essere ottenuto diluendo 50 µl di seme conservato in 75 µl di acqua distillata.

- Le sospensioni di spermatozoi conservate nel frigorifero dovrebbero essere stabili per almeno 4 mesi, momento in cui dovrebbero essere preparate le nuove soluzioni. È auspicabile avere un periodo di sovrapposizione, durante il quale si gestiscono sia le preparazioni vecchie che le nuove, per monitorare il periodo di transizione.

A7.7 Preparazione dei vetrini per il controllo di qualità interno per la valutazione della morfologia nemaspermica

A7.7.1 Considerazioni generali

- Si possono preparare strisci in laboratorio per il controllo di qualità interno relativo alla colorazione e all'analisi della morfologia.
- Si possono preparare strisci multipli da diversi campioni di seme che rappresentano i diversi assetti morfologici valutati nel laboratorio.
- Gli strisci possono essere fissati e conservati per monitorare la colorazione e le procedure di analisi.
- Gli strisci colorati possono essere utilizzati singolarmente o in replicato per il CQ nella procedura di analisi della morfologia.
- L'utilizzo di replicati permette di determinare la precisione intra-operatore. Tali vetrini CQ sono utili anche per comparare i risultati provenienti da differenti seminologi all'interno di un laboratorio, o per confrontare le analisi tra laboratori.
- Gli strisci colorati con Papanicolaou chiusi con mezzo di montaggio e conservati al buio a temperatura ambiente dovrebbero essere stabili per molti mesi o addirittura anni.
- Il liquido seminale deve essere miscelato accuratamente durante il processo di preparazione degli strisci, per assicurare che tutti i preparati provenienti da un particolare campione di seme siano identici. Si può ipotizzare quindi che qualsiasi variazione evidenziata durante l'analisi possa essere la conseguenza della metodologia, che deve essere monitorata (cioè la procedura dell'analisi morfologica) e non causata da un insufficiente miscelamento del seme durante la preparazione del vetrino.

A7.7.2 Procedura

1. Trasferire il liquido seminale dal contenitore in una provetta da centrifuga da 15 ml. Ciò consentirà una miscelazione più semplice e accurata durante il processo di preparazione del vetrino.
2. Pulire entrambe le superfici dei vetrini smerigliati, strofinando energicamente con fazzoletti di carta privi di peli.
3. Etichettare i vetrini smerigliati con informazioni identificative (per esempio, il numero di identificazione e la data) utilizzando una mina HB (numero 2). I segni della matita sono stabili durante la fissazione e la colorazione dei vetrini con Papanicolaou; l'inchiostro delle penne e alcuni pennarelli indelebili non lo sono.

4. Porre una punta pulita nella micropipetta e impostare il volume a 10 μl (o il volume usato di routine in laboratorio per la preparazione di strisci morfologici).
5. Il seme deve essere accuratamente miscelato durante l'intero processo, per assicurare che tutti gli strisci siano simili. Dopo il miscelamento, ritardi anche minimi prima di prelevare un'aliquota possono consentire la sedimentazione degli spermatozoi, alterando la popolazione di spermatozoi che verrà strisciata sul vetrino.
6. Miscelare bene il campione nella provetta da centrifuga, aspirandolo 10 volte con una pipetta ad apertura ampia (circa 1.5 mm di diametro) equilibrata alla temperatura del campione. Tale operazione dovrebbe essere abbastanza energica da miscelare il seme, ma non così vigorosa da creare bolle.
7. Subito dopo il miscelamento, rapidamente, per evitare che gli spermatozoi sedimentino, porre 10 μl di seme alla fine di uno dei vetrini portaoggetti puliti. È importante non lasciare che la goccia di sperma rimanga sul vetrino per più di un paio di secondi prima di strisciarla.
8. Strisciare l'aliquota di seme sulla superficie del vetrino utilizzando il metodo a fiamma (vedi Sezione 2.13.2). In questa procedura, viene utilizzato il bordo di un secondo vetrino per trascinare la goccia di seme lungo la superficie del vetrino. Assicurarsi di utilizzare il vetrino per "stendere" il liquido seminale lungo la superficie del vetrino: non utilizzare il vetrino per "spingere" il seme dalla parte posteriore. Fare attenzione a non fare uno striscio troppo spesso, per evitare sovrapposizioni o agglomerati di spermatozoi e una maggiore interferenza di fondo del colorante. La dispersione degli spermatozoi sul vetrino dipende dal volume del liquido seminale e dalla concentrazione nemaspermica, dall'angolo del vetrino utilizzato per lo striscio (minore è l'angolo più sottile sarà lo striscio) (Hotchkiss, 1945) e dalla velocità di striscio (più rapido è il movimento, più spesso sarà lo striscio) (Eliasson, 1971).
9. Ripetere i punti 6-8 per i rimanenti vetrini, facendo un solo vetrino dopo ogni miscelamento per garantire che gli spermatozoi non sedimentino prima che venga prelevata l'aliquota. Se c'è una pausa di più di un paio di secondi dopo la miscelazione, il seme deve essere miscelato di nuovo prima che venga prelevata l'aliquota.
10. Una volta che è stata stabilita la tecnica e la preparazione sta procedendo in modo regolare, può essere possibile fare due o tre vetrini dopo ogni miscelamento. Le aliquote dovrebbero essere prelevate tutte immediatamente dopo il miscelamento, e dovrebbero essere fatti due o tre strisci il più rapidamente possibile, in pochi secondi.

A7.8 Taratura delle apparecchiature

- Le pipette, le camere di conta e le altre attrezzature dovrebbero essere calibrate ad intervalli di 6 mesi - un anno.

