# 4

# *Tecniche di preparazione del liquido seminale*

Un gran numero di tecniche terapeutiche e diagnostiche della andrologia clinica sono basate sulla separazione degli spermatozoi umani dal plasma seminale. Il metodo tradizionale di preparazione del liquido seminale comportava un semplice lavaggio nel quale il liquido seminale veniva diluito con un opportuno terreno di coltura (come il medium di Earle arricchito di siero al 10%) e sottoposto a tre cicli di centrifugazione (500 *g* per 5 minuti) e risospeso.

Per quanto questa tecnica separasse adeguatamente gli spermatozoi dal plasma seminale, venne dimostrato che le ripetute centrifugazioni (e il conseguente ammassamento) di popolazioni cellulari non selezionate, come leucociti e spermatozoi anomali, intaccavano la capacità fecondante degli spermatozoi normali dell'eiaculato (Aitken & Clarkson, 1988). Comunque la funzionalità spermatozoaria potrebbe essere conservata, se venissero selezionati prima della centrifugazione gli spermatozoi normali, mobili.

La selezione degli spermatozoi funzionali è basata sulla loro elevata motilità e maggiore densità. Le tecniche di preparazione del liquido seminale basate sulla motilità degli spermatozoi includono la metodica dello "swim up" (Lopata *et al.,* 1976; Harris *et al.*,1981; Makler *et al.,* 1984), dove gli spermatozoi più mobili vengono fatti migrare al di fuori del plasma seminale in uno strato di mezzo di coltura sovrastante al plasma, essendo stati prima centrifugati e lavati una sola volta (Aitken & Clarkson, 1988; Appendice XXIV). Una variante di questa metodica è lo "swim down", dove il liquido seminale viene stratificato sulla sommità di una colonna di mezzo di coltura, la cui viscosità è stata aumentata dalla aggiunta di albumina (Urry *et al.*,1983; Aitken & Clarkson, 1988).

La separazione degli spermatozoi funzionali in base alla loro maggiore densità (Berger *et al.,* 1985; Lessley & Garner, 1983) viene ottenuta più rapidamente utilizzando un semplice Percoll a due gradienti (Appendice XXIV), anche se sono stati descritti mezzi di coltura alternativi come il Nycodenz (Gellert-Mortimer *et al.,* 1988; Serafini *et al.,* 1990).

# 5

# *Controllo di qualità dell'esame del liquido seminale*

## 5.1 Introduzione

I test di laboratorio non sono mai completamente privi di errore per la loro stessa natura. Un prerequisito per la corretta valutazione dei risultati dei test nelle procedure diagnostiche è conoscere la causa e i valori di tali errori. Allo scopo di determinare il valore di questi errori, in molti test di laboratorio sono stati introdotti e sono diventati di routine i controlli di qualità. Fino a tempi recenti, nei laboratori di andrologia non si era giunti alle condizioni indispensabili per un controllo di qualità per la difficoltà di analizzare gameti vivi, per l'impossibilità di utilizzo di preparati standard, e per la mancanza di metodiche precise di riferimento per la determinazione delle caratteristiche del liquido seminale.

Mentre venivano lentamente introdotte metodiche di riferimento, come ad esempio la citometria a flusso per la valutazione del numero di spermatozoi, l'utilizzo in tutto il mondo in questi ultimi dieci anni del manuale OMS ha portato ad un notevole incremento della standardizzazione delle tecniche per l'analisi del liquido seminale. Questo ha consentito di porre le basi per un controllo di qualità. Vari laboratori hanno iniziato ad introdurre il controllo interno di qualità come suggerito da alcuni autori (Mortimer *et al.*, 1986; Dunphy *et al.*, 1989; Knuth *et al.*, 1989) e sono state eseguite le prime prove di controlli esterni di qualità (Neuwinger *et al.*, 1990). I vari sistemi di controllo di qualità richiedono studi ulteriori prima che si possa stabilire una regola generale valida, ma anche a questo stadio tutti i laboratori dovrebbero iniziare ad utilizzare i vari sistemi di controllo di qualità.

