

2

Raccolta ed esame del liquido seminale umano

Il liquido seminale normale è una sospensione di spermatozoi nella secrezione di testicoli e degli epididimi a cui si aggiunge al momento della eiaculazione la secrezione di prostata, vescichette seminali e ghiandole bulbo uretrali. Il prodotto finale è un fluido viscoso che include l'eiaculato. La raccolta e l'analisi del liquido seminale deve essere intrapresa secondo metodiche standardizzate se i risultati devono fornire valide informazioni sulla fertilità dell'individuo. Questo capitolo e le sue appendici associate (III - XX) propongono le metodiche atte a realizzare questo scopo. Queste metodiche sono divise in procedure standard, optionali e di ricerca.

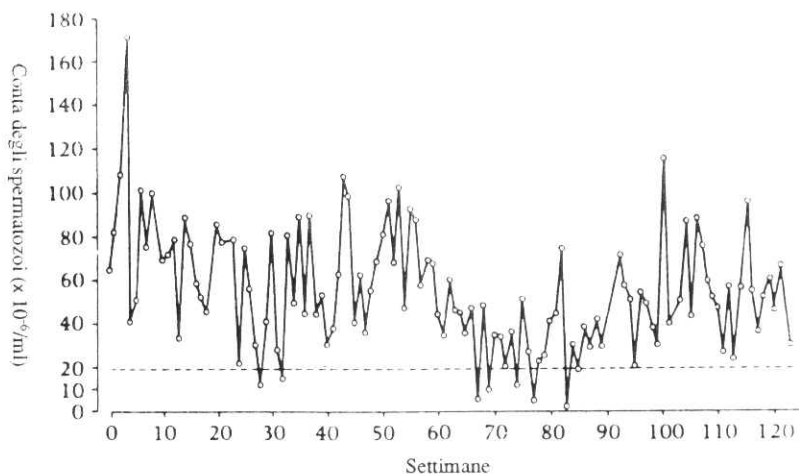
2A PROCEDURE STANDARD

2.1 Raccolta e consegna del campione

Al paziente dovrebbero essere fornite istruzioni chiare, a voce o scritte, per quanto riguarda la raccolta e, se necessario, il 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 ogni campione (vedi Appendice X) dovranno essere registrati il nome del paziente, il periodo di astinenza, la data e l'ora della raccolta e l'intervallo tra la raccolta e l'esame.
- (b) Per una prima valutazione del paziente si dovranno esaminare due campioni. L'intervallo tra le due raccolte dipenderà dal singolo caso ma non dovrà essere inferiore a 7 giorni o superiore a 3 mesi. Se i risultati di questi accertamenti dovessero essere marcatamente diversi, dovranno essere esaminati ulteriori campioni poiché nello stesso individuo si possono verificare sensibili variazioni nel numero di spermatozoi emessi al momento della eiaculazione (Fig. 2.1).
- (c) Preferibilmente, il campione dovrebbe essere raccolto in una apposita stanza nei pressi del laboratorio. Altrimenti, dovrebbe essere consegnato entro un'ora dalla raccolta. Se la motilità degli spermatozoi è molto bassa (meno del 25% di spermatozoi con motilità progressiva rapida, vedi Sezione 2.4.2), si dovrà esaminare un ulteriore campione,

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).



il prima possibile dopo la raccolta. Se si devono eseguire test per la funzione degli spermatozoi, è di fondamentale importanza che gli spermatozoi vengano separati dal plasma seminale entro un'ora dall'eiaculazione (vedi Appendice XIX).

- (d) Il campione dovrà essere ottenuto per masturbazione e raccolto in un contenitore pulito di vetro o di plastica dall'apertura sufficientemente larga. Se si usa un contenitore di plastica, si dovrà controllare che il materiale non sia tossico per gli spermatozoi. Il contenitore dovrebbe essere riscaldato per minimizzare il rischio di shock termico (vedi (g)). Se sul campione si dovrà eseguire una indagine microbiologica, il paziente dovrà prima urinare e quindi lavare ed asciugare le mani ed il pene prima che il campione venga raccolto in un contenitore sterile (vedi Sezione 2.6).
- (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 speciali profilattici in silastic per la raccolta del liquido seminale (vedi Zavos, 1985).

Il coitus interruptus non è accettabile come mezzo di raccolta perché è possibile che venga persa la prima parte dell'eiaculato, che contiene la più alta concentrazione di spermatozoi. Inoltre questo metodo favorisce la contaminazione cellulare e batteriologica del campione ed il pH acido del fluido vaginale influenzerà negativamente la motilità degli spermatozoi.

- (f) Campioni incompleti non dovrebbero essere analizzati.
- (g) Il campione dovrebbe essere protetto dalle alte e basse temperature (non meno di 20 gradi e non più di 40 gradi centigradi) durante il trasporto al laboratorio.
- (h) Il contenitore dovrebbe essere etichettato con il nome del soggetto, la data e l'ora della raccolta.

2.2 Manipolazione del campione

Il personale di laboratorio andrà informato che i campioni di liquido seminale possono contenere virus pericolosi (ad es. l'HIV, il virus dell'epatite, gli herpes virus) e che perciò andranno maneggiati con la dovuta cura. Le linee guida per la sicurezza elencate nella Appendice II, andranno rigorosamente osservate.

Buone pratiche di laboratorio sono fondamentali per la sicurezza del laboratorio e non possono essere sostituite da attrezzature speciali (WHO, 1983).

2.3 Esame macroscopico iniziale

2.3.1 *Liquefazione*

Un campione normale si liquefa entro 60 minuti a temperatura ambiente. In alcuni casi la liquefazione completa non avviene entro 60 minuti e questo fatto deve essere registrato. La presenza di strie di muco, un segno di liquefazione incompleta, può interferire con il conteggio delle cellule. Campioni normali di liquido seminale possono contenere granuli gelatinosi (corpi amilacei) che non si liquefanno. Il significato di tale fenomeno è ignoto.

In alcuni casi, quando i campioni non si liquefanno può essere necessario un trattamento addizionale (per es. una miscelazione meccanica o l'esposizione a bromelina 1 g/l, o plasmina 0,35-0,50 unità caseina/ml, o chimotripsina 150 USP/ml) per permettere al campione di essere adeguatamente analizzato. Restano comunque ignoti gli effetti di tali trattamenti sulla funzione spermatozoaria e sulla biochimica del plasma seminale.

Il campione deve essere ben mescolato nel contenitore dove è avvenuta la raccolta. Una incompleta mescolazione è probabilmente la causa più frequente di errori nel determinare la concentrazione spermatozoaria. Una mescolazione continua, durante la liquefazione, ruotando il contenitore del campione può ridurre tali errori (Ziegler *et al.*, 1987).

2.3.2 *Aspetto*

Il campione andrebbe esaminato inizialmente con la semplice osservazione a temperatura ambiente immediatamente dopo la liquefazione o entro un'ora dall'eiaculazione. Un campione normale ha un aspetto grigio opalescente omogeneo. Può apparire meno opaco se la concentrazione di spermatozoi è molto bassa o bruno se sono presenti emazie.

2.3.3 *Volume*

Il volume dell'eiaculato andrebbe misurato o in un cilindro graduato a base conica o aspirando meccanicamente l'intero campione dentro una pipetta graduata dalla imboccatura ampia (vedi Appendice XXV). Se sul campione si dovranno effettuare dosaggi biologici, inseminazione intrauterina o fertilizzazione *in vitro*, si dovranno usare materiali sterili. Non andranno usate siringhe di plastica o aghi ipodermici perché possono influenzare lo spermioγραμμα, soprattutto la motilità spermatozoaria.

2.3.4 *Consistenza*

La consistenza del campione liquefatto (spesso definita "viscosità") può essere valutata aspirando delicatamente il liquido seminale in una pipetta da 5 ml, lasciandolo gocciolare per gravità ed osservando la lunghezza del filamento ottenuto. Un campione normale lascia la pipetta come piccole gocce distinte, mentre in caso di consistenza anormale 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 ed osservando la lunghezza del filamento che si forma estraendo la bacchetta. Anche in questo caso la lunghezza non deve superare i 2 cm.

Una consistenza anomala, per es. per un elevato contenuto di muco, può interferire nella determinazione dei vari parametri del liquido seminale come la motilità, la concentrazione spermatozoaria e la ricerca degli anticorpi adesi agli spermatozoi.

