

1

Introduzione

Nel 1980, con la pubblicazione, da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, del *Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction* (*Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra liquido seminale e muco cervicale*) si venne incontro alla crescente necessità di standardizzare le procedure per l'esame del liquido seminale umano. Questa pubblicazione fu accolta con entusiasmo ed è stata ampiamente usata in questi anni dai clinici e dai ricercatori di tutto il mondo.

Il crescente sviluppo in questo campo di indagini ha tuttavia incoraggiato questa revisione del *Manuale*. Il settore dell'Andrologia ha subito rapide modificazioni, con un'attenzione sempre più rivolta alla necessità di una valutazione obiettiva della qualità e delle caratteristiche funzionali degli spermatozoi e delle variabili legate alla funzione secretoria delle ghiandole accessorie. Questo dato è essenziale tanto nell'esame della coppia infertile quanto nella valutazione della fertilità in quei soggetti in cui la produzione di spermatozoi venga soppressa da agenti tossici o da composti con potenziale attività contraccettiva. Una misura obiettiva delle variabili seminali è di grande interesse anche in settori in continuo sviluppo quali la fecondazione *in vitro* (IVF), l'inseminazione artificiale eterologa (AID) e omologa (AIH) e nella medicina legale.

Per questa ragione il Programma Speciale di Ricerca dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, per la Ricerca e lo Sviluppo nella Riproduzione Umana dette vita ad un gruppo di lavoro formato da esperti (vedi "Ringraziamenti") per rivedere e aggiornare il *Manuale* per conto di due delle sue Task Forces:

- (a) metodi per la regolazione della fertilità maschile;
- (b) diagnosi e trattamento dell'infertilità.

La sezione iniziale del nuovo *Manuale*, che comprende l'esame del liquido seminale umano, è divisa in due parti principali: la prima riporta quelle procedure che sono considerate standard e che perciò rappresentano i primi passi indispensabili nella valutazione del liquido seminale (Sezione 2A: da 2.1 a 2.5); la seconda indica quelle procedure che sono suggerite per studi particolari o per indagini approfondo-

dite e che possono perciò essere considerate come facoltative (Sezione 2B: da 2.6 a 2.10).

Tra i cambiamenti introdotti in questa seconda edizione, è stato inserito un metodo semplificato per la caratterizzazione della morfologia degli elementi cellulari diversi dagli spermatozoi che sostituisce il metodo descritto nella prima edizione: quest'ultimo è stato trasferito nelle procedure facoltative. Sono stati inoltre aggiunti alcuni metodi per valutare la presenza di anticorpi contro gli spermatozoi.

E' stata inoltre affermata la necessità del dosaggio di numerosi composti biochimici del liquido seminale per valutare la funzione secretoria delle ghiandole accessorie. Di queste l'acido citrico, lo zinco, la γ -glutamyl transpeptidasi e la fosfatasi acida riflettono la funzione secretoria della prostata; il fruttosio è un marker della funzione delle vescichette seminali; la L-carnitina libera è un possibile indice di quella epididimaria. Sebbene nessuno di questi parametri si sia dimostrato ben correlato con la fertilità, l'analisi biochimica di indici seminali specifici potrebbe fornire informazioni sullo stato funzionale delle ghiandole accessorie maschili ed eventualmente permettere una migliore valutazione dei possibili effetti di fattori xenobiotici e di malattie. Per queste ragioni i test biochimici scelti sono stati inclusi nella sezione delle indagini facoltative (2.7).

La misura dell'adenosin trifosfato (ATP) è stata proposta come parametro biochimico significativamente legato alla funzione spermatozoaria. Analogamente l'OMS ha promosso un dibattito per riesaminare la validità del test di penetrazione nell'oocita di hamster (*zona-free hamster oocyte test*) nel valutare la capacità dello spermatozoo umano a fondersi con l'oocita (Organizzazione Mondiale della Sanità, 1986). Sono perciò qui indicate le procedure per questi due test facoltativi e le relative citazioni bibliografiche, che danno una visione attuale della loro rilevanza.

La sezione del *Manuale* che tratta le interazioni tra spermatozoi e muco cervicale (Sezioni da 3.1 a 3.5) riconosce che la misura della capacità dello spermatozoo di penetrare il muco cervicale *in vitro* rappresenta un valido aiuto nella valutazione della fertilità di coppia da affiancare all'esame dei parametri tradizionali del liquido seminale. A tale scopo possono essere utilizzati numerosi metodi: per esempio un metodo microscopico, come la tecnica su vetrino o quella nel tubo capillare.

Infine si deve ancora sottolineare che il principale scopo di questo *Manuale* è quello di promuovere l'uso di procedure standardizzate che consentano di migliorare il controllo di qualità tra laboratori e che permettano di rendere uniformi i risultati provenienti da fonti diverse. Seguire con attenzione i dettagli delle procedure standard dovrebbe anche migliorare la precisione e la riproducibilità dei dati di laboratorio. L'affermarsi di raffinate tecnologie che utilizzano il computer per l'analisi di certe caratteristiche del liquido seminale preannuncia future possibilità di un trasferimento computerizzato dei dati e un efficiente controllo di qualità interlaboratorio.

2

Raccolta ed esame del liquido seminale umano

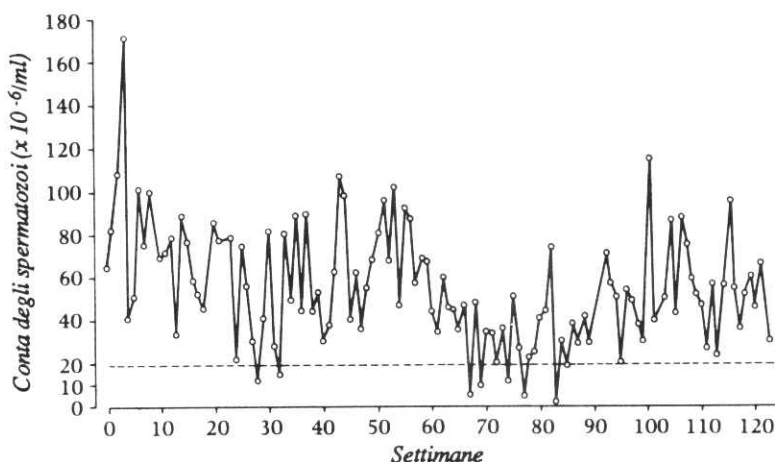
2.A LE PROCEDURE STANDARD

2.1 Raccolta e consegna del campione

Al paziente dovrebbero essere fornite istruzioni scritte in cui siano indicate con chiarezza le modalità di raccolta e di trasporto del campione.

