

Appendice XVI

Dosaggio del fruttosio nel plasma seminale umano^a

XVI.1 Reagenti

- (1) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ all'1,8% (18 g/l).
- (2) NaOH 0,1M.
- (3) *Reagente - indolo*: 200 mg di acido benzoico vengono aggiunti a 100 ml di acqua distillata e sciolti agitando ripetutamente in un bagno di acqua calda (circa 60 °C). Quando tutto l'acido benzoico è sciolto, si aggiungono 25 mg di indolo. La soluzione viene poi filtrata e conservata in frigorifero a 4 °C.
- (4) *Stock dello standard di fruttosio* (2,8 mM): si sciolgono 50,4 mg di fruttosio in 100 ml di acqua distillata. La soluzione può essere conservata in frazioni congelate.
- (5) *Soluzioni di lavoro di fruttosio*: il giorno del dosaggio si diluisce lo stock a 0,28 e 0,14 mM, rispettivamente.

XVI.2 Preparazione del plasma seminale

- (i) Diluire il plasma seminale 1:50 aggiungendo 0,1 ml di plasma seminale a 4,9 ml di acqua distillata.
- (ii) Aggiungere 1 ml di plasma seminale diluito a un tubo da centrifuga.
- (iii) Aggiungere 0,3 ml della soluzione di zinco solfato all'1,8%; mescolare.
- (iv) Aggiungere 0,2 ml di NaOH e mescolare accuratamente.
(Il plasma seminale ha una diluizione totale di 1:75 cioè $50 \times (1 + 0,3 + 0,2) \text{ ml} \div 1 \text{ ml}$).
- (v) Aspettare 15 minuti e centrifugare a 2000 g per 20 minuti.
- (vi) Utilizzare 0,5 ml del sovrantante trasparente per il dosaggio.

XVI.3 Procedura

- (i) Prendere 4 tubi di vetro con tappi di vetro. Nel primo trasferire 0,5 ml del sovrantante del plasma seminale diluito e deproteizzato, nel secondo 0,5 ml della soluzione di lavoro di fruttosio a 0,28 mM, nel terzo 0,5 ml della soluzione di lavoro di fruttosio a 0,14 mM e nel quarto 0,5 ml di acqua distillata (bianco).

^aKarvonen, M.J. & Malm, M. (1955) Colorimetric determination of fructose with indol. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 7: 305-307.

- (ii) Aggiungere in ciascun tubo 0,5 ml di reagente indolo e 5 ml di HCl concentrato^b.
- (iii) Tappare i tubi di vetro e incubare per 20 minuti a 50 °C.
- (iv) Raffreddare in bagno di ghiaccio fino a temperatura ambiente e leggere l'intensità del colore a 470 nm.

XVI.4 Calcolo

La concentrazione di fruttosio (mmol/l) nel plasma seminale viene calcolata con la seguente equazione: $A_s \times F \times \emptyset$ dove A_s è l'assorbanza del campione di plasma seminale, \emptyset è la diluizione del campione, ed F è il fattore standard medio del fruttosio, secondo la formula:

$$F = 1/2 \left(\frac{0,14}{S_1} + \frac{0,28}{S_2} \right)$$

dove S_1 ed S_2 sono le medie delle letture della densità ottica per gli standard di fruttosio 0,14 mM e 0,28 mM rispettivamente. Il fattore di diluizione \emptyset del plasma seminale è 75 (vedi sezione XVI.2).

XVI.5 Valori normali

13 μ mol o più per eiaculato.

^bSe l'uso dell'HCl concentrato è considerato sgradevole, può essere impiegato un alternativo ma più costoso metodo enzimatico usando la spettrofotometria a raggi ultravioletti (Boehringer-Mannheim kit No. 139106)

Appendice XVII

Determinazione della α -glucosidasi neutra nel plasma seminale

Nella maggior parte degli studi clinici, l'attività enzimatica totale viene misurata a pH 6,8. In aggiunta all'isoenzima neutro originato dagli epididimi, il plasma seminale contiene anche un isoenzima acido il quale è di provenienza prostatica e che può essere inibito selettivamente (Paquin *et al.*, 1984). Il dosaggio seguente accresce la specificità della misurazione dell' α -glucosidasi come un marker epididimario (Cooper *et al.*, 1990).

XVII.1 Reagenti

- (1) Tampone fosfato a pH 6,8 (0,1M) contenente sodio dodecil-solfato (SDS) inibitore della α -glucosidasi acida.

Miscelare 12 ml K_2HPO_4 (0,2M) e 13 ml di KH_2PO_4 (0,2M) e portare a 40 ml circa con acqua distillata. Aggiustare il pH a 6,8 aggiungendo KH_2PO_4 quando il pH è maggiore di 6,8 o K_2HPO_4 quando il pH è minore di 6,8. Portare a un volume finale di 50 ml e conservare a 4 °C. Prima dell'uso dissolvere il SDS nel volume necessario di tampone (ad esempio, 50 mg per 5 ml).