2.3.5 *pH*

Una goccia di liquido seminale viene uniformemente stesa su una cartina indicatrice per la misura del pH (range da 6,1 a 10,0). Dopo 30 secondi il colore della zona così impregnata dovrebbe essere uniforme e deve essere allora confrontato con la scala delle colorazioni per leggere il pH.

Qualunque cartina indicatrice di pH venga utilizzata per questa misura dovrà precedentemente essere testata contro standard noti di pH prima di essere utilizzata di routine.

Il pH andrebbe sempre misurato entro un'ora dall'eiaculazione e dovrebbe essere compreso tra 7,2 e 7,8. 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 si determina la concentrazione spermatozoaria, la motilità, e si valuta la presenza di agglutinati e di cellule diverse dagli spermatozoi.

Sebbene per le preparazioni a fresco si possa usare un comune microscopio ottico con il condensatore regolato in maniera da disperdere la luce, è fortemente raccomandato un microscopio a contrasto di fase per tutti gli esami di preparati a fresco di liquido seminale intero o di spermatozoi lavati.

2.4.1 *Preparazione di un esame di routine del liquido seminale*

Con l'ausilio di una micropipetta viene posto un volume fisso di liquido seminale (non più di 10 µl) su di un vetrino portaoggetti pulito e coperto con un coprivetrino di dimensioni di 22 mm x 22 mm. È importante che il volume del liquido seminale e le dimensioni del coprivetrino siano standardizzate in maniera che la valutazione sia sempre fatta su un preparato di spessore fisso (per es. circa 20 µm). Questo spessore consente l'espressione di tutti i movimenti di rotazione degli spermatozoi normali.

Il preparato viene quindi esaminato a 400-600 ingrandimenti. Il peso del coprivetrino distende il campione così da ottenere una ottima visione al microscopio. Il preparato a fresco appena ottenuto viene lasciato stabilizzare per circa un minuto. Dato che la motilità e la velocità degli spermatozoi dipendono largamente dalla temperatura, la valutazione della motilità andrebbe eseguita il più vicino possibile ai 37 °C usando un piatto portaoggetti riscaldato o altri dispositivi. L'esame dovrebbe essere eseguito a temperatura ambiente, tra i 20 ed i 24 °C, e questa temperatura deve essere standardizzata in tutti i laboratori.

Se il numero di spermatozoi per campo visivo varia considerevolmente, è segno che il campione non è omogeneo. In tali casi, il campione seminale andrebbe mescolato di nuovo accuratamente. La mancanza di omogeneità può derivare da una consistenza anomala o da una anomala liquefazione, dalla aggregazione degli spermatozoi nelle strie di muco o dalla agglutinazione degli spermatozoi. Tutte queste osservazioni andrebbero segnalate nei risultati dello spermioγραμμα.

Se il numero di spermatozoi è molto basso, andrebbe eseguita la centrifugazione del campione. Un volume noto di liquido seminale (il volume maggiore possibile) andrà centrifugato a 600 g per 15 minuti. Si rimuoverà allora un volume noto di plasma seminale e ciò che rimane andrà accuratamente mescolato e contato come descritto nella Sezione 2.5.2. La concentrazione finale andrà corretta del volume del sopranatante rimosso. Dopo la centrifugazione, sul campione si potrà anche eseguire la valutazione della motilità e della morfologia degli spermatozoi.

2.4.2 *Valutazione della motilità*

Negli ultimi anni, sono state introdotte numerose tecniche per la valutazione obiettiva delle caratteristiche del movimento dello spermatozoo umano. In questo manuale, viene raccomandato un semplice sistema di classificazione che fornisce la migliore valutazione possibile senza ricorrere a complesse strumentazioni. I laboratori interessati ad una più dettagliata valutazione della motilità facciano riferimento alla Sezione 2.10.

Il campo microscopico viene esaminato sistematicamente e la motilità di ogni spermatozoo incontrato viene definita "a", "b", "c", o "d", a seconda se lo spermatozoo presenta:

- a) motilità progressiva rapida;
- b) motilità progressiva lenta o irregolare;
- c) motilità non progressiva;
- d) immobilità.

Il numero di spermatozoi di ciascuna categoria può essere contato con l'aiuto di un contacellule. Normalmente devono essere esaminati da quattro a sei campi per osservare 100 spermatozoi che verranno classificati, ottenendo così la percentuale per ogni categoria di motilità. Si ripeterà l'osservazione di 100 spermatozoi e si calcoleranno i valori medi di ogni categoria. I valori andranno espressi in valori percentuali (%).

E' buona norma ripetere la valutazione della motilità su una seconda goccia di liquido seminale trattata alla stessa maniera. Si farà poi la media dei valori ottenuti dalle due conte facendo attenzione che ci sia meno del 10% di discrepanza tra di essi. Ciò è facilmente determinabile verificando che la differenza tra le due percentuali di spermatozoi mobili, per es. la somma delle categorie (a), (b) e (c) sia meno di 1/20 della loro somma. Per campioni con motilità inferiore al 50%, si utilizza la percentuale di spermatozoi immobili, per es. la

categoria (d). Se la differenza è maggiore del 10% andrà fatto un altro preparato, si farà la valutazione delle categorie e si calcoleranno ed andranno riportati i valori medi dei tre preparati.

2.4.3 *Elementi cellulari diversi dagli spermatozoi*

L'eiaculato normalmente contiene altre cellule oltre agli spermatozoi. Esse includono le cellule epiteliali a forma poligonale dell'uretra, le cellule della spermatogenesi, ed i leucociti definiti collettivamente "cellule rotonde". La concentrazione di tali cellule può essere determinata nei preparati a fresco usando un'adatta camera contaglobuli.

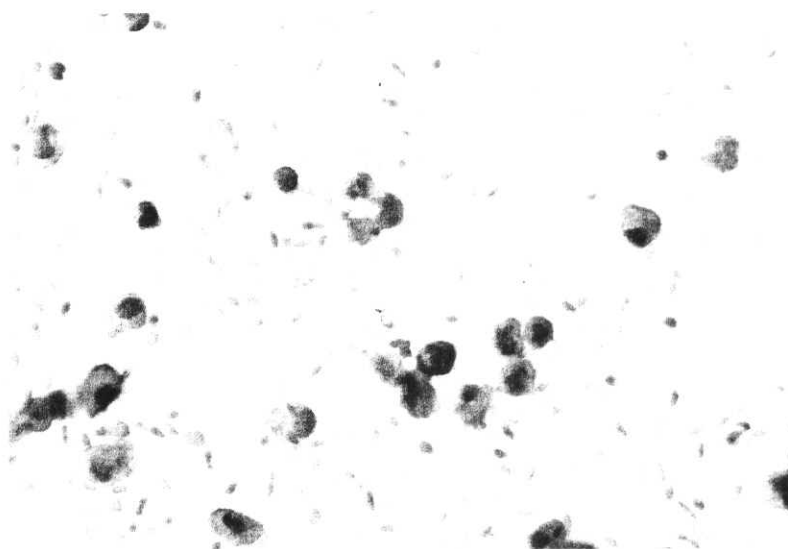
I leucociti sono presenti nella maggior parte degli eiaculati umani (Wolff & Anderson, 1988 a, b; Aitken & West 1990; Barratt *et al.*, 1990) il tipo cellulare predominante è il neutrofilo. Una stima precisa del numero di leucociti è importante poiché un numero eccessivo di queste cellule (questa condizione è definita leucospermia) può indicare l'esistenza di una infezione delle vie genitali che può rispondere a terapia antibiotica. Inoltre una leucospermia può associarsi a difetti del quadro seminale come riduzione del volume dell'eiaculato, della concentrazione e motilità degli spermatozoi ed anche perdita della funzione dello spermatozoo come risultato dello stress ossidativo (Aitken *et al.*, 1989; Aitken & West, 1990) e/o della secrezione di citochine citotossiche (Hill *et al.*, 1987).

E' difficile definire un valore soglia oltre il quale venga danneggiata la fertilità. Il danno dovuto a queste cellule dipende dal punto in cui le cellule entrano nel liquido seminale, dal tipo/i di leucociti coinvolti e dal loro stato di attivazione. Alla luce della sensibilità dello spermatozoo agli stress ossidativi, la presenza di neutrofili è probabilmente dannosa soprattutto se avviene a livello della rete testis o dell'epididimo. Viceversa, l'ingresso di leucociti al momento della eiaculazione attraverso la prostata o le vescichette seminali è probabilmente meno lesivo a causa del potente potere antiossidante del plasma seminale (Jones *et al.*, 1979). Come criterio generale un eiaculato normale non dovrebbe contenere più di 5×10^6 cellule rotonde/ml, mentre il numero di leucociti non dovrebbe superare 1×10^6 ml.

