

ISSN 0021-2571
Coden: AISSAW 37 (N. 1) 1-124 (2001)

Volume 37, N. 1, 2001

**Manuale di laboratorio della WHO
per l'esame del liquido seminale umano
e dell'interazione tra spermatozoi
e muco cervicale**

Quarta edizione

Prefazione all'edizione italiana di
G. Fabrizio Menchini Fabris e Silvia Voliani

Annali

*dell'Istituto
Superiore
di Sanità*

Rivista trimestrale dell'Istituto Superiore di Sanità

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità
Enrico Garaci

Direttore responsabile
Giuseppe Benagiano

Redattore capo
Enrico Alleva

Comitato di redazione
Umberto Agrimi, Enrico Alleva, Sergio Caroli, Paola De Castro, Eugenia Dogliotti, Filomena Mazzei, Edoardo Pozio, Stefano Vella

Segretaria di Redazione
Federica Napolitani Cheyne

Redazione e composizione
Gabriele Baldi, Antonella Martino Santucci, Federica Napolitani Cheyne, Laura Radiciotti, Franco Timitilli

Pubblicazione
Gli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* appaiono in fascicoli trimestrali e speciali, preparati e composti dal Servizio per le Attività Editoriali dell'Istituto Superiore di Sanità e stampati dall'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.

Direzione e Redazione
Servizio per le Attività Editoriali
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma
Tel. +39-0649901
Fax +39-0649902253
e-mail: segr-sae@iss.it

Gli articoli scientifici e la corrispondenza ad essi relativa vanno indirizzati alla Redazione della rivista. Le "Istruzioni agli Autori" degli *Annali* sono pubblicate in ciascun fascicolo.

Abbonamenti
Gli abbonamenti sono curati dall'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato. La corrispondenza relativa agli abbonamenti e all'acquisto di singoli fascicoli deve essere indirizzata a:
Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato
Direzione editoriale - Settore abbonamenti
Via Marciana Marina, s.n.c.
00199 Roma
Tel. +39-0685084131/0685084126
Fax +39-0685084117

Condizioni di abbonamento - Anno 2001
Annuale:
Italia Lit 110 000 (€ 56,81); estero Lit 130 000 (€ 67,14).
Un fascicolo trimestrale:
Italia Lit 35 000 (€ 18,08); estero Lit 40 000 (€ 20,66).
L'importo dovrà essere versato sul conto corrente postale n. 387001 intestato all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato specificando la causale del versamento: "abbonamento agli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*".

Il periodico può essere oggetto di scambio con riviste di interesse per l'Istituto Superiore di Sanità. La corrispondenza relativa va indirizzata alla Redazione della rivista.

Gli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* sono indicizzati da:
- CHEMABS
- EMBASE/Excerpta Medica
- MEDLINE
- PASCAL

L'indice del contenuto dei singoli fascicoli è disponibile su Internet: www.iss.it

ISSN 0021-2571

© Istituto Superiore di Sanità 2001. Tutti i diritti sono riservati.
Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 482/85 del 29 ottobre 1985

Roma, 2001 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato P.V.

Annali dell'Istituto Superiore di Sanità is a quarterly periodical edited by the Istituto Superiore di Sanità.

President of the Istituto Superiore di Sanità
Enrico Garaci

Responsible Director
Giuseppe Benagiano

Editor-in-chief
Enrico Alleva

Editorial Committee
Umberto Agrimi, Enrico Alleva, Sergio Caroli, Paola De Castro, Eugenia Dogliotti, Filomena Mazzei, Edoardo Pozio, Stefano Vella

Editorial Secretary
Federica Napolitani Cheyne

Editing and composition
Gabriele Baldi, Antonella Martino Santucci, Federica Napolitani Cheyne, Laura Radiciotti, Franco Timitilli

Publication
Annali dell'Istituto Superiore di Sanità is printed quarterly and in special issues; it is prepared and composed by the Editorial Service of the Istituto Superiore di Sanità and printed by the Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.

Direction and Editorial Office
Servizio per le Attività Editoriali
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma, Italy
Tel. +39-0649901
Fax +39-0649902253
e-mail: segr-sae@iss.it

Papers to be presented for publication should be addressed to the Editorial Office. "Instructions to Authors" are printed in each issue.

Subscription information

The official bookseller agency for *Annali* is Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.
Correspondence concerning subscriptions and purchase of separate issues should be addressed to:
Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato
Direzione editoriale - Settore abbonamenti
Via Marciana Marina, s.n.c.
00199 Roma, Italy
Tel. +39-0685084131/0685084126
Fax +39-0685084117

Subscription terms - Year 2001

Annual: Lit 110 000/€ 56,81 (Italy);
Lit 130 000/€ 67,14 (other countries).
Each quarterly issue: Lit 35 000/€ 18,08 (Italy);
Lit 40 000/€ 20,66 (other countries).

The journal can be exchanged with periodicals of interest to the Istituto Superiore di Sanità. Requests of exchange agreements should be addressed to the Editorial Office.

Annali dell'Istituto Superiore di Sanità is indexed in:

- CHEMABS
- EMBASE/Excerpta Medica
- MEDLINE
- PASCAL

The tables of contents of *Annali* are available on Internet:
www.iss.it

ISSN 0021-2571

© Istituto Superiore di Sanità 2001. All rights reserved.
Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 482/85 del 29 ottobre 1985

Roma, 2001 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato P.V.

Manuale di laboratorio della WHO

*per l'esame del liquido seminale umano
e dell'interazione tra spermatozoi
e muco cervicale*

QUARTA EDIZIONE

Edizione italiana pubblicata da
Istituto Superiore di Sanità

Prefazione all'edizione italiana di G. Fabrizio Menchini Fabris e Silvia Voliani
Traduzione di L. Olivieri, P. Palego, P. Rossi e S. Voliani

Prima edizione pubblicata da Press Concern, Singapore 1980.
Seconda edizione pubblicata da Cambridge University Press 1987.
Ristampe 1988, 1990.
Terza edizione pubblicata da Cambridge University Press 1992.
Ristampe 1993, 1995, 1998.
Quarta edizione pubblicata da Cambridge University Press 1999.
Ristampa 2000.

Questa edizione italiana è la traduzione della quarta edizione pubblicata da Cambridge University Press per conto della World Health Organization nel 1999 con il titolo *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*.

© World Health Organization 1980, 1987, 1992, 1999.

© Per l'edizione italiana: Istituto Superiore di Sanità 1989, 1993, 2001.

Il Direttore della World Health Organization ha concesso i diritti di traduzione per l'edizione italiana all'Istituto Superiore di Sanità che ne è unico responsabile.

Preparato dal programma speciale di ricerca della World Health Organization "Sviluppo e ricerca nella riproduzione umana".

La citazione di specifiche ditte e di prodotti commerciali non implica che essi siano indicati o raccomandati dalla World Health Organization in preferenza ad altri, di natura simile, che non vengono citati. Errori od omissioni a parte, i nomi dei prodotti di proprietà riservata sono indicati con l'iniziale maiuscola.

Prefazione all'edizione italiana

Sono trascorsi oltre 300 anni da quando, nel 1677, Antonij Van Leeuwenhoek, nel suo Animalicula in semine, descrisse per la prima volta gli spermatozoi, casualmente scoperti dallo studente Ham di Leyda. Gli spermatozoi furono sistematicamente studiati da Van Leeuwenhoek che, in 150 lettere inviate alla Royal Society di Londra, descrisse le sue osservazioni effettuate mediante un primitivo microscopio a lente singola biconvessa, capace di due-trecento ingrandimenti.

Circa 100 anni dopo (1775), Lazzaro Spallanzani giunse alla fondamentale conclusione che gli ovuli delle varie specie animali non possono svilupparsi senza il liquido seminale maschile, e con originali esperimenti d'inseminazione artificiale negli anfibi, dimostrò che lo sviluppo dell'uovo dipendeva dall'attività del liquido seminale.

Stranamente, Spallanzani ritenne però causa della fecondazione la parte liquida dell'eiaculato e non gli spermatozoi. Solamente nel 1824, Prevost e Dumas provarono, filtrando il liquido seminale, che questo era fertilizzante solamente se vi erano presenti gli spermatozoi.

Nel 1875 Hertwig dimostrò la penetrazione dello sperma nell'uovo e la unione di quest'ultimo con il nucleo spermatico, e a partire dai primi decenni del 1900, comparvero le prime valutazioni della fertilità maschile basate sull'osservazione degli spermatozoi. Tuttavia, lo studio del liquido seminale assunse un valore clinico-scientifico solo dopo il 1950, quando gli studi di MacLeod iniziarono a sottolineare l'importanza della densità e della motilità degli spermatozoi come indice di fertilità.

*Questi studi hanno rappresentato la base per la messa a punto dell'analisi del liquido seminale, o spermioγραμμα. Lo spermioγραμμα per diversi anni è stato uno strumento analitico piuttosto impreciso, basato sulla valutazione soggettiva di operatori non specialisti, nell'ambito dell'attività di base dei laboratori di chimica clinica. I principali, se non gli unici, parametri considerati erano il numero degli spermatozoi presenti nell'eiaculato e la percentuale di questi dotati di movimento. Impossibile, per quei tempi, un'analisi qualitativa della motilità, e quasi completamente trascurata la morfologia delle cellule. L'unico tentativo di oggettivazione è stata l'introduzione di un emocitometro (camera di Burker o camera di Tomaz-*Zeiss*), preso in prestito dall'ematologia, per il conteggio degli spermatozoi, e dalla messa a punto di indici di fertilità, cioè indici che combinavano concentrazione e motilità degli spermatozoi in un valore numerico, assai poco indicativo del quadro clinico del paziente (indice di Raboch, indice di Page-Houlding).*

Lo sviluppo dell'andrologia come disciplina distinta ed autonoma, ha portato alla formazione professionale di veri e propri specialisti andrologi e alla messa a punto di una diagnostica specifica, capace di modificare e finalizzare alle proprie esigenze gli strumenti analitici del laboratorio di base.

Queste trasformazioni si sono realizzate di pari passo con un progressivo aumento della richiesta di intervento medico nel campo dell'infertilità di coppia.

In Italia si calcola oggi che ogni anno 60 000-80 000 nuove coppie si trovino a dover affrontare problematiche di infertilità, il che rappresenta il 20-25% delle 300 000 nuove unioni.

Le cause dell'infertilità di coppia sono da ricondurre per un buon 40% a un deficit della componente maschile, mentre per un altro 20% circa alla sovrapposizione di fattori maschili e femminili. Da qui possiamo rilevare che il 60% dell'infertilità è di natura maschile.

L'importanza del problema è tale che, se consideriamo un individuo in età adulta, e ne vogliamo saggiare il potenziale di fertilità con test clinici, ben difficilmente lo troveremo in possesso della piena capacità riproduttiva: secondo le linee-guida per l'analisi del liquido seminale e l'interpretazione dei suoi risultati, redatte dalla World Health Organization, viene ritenuto normale l'eiaculato che presenti almeno una concentrazione di 20 milioni di spermatozoi per ml, dei quali almeno il 50% degli spermatozoi deve essere dotato di motilità progressiva rettilinea. Bisogna, comunque, tenere presente che la fertilità è un concetto probabilistico, complicato dalla presenza contemporanea di due fattori, quello maschile e quello femminile.

E' interessante rilevare come da uno studio eseguito presso il Laboratorio del Centro di Andrologia di Pisa, confrontando i valori medi riscontrati negli esami odierni con quelli eseguiti venti anni orsono, sia stato rilevato un marcato decremento sia a carico della concentrazione che della motilità e della morfologia spermatozoaria.

Non è, però, solamente il trascorrere degli anni che comporta la riduzione della capacità riproduttiva, che stiamo osservando, ma è anche l'influenza combinata di molti fattori esterni, presenti nel mondo che ci circonda. L'aumento dell'infertilità maschile è imputabile, infatti, a tutto un insieme di cause, prima tra tutte quella ambientale, intendendo per ambientali sia quei fattori legati all'inquinamento dell'ambiente in cui viviamo oggi, sia alle mutate abitudini di vita, alle quali la società odierna ci costringe. Un esempio per tutti, secondo alcuni scienziati, un danno al normale sviluppo delle cellule germinali maschili può derivare dall'esposizione in gravidanza della madre all'azione di ormoni estrogeni ambientali, esposizione a cui tutti possiamo essere sottoposti consumando cibi trattati con tali sostanze.