- (2) *p*-Nitrofenol glucopiranoside (PNPG; substrati, 5 g/l di tampone); il volume richiesto deve essere fatto fresco per ciascun esame.

Aggiungere la quantità esatta di PNPG al volume richiesto di reagente 1 (ad esempio 25 mg/5 ml). Scaldare e agitare su una piastra calda a 50 °C per circa 10 minuti.

- (3) Castanospermina (1 mM; inibitore della α -glucosidasi).

10 mM stock: sciogliere 1 mg di castanospermina in 0,53 ml di acqua distillata e conservare a -20 °C.

1 mM di soluzione: aggiungere 0,1 ml di soluzione stock a 10 ml di acqua distillata e conservare 0,2 ml di aliquote a 4 °C. Le aliquote d'avanzo possono essere conservate a -20 °C.

- (4) Na_2CO_3 (0,1M).

Sciogliere 6,20 g di $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ in 500 ml di acqua distillata.

- (5) *p*-Nitrofenolo (PNP; 5 mM; per la curva standard); preparare una soluzione fresca ogni 3 mesi.

Sciogliere 0,0695 g di PNP in acqua distillata, scaldare la soluzione se necessario e portarla a 100 ml in un contenitore graduato. Conservare in una bottiglia scura.

XVII.2 Metodo

- (i) Preparare un bagnomaria a 37 °C per l'incubazione.
- (ii) Scongellare e agitare mediante vortex il plasma seminale conservato a -20 °C.
- (iii) Preparare una soluzione di PNPG (2 x 100 µl per ciascun campione o bianco).
- (iv) Porre 10 µl di plasma seminale (usando una pipetta di precisione) in 100 µl di PNPG in un tubo di Eppendorf e agitare in vortex.
- (v) Come bianco: 10 µl di acqua in 100 µl di PNPG.
- (vi) Come standard interno di controllo: 10 µl da un pool di plasma seminale con alto contenuto di glucosidasi e 10 µl da un pool con basso contenuto di glucosidasi e porre ciascuno di essi in 100 µl di PNPG.
- (vii) Come bianchi seminali: porre 10 µl di plasma seminale da pools ad alto e a basso contenuto di glucosidasi (o lo stesso campione) ciascuno in 100 µl di PNPG. Aggiungere 5 µl di castanospermina in ciascuno.
- (viii) Agitare mediante vortex ciascun tubo e incubare per 4 ore in bagnomaria a 37 °C (sono essenziali una temperatura e un tempo precisi).
- (ix) Interrompere l'incubazione aggiungendo 1 ml 0,1M di Na₂CO₃ a ciascun tubo e agitare.
- (x) Trasferire 250 µl da ciascun tubo su una piastra 96-well e leggere l'assorbanza a 405 nm, usando il bianco per segnare lo zero.
- (xi) Preparare la curva standard del PNP (meno di 1 ora prima di leggere l'assorbanza). Porre 400 µl di soluzione stock a 5 mM in un contenitore graduato da 20 ml e portare a 20 ml con 0,1M di Na₂CO₃ (questa soluzione è 100 µM). Diluire questa soluzione con 0,1M di Na₂CO₃ per dare gli standards di 0, 20, 40, 60, 80 e 100 µM e leggere l'assorbanza.

XVII.3 Calcolo

1 unità di α-glucosidasi = 1 µmol di PNP prodotto per minuto a 37 °C.

Pendenza della curva standard (*S*) = unità di assorbanza/µM.

Guadagno netto di assorbanza per campione (*A*) = assorbanza - la media dei bianchi seminali.

Fattore (*F*) = volume totale ÷ volume del campione ÷ 240 minuti = 0,46.

Attività α-glucosidasica neutrale nel campione = $\frac{A}{S} \times F$ mU/ml

Attività totale = mU/ml x volume di eiaculato = mU/eiaculato.

XVII.4 Valori normali:

20 mU per eiaculato o più.

Nota - I volumi usati nel metodo illustrato (volume totale 1,1 ml) sono per piastre di lettura a 46 well e per tubi Eppendorf. Questi volumi possono essere aggiustati proporzionalmente quando vengono impiegati cuvettes spettrofotometri e provette da incubazione diversi, e, analogamente, appropriate correzioni devono essere fatte per il calcolo dei risultati.

Bibliografia

- Cooper, T.G., Yeung, C.H., Nashan, D., Jockenhövel, F. & Nieschlag, E. (1990) Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of α-glucosidase in seminal plasma. *International Journal of Andrology*. **13**: 297-305.
- Paquin, R., Chapdelaine, P., Dube, J.Y., & Tremblay, R.R. (1984) Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal α-1,4-glucosidase. *Journal of Andrology*. **5**: 277-82.