Sono state descritte varie tecniche per quantizzare la popolazione leucocitaria del liquido seminale. Per esempio, è stata dimostrata la validità dei sistemi biochimici come il rilevamento delle concentrazioni di elastina con un dosaggio immuno-enzimatico (Wolff *et al.*, 1990). In aggiunta a questi sistemi, l'Appendice III reca la descrizione di due tecniche istologiche per l'identificazione dei leucociti basate rispettivamente sulla presenza di perossidasi intracellulare e sull'antigene leucocitario specifico. Va notato che la tecnica della perossidasi fornisce numeri minori di leucociti rispetto a quelli ottenuti con gli anticorpi monoclonali anti leucocita. (Fig 2.2).

Resta controversa la relazione tra il numero di leucociti e la presenza di infezioni delle vie genitali. Quando il liquido seminale contiene più di 1×10^6 ml leucociti, andrebbero eseguiti i test microbiologici per indagare la presenza di una infezione delle ghiandole accessorie. Tali test includono l'esame del primo mitto urinario, del secondo mitto urinario, del secreto prostatico dopo massaggio prostatico e delle urine dopo il massaggio prostatico (Meares &

Fig. 2.2. Leucociti nel liquido seminale umano colorati con un anticorpo monoclonale per l'antigene presente su tutti i leucociti CD45 (si veda l'Appendice III.2).



Stamey, 1972). I test microbiologici includono anche i dosaggi biochimici del plasma seminale dato che l'infezione delle ghiandole accessorie spesso causa una anomala funzione secretoria (Sezione 2.7; Comhaire *et al.*, 1980). Comunque l'assenza di leucociti non esclude la possibilità di una infezione delle ghiandole accessorie.

Le cellule che non sono identificate come leucociti sono gli spermatidi, gli spermatociti e gli spermatogoni. Dato che solo gli spermatozoi (cellule germinali morfologicamente mature e dotate di coda) vengono inclusi nella conta spermatica, la concentrazione degli altri tipi di cellule germinali o dei leucociti può essere calcolata in relazione alla concentrazione di spermatozoi.

Se N è il numero di un dato tipo cellulare che viene contato nello stesso campo/i in cui si sono contati 100 spermatozoi e S è la concentrazione in milioni/ml, allora la concentrazione di quel dato tipo cellulare espresso in milioni/ml può essere calcolato usando la formula

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

Per esempio, se il numero di cellule immature contate è di 10 per ogni 100 spermatozoi e la concentrazione di spermatozoi è 120×10^6 ml, la concentrazione delle cellule immature è

$$\frac{10 \times 120 \times 10^6}{100} = \text{per millilitro} = 12 \text{ milioni per ml}$$

2.4.4 Agglutinazione

Questo termine indica il fenomeno per il quale spermatozoi mobili aderiscono l'un l'altro, testa a testa, tratto intermedio a tratto intermedio, coda a coda oppure in maniera mista, per esempio coda a tratto intermedio. L'adesione di spermatozoi mobili od immobili a strie di muco, a cellule diverse dagli spermatozoi, o a detriti cellulari deve essere considerata una aggregazione non specifica piuttosto che una agglutinazione e non andrà registrata come agglutinazione.

La presenza di agglutinazione è indicativa dell'esistenza di cause immunologiche di infertilità ma non è una evidenza che può da sola confermare tale possibilità, suggestiva, ma non di evidenza sufficien-

te. La agglutinazione va valutata in 10 campi scelti a caso ("random"). La percentuale media di spermatozoi agglutinati è stimata essere intorno al 5%. La presenza di fenomeni 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

La vitalità degli spermatozoi è definita dalla percentuale di spermatozoi vivi cioè impermeabili al colorante o capaci di regolare la loro pressione osmotica in condizioni di ipoosmolarità.

2.5.1.1 Colorazione sopra-vitale

Se la percentuale di spermatozoi immobili supera il 50%, si dovrà determinare la proporzione di spermatozoi vivi usando tecniche di colorazione sopra-vitale, che si basano sul fatto che la membrana plasmatica delle cellule morte permette il passaggio dei coloranti. I dettagli dei protocolli per eseguire queste tecniche sono riportati nell'Appendice IV.

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

Queste tecniche forniscono anche un controllo della precisione della misura della motilità, poiché la percentuale di cellule morte non dovrà superare la percentuale di cellule immobili. Inoltre la presenza di un'alta percentuale di cellule vitali ma immobili può indicare la presenza di difetti strutturali nel flagello.

2.5.1.2 Swelling test (*Hypo-osmotic swelling (HOS) test*)

Questo è un semplice test basato sulla semipermeabilità della membrana della cellula vitale, che fa "rigonfiare" lo spermatozoo in condizioni di ipoosmolarità quando si ha un afflusso di acqua all'interno della cellula con aumento del volume cellulare (Drevius & Eriksson, 1966). Introdotto da Jeyendran *et al.* (1984) nella pratica clinica lo Swelling test non dovrebbe essere usato come un test della funzionalità spermatozoaria ma va usato come test aggiuntivo, opzionale, della vitalità spermatozoaria. E' facilmente eseguibile e valutabile e fornisce ulteriori informazioni sull'integrità e la deformabilità della membrana cellulare e della coda. La metodica di esecuzione dello Swelling test è descritta nell'Appendice XVIII.

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 bicarbonato di sodio (NaHCO_3), 10 ml di formalina al 35% (v/v) e, a discrezione, 0,25 g di trypan blue (CI 23850) o 5 ml di soluzione acquosa satura di violetto di genziana e

aggiungendo acqua distillata per raggiungere il volume finale di 1000 ml. Se si usa il microscopio a contrasto di fase non vanno inclusi i coloranti nella preparazione.

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

Così per campioni che contengono meno di 20×10^6 spermatozoi/ml si può usare una diluizione 1:10; per campioni che contengono più di 100×10^6 spermatozoi/ml si può usare una diluizione 1:50. Le pipette per la diluizione dei globuli bianchi e le pipette automatiche che si basano su dispositivi pneumatici *non* sono abbastanza accurate per fare diluizioni volumetriche di un materiale così vischioso come il liquido seminale. Si dovrà utilizzare un tipo di pipetta a spostamento positivo (vedi Appendice XXV).

Il campione diluito andrà mescolato accuratamente e una goccia (10-20 μ l) andrà trasferita in una camera contaglobuli di Neubauer modificata e ricoperta con un vetrino coprioggetti. La camera contaglobuli viene lasciata immobile per circa 5 minuti in una camera umida per ridurre al minimo l'essiccazione. In questo intervallo di tempo le cellule sedimentano e vengono poi contate, preferibilmente con un microscopio a contrasto di fase a 200-400 ingrandimenti. Vengono contati solo gli spermatozoi (cellule germinali mature dotate di coda); teste a spillo o teste senza coda non vengono contate.

La procedura per il conteggio degli spermatozoi in una camera contaglobuli è la seguente: il quadrato centrale della griglia di una camera di Neubauer modificata contiene 25 grandi quadrati, ciascuno composto da 16 quadrati più piccoli (Fig. 2.3). Per campioni che contengono meno di 10 spermatozoi per quadrato grande si dovrà contare l'intera griglia di 25 quadrati grandi; per campioni che contengono da 10 a 40 spermatozoi per quadrato grande si dovranno contare 10 quadrati grandi; e, per campioni che contengono più di 40 spermatozoi per quadrato grande, si dovranno analizzare 5 quadrati grandi. Se uno spermatozoo giace sulla linea che divide due quadrati adiacenti andrà contato solo se si trova sul lato superiore o sinistro del quadrato da contare.

Si valutano due camere del contaglobuli e si calcolano i valori medi facendo attenzione che la differenza tra i due conteggi non ecceda 1/20 della loro somma (per es. meno del 10% di differenza). Se i due

Fig. 2.3. 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).

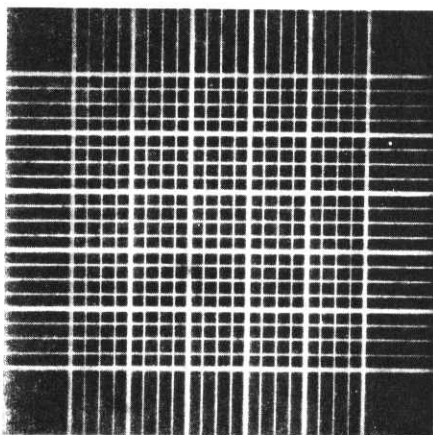


Tabella 2.1. Fattori di conversione per la camera contaglobuli

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).

conteggi non sono entro il 10%, vanno scartati, si ripete la diluizione del campione e si prepara e si conta una altra camera contaglobuli.

