

## Appendice XXII

---

### *Interazione tra spermatozoi e muco cervicale: il test del tubo capillare*

#### **XXII.1 Attrezzatura**

A partire dal lavoro di Kremer (1965, 1980), l'uso del "capillary tube test" per la valutazione clinica della penetrazione del muco cervicale ha avuto un grande sviluppo, e i principi di questo metodo rimangono validi tutt'oggi. Il test misura la capacità degli spermatozoi di penetrare una colonna di muco cervicale in un tubo capillare. Sono stati impiegati vari tipi di tubi capillari, ma vengono raccomandati quelli con sezione trasversale rettangolare. La procedura specifica qui raccomandata fu introdotta da Pandya *et al.* (1986) ed è una versione semplificata della procedura di Kroeks & Kramer (1980). Il test utilizza un tubo capillare piatto lungo 10 cm e con sezione trasversale di 3 per 0,3 mm. Tali capillari possono essere ottenuti dalla Vitro Dynamics, Rockaway, NJ, USA. Il capillare dovrebbe essere marcato a intervalli di 1 centimetro, usando una penna a inchiostro indelebile a punta fine.

#### **XXII.2 Metodo**

Dovrebbe essere usato liquido seminale fresco, non più vecchio di un'ora dall'ejaculazione. Il muco cervicale va aspirato nel capillare, facendo attenzione che non entrino bolle d'aria. Il caricamento del capillare può essere ottenuto usando un semplice collettore realizzato ponendo sulla parte terminale larga di una pipetta Pasteur un sigillante elastico come una colla al silicone (Katz *et al.*, 1980). Viene fatta un'apertura piatta nel sigillante, attraverso la quale viene in seguito apposto il capillare. L'aspirazione viene fatta alla parte opposta della pipetta mentre la parte terminale aperta del capillare piatto viene posto nel muco. Il capillare dovrebbe essere riempito di muco in modo che il menisco di muco non sia superiore a 2-3 cm dalla fine del capillare. Il filamento di muco viene tagliato dall'estremità inferiore del capillare mentre la parte superiore viene sigillata con plastilina, argilla da modellare o sostanze simili. Tali sostanze sigillanti devono essere applicate fino a che la colonna di muco fuoriesca appena dalla estremità superiore del capillare. Dopo aver riempito il capillare, questo dovrebbe essere esaminato al microscopio per verificare la presenza di spermatozoi nel muco. Se sono presenti spermatozoi,

dovrebbe essere determinato il loro numero e il movimento, cosicché possa essere fatta una correzione nell'analizzare la penetrazione del liquido seminale fresco.

Una piccola quota di liquido seminale ben miscelato (50 µl) viene pipettato in un contenitore come una capsula No. 00 BEEM, sul cui coperchio viene praticata una incisura per poter accogliere e sostenere il capillare. Così il capillare rimane orientato verticalmente durante la penetrazione spermatozaria. Se il contenitore non possiede un coperchio, il capillare dovrebbe essere sostenuto perché rimanga più verticalmente possibile e una spugna o un panno umidi dovrebbero coprire l'apertura del contenitore. La temperatura a cui viene eseguito il test dovrebbe essere standardizzata a 37 °C, temperatura cui si riferisce la metodica presentata qui.