Un altro fattore è, senz'altro, la ritardata età in cui le coppie giungono al matrimonio, dettata da esigenze di tipo economico-professionale: in mancanza di un'adeguata opera di prevenzione questa condizione amplifica difficoltà riproduttive che in età più giovanile potrebbero essere tranquillamente superate.

Infine, è innegabile che stiamo assistendo ad una recrudescenza di molte forme di patologia dell'apparato riproduttivo maschile, in primo luogo di quelle flogistiche-infettive legate alle mutate abitudini sessuali di oggi.

L'esame del liquido seminale, o spermioγραμμα, è il caposaldo dell'attività del laboratorio di andrologia, dal momento che rappresenta il punto di partenza dello studio della capacità fecondante di un uomo. Questo esame, però, compare a diversi livelli durante l'iter diagnostico e terapeutico dell'infertilità maschile: esso, infatti, viene utilizzato in modo efficace come strumento di valutazione durante il trattamento terapeutico. Da una sua corretta esecuzione si possono avere indicazioni per indagini più approfondite e specifiche e, addirittura, per interventi terapeutici.

Lo spermioγραμμα, tra gli esami di laboratorio, si distingue per il significato particolare che si associa ai “valori normali” dei vari parametri che misurano la qualità dello sperma: infatti, “normalità” non implica necessariamente “fertilità”, dal momento che molte delle caratteristiche funzionali che contribuiscono a definire la fertilità non sono ancora oggi ben conosciute. Per questo si possono avere gravidanze con liquidi seminali definiti patologici, e non averne con eiaculati definiti normali. A questo, poi, si deve aggiungere il contributo della componente femminile alla fertilità di coppia: una partner con un elevato potenziale di fertilità, infatti, può compensare deficit seminali considerevoli.

La complessità dello spermioγραμμα è cresciuta a tal punto da indurre la World Health Organization nel 1980 a promuovere alcune linee guida per la standardizzazione delle indagini per lo studio di base del liquido seminale e per la descrizione ed interpretazione dei risultati ottenuti; linee guida che periodicamente vengono tenute al passo dei progressi nel settore, attraverso aggiornamenti successivi (1987, 1992, edizione attuale). Questa standardizzazione permette oggi di confrontare successivi esami di un paziente, anche eseguiti in laboratori diversi.

Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Langzam J, Reichart M, Soffer Y. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analysis. *Hum Reprod* 1994;9:2069.

Menchini Fabris GF, Giannotti P. Il liquido seminale. In: *Atti 49° Congresso Società Italiana di Urologia*. Pisa: Pacini Editore; 1976.

Menchini Fabris GF, Canale D, Basile-Fasolo C, Di Coscio MA, Izzo PL, Giannotti P, Servadio L, Baldassarri S, Fratta M. Varicocele and male subfertility: prognostical criteria in the surgical treatment. *Andrologia* 1985;17:16-21.

Menchini Fabris GF, Voliani S, Canale D, Olivieri L. Sperm analysis in the infertile male. In: Paulson JD, Negro Vilar A, Lucena E, Martini E (Ed.). *Andrology. Male fertility and sterility*. New York: Academic Press; 1986.

Menchini Fabris GF, Rossi P, Palego P, Turchi P. Declining sperm counts in Italy during the past 20 years. *Andrologia* 1996;28:304.

Menkeveld R, Stander FSH, Kotze TJvW, Kruger TF, Van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990;5:586.

Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Hum Reprod* 1986;1:299.

Voliani S, Bertozzi MA, Rossi P, Porzano A, Menchini Fabris GF. Semen in patients with genital inflammations. In: *Proceedings 4th International Congress Therapy in Andrology*. Bologna: Monduzzi Editore; 1999.

World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Singapore: Press Concern; 1980.

World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1987.

World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.

G. Fabrizio Menchini Fabris (a) e Silvia Voliani (b)

(a) *Direttore della Scuola di Specializzazione in Endocrinologia e Malattie del Ricambio, indirizzo Andrologia, Università degli Studi di Pisa e Direttore dell'Unità Operativa di Andrologia dell'Azienda Ospedaliera Pisana*
(b) *Responsabile del Laboratorio dell'Unità Operativa di Andrologia dell'Azienda Ospedaliera Pisana*

Contenuto

Ringraziamenti	Pag.	X
Abbreviazioni		XII
1 Introduzione		1
2 Raccolta ed esame del liquido seminale umano		4
2A PROCEDURE STANDARD		4
2.1 Raccolta e consegna del campione		4
2.2 Manipolazione del campione		6
2.3 Esame macroscopico iniziale		6
2.3.1 <i>Liquefazione</i>		6
2.3.2 <i>Aspetto</i>		6
2.3.3 <i>Volume</i>		7
2.3.4 <i>Viscosità</i>		7
2.3.5 <i>pH</i>		7
2.4 Esame microscopico iniziale		7
2.4.1 <i>Preparazione di un esame di routine del liquido seminale</i>		7
2.4.2 <i>Determinazione preliminare della concentrazione degli spermatozoi</i>		8
2.4.3 <i>Valutazione della motilità</i>		9
2.4.4 <i>Elementi cellulari diversi dagli spermatozoi</i>		10
2.4.5 <i>Agglutinazione</i>		13
2.5 Altre valutazioni microscopiche		13
2.5.1 <i>Vitalità spermatozoaria per esclusione del colorante</i>		13
2.5.2 <i>Valutazione della concentrazione degli spermatozoi</i>		14
2.5.3 <i>Valutazione della morfologia spermatozoaria</i>		16
2.5.4 <i>Classificazione della morfologia degli spermatozoi</i>		18
2.5.5 <i>Esecuzione del conteggio della morfologia spermatozoaria</i>		21
2.6 Determinazione degli anticorpi adesi agli spermatozoi		22
2.6.1 <i>Immunobead test</i>		22
2.6.2 <i>MAR test</i>		24
2B TEST FACOLTATIVI		27
2.7 Calcolo degli indici di difetti multipli degli spermatozoi		27
2.8 Test di swelling ipo-osmotico (HOS)		28
2.9 Spermicoltura		28
2.10 Indagini biochimiche sulla funzionalità delle ghiandole accessorie		28
2.10.1 <i>Attività secretoria della prostata</i>		28
2.10.2 <i>Attività secretoria delle vescichette seminali</i>		29
2.10.3 <i>Attività secretoria dell'epididimo</i>		29

2.11	Analisi computerizzata del liquido seminale	29
2.12	Test di penetrazione in oocita di hamster zona-free	29
2C	TEST DI RICERCA	30
2.13	Test di funzionalità spermatozoaria	30
2.13.1	<i>Radicali ossigeno e infertilità maschile</i>	30
2.13.2	<i>Test di legame alla zona pellucida umana</i>	31
2.13.3	<i>Valutazione della reazione acrosomiale</i>	31
2.14	Analisi seminale computerizzata: morfologia	32
3	Tecniche di preparazione del liquido seminale	33
4	Controllo di qualità nel laboratorio di andrologia	35
4.1	Introduzione	35
4.2	Origine degli errori di misurazione	35
4.2.1	<i>Errori statistici di conteggio nell'analisi seminale</i>	36
4.2.2	<i>Altri errori nell'analisi seminale</i>	37
4.2.3	<i>Importanza del controllo di qualità</i>	37
4.3	Approccio pratico al controllo di qualità	38
4.3.1	<i>Controllo e correlazione routinaria dei risultati intracampione</i>	38
4.3.2	<i>Controllo di qualità settimanale interno: valutazione della variabilità intra- ed inter-operatore</i>	39
4.4	Monitoraggio delle medie mensili	45
4.5	Risposta ai risultati esterni ai limiti di controllo	47
4.6	Controllo di qualità esterno	48
5	Interazione tra spermatozoi e muco cervicale	50
5.1	Introduzione	50
5.2	Raccolta e conservazione del muco cervicale	52
5.2.1	<i>Metodo di raccolta</i>	52
5.2.2	<i>Conservazione</i>	53
5.3	Valutazione del muco cervicale	53
5.3.1	<i>Volume</i>	53
5.3.2	<i>Consistenza</i>	53
5.3.3	<i>Cristallizzazione</i>	54
5.3.4	<i>Filanza</i>	54
5.3.5	<i>Cellularità</i>	54
5.3.6	<i>pH</i>	55
5.4	Interazione tra spermatozoi e muco cervicale	55
5.4.1	<i>Test in vivo (post coital)</i>	55
5.4.2	<i>Test in vitro</i>	57
	Appendici	
IA	Valori di riferimento delle variabili del liquidi seminale	59
IB	Terminologia di alcune variabili seminali	61
II	Linee guida per la sicurezza del laboratorio di andrologia	62
III	Metodi di studio dei leucociti	64
IV	Tecniche per la vitalità spermatozoaria	67
V	Colorazione di Papanicolaou modificata per gli spermatozoi	70
VI	Metodo di colorazione di Shorr per la morfologia spermatozoaria	74
VII	Metodo di colorazione rapida per la morfologia spermatozoaria	75
VIII	Immunobead test	76
IX	Mixed antiglobulin reaction test (MAR test)	79
X	Dosaggio dello zinco seminale	80
XI	Dosaggio del fruttosio nel plasma seminale	82
XII	Dosaggio dell' α -glucosidasi neutra nel plasma seminale	84
XIII	Istruzioni per la raccolta del campione e modulo per la registrazione dei risultati dell'analisi seminale	87

XIV	Spermiogramma computerizzato (CASA)	89
XV	Protocollo per il test di penetrazione negli oociti zona-free di hamster	93
XVI	Dosaggio dei radicali ossigeno prodotti dalle sospensioni spermatozoarie	97
XVII	Test di induzione della reazione acrosomiale	100
XVIII	Tecniche di preparazione del liquido seminale	102
XIX	Procedure di controllo di qualità (QC)	105
XX	Scheda di registrazione del punteggio dei campioni di muco cervicale e del post coital test	107
XXI	Interazione liquido seminale-muco cervicale: il capillary tube test	108
XXII	Requisiti di base per il laboratorio di andrologia	111
	Bibliografia	115
	Indice analitico	120

Ringraziamenti

Il Programma speciale di ricerca della UNDP/UNFPA/WHO/ World Bank, "Sviluppo e ricerca nella riproduzione umana" desidera ringraziare le seguenti persone che hanno partecipato alla preparazione ed alla pubblicazione della quarta edizione del manuale di laboratorio: *WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*:

Dr R.J. Aitken

MRC Reproductive Biology Unit
Centre for Reproductive Biology
37 Chalmers Street
Edinburgh EH3 9EW
United Kingdom

Dr H.W.G. Baker

University of Melbourne
Royal Women's Hospital
Department of Obstetrics
and Gynaecology
Carlton 3053, Victoria
Australia

Dr C.L.R. Barrat

University Department of Obstetrics
and Gynaecology
Birmingham Women's Hospital
Edgbaston
Birmingham B15 2TG
United Kingdom

Dr H.M. Behre

Institute of Reproductive Medicine
of the University
Domagkstrasse 11
D-48129 Münster
Germany

Dr F. Comhaire

Dienst Voor Inwendige Zietken
Endocrinologie-Stofwisselingsziekten
De Pintelaan 185
9000 GENT
Belgium

Dr T.G. Cooper

Institute of Reproductive Medicine
of the University
Domagkstrasse 11
D-48129 Münster
Germany

Dr C. De Jonge

Department of Obstetrics
and Gynaecology
University of Nebraska
Medical Center
600 South 42 Street
Omaha, NE 68198-3255
United States of America

Dr R. Eliasson

Head, Andrology Unit
Sophiahemmet Hospital
SE 114 86 Stockholm
Sweden

Dr T.M.M. Farley
UNDP/UNFPA/WHO/World Bank
Special Programme of Research,
Development and Research Training
in Human Reproduction
World Health Organization
1211 Geneva 27
Switzerland

Mr P.D. Griffin
UNDP/UNFPA/WHO/ World Bank
Special Programme of Research,
Development and Research Training
in Human Reproduction
World Health Organization
1211 Geneva 27
Switzerland

Dr I. Huhtaniemi
Department of Physiology
University of Turku
Kiinamylynkatu 10
SF-20520 Turku
Finland

Dr T.F. Kruger
Reproductive Biology Unit
Tygerberg Hospital
PO Box 19058
Tygerberg 7505
South Africa

Dr M.T. Mbizvo
Department of Obstetrics
and Gynaecology
University of Zimbabwe
PO Box A 178
Avondale
Harare
Zimbabwe

