

Appendice XV

Protocollo per il test di penetrazione nell'uovo di hamster

XV.1 Procedura

- (i) Consentire per 30-60 minuti la completa liquefazione del liquido seminale.
- (ii) Il medium colturale per questo test è il BWW (Biggers, Whitten e Whittingham, 1971). Questo medium è preparato come soluzione stock (vedi Tab. XV.1) che può essere conservata a 4 °C per diverse settimane senza che si deteriori. Il giorno del test si aggiungono a 100 ml della soluzione stock del medium 210 mg di bicarbonato di sodio, 100 mg di glucosio, 0,37 ml di uno sciroppo di sodio lattato al 60% (v/v), 3 mg di sodio piruvato, 350 mg di albumina serica bovina Frazione V, 10.000 unità di penicillina, 10.000 µg di streptomicina solfato e 20 mmol/l di HEPES. Il medium dovrebbe essere riscaldato a 38 °C prima dell'uso, preferibilmente in un'atmosfera di CO₂ al 5% e aria al 95%.

Tabella XV.1. *Componenti della soluzione stock del medium BWW usato nel test di penetrazione nell'uovo di hamster*

Composto	Quantità (g/l)
NaCl	5,540
KCl	0,356
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,250
KH ₂ PO ₄	0,162
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,294
Rosso fenolo	1,0 (ml/l)

- (iii) I campioni seminali (da 0,5 a 1,0 ml) vengono posti in tubi sterili da coltura e coperti delicatamente con il medium di coltura nel rapporto una parte di liquido seminale:due parti di medium. Un certo numero di tubi (da tre a dieci a seconda del volume del campione e della concentrazione di spermatozoi) possono essere preparati in questo modo, usando preferibilmente tubi da coltura a fondo tondo per aumentare al massimo la superficie dell'interfacies tra liquido seminale e medium. Questa superficie può essere ulteriormente

aumentata inclinando i tubi dolcemente di un angolo di circa 20° rispetto alla piano orizzontale.

- (iv) I tubi vengono incubati a 37 °C per un'ora in un'atmosfera di CO₂ al 5% e aria al 95%. Se questo tipo di incubatore non è disponibile, i tubi possono essere tappati accuratamente e mantenuti a 37 °C in atmosfera d'aria. Durante il periodo dell'incubazione gli spermatozoi con maggiore mobilità migrano dal plasma seminale al medium sovrastante.
- (v) Alla fine del periodo d'incubazione i tubi vengono dolcemente riportati alla posizione verticale e si recupera circa l'80% della parte superiore del medium sovrastante, che viene mescolato e centrifugato in un tubo a fondo conico a 500 g per cinque minuti. A questo punto si può rivelare necessario un secondo passaggio di lavaggio se ci sono cenni di contaminazione da parte del plasma seminale.
- (vi) Il sedimento di spermatozoi, una volta risospeso in modo da ottenere una concentrazione di circa 10×10^6 spermatozoi/ml in un volume non inferiore a 0,5 ml, viene incubato per 18-24 ore a 37 °C in un'atmosfera di CO₂ al 5% e aria al 95%. Se non è disponibile un incubatore a CO₂ i tubi possono essere chiusi accuratamente e incubati in atmosfera d'aria a 37 °C. Durante il periodo dell'incubazione i tubi dovrebbero essere inclinati di 20° rispetto al piano orizzontale per impedire che gli spermatozoi sedimentino e per aumentare la superficie per gli scambi gassosi.
- (vii) Gli oociti possono essere prelevati da hamster prepuberi o puberi nel primo giorno del ciclo estrale. Si iniettano, a 48-72 ore di distanza, siero di cavalla incinta e gonadotropine corioniche umane (hCG) intraperitonealmente a una dose di 30-40 IU. Gli oociti dovrebbero poi essere recuperati entro 18 ore dopo l'iniezione di hCG e preparati a temperatura ambiente usando ialuronidasi all'0,1% (p/v) e tripsina all'0,1% (p/v) per rimuovere le cellule del cumulo e della zona pellucida, rispettivamente. Ciascun trattamento enzimatico dovrebbe essere seguito da due lavaggi nel medium BWB. Gli oociti isolati possono essere riscaldati a 37 °C e introdotti immediatamente nella sospensione di spermatozoi o conservati a 4 °C fino a 24 ore.
- (viii) Alla fine della fase di capacitazione i tubi vengono di nuovo posti in posizione verticale per 20 minuti, per permettere di sedimentare a tutte le cellule immobili, dopo di che gli spermatozoi mobili vengono aspirati insieme al sovrantante e portati ad una concentrazione appropriata di $3,5 \times 10^6$ spermatozoi mobili/ml. Gli spermatozoi vengono quindi posti sotto paraffina liquida in piccole gocce di 100 µl a cui si aggiungono 30 oociti privati della zona, introducendo almeno 15 oociti per ogni goccia. I gameti vengono poi incubati a 37 °C in un'atmosfera di CO₂ al 5% e aria al 95% per 3 ore.
- (ix) Viene poi determinato il numero di spermatozoi che sono penetrati nell'oocita rimuovendo gli oociti stessi e lavando via gli spermatozoi che vi aderiscono soltanto; dopo di ciò essi vengono schiacciati in uno spessore di circa 30 µm sotto un vetrino coprioggetti ed esaminati in contrasto di fase. (E' anche possibile fissare e conservare gli