### **XXII.3 Valutazione del test**

Questo test valuta sia la distanza di migrazione degli spermatozoi penetrati che la loro concentrazione lungo il capillare. Questa informazione viene combinata in un singolo punteggio quantitativo. Dopo un'ora di contatto tra liquido seminale e muco, il capillare viene rimosso dal contenitore e la sua parte terminale viene sciacquata con soluzione salina o, preferibilmente, con una soluzione mucolitica come dithiotreitol (DTT, Catalogo Sigma No. D0632; 10 g/l) o mercaptoetanolo, per rimuovere gli spermatozoi residui dalla interfaccia con il muco e dalla superficie esterna del capillare. Questo viene posto al microscopio ed esaminato con un obbiettivo 40 x a contrasto di fase e lenti oculari 10 x. Il numero degli spermatozoi viene conteggiato in 3 campi microscopici ai segni 1 cm, 4 cm e 7 cm lungo il capillare. Viene determinato il numero totale di spermatozoi in ciascun gruppo di tre campi esaminati sottraendo gli eventuali spermatozoi presenti fin dall'inizio nel capillare. Questo valore viene espresso come numero per mm<sup>2</sup> e viene calcolato conoscendo l'area del campo microscopico. Tale area può essere calibrata usando un micrometro. Viene anche annotata la posizione degli spermatozoi più avanzati. Il risultato del test viene espresso come un punteggio che ha come massimo 20. Questo è la somma dei punteggi per il numero degli spermatozoi a 1 cm, 4 cm e 7 cm lungo il capillare, più il punteggio per la posizione degli spermatozoi più avanzati. La tabella seguente riassume il calcolo:

Numero spermatozoi/mm <sup>2</sup>	Punteggio	Spermatozoi più avanzati	Punteggio
0	0	Meno di 3 cm	0
1-30	1	≥ 3 - < 4 cm	1
31-60	2	≥ 4 - < 5 cm	2
61-120	3	≥ 5 - < 6 cm	3
121-200	4	≥ 6 - < 7 cm	4
> 200	5	≥ 7 cm	

Il risultato del calcolo viene poi espresso secondo la seguente tabella.

Punteggio totale	Risultato	Ordine
0	Negativo	0
1-8	Povero	1
9-11	Intermedio	2
12-15	Buono	3
16 o più	Eccellente	4

### Bibliografia

- Katz, D.F., Overstreet, J.W. & Hanson, F.W. (1980) A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus. *Fertility and Sterility*. **33**: 179-86.
- Kremer, J. (1965) A simple penetration test. *International Journal of Andrology*. **10**: 209-15.
- Kremer, J. (1980) *In vitro* sperm penetration in cervical mucus and AIH. In: *Homologous Artificial Insemination (AIH)*, ed. Emperaire, J.C., Audebert, A. & Hafez, E.S.E. The Hague, Martinus Nijhoff, pp 30-7.
- Kroeks, N.I. & Kremer, J. (1980) The role of cervical factors in infertility. In: *The infertile couple*. ed Pepperell, R.J., Hudson, B. & Wood, C. Edinburgh, Churchill-Livingstone, p. 112.
- Pandya, I.J., Mortimer, D. & Sawers, R.S. (1986) A standardized approach for evaluating the penetration of human spermatozoa into cervical mucus *in vitro*. *Fertility and Sterility*. **45**: 357-60.

## *Appendice XXIII*

---

### *Procedura standard per il conteggio delle cellule e degli spermatozoi nel muco cervicale*

La preparazione del vetrino da esaminare al microscopio deve essere standardizzata a uno spessore noto al fine di eseguire un conteggio obiettivo della concentrazione delle cellule e degli spermatozoi. Ciò può essere ottenuto sostenendo il coprivetrino con grasso al silicone (o altro materiale non spermato tossico) impregnato con microsfere dello spessore desiderato (Drobnis *et al.*, 1988). "Supporti" di grasso possono essere posti in 4 punti del vetrino corrispondenti ai 4 angoli del coprivetrino (tipicamente 22 x 22 mm). La sospensione di spermatozoi muco ecc. viene posta nello spazio tra questi 4 supporti e quindi il coprivetrino viene posto sopra di essi. Il preparato può essere sigillato pipettando olio minerale negli spazi tra i supporti. Viene raccomandato che le preparazioni contenenti muco cervicale siano sostenute da grasso contenente particelle di vetro del diametro di 100 µm (ottenibili da Sigma Chemical Co; Catalogo No. G4649). Queste devono essere lavate prima di essere mescolate con il grasso. La procedura è la seguente:

#### **Lavaggio**

Coprire 150 ml di particelle con acetone, agitare vigorosamente e lasciar decantare.