Allo scopo di determinare la concentrazione degli 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 1 + 19, e se sono stati contati 162 a 170 spermatozoi in 10 quadrati grandi di ciascuna camera, allora la concentrazione degli spermatozoi nel campione seminale originale è 83×10^6 (cioè 166 diviso due).

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

Un metodo possibile per determinare la concentrazione di spermatozoi è di impiegare camere specificatamente studiate per la conta degli spermatozoi. Per quanto tali camere, per es. la camera di Makler (Makler, 1980) o la Microcell (Ginsburg & Armant, 1990), siano convenienti perché possono essere utilizzate senza diluizione del campione, possono mancare della precisione del metodo della camera contaglobuli soprattutto nel caso di campioni molto viscosi e/ o eterogenei. Se si utilizzano queste camere, ne andrà stabilita l'accuratezza e precisione comparandole alla camera contaglobuli.

2.5.3 *Analisi delle caratteristiche morfologiche degli spermatozoi*

Per quanto la variabilità della forma degli spermatozoi umani renda molto difficile studiare la differente morfologia spermatozoaria, lo studio degli spermatozoi selezionati rinvenuti nelle vie genitali femminili (specialmente nel muco cervicale dopo post-coital test) ha contribuito a definire quello che deve essere l'aspetto di uno spermatozoo normale.

Molti spermatozoi con anomalie morfologiche presentano più di una anomalia. Precedentemente, quando era presente più di una anomalia, ne veniva registrata solo una dando la priorità alle anomalie della testa su quelle del tratto intermedio ed alle anomalie del tratto intermedio su quelle della coda. E' stato dimostrato, comunque, che il numero medio di difetti per spermatozoo con anomalie, una misura chiamata indice di teratozoospermia, è un valido predittivo della funzione spermatozoaria sia *in vivo* che *in vitro* (Jouannet *et al.*, 1988; Mortimer *et al.*, 1990b). Quindi, la valutazione della morfologia di ciascun spermatozoo dovrebbe essere multiparametrica, descrivendo ciascun difetto separatamente.

2.5.3.1 *Classificazione della morfologia dello spermatozoo umano*

La classificazione della morfologia dello spermatozoo umano può essere eseguita usando un microscopio ottico a campo chiaro su campioni fissati e colorati (vedi Sezione 2.5.4 per le metodiche di colorazione) o un microscopio di buona qualità a contrasto di fase (ingrandimento totale almeno 600 ingrandimenti) su campioni a fresco (Appendice V).

Le teste degli spermatozoi colorati sono leggermente più piccole delle teste degli spermatozoi viventi nel liquido seminale non trattato, la forma invece non varia in maniera apprezzabile (Katz *et al.*, 1986). Per valutare la morfologia normale dello spermatozoo andrebbero applicati i criteri ristretti. La testa normale dovrebbe essere di forma ovale. Tenendo conto della leggera contrazione indotta dalla fissazione e dalla colorazione, la lunghezza della testa dovrebbe essere 4,0-5,5 μm , e la larghezza 2,5-3,5 μm . Il rapporto lunghezza/larghezza dovrebbe essere da 1,50 a 1,75. Questi valori presentano una affidabilità del 95% derivando dalla comparazione dei valori di lunghezza e di larghezza delle teste di spermatozoi colorati con il Papanicolau e di spermatozoi a fresco (Katz *et al.*, 1986). Ci dovrebbe essere una zona acrosomiale ben definita comprendente il 40-70% dell'area della testa. Non ci devono essere difetti del collo, del tratto intermedio e non devono essere presenti residui citoplasmatici più grandi di 1/3 delle dimensioni della testa dello spermatozoo normale. Questo schema classificativo impone che tutte le forme "borderline" siano considerate anomale.

Dato che tale valutazione della morfologia analizza le varie regioni funzionali degli spermatozoi, è ritenuto superfluo per la routine classificare tutte le variazioni di forma e di dimensioni della testa o tutti i difetti del flagello dello spermatozoo. Comunque, se una regione dello spermatozoo risulta alterata nella maggior parte delle cellule, andrà fatto un commento aggiuntivo sul/i difetto/i più diffuso/i.

Si dovranno riportare le seguenti categorie di anomalie (vedi Fig. 2.4).

- (a) *Anomalie di forma e di dimensioni della testa*, che include teste grandi, piccole, affusolate, piriformi, amorfe, vacuolate (> del 20% dell'area della testa dello spermatozoo occupata da zone vacuolari non colorate), teste duplici o qualsiasi combinazione di questi difetti.
- (b) *Anomalie del collo e del tratto intermedio*, che include l'assenza del flagello (teste "libere" o "perse"), flagello non inserito o "angolato" (il flagello forma un angolo di circa 90° rispetto all'asse maggiore della testa), tratto intermedio disteso/irregolare/angolato, tratto intermedio abnormemente sottile (per es. assenza del rivestimento mitocondriale) o qualsiasi combinazione di questi difetti.
- (c) *Anomalie del flagello*, che include flagelli corti, multipli, a forcina, rotti (angolazione > di 90°), con spessore irregolare, o flagelli avvolti, o con residui citoplasmatici, o qualsiasi combinazione di questi difetti.
- (d) *Residui citoplasmatici*, più grandi di un terzo delle dimensioni di una testa normale. I residui citoplasmatici sono di solito posti nelle regioni del collo o del tratto intermedio, per quanto alcuni spermatozoi immaturi possano avere residui citoplasmatici in altre sedi lungo la coda.

Fig. 2.4. Morfologia spermatozoaria (vedi 2.5.3.1 e 2.5.3.2). Microfotografie (1000 x) di spermatozoi colorati con il Papanicolaou (vedi Appendice VII).

(a) Spermatozoo normale. N = normale.

(b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) Spermatozoi con anomalie della testa, del collo, del tratto intermedio, della coda, e teste affusolate. HA = testa amorfa;

HD = testa duplice; HL = macrocefali;

HLA = macrocefali amorfi;

HP = testa piriforme;

HT = testa allungata (Tapering);

Hv = testa vacuolata;

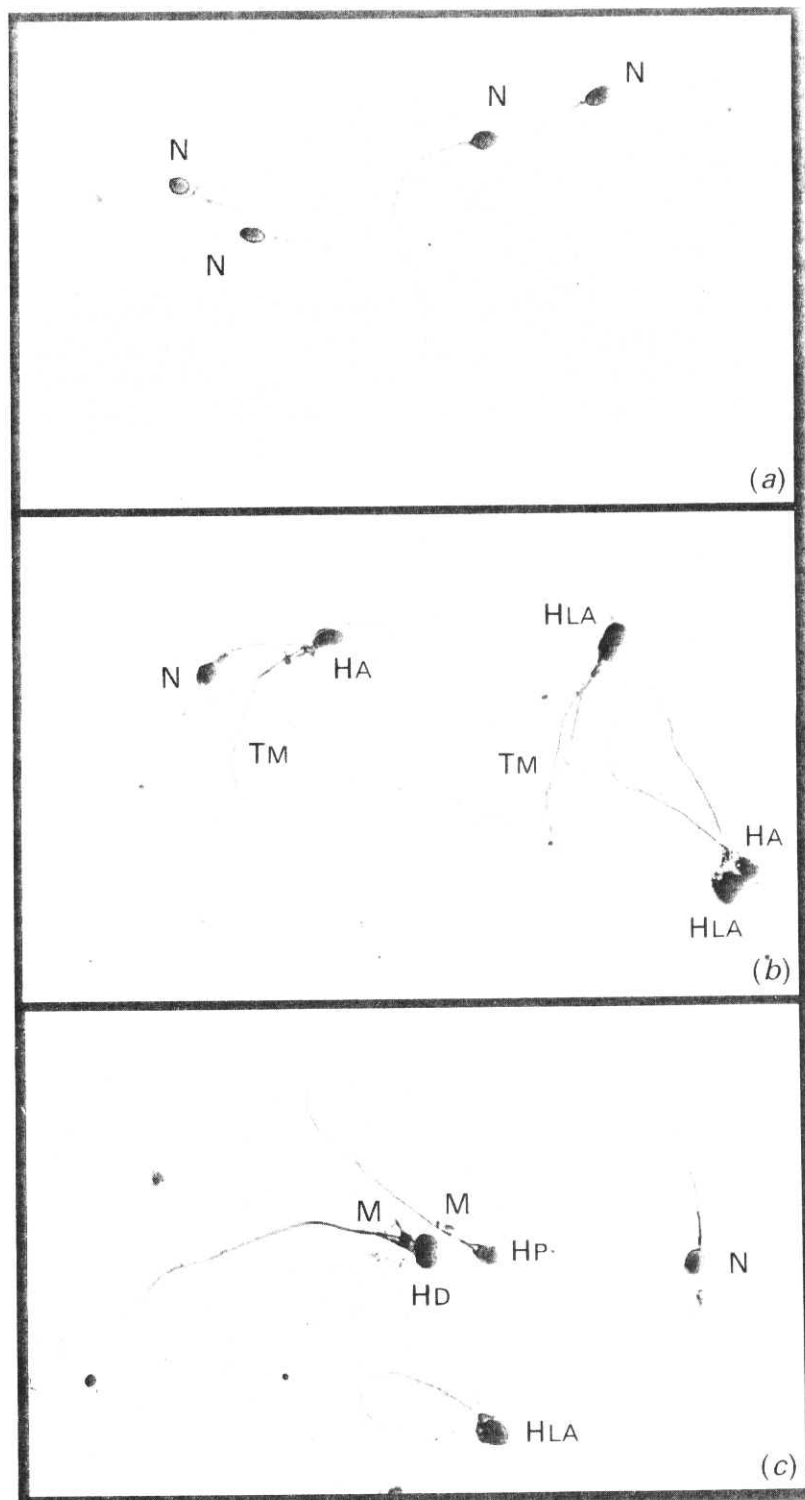
M = anomalie del collo e del tratto intermedio; CD = residui citoplasmatici;