## 5.2 Controllo di qualità interno

Per garantire il controllo di qualità interno della concentrazione di spermatozoi, andranno conservati ed analizzati, ad intervalli settimanali, i pool dei liquidi seminali. Per la morfologia, si possono preparare diapositive da far rivedere periodicamente allo stesso esaminatore o a esaminatori diversi. Per valutare la precisione della stima della motilità degli spermatozoi, vari esaminatori possono analizzare indipendentemente lo stesso campione a fresco o si possono congelare e periodicamente analizzare aliquote di (pool) di liquidi seminali. Nel caso non vi sia la disponibiltà di congelare il liquido seminale, si possono utilizzare in alternativa video cassette.

## 5.3 Metodologia

Al momento attuale la precisione delle tecniche utilizzate dovrà essere determinata, ad intervalli regolari, valutando la variabilità intra- ed inter esaminatore. Questi controlli non dovranno valutare tanto il grado di concordanza tra le varie osservazioni o tra i vari osservatori ma piuttosto le cause di discrepanza tra le valutazioni ed intra- ed inter esaminatore. Mentre il coefficiente di variazione riporta una sommatoria della variabilità intra- ed inter-esaminatore, si possono ottenere maggiori informazioni esaminando (possibilmente graficamente) le differenze tra le valutazioni individuali. Tale metodica è descritta da Bland & Altman,1986.

# *Appendice IA*

## *Valori normali delle variabili del liquido seminale*

E' preferibile, come per qualsiasi test di laboratorio, che ogni laboratorio stabilisca i propri range di normalità per ciascuna variabile. Per ottenere i valori di normalità del liquido seminale andranno valutati i campioni di uomini che abbiano da poco ottenuto una gravidanza, meglio se entro 12 mesi dall' interruzione dei metodi anticoncezionali.

Talvolta può essere difficile reclutare un numero adatto (da 50 a 100) di uomini con tali caratteristiche, e quindi i laboratorii si possono basare su studi più ampi pubblicati da altri laboratori. Comunque, molti di questi studi, pur valutando un gran numero di uomini, spesso non tengono in considerazione il tempo intercorso per raggiungere la gravidanza.

Fino ad oggi non sono state trovate significative differenze che indichino che fattori razziali possano influenzare i limiti inferiori di normalità.

Comunemente, per campioni di liquido seminale analizzati secondo le metodiche descritte in questo manuale, si utilizzano i seguenti valori di normalità.

(vedi p. 41)

| | |
|---|---|
| **Test standard** | |
| Volume | 2,0 ml o più |
| pH | 7,2-8,0 |
| Concentrazione degli spermatozoi . | 20 x $10^6$ spermatozoi/ml o più |
| Numero totale di spermatozoi | 40 x $10^6$ spermatozoi per eiaculato o più 50% o più con motilità |
| Motilità | rettilinea progressiva (categorie "a" e "b") o 25% o più con motilità rapidamente progressiva (categoria "a") entro 60 minuti dalla raccolta |
| Morfologia | 30% o più forme con morfologia normale[a] |
| Vitalità | 75% o più di spermatozoi vivi, per es., escludendo quelli colorati |
| Leucociti | Meno di 1 x $10^6$ /ml |
| Test con immunobeads | Meno del 20% di spermatozoi con particelle adese |
| MAR test | Meno del 10% di spermatozoi con particelle adese |
| **Test facoltativi** | |
| α-glicosidasi (neutra) | 20 mU o più per eiaculato (vedi Appendice XVII per la definizione di U) |
| Zinco (totale) | 2,4 μmol o più per eiaculato |
| Acido citrico (totale) | 52 μmol o più per eiaculato |
| Fosfatasi acida (totale) | 200 U o più per eiaculato (vedi Appendice XV per la definizione di U ) |
| Fruttosio (totale) | 13 μmol o più per eiaculato |

[a] Per quanto non sia stato concluso nessuno studio clinico, l'esperienza clinica di molti centri suggerisce che il numero minimo di spermatozoi morfologicamente normali andrebbe spostato a valori inferiori quando si applicano gli "strict criteria". Si suggerisce come valore di riferimento empirico il 30% o più di forme morfologicamente normali.

# *Appendice II*

## *Linee guida per la sicurezza del laboratorio di andrologia*[a]

(1) Tutto il personale che lavora nel laboratorio di andrologia dovrà essere vaccinato per l'epatite B, come richiesto per il personale medico in generale.