Appendice XVIII

Swelling test ipo-osmotico per spermatozoi^a

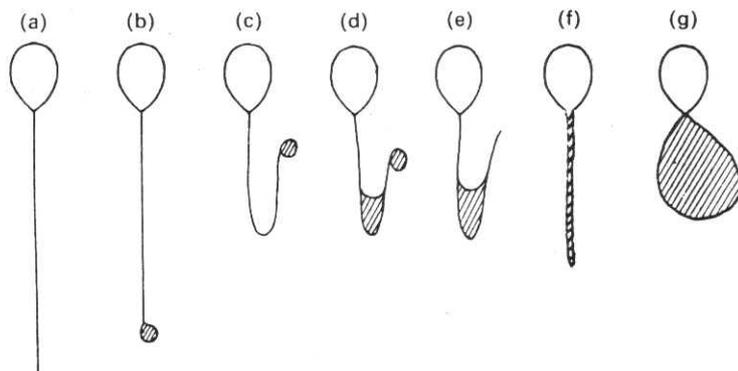
XVIII.1 Soluzione swelling

Sciogliere 0,735 g di sodio citrato $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1,351 g di fruttosio in 100 ml di acqua distillata. Conservare la soluzione a -20°C . Scongelare e agitare prima dell'uso.

XVIII.2 Metodo

Scaldare 1 ml di soluzione swelling in un tubo di Eppendorf chiuso a 37°C per circa 5 minuti. Aggiungere 0,1 ml di liquido seminale liquefatto e miscelare delicatamente con la pipetta. Porre a 37°C per almeno 30 minuti (ma non oltre 120 minuti) e esaminare gli spermatozoi con microscopio a contrasto di fase. Il rigonfiamento degli spermatozoi è identificato come cambiamento nella forma della coda, come illustrato in Fig. XVIII.1. Ripetere due volte il punteggio delle cellule rigonfiate per un totale di 100 spermatozoi contati e calcolare il punteggio medio.

Fig. XVIII.1. Rappresentazione schematica delle modificazioni morfologiche tipiche degli spermatozoi umani sottoposti a stress ipo-osmotico: a = nessun cambiamento; b-g = vari tipi di modificazioni della coda. La regione della coda che mostra il rigonfiamento è indicata dalla area incisa.



^aJeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G. & Zaneveld, L.J.D. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, **70**: 219-28.

Appendice XIX

Protocollo per il test di penetrazione nell'uovo di hamster

XIX.1 Protocollo standard

XIX.1.1 Procedura

- (i) Lasciare passare da 30 a 60 minuti per una completa liquefazione del liquido seminale.
- (ii) Il medium colturale per questo test è il BWW (Biggers *et al.*, 1971). Questo medium è preparato come soluzione stock (vedi tabella) che può essere conservata a 4 °C per alcune settimane senza che si deteriori. Nel 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% (600 g/l), 3 mg di sodio piruvato, 350 mg di albumina serica bovina Frazione V, 10000 unità di penicillina, 10 mg di streptomina solfato e 20 mmol/l di sali di HEPES. Il medium dovrebbe essere riscaldato a 37 °C prima dell'uso, preferibilmente in un'atmosfera di CO₂ al 5% e aria al 95%.

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 di liquido seminale sono preparati per questo test usando le tecniche di preparazione descritte in Appendice XXIV. Se viene impiegata la procedura swim-up, possono essere preparati un numero di tubi da 3 a 10 a seconda del volume del campione e della concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale.