Ripetere 2 volte.

Risciacquare 4-6 volte con acqua deionizzata.

Coprire con 1 M (mol/l) di HCl, agitare per 20 minuti e decantare l'acido.

Risciacquare 4-6 volte con acqua deionizzata.

Coprire con 2 M di NaCl, agitare 10 minuti e decantare la salina.

Risciacquare 2 volte con 2 M di NaCl.

Risciacquare 10 volte con acqua deionizzata, agitando 2-5 minuti a ciascun risciacquo.

Stendere le particelle su un piatto da forno in Pyrex o altro contenitore piano e asciugare in un forno.

Le particelle possono essere poste in autoclave e conservate sotto un cappuccio sterile.

#### **Preparazione del materiale grasso di sostegno**

Riempire approssimativamente 10 ml di olio silicone (*high vacuum grease*, Dow Corning Corporation) o materiale equivalente in un beaker.

Aggiungere approssimativamente 2 ml di particelle di vetro lavate e miscelare.

Rimuovere il sovranatante mediante una siringa da 5 o 10 ml (ad esempio Sigma Chemical Co.). Usando una spatola, porre quanto più possibile materiale oleoso nella siringa.

Ricollocare il sovranatante e con la siringa diretta verso l'alto espellere più aria possibile. Preparare la siringa con un ago 10-gauge smussato.

### **Conteggio degli spermatozoi o altre cellule nella preparazione**

Viene raccomandato che tutti gli spermatozoi e le cellule contate siano espresse in cellule/mm<sup>3</sup>. La calibrazione dell'ottica di ogni microscopio può essere ottenuta attenendosi ai seguenti concetti: tradizionalmente la densità degli spermatozoi o altre cellule nel muco cervicale è stata espressa in numero di cellule per "high powered field" (HPF). La più comune combinazione di lenti da microscopio per ottenere questo, è stata basata su un 40× come lente per obiettivo e 10× come lente oculare (14 mm) che rende un ingrandimento di 400×. Tuttavia le dimensioni del campo visto da un esaminatore dipendono dalla dimensione dell'apertura della lente dell'oculare. I moderni microscopi sono generalmente equipaggiati con oculari a largo campo visivo aumentando con ciò le dimensioni del campo osservato. Il diametro del campo osservato è uguale al diametro dell'apertura delle lenti oculari diviso l'ingrandimento delle lenti dell'obiettivo. Una tipica lente oculare 10× ad ampio campo visivo ha un'apertura di 20 mm. Così il diametro del campo microscopico visto con un oculare a largo campo 10× e una lente dell'obiettivo 40× è approssimativamente 500 μm. Se questo campo è profondo 100 μm, il suo volume è quindi 0,02 mm<sup>3</sup>. Così un conto di 10 cellule/HPF è equivalente ad approssimativamente 500 cellule/mm<sup>3</sup> sotto queste condizioni.

### **Bibliografia**

Drobnis, E.Z., Yudin, A.L., Cherr, G.N. & Katz, D.F. (1988) Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Developmental biology*. **130**: 311-23.

## *Appendice XXIV*

---

### *Tecniche di preparazione del liquido seminale*

#### **Procedura**

Sono descritte 2 semplici procedure di preparazione basate sul "swim up" degli spermatozoi mobili dal liquido seminale e sulla centrifugazione su gradiente di Percoll discontinuo. Per ambedue le tecniche il terreno di coltura suggerito è l'Earle's supplementato, sebbene siano appropriati anche altri terreni come l'Hams F10.