Dr J.W. Overstreet
Division of Reproductive Biology
Department of Obstetrics
& Gynaecology
One Shields Avenue
University of California, Davis
Davis, CA 95616
United States of America

Mrs L. Sellaro
UNDP/UNFPA/WHO/ World Bank
Special Programme of Research,
Development and Research Training
in Human Reproduction
World Health Organization
1211 Geneva 27
Switzerland

Dr J. Suominen
Department of Anatomy
University of Turku
Kiinamylynkatu 10
SF-20520 Turku
Finland

Dr G.M.H. Waites
c/o Clinique de Stérilité
et d'Endocrinologie Gynécologique
Hôpital Cantonal
Universitaire de Genève
20 Rue Alcide Jentzer
1211 Geneva 14
Switzerland

Dr C.C.L. Wang
Clinical Study Center (Box 16)
Harbor-UCLA Medical Center
1000 West Carson Street
Torrance, CA 90509
United States of America

Abbreviazioni

BSA	bovine serum albumin = albumina serica bovina (V frazione di Cohn)
CASA	computer-aided sperm analysis = analisi seminale computerizzata
DMSO	dimethyl sulfoxide = dimetil solfossido
DTT	dithiothreitol = ditiotreitolo
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid = acido diamminotetraacetico
EQA	external quality assessment = controllo di qualità esterno
HIV	human immunodeficiency virus = virus dell'immunodeficienza umana
HOPT	hamster oocyte penetration test = test di penetrazione nell'ovocita di hamster
HOS	hypo-osmotic swelling test = test di swelling
HPF	high power field = campo microscopico a forte ingrandimento
HSA	human serum albumin = albumina serica umana (V frazione di Cohn)
IBT	immunobead test = test con immunobead
IQC	internal quality control = controllo di qualità interno
IU	international unit = unità internazionali
IVF	<i>in vitro</i> fertilization = fecondazione <i>in vitro</i>
MAR	mixed antiglobulin reaction = MAR (MAR test)
MAI	multiple anomalies index = indice di anomalie multiple
PAS	periodic acid Schiff = acido periodico di Schiff
PBS	phosphate buffered saline = tampone fosfato salino
PCT	post-coital test = post coital test
QC	quality control = controllo di qualità
ROS	reactive oxygen species = radicali liberi dell'ossigeno
SCMC	sperm-cervical mucus contact = test di contatto tra spermatozoi e muco cervicale
SDI	sperm deformity index = indice di deformità spermatozoaria
SPA	sperm penetration assay (HOPT) = test di penetrazione spermatozoaria
TZI	teratozoospermia index = indice di teratozoospermia
U	(international) unit = unità (internazionale)
WBC	white blood cells (leukocyte) = globuli bianchi (leucociti)

1

Introduzione

In risposta alla crescente richiesta di standardizzazione delle metodiche per l'esame del liquido seminale umano, la World Health Organization (WHO) ha pubblicato inizialmente nel 1980 il *Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction* (Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale).

Questa fu seguita da una seconda e da una terza edizione nel 1987 e nel 1992.

Queste pubblicazioni sono state ampiamente utilizzate da clinici e ricercatori di tutto il mondo, infatti la terza edizione è stata tradotta in arabo, cinese, francese, tedesco, indonesiano, italiano, portoghese e spagnolo. Comunque, il campo dell'andrologia ha continuato ad avanzare rapidamente e questo, insieme alla aumentata consapevolezza della necessità di standardizzare il rilevamento di tutte le variabili seminali, ha portato alla attuale versione.

La quarta edizione giunge in un periodo di nuovi interessi. La definitiva dimostrazione della efficacia contraccettiva ottenibile mediante la soppressione ormonale della spermatogenesi (World Health Organization Task Force on Methods for The Regulation of Male Fertility, 1990, 1996) dovrebbe condurre allo sviluppo di metodiche ormonali di controllo della fertilità maschile efficaci e di provata sicurezza.

Le accresciute conoscenze delle basi genetiche dell'infertilità maschile congiuntamente ai successi della procreazione assistita, inclusa l'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi, hanno riacceso l'interesse e ridato speranza a uomini considerati precedentemente infertili.

Questi progressi della terapia della sub-fertilità umana hanno determinato un rinnovato interesse per lo studio della funzionalità spermatozoaria. Inoltre l'opinione pubblica è stata scossa da studi relativi ad un calo delle conta spermatica ed all'incremento di incidenza di anomalie dei genitali esterni e cancro del testicolo in alcune nazioni. Il decremento della qualità del liquido seminale non presenta una distribuzione geografica uniforme, come dimostrato da studi in Danimarca, Finlandia, Francia, Gran Bretagna e Stati Uniti.

Agenzie dell'ambiente governativo e società scientifiche nazionali ed internazionali, come pure la WHO, hanno promosso dibattiti su questo argomento senza giungere ad una posizione univoca. Ulteriori indagini sono in corso, probabilmente su varie popolazioni in assenza ed in presenza di inquinanti o tossici ambientali riconosciuti. Il progresso nello sviluppo della contraccezione maschile e nella terapia della sub-fertilità maschile, congiuntamente all'interesse per l'ambiente e per le possibili conseguenze sulla funzione riproduttiva maschile, esortano alla rapida ricerca di nuovi e migliori metodi anche dal punto di vista della standardizzazione per l'esame del liquido seminale.

Per questi motivi la UNDP/UNFPA/WHO, il programma speciale di ricerca "Sviluppo ed insegnamento nella riproduzione umana della banca mondiale", dopo aver chiesto consiglio ad esperti in tutto il mondo attraverso giornali, lettere e con la collaborazione delle varie società di andrologia ha formato un gruppo di lavoro (vedi "Ringraziamenti") per la revisione del manuale. L'attuale edizione è una modifica del manuale della WHO per *l'Accertamento diagnostico standardizzato e la diagnosi della coppia infertile* pubblicato dalla Cambridge University Press nel 1993.

Il Capitolo 2 dell'attuale manuale, relativo all'esame seminale, è diviso in tre parti. La prima descrive le procedure indispensabili nell'esame seminale (Sezioni 2A, da 2.1 a 2.7). La seconda parte comprende procedure considerate opzionali dalla maggior parte dei laboratori, che possono essere di aiuto nella diagnosi clinica (Sezioni 2B, da 2.7 a 2.12). La terza parte (Sezione 2C, da 2.13 a 2.14) include metodiche che valutano la capacità funzionale dello spermatozoo e le ultime metodiche di analisi computerizzata della morfologia spermatozoaria. Queste tecniche possono non essere disponibili in tutti i laboratori ma potrebbero essere di aiuto nella diagnostica della sub-fertilità umana, negli studi sulla tossicologia riproduttiva o come strumenti di ricerca. Nella sezione delle procedure standard relativa alla morfologia spermatozoaria, questo manuale raccomanda la colorazione di Papanicolaou e raccomanda la classificazione semplificata della morfologia in accordo ai cosiddetti *strict criteria*. L'analisi computerizzata del liquido seminale (CASA, *computer-aided sperm analysis*) per la motilità degli spermatozoi, ed il test dell'ovocita di hamster sono stati inclusi nella sezione dei test opzionali, dato che essi possono avere alcune applicazioni diagnostiche. La sezione sui test di ricerca è stata riscritta ed aggiornata per rispecchiare le opinioni universalmente condivise sulla valutazione della funzionalità spermatozoaria. E' stato aggiunto un capitolo di nozioni di statistica relativo agli errori di calcolo dell'esame seminale ed è stato anche ampliato il capitolo sul controllo di qualità includendo descrizioni dei metodi pratici di miglioramento del controllo di qualità in tutti i laboratori di andrologia.

Nell'Appendice I, sono riportati i valori di riferimento delle variabili seminali. Andrebbe comunque fatto presente che questo manuale non ha lo scopo di definire il limite inferiore dei parametri seminali compatibile con il raggiungimento di una gravidanza, *in vivo* o *in vitro*. Si è dimostrato estremamente difficile ottenere un accordo

generalizzato sulla valutazione di alcuni aspetti della morfologia spermatozoaria e sul ruolo predittivo dei valori di riferimento dato che la valutazione della morfologia rimane un parametro soggettivo. I valori di riferimento per il liquido seminale umano presentano quindi dei limiti concettuali. La correlazione della qualità del liquido seminale alla fertilità è resa più complessa da molti altri fattori, inclusa la fertilità femminile. Di conseguenza uomini con parametri seminali alterati possono ancora essere fertili, mentre uomini con parametri seminali migliori della media possono ottenere gravidanze in percentuale superiore alla media. Questo manuale non è stato concepito solamente per laboratori che si occupano di coppie sub-fertili, ma va incontro anche alle esigenze dei laboratori che si occupano di contraccezione maschile e di tossicologia riproduttiva. In questa ottica, è importante fornire valori di riferimento ottenuti da studi multicentrici su popolazioni di uomini normali piuttosto che i valori minimi necessari per la fecondazione. Inoltre il manuale suggerisce che è preferibile che ogni laboratorio stabilisca i propri valori di riferimento per ogni parametro (per esempio comparando con campioni seminali di uomini che abbiano recentemente ottenuto una gravidanza).

Infine bisogna sottolineare che lo scopo principale di questo manuale è quello di promuovere l'impiego delle metodiche standard per definire i valori di riferimento (precedentemente definiti valori normali) negli esami seminali. Questo potrà consentire una migliore comparabilità dei risultati dei laboratori e l'omogeneità dei risultati delle analisi da diverse fonti. Attenersi alle procedure standard dovrebbe incrementare la precisione dei risultati e la loro riproducibilità. Soprattutto, l'obiettivo primario delle precedenti edizioni è rimasto quello di fornire un manuale di laboratorio che vada incontro alle necessità dei ricercatori e dei clinici nei paesi in via di sviluppo.

2

Raccolta ed esame del liquido seminale umano

Il liquido seminale normale è una sospensione di spermatozoi nella secrezione dei 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 costituisce l'eiaculato.

La valutazione della intera popolazione degli spermatozoi emessi nell'eiaculato non può definire la capacità fecondante di quei pochi che hanno raggiunto il sito della fecondazione. Nonostante ciò, l'esame seminale fornisce essenzialmente informazioni relative alle condizioni cliniche del soggetto.

Chiaramente, la raccolta e l'analisi del liquido seminale deve essere intrapresa secondo metodiche standardizzate se i risultati devono fornire valide informazioni, e questo capitolo e le sue Appendici allegate (II-XVII) propongono le metodiche atte a realizzare questo scopo. Le metodiche sono suddivise in procedure standard, opzionali e facoltative.

2A PROCEDURE STANDARD

Le procedure descritte in questa parte del manuale sono le procedure codificate che costituiscono le tappe indispensabili della analisi seminale.

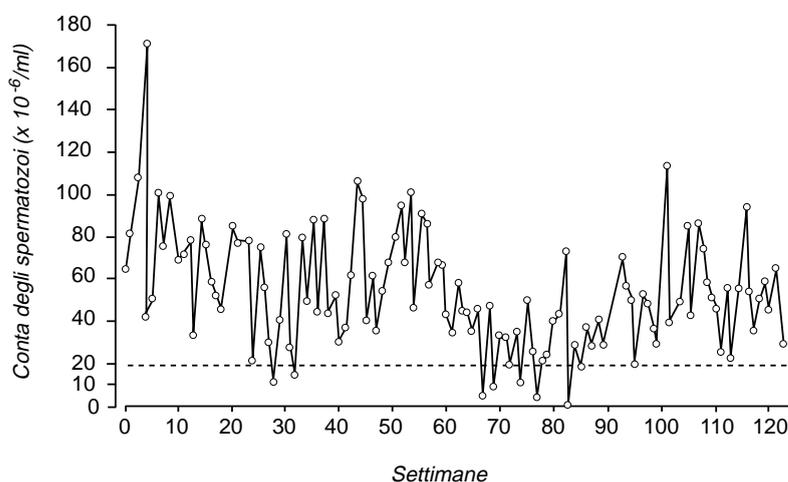
2.1 Raccolta e consegna del campione

Al paziente dovranno essere fornite istruzioni chiare, a voce o scritte, per quanto riguarda la raccolta e, se necessario, il trasporto del campione (vedi Appendice XIII).