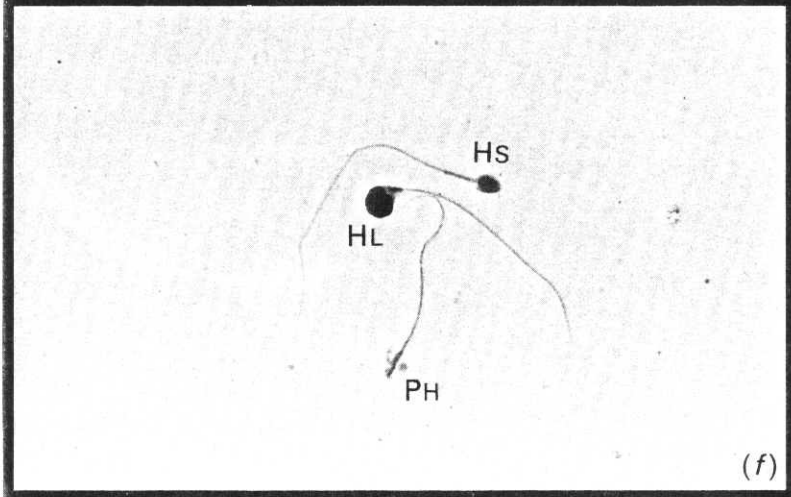
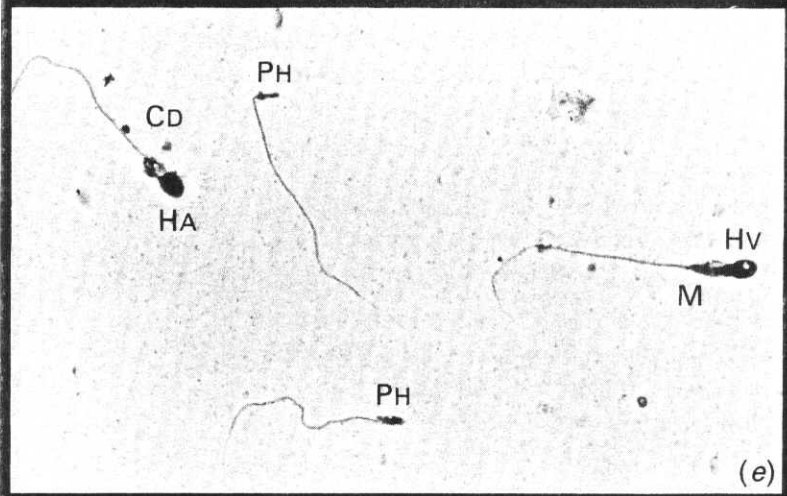
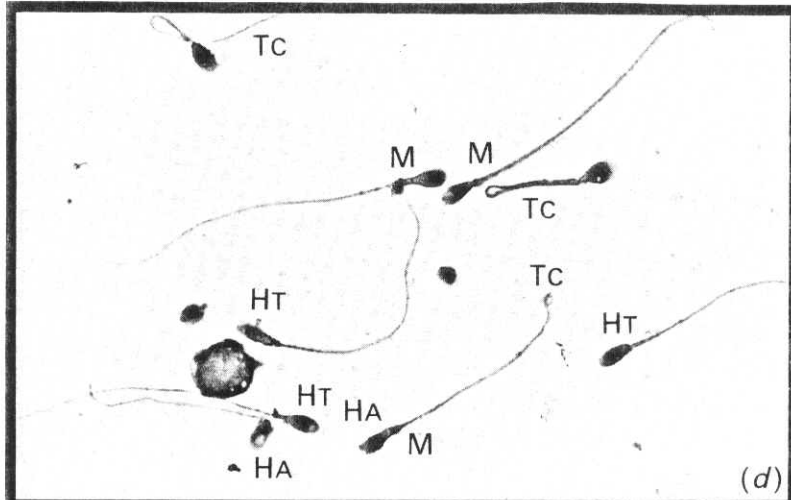
N = normale; PH = testa affusolata (questi spermatozoi andrebbero contati come spermatozoi, ma riportati separatamente);

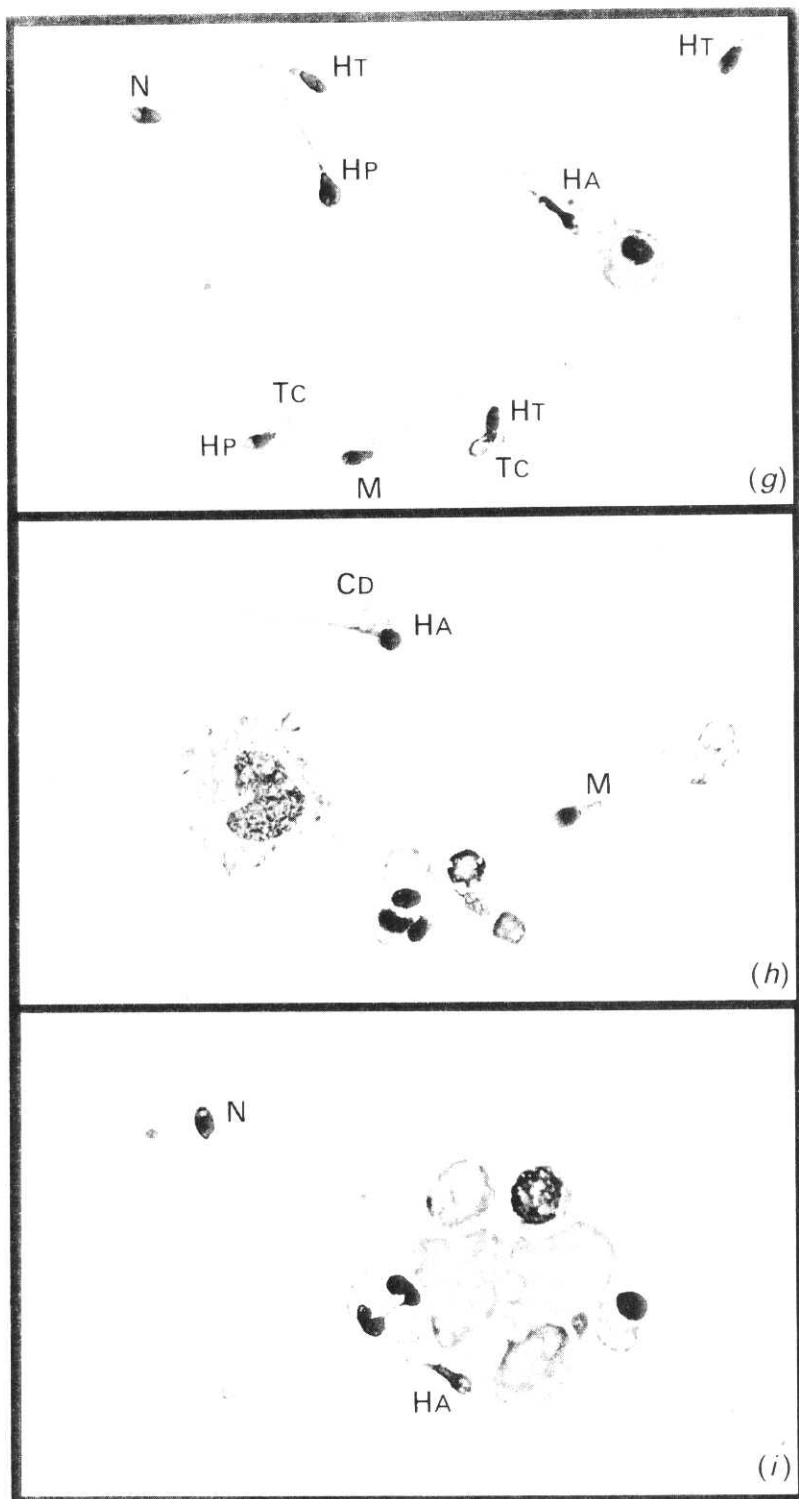
Tc = flagello avvolto;

TM = flagello multiplo. Si noti che sono presenti in (d), (g), (h) e (i) leucociti e

cellule germinali immature.