#### **XXIV.1**

##### **"Swim up"**

In una provetta sterile da centrifuga da 15 ml contenente il liquido seminale (1 ml) viene delicatamente stratificato terreno di Earle's supplementato (1,2 ml). La provetta è inclinata di 45° e incubata per 1 ora a 37 °C. Viene poi delicatamente riposizionata diritta e viene rimosso 1 ml di sovranatante. Questa aliquota di cellule mobili è quindi diluita con 8 volumi di Earle's supplementato, centrifugato a 500 g per 5 minuti e infine rimesso in sospensione in 0,5 ml di terreno di Earle's per la valutazione della concentrazione o della funzionalità degli spermatozoi, o per altre procedure.

##### *Costituenti del terreno di Earle's supplementato*

46 ml di soluzione salina bilanciata di Earle's

4 ml di siero del paziente inattivato al calore (56 °C per 20 minuti)

1,5 mg di piruvato di sodio

0,18 ml di bicarbonato di sodio

oppure

50 ml di soluzione salina bilanciata di Earle's

300 mg di albumina sierica umana o bovina<sup>a</sup>

1,5 mg di piruvato di sodio

0,18 ml di lattato di sodio

100 mg di bicarbonato di sodio.

<sup>a</sup> Per le procedure di riproduzione assistita come la fertilizzazione *in vitro* (IVF), inseminazione artificiale (AI) o trasferimento dei gameti intratubarico (GIFT), è imperativo che l'albumina sierica umana sia altamente purificata e libera da contaminazioni virali e batteriche. Alcune preparazioni di albumina sono state indicate per queste procedure (ad es. da Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA; Armour Pharmaceuticals, Eastbourne, United Kingdom).

#### **XXIV.2 Gradiente discontinuo di Percoll**

- (i) 3 ml di Percoll all'80% vengono pipettati in una provetta sterile a fondo conico da 15 ml.
- (ii) 3 ml di Percoll al 40% vengono delicatamente pipettati su uno strato di Percoll all'80%, avendo cura di non disturbare l'interfaccia tra i due strati.
- (iii) 1-2 ml di liquido seminale è poi delicatamente stratificato sul gradiente di Percoll e centrifugato a 500 g per 20 minuti.
- (iv) Il pellet alla base della frazione di Percoll all'80% viene poi risospeso in 5-10 ml di terreno di Earle's e centrifugato per 5 minuti a 500 g prima di essere risospeso in 1 ml di terreno di Earle's per una valutazione della concentrazione o funzionalità spermatozoaria o per altre procedure.

*Costituenti del Percoll isotonicco*

10 ml di terreno di Earle's concentrato 10 volte (ad es. da Flow Laboratories)

90 ml di Percoll

300 mg di albumina sierica bovina o umana<sup>a</sup> o 10 ml di siero del paziente inattivato al calore

3 mg di piruvato di sodio

0,37 ml di lattato di sodio (sciroppto al 60%)

200 mg di bicarbonato di sodio

*Costituenti del Percoll all'80%*

40 ml di Percoll isotonicco

10 ml di terreno di Earle's supplementato

*Costituenti del Percoll al 40%*

20 ml di Percoll isotonicco

30 ml di terreno di Earle's supplementato

#### **XXIV.3 Preparazione di campioni di qualità povera**

In caso di oligozoospermia severa e/o astenozoospermia, i gradienti di Percoll sono preferibili rispetto al metodo "swim-up" per il maggior numero di recuperi ottenibile. Inoltre le proporzioni e la composizione del gradiente di Percoll può essere modificato per andare incontro ai bisogni specifici dei singoli campioni. Una possibilità, per esempio, è di sottoporre il campione ad alcuni gradienti mini-Percoll (Ord *et al.*, 1990), contenenti solo 0,3 ml di volume delle frazioni di Percoll 40% e 80%.

#### **Bibliografia**

Ord, T., Patrizio, P., Marello, E., Balmaceda, J.P. & Asch, R.H. (1990) Mini Percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Human Reproduction*. 5: 987-9.