- (a) Preferibilmente il campione dovrebbe essere raccolto dopo un periodo di astinenza sessuale di non meno di 48 ore e non più di 7 giorni. Sul modulo di accompagnamento di ciascun campione (vedi Appendice VII) dovranno essere registrati il nome del paziente, il periodo di astinenza, la data e l'ora della raccolta.
- (b) Per una prima valutazione del paziente si dovranno esaminare due campioni. L'intervallo di tempo tra le raccolte dipenderà dalle esigenze del singolo caso, ma dovrebbe essere compreso tra un minimo di 7 giorni e un massimo di 3 mesi. Se i risultati di questi accertamenti dovessero apparire decisamente diversi, dovranno essere esaminati ulteriori campioni di liquido seminale perché si possono verificare, nello stesso individuo, sensibili variazioni nel numero degli spermatozoi che vengono emessi al momento dell'eiaculazione (Fig. 2.1).

Fig. 2.1. Variabilità della concentrazione di spermatozoi in un soggetto nell'arco di 120 settimane. Durante questo periodo il soggetto non ha assunto farmaci e non è stato affetto da malattie febbrili. La linea tratteggiata corrisponde alla concentrazione di $20 \times 10^6/\text{ml}$, che viene generalmente considerato come il limite inferiore di normalità (vedi Appendice I.A). (Dati non pubblicati da C.A. Paulsen).



- (c) Se possibile, il campione dovrebbe essere raccolto in un'apposita stanza nei pressi del laboratorio. Altrimenti dovrebbe essere consegnato entro un'ora dal momento della raccolta e, se la motilità degli spermatozoi risulta molto bassa (meno del 25% con progressione rapida lineare, vedi Sezione 2.4.1), si dovrà esaminare un ulteriore campione, il prima possibile dopo la raccolta. Se si devono poi eseguire test per la funzione degli spermatozoi, come nel caso della penetrazione nell'uovo di hamster, è di fondamentale importanza che gli spermatozoi vengano separati dal plasma seminale entro un'ora dall'eiaculazione (vedi Appendice XV).
- (d) Il campione dovrà essere ottenuto per masturbazione e raccolto in un contenitore pulito di vetro o di plastica, con l'apertura sufficientemente larga; se si usa un contenitore di plastica si dovrà controllare che il tipo di materiale non eserciti alcun effetto tossico sugli spermatozoi. Il contenitore dovrebbe essere riscaldato per ridurre al minimo il rischio di shock termico. Se sul campione si dovrà eseguire un'analisi batteriologica, il paziente dovrebbe prima urinare e quindi lavare e sciacquare le mani e il pene prima che il campione venga raccolto in un contenitore sterile (vedi Sezione 2.6).
Non si dovrebbero usare lubrificanti per facilitare la raccolta del liquido seminale.
- (e) I comuni profilattici non devono essere usati per la raccolta del campione seminale perché possono interferire con la vitalità degli spermatozoi. In casi in cui circostanze particolari impediscano la raccolta per masturbazione, sono disponibili particolari profilattici di plastica per la raccolta del liquido seminale (vedi Zavos, 1985).
Il *coitus interruptus* non è accettabile come metodo per la raccolta perché è possibile che venga persa la prima parte dell'eiaculato, che contiene normalmente la più alta concentrazione di spermatozoi. Inoltre questo metodo favorisce la contaminazione cellulare e batteriologica del campione e il pH acido del fluido vaginale influenzerà in modo negativo la motilità degli spermatozoi.
- (f) Campioni incompleti non dovrebbero essere analizzati, in modo particolare se è andata persa la prima frazione dell'eiaculato.
- (g) Il campione dovrebbe essere protetto dalle basse e dalle alte temperature (non meno di 20 °C e non più di 40 °C) durante il trasporto al laboratorio.
- (h) Sul contenitore dovrebbero essere scritti il nome del soggetto, la data e l'ora della raccolta e la durata dell'astinenza.

2.2 Manipolazione del campione

Il personale del laboratorio dovrebbe essere informato che i campioni di liquido seminale presentano un possibile rischio biologico in quanto possono contenere pericolosi virus come ad esempio il virus dell'epatite, quello dell'immunodeficienza acquisita umana (AIDS), gli herpes virus e devono essere quindi maneggiati con la dovuta attenzione.

2.3 Esame macroscopico iniziale

2.3.1 *Aspetto*

Il campione seminale viene prima di tutto valutato con una semplice osservazione a temperatura ambiente. Un campione normale ha un aspetto grigio opalescente, omogeneo e si liquefa entro 60 minuti a temperatura ambiente. In alcuni casi tale liquefazione non si verifica entro 60 minuti e questo fatto deve essere registrato.

Il campione può apparire trasparente se la concentrazione di spermatozoi è troppo bassa, oppure può avere un colore bruno quando sono presenti globuli rossi nell'eiaculato, mentre la presenza di filamenti mucosi, un segno di liquefazione incompleta, può interferire con il conteggio delle cellule.

Campioni normali possono contenere granuli gelatinosi che non si liquefanno.

Il campione dovrebbe essere esaminato immediatamente dopo la liquefazione o entro un'ora dal momento dell'eiaculazione. In alcuni casi, quando i campioni non si liquefanno, può essere necessario un trattamento addizionale (per esempio, un trattamento con bromelina) per permettere al campione di essere adeguatamente analizzato.

Il campione dovrebbe essere ben mescolato nel recipiente in cui è stata effettuata la raccolta.

2.3.2 *Volume*

Il volume dell'eiaculato dovrebbe essere misurato o in un cilindro graduato o aspirando l'intero campione in una siringa o in una pipetta graduate. Se sul campione si dovranno effettuare dosaggi biologici o esami colturali, si dovranno utilizzare materiali sterili.

2.3.3 *Consistenza*

La consistenza del campione liquefatto (definita nella prima edizione del *Manuale* "viscosità") può essere valutata facendo passare dolcemente il campione attraverso un ago da siringa (21G, diametro interno di circa 0,8 mm; vedi Sezione 2.2 riguardo alle precauzioni da prendere nell'uso degli aghi) ed osservando la lunghezza del filamento. Un campione normale esce dall'ago sotto forma di piccole gocce mentre in caso di anormale consistenza, la goccia formerà un filamento di lunghezza superiore ai 2 cm. In alternativa la consistenza può essere valutata introducendo una bacchetta di vetro nel campione e osservando la lunghezza del filamento che si ottiene estraendo la bacchetta. Anche in questo caso il filamento non deve superare i 2 cm.

2.3.4 *pH*

Una goccia di liquido seminale viene uniformemente stesa su una cartina indicatrice per la misura del pH (range da 6,4 a 8,0). Dopo 30 secondi il colore della zona così impregnata dovrebbe essere uniforme e deve essere allora confrontato con la scala di colorazioni per leggere il valore del pH.

Qualunque cartina indicatrice di pH venga usata per questa misura, dovrà essere precedentemente controllata contro standard noti di pH prima di usarla nell'esame di routine di liquido seminale.

Il pH dovrebbe essere misurato entro un'ora dall'eiaculazione e dovrebbe essere compreso tra 7,2 e 7,8. Se il pH supera il valore di 7,8 si può sospettare la presenza di un'infezione. Al contrario, se il pH in un soggetto azoospermico è inferiore a 7, ci possiamo trovare di fronte ad una disgenesia dei vasi deferenti, delle vescichette seminali o dell'epididimo.