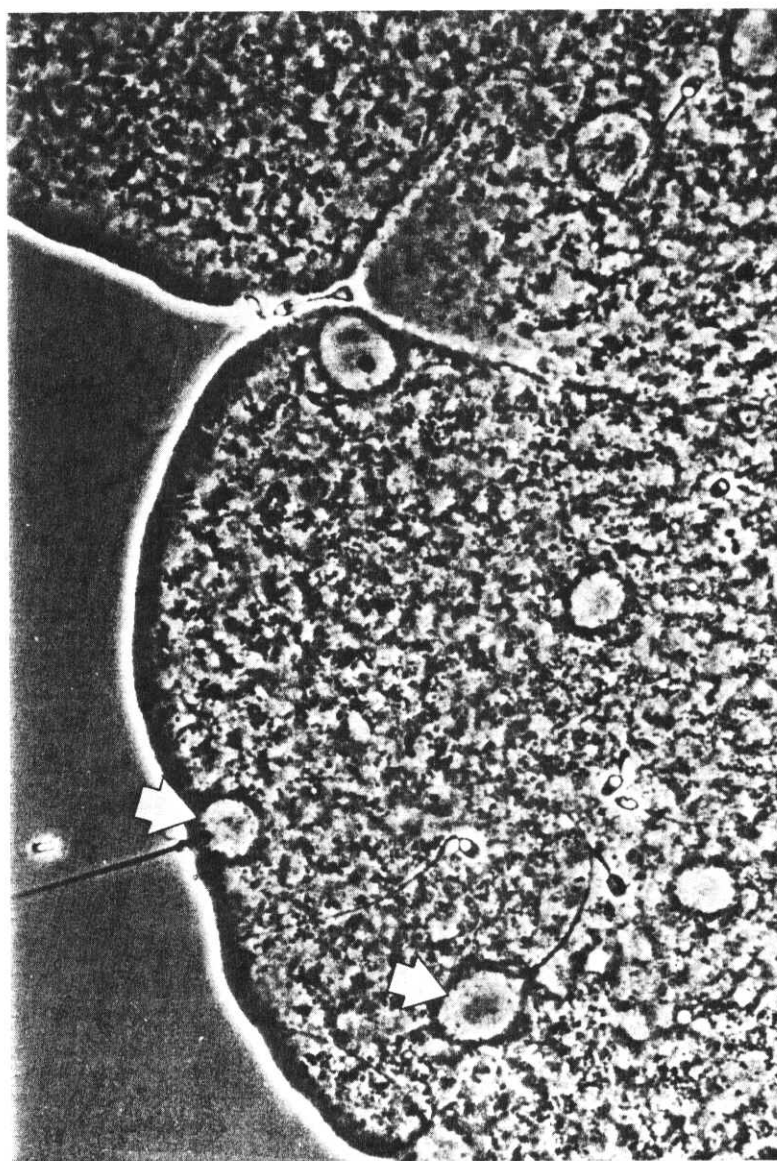
oociti, per esempio, in glutaraldeide all'1% (v/v), e colorarli con lacmoide o aceto-orceina).