## *Appendice XXV*

---

### *Requisiti di base per il laboratorio di andrologia*

Quella che segue è una lista di materiali ed attrezzi che rendono un laboratorio idoneo per effettuare i test di base suggeriti in questo manuale e per funzionare come un laboratorio di andrologia. Questo presuppone che siano disponibili almeno un frigorifero, una centrifuga ("swing-out rotor") e un termostato.

**A. Protezioni di sicurezza di un laboratorio di andrologia**

1. Guanti in lattice
2. Mascherina facciale
3. Camici da laboratorio
4. Ipoclorito di sodio 5,25 g/l (per es. candeggina per uso domestico diluita 1 a 9 con acqua)
5. Vetri protettivi di sicurezza
6. Kit di pronto soccorso
7. Soluzione di lavaggio per gli occhi
8. Doccia (facoltativa)

**B. Analisi seminale**

1. *Manuale della WHO per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale* (terza edizione)
2. Moduli di registrazione per l'analisi seminale
3. Contenitori ad ampia apertura con coperchio (che sia stato dimostrato non avere effetti lesivi sugli spermatozoi)
4. Pipette Pasteur con contagocce in latex o pipette usa e getta di plastica
5. Pipette automatiche (per es. Eppendorf, Oxford, Finnpipet, Pipetman, disponibili da diversi fornitori)
6. Pipette di precisione per misurare 50 µl come la Wiretrol II W-100(Drummond Scientific Co., 500 Parkway, Broomhall, PA 19008, USA); Chempette series 7947-20 o 7947-30 (Cole-Parmer Instrument Co., 7425 North Oak Park Ave, Chicago, IL 60648-9830, USA); SMI Digital Adjust Micro/Pettor Model P5068-20D (da 20 a 100 µl) (SMI Liquid Handling Products, American Hospital Supply Corporation, Miami FL 33152, USA)
7. Contatore da laboratorio, come il Clay Adams Lab Counter (Fisher Scientific, Springfield, NJ, USA, Catalogo No. 02-670-13)
8. Emocitometro (Modifato Neubauer)

9. Piatto riscaldante (da banco)
10. Miscelatore vortex
11. Microscopio a contrasto di fase, che includa obbiettivi di fase 10 x, 20 x, 40 x e un obbiettivo 100 x a immersione a olio e un oculare 10 x (a campo largo).
12. Fonte luminosa 50-watt.

**C. Interazione tra spermatozoo e muco cervicale**

1. Moduli per la registrazione dei punteggi
2. Siringa per il prelievo del muco, per es. Aspiglaire (BICEF, L'Aigle, France)
3. Tubo capillare di vetro a sezione rettangolare per il test del tubo capillare, di 3 mm di larghezza, 0,3 mm di profondità e 10 cm di lunghezza (Microslide, Vitro Dynamics, Rockaway, NJ, USA).

**D. Reagenti per il test immunobead o MAR**

Vedere Appendice XI e XII.

**E. Esame clinico di un paziente con infertilità**

Orchidometro ("Test size" Remcat Trade AB, PO Box 5011, S-16205, Vallingby, Sweden).