- (a) Il campione deve essere raccolto dopo un periodo di astinenza sessuale di non meno di 48 ore e non più di 7 giorni. Per minimizzare la variabilità dei risultati dell'esame seminale, il numero di giorni di astinenza dovrà essere mantenuto il più costante possibile. Sul modulo di accompagnamento di ogni analisi (vedi Appendice XIII) dovranno essere registrati il nome del paziente, il periodo di astinenza, il giorno e l'ora della raccolta, e l'intervallo intercorso tra la raccolta e l'analisi.

- (b) Per una prima valutazione del paziente si dovranno esaminare due campioni. L'intervallo tra le due raccolte non dovrà essere inferiore a 7 giorni o superiore a 3 settimane. Se i risultati delle due analisi fossero marcatamente discordanti, andrà valutata l'opportunità di un esame addizionale poiché nello stesso individuo si possono verificare sensibili variazioni (Fig. 2.1).
- (c) Preferibilmente, il campione andrà raccolto in una apposita stanza nei pressi del laboratorio. Altrimenti, dovrà essere consegnato al laboratorio entro 1 ora dalla raccolta. Se la motilità degli spermatozoi è molto bassa (meno del 25% di spermatozoi con motilità progressiva rapida, vedi Sezione 2.4.3) si dovrà esaminare un ulteriore campione il prima possibile perché la motilità cala rapidamente (Eliasson, 1981). Se si devono eseguire test per la funzionalità degli spermatozoi, è essenziale che gli spermatozoi vengano separati dal plasma seminale entro un'ora dall'eiaculazione (vedi Appendice XVIII).
- (d) Il campione dovrà essere ottenuto per masturbazione e raccolto in un contenitore pulito di vetro o di plastica dall'apertura sufficientemente larga. Il contenitore dovrà essere caldo (20-40 °C) per evitare una diminuzione della motilità e di un materiale che sia stato provato privo di effetti negativi per la motilità degli spermatozoi (vedi Appendice XXIII). 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 di eseguire la raccolta in un contenitore sterile (vedi Sezione 2.9).
- (e) In casi in cui circostanze particolari impediscano la raccolta per masturbazione, sono disponibili speciali profilattici (Milex Products Inc., Chicago Illinois 60631, USA, USA: Male Factor Pack^R, Hygiene^R, FertiPro N.V., Belgium). I comuni profilattici di lattice non devono essere utilizzati per la raccolta perché possono interferire con la vitalità degli spermatozoi. Il *coitus interruptus* non è accettabile come mezzo di raccolta perché è possibile che venga persa la prima parte dell'eiaculato, quella 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) E' importante sottolineare al paziente che il campione seminale deve essere completo.

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 IA). (Dati non pubblicati da C.A. Paulsen).



- (g) Il campione deve essere protetto dalle alte e dalle basse temperature (inferiori a 20 °C e superiori a 40 °C) durante il trasferimento al laboratorio.
- (h) Il contenitore deve essere etichettato con il nome del paziente (e/o numero di identificazione) e con la data e l'ora della raccolta.

2.2 Manipolazione del campione

Il personale di laboratorio deve essere al corrente che i campioni di liquido seminale possono contenere agenti infettivi pericolosi (ad es. HIV, il virus dell'epatite e gli herpes virus), e che perciò deve essere trattato con estrema cura, come materiale a rischio biologico. Se sul campione deve essere eseguita una spermio-coltura, dosaggi biologici, inseminazione intrauterina o fecondazione *in vitro*, si dovranno adoperare materiali sterili.

Le linee guida per la sicurezza elencate nella Appendice II devono essere rigorosamente osservate: le norme della buona qualità di laboratorio sono fondamentali per la sicurezza (WHO, 1983).

2.3 Esame macroscopico iniziale

2.3.1 Liquefazione

Un campione normale si liquefa entro 60 minuti a temperatura ambiente, sebbene generalmente questo avvenga entro 15 minuti. In alcuni casi, la liquefazione completa non avviene entro 60 minuti e questo fatto dovrà essere registrato. Campioni normali di liquido seminale possono contenere granuli gelatinosi (corpi amilacei) che non si liquefanno e che non sembrano avere nessun rilevanza clinica. La presenza di strie di muco, segno di incompleta liquefazione, può interferire con l'esecuzione dell'esame seminale.

Il campione deve essere ben mescolato nel contenitore dove è avvenuta la raccolta, ma non deve essere agitato eccessivamente. Una delicata miscelazione continua o una rotazione del campione, durante la liquefazione, possono ridurre gli errori nel determinare la concentrazione degli spermatozoi (de Ziegler *et al.*, 1987). Se la motilità spermatozoaria viene valutata a 37 °C, il campione andrà mantenuto a questa temperatura durante la liquefazione e la mescolatura. In alcuni casi, quando i campioni non si liquefanno, può essere necessario un trattamento addizionale, come una mescolatura meccanica o una digestione enzimatica (per es. bromelina 1 g/l). La liquefazione può essere indotta in alcuni campioni dalla aggiunta di un ugual volume di medium e dal ripetuto pipettaggio. Tutte queste procedure possono interferire sulla biochimica seminale, sulla motilità o sulla morfologia spermatozoaria, ed il loro impiego andrebbe riportato nella scheda seminale.

2.3.2 Aspetto

Il campione viene valutato inizialmente mediante una semplice osservazione a temperatura ambiente, immediatamente dopo la liquefazione o dopo un'ora dalla eiaculazione. Il liquido seminale normale ha un aspetto grigio opalescente. Può apparire meno opaco se la concentrazione di spermatozoi è molto bassa, di colore rosso brunastro se ci sono emazie o giallognolo in pazienti con ittero o che assumono vitamine.

2.3.3 *Volume*

Il volume dell'eiaculato dovrebbe essere misurato usando un cilindro graduato a base conica o pesando contenitori standard con e senza liquido seminale. Non devono essere usate siringhe di plastica perché possono alterare la motilità o aghi ipodermici perché poco sicuri.

2.3.4 *Viscosità*

La viscosità del campione liquefatto (spesso definita "consistenza") dovrà essere considerata come una condizione diversa dalla coagulazione. Potrà essere valutata aspirando delicatamente il liquido seminale in una pipetta da 5 ml dalla imboccatura ampia, e lasciandolo gocciolare per gravità, osservando la lunghezza del filamento ottenuto: un campione normale lascia la pipetta come piccole gocce distinte. In caso di anormale viscosità la goccia formerà un filamento superiore ai 2 cm. In alternativa, la viscosità può essere valutata introducendo una bacchetta di vetro nel campione ed esaminando la lunghezza del filamento che si forma estraendo la bacchetta. Anche in questo caso il filamento non dovrà superare i 2 cm.

Una viscosità anomala può interferire nella determinazione del numero, della motilità degli spermatozoi e nella valutazione degli anticorpi ad essi adesi. Le metodiche per ridurre la viscosità sono le stesse proposte per la ritardata liquefazione (vedi Sezione 2.3.1).

2.3.5 *pH*

Il pH deve essere sempre misurato ad un tempo costante dall'eiaculazione, e comunque entro un'ora. Una goccia di liquido seminale deve essere uniformemente stesa su una apposita cartina indicatrice (range da 6,1-10,0 o 6,4-8,0). Dopo 30 secondi, il colore della zona bagnata diventa uniforme e deve essere confrontato con la scala delle colorazioni per leggere il valore di pH. Qualunque cartina indicatrice venga utilizzata per questa misura dovrà prima essere testata contro standard noti di pH.

Se il pH in un paziente azoospermico è inferiore a 7, ci possiamo trovare di fronte ad una ostruzione dei dotti eiaculatori o una agenesia bilaterale dei deferenti.

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. E' fortemente raccomandato un microscopio a contrasto di fase per tutti gli esami di preparati a fresco di liquido seminale intero o spermatozoi lavati. Per preparati a fresco è possibile usare un comune microscopio ottico con il condensatore abbassato in maniera da disperdere la luce.

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

Il volume di liquido seminale e le dimensioni del vetrino coprioggetto devono essere standardizzate in modo che la valutazione sia sempre fatta su un preparato dello spessore fisso di circa 20 μm . Questo spessore consente di preparare il campione seminale per la corretta

determinazione della concentrazione di spermatozoi. Spessori inferiori ai 20 μm possono interferire con i movimenti di rotazione degli spermatozoi.

Con l'ausilio di una micropipetta viene posto un volume fisso di liquido seminale di 10 μl su di un vetrino portaoggetti pulito, e coperto con un vetrino coprioggetto di 22 x 22 mm. Il peso del coprioggetto distende il campione così da ottenere una ottima visione al microscopio, e particolare attenzione dovrà essere posta ad evitare la formazione e l'intrappolamento di bolle d'aria tra il vetrino ed il coprioggetto.

Il preparato appena ottenuto viene lasciato stabilizzare per circa un minuto. Dato che la motilità e la velocità degli spermatozoi dipendono grandemente dalla temperatura, la valutazione della motilità andrebbe eseguita preferibilmente il più vicino possibile ai 37 °C, usando un piatto portavetrini riscaldato. L'esame può anche essere condotto a temperatura ambiente, tra i 20 ed i 24 °C, ma questa temperatura deve allora essere standardizzata in tutti i laboratori, dato che può influenzare la classificazione della motilità. Un primo esame a 100 ingrandimenti (ad es. obiettivo 10x ed oculare 10x) fornisce una visione generale per la valutazione delle strie mucose, degli agglutinati di spermatozoi e della uniformità della dispersione degli spermatozoi nel vetrino. Il preparato viene quindi esaminato a 400 ingrandimenti.

2.4.2 *Determinazione preliminare della concentrazione degli spermatozoi*

Con microscopi diversi, il campo visivo a 400 ingrandimenti è di vario diametro, in genere risulta di 250-400 μm , il che corrisponde ad un volume di 1,0-2,5 nl se si considera uno spessore del campione di 20 μm . Con l'aiuto della griglia micrometrica di una camera contaglobuli si può stabilire il diametro del campo visivo del microscopio. Si può ottenere una stima approssimativa della concentrazione degli spermatozoi in milioni/ml visionando il preparato e contando il numero di spermatozoi per campo o parti di campo equivalenti ad 1 nl. Questa stima approssimativa è importante per decidere la diluizione per valutare la concentrazione con l'emocitometro: meno di 15 spermatozoi per campo, diluizione 1:5; 15-40 spermatozoi, diluizione 1:10; 40-200 spermatozoi, diluizione 1:20; più di 200 spermatozoi, diluizione 1:50 (vedi Tab. 2.1).

Tabella 2.1. Diluizioni e fattori di conversione per la camera contaglobuli di Neubauer modificata

Spermatozoi per campo a 400x	Diluizione (sperma + diluente)	Fattore di conversione Numero di quadrati grandi contati		
		25	10	5
< 15	1:5 (1+4)	20	8	4
15-40	1:10 (1+9)	10	4	2
40-200	1:20 (1+19)	5	2	1
> 200	1:50 (1+49)	2	0,8	0,4

Se la concentrazione di spermatozoi per campo microscopico varia considerevolmente, significa che il campione non è omogeneo. In tal caso il campione seminale andrà mescolato di nuovo con cura. Una non buona omogeneità può essere la conseguenza di una consistenza anomala, di una liquefazione incompleta, di una aggregazione degli spermatozoi per strie mucose, o della presenza di agglutinati di spermatozoi. Tutte queste osservazioni andranno segnalate nei risultati dello spermioγραμμα.

Se il numero di spermatozoi è basso (1-2 per campo a 400x), è possibile centrifugare il campione seminale per concentrarlo e determinare successivamente la concentrazione di spermatozoi. Un millilitro di liquido seminale (o la maggiore quantità di eiaculato possibile) viene centrifugato a 600 g per 15 minuti. Si rimuove quindi un volume noto di plasma seminale e ciò che rimane, accuratamente mescolato, viene contato come descritto nella Sezione 2.5.2. La concentrazione finale andrà corretta del volume del soprannatante rimosso. Dopo la centrifugazione, sul campione si potrà anche eseguire la valutazione della motilità e della morfologia degli spermatozoi. Se il numero di spermatozoi è basso (1-2 per campo), è sufficiente per la clinica riportare la concentrazione di spermatozoi come inferiore a $2 \times 10^6/\text{ml}$, specificando se sono stati riscontrati o meno spermatozoi mobili.

Tutti i campioni seminali nei quali non vengono rinvenuti spermatozoi al microscopio andranno centrifugati per rilevare la presenza di spermatozoi nel sedimento. E' consigliata una centrifugazione ad oltre 3000 g per 15 minuti. E' possibile definire azoospermici solamente quei campioni in cui, dopo una completa e sistematica analisi del sedimento risospeso, non vengano riscontrati spermatozoi.