(2) Il personale di laboratorio deve manipolare ciascun campione di liquido seminale come se fosse contaminato da malattie a trasmissione sessuale o da altri microorganismi infettanti.

(3) Si deve stare estremamente attenti ad evitare ferite accidentali da strumenti taglienti contaminati dal liquido seminale e ad evitare il contatto del liquido seminale con lesioni cutanee aperte.

(4) Devono essere indossati guanti monouso in plastica o in gomma quando si maneggia plasma seminale fresco o congelato e qualsiasi contenitore che sia venuto a contatto con plasma o liquido seminale. I guanti vanno rimossi e gettati quando si lascia il laboratorio o si maneggia il telefono, ecc. I guanti non devono mai essere riutilizzati.

(5) Nel laboratorio di andrologia deve essere indossato un camice da laboratorio o indumenti usa e getta. Il camice o tali indumenti andranno tolti quando si lascia il laboratorio. Né l'uno né l'altro deve mai essere indossato in sale comuni o nei bar.

(6) Nel laboratorio di andrologia vanno indossati occhiali di sicurezza in ogni momento della manipolazione di fiale di liquido seminale congelato (le fiale possono esplodere durante lo scongelamento).

(7) Bisogna lavarsi le mani dopo essersi levati gli indumenti e i guanti. Se le mani vengono a contatto con il liquido seminale vanno immediatamente lavate con estrema cura. Ogni volta che ci si lava le mani si dovrà utilizzare acqua calda e sapone disinfettante.

(8) Se il lato esterno del contenitore del liquido seminale è contaminato, deve essere lavato con una soluzione disinfettante (per es. 5,25 g/l di ipoclorito di sodio, con diluizione 1:10).

(9) Andrà utilizzato materiale di laboratorio mono uso ogni volta che sia possibile.

(10) Tutti i materiali monouso andranno raccolti in uno speciale contenitore e trattati adeguatamente come per gli altri materiali infetti.

[a] Adattato da: Schrader, S.M. (1989) Linee guida per la sicurezza del laboratorio di andrologia. *Fertility and Sterility*. **51**: 387-9.

(11) Tutti gli equipaggiamenti di laboratorio che possono essere stati contaminati dal plasma o dal liquido seminale devono essere disinfettati o sterilizzati dopo che è avvenuto il contatto o dopo la fine dell'attività di laboratorio.

(12) In laboratorio, per la manipolazione dei liquidi, devono essere utilizzate pipette meccaniche.

(13) Non deve mai essere permesso il pipettaggio a bocca.

(14) Tutte le metodiche e le manipolazioni del liquido seminale devono essere eseguite in modo da ridurre la formazione di gocce od aerosol. Bisogna indossare mascherine chirurgiche quando si eseguono procedure che hanno alto rischio di formazione di aerosol o di gocce. Tali procedure comprendono la centrifugazione o la miscelazione meccanica (con il vortex) di contenitori aperti. Le centrifughe dovranno essere coperte o essere poste in cappe di aspirazione durante la centrifugazione dei fluidi biologici.

(15) Un equipaggiamento, ben fornito, per il pronto soccorso dovrà essere sempre presente nel laboratorio.

(16) Le superfici di lavoro del laboratorio, che devono essere impermeabili, devono essere decontaminate con un disinfettante (per es. 5,25 g/l di ipoclorito di sodio o candeggina domestica) immediatamente dopo che è avvenuta qualsiasi contaminazione ed anche ogni giorno dopo aver finito gli esami.

(17) Nel laboratorio deve essere proibito mangiare, bere, fumare, truccarsi, conservare cibo, ecc.

Per ulteriori dettagli il lettore è rimandato alle due pubblicazioni della WHO: *Laboratory Biosafety Manual,* Ginevra, World Health Organization, 1983; e *Guidelines on the Sterilization and Disinfection Methods Effective Against Human Immunodeficiency Virus (HIV)* seconda ed., Ginevra, World Health Organization, 1989 (AIDS Series n. 2) p. 10.
[L'edizione italiana della *AIDS Series* è pubblicata dall'Istituto Superiore di Sanità].