2.4 Esame microscopico iniziale

Durante l'esame microscopico iniziale del campione seminale si determina la motilità, si dà una prima stima della concentrazione degli spermatozoi e si valuta la presenza di cellule diverse dagli spermatozoi e di fenomeni di agglutinazione degli spermatozoi stessi.

2.4.1 Motilità

Negli ultimi anni sono state introdotte numerose tecniche per la valutazione obiettiva delle caratteristiche del movimento degli spermatozoi umani; tra queste vanno ricordate quelle basate sull'uso dell'esposizione fotografica a tempo e la video-microfotografia computerizzata (Overstreet *et al.*, 1979; Katz and Overstreet, 1981; Aitken *et al.*, 1982) e le tecniche laser (Lee *et al.*, 1982). Per quelli che sono gli scopi di questo *Manuale*, viene qui raccomandato un semplice sistema di classificazione che fornisce la migliore valutazione possibile della motilità degli spermatozoi senza ricorrere a complesse strumentazioni. I laboratori interessati allo sviluppo di particolareggiate tecniche di valutazione della motilità degli spermatozoi si possono riferire alle voci bibliografiche sopra menzionate.

2.4.2 Preparazione del campione e determinazione del grado di motilità

Con l'ausilio di una micropipetta o con un ago da siringa 21G viene posto un volume fisso di liquido seminale (10-15 μ l) su un vetrino portaoggetti pulito e coperto poi con un coprivetrino di dimensioni comprese tra i 20 x 20 mm e i 24 x 24 mm. E' importante che il volume del liquido seminale e le dimensioni del coprioggetti siano standardizzate, in maniera che la valutazione sia sempre fatta su di un preparato con spessore fisso (per esempio tra 25 e 30 μ m). Questo spessore permette la piena espressione dei movimenti di rotazione degli spermatozoi.

Il preparato viene quindi esaminato a 400-600 ingrandimenti. Per le preparazioni non colorate può essere utilizzato un normale microscopio, specialmente se il condensatore è regolato in maniera da disperdere la luce. Un microscopio a contrasto di fase è comunque preferibile.

Il peso del vetrino coprioggetti distende il campione così da ottenere un'ottima visione al microscopio. Il preparato così ottenuto viene la-

Tavola 2.1. Spermatozoi

(a) e (b) Spermatozoi normali

Gli spermatozoi che appartengono a questa categoria mostrano una testa di forma ovale con profilo regolare e con il cappuccio acrosomiale che copre più di un terzo della superficie della testa. La lunghezza della testa varia dai 3 ai 5 μm e la sua larghezza varia dai 2 ai 3 μm ; la larghezza deve comunque essere compresa tra un mezzo e i due terzi della lunghezza.

Il tratto mediano è sottile, meno di un terzo della larghezza della testa, diritto e di profilo regolare: è allineato con l'asse longitudinale della testa ed è lungo approssimativamente 7-8 μm .

La coda è sottile, distesa e dovrebbe mostrare un profilo regolare; la sua lunghezza è di almeno 45 μm .

(a) Negli spermatozoi colorati con il metodo di Papanicolaou e osservati in contrasto di fase, la capsula acrosomiale appare blu e il materiale nucleare contenuto nella testa assume una colorazione gialla.

(b) Un campo a bassa risoluzione per mostrare spermatozoi normali (N) e numerosi altri tipi di cellule con caratteristiche anormali: amorfi (A), con residuo citoplasmatico (CD), con coda arrotondata (CT), con testa doppia (DH), macrocefali (LH), con testa piriforme (PH), microcefali (SH) e con testa allungata (tapering) (TH). Colorazione col metodo di Papanicolaou. Ingrandimento: 690 x.

(c) Spermatozoo con grossa testa ovale

Questo spermatozoo mostra una testa ovale con profilo irregolare e più grande delle dimensioni normali (vedi anche (b) e (f)). Il tratto mediano è anormale perché presenta un'angolazione con l'asse longitudinale della testa ed ha un profilo irregolare. La coda appare normale. Ingrandimento: 1500 x.

(d) Spermatozoo con piccola testa ovale

Anormalità isolate delle dimensioni della testa sono rare. Questo spermatozoo ha una piccola testa ovale con profilo irregolare e probabilmente senza capsula acrosomiale (vedi anche (b)). Il pezzo mediano e la coda appaiono normali. Ingrandimento: 1500 x.

(e) e (f) Testa allungata (tapering)

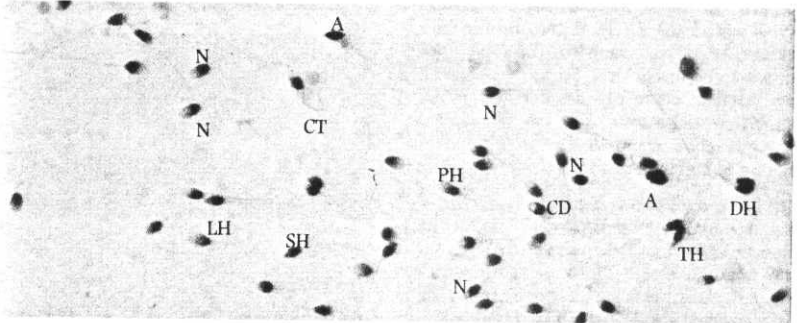
Questi spermatozoi mostrano una larghezza della testa diminuita in rapporto alla lunghezza, cosicché la larghezza risulta meno della metà della lunghezza. La testa assume perciò la tipica forma a sigaro che può o no terminare a punta verso il tratto mediano.

(e) Il passaggio dal tratto mediano alla coda è angolato, sebbene la coda appaia normale. Ingrandimento: 1260 x.

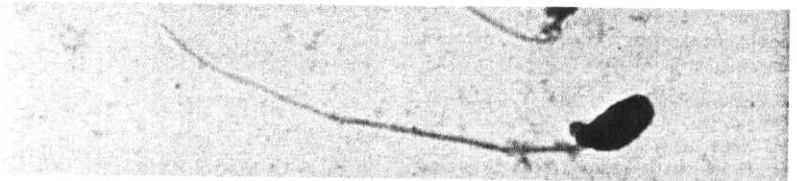
(f) Un campo a bassa risoluzione mostra due spermatozoi con testa allungata (TH) e altre forme normali (N) e anormali (vedi (b) per l'identificazione): BT, coda angolata. Ingrandimento: 825 x.