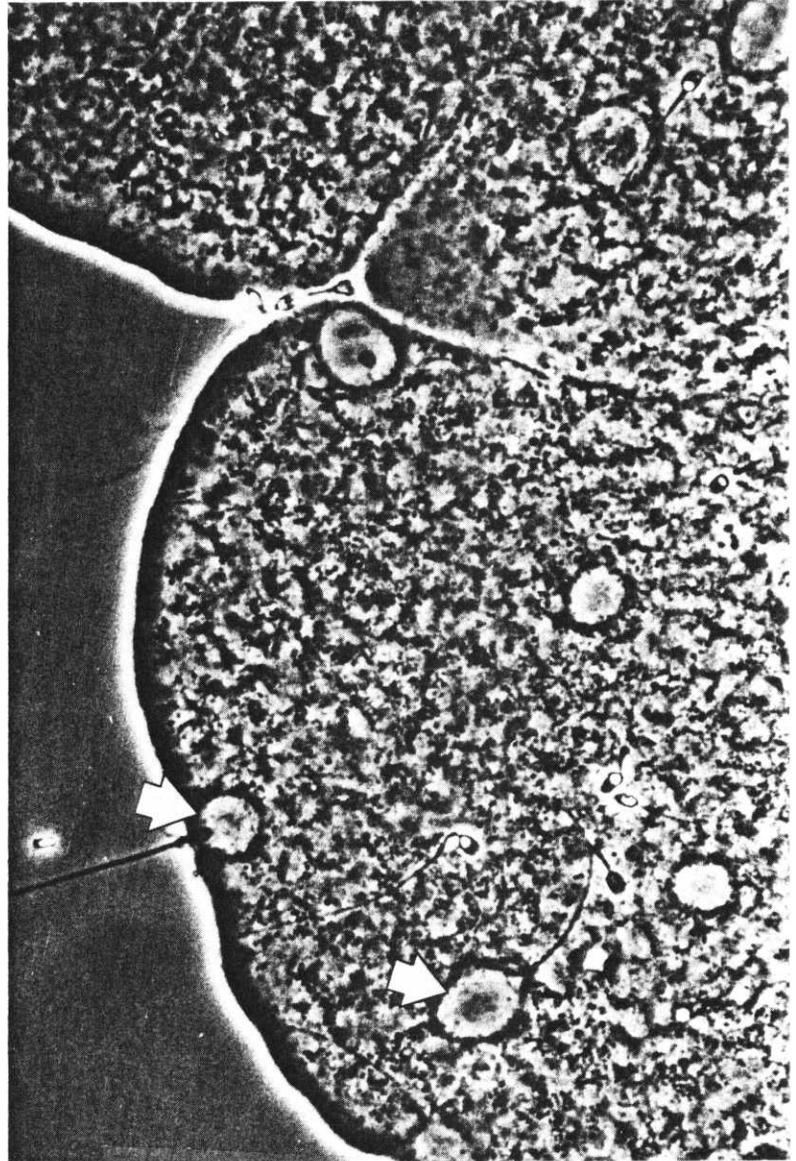
I tubi sono incubati a 37 °C per un'ora in un'atmosfera di 5% di CO₂ e 95% di aria. Se questo tipo di incubatore non è disponibile, i tubi possono essere tappati accuratamente e mantenuti a 37 °C in atmosfera di aria. Durante il periodo di incubazione gli spermatozoi con maggiore mobilità migrano dal plasma seminale al medium sovrastante.

- (iv) Il pellet degli spermatozoi è quindi risospeso a circa 10×10^6 spermatozoi/ml in un volume di non meno di 0,5 ml e incubato per 18-24 ore a 37 °C in un'atmosfera di 5% di CO₂ e 95% di aria. Se un incubatore a CO₂ non è disponibile, i tubi possono essere tappati accuratamente e incubati a 37 °C in atmosfera di aria. Durante il periodo di incubazione i tubi devono essere inclinati con un angolo di 20° sul piano orizzontale allo scopo di prevenire la sedimentazione degli spermatozoi e di incrementare l'area di superficie per gli scambi gassosi.
- (v) Gli oociti possono essere prelevati da hamster immaturi o nel primo giorno del ciclo estrale. Siero di cavalla incinta (*pregnant mare's serum*, PMS) e gonadotropine corioniche umane (hCG) sono iniettate intraperitonealmente alla dose di 30-40 UI, da 48 a 72 ore di distanza. Gli oociti dovrebbero essere quindi recuperati entro 18 ore dopo l'iniezione delle hCG e preparati a temperatura ambiente usando ialuronidasi allo 0,1% (1 g/l) e tripsina allo 0,1% (1 g/l) per rimuovere le cellule del cumulo e della zona pellucida, rispettivamente. Ciascun trattamento enzimatico dovrebbe essere seguito da due lavaggi nel medium BWW. Gli oociti isolati possono essere scaldati a 37 °C e introdotti immediatamente nella sospensione di spermatozoi o conservati a 4 °C fino a 24 ore.
- (vi) Alla fine della 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 a 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 di aria al 95% per 3 ore.
- (vii) Viene poi determinato il numero degli spermatozoi che hanno penetrato gli oociti 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 22 mm x 22 mm ed esaminati in contrasto di fase. (E' possibile inoltre il fissaggio e la conservazione degli oociti, per esempio in glutaraldeide all'1% (10 ml/l) seguiti da colorazione con lacmoide o aceto-orceina).
- (viii) Quindi gli oociti dovrebbero essere esaminati per determinare gli spermatozoi presenti nel citoplasma e il numero medio di spermatozoi incorporati per ogni oocita (Fig. XIX.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.