2.4.3 Valutazione della motilità

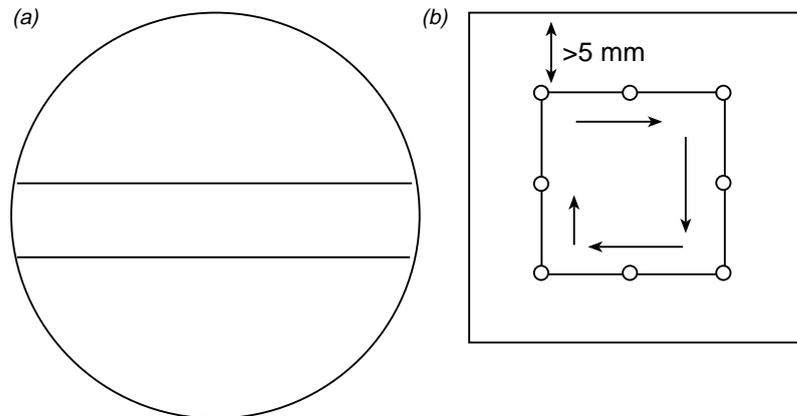
E' consigliabile un semplice sistema di classificazione, che permetta la valutazione delle motilità degli spermatozoi senza ricorrere a particolari apparecchiature. Le altre metodiche di valutazione della motilità incluso il CASA (*computer-aided sperm analysis*) sono descritte nella Sezione 2.11.

E' necessario osservare almeno 5 campi in modo sistematico per classificare 200 spermatozoi (Fig 2.2). La motilità di ogni spermatozoo è definita "a", "b", "c", o "d", se esso mostra:

- a. motilità progressiva rapida ($\geq 25 \mu\text{m/s}$ a 37°C e $\geq 20 \mu\text{m/s}$ a 20°C ; si ricorda che $25 \mu\text{m}$ corrispondono approssimativamente alla lunghezza della testa di 5 spermatozoi o alla metà della lunghezza di una coda);
- b. motilità progressiva lenta o irregolare;
- c. motilità non progressiva;
- d. immobili.

Gli spermatozoi con motilità "a" e "b" devono essere contati inizialmente nell'area del campo microscopico delimitata dalle linee (Fig. 2.2 (a) e (b)) o nell'intero campo se la concentrazione di spermatozoi è bassa. Successivamente verranno contati gli spermatozoi con motilità non progressiva "c" e immobili "d" presenti nella stessa area. Il numero di spermatozoi di ogni categoria viene registrato con l'aiuto di un contacellule. Altri 200 spermatozoi devono essere contati in un altro campione di $10 \mu\text{l}$ dello stesso eiaculato, e le percentuali di ogni classe

Fig. 2.2. (a) Linee di osservazione nel campo del microscopio per facilitare la valutazione della motilità. (b) Osservazione sistematica di 8 campi per valutare la motilità degli spermatozoi ad almeno 5 mm dal margine del vetrino coprioggetti.



di motilità vengono comparate. La Fig. 2.3 riporta il range delle differenze tra le percentuali previste nel 95% dei campioni per effetto della sola variabilità di conteggio legata al caso. Differenze maggiori suggeriscono che è stata effettuata una conta non corretta o che gli spermatozoi non erano distribuiti uniformemente nel preparato. In tal caso dovranno essere preparati due nuovi vetrini ed eseguita nuovamente la conta.

2.4.4 *Elementi cellulari diversi dagli spermatozoi*

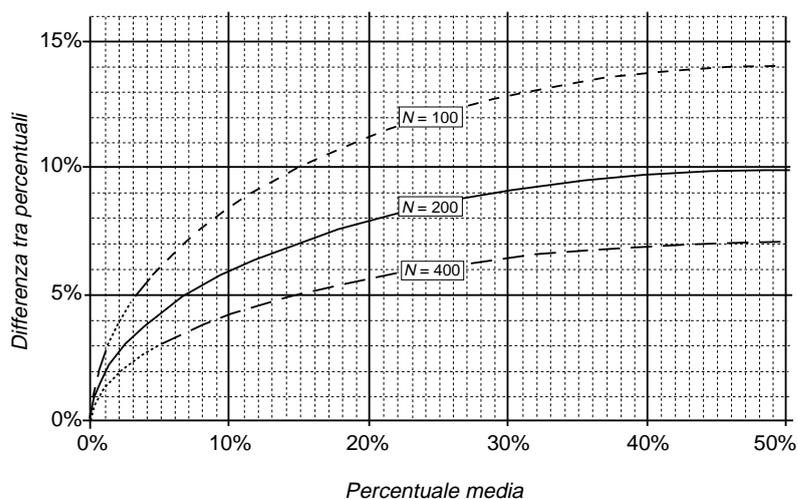
L'eiaculato contiene normalmente altre cellule oltre agli spermatozoi, comunemente definite *round cells* (cellule rotonde). Queste includono le cellule epiteliali del tratto genito-urinario, le cellule dell'epitelio prostatico, le cellule della spermatogenesi ed i leucociti (vedi Fig. 2.4). Come criterio generale, un eiaculato non deve contenere più di 5×10^6 cellule rotonde/ml.

Leucociti. - Leucociti, soprattutto neutrofili, sono presenti nella maggior parte degli eiaculati umani (Tomlisson *et al.*, 1993). Un loro numero eccessivo (leucospermia) può essere associato con una infezione e con cattiva qualità del liquido seminale (Wolff *et al.*, 1990). Il numero di leucociti non deve essere superiore a 1×10^6 /ml.

Sono state descritte svariate tecniche per quantizzare la popolazione leucocitaria nel liquido seminale. Nell'Appendice III sono descritte due tecniche citochimiche basate sulla presenza di perossidasi intracellulare e su quella di antigeni leucocita-specifici. La tecnica della perossidasi (Fig. 2.4a) fornisce stime che sono inferiori a quelle ottenute con gli anticorpi pan-leucocitari (Fig. 2.4b).

Quando il numero di leucociti nello sperma è alto, dovrebbero essere eseguiti test microbiologici per stabilire se vi sia un'infezione delle ghiandole accessorie. Questi test includono l'analisi del primo e del secondo getto urinario, del secreto prostatico e delle urine dopo massaggio prostatico (Meares & Stamey, 1972), ed includono anche le analisi biochimiche sul plasma seminale, dal momento che le infezioni delle ghiandole accessorie, spesso, provocano alterazioni della funzionalità secretoria (Sezione 2.10; Comhaire *et al.*, 1980). Comunque, l'assenza di leucociti non esclude la possibilità di un'infezione delle ghiandole accessorie (vedi World Health Organization, 1993).

Fig. 2.3. Range di confidenza al 95% per le differenze tra le due percentuali della conta di 100, 200, o 400 spermatozoi. Per determinare le percentuali delle due conte da 200, calcolare la media e la differenza. Se la differenza risulta maggiore di quanto indicato dalla curva $N = 200$, il campione dovrà essere analizzato nuovamente. La curva inferiore mostra l'incremento in precisione per la conta di 400 spermatozoi ($N = 400$). Per un risultato medio del 5%, l'intervallo di confidenza al 95% risulta del 3%. Gli errori statistici associati alla conta di 100 spermatozoi sono rappresentati sulla curva più alta ($N = 100$). Per un risultato del 5%, le due separate conte di 100 spermatozoi potranno essere del 3% e del 9% per solo effetto della variabilità casuale (vedi Appendice XXII per una versione più estesa di questi grafico).



Esempio 1:

Le motilità degli spermatozoi in due conte di 200 spermatozoi sono: categoria a = 3% e 20%; b = 32% e 40%; c = 5% e 5%; e d = 60% e 35%. La categoria di motilità più numerosa è la d (60% e 35%) con una media di 47,5% e una differenza di 25%. Dalla Fig. 2.3 si vede che per $N = 200$ spermatozoi in ogni preparato e con una media del 47,5%, è previsto che possa aver luogo una differenza fino al 10% ma non una del 25%. Di conseguenza i risultati devono essere scartati e la preparazione ripetuta. Si noti che, se la differenza percentuale in una categoria di motilità risulta maggiore di quanto atteso, allora anche quella in un'altra risulterà maggiore, come nell'esempio per la categoria a. Solamente le differenze delle categorie più rappresentate andranno comparate.

Esempio 2:

Le motilità di due conte di 200 spermatozoi sono: categoria a = 32% e 25%; b = 4% e 3%; c = 4% e 4%; e d = 60 e 68%; la categoria più rappresentata è la d, con una media del 64% ed una differenza dell'8%. Poiché la percentuale media 64% non rientra nella Fig. 2.3, è riportata la differenza attesa per una percentuale media di 36% (=100%-64%). Per $N = 200$ in ciascun campione, differenze fino a 9,5% possono realizzarsi per solo effetto casuale, e la differenza osservata è inferiore a questa. Vengono calcolate le percentuali medie per ciascuna categoria di motilità: 28,5%, 3,5%, 4% e 64%. Notare che la convenzione prevede di arrotondare lo 0,5% al più vicino numero pari, ad esempio, 28,5% si abbassa a 28% ma 3,5% si alza a 4%. Le percentuali riportate dovrebbero sommarsi a 100% aggiustando, se necessario, la categoria più numerosa, ad esempio a = 28%, b = 4%, c = 4% e d = 64%.

Cellule germinali immature. - Le *round cells*, oltre ai leucociti, comprendono anche gli spermatidi rotondi, gli spermatociti, gli spermatogoni e le cellule epiteliali desquamate. Spesso esse sono degenerate, e pertanto, difficili da identificare.

I differenti tipi di cellule germinali immature presenti nello sperma (Fig. 2.11) sono generalmente indicativi di disordini della spermatogenesi; la loro identificazione può essere facilitata dall'uso

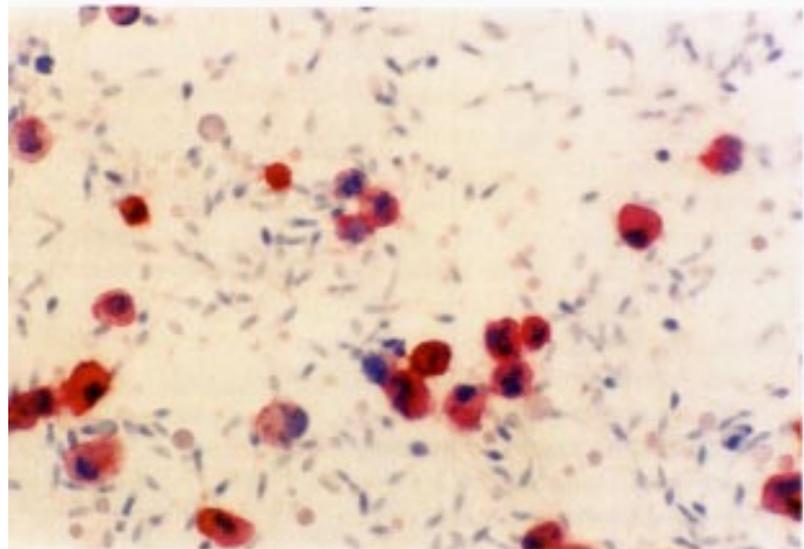
della colorazione di Bryan-Leishman (vedi Appendice VIII della terza edizione di questo manuale). Queste cellule possono essere distinte dai leucociti dalle loro caratteristiche citologiche, dall'assenza di perossidasi intracellulare e dall'assenza di antigeni leucocita-specifici (vedi Appendice III). Gli spermatidi rotondi possono essere individuati da una colorazione che evidenzia l'acrosoma, come quella dell'acido periodico di Schiff. L'eccessiva perdita di cellule germinali immature deriva, di solito, da un danno alla funzione dei tubuli seminiferi, come avviene nell'ipospertogenesi, nel varicocele, nelle disfunzioni delle cellule di Sertoli, ed è associata con una ridotta fertilità *in vitro*.

Conteggio delle cellule non spermatozoarie. - La concentrazione di queste cellule può essere stimata in preparati a fresco, con un emocitometro adatto, allo stesso modo di come si contano gli spermatozoi (vedi Sezione 2.5.2). Dal momento che solo gli spermatozoi vengono inclusi nella valutazione della densità spermatica, la concentrazione degli altri tipi di cellule germinali può essere calcolata in relazione a

Fig. 2.4. Leucociti nel liquido seminale umano (400x).
(a) Colorazione con il metodo della perossidasi (Da C. DeJonge; vedi Appendice III.1.)
(b) Colorazione con anticorpo monoclonale contro l'antigene comune leucocitario CD45 (vedi Appendice III.2).