(a)



(b)



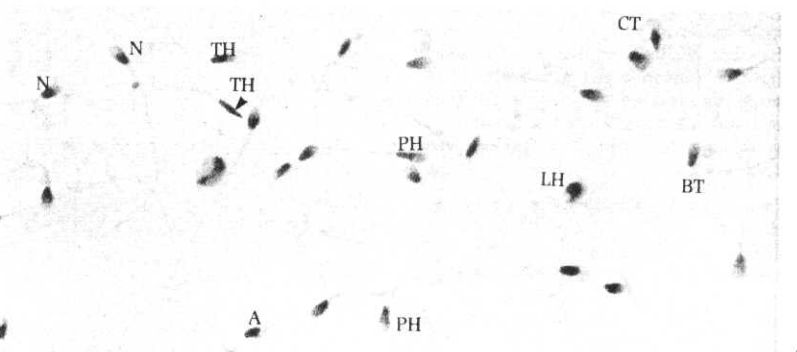
(c)



(d)



(e)

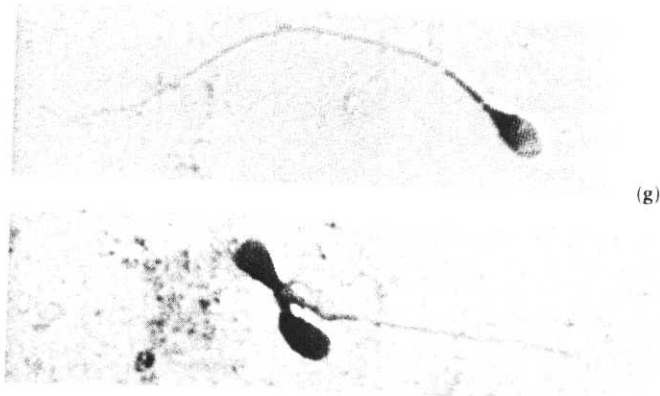


(f)

Tavola 2.1 (continua)

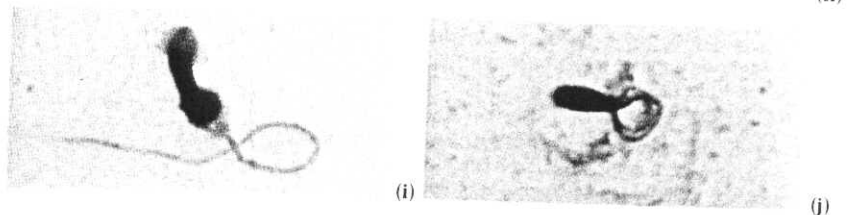
(g) *Testa piriforme*

Gli spermatozoi che appartengono a questa categoria sono quelli la cui testa ha un'evidente ed esagerata forma a lacrima, con forma affusolata che finisce a punta proprio al di sopra del tratto mediano (vedi anche (b) e (f)). Il loro profilo può essere regolare, come nell'esempio qui mostrato, o irregolare. Spesso la capsula acrosomiale copre più dei due terzi della superficie della testa. Il tratto mediano e la coda dello spermatozoo in (g) appare normale. Ingrandimento: 1500 x.



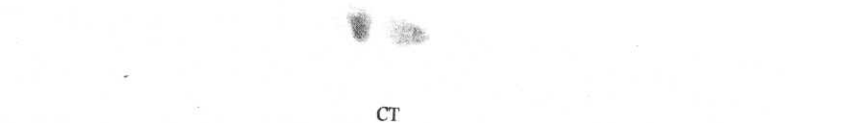
(h) *Testa duplicata o doppia*

Lo spermatozoo mostrato in figura ha due teste distinte (vedi anche (b)). Le teste possono essere di forma e dimensioni varie. La presenza di doppie teste ha la precedenza su ogni altra classificazione riguardante la testa. Il tratto mediano di questo spermatozoo è anormale perché non è dritto, mentre la coda è indistinta. Ingrandimento: 1500 x.



(i) *Testa amorfa*

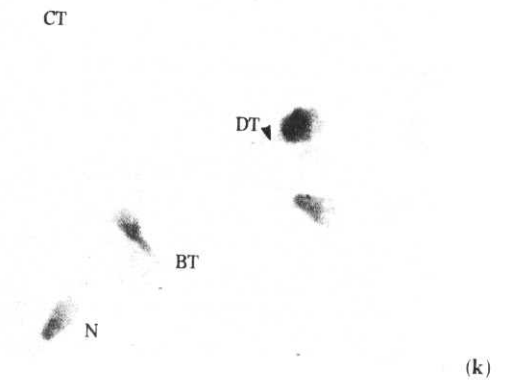
Questo tipo di spermatozoo ha una forma della testa bizzarra tale da non poter essere inserita in nessuna delle altre categorie; il profilo è sempre irregolare (vedi anche (b)). Inoltre il tratto mediano dello spermatozoo qui mostrato è anormale perché è piegato e la coda è probabilmente corta. Ingrandimento: 1500 x.



(j) e (k) *Difetti combinati della testa, del tratto mediano e della coda*

(j) La testa di questo spermatozoo ha una forma affusolata e dovrebbe essere classificato nella categoria con testa allungata (tapering) con profilo regolare. Il tratto intermedio è alterato e la coda è raggomitolata. Ingrandimento: 1500 x.

(k) Altri possibili difetti sono rappresentati da code piegate (BT) o raggomitolate (CT), code doppie (DT), code corte e code che sono attorcigliate o presentano un profilo irregolare. Ingrandimento: 1750 x.



(l) *Difetti combinati della testa e del tratto mediano*

La testa dello spermatozoo mostrato in figura è piriforme più che ovale. E' presente un residuo citoplasmatico (corpo residuo) attaccato al tratto mediano. La coda appare normale. Ingrandimento: 1500 x.



(m) *Residuo citoplasmatico (cytoplasmic droplet)*

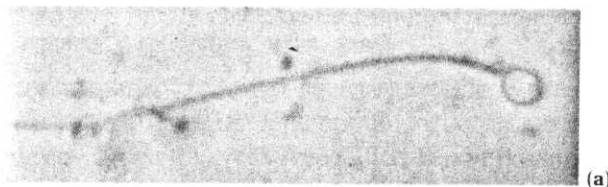
Il residuo citoplasmatico in questo spermatozoo è attaccato alla testa dello spermatozoo (vedi anche (b)). Anche la testa appare anormale e può essere classificata come amorfa. Ingrandimento: 1500 x.



Tavola 2.2. Spermatozoi e altre cellule presenti nel liquido seminale

(a) Testa tonda

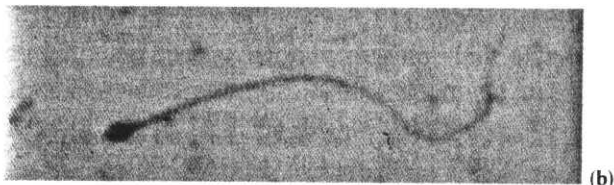
Questo spermatozoo ha una tipica testa tonda, senza acrosoma; è stato colorato usando il metodo semplificato di Papanicolaou e fotografato in contrasto di fase.



(a)

(b) Testa a spillo

Alcuni spermatozoi, che sono normalmente molto mobili, presentano una testa con struttura non chiara e sembrano essere composti interamente dal tratto intermedio e dalla coda. Dovrebbero essere differenziati dagli spermatozoi con testa piccola (vedi Tavola 2.1 (d)).