## Bibliografia

---

*Gli asterischi indicano articoli di rassegna*

- Aitken, R.J. & Clarkson, J.S. (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. **81**: 459-69.
- Aitken, R.J. & Clarkson, J.S. (1988) Significance of reactive oxygen species in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*. **9**: 367-76.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S. & Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*. **41**: 183-7.
- Aitken, R.J., Irvine, D.S. & Wu, F.C.W. (1991) Prospective analysis of spermocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *American Journal of Gynecology*. **164**: 542-51.
- Aitken, R.J., Thatcher, S., Glasier, A.F., Clarkson, J.S., Wu, F.C.W. & Baird, D.T. (1987) Relative ability of modified versions of the hamster oocyte penetration test, incorporating hyperosmotic medium or the ionophore A23187, to predict IVF outcome. *Human Reproduction*. **2**: 227-31.
- Aitken, R.J. & West, K.M. (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*. **13**: 433-51.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. & Storey, B.T. (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*. **8**: 338-48.
- Ayvaliotis, B., Bronson, R., Rosenfeld, D. & Cooper, G. (1985) Conception rates in couples where autoimmunity to sperm is detected. *Fertility and Sterility*. **43**: 739-42.
- Barratt, C.L.R., Bolton, A.E. & Cooke, I.D. (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*. **5**: 639-44.
- Berger, T., Marrs, R.P. & Moyer, D.L. (1985) Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertility and Sterility*. **43**: 268-73.
- Bland, J.M. & Altman, D.G. (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. **I**: 307-10.
- \*Boyers, S.P., Davis, R.O. & Katz, D.F. (1989) Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynaecology and Fertility*. Chicago, IL. Year Book Medical Publishers, Inc. **XII**: 173-200.
- \*Bronson, R.A., Cooper, G.W. & Rosenfeld, D. (1984) Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility*. **42**: 171-83.
- Brunner, H., Weidner, W. & Schiefer, H.G. (1983) Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in prostatitis. *Journal of Infectious Diseases*. **147**: 807-13.
- Burkman, L.J., Kruger, T.F., Coddington, C.C., Rosenwaks, Z., Franken, D.R. & Hodgen, G.D. (1988) The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertility and Sterility*. **49**: 688-97.
- Clarke, G.N., Elliott, P.J. & 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., Verschraegen, G. & Vermeulen, L. (1980) Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. *International Journal of Andrology*. **3**: 32-45.
- Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W. & Hanson, F.W. (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*. **15**: 213-26.

- Cummins, J.M., Pember, S.M., Jequier, A.M., Yovich, J.L. & Hartmann, P.E. (1991) A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: Relationship to fertility and other seminal parameters. *Journal of Andrology*. **12**: 98-103.
- \*Davis, R.O. & Katz, D.F. (1992) Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology*. **13**: 81-6.
- Davis, R.O., Rothmann, S.A. & Overstreet, J.W. (1992). Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertility and Sterility*. **57**: 648-53.
- Drevius, L. & Eriksson, H. (1966) Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research*. **42**: 136-56.
- Dunphy, B.C., Kay, R., Barratt, C.L.R. & Cooke, I.D. (1989) Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *Journal of Andrology*. **10**: 378-85.
- Egozcue, J., Templado, C., Vidal, F., Navarro, J., Morer-Fargas, F. & Marina, S. (1983) Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Human Genetics*. **65**: 185-8.
- Gagnon, C. (ed.) (1990) *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Boca Raton, CRC Press.
- Gellert-Mortimer, S.T., Clarke, G.N., Baker, H.W.G., Hyne, R.V. & Johnson, W.I.H. (1988) Evaluation of Nycodenz and Percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. **49**: 335-41.
- Ginsberg, K.A. & Armant, D.R. (1990) The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measurements obtained by manual and videomicrographic analysis. *Fertility and Sterility*. **53**: 882-7.
- Harris, S.J., Milligan, M.P., Masson, G.M. & Dennis, K.J. (1981) Improved separation of motile sperm in asthenozoospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH). *Fertility and Sterility*. **36**: 219-21.
- Hellstrom, W.J.G., Samuels, S.J., Waits, A.B. & Overstreet, J.W. (1989) A comparison of the usefulness of SpermMar and Immunobead tests for the detection of antisperm antibodies. *Fertility and Sterility*. **52**: 1027-31.
- Hill, J.A., Haimovici, F., Politch, J.A. & Anderson, D.J. (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*. **47**: 460-5.
- Huszar, Corrales, M. & Vigue, L. (1988) Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normospermic and oligozoospermic men. *Gamete Research*. **19**: 67-75.
- Huszar, G., Vigue, L. & Corrales, M. (1990) Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligozoospermic men. *Journal of Andrology*. **11**: 40-6.
- Insler, V., Melmed, H., Eichenbrenner, I., Serr, D.M. & Lunnenfeld, B. (1972) The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*. **10**: 223-28.
- Jeyendran, 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 the other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. **70**: 219-28.
- \*Jones, W.R. (1986) Immunological factors in infertility. In *The Infertile Couple*. ed. Pepperell, R.J., Hudson, B. and Wood, C. Edinburgh, Churchill Livingstone (2nd edition).
- Jones, R., Mann, T. & Sherins, R. (1979) Peroxidative breakdown of phospholipids by human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxidizes and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*. **31**: 531-7.
- Jouannet, P., Ducot, B., Feneux, D. & Spira, A. (1988) Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*. **11**: 379-94.
- Katz, D.F., Overstreet, J.W., Samuels, S.J., Niswander, P.W., Bloom, T.D. & Lewis, E.L. (1986) Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology*. **7**: 203-10.
- Katz, D.F., Drobnis, E.Z. & Overstreet, J.W. (1989) Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte investments. *Gamete Research*. **22**: 443-69.
- Katz, D., Morales, P., Samuels, S.J. & Overstreet, J.W. (1990) Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertility and Sterility*. **54**: 513-6.