- (x) A questo punto gli oociti dovrebbero essere esaminati per determinare gli spermatozoi presenti nel loro citoplasma e il numero medio di spermatozoi incorporati per ogni oocita (Fig. XV.1). Si dovrebbe anche registrare la presenza di spermatozoi che rimangono legati alla superficie dell'oocita anche dopo l'iniziale lavaggio, perché questo fatto può dare alcune indicazioni sulla percentuale di spermatozoi che hanno subito la reazione acrosomiale.

XV.2 Controllo di qualità

Questo test deve essere eseguito con un grado adeguato di controllo di qualità. La variazione intra-assay dovrebbe essere stabilita

Fig. XV.1. Oocita di hamster privo di zona contenente spermatozoi umani, come risulta con microscopia in contrasto di fase. Le frecce indicano la presenza di teste di spermatozoi che si stanno decondensando entro l'ooplasma (scala: 500 x). (da Aitken *et al.*, 1983).



ripetendo l'analisi su un singolo campione almeno 10 volte nel corso dello stesso test; in queste condizioni il coefficiente di variazione dell'intra-assay non dovrebbe superare il 15%. Il coefficiente di variazione dell'inter-assay non dovrebbe superare il 25% e può essere determinato usando un pool di spermatozoi crioconservati con un livello di penetrazione noto. Qualunque test in cui il valore ottenuto con la preparazione standard superi di due unità di deviazione standard il valore medio dovrebbe essere considerato non attendibile. Qualunque test in cui la penetrazione sia totalmente assente dovrebbe essere ripetuto utilizzando un altro campione di liquido seminale.

Appendice XVI

Suggerimenti per la preparazione del post-coital test

Il post-coital test viene effettuato nel periodo ovulatorio, quando il muco cervicale è nelle condizioni più favorevoli alla progressione degli spermatozoi. Questo è uno dei test impiegati nella diagnosi dell'infertilità.

Nella preparazione del post-coital test si dovrebbero seguire il più possibile le seguenti istruzioni.

- (i) La coppia dovrebbe astenersi da rapporti per almeno due giorni prima del test.
- (ii) Si dovrebbe soddisfare le proprie necessità fisiologiche prima del rapporto in quanto è necessario evitare l'uso del bagno per alcune ore dopo il rapporto.
- (iii) Il rapporto sessuale avverrà, secondo le abitudini della coppia, nel giorno suggerito dall'equipe medica (la donna deve tenere a portata di mano un assorbente igienico).
- (iv) Dopo il coito la donna dovrebbe rimanere sul dorso per circa 30 minuti con le ginocchia curve per sollevare le anche in modo da prevenire la perdita di liquido seminale.
- (v) Indossare l'assorbente igienico o tampone nella maniera usuale per impedire perdite di liquido seminale.
- (vi) Presentarsi alla clinica per l'esecuzione del test nei tempi concertati.
- (vii) Non togliere l'assorbente igienico o il tampone fino al momento in cui il medico esegue l'esame.

*Esempio di modulo per la valutazione del muco cervicale
e per il post-coital test*

Data delle ultime mestruazioni

Giorno	Mese	Anno

Punteggio giornaliero del muco cervicale

	Giorno	Mese	Giorno	Mese	Giorno	Mese	Giorno	Mese
Data								
Giorno del ciclo								
Volume								
Consistenza								
Ferning (cristallizzazione)								
Spinnbarkeit (filanza)								
Cellularità								
Punteggio totale								
pH								

Post-coital test

	Giorno	Mese	
Data			
Tempo dopo il rapporto (ore)			
	Pool vaginale	Pool esocervicale	Pool endocervicale
Spermatozoi/HPF (400 x)			
Motilità (100 spermatozoi)			
(a) Progressione rapida lineare			
(b) Progressione lineare lenta o non lineare			
(c) Motilità non progressiva			
(d) Immobili			