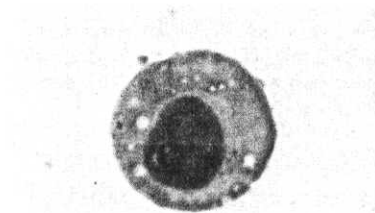
(b)

Cellule germinali immature

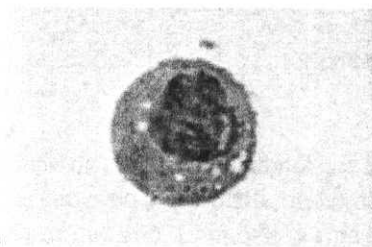
Queste cellule non hanno coda e perciò non hanno completato il loro processo di sviluppo. Vengono classificate a seconda della loro colorazione e delle loro caratteristiche morfologiche. In generale il loro nucleo assume una colorazione che va dal violetto al porpora e il citoplasma è grigio, se si usa la colorazione di Bryan-Leishman (vedi Appendice VI).

(c) Spermatogoni

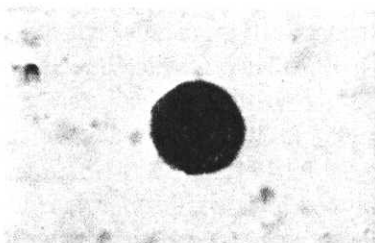
Tipo A (diametro nucleare da 6 a 7 μm). Queste cellule contengono normalmente uno o due nucleoli che si possono vedere ai margini del nucleo all'interno dei caratteristici aloni.



(c)



(d)



(e)



(f)

(d) Spermatociti primari

(Diametro nucleare da 8 a 9 μm) Questa cellula, quando viene colorata, mostra un grande nucleo sferico che va dal violetto scuro al porpora contro un citoplasma grigio. Il nucleo è normalmente omogeneo, ma occasionalmente si possono vedere filamenti di cromatina.



(g)



(h)

(e) Spermatociti secondari

(Diametro nucleare 7 μm). Questa cellula si colora esattamente come lo spermatocita primario, ma è di diametro inferiore. A differenza dei linfociti, il nucleo è sferico.

(f), (g) e (h) Spermatidi Sab *

Queste cellule sono normalmente di forma sferica e hanno un diametro di 4-5 μm . Talora si può vedere la capsula acrosomiale come una piccola protusione di color magenta su un lato della cellula. La restante parte della cellula si colora in porpora scuro. Molti spermatidi pos-

sono mostrare un citoplasma simile, ma si distinguono dai leucociti polimorfonucleati per la mancanza di citoplasma granulato, per l'assenza di ponti nucleari e per la loro forma sferica. Gli spermatidi possono talora presentare acrosomi fusi tra di loro.

(i) *Spermatidi Scd **

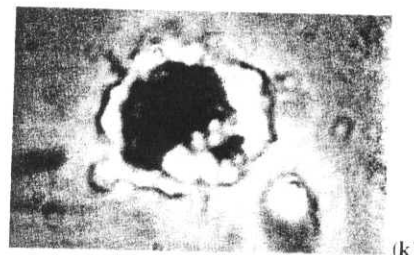
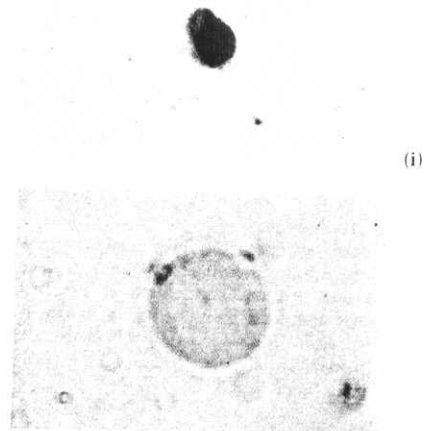
Queste cellule assomigliano a spermatozoi maturi senza testa e coda. Non è possibile distinguere gli spermatidi Scd dagli spermatozoi che hanno perso la coda.

(j) e (k) *Cellule perossidasi-positive e perossidasi-negative (vedi Appendice II)*

(j) Una cellula perossidasi-negativa, probabilmente una cellula germinale "immatura", contrastata con cianosina.

(k) Una cellula bianca del sangue perossidasi-positiva.

*Sabcd si riferisce alle differenti tappe della spermiogenesi basate sul grado di condensazione del nucleo e sulla forma dell'acrosoma.



sciato stabilizzare per circa un minuto. L'esame dovrebbe essere condotto a temperatura ambiente, preferibilmente tra i 18 e i 24 °C. A temperature al di fuori di questo intervallo si possono verificare alterazioni della motilità dello spermatozoo e i ranges di normalità per questo parametro (vedi Appendice I) non possono più essere applicati.

Il campo microscopico viene esaminato sistematicamente e la motilità di ogni spermatozoo incontrato viene classificata. Le categorie usate per indicare la motilità degli spermatozoi sono state classificate come (a), (b), (c) e (d), e sono così definite:

- (a) se lo spermatozoo ha una *motilità progressiva rapida e lineare* (precedentemente indicata come progressione "eccellente" e "buona");
- (b) se lo spermatozoo ha un *movimento lineare lento o non lineare* (precedentemente indicata come progressione "debole" o "moderata");
- (c) se lo spermatozoo ha *motilità non progressiva*;
- (d) se lo spermatozoo è *immobile*.

Normalmente devono essere esaminati da quattro a sei campi per accumulare 100 diversi spermatozoi che vengono classificati, ottenendo così la percentuale per ogni categoria di motilità. E' buona norma ripetere l'operazione su una seconda goccia di liquido seminale trattata nella stessa maniera. Il numero di spermatozoi di ciascuna categoria può essere contato con l'aiuto di un contacellule.

2.4.3 *Prima valutazione della concentrazione degli spermatozoi*

I metodi per la determinazione della concentrazione degli spermatozoi verranno discussi in seguito (Sezione 2.5.2), ma la concentrazione può anche essere approssimativamente stimata durante l'esame iniziale, allo scopo di stabilire la giusta diluizione per la conta e per evidenziare la necessità di una centrifugazione del campione per ottenere uno striscio adeguato per l'esame morfologico. Questa stima approssimativa si ottiene moltiplicando per 10^6 il numero medio degli spermatozoi ottenuto in diversi campi microscopici con un obiettivo a 40 ingrandimenti. Per esempio, 40 spermatozoi per campo possono essere considerati approssimativamente equivalenti a 40 milioni di spermatozoi/ml.

Se il numero degli spermatozoi per campo varia considerevolmente, ciò indica che il campione non è omogeneo. In questi casi il campione seminale dovrebbe ancora essere accuratamente mescolato. La mancanza di omogeneità può essere anche la conseguenza di una consistenza anormale, di una liquefazione incompleta, dell'aggregazione degli spermatozoi in filamenti mucosi o dell'agglutinazione degli spermatozoi. Queste osservazioni dovrebbero essere riportate nei risultati dell'esame.