2.5.3.2 *Modalità di esecuzione dello studio morfologico degli spermatozoi (spermocitogramma)*

Si devono contare almeno 100, e meglio ancora 200 spermatozoi. Per preparati colorati si userà un obiettivo 100 x, a bagno d'olio a campo chiaro, senza contrasto di fase.

Di solito per uno studio numerico delle differenti morfologie si valutano solo le cellule riconosciute come spermatozoi; non si devono contare come spermatozoi le cellule germinali immature fino agli spermatidi allo stadio Sd₁ inclusi. Le teste libere o perse degli spermatozoi vanno contate come forme anomale (nella categoria *Anomalie del collo e del tratto intermedio* - vedi Sezione 2.5.3.1), e non come code isolate. Andrà riportato a parte se si nota una alta incidenza di teste "affusolate" (> del 20% di spermatozoi); le teste appuntite non vengono riportate tra le anomalie della testa dato che raramente questi spermatozoi possiedono cromatina o strutture nella testa al davanti del disco basale.

Un'alta incidenza di flagelli avvolti può indicare che gli spermatozoi sono stati esposti ad uno stress ipo-osmotico, per quanto l'avvolgimento del flagello si associa anche all'invecchiamento dello spermatozoo.

2.5.3.3 *Anomalie "caratteristiche" invalidanti la fertilità*

Negli animali domestici, sono state fondamentalmente descritte numerose anomalie invalidanti la fertilità nelle quali tutti gli spermatozoi prodotti presentavano una anomalia strutturale "caratteristica" che invalidava la funzionalità degli spermatozoi. Nell'uomo sono stati descritti pochi casi simili, probabilmente il più noto di questi è l'anomalia delle "teste rotonde" o "globospermia".

2.5.4 *Metodiche di colorazione degli spermatozoi umani*

La colorazione può essere eseguita utilizzando una metodica di Giemsa (Appendice VI), la colorazione di Papanicolaou modificata per gli spermatozoi (Appendice VII), la colorazione di Bryan-Leishman (Appendice VIII) o la colorazione di Shorr (Appendice IX). La colorazione di Giemsa permette di valutare meglio i diversi tipi di leucociti più che gli spermatozoi. La colorazione di Papanicolaou è la metodica più utilizzata nei laboratori di andrologia. Permette di colorare le regioni acrosomiale e post acrosomiale della testa, il tratto intermedio ed il flagello, e si può utilizzare anche per campioni di liquido seminale molto viscosi. La colorazione di Bryan-Leishman consente un'adeguata colorazione dello spermatozoo; è particolarmente efficace per identificare e differenziare le cellule germinali dai leucociti. La colorazione di Shorr è facile da effettuare e può andare bene per gli esami di routine della morfologia spermatozoaria.

Sebbene esistano sul mercato vetrini precolorati pronti per l'uso con un solo passaggio, alcuni di questi vetrini non possono essere conservati per consultazioni future, altri invece non garantiscono la stessa qualità degli strisci ottenibili con le tecniche descritte in questo manuale.

Il metodo tradizionale dello striscio (secondo il quale lo spigolo di un altro vetrino viene utilizzato per distribuire una goccia di liquido seminale sulla superficie pulita di un vetrino) può essere utilizzato per

ottenere strisci degli spermatozoi, ma bisogna stare attenti a non fare strisci troppo spessi. Infatti lo striscio è molto adatto ai materiali meno viscosi come il sangue o gli spermatozoi lavati mentre spesso è poco appropriato per i liquidi seminali viscosi. In alternativa, si può piazzare una goccia di liquido seminale nel mezzo di un vetrino pulito e poi porvi al di sopra un secondo vetrino pulito, a faccia in giù in maniera tale che il liquido seminale venga steso tra di loro; infine, facendoli scivolare, si separano delicatamente i due vetrini ottenendo simultaneamente due strisci.

I confini di tutte le parti dello spermatozoo dovrebbero essere facilmente distinguibili. Con la colorazione di Papanicolaou, la testa dello spermatozoo si colora in blu chiaro nella regione acrosomiale ed in blu scuro nella regione post acrosomiale. Il tratto intermedio può presentare una certa colorazione rossa ma questo colore si considera anomalo solo se il tratto intermedio è grossolanamente disteso od irregolare. Anche il flagello si colora in blu. I residui citoplasmatici, localizzati di solito dietro la testa e lungo il tratto intermedio, si colorano in verde (Fig. 2.5.).

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 quasi esclusivamente a due classi immunologiche: IgA ed IgG. Gli anticorpi IgA sembrerebbero avere una maggiore importanza clinica rispetto agli anticorpi IgG (Kremer & Jager, 1980). Gli anticorpi IgM a causa del loro elevato peso molecolare si ritrovano difficilmente nel liquido seminale.

La ricerca degli anticorpi va condotta sul liquido seminale a fresco e può essere fatta con la metodica delle immunobeads o con il test degli anticorpi misti (MAR test; per esaminarlo vedi Bronson *et al.*, 1984).

Fig. 2.5. Spermatozoi normali colorati con il Papanicolaou.
Acrosoma - blu chiaro;
regione post acrosomiale - blu scuro;
tratto intermedio - rosso chiaro;
flagello - blu scuro.



Affinché questi test siano validi, devono essere disponibili per la valutazione almeno 100 spermatozoi con motilità progressiva. Un elevato contenuto di muco nel campione può interferire con questi test. I risultati del MAR test e del test con le immunobeads non sempre sono concordanti (Scarselli *et al.*, 1987; Hellstrom *et al.*, 1989). Il test con immunobeads presenta una buona correlazione con i test di immobilizzazione e di agglutinazione degli spermatozoi condotti sul siero. Quando questi test sono positivi, test aggiuntivi (test del contatto tra spermatozoi e muco cervicale, test del tubo capillare con muco cervicale e spermatozoi, o la titolazione degli anticorpi anti spermatozoo nel siero) forniranno ulteriori informazioni e confermeranno la diagnosi (vedi Capitolo 3).

2.5.5.1 *Test con immunobeads*

Gli anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi possono essere individuati con il test che utilizza le immunobeads (Appendice IX). Le immunobeads sono sferette di poliacrilamide a cui sono legate covalentemente immunoglobuline di coniglio anti-immunoglobuline umane. Con questo test si può valutare simultaneamente la presenza di anticorpi IgG, IgA, e IgM.

Gli spermatozoi, separati dal plasma seminale con ripetute centrifugazioni vengono risospesi in un tampone. La sospensione di spermatozoi viene mescolata con una sospensione di immunobeads. Il preparato viene esaminato a 400 ingrandimenti con un microscopio a contrasto di fase. Dato che gli spermatozoi nuotano nella sospensione, le immunobeads aderiscono agli spermatozoi mobili che presentano anticorpi adesi alla loro superficie. Viene così determinata la percentuale di spermatozoi con anticorpi sulla superficie e, usando diversi tipi di immunobeads, si può anche determinare la classe di tali anticorpi (IgG, IgA o IgM) (Appendice XI). Si può anche utilizzare un altro tipo di immunobead, proposto originariamente per differenziare i differenti tipi di linfociti B, come rapido test di screening per le diverse classi di anticorpi IgG, IgA, ed IgM sulla superficie dello spermatozoo (Pattinson & Mortimer, 1987).