XIX.2 Protocollo di incorporazione del Ca ionoforo (A23187)

Una popolazione di spermatozoi molto mobili viene preparata attraverso un centrifugato secondo gradiente di Percoll impiegando un gradiente discontinuo di 2 livelli come descritto in Appendice XXIV. Il pellet alla base dell'80% della frazione è quindi sciolto in 8 ml di medium BWW, centrifugato a 500 g per 5 minuti e infine risospeso a una concentrazione di 5×10^6 spermatozoi mobili/ml.

Fig. XIX.1. Oocita di hamster privo di zona contenente spermatozoi umani, come risulta dalla 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).



A23187 viene preparato come segue: una sospensione di 1 mM (mmol/l) di acido libero di A23187 viene preparata da uno stock di 10 mM in dimetilsulfoxide (DMSO) diluita da 1 a 10 con medium BWB. Questa sospensione viene messa a 4 °C per almeno 3 giorni prima dell'uso.

Nel giorno del test, l'A23187 viene aggiunto agli spermatozoi per ottenere 2 concentrazioni finali di 1,25 e 2,5 μM ($\mu\text{mol/l}$). La curva di risposta per il trattamento ionoforo varia da individuo a individuo e come risultato è preferibile testare ogni paziente sia a 1,25 che a 2,5 μM . Gli spermatozoi vengono incubati con lo ionoforo per 3 ore, dopo di che le cellule sono separate mediante centrifugazione a 500 g e risospese nello stesso volume di medium BWB fresco.

A questo punto va valutata la percentuale di spermatozoi mobili e la concentrazione di spermatozoi è riaggiustata a $3,5 \times 10^6$ spermatozoi

mobili/ml prima che siano distribuiti come gocce di 50-100 μ l sotto olio di paraffina. Comunque risultati validi possono essere ottenuti anche usando concentrazioni più basse di 1×10^6 spermatozoi mobili/ml (Aitken & Elton, 1986).

Gli oociti zona-free sono preparati come descritto da Yanagimachi *et al.* (1976) e distribuiti in gocce con incidenza di circa 5 oociti/goccia e 20 oociti/campione.

Dopo ulteriori 3 ore gli oociti sono recuperati dalle gocce, lavati da spermatozoi, compressi a una profondità di circa 30 μ m sotto un coprioggetti 22 x 22 mm su un vetrino e saggiate per la presenza di teste di spermatozoi decondensati con code attaccate o strettamente connesse, usando un microscopio a contrasto di fase. Il numero di spermatozoi che sono penetrati nelle uova viene saggiato e i risultati espressi come il numero medio di spermatozoi penetrati in ciascun uovo.

XIX.3 Controllo di qualità

Questo test deve essere eseguito con un grado adeguato di controllo di qualità. La variazione intra-assay dovrebbe essere stabilita 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 2 unità di deviazione standard il valore medio, dovrà essere considerato non attendibile. Qualunque test in cui la penetrazione sia totalmente assente dovrà essere ripetuto utilizzando un altro campione di liquido seminale.

Bibliografia

- Aitken, R.J., & Elton, R.A. (1986) Application of a Poisson-gamma model to study the influence of gamete concentration on sperm-oocyte fusion in the zona-free hamster egg penetration test. *Journal of Reproduction and Fertility*. **78**: 733-39.
- Aitken, R.J., Templeton, A., Schats, R., Best, F., Richardson, D., Djahanbakhch, O. & 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 & H. Lindner. Berlin, Springer. pp. 147-65.
- Biggers, J.D., Whitten, W.K. & Whittingham, D.G. (1971) The culture of mouse embryos *in vitro*. In *Methods in Mammalian Embriology*. ed J.C. Daniel, San Francisco, Freeman, pp. 86-116.
- Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. & 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.

Appendice XX

Analisi computerizzata del liquido seminale (CASA)

XX.1 Preparazione del liquido seminale per apparecchio CASA

In generale, i criteri per la raccolta e il trattamento del liquido seminale per applicazioni CASA sono identici a quelli specificati nella Sezione 2A per l'analisi manuale. Il sistema CASA deve includere la fornitura per il mantenimento di una temperatura specifica di 37 °C perché i parametri del movimento spermatico sono sensibili alla temperatura.