(a)



(b)

quella degli spermatozoi. Se N è il numero di un certo tipo cellulare, contato nello stesso campo dove ci sono 100 spermatozoi e S è la concentrazione spermatozoaria in milioni/ml, allora la concentrazione C di quel tipo cellulare, in milioni/ml, può essere calcolata dalla formula

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

Per esempio, se le cellule germinali immature, o i leucociti, contate sono pari a 10 per 100 spermatozoi e la densità spermatozoaria è 120×10^6 /ml, la concentrazione di quelle cellule sarà

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

Se non si riscontrano cellule nell'intero preparato, è corretto registrare che ci sono meno di 3,7 cellule/unità di volume esaminato (il limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% di 0 è 3,7 in una distribuzione di Poisson). Così, per un campione di 1 μ l la conta è < 3700 cellule/ml, che rappresenta il limite di sensibilità del metodo. Gli errori di conteggio sono maggiori quando si vedono solo poche cellule. Negli studi di ricerca sui leucociti o altre cellule del liquido seminale sono necessari campioni di maggior volume, per poter contare almeno 200 cellule e raggiungere così errori di conteggio accettabilmente bassi (vedi Sezione 2.5.2).

2.4.5 *Agglutinazione*

Per agglutinazione degli spermatozoi si intende che gli spermatozoi motili aderiscono l'uno all'altro testa a testa, coda a coda, o in modo misto, testa a coda. L'aderenza tra loro di spermatozoi immobili, e quella degli spermatozoi motili a filamenti di muco e ad altri tipi di cellule o a detriti devono essere considerate come fenomeni di aggregazione non specifica piuttosto che agglutinazione, e pertanto come tali dovrebbero essere registrate.

La presenza di agglutinazione suggerisce, ma non ne è segno determinante, una infertilità di natura immunologica. L'agglutinazione viene rilevata durante la valutazione della motilità. Deve essere annotato il tipo di agglutinazione, se testa a testa, coda a coda o mista, e può essere impiegata una gradazione semiquantitativa che va da – (nessuna agglutinazione) a +++ (grossi ammassi in cui tutti gli spermatozoi motili sono agglutinati).

2.5 **Altre valutazioni microscopiche**

2.5.1 *Vitalità spermatozoaria per esclusione del colorante*

La vitalità degli spermatozoi è definita dalla percentuale di cellule vive, determinata dall'esclusione del colorante o dal test di swelling (rigonfiamento) iposmotico (vedi Sezione 2.8). Essa dovrebbe essere valutata quando la percentuale degli spermatozoi immobili supera il 50%. La percentuale di spermatozoi vivi può essere determinata attraverso tecniche di colorazione che si basano sul principio che le

cellule morte, che hanno una membrana danneggiata, trattengono determinati coloranti. I dettagli dei protocolli per eseguire queste tecniche sono riportati nell'Appendice IV.

Al microscopio a contrasto di fase vengono contati 200 spermatozoi, differenziando gli spermatozoi vivi (non colorati) dalle cellule morte (colorate).

La valutazione della vitalità degli spermatozoi rappresenta un controllo dell'accuratezza della valutazione della motilità, dal momento che la percentuale delle cellule morte non deve superare (nei limiti dell'errore di conteggio) la percentuale degli spermatozoi immobili. La presenza di un'ampia percentuale di spermatozoi vitali ma immobili può essere indicativa di alterazioni strutturali del flagello.

2.5.2 *Valutazione della concentrazione degli spermatozoi*

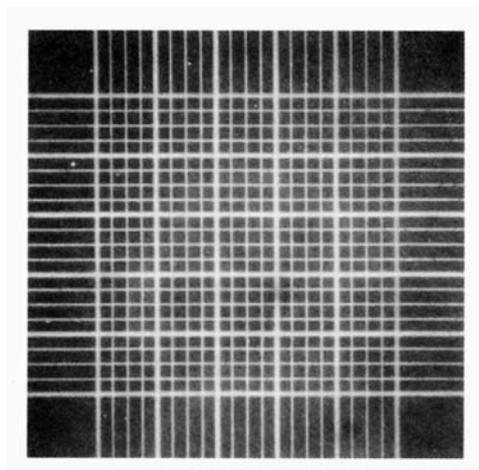
La concentrazione degli spermatozoi deve essere determinata con un metodo emocitometrico su due diversi preparati del campione seminale, uno per ciascun lato della camera di conta. La diluizione (1:5, 1:10, 1:20, 1:50) viene determinata alla valutazione preliminare della conta spermatica (Sezione 2.4.2). Per esempio, una diluizione 1:20 si ottiene diluendo 5 µl di sperma con 95 µl di diluente. Il diluente viene preparato aggiungendo ad acqua distillata 50 g di bicarbonato di sodio (NaHCO_3), 10 ml di formalina (35% v/v) e 0,25 g di trypan blue (Colour Index C.I. 23850) o 5 ml di soluzione acquosa satura di violetto di genziana, portando la soluzione al volume finale di 1 litro. Il colorante non è necessario se si usa un microscopio a contrasto di fase.

Le pipette per la diluizione dei globuli bianchi e quelle automatiche che si basano su dispositivi pneumatici non sono abbastanza precise per fare diluizioni volumetriche dello sperma, ma si dovrà usare una pipetta a spostamento positivo (vedi Appendice XXII).

Fissare il coprioggetto sulla camera di conta dell'emocitometro di Neubauer modificato umidificando leggermente i due lati degli alloggiamenti (con una goccia d'acqua sul dito). Premere con fermezza il coprioggetto fino a che non compaia una iridescenza (anelli di Newton) tra le due superfici di vetro. Trasferire in ciascuna delle due camere di conta dell'emocitometro circa 10 µl di campione diluito e ben miscelato, da ciascuna diluizione in doppio. Per fare questo, toccare delicatamente il bordo del coprioggetto con la punta della pipetta e lasciare che ciascuna camera si riempia per azione della capillarità. Le camere non devono essere riempite troppo o troppo poco, ed il coprioggetto non deve essere spostato. L'emocitometro viene quindi mantenuto per circa 5 minuti in una camera umida, per evitarne l'essiccazione. In questo tempo le cellule sedimentano, e possono così essere contate, preferibilmente con un microscopio a contrasto di fase, ad un ingrandimento di 200-400x. Devono essere contati solo gli spermatozoi completi (teste con coda), mentre gli altri (flagelli isolati e teste senza coda) devono essere registrati separatamente.

La procedura per il conteggio degli spermatozoi nella camera dell'emocitometro è la seguente. Il quadrato centrale della griglia, nell'emocitometro di Neubauer modificato, contiene 25 grandi

Fig. 2.5. La griglia centrale dell'emocitometro di Neubauer perfezionato contiene 25 quadrati in cui si devono contare gli spermatozoi (vedi Sezione 2.5.2 e Tab. 2.1).



Esempio 1:

I conteggi di dieci quadrati in ciascuna camera danno 250 e 198 spermatozoi. La somma è 448, e la differenza 52 è maggiore di quella attesa per il caso (Fig. 2.6). I risultati sono quindi rifiutati, il campione miscelato attentamente di nuovo e viene eseguita una nuova diluizione, in doppio, che verrà analizzata nuovamente.

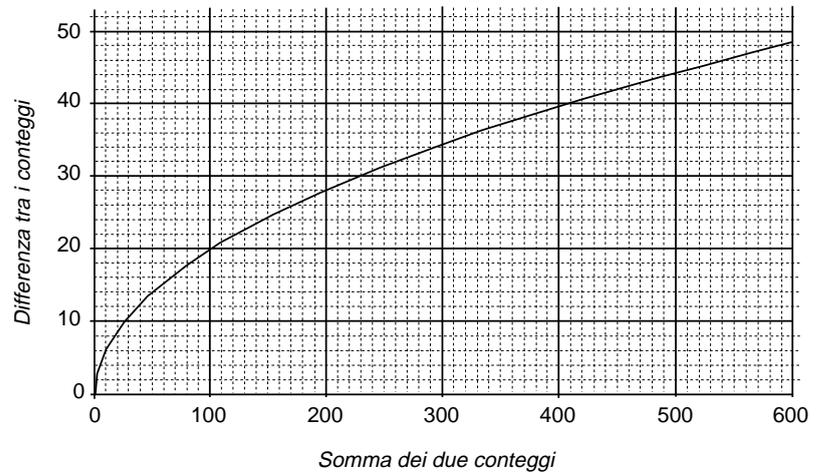
Esempio 2:

I conteggi di dieci quadrati in ciascuna camera danno 247 e 213 spermatozoi. La somma è 460, e la differenza 34. La Fig. 2.6 mostra che per due conteggi con un totale di 460, differenze inferiori a 42 si rilevano frequentemente per solo effetto del caso, e la differenza osservata è inferiore a questo limite. Si calcola il conteggio medio ($460/2 = 230$) e si valuta la concentrazione in base ai fattori di conversione della Tab. 2.1.

quadrati, ciascuno dei quali ne contiene 16 piccoli (Fig. 2.5). Per campioni che contengono meno di 10 spermatozoi per quadrato grande, devono essere contati gli spermatozoi dell'intera griglia di 25 quadrati grandi, per campioni contenenti da 10 a 40 spermatozoi per quadrato grande è necessario esaminare dieci quadrati grandi, mentre per campioni con più di 40 spermatozoi per quadrato grande dovrebbero essere contati gli spermatozoi di 5 quadrati grandi. Se uno spermatozoo è posto sulla linea che divide due quadrati adiacenti, dovrebbe essere contato solo quando è sul lato superiore o quello sinistro del quadrato che stiamo analizzando.

Deve essere effettuata una conta in doppio di 200 spermatozoi per raggiungere un errore di conteggio accettabilmente basso. Per monitorare i due conteggi, calcolare la loro somma e differenza. La Fig. 2.6 mostra l'intervallo delle differenze che potremmo attenderci nel 95% dei campioni come effetto della sola variabilità casuale. Differenze maggiori suggeriscono un errore nella diluizione o nel conteggio, oppure una distribuzione non casuale degli spermatozoi nello sperma diluito. Quando le differenze nel conteggio sono maggiori di quelle indicate nella curva di Fig. 2.6, due nuove diluizioni dello sperma, in doppio, devono essere allestite e contate nuovamente.

Fig. 2.6. Intervallo di confidenza approssimato al 95% per le differenze tra due conteggi. Per valutare questi conteggi, calcolare la loro somma e differenza. Se la differenza è maggiore di quella indicata dalla curva potrebbe esserci un errore sistematico (vedi Capitolo 4) ed il campione deve essere nuovamente analizzato. Sono evidenti gli ampi errori statistici associati al conteggio di un numero di spermatozoi inferiore a 200. Per esempio, per un conteggio medio di 60 spermatozoi (somma 120), le due conte possono variare da 50 a 70 solo per effetto del caso (vedi Appendice XXII per una rappresentazione più ampia di questo grafico).



Per determinare la concentrazione degli spermatozoi nel campione seminale in milioni/ml, il numero medio degli spermatozoi viene diviso per l'appropriato fattore di conversione riportato in Tab. 2.1. Per esempio, per una conta media di 230 in una diluizione 1:20 e 10 quadrati contati per camera, il fattore di conversione è 2 e la concentrazione $115 \times 10^6/\text{ml}$.

Altre camere, oltre all'emocitometro, possono essere impiegate per determinare la concentrazione degli spermatozoi, come la camera di Makler (Makler, 1980) e la Microcell (Ginsburg & Armant, 1990), se da una parte sono convenienti perché evitano di fare la diluizione, dall'altra non hanno la precisione e l'accuratezza del metodo dell'emocitometro. Qualora se ne voglia fare uso, è necessario confrontarne la validità con l'emocitometro.