A7.8.1 Bilance

- Le bilance dovrebbero essere controllate regolarmente con calibratori interni e con calibrazione esterna ad opera del servizio di manutenzione del laboratorio.
- Calibrare le bilance utilizzando pesi standard (per esempio, 1, 2, 5 e 10 g per coprire la gamma dei pesi del liquido seminale).
- Ripetere le misure 10 volte e calcolare media, DS e coefficiente di variazione (CV) ($= 100 \times DS / \text{media}$).
- Controllare la precisione (che il peso rientri in 2 DS delle misure medie).

A7.8.2 Pipette

- Calibrare le pipette aspirando acqua distillata fino al segno indicato e distribuirlo in contenitori prepesati.
- Calcolare il volume dal peso dell'acqua pipettata, considerando la densità pari a 1 g/ml.

Nota: La densità dell'acqua diminuisce con la temperatura (Lentner, 1981). Si tratta di 0.9982 g/ml a 20°C, 0.9956 g/ml a 30°C e 0.9922 g/ml a 40°C. Per la calibrazione è adeguato considerare il valore pari a 1.0 g/ml.

- Ripetere le misure 10 volte e calcolare media, DS e CV ($= 100 \times DS / \text{media}$).
- Controllare la precisione (che il peso rientri in 2 DS delle misure medie).

A7.8.3 Profondità delle camere

- Misurare la profondità delle camere di conta usando la scala Vernier per la messa a fuoco del microscopio. Mettere a fuoco prima sulla griglia della camera e poi su un segno indelebile sotto il coprioggetto. Misurare il numero dei gradi necessari per mettere a fuoco i due punti.
- Ripetere le misure 10 volte e calcolare media, DS e CV ($= 100 \times DS / \text{media}$).
- Controllare la precisione (che il peso rientri in 2 DS delle misure medie).

A7.8.4 Incubatori

- La temperatura degli incubatori e dei tavolini termostatati deve essere controllata con dei termometri che sono, a loro volta, regolarmente calibrati.
- Miscele di gas CO₂ devono essere controllate quotidianamente con la lettura

del display dell'incubatore, o con altri sistemi di analisi dei gas, settimanalmente o mensilmente, e dal campionamento del gas al momento della manutenzione.

A7.8.5 Cartine pH

- Le cartine per il pH dovrebbero essere controllate con soluzioni standard di pH.

A7.8.6 Altre attrezzature

- Altre apparecchiature di laboratorio, quali piaccetri, dovrebbero essere controllate con gli standard, a intervalli di 3-6 mesi.

Riferimenti

- Armitage P *et al.* (2002). *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell Science.
- Brazil C *et al.* (2004). *Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study*. *Journal of Andrology*, 25:645-656.
- Eliasson R (1971). *Standards for investigation of human semen*. *Andrologia*, 3:49-64.
- Hotchkiss RS (1945). *Fertility in man*. London, William Heineman Medical Books.
- Jørgensen N *et al.* (2001). *Regional differences in semen quality in Europe*. *Human Reproduction*, 16:1012-1019.
- Lentner C (1981). *Geigy scientific tables. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition*. Basel, Ciba-Geigy:50.

APPENDICE 8 Programmi nazionali di controllo di qualità esterno per l'analisi del liquido seminale

Australia: Fertility Society of Australia, External Quality Assurance Schemes for Reproductive Medicine, PO Box 1101, West Leederville, Western Australia 6901, Australia

Denmark: Dansk Institut for Ekstern Kvalitetssikring for Laboratorier, Sundhedssektoren, DEKS 54MI, Herlev Universitets sygehus, Herlev Ringvej 75, 2730 Herlev, Denmark

Germany: QuaDeGA, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Universitätsklinikum, Domagkstrasse 11, D-48129 Münster, Germany

Italy: Valutazione Esterna di Qualità, Gruppo Controllo Qualità Analitico Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna, Italy

Scandinavia: NAFA (Nordic Association for Andrology), Andrology Unit, Reproductive Medicine Centre, Karolinska Hospital, PO Box 140, SE-171 76 Stockholm, Sweden

Spain: Centro de Estudio e Investigación de la Fertilidad (CEIFER), Granada, Spain

United Kingdom: UKNEQAS Schemes for Andrology, Department of Reproductive Medicine, St Mary's Hospital, Manchester M13 0JH, United Kingdom

United States of America: American Association of Bioanalysts Proficiency Testing Service, 205 West Levee, Brownsville, Texas 78520-5596, USA

Questo manuale è rivolto a ricercatori e laboratoristi che svolgono l'esame del liquido seminale per ricerca e clinica.

La quinta edizione fornisce aggiornamenti, dimostrazioni, protocolli dettagliati per analisi di routine e ricerca, con lo scopo di migliorare la qualità e la standardizzazione dell'analisi del liquido seminale e ottimizzare la comparabilità dei risultati di differenti laboratori.

Caratteristiche della nuova edizione

- Formato di facile consultazione che include informazioni dettagliate per ogni procedura.
- Sezioni aggiuntive dedicate alle metodologie e all'interpretazione dei risultati.
- Numerose fotografie che mostrano esempi di varie atipie nemaspermiche.
- Sezioni dedicate alla selezione nemaspermica e crioconservazione.
- Range e limiti di riferimento dei vari parametri seminali basati su riferimenti bibliografici.

Omaggio per la Classe Medica. Vietata la vendita



siamS
Società Italiana di Andrologia
e Medicina della Sessualità