2.4.4 *Elementi cellulari diversi dagli spermatozoi*

L'eiaculato normalmente contiene altre cellule oltre gli spermatozoi. Esse includono le cellule epiteliali a forma poligonale che provengono dall'uretra, le cellule spermatogenetiche e i leucociti, che nella prima

edizione del *Manuale* venivano indicate come cellule "tonde". La concentrazione approssimativa di queste cellule può essere stimata per ogni campo visivo nel preparato fresco contemporaneamente alla stima della concentrazione degli spermatozoi. In seguito, la concentrazione di tutte queste cellule può essere determinata con precisione usando un'adatta camera contaglobuli, per esempio quella di Burkner, quella di Neubauer o quella di Neubauer modificata.

Se la concentrazione di queste cellule supera le $10^6/\text{ml}$ o una per campo visivo usando un obiettivo a 40 ingrandimenti, allora è possibile distinguere i leucociti, perossidasi-positivi dalle altre cellule grazie ad una specifica colorazione. Questa colorazione si esegue sull'eiaculato fresco ed è basata sul fatto che i granulociti neutrofili polimorfonucleati intatti contengono perossidasi (vedi Appendice II; Nahoum e Cardozo, 1980). Le cellule perossidasi-negative includono i granulociti polimorfonucleati degranulati, i linfociti e le cellule germinali "immature". Queste ultime includono gli spermatidi, gli spermatociti e gli spermatogoni (vedi Tav. 2.2). Se la concentrazione delle cellule perossidasi-positive supera le $10^6/\text{ml}$, sono allora necessarie ulteriori indagini per stabilire se il paziente è affetto da infezione delle ghiandole accessorie. L'assenza di leucociti non esclude la possibilità di un'infezione delle ghiandole accessorie.

Se si considera poi importante quantificare ciascun tipo di cellula, si dovrebbe seguire il seguente metodo:

Dato che solo gli spermatozoi (cellule germinali morfologicamente mature e dotate di coda) vengono inclusi nella conta spermatica (vedi Sezione 2.5.2), la concentrazione degli altri tipi di cellule germinali e dei leucociti può essere calcolata in relazione alla concentrazione nota di spermatozoi.

Se N è il numero di un tipo cellulare che viene contato nello stesso numero di campi in cui si sono contati 100 spermatozoi e S è la concentrazione degli spermatozoi espressa come milioni/ml, allora la concentrazione di un certo tipo di cellula espresso in milioni/ml (C) può essere calcolata con la seguente formula, dato che il rapporto tra il numero di queste cellule e quello degli spermatozoi è considerato uguale nello striscio e nel liquido seminale:

$$C = \frac{N \times S}{100}$$

Per esempio, se il numero di cellule immature contate è di 10 per ogni 100 spermatozoi e la concentrazione degli spermatozoi è $120 \times 10^6/\text{ml}$, la concentrazione delle cellule immature è:

$$\frac{10 \times 120 \times 10^6}{100} = 12 \times 10^6/\text{ml} \text{ (12 milioni/ml)}$$

2.4.5 *Agglutinazione*

Questo termine indica il fenomeno per il quale gli spermatozoi mobili possono aderire l'un l'altro, testa a testa, tratto mediano contro tratto mediano, coda a coda oppure in maniera mista, per esempio coda contro tratto mediano. Le adesioni degli spermatozoi, mobili o immobili, a filamenti mucosi, ad altre cellule che non siano spermatozoi o a detriti cellulari *non* sono considerate agglutinazioni e non dovrebbero quindi essere riportate come tali.

La presenza di fenomeni di agglutinazione può essere indicativa dell'esistenza di cause immunologiche di infertilità, ma non è una evidenza che può da sola confermare tale possibilità. Il grado di agglutinazione può essere importante e si dovrebbe annotare anche la presenza di pochi gruppi formati da pochi spermatozoi agglutinati.

2.5 **Ulteriori esami microscopici**

2.5.1 *Vitalità degli spermatozoi*

Se la percentuale degli spermatozoi immobili supera il 60%, si può determinare la proporzione di spermatozoi vivi usando tecniche di colorazione sopra-vitale. Queste tecniche si basano sul fatto che la membrana plasmatica delle cellule morte permette il passaggio del colorante. Sono possibili due metodi: usando l'eosina da sola sulla preparazione fresca oppure usando una miscela di eosina e nigrosina su preparazioni essiccate. I dettagli dei protocolli di queste due tecniche sono riportati nell'Appendice III.

Si contano 100 spermatozoi con un normale microscopio o in contrasto di fase e si differenziano gli spermatozoi vivi (non colorati) da quelli morti (colorati). Queste tecniche di colorazione sopra-vitale permettono di differenziare gli spermatozoi immobili ma vivi da quelli che sono morti.

Queste tecniche forniscono anche un controllo sulla precisione della misura della motilità, perché la percentuale di cellule morte non dovrebbe superare la percentuale di cellule immobili. Per di più la presenza di un'alta proporzione di cellule vitali ma immobili può indicare la presenza di difetti nella struttura del flagello.

2.5.2 *Conta degli spermatozoi*

La concentrazione degli spermatozoi può essere determinata utilizzando una camera contaglobuli.

Per questa procedura si prepara una diluizione 1:20 per ciascun campione ben mescolato, diluendo 50 µl di liquido seminale liquefatto con 950 µl di diluente. Quest'ultimo viene preparato con 50 g di NaHCO₃, 10 ml di formalina al 35% (v/v) e acqua distillata per raggiungere il volume finale di 1000 ml (a discrezione si possono aggiungere 5 ml di soluzione acquosa satura di violetto di genziana). Se si usa la microscopia a contrasto di fase non è necessario l'uso del colorante.

Se l'esame preliminare del liquido seminale indica che la concentrazione degli spermatozoi è eccessivamente alta o bassa, allora la diluizione del campione dovrà variare di conseguenza.

Così per i campioni che contengono meno di 20×10^6 spermatozoi/ml si può usare una diluizione di 1:10; per campioni che contengono più di 100×10^6 spermatozoi/ml può essere usata una diluizione 1:50. Sebbene comunemente usata, la pipetta da diluizione per la conta dei globuli bianchi non è abbastanza accurata per questo tipo di diluizione e perciò si raccomanda a tale scopo l'uso di micropipette. I campioni dovrebbero essere diluiti in piccoli tubi di vetro ben puliti.

Il campione diluito dovrebbe essere mescolato accuratamente e una goccia dovrebbe essere trasferita in una camera contaglobuli e coperta con un vetrino coprioggetti. La camera contaglobuli viene lasciata immobile per 1-5 minuti, preferibilmente in una camera umida per ridurre al minimo l'essiccazione. In questo intervallo di tempo le cellule sedimentano e vengono poi contate con un normale microscopio o in contrasto di fase a 100 o 400 ingrandimenti. Vengono contati solo gli spermatozoi (cellule germinali morfologicamente mature dotate di coda).