Il test è ritenuto positivo quando almeno il 20%, o più, degli spermatozoi mobili presentano immunobeads adese. Comunque, la penetrazione nel muco cervicale e la fertilizzazione *in vivo* non risultano significativamente alterate fino al 50% o più di spermatozoi mobili con anticorpi adesi alla superficie (Ayvaliotis *et al.*, 1985; Clarke *et al.*, 1985). Su queste basi, perché il test sia ritenuto valido clinicamente, almeno il 50% di spermatozoi mobili deve essere ricoperto dalle immunobeads. Inoltre, il legame delle immunobeads solo all'apice del flagello non si associa ad una diminuita fertilità e può essere presente nel liquido seminale di alcuni uomini fertili.

2.5.5.2 *MAR test*

Il MAR test per la ricerca delle IgG (Appendice XII) 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 siero monospecifico anti IgG umane. La formazione di agglutinati misti tra le particelle e gli spermatozoi mobili prova

la presenza di anticorpi IgG sugli spermatozoi. La diagnosi di infertilità su base immunologica è probabile quando il 50% o più degli spermatozoi mobili presenta particelle adese. Si può sospettare una diagnosi di infertilità su base immunologica quando il 10-50% di spermatozoi mobili presenta particelle adese.

2B TEST FACOLTATIVI

I test descritti in questa sezione del *Manuale* sono 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 Spermiocoltura

I campioni di liquido seminale da porre in coltura devono essere raccolti seguendo speciali precauzioni per evitare contaminazioni. Prima di raccogliere il campione il paziente dovrà urinare. Immediatamente dopo dovrà lavarsi mani e pene con sapone. Dovrà poi sciacquare via il sapone ed asciugarsi con un asciugamano pulito. I contenitori per la raccolta seminale devono essere sterili. Per un esame completo, il campione andrà inviato ad un laboratorio di microbiologia per quei test che non sono normalmente eseguiti dal laboratorio di andrologia. La spermiocoltura, indagando la presenza sia di batteri aerobi che di anaerobi, può contribuire alla diagnosi di un'infezione delle ghiandole accessorie maschili, in particolar modo della prostata (Mobley, 1975).

La coltura dei soli batteri aerobi può essere eseguita con o senza diluizione del campione seminale su un vetrino di plastica coperto con il medium di coltura o in agar sangue. Se la concentrazione di batteri supera le 1000 unità formanti colonie (CFU) per ml, andranno esaminati i tipi di colonie. Se le colonie appaiono uniformi, andranno eseguite, da un laboratorio specialistico di microbiologia, l'antibiogramma e ulteriori indagini per l'identificazione dei batteri. Se le colonie non appaiono uniformi, andrà sospettata una contaminazione ed andrà eseguita una seconda spermiocoltura istruendo con cura il paziente per evitare la contaminazione.

Se la concentrazione di batteri è inferiore a 1000 CFU/ml, la coltura va considerata negativa per i batteri aerobi. In caso di infezioni genitali si richiederà l'aiuto di un laboratorio di microbiologia (Brunner *et al.*, 1983; Krieger, 1984; Weidner *et al.*, 1985).

2.7 Analisi biochimiche

2.7.1 Il plasma seminale

Ci sono vari indici biochimici della funzione delle ghiandole accessorie, per es. l'acido citrico, lo zinco, la γ -glutamyl transpeptidasi e la fosfatasi acida per la prostata; il fruttosio e le prostaglandine per le vescichette seminali; la L-carnitina, la glicerofosfolina e la α -

glicosidasi per l'epididimo. 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. Una infezione può talora causare una considerevole diminuzione della funzione secretoria ma nonostante ciò, la quantità totale di uno o più indici seminali può ancora trovarsi entro l'ampio range di normalità. Una 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 prostatica. I dosaggi di questi markers sono riportati da Appendice XIII a XV.

2.7.1.2 *Capacità secretoria delle vescichette seminali*

Il fruttosio nel liquido seminale rispecchia bene la funzione secretoria delle vescichette seminali ed un metodo per la sua misura è riportato nell'Appendice XVI. In casi di azoospermia da agenesia dei deferenti, bassi livelli di fruttosio possono indicare una disgenesia associata delle vescichette seminali. La determinazione del fruttosio è utile anche nei rari casi di ostruzione del dotto eiaculatorio. Il liquido seminale di uomini con ostruzione del dotto eiaculatorio o agenesia dei deferenti e vescichette seminali è caratterizzato da basso volume, basso pH, assenza di formazione del coagulo, ed assenza del caratteristico odore del liquido seminale.

2.7.1.3 *Capacità secretoria dell'epididimo*

Fino a tempi recenti il marker epididimario più utilizzato clinicamente era la L-carnitina, ma recentemente si è introdotto l'uso della α -glicosidasi in alcuni centri. Ci sono due isoforme di α -glicosidasi nel liquido seminale: la maggiore, neutra, prodotta solo nell'epididimo e la minore, acida, prodotta principalmente nella prostata. E' stato dimostrato che la α -glicosidasi neutra è un marker più specifico e sensibile dell'epididimo rispetto alla L-carnitina e alla glicerofosfocolina, e in caso di ostruzioni distali la sua misurazione, quando usata insieme a parametri ormonali e testicolari è di maggior valore diagnostico. Inoltre, la valutazione della α -glicosidasi (Appendice XVII) è più facile, meno costosa e più rapida che la valutazione degli altri due marker.

2.8 **Le cellule germinali immature**

I diversi tipi di cellule germinali immature che sono presenti nel liquido seminale (Fig. 2.6) sono di solito indice di disordini della spermatogenesi. 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).

Fig. 2.6.*Cellule germinali immature*

Queste cellule non hanno flagello 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 VIII).

(a) Spermatogoni

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

(b) Spermatociti primari

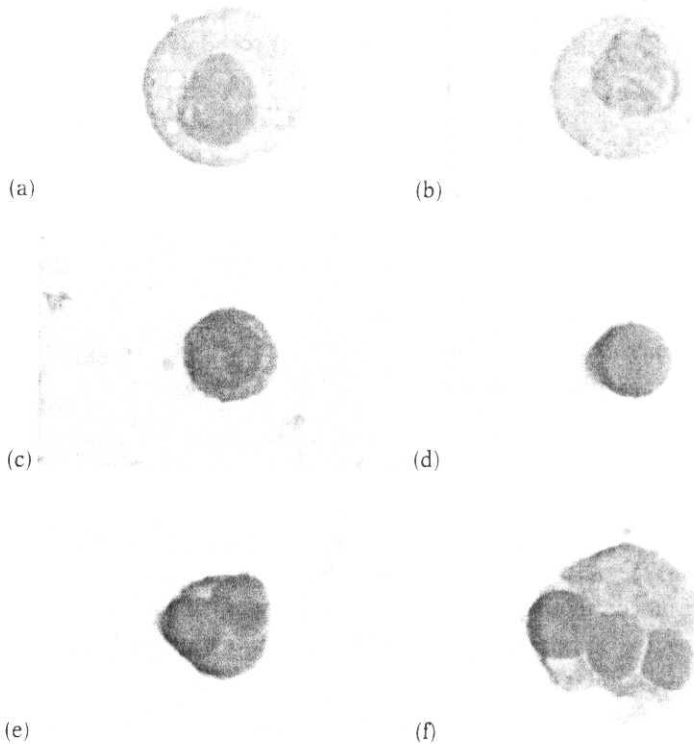
(Diametro nucleare da 8 a 9 μm). Questa cellula, quando colorata, mostra un grande nucleo sferico che va dal violetto scuro al porpora in un citoplasma grigio. Il nucleo è normalmente omogeneo, ma occasionalmente si possono vedere filamenti di cromatina.

(c) 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.

(d), (e) e (f) Spermatidi

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 protrusione di color magenta su un lato della cellula. La restante parte della cellula si colora in porpora scuro. Molti spermatidi possono 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.



2C TEST DI RICERCA

2.9 Test di funzionalità spermatozoaria

2.9.1 *Gli spermatozoi*

La comprensione dei meccanismi responsabili di una difettosa funzionalità spermatozoaria è così progredita che i bioassays di laboriosa esecuzione sono stati rapidamente sostituiti da semplici test biochimici. Per esempio, si è visto recentemente che il danno perossidativo, indotto dall'eccessiva produzione di radicali liberi dell'ossigeno (per es. il perossido di idrogeno), può essere responsabile di una anomala funzione spermatozoaria (Aitken & Clarkson, 1987; Aitken *et al.*, 1989, 1991; Alvarez *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1979).