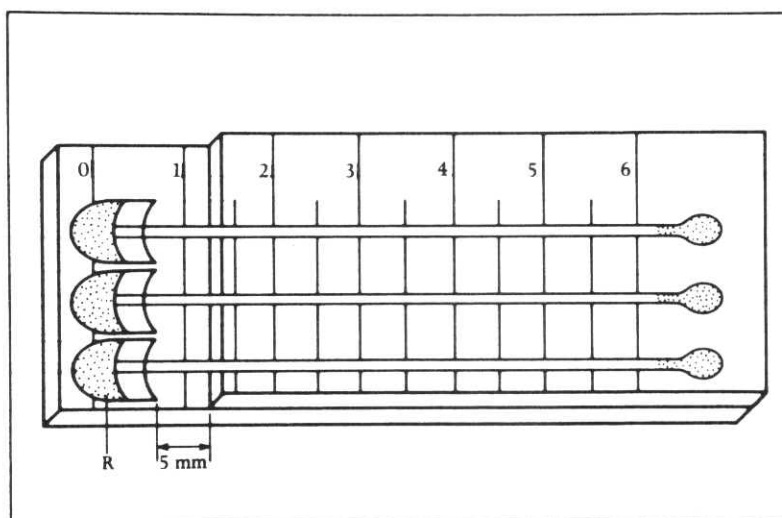
Appendice XVII

Interazione tra spermatozoi e muco cervicale: test del tubo capillare

XVII.1 Attrezzatura

Il test originamente fu proposto da Kremer (1965) e fu poi modificato nel 1980 (Kremer, 1980). Il test misura la capacità degli spermatozoi di penetrare in una colonna di muco cervicale all'interno di un tubo capillare. A tale scopo sono stati utilizzati vari tipi di tubi capillari ma i più raccomandati sono quelli a sezione rettangolare.

Fig. XVII.1. La camera di Kremer per la penetrazione degli spermatozoi (vedi testo).



Il misuratore di penetrazione degli spermatozoi ideato da Kremer (Fig. XVII.1) può essere costruito in laboratorio seguendo queste istruzioni:

- (i) Incollare su un vetrino da microscopio tre serbatoi (R) a sezione semi-circolare (raggio di circa 3,5 mm).
- (ii) Sopra al primo vetrino ne viene incollato un secondo. Il secondo vetrino è più corto di circa 1,5 mm e viene posto ad una distanza di circa 5 mm dai serbatoi. Questa struttura impedisce che il liquido seminale si insinui tra il tubo capillare e il vetrino. Sul secondo vetrino è presente una scala graduata.

I tubi capillari di vetro possono essere richiesti alla Vitro Dynamics, USA, sono a sezione rettangolare e sono disponibili in vari formati.

Per questo test risultano appropriati quelli con uno spessore di 300-400 μm e di 6 cm di lunghezza.

XVII.2 Metodo

Si dovrebbe usare liquido seminale fresco, a non più di un'ora dal momento dell'eiaculazione. Il muco cervicale viene aspirato nel tubo capillare, assicurandosi che non vi penetrino bolle d'aria. Un'estremità del tubo viene sigillata con plastilina o creta. L'applicazione del sigillante fa sì che una goccia di muco sporga dal tubo. L'estremità aperta del tubo capillare viene posta sul vetrino in maniera tale che penetri di circa 0,5 cm nel serbatoio contenente il campione seminale. Durante il processo di penetrazione degli spermatozoi il supporto dovrebbe essere posto in una piastra di Petri coperta, con una spugna umida al lato per mantenere l'umidità e prevenire l'essiccazione del liquido seminale e del muco. La misura è condotta preferibilmente in una camera con temperatura ambiente di 37 °C.

XVII.3 Valutazione del test

Dopo due ore si osservano la distanza di migrazione, la densità di penetrazione, la riduzione di migrazione e la presenza di spermatozoi con motilità progressiva.

I tubi capillari possono essere osservati di nuovo dopo 24 ore per valutare la sola presenza di spermatozoi con motilità progressiva.

Le variabili da valutare dopo due ore sono definite nel seguente modo:

XVII.3.1 Distanza di migrazione

E' la distanza dal serbatoio dello spermatozoo più lontano nel tubo capillare.