La procedura per il conteggio degli spermatozoi in una camera contaglobuli è la seguente: il quadrato centrale della griglia di una camera contaglobuli di Neubauer modificata contiene 25 grandi quadrati, ciascuno composto da 16 quadrati più piccoli (Fig. 2.2); per campioni che contengono meno di 10 spermatozoi per quadrato si dovrebbe contare l'intera griglia, cioè 25 quadrati; per campioni che contengono da 10 a 40 spermatozoi per quadrato, possono essere contati 10 quadrati; e per campioni che contengono più di 40 spermatozoi per quadrato, dovrebbero essere analizzati 5 quadrati. Se uno spermatozoo giace sulla linea che divide due quadrati adiacenti, dovrebbe essere contato solo se si trova sul lato superiore o sinistro del quadrato da contare. Allo scopo di determinare la concentrazione di spermatozoi in milioni/ml nel campione originale, si deve moltiplicare il numero degli spermatozoi contati per il fattore di conversione appropriato indicato nella Tabella 2.1, per esempio se il campione è stato diluito

Fig. 2.2. La griglia centrale della camera di Neubauer modificata contiene 25 quadrati all'interno dei quali si devono contare gli spermatozoi (vedi testo e Tab. 2.1).

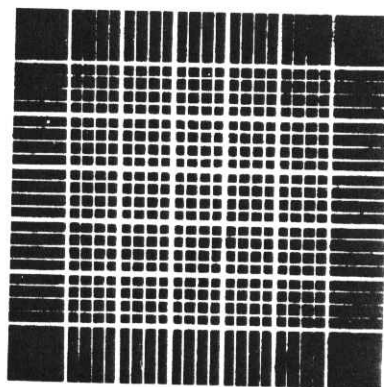


Tabella 2.1. *Fattori di conversione per la camera contaglobuli*

Fattore di diluizione (seme + diluente)	Numero di quadrati grandi contati		
	25	10	5
1 + 9	10	4	2
1 + 19	5	2	1
1 + 49	2	0,8	0,4

(da Mortimer, 1985)

1 + 9 e in 25 quadrati sono stati contati 2 spermatozoi, allora la concentrazione degli spermatozoi nel campione seminale originale è di $20 \times 10^6/\text{ml}$.

Per altre camere contaglobuli ci sono fattori di conversione diversi che dipendono dal volume dell'interno di ciascun quadrato.

Un metodo possibile per determinare la concentrazione degli spermatozoi è di impiegare camere specificatamente studiate per la conta degli spermatozoi (Makler, 1980). Queste camere sono convenienti perché possono essere usate senza diluizione del campione, ma possono mancare della precisione del metodo con la camera contaglobuli.

2.5.3 *Analisi delle caratteristiche morfologiche degli spermatozoi*

Preparazione degli strisci seminali

Per preparare uno striscio su vetrino, da usare poi per l'analisi della morfologia degli spermatozoi, è importante usare il liquido seminale fresco. Il vetrino dovrebbe essere pulito con un detergente, lavato in acqua e poi in alcool e asciugato prima dell'uso. Su un lato del vetrino si depone una goccia di 10-15 μl di liquido seminale. Lo spigolo di un altro vetrino viene posto in contatto con la goccia in modo che essa si distribuisca lungo lo spigolo. Il vetrino viene poi spostato, trascinando dietro la goccia per produrre uno striscio sulla scia del margine del vetrino.

Lo striscio viene poi asciugato all'aria e fissato in una miscela di etanolo (95%, v/v) e etere in parti uguali.

Le varie anomalie morfologiche possibili sono descritte nelle legende delle Tavole 2.1 e 2.2. I dati vengono poi riportati sull'apposito modulo di registrazione (Appendice VII).

2.5.4 *Metodo di colorazione*

La colorazione può essere fatta usando il metodo di Giemsa (Appendice IV), una delle colorazioni di Papanicolaou modificate per gli spermatozoi (Appendice V, A e B) o la colorazione di Bryan-Leishman (Appendice VI).

Il preparato colorato con il metodo semplificato di Papanicolaou (Appendice V.B) può essere comodamente esaminato con un microscopio a contrasto di fase con un obiettivo a 40 ingrandimenti. I par-

ticolari di tutte le parti dello spermatozoo sono molto chiari: l'acrosoma si colora in blu; il segmento nucleare della testa si colora in giallo mentre il citoplasma residuo intorno al tratto intermedio si colora in verde. Il profilo del flagello è chiaramente visibile e si possono così individuare sue irregolarità (vedi Tavola 2.1).

I vetrini possono essere osservati anche in luce bianca usando un obiettivo ad immersione a 100 ingrandimenti.

2.5.5 *Metodo per individuare la presenza di anticorpi adesi agli spermatozoi*

La presenza di anticorpi anti-spermatozoo adesi a questa cellula è tipica, ed è considerata specifica, dell'infertilità su base immunitaria (vedi Jones, 1986). Gli anticorpi anti-spermatozoo nel liquido seminale appartengono a due classi immunologiche: IgA e IgG. Ci sono alcuni dati che suggeriscono come le IgA possano avere maggiore importanza clinica delle IgG (Kremer e Jager, 1980). L'esame per la ricerca di questi anticorpi viene fatto su liquido seminale fresco con il MAR test (mixed antiglobulin reaction) o con un metodo che sfrutta fasi solide (test con immunobeads) (vedi Bronson *et al.*, 1984).

2.5.5.1 *MAR test*

Il MAR test per la ricerca delle IgG (vedi Appendice VIII) viene effettuato mescolando liquido seminale fresco e non trattato con particelle di lattice o eritrociti di pecora rivestiti con IgG umane. A questa miscela viene aggiunto un antisiero monospecifico contro le IgG umane. La formazione di agglutinati misti tra particelle e spermatozoi mobili prova la presenza di anticorpi della classe delle IgG sugli spermatozoi. La diagnosi di infertilità su base immunologica è probabile quando il 40% o più degli spermatozoi mobili sono adesi a particelle. Quando tale percentuale è compresa tra il 10 e il 40% si può avere il sospetto di una infertilità su base immunitaria. Ulteriori indagini (il test di contatto tra spermatozoi e muco cervicale (SCMC), la titolazione di anticorpi anti-spermatozoo nel siero) avvaloreranno e confermeranno, oppure escluderanno, tale diagnosi (vedi Capitolo 3).

2.5.5.2 *Test con immunobeads*

Anticorpi presenti sulla superficie degli spermatozoi possono essere individuati con il test che utilizza le immunobeads (vedi Appendice IX). Le immunobeads sono sfere di policrilamide a cui sono legate covalentemente immunoglobuline di coniglio anti-immunoglobuline umane. Con questo test si può evidenziare contemporaneamente la presenza delle IgG e delle IgA.