- Knuth, U.A., Neuwinger, J. & Nieschlag, E. (1989) Bias of routine semen analysis by uncontrolled changes in laboratory environment: detection by long term sampling of monthly means for quality control. *International Journal of Andrology*. **12**: 375-83.
- Kremer, J. & 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 syndrome: pathophysiology, differential diagnosis and treatment. *Sexually Transmitted Diseases*. **11**: 100-12.
- Lessley, B.A. & Garner, D.L. (1983) Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll. *Gamete Research*. **7**: 49-61.
- Liu, D.Y., Lopata, A., Johnston, W.H.I. & Baker, H.W.G. (1988) A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in-vitro. *Fertility and Sterility*. **50**: 782-8.
- Liu, D.Y., Clarke, C.Y., Lopata, A., Johnson, W.I.H. & Baker, H.W.G. (1989) A sperm-zona pellucida binding test and in-vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. **50**: 281-7.
- Lopata, A., Patullo, M.J., Chang, A. & James, B. (1976) A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertility and Sterility*. **27**: 677-84.
- Lorton, S.P., Kummerfeld, H.L. & Foote, R.H. (1981) Polyacrylamide as a substitute for cervical mucus in sperm migration tests. *Fertility and Sterility*. **35**: 222-5.
- Makler, A. (1980) The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertility and Sterility*. **33**: 337-8.
- Makler, A., Murillo, O., Huszar, G., Tarlatzis, B., DeCherney, A. & Naftolin, F. (1984) Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. I. A self-migratory method. *International Journal of Andrology*. **7**: 61-70.
- Meares, E.M. & Stamey, T.A. (1972) The diagnosis and management of bacterial prostatitis. *British Journal of Urology*. **44**: 175-9.
- Mobley, D.F. (1975) Semen cultures in the diagnosis of bacterial prostatitis. *Journal of Urology*. **114**: 83-5.
- Moghissi, K.S. (1976) Post-coital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*. **27**: 117-29.
- Moghissi, K.S. (1986) Evaluation and management of cervical hostility. *Seminars in Reproductive Endocrinology*. **4**: 343-55.
- Mortimer, D., Leslie, E.E., Kelly, R.W. & Templeton, A.A. (1982) Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. **64**: 391-9.
- Mortimer, D. (1985). The male factor in infertility. Part 1. Semen analysis. In: *Current Problems in Obstetrics, Gynaecology and Fertility*, ed. J.M. Leventhal, Chicago, IL, Year Book Medical Publishers, Inc., pp. 1-87.
- Mortimer, D., Shu, M.A. & Tan, R. (1986) Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human Reproduction*. **1**: 299-303.
- \*Mortimer, D. (1990) Objective analysis of sperm motility and kinematics. In: *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, ed. B.A. Keel & B.W. Webster, Boca Raton, CRC Press, pp. 97-133.
- Mortimer, D., Curtis, E.F. & Camenzind, A.R. (1990a) Combined use of fluorescent peanut agglutinin lectin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa. *Human Reproduction*. **5**: 99-103.
- Mortimer, D., Mortimer, S.T., Shu, M.A. & Swart, R. (1990b) A simplified approach to sperm-cervical mucus interaction testing using a hyaluronate migration test. *Human Reproduction*. **5**: 835-41.
- Neuwinger, J., Behre, H. & Nieschlag, E. (1990) External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertility and Sterility*. **54**: 308-14.
- Oehninger, S., Burkman, L.J., Coddington, C.C., Acosta, A.A., Scott, R., Franken, D.A. & Hodgen, G.D. (1989) Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in-vitro fertilization outcome. *Fertility and Sterility*. **51**: 665-70.
- Pattinson, H.A. & Mortimer, D. (1987) Prevalence of sperm surface antibodies in the male partners of infertile couples as determined by Immunobead screening. *Fertility and Sterility*. **48**: 466-9.
- Purvis, K., Rui, H., Scholberg, A., Hesla, S. & Clausen, O.P.F. (1990) Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. *Journal of Andrology*. **11**: 361-6.
- Rao, B., Soufir, J.C., Martin, M. & David, G. (1989) Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research*. **24**: 127-34.