Gli spermatozoi con alterata funzionalità sono anche caratterizzati da una attività anormalmente elevata di alcuni enzimi come la creatin fosfochinasi (Huszar *et al.*, 1988, 1990). Una eccessiva produzione di radicali dell'ossigeno e elevati livelli di creatin fosfochinasi possono entrambi derivare da un unico difetto negli spermatozoi con anomalie nel tratto intermedio (Rao *et al.*, 1989).

2.9.2 *Test di penetrazione nell'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 es. la motilità degli spermatozoi, potrebbe fornire una base importante per la predizione della funzionalità spermatozoaria. Il protocollo standardizzato approvato in quella riunione viene riportato in Appendice XIX.

I dettagli ultrastrutturali della fusione tra ovocita e spermatozoo nel test di penetrazione nell'uovo di hamster sono identici a quanto avviene nell'uomo, in quanto la fusione con la membrana vitellina dell'ovocita, inizia dalla membrana plasmatica che riveste il segmento equatoriale dello spermatozoo umano in cui è avvenuta la reazione acrosomiale. Proprio per questo aspetto il test è significativo. Mentre il test differisce dalla situazione fisiologica per la assenza della zona pellucida.

L'attivazione della reazione acrosomiale è scatenata dall'interazione tra la membrana plasmatica dello spermatozoo e una glicoproteina costituente la zona pellucida. In assenza di reazione acrosomiale è impossibile la fusione con l'ovocita. Questo test dell'uovo di hamster si basa sulle reazioni acrosomiali che si verificano spontaneamente nelle popolazioni di spermatozoi incubate per prolungati periodi di tempo *in vitro*. Dato che questo fenomeno è meno efficiente di quello fisiologico e può coinvolgere meccanismi diversi, sono frequentemente riportati risultati di falsi negativi (pazienti che falliscono nel test dell'uovo di hamster ma che riescono a fertilizzare *in vitro* od *in vivo* ovociti umani) (WHO, 1986).

I segnali intracellulari che iniziano la reazione acrosomiale, che fa seguito alla interazione tra spermatozoo e zona pellucida, sono mediati dal calcio e dalla alcalinizzazione del citoplasma. Ottenibili entrambi artificialmente con lo ionoforo per ioni divalenti, A23187 (Aitken *et al.*, 1987, 1991; Appendice XIX).

2.9.3 *Test di legame alla zona pellucida umana*

Recentemente sono stati sviluppati test per valutare la capacità dello spermatozoo umano di legarsi alla zona pellucida umana. Tali test fanno uso di ovociti umani non vitali, non fecondabili ottenuti da autopsie o da rimozioni chirurgiche di ovaie o da programmi di fertilizzazione *in vitro*. Questi ovociti possono essere conservati per vari mesi in soluzioni saline elevate (Yanagimachi *et al.*, 1979). Il test dell'emizona (Burkman *et al.*, 1988; Oehninger *et al.*, 1989) comporta la microdissezione della zona pellucida in due metà uguali e la valutazione del legame su ciascuna delle due metà appaiate dello stesso numero di spermatozoi del campione in esame e di un campione di controllo. Un altro test marca in maniera differente gli spermatozoi del campione da testare con un colorante fluorescente (per es., fluoresceina) ed il campione di controllo con un altro colorante (per es. rodamina, Liu *et al.*, 1988, 1989). Viene contato e confrontato il numero di spermatozoi del campione da testare e del campione di controllo legati alla zona pellucida. Entrambi questi test di legame alla zona pellucida hanno dimostrato di correlare con il successo della fertilizzazione *in vitro*. Tali test sono limitati dalla disponibilità di ovociti umani e dalla necessità di una conta spermatica minima. I risultati dovranno essere confermati da un numero maggiore di laboratori in tutto il mondo.

2.9.4 *Valutazione della reazione acrosomiale*

Sono disponibili molte metodiche per la valutazione dello stato dell'acrosoma dello spermatozoo umano. Quelle che utilizzano le lectine fluorescenti, spesso in associazione al fluorocromo Hoechst H33258 come colorazione vitale, sono probabilmente le più semplici. L'agglutinina di arachide marca la membrana esterna (Mortimer *et al.*, 1990a) mentre l'agglutinina di pisello marca la matrice acrosomiale (Cross *et al.*, 1986). Oltre alla valutazione con il microscopio a fluorescenza, gli spermatozoi marcati con le lectine possono essere contati usando la citometria a flusso (Purvis *et al.*, 1990).

La reazione acrosomiale fisiologica (per es. quella dello spermatozoo che realmente feconda l'ovocita) avviene dopo che lo spermatozoo si è legato alla zona pellucida (vedi la Sezione 2.9.1). Di conseguenza, lo sviluppo di una metodica valida per lo studio della reazione acrosomiale rimane difficoltosa per quanto gli ionofori del calcio possano essere utilizzati per valutare la capacità degli spermatozoi capacitati, di andare incontro ad una normale reazione acrosomiale (vedi Sezione 2.9.2).

Resta da stabilire l'importanza clinica della valutazione e della dinamica della reazione acrosomiale.

2.10 **Analisi computerizzata del liquido seminale (CASA)**

2.10.1 *Introduzione*

E' opinione comune che analisi della motilità spermatozoaria standardizzate, accurate e precise miglioreranno le possibilità prognostiche e diagnostiche del laboratorio di andrologia. La tecnologia del video e della visione computerizzata ha prodotto nuovi strumenti capaci di identificare e registrare il singolo spermatozoo e infine di calcolare un

numero di parametri che definiscono la "cinetica" (ad es. i vari spostamenti nell'unità di tempo) del movimento dello spermatozoo (Boyers *et al.*, 1989; Katz *et al.*, 1989; Gagnon, 1990; Mortimer, 1990). Tali strumenti utilizzano un computer per analizzare il segnale elettrico ottenuto da una videocamera inserita su un microscopio, o per l'analisi diretta di quel segnale, o per l'analisi di un segnale analogo da un videoregistratore (Boyers *et al.*, 1989). La tecnologia e le modalità di impiego del CASA non sono tuttavia sviluppate da poter essere ritenute una procedura di routine in tutto il mondo. Quando utilizzato correttamente, il CASA consente una maggiore precisione nella analisi della motilità spermatozoaria rispetto alla soggettività della valutazione manuale, e consente di ottenere una concordanza tra i vari laboratori (Davis *et al.*, 1992; Davis & Katz, 1992).

2.10.2 *Rilevamenti sul liquido seminale ottenuti col CASA*

I sistemi CASA sono stati ideati per avere rilevamenti della concentrazione degli spermatozoi, della percentuale di spermatozoi mobili e dei parametri che caratterizzano il tipo e la vitalità dei movimenti della testa dello spermatozoo. Alcuni sistemi possono essere ampliati per misurare anche la morfologia della testa dello spermatozoo.

La precisione del CASA nel determinare la concentrazione di spermatozoi è compromessa dagli elementi cellulari e da altre sostanze diverse dagli spermatozoi, che sono tipiche del liquido seminale umano (Boyers *et al.*, 1989). Di conseguenza non è generalmente raccomandato usare il CASA per determinare la concentrazione di spermatozoi nel liquido seminale umano, per quanto siano previste migliorie tecniche. Attualmente, è da raccomandarsi l'uso manuale dell'emocitometro (Sezione 2.5.2).

Anche il rilevamento con il CASA della percentuale di spermatozoi mobili è compromesso dal materiale diverso dagli spermatozoi presente nel liquido seminale, dato che lo strumento può avere difficoltà nel distinguere tra tale materiale e spermatozoi. Inoltre il CASA definisce mobili esclusivamente gli spermatozoi che raggiungono determinati valori soglia di motilità rettilinea. All'opposto, la percezione visiva del movimento dello spermatozoo è frequentemente influenzata dalla presenza dell'attività flagellare, anche se la cellula non ha motilità progressiva. Di conseguenza, il CASA e la stima visiva delle percentuali di motilità del liquido seminale sono probabilmente differenti, fornendo di solito il primo valori inferiori (Davis & Katz, 1992). Perciò si raccomanda di eseguire una stima visiva diretta delle percentuali di motilità, (Sezione 2.4.2), oltre ai dati ottenuti con la analisi CASA.

L'utilità particolare degli attuali sistemi CASA è quella di fornire i dettagli della cinetica della testa dello spermatozoo dai quali si possono calcolare i vari parametri del movimento. Esistono dei valori standard per questi parametri, alcuni dei quali sono forniti nell'Appendice XX.