2.5.3 Valutazione della morfologia spermatozoaria

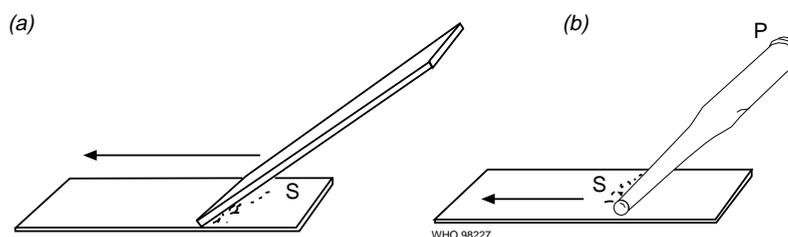
Sebbene la variabilità morfologica dello spermatozoo umano renda difficoltosa la valutazione della morfologia, osservazioni su spermatozoi raccolti dalle vie genitali femminili (in particolar modo nel muco cervicale dopo il coito) o dalla superficie della zona pellucida hanno contribuito a definire l'aspetto dello spermatozoo normale (Fredricsson & Bjork, 1977; Mortimer *et al.*, 1982; Menkveld *et al.*, 1990; Liu & Baker, 1992).

Preparazione degli strisci. - Almeno due strisci dovrebbero essere allestiti da ciascun campione, per la valutazione in doppio, ed in caso di artefatti di colorazione. I vetrini devono in primo luogo essere puliti con cura, lavati in etanolo al 70% ed asciugati; quindi deporvi una piccola goccia (5-20 μl) di sperma. Se la concentrazione di spermatozoi è superiore a $20 \times 10^6/\text{ml}$ si devono usare 5 μl di sperma, se è inferiore a $20 \times 10^6/\text{ml}$ è preferibile usare 10 o 20 μl .

La tecnica del *feathering*, in cui il bordo di un secondo vetrino viene impiegato per trascinare la goccia di liquido seminale sulla superficie di un vetrino pulito (Fig. 2.7(a)), può essere utilizzata per fare strisci di spermatozoi, ma bisogna porre attenzione a non fare strisci di spessore eccessivo. Il *feathering* dà buoni risultati in campioni con viscosità normale, ma spesso non può essere utilizzato

Fig. 2.7. Preparazione dello striscio per colorazione per la morfologia spermatica. (a) Metodo *feathering* per lo sperma non diluito.

Una goccia di liquido seminale si sparge ad opera del bordo posteriore di un vetrino tenuto ad angolo, e viene spinta avanti sul vetrino liscio per formare uno striscio. (b) Metodo della pipetta per campioni trattati. Una goccia di sospensione (S) viene sparsa sulla superficie del vetrino da una pipetta tenuta orizzontale (P).



se la viscosità è aumentata. In alternativa, una goccia di sperma può essere deposta al centro di un vetrino, ed un secondo vetrino, rivolto verso il basso, viene appoggiato sopra, in modo che lo sperma venga a spandersi tra di loro; separando delicatamente i due vetrini, si ottengono così due preparati contemporaneamente.

Talvolta è difficile ottenere un buono striscio per la variabile viscosità del liquido seminale, che causa uno spessore inadatto del preparato; anche grossi quantitativi di detriti e di materiale corpuscolare possono causare una deposizione non perfettamente orizzontale degli spermatozoi. Quando vi sono concentrazioni molto basse di spermatozoi, iperviscosità dello sperma, presenza massiva di detriti o quando si intende procedere ad un'analisi computerizzata della morfologia, può essere opportuno diluire lo sperma e liberare per centrifugazione gli spermatozoi del plasma seminale (Liu & Baker, 1992; Menkveld & Kruger, 1996). Il pellet di spermatozoi viene risospeso in un volume appropriato per ottenere la maggior concentrazione possibile di spermatozoi, comunque non superiore a $80 \times 10^6/\text{ml}$. Un'aliquota di 0,2-0,5 ml di liquido seminale, in funzione della concentrazione degli spermatozoi, viene portata a 10 ml con soluzione salina bilanciata a temperatura ambiente. Si centrifuga la provetta a 800 g per 10 minuti e viene gettata la maggior parte del sovrantante ancora con soluzione salina, in genere 20-40 μl , picchiando delicatamente la provetta. Quindi, 5-10 μl di questa sospensione vengono posti su un vetrino portaoggetti e la goccia viene sparsa sul vetrino con una pipetta, come illustrato nella Fig. 2.7 (b). Il vetrino viene quindi scansionato all'ingrandimento totale di 400x per assicurarsi che lo striscio abbia una buona dispersione degli spermatozoi e che ci siano almeno 40 spermatozoi per ogni campo a 400x, senza ammassi di spermatozoi o sovrapposizioni. Se lo striscio è troppo denso di cellule, si usa per la diluizione un volume più piccolo di eiaculato, o viene ulteriormente diluita la precedente sospensione, e lo striscio viene ripetuto. Se gli spermatozoi sono troppo dispersi sul vetrino, deve essere utilizzata una maggior quantità di sperma per ottenere un maggior numero di spermatozoi. I vetrini così ottenuti vengono lasciati asciugare all'aria e poi fissati. Le modalità di fissazione dipendono dal metodo di colorazione.

Metodi di colorazione. - La colorazione di Papanicolaou è il metodo più diffuso nei laboratori di andrologia, ed è il metodo consigliato da questo manuale. Essa fornisce una buona colorazione degli spermatozoi e delle altre cellule: permette la colorazione della regione acrosomiale e di quella postacrosomiale della testa, i residui citopla-

smatici, il tratto intermedio ed il flagello (Appendice V e Fig. 2.9). La colorazione di Shorr (Appendice VI e Fig. 2.10) dà risultati simili a quella di Papanicolaou per le forme normali (Meschede *et al.*, 1993). In alcuni laboratori viene utilizzato il metodo di colorazione rapido del Diff-Quik (Kruger *et al.*, 1987; Appendice VII). Alcuni strisci colorati con metodiche rapide possono avere un fondo di colorazione e non sempre garantiscono una qualità buona come il Papanicolaou. Inoltre, la dimensione della testa degli spermatozoi colorati con il Diff-Quik è maggiore di quella rilevata con le colorazioni di Papanicolaou e di Shorr (Kroger *et al.*, 1988).

Con queste colorazioni la testa si colora di blu pallido nella regione acrosomiale e di blu scuro in quella postacrosomiale. Il tratto intermedio può assumere una colorazione rossastra. La coda si colora anch'essa di rosso o di blu. I residui citoplasmatici, di solito osservabili dietro la testa ed intorno al tratto intermedio, si colorano di verde con la colorazione di Papanicolaou (Fig. 2.9).

2.5.4 *Classificazione della morfologia degli spermatozoi*

Le teste degli spermatozoi umani colorati sono leggermente più piccole delle teste degli spermatozoi vivi, osservati nello sperma fresco, sebbene la loro forma non differisca in modo sensibile (Katz *et al.*, 1986). Quando si valuta la normalità degli spermatozoi è necessario applicare criteri ristretti (Menkveld *et al.*, 1990). Perché uno spermatozoo possa essere considerato normale è necessario che siano normali la testa, il collo, il tratto intermedio e la coda dello spermatozoo. La testa deve avere forma ovale: tenendo conto della leggera contrazione che la testa subisce durante la fissazione e la colorazione, la lunghezza deve essere 4,0-5,5 μm e la larghezza 2,5-3,5 μm . Il rapporto lunghezza/larghezza deve essere 1,50-1,75. Questi intervalli rientrano nei limiti di confidenza al 95% per le teste di spermatozoi colorati con il Papanicolaou (Katz *et al.*, 1986). La stima della lunghezza e della larghezza dello spermatozoo può essere effettuata mediante un oculare micrometrico. Dovrebbe essere presente una regione acrosomiale ben definita, che occupa il 40-70% dell'area della testa. Il pezzo intermedio deve essere slanciato, largo meno di 1 μm , circa una volta e mezzo la lunghezza della testa, e congiunto assialmente alla testa. I residui citoplasmatici non devono superare la metà della dimensione della testa. La coda deve essere diritta, uniforme, più sottile del tratto intermedio, non arrotolata e lunga approssimativamente 45 μm . Lo schema classificativo richiede che tutte le forme "ai limiti" siano considerate anomale (Kruger *et al.*, 1986; Menkveld *et al.*, 1990). Usando questi criteri di classificazione, vi sono dati che mostrano il valore prognostico della morfologia spermatozoaria nella fecondazione *in vitro* (Kruger *et al.*, 1986, 1988; Kobayashi *et al.*, 1991; Enginsu *et al.*, 1991; Liu & Baker, 1992; Ombelet *et al.*, 1995).

Poiché la valutazione morfologica consigliata considera le regioni funzionali dello spermatozoo, non si ritiene necessario, nella routine, fare distinzioni tra le varie alterazioni della forma e della dimensione della testa o tra i vari tipi di anomalie del tratto intermedio o del flagello. Comunque, dovrebbe essere fatto un commento aggiuntivo sulle anomalie più frequenti.

Le classi di anomalie che devono essere annotate sono le seguenti (vedi esempi nelle Fig. 2.8-2.10).

- (a) *Anomalie della testa* definiscono teste grandi, piccole, allungate, piriformi, rotonde, amorphe e vacuolate (> 20% dell'area della testa occupata da una zona vacuolare non colorata), teste acrosoma piccolo (< al 40% dell'area della testa), teste duplici e qualsiasi combinazione tra queste categorie.

Fig. 2.8. Disegni schematici di alcune forme anomale di spermatozoi umani. (Adattato da Kruger *et al.*, 1993)

(A) Anomalie della testa.

(a) Allungata. (b) Piriforme.

(c) Rotonda, piccola e con acrosoma assente o presente. (d) Amorfa.

(e) Vacuolata. (f) Acrosoma piccolo.

(B) Anomalie del collo e del tratto intermedio. (g) Collo angolato.

(h) Inserzione asimmetrica del tratto intermedio.

(i) Tratto intermedio ispessito.

(j) Tratto intermedio sottile.

(C) Anomalie della coda. (k) Coda corta.

(l) Coda piegata.

(m) Coda avvolta.

(D) Persistenza di residuo citoplasmatico.

(n) Residuo maggiore di un terzo dell'area della testa dello spermatozoo.