# *Appendice III*

## *Metodiche per la ricerca dei leucociti*

La metodica tradizionale per la conta dei leucociti nel liquido seminale umano è basata sull'uso di procedure istochimiche per identificare l'enzima perossidasi che caratterizza i granulociti polimorfonucleati (III.I). Questa tecnica ha il vantaggio di essere relativamente facile da eseguire, ma non rileva i polimorfi attivati che hanno rilasciato i loro granuli, né altre specie di leucociti, come i linfociti, che non contengono perossidasi. Tali cellule possono essere rilevate da metodiche immunocitochimiche (III.2).

### III.1 Colorazione della perossidasi con orto-toluidina[a]

*III.1.1 Reagenti*

(1) Soluzione satura di $NH_4Cl$ (250 g/l).
(2) $Na_2$ EDTA; 5% (50 ml/1) in tampone fosfato (pH 6,0).
(3) Orto-toluidina, 0,025% (0,25 ml/l)[b].
(4) $H_2O_2$, 30% (300 ml/l) in acqua distillata.

La soluzione operativa è costituita da: 1 ml del reagente (1); 1 ml del reagente (2); 9 ml del reagente (3); ed una goccia del reagente (4).

Questa soluzione deve essere utilizzata entro 24 ore dalla preparazione.

*III.1.2 Procedimento*

(i) Mescolare 0,1 ml di liquido seminale con la soluzione operativa fino a raggiungere il volume di 1 ml.
(ii) Agitare per 2 minuti.
(iii) Lasciare per 20-30 minuti a temperatura ambiente.
(iv) Agitare di nuovo.

[a] Da Nahoum, C.R.D. & Cardozo, D (1980) Colorazione per la conta volumetrica dei leucociti nel liquido seminale e nel liquido prostatico. *Fertility and Sterility.* **34**: 68-9.

[b] The International Agency for Research on Cancer (IARC) ha dichiarato che l'orto-toluidina "dovrebbe essere considerata, per scopi pratici, come se presentasse un rischio carcinogenetico per l'uomo" (*IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* (1982), vol. 27, suppl. 4, pp. 169-70).

(v) Le cellule perossidasi-positive si colorano in marrone, mentre le cellule perossidasi-negative non si colorano.

(vi) Le cellule perossidasi positive e negative possono essere contate in una camera conta globuli per leucociti, o si può fare una stima della loro percentuale in preparati a fresco.

## III.2 Metodi di colorazione immunocitochimici

Tutte le classi di leucociti umani esprimono un antigene specifico (CD 45) che può essere indagato con uno specifico anticorpo monoclonale (Mab; vedi Fig. 2.2). Questa metodica generale, cambiando il tipo di anticorpo, può essere adattata per la ricerca dei diversi tipi di leucociti come macrofagi, neutrofili, linfociti T o B.

### *III.2.1 Reagenti*

(1) Tampone fosfato salino di Dulbecco (PBS). Costituenti della soluzione PBS:

| | |
|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,132 g |
| KCl | 0,2 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,2 g |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,1 g |
| NaCl | 8,0 g |
| $Na_2HPO_4$ | 1,15 g |
| Aggiungere acqua fino ad un litro | |

(2) Soluzione salina tamponata Tris (TBS: si prepara una soluzione madre 10 x e si diluisce 1:10 immediatamente prima dell'uso).

Costituenti della soluzione TBS 10 x

| | |
|---|---|
| Base Trizma | 60,55 g |
| NaCl | 85,2 g |
| Aggiungere acqua, correggere il pH a 8,6 con HCL 1M (mol/1) | |
| Portare ad 1 litro aggiungendo acqua | |

(3) Il substrato per la fosfatasi alcalina è preparato come descritto in seguito.

Costituenti del substrato per la fosfatasi alcalina:

| | |
|---|---|
| Naftolo fosfato AS-MX | 2 mg |
| Dimetilformammide | 0,2 ml |
| 0,1M tampone Tris (0,1 mol/l), pH 8,2[a] | 9,7 ml |
| Levamisolo 1M (1 mol/l) | 0,1 ml |
| Sale Fast Red TR, aggiunto immediatamente prima dell'uso | 10 mg |

[a] 1,21 g di base Trizma disciolti in acqua, pH portato a 8,2 con HCl 1M, portare a 100 ml con l'aggiunta di acqua.