XVII.3.2 Densità di penetrazione

Questo parametro viene determinato a una distanza di 1 e 4,5 cm dal serbatoio di liquido seminale. A ciascuna delle due distanze si determina il numero degli spermatozoi per campo visivo ridotto (low power field, LPF; 10 x 10). Il numero medio si ottiene dall'osservazione di cinque LPF adiacenti. La media di queste osservazioni viene espressa con una delle classi di densità di penetrazione (vedi Tab. XVII.1). Per la valutazione complessiva del test viene riportata la più alta classe di densità di penetrazione.

XVII.3.3 Riduzione della migrazione

Questo parametro indica la *riduzione* della densità di penetrazione a 4,5 cm confrontata con quella a 1 cm. Viene espressa come la differenza tra i numeri dell'ordine di rango.

Esempi

- (1) La densità di penetrazione a 1 cm è compresa tra 51 e 100 e a 4,5 cm tra 6 e 10. Il valore della riduzione di migrazione è 3 (da ordine di rango 6 a ordine di rango 3; vedi Tab. XVII.1).
- (2) La densità di penetrazione a 1 cm è compresa tra 21 e 50 e a 4,5 cm tra 51 e 100. Il valore della riduzione di migrazione è zero perchè non c'è diminuzione della densità di penetrazione.

Tabella XVII.1 *Ordine delle classi della densità di penetrazione*

Classe di densità di penetrazione	Ordine dei ranghi
0	1
0 - 5	2
6 - 10	3
11 - 20	4
21 - 50	5
51 - 100	6
> 100	7

XVII.3.4 Durata dei movimenti progressivi

La presenza nel muco cervicale di spermatozoi con motilità progressiva può essere determinata dopo 2 e 24 ore.

I risultati possono essere classificati secondo la Tab. XVII.2.

Tabella XVII.2. *Classificazione dei risultati del test*

Distanza di migrazione		Densità di penetrazione		Riduzione della migrazione da 1 a 4,5 cm		Durata dei movimenti progressivi nel muco		Classificazione
(cm)		(spermatozoi LPF ^a)		(Riduzione dell'ordine di rango)		(ore)		
1		0		—		—		Negativo
< 3	oppure	< 10	oppure	> 3	oppure	< 2		Insufficiente
Tutte le combinazioni del test che non possono essere classificate come: negativo, insufficiente o buono								Discreto
4,5	e	> 50	e	< 3	e	> 24		Buono

^aLPF = low power field (10 x 10).

Bibliografia

Le reviews sono indicate da asterischi.

- Aitken, R.J., Best, F.S.M., Richardson, D.W., Djahanbakhch, O. and Lees, M. (1982). The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. *Fertility and Sterility*, **38**: 68-76.
- Aitken, R.J., Templeton, A., Schats, R., Best, F., Richardson, D., Djahanbakhch, O. and Lees, M. (1983). Methods of assessing the functional capacity of human spermatozoa: their role in the selection of patients for *in vitro* fertilization. In *Fertilization of the Human Egg in vitro*, ed. H. Beier and H. Lindner, pp. 147-65. Springer-Verlag, Berlin.
- Belkien, L., Bordt, J., Freischem, C.W., Hano, R., Knuth, U.A. and Nieschlag, E. (1985). Prognostic value of the heterologous ovum penetration test for human *in vitro* fertilization. *International Journal of Andrology*, **8**: 275-84.
- Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D.G. (1971). The culture of mouse embryos *in vitro*. In *Methods in Mammalian Embryology*, ed. J.C. Daniel, pp. 86-116, Freeman, San Francisco.
- *Blasco, L. (1984). Clinical tests of sperm fertilizing ability. *Fertility and Sterility*, **41**: 177-91.
- Bronson, R.A., Cooper, G.W. and Rosenfeld, D. (1982). Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Archives of Andrology*, **9**: 61.
- *Bronson, R.A., Cooper, G.W. and Rosenfeld, D. (1984). Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility*, **42**: 171-83.
- Brunner, H., Weidner, W. and Schiefer, H.G. (1983). Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in prostatitis. *Journal of Infectious Diseases*, **147**: 807-13.
- Clarke, G.N., Elliott, P.J. and Smaila, C. (1985). Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, **7**: 118-23.
- Comhaire, F., Vermeulen, L. and Zegers-Hochschild, F. (1982). Enhancement of sperm motility: selecting progressively motile spermatozoa. In *Treatment of Male Infertility*, ed. J. Bain, W.B. Schill and L. Schwarstein, pp. 283-309. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Comhaire, F., Vermeulen, L., Ghedira, K., Mas, J., Irvine, S. and Kallipolitis, G. (1983). Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential. *Fertility and Sterility*, **40**: 500-4.
- Comhaire, F., Verschraegen, G., and Vermeulen, L. (1980). Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. *International Journal of Andrology*, **3**: 32-45.
- Egozcue, J., Templado, C., Vidal, F., Navarro, J., Morer-Fargas, F. and Marina, S. (1983). Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Human Genetics*, **65**: 185-8.