I sistemi CASA correnti hanno difficoltà ad effettuare una continua identificazione individuale dello spermatozoo quando vi siano concentrazioni superiori a, approssimativamente, 40×10^6 spermatozoi/ml (Vantman *et al.*, 1988). Quindi, alcuni campioni richiedono una diluizione se si vuole ottenere una misurazione precisa. Il diluente da preferire è plasma seminale omologo, che può essere ottenuto con una delicata centrifugazione. Talvolta può essere non facile ottenere plasma seminale fresco omologo. Per esempio, un liquido seminale molto viscoso preclude la semplice estrazione di una componente plasmatica seminale limpida. Un plasma seminale eterologo, stoccato e/o crioconservato non può essere standardizzato e può avere effetti negativi sul liquido seminale fresco. Quindi è raccomandato che per la diluizione del liquido seminale venga impiegato un medium artificiale isotonico, con pH 7,2-7,5, se non è ottenibile un plasma seminale fresco omologo. Il tampone fosfato di Dulbecco in soluzione salina è utilizzabile per questo scopo. Se la concentrazione spermatica iniziale è $\geq 100 \times 10^6$ spermatozoi/ml, una successiva aggiunta di albumina serica bovina (0,3 g/l) e glucosio (1 g/l) al medium, può prevenire alterazioni nella motilità spermatozoaria dovuta alla diluizione.

Può essere preparato un vetrino standard per microscopio. Per l'analisi del liquido seminale, è accettabile l'applicazione di 7 μ l di materiale per vetrino, che è coperto con un coprivetrino 22 x 22 mm. Questo determina una profondità nel preparato di circa 15 μ m. Sono da preferire speciali camere che hanno una profondità predeterminata fissa e che includono la camera di Makler (Sefi Medical Instruments; 10 μ m di profondità) e la camera Microcell (Fertility Technologies, Inc.; 20 μ m di profondità). Liquidi seminali molto viscosi si studiano meglio con camera di Makler. Se gli spermatozoi umani devono essere esaminati durante capacitazione, e specialmente durante motilità iperattivata, allora è accettabile una profondità di 20 μ m per gli

spermatozoi subito dopo la separazione dal plasma seminale e la risospensione in medium capacitante. Per l'analisi della iperattivazione, lo spessore minimo accettabile dovrebbe essere maggiore. Uno spessore di 50 μm è appropriato in questi casi e può essere ottenuto usando una camera Microcell di questa misura. Alternativamente, uno spessore di 50 μm può essere ottenuto usando un capillare piatto di questa dimensione verticale (Vitro Dynamics, Inc.).

Attualmente nella analisi computer-assistita del liquido seminale umano, gli spermatozoi sono osservati usando un'ottica positiva a contrasto di fase, generalmente con un ingrandimento di 67 x (10 x le lenti dell'obbiettivo e 6,7 x le lenti dell'oculare). La ditta produttrice suggerirà i requisiti specifici del microscopio. Quando gli spermatozoi sono osservati dopo separazione dal plasma seminale, un'ottica a contrasto di fase negativa con lo stesso ingrandimento fornisce immagini degli spermatozoi di maggior chiarezza. Questo richiede l'uso di un obbiettivo con lenti a contrasto di fase negativo, ma tutte le altre componenti ottiche sono le stesse del contrasto di fase positivo tradizionale.

XX.2 Videoregistrazione del liquido seminale per l'analisi computer-assistita degli spermatozoi

Si raccomanda che sia effettuata una registrazione degli spermatozoi e che l'analisi computerizzata sia effettuata da questa registrazione piuttosto che direttamente dalla telecamera. Questo aumenta la standardizzazione e la garanzia di una procedura corretta (vedi Capitolo 5). L'utente dovrebbe comunicare al produttore quale videoregistratore sia stato scelto. E' utile incorporare un video time generator o un dispositivo codificatore simile, cosicché ciascun campione possa ricevere un distinto codice numerico o alfanumerico.

L'intensità di luce del microscopio dovrebbe essere standardizzata mentre è in corso la registrazione, agendo sulla manopola o leva di controllo della sorgente luminosa del microscopio. L'illuminazione è migliore se il voltaggio al microscopio è stabile.

E' importante che un'immagine del campo microscopico sia registrata misurando l'intero vetrino evitando i bordi del preparato. Almeno 10 campi siffatti dovrebbero essere videoregistrati per 7-10 secondi ciascuno. Soprattutto con campioni con bassa concentrazione spermatozoaria, ad esempio, meno di 10×10^6 spermatozoi/ml, almeno 20 campi possano essere necessari per ottenere campioni di almeno 100 spermatozoi mobili per analisi (vedere oltre). Durante la videoregistrazione, le teste degli spermatozoi dovrebbero essere tenute a fuoco e l'illuminazione aggiustata sul microscopio per ottenere il massimo contrasto tra le teste degli spermatozoi e il sottofondo.