Gli spermatozoi, separati dal plasma seminale con ripetute centrifugazioni, vengono risospesi in tampone. La sospensione di spermatozoi viene mescolata con una sospensione di immunobeads. La reazione viene esaminata a 400 ingrandimenti con un microscopio a contrasto di fase. Dato che gli spermatozoi nuotano nella sospensione, quegli spermatozoi mobili che hanno anticorpi adesi sulla loro

membrana aderiscono alle immunobeads. Viene così determinata la percentuale di spermatozoi con anticorpi sulla loro superficie e, usando due diversi tipi di immunobeads, si può anche identificare la classe di tali anticorpi (IgG o IgA) (Appendice IX).

Se il test con le immunobeads risulta positivo, ulteriori indagini (SCMC test, titolazione degli anticorpi antispermatozoo nel siero) avvaloreranno e confermeranno, oppure escluderanno, tale diagnosi (vedi Capitolo 3).

2.B TEST FACOLTATIVI

Come ricordato nel Capitolo 1, i test descritti in questa sezione del *Manuale* sono quelli considerati di interesse specialistico e la loro importanza non è ancora completamente chiarita. Per questo motivo non sono normalmente raccomandati per l'esame seminale di routine.

2.6 Coltura del liquido seminale

I campioni di liquido seminale da porre in coltura dovrebbero essere raccolti seguendo specifiche precauzioni per evitare contaminazioni. Prima di raccogliere il campione il paziente dovrebbe urinare. Immediatamente dopo dovrebbe lavarsi le mani e il pene con sapone. Dovrebbe poi sciacquare via il sapone e asciugarsi con un asciugamano pulito. I contenitori per la raccolta seminale devono essere sterili. Per un esame completo il campione dovrebbe essere inviato ad un laboratorio di microbiologia.

L'esame colturale del liquido seminale può contribuire alla diagnosi di un'infezione delle ghiandole accessorie maschili, in particolar modo della prostata (Mobley, 1975). L'esame colturale del liquido seminale dovrebbe essere fatto quando il soggetto mostra segni o sintomi di infezione delle ghiandole accessorie o il campione seminale contenga una concentrazione di leucociti superiore a 1×10^6 (vedi Sezione 2.4.4). I risultati dovrebbero comunque essere interpretati con cautela e si devono eseguire ulteriori indagini per confermare la diagnosi. Queste indagini comprendono l'esame della prima porzione delle urine, della seconda porzione, dello specifico fluido prostatico (Meares e Stamey, 1972) e delle urine dopo il massaggio prostatico. Anche l'analisi biochimica del plasma seminale è inclusa in tali indagini (Sezione 2.7; Comhaire *et al.*, 1980).

La coltura dei soli batteri aerobi può essere condotta diluendo o no il campione seminale su un vetrino di plastica coperto con il medium di coltura o in agar sangue (Appendice X).

2.7 Analisi biochimiche

2.7.1 Il plasma seminale

Ci sono vari indici biochimici della funzione delle ghiandole accessorie, per esempio l'acido citrico, lo zinco, la γ -glutamil transpeptidasi e

la fosfatasi acida per la prostata; il fruttosio e le prostaglandine per le vescichette seminali; la L-carnitina e l' α -glucosidasi per l'epididimo (Menchini-Fabris *et al.*, 1984). Una funzione secretoria ridotta si riflette in una diminuita produzione degli specifici indici, che possono perciò essere usati per determinare la funzione secretoria della ghiandola accessoria maschile. Un'infezione può talora causare una considerevole diminuzione della funzione secretoria ma, nonostante ciò, la quantità totale di uno o più indici biochimici seminali può ancora trovarsi entro l'ampio range di normalità. Un'infezione può anche causare un danno irreversibile dell'epitelio secretivo tale che, anche dopo il trattamento, la capacità secretoria rimarrà bassa.

2.7.1.1 *Capacità secretoria della prostata*

Il contenuto seminale di zinco e acido citrico fornisce una valida misura della secrezione prostatica. C'è una buona correlazione tra zinco, acido citrico e fosfatasi acida ma, per semplicità, solo i primi due test sono stati riportati in questo *Manuale* (vedi Appendici XI e XII).

2.7.1.2 *Capacità secretoria delle vescichette seminali*

Come noto, il fruttosio rispecchia bene la funzione secretoria delle vescichette seminali ed un metodo per la sua misura è riportato nell'Appendice XIII. Il suo dosaggio è particolarmente importante nei casi di azoospermia, poiché bassi livelli di fruttosio possono indicare disgenesia congenita delle vescichette seminali e dei vasi deferenti.

2.7.1.3 *Capacità secretoria dell'epididimo*

La L-carnitina libera sembra riflettere la funzione secretoria dell'epididimo, sebbene non ci sia su questo punto un accordo generale. L'idrolisi di altri composti contenenti carnitina durante la procedura di separazione può spiegare i diversi risultati (per i dettagli vedi Menchini-Fabris *et al.*, 1984).

2.7.2 *Gli spermatozoi*

Esiste un gran numero di indagini biochimiche che riguardano gli spermatozoi ma la loro importanza deve essere confermata. Queste indagini includono lo specifico isoenzima della lattico deidrogenasi (Virji e Eliasson, 1985), l'acrosina (Mohsenian *et al.*, 1982; Ficsor *et al.*, 1983), la compattazione del DNA (Kvist, 1982; Johannisson *et al.*, 1982) e l'ATP (Comhaire *et al.*, 1983; Irvine e Aitken, 1985; vedi Appendice XIV).

2.8 *Il test di penetrazione in uovo di hamster*

Nel 1986 una riunione dell'OMS tenutasi proprio per esaminare il valore di questo test concluse che, se ben controllato e se associato ad altre misure appropriate, per esempio la motilità degli spermatozoi, questo test potrebbe fornire una base importante per la predizione della funzionalità spermatozoaria. Sebbene il metodo sia ancora sperimentale, viene riportato nell'Appendice XV il protocollo standardizzato che emerse da quella riunione.

2.9 Il test di migrazione degli spermatozoi: l'isolamento di spermatozoi mobili dal liquido seminale

Esistono molte semplici tecniche per isolare gli spermatozoi mobili da una popolazione di spermatozoi con varia motilità. Questi metodi sono utili nella preparazione dei campioni per AIH, IVF e altre procedure simili, sebbene siano necessari ulteriori studi sulla relazione esistente tra capacità migratoria degli spermatozoi e il loro potenziale fertilizzante. I metodi sono basati sulla capacità degli spermatozoi mobili di nuotare attraverso fluidi confinanti in vari media (vedi Comhaire *et al.*, 1982; Wolf e Sokolosky, 1982).

2.10 Le cellule germinali immature

I diversi tipi di cellule germinali immature che sono presenti nel liquido seminale (vedi Tavola 2.2) sono normalmente indicative di disordini della spermatogenesi. La loro identificazione può essere aiutata dall'uso della colorazione di Bryan-Leishman (vedi Appendice Vi). Le cellule germinali possono essere usate per studiare i cromosomi meiotici e possono fornire materiale per la diagnosi di disordini cromosomici (Egozcue *et al.*, 1983).