- 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 and D. de Kretser, pp. 381-99, Raven Press, New York.
- *Eliasson, R. (1986). Semen analysis as a tool in the search for a male contraceptive. In *Male Contraception: Advances and Future Prospects*, ed. G.I. Zatuchni, A. Goldsmith, J.M. Spieler and J.J. Sciarra, pp. 114-123. Harper & Row, Philadelphia.
- Eliasson, R., Hellinga, F., Lübecke, F., Meyhöfer, W., Niemann, H., Steeno, O. and Schirren, C. (1970). Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia*, **2**: 1257.
- Eliasson, R. and Johnsen, O. (1986). Interaction between seminal plasma and spermatozoa. In *Andrology: Male Fertility and Sterility*, ed. C.A. Paulsen, pp. 331-40. Academic Press, New York.
- Ficsor, G., Ginsberg, L.C., Oldford, G.M., Snoke, R.E. and Becker, R.W. (1983). Gelatin-substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. *Fertility and Sterility*, **39**: 548-552.
- Hellinga, G. (1976). *Clinical Andrology*. William Heinemann Ltd., London.
- Insler, V. and Bettendorf, G. (ed.) (1977). *The Uterine Cervix in Reproduction: Workshop Conference*, Georg Thieme, Stuttgart.
- Irvine, D.S. and Aitken, R.J. (1985). The value of adenosine triphosphate (ATP) measurements in assessing the fertilizing ability of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, **44**: 806-813.
- Jager, S., Kremer, J., Kuiken, J. and Van Slochteren-Draaisma, T. (1980). Immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies from infertile men and inhibition of *in vitro* sperm penetration into cervical mucus. *International Journal of Andrology*, **3**: 1-14.
- Johannisson, E., Norén, S., Rietton, G. and Eliasson, R. (1982). Microfluorometric assessment of sperm maturation in testicular biopsies from men with histologically normal or reduced spermatogenesis. *International Journal of Andrology*, **5**: 11-20.
- Johnsen, O. and Eliasson, R. (1987). Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *International Journal of Andrology*, **10**: 435-40.
- *Jones, W.R. (1986). Immunological factors in infertility. In *The Infertile Couple*, ed. R.J. Pepperell, B. Hudson and C. Wood. Churchill Livingstone, London (2nd edition).
- Karvonen, M.J. and Malm, M. (1955). Colorimetric determination of fructose with indol. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, **7**: 305-7.
- Katz, D.F.R. and Overstreet, J.W. (1981). Sperm motility assessment by videomicrography. *Fertility and Sterility*, **35**: 188-93.
- Kremer, J. (1965). A simple sperm penetration test. *International Journal of Fertility*, **10**: 209-15.
- Kremer, J. (1980). *In vitro* sperm penetration in cervical mucus and AIH. In *Homologous Artificial Insemination (AIH)*, ed. J.C. Empeire, A. Audebert and E.S.E. Hafez, pp. 30-7. Martinus Nijhoff. The Hague, Boston, London.
- Kremer, J. and Jager, S. (1976). The sperm-cervical mucus contact test: a preliminary report. *Fertility and Sterility*, **27**: 335-40.
- Kremer, J. and Jager, S. (1980). Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon, with special regard to immunoglobulin class and antigen-reactive sites. *International Journal of Andrology*, **3**: 143-52.
- *Krieger, J.N. (1984). Prostatitis syndromes: pathophysiology, differential diagnosis and treatment. *Sexually Transmitted Diseases*, **11**: 100-12.
- Kvist, U. (1982). Sperm nuclear chromatin decondensation ability. *Acta Physiologica Scandinavica, Supplement* 486.
- Lee, W.I., Gaddum-Rosse, P., Smith, W.D., Stenchever, M. and Blandau,