XX.3 Uso dello strumento CASA

Le istruzioni del fabbricante dovrebbero essere seguite con attenzione quando viene "settato" lo strumento. Questo dovrebbe essere mantenuto in un ambiente asciutto, privo di polvere, in cui vi siano minime fluttuazioni di temperatura. Particolare attenzione dovrebbe essere posta alla procedura di "thresholding", procedura che consiste nell'aggiustare la luminosità dell'immagine CASA prima di procedere

all'analisi. Altri passi importanti consistono nella calibrazione dell'ingrandimento dell'immagine, la specificazione delle misure della testa degli spermatozoi permesse e l'aggiustamento dei parametri da seguire per il range di velocità degli spermatozoi mobili. E' importante distinguere tra il settaggio utilizzato nel conteggio degli spermatozoi mobili e quello usato per misurare i singoli parametri del movimento spermatozoario. Quando il CASA è pronto per ciascuna sessione di analisi, l'uso delle videoregistrazioni per i campioni seminali dotati di svariate concentrazioni fornisce una base per i controlli di qualità (Destefano *et al.*, 1989). Questi nastri potrebbero essere fatti da ciascun utente o condivisi tra più operatori.

Viene raccomandato che il CASA sia utilizzato per conteggiare i movimenti di tutti gli spermatozoi per un tempo di circa mezzo secondo, a un numero di "frame" di 25-30 al secondo (a seconda degli standard elettrici del paese e al conseguente adattamento dello strumento). L'esame di tutti gli spermatozoi per questo intervallo di tempo migliora l'accuratezza e la precisione con cui i singoli parametri di movimento sono conteggiati (Mack *et al.*, 1988). Tempi di intervallo più corti potrebbero ridurre l'accuratezza con cui vengono compiute le misurazioni dei pattern di movimento della testa dello spermatozoo.

XX.4 Terminologia CASA

Esiste una terminologia standard per i parametri misurati con un sistema CASA, alcuni dei quali sono illustrati nella figura XX.1.

VCL = *curvilinear velocity* (velocità curvilinea) ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa spermatozoaria lungo la sua attuale traiettoria curvilinea, osservata in due dimensioni dal microscopio.

VSL = *straight-line velocity* (velocità rettilinea) ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa spermatozoaria lungo la linea retta tra la sua prima e la sua ultima posizione rilevata.

VAP = *average path velocity* (velocità di traiettoria media) ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa di spermatozoo lungo la sua traiettoria media spaziale. Questa traiettoria è computata appianando la traiettoria attuale in accordo con gli algoritmi dello strumento; tali algoritmi variano a seconda dello strumento CASA utilizzato.

ALH = *amplitude of lateral head displacement* (ampiezza dei movimenti laterali della testa) (μm). Entità dei movimenti laterali di una testa di spermatozoo rispetto alla sua traiettoria media spaziale. Il valore può essere espresso sia come movimento massimo che come media. I diversi strumenti CASA computano l'ALH usando diversi algoritmi, cosicché i valori non sono ben comparabili tra loro.

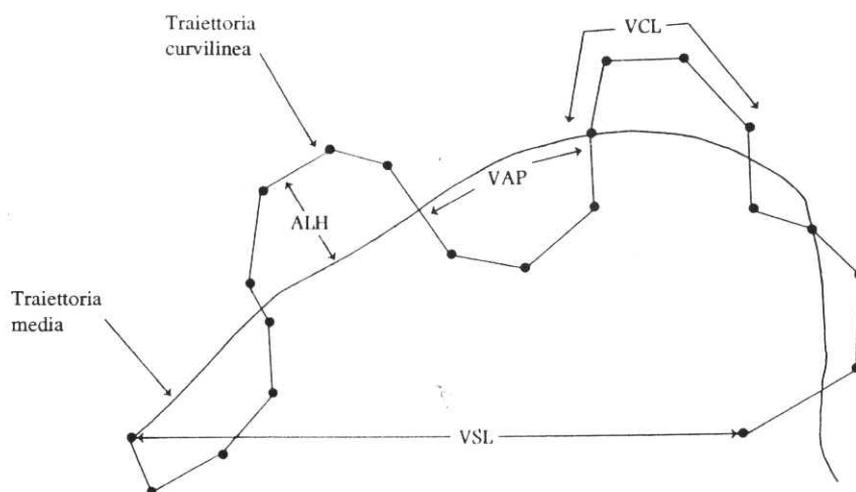
LIN = *linearity* (linearità). La linearità di una traiettoria curvilinea, VSL/VCL.

WOB = *wobble* (oscillazione). Misurazione dell'oscillazione della traiettoria attuale rispetto alla sua traiettoria media spaziale, VAP/VCL.

STR = *straightness* (rettilineità). Linearità della traiettoria media spaziale, VSL/VAP.

BCF = *beat/cross frequency* (frequenza dei battiti laterali del flagello) (battiti/s). Tempo medio in cui la traiettoria curvilinea spermatozoaria attraversa la sua traiettoria media spaziale.

Figura XX.1.
Terminologia
standard per i
parametri misurati
con un sistema
CASA.



MAD= *mean angular displacement* (movimenti angolari medi) (gradi).
Il tempo medio dei valori assoluti dell'angolo di deviazione istantanea della testa spermatozoaria lungo la sua traiettoria rettilinea.