(4) Anticorpo primario. Un anticorpo monoclonale, ampiamente disponibile sul mercato, diretto contro l'antigene, chiamato CD45, comune a tutti i leucociti.

(5) Anticorpo secondario. Immunoglobuline anti-topo ottenute dal coniglio; la diluizione utilizzata dipenderà dal titolo e dalla ditta di origine dell'anticorpo (per es. diluizione 1 : 25 per l'anticorpo Z259 prodotto dalla DAKO).

(6) Fosfatasi alcalina: complesso anti-fosfatasi alcalina (APAAP). Nuovamente la diluizione dipenderà dal titolo e dalla ditta di origine dell'anticorpo (ad es. diluizione 1 : 50 per il complesso D6 51 prodotto dalla DAKO).

*III.2.2 Preparazione delle cellule*

*Procedura*

(i) Si deve prima mescolare un'aliquota di liquido seminale già fluidificato (circa 0,5 ml) con cinque volumi di tampone fosfato salino (PBS) e poi centrifugare il tutto a 500 *g* per 5 minuti a temperatura ambiente.

Questo procedimento va ripetuto 2 volte e il corpo di fondo va risospeso in PBS fino a ripristinare il volume iniziale del campione di liquido seminale. Questa sospensione va poi diluita da due a cinque volte il suo volume con PBS in base alla concentrazione di spermatozoi.

Due aliquote da 5 µl di queste cellule vanno poi fatte asciugare all'aria su vetrini, fissate e colorate immediatamente o avvolte in un foglio di alluminio e conservate a -70 °C per analisi successive.

(ii) Le cellule essiccate all'aria vanno fissate in acetone assoluto per 10 minuti o in una miscela di acetone, metanolo e 400 g/l di formaldeide (in proporzioni volumetriche di 95 : 95 : 10) per 90 secondi, lavate 2 volte con tampone salino Tris (TBS; vedi III.2.1) e lasciate asciugare.

(iii) Ciascuna aliquota di cellule fissate va cimentata con 10 µl dell'anticorpo primario e va incubata per 30 minuti a temperatura ambiente in atmosfera umidificata.

I vetrini vanno poi ulteriormente lavati due volte con TBS e fatti asciugare.

(iv) Le cellule vanno poi cimentate con 10 µl dell'anticorpo secondario, incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in atmosfera umidificata, lavate due volte con TBS e fatte asciugare.

(v) A ciascun campione vanno aggiunti 10 µl di fosfatasi alcalina: il complesso anti- fosfatasi alcalina (APAAP), e il campione va incubato per 1 ora a temperatura ambiente in atmosfera umidificata dopo averlo lavato due volte in TBS.

(vi) Allo scopo di intensificare la reazione prodotta, si può ripetere la colorazione con l'anticorpo secondario e la APAAP, con una incubazione per ciascun reagente di 15 minuti.

(vii) Le cellule vanno lavate per due volte con TBS, fatte sgocciolare, incubate con 10 µl di fosfatasi alcalina per 18 minuti.

(viii) Dopo che si è sviluppata la reazione di colorazione alla fosfatasi alcalina, i vetrini vanno lavati con TBS ed infine contrastati per pochi secondi con ematossilina prima di essere lavati in acqua corrente e fissati nel medium di fissaggio acquoso di Apathy.

# *Appendice IV*

## *Tecniche di colorazione sopra-vitale*[a]

**IV.1 Eosina**

*IV.1.1 Reagenti*

Eosina Y; preparare una soluzione allo 0,5% (5 g/l) di eosina Y (C.I.45380) in soluzione fisiologica allo 0,9% di NaCl (9 g/l).

In alternativa, il colorante standard può essere ottenuto da numerose ditte nei rispettivi paesi.

*IV.1.2 Procedura*

(i) Mescolare una goccia (10-15 µl) di liquido seminale fresco con una goccia di soluzione di eosina allo 0,5% su un vetrino e coprire con un coprioggetti.

(ii) Dopo uno o due minuti, osservare la preparazione a 400 ingrandimenti a contrasto di fase.

(iii) Contare gli spermatozoi non colorati (vivi) e colorati (morti) come descritto nel testo.