- R.J. (1982). Laser light-scattering study of the effect of washing on sperm motility. *Fertility and Sterility*, **38**: 62-70.
- Macleod, J. (1970). The significance of deviations in human sperm morphology. In *The Human Testis*, ed. E. Rosemberg and C.A. Paulsen, pp. 481-500. Plenum Press, New York.
- Makler, A. (1980). The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertility and Sterility*, **33**: 337-8.
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1981). *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Meares, E.M. and Stamey, T.A. (1972). The diagnosis and management of bacterial prostatitis. *British Journal of Urology*, **44**: 175-9.
- Menchini-Fabris, A., Canale, D., Izzo, P.L., Olivieri, L. and Bartelloni, M. (1984). Free L-carnitine in human semen: its variability in different andrologic pathologies. *Fertility and Sterility*, **42**: 263-7.
- Mills, N.R. and Katz, D. (1978). A flat capillary tube system for assessment of sperm movement in cervical mucus. *Fertility and Sterility*, **29**: 43-7.
- Mobley, D.F. (1975). Semen cultures in the diagnosis of bacterial prostatitis. *Journal of Urology*, **114**: 83-5.
- Moghissi, K.S. (1966). Cyclic changes of cervical mucus in normal and progestin-treated women. *Fertility and Sterility*, **17**: 663-75.
- Moghissi, K.S. (1976). Post-coital test: physiologic basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*, **27**: 117-29.
- *Moghissi, K.S. (1984). The function of the cervix in human reproduction. In *Current Problems in Obstetrics and Gynaecology*, Vol. VII. pp. 1-58. Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago.
- Mohsenian, M., Syner, F.N. and Moghissi, K.S. (1982). A study of sperm acrosin in patients with unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, **37**: 223-9.
- Mortimer, D. (1985). The male factor in infertility. Part 1. Semen analysis. In *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility*, ed. J.M. Leventhal, pp. 1-87. Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago.
- Nahoum, C.R.D. and Cardozo, D. (1980). Staining for volumetric count of leucocytes in semen and prostate-vesicular fluid. *Fertility and Sterility*, **34**: 68-9.
- Overstreet, J.W., Katz, D.F., Hanson, F.W. and Fonesca, J.R. (1979). A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertility and Sterility*, **31**: 162-72.
- Papanicolaou, G.N. (1942). A new procedure of staining vaginal smears. *Science*, **95**: 438.
- Schlegel, W., Kusseler, R. and Nieschlag, E. (1985). Significance of adenosine triphosphate in human sperm as clinical parameter. *Archives of Andrology*, **14**: 171-6.
- Virji, N. and Eliasson, R. (1985). LDH-C₄ in human seminal plasma and testicular function. III. Relationship to other semen variables. *International Journal of Andrology*, **8**: 376-84.
- Weidner, W., Krause, W., Schiefer, H.G., Brunner, H. and Friedrich, H.J. (1985). Ureaplasma infections of the male urogenital tract, in particular prostatitis and semen quality. *Urologia Internationalis*, **40**: 5-9.
- Wolf, D.P. and Sokoloski, J.E. (1982). Characterization of the sperm penetration bioassay. *Journal of Andrology*, **35**: 445-51.
- World Health Organization (1986). *Consultation on: The Zona-free Hamster Oocyte Penetration Test and the Diagnosis of Male Fertility*, ed. R.J. Aitken, International Journal of Andrology (Suppl. 6).
- Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B.J. (1976). The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, **15**: 471-6.
- Zavos, P.M. (1985). Seminal parameters of ejaculates collected from oligospermic and normospermic patients via masturbation and at intercourse with the use of Silastic seminal fluid collection device. *Fertility and Sterility*, **44**: 517-20.