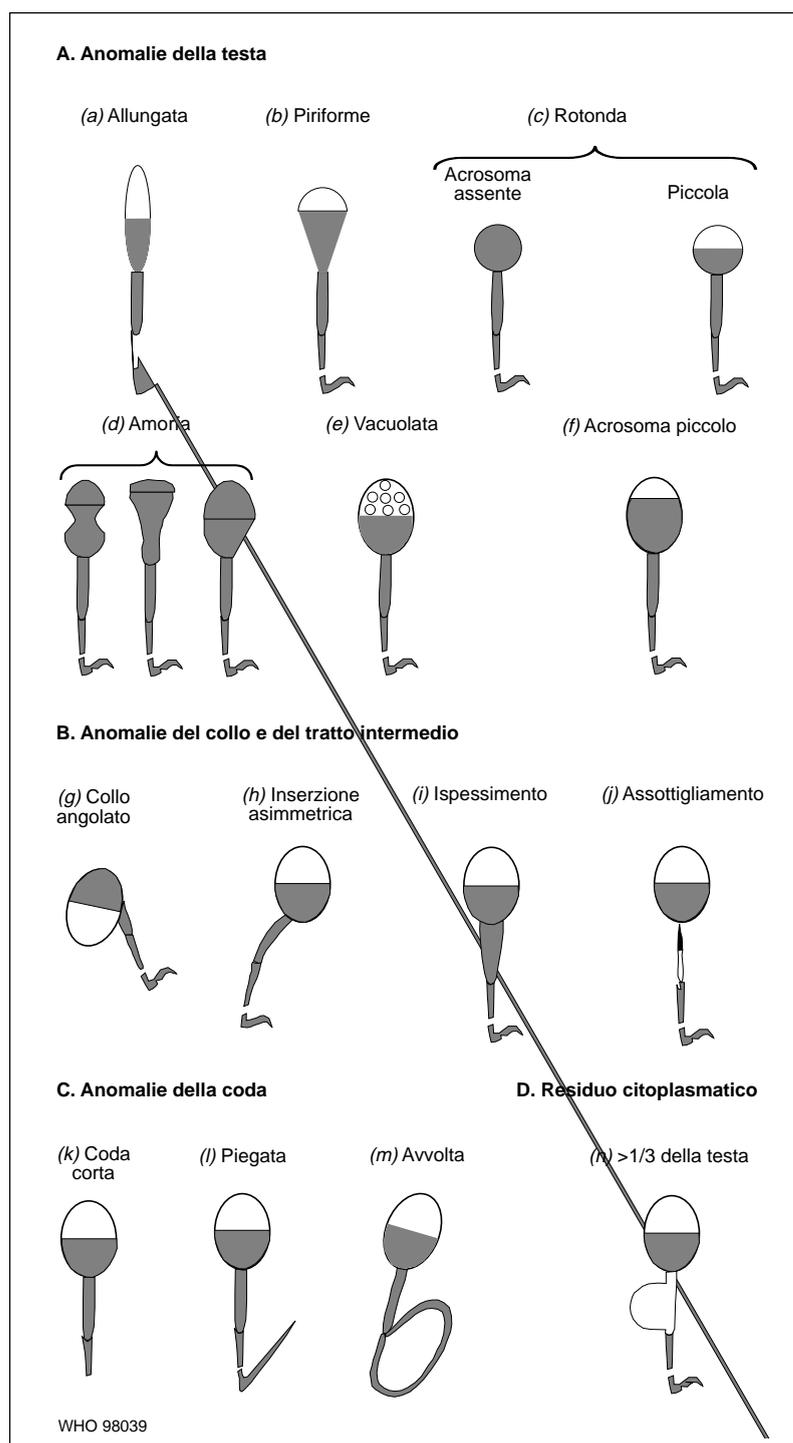
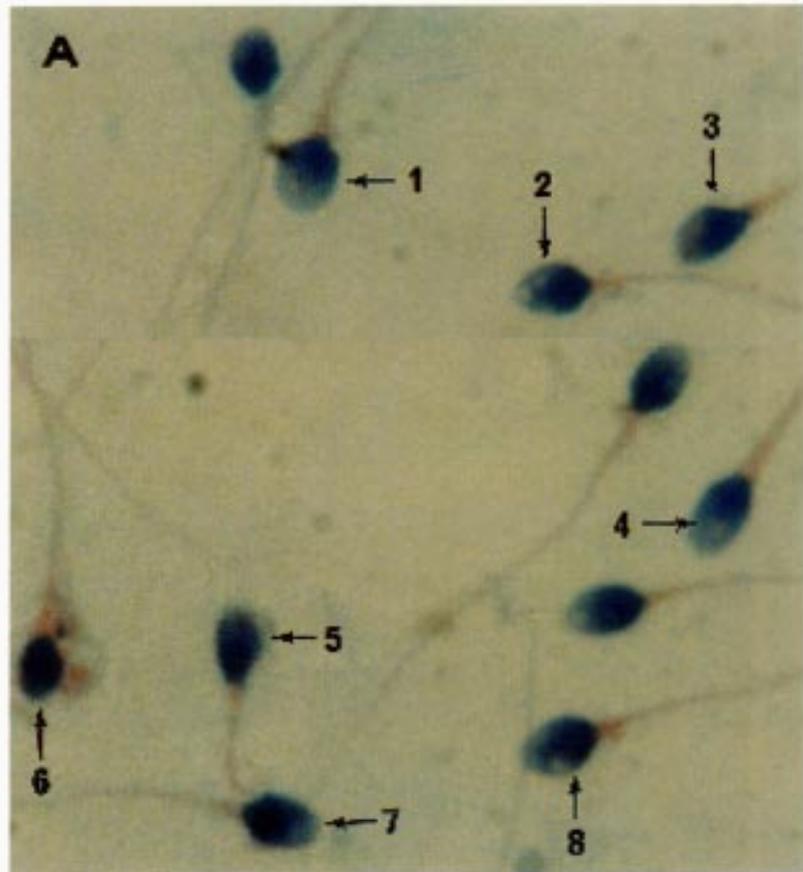


Fig. 2.9. Microfotografia (circa 1700x) di spermatozoi colorati con Papanicolaou (Da J. Suominen; vedi Appendice V).

(A) (1) Anomalia, testa grande e troppo larga (>3,5 m).
 (2) Anomalia, area acrosomiale piccola e vacuolata.
 (3) Anomalia, testa amorfa.
 (4) Normale. (5) Anomalia, area acrosomiale piccola.
 (6) Anomalia, testa amorfa e residuo citoplasmatico.
 (7) Normale. (8) Anomalia, area acrosomiale piccola e vacuolata.

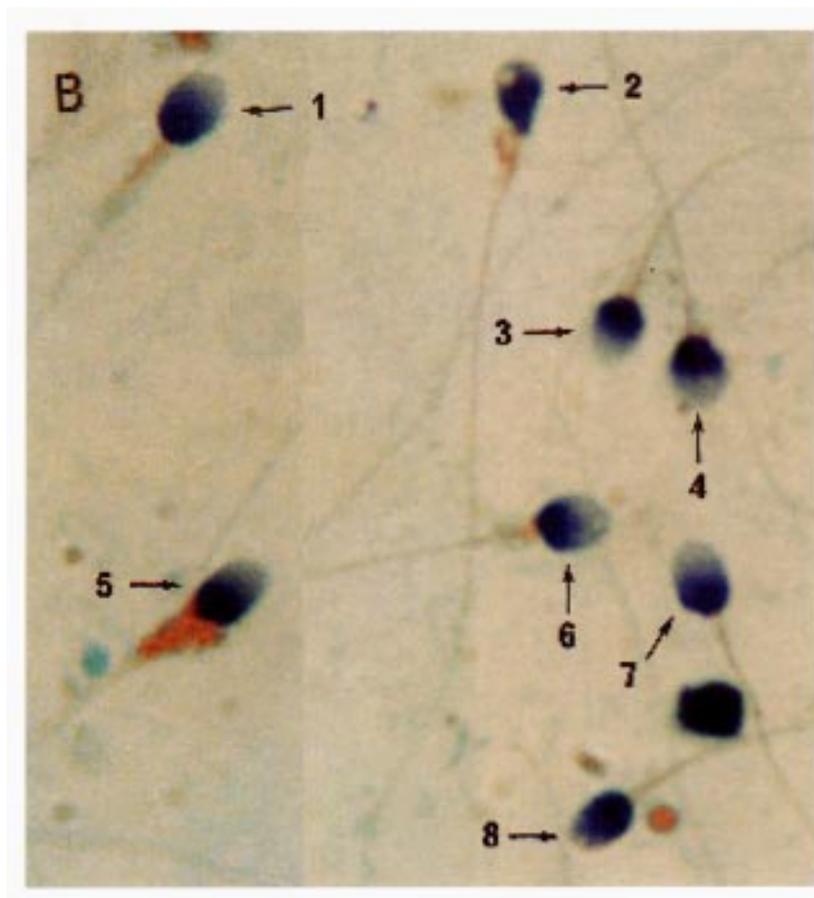


- (b) *Anomalie del collo e del tratto intermedio*, descritte come coda angolata (il collo e la coda formano un angolo maggiore di 90° con l'asse maggiore della testa), inserzione asimmetrica del tratto intermedio nella testa, tratto intermedio ispessito o irregolare, tratto intermedio eccessivamente sottile (ad es., privo di fascia mitocondriale), e qualsiasi combinazione tra queste categorie.
- (c) *Anomalie della coda* definiscono code corte, multiple, a zig-zag, rotte e piegate ($> 90^\circ$), avvolte, code di spessore irregolare e qualsiasi combinazione tra queste categorie.
- (d) *Residui citoplasmatici* maggiori della metà dell'area della testa normale di uno spermatozoo.

Solo gli spermatozoi ben riconoscibili e dotati di flagello vengono inclusi nel conteggio differenziale della morfologia: le cellule immature, fino allo stadio di spermatidio rotondo compreso, non vengono contate come spermatozoi (Fig. 2.11). Le teste isolate, o perse dagli spermatozoi, non vengono contate ma sono registrate separatamente (vedi Sezione 2.5.2). I flagelli avvolti possono essere associati con una bassa motilità spermatica o indicare che gli spermatozoi hanno subito uno stress ipo-osmotico. Talvolta molti spermatozoi possono avere uno specifico difetto strutturale, come il mancato sviluppo dell'acrosoma, che causa l'anomalia delle "teste piccole e tonde" o "globozoospermia" (Fig. 2.8). L'alterata inserzione del nucleo alla piastra basale, all'estremità opposta dell'acrosoma, causa alla spermioistogenesi il distacco tra testa e flagello. Le teste vengono riassorbite, e soltanto le code sono presenti nel liquido

Fig. 2.9. (continua)

- (B)** (1) Anomalia, tratto intermedio ispessito. (2) Anomalia, testa amorfa e asimmetrica. (3) Anomalia, testa asimmetrica. (4) Anomalia, testa tonda ed amorfa con regione postacrosomiale asimmetrica. (5) Anomalia, residuo citoplasmatico. (6) Anomalia, testa tonda. (7) Normale (nonostante una lieve asimmetria della testa). (8) Anomalia, testa piccola con ridotta regione acrosomiale.



seminale, dando il fenomeno dei “flagelli isolati” o “teste a spillo”. I flagelli isolati non vengono contati come anomalie della testa, poiché solo raramente posseggono alcuna struttura cromatinica, o comunque della testa, in posizione anteriore alla piastra basale. Se si rilevano molti flagelli isolati, questi dovrebbero essere contati separatamente.

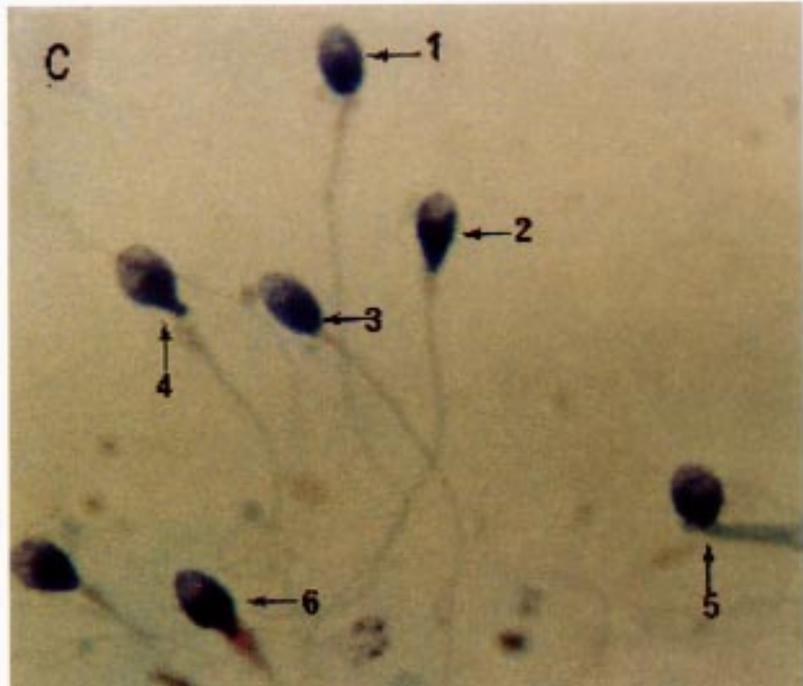
2.5.5 Esecuzione del conteggio della morfologia spermatozoaria

Con preparati colorati, è necessario utilizzare un obiettivo in campo chiaro 100x ad immersione di olio ed un oculare almeno 10x. La valutazione della morfologia dovrebbe essere eseguita su diverse aree del vetrino scelte in modo sistematico (Fig. 2.2(b)). Mentre il vetrino viene esaminato sistematicamente da un campo microscopico a quello successivo, vengono contati tutti gli spermatozoi normali, e vengono registrate tutte le alterazioni di quelli anomali. Gli spermatozoi sovrapposti e quelli con la testa appoggiata su un fianco non possono essere valutati. Questi ultimi si riconoscono muovendo la manopola del fuoco del microscopio. Per misurare le dimensioni degli spermatozoi è essenziale disporre di un oculare micrometrico. Anche gli operatori più esperti dovrebbero utilizzare un micrometro artigianale per poter controllare le dimensioni delle teste degli spermatozoi in ciascuna preparazione di vetrini che devono essere analizzati.

Contare almeno 200 spermatozoi consecutivi (analizzarne 200 è meglio che non 100 due volte). Sebbene sia preferibile contarne 200 due volte, per ridurre l'errore di conteggio dovuto alla variabilità, questa procedura può non risultare agevole per tutti i campioni in

Fig. 2.9. (continua)

- (C)** (1) Normale.
 (2) Anomalo, testa piriforme.
 (3) Normale (nonostante la testa leggermente assottigliata).
 (4) Anomalo, testa amorfa.
 (5) Anomalo, regione acrosomiale ridotta con tratto intermedio ispessito e inserzione asimmetrica.
 (6) Anomalo, testa amorfa con ispessimento del tratto intermedio.



ogni laboratorio. Comunque, quando la diagnosi ed il trattamento di un paziente dipende in primo luogo dalla percentuale di spermatozoi con morfologia normale, si devono contare due volte 