**IV.2 Eosina-nigrosina** (una modifica della tecnica di Blom)

*IV.2.1 Reagenti*

(1) Eosina Y (C.I. 45380, 10 g/l, in acqua distillata all'1%)

(2) Nigrosina (C.I. 50420, 100 g/l, in acqua distillata al 10%)

*IV.2.2 Procedura*

(i) Mescolare una goccia di liquido seminale con due gocce di eosina Y all'1% (10 g/l).

(ii) Dopo 30 secondi aggiungere 3 gocce di Nigrosina al 10% (100 g/l) e mescolare.

(iii) Porre una goccia della miscela liquido seminale-eosina-nigrosina su un vetrino da microscopio e preparare uno striscio. Farlo seccare all'aria. (Lo striscio non deve essere troppo spesso).

[a] Eliasson, R. (1977) Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and Sterility.* **28**: 1257; Eliasson, R. (1981) Analysis of semen. In: *The Testis.* ed H. Burger & D. de Kretser. New York, Raven Press, pp 381-99.

# *Appendice V*

## *Differenziazione morfologica degli spermatozoi: preparazione a fresco*

Per eseguire una valutazione numerica della morfologia spermatozoaria su preparato a fresco, è necessario porre il liquido seminale su vetrino. Un metodo comune di effettuare questo è quello di strisciare il liquido seminale su un vetrino, lasciarlo seccare all'aria, e infine fissarlo con etanolo (vedi Appendice VII.1). Questa procedura può determinare una morfologia artefatta dovuta a danneggiamento osmotico delle cellule alla estrazione di componenti da parte dell'etanolo. Un approccio usato frequentemente per minimizzare gli artefatti è quello di mettere le cellule in sospensione iso-osmotica (o fissare lievemente le cellule con un fissativo aldeico) e apporle su un vetrino pretrattato con poly-l-lysina lasciandole precipitare in soluzione senza seccare, cioè, costituendo così una preparazione fresca.

Un tipico protocollo[a] potrebbe essere il seguente.

### V.1 Reagenti

(1) Tampone salino fosfato (PBS).
Il PBS comprende 0,8 g di $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 3,8 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ e 16 g di NaCl diluito in 2000 ml di acqua distillata.

(2) Vetrini trattati con poly-l-lysina
Tali vetrini sono costituiti da una soluzione di poly-l-lysina[b] in PBS ponendo 10-20 µl della soluzione al centro di un piccolo cerchio inciso con la punta di un diamante sul vetrino. I vetrini sono seccati e possono essere posti in frigorifero per circa una settimana.

[a] Modificato da: Suarez, S.S., Wolf, D.P. & Meizel, S. (1986). Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of follicular fluid. *Gamete Research*. **124**: 107-21.

[b] La poly-l-lysina può essere acquistata sia come polvere liofilizzata (peso molecolare specifico da 70 000 a 150 000) che come soluzione a 10 mg/l che può essere diluita a 0,1 mg/l. Può essere utilizzata anche una soluzione di poly-l-lysina più concentrata (0,5 mg/l), come descritto in: Suarez *et al.*, 1986. La concentrazione che agisca meglio dipenderà in parte dalla particolare partita di poly-l-lysina utilizzata e dovrà essere determinata empiricamente.

**V.2 Procedura**

(i) Diluire il liquido seminale a 1 x $10^6$ cellule/ml in liquido diluente per liquido seminale (vedi sezione 2.5.2) o in tampone fosfato salino (PBS).

(ii) Porre un vetrino trattato con poly-l-lysina in una camera umida (ad esempio una scatola per vetrini con fazzoletti bagnati). Mettere ~ 10 µl di liquido seminale diluito nel piccolo cerchio inciso sul vetrino e coprire la camera.

(iii) Lasciare il liquido seminale a decantare nella soluzione e a fissarsi al vetrino. Il tempo necessario dovrebbe essere determinato empiricamente la prima volta che venga utilizzata questa procedura, ma, con un volume ridotto come quello di 10 µl, 10 minuti dovrebbero essere sufficienti.

(iv) Dopo che gli spermatozoi si siano fissati può essere apposto direttamente un coprivetrino. Il preparato può essere visto con un microscopo a contrasto di fase. In queste condizioni gli spermatozoi non saranno stati sottoposti a shock osmotico e la morfologia dovrebbe essere libera da artefatti dovuti alla preparazione.