I diversi strumenti CASA utilizzano diversi algoritmi matematici per calcolare molti di questi parametri di movimento. Il grado di comparabilità di misurazione tra tutti gli strumenti non è ancora conosciuto. Comunque, un confronto iniziale dà una relativa buona concordanza tra alcuni strumenti (Davis & Katz, 1992).

XX.5 Analisi statistica

Viene raccomandato che l'analisi CASA ottenga parametri di movimento per almeno 100 tracce di spermatozoi mobili per esame. Questo richiederà la ricerca di molti più spermatozoi. Qualora si desideri classificare gli spermatozoi in sottoclassi di movimento o effettuare altre analisi di variabilità nell'ambito dell'esame, sono necessarie almeno 200 tracce mobili. Per standardizzare il numero di spermatozoi analizzati per esame dovrebbe essere trovato uno schema sperimentale. È conveniente interfacciare lo strumento CASA con un computer con apposito software che permetta un'organizzazione dei dati e un'analisi statistica. Le distribuzioni di molti dei parametri di movimento di un singolo campione non sono normali. Quindi viene raccomandato che sia usata la mediana piuttosto che i valori medi per riassumere la tendenza centrale di ciascun parametro di movimento. A seconda dell'analisi statistica che viene svolta, può essere necessario compiere trasformazioni matematiche del parametro per il singolo spermatozoo prima di ciascuna analisi. In alcuni casi possono essere necessari tests statistici non parametrici.

Bibliografia

- Destefano, F., Annet, J.L., Kresnow, W., Schrader, S.M. & Katz, D.F. (1989) Semen characteristics of Vietnamese veterans. *Reproductive Toxicology*. **3**: 165-73.
- Mack, S.O., Wolf, D.P. & Tash, J.S. (1988) Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biology of Reproduction*. **38**: 270-81.
- Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M. & Scherins, R.J. (1988) Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertility and Sterility*. **49**: 510-16.

Appendice XXI

Istruzioni da dare ai pazienti in preparazione al post-coital test

Il post-coital test viene eseguito il più vicino possibile al momento dell'ovulazione, quando il muco cervicale è più recettivo alla penetrazione degli spermatozoi. Questo è uno dei test eseguibili nella diagnostica dell'infertilità. Le istruzioni che seguono dovrebbero essere seguite il più rigidamente possibile in preparazione del post-coital test.

- (i) Lei e la Sua partner dovete astenervi da rapporti sessuali per almeno 2 giorni prima di eseguire il 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 giorno più idoneo per il test è: — (giorno) — (mese) — (anno). Il rapporto avverrà in questo giorno compatibilmente con le vostre esigenze. (Tenere un assorbente igienico a disposizione).
- (iv) Dopo il coito la donna deve restare distesa supina per circa 30 minuti con le ginocchia piegate a sollevare i fianchi per prevenire la perdita di liquido seminale.
- (v) Indossare un assorbente igienico/tampone per evitare perdita di liquido seminale.
- (vi) Presentarsi alla clinica per il test alle — (ora) del — (giorno) — (mese) — (anno).
- (vii) Non rimuovere l'assorbente igienico/tampone fino al momento della visita del medico.

Modulo di registrazione dati per la valutazione del muco cervicale e per il post-coital test

Data dell'ultima mestruazione

Giorno	Mese	Anno
_ _ _ _ _	_ _	_ _ _ _

Punteggio giornaliero del muco cervicale

	Giorno	Mese	Giorno	Mese	Giorno	Mese	Giorno	Mese
Data	_ _ _ _	_ _	_ _ _ _	_ _	_ _ _ _	_ _	_ _ _ _	_ _
Giorno del ciclo		_ _		_ _		_ _		_ _
Volume		_		_		_		_
Consistenza		_		_		_		_
<i>Ferning</i> (cristallizzazione)		_		_		_		_
<i>Spinnbarkeit</i> (filanza)		_		_		_		_
Cellularità		_		_		_		_
Punteggio totale		_ _		_ _		_ _		_ _
pH		_ _		_ _		_ _		_ _

Post-coital test

	Giorno	Mese	
Data	_ _ _ _	_ _	
Tempo trascorso dal coito (ore)		_ _	
	Prelievo vaginale	Prelievo esocervicale	Prelievo endocervicale
Spermatozoi/mm ³	_ _ _ _	_ _ _ _	_ _ _ _

Motilità (100 spermatozoi)

(a) rapidamente progressivi	_ _	_ _	_ _	_ _
(b) lentamente progressivi	_ _	_ _	_ _	_ _
(c) non progressivi	_ _	_ _	_ _	_ _
(d) immobili	_ _	_ _	_ _	_ _