- Scarselli, G., Livi, C., Chelo, E., Dubini, V. & Pellagrini, S. (1987) Approach to immunological male infertility: a comparison between MAR test and direct immunobead test, *Acta Europea Fertilitatis*. **18**: 55-9.
- Serafini, P., Blank, W., Tran, C., Mansourian, M., Tan, T. & Batzofin, J. (1990) Enhanced penetration of zona-free hamster ova by sperm prepared by Nycomedz and Percoll gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*. **53**: 551-5.
- Urry, R.L., Middleton, R.K.G., McNamara, L. & Vikari, C.A. (1983) The effect of single density bovine serum albumin columns on sperm concentration, motility and morphology. *Fertility and Sterility*. **40**: 666-9.
- Weidner, W., Krause, W., Scheifer, H.G., Brunner, H. & Friedrich, H.J. (1985) Ureaplasma infections of the male urogenital tract, in particular prostatitis and semen quality. *Urologia Internationalis*. **40**: 5-9.
- Wiklund, M., Wik, O., Steen, Y., Quist, K., Söderlund, B. & Jansen, P.O. (1987) A self-migration method for preparation of sperm for *in vitro* fertilization. *Human Reproduction*. **2**: 191-5.
- Wolff, H. & Anderson, D.J. (1988a) Immunohistological characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertility and Sterility*. **49**: 497-504.
- Wolff, H. & Anderson, D.J. (1988b) Evaluation of granulocyte elastase as a seminal plasma marker for leukocytospermia. *Fertility and Sterility*. **50**: 129-32.
- Wolff, H., Politch, J.A., Martinez, A., Haimovici, F., Hill, J.A. & Anderson, D.J. (1990) Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertility and Sterility*. **53**: 528-36.
- World Health Organization. (1983) *Laboratory Biosafety Manual*. Geneva, pp. 1-123.
- 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 (Supplement 6)*.
- World Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility. (1990) Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia in normal men. *Lancet*. **336**: 995-9.
- Yanagimachi, R., Lopata, A., Odom, C.B., Bronson, R.A., Mahi, C.A. & Nicolson, A.L. (1979) Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertility and Sterility*. **31**: 562-74.
- 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.
- de Ziegler, D., Cedars, M.I., Hamilton, F., Moreno, T. & Meldrum, D.R. (1987) Factors influencing maintenance of sperm motility during *in vitro* processing. *Fertility and Sterility*. **48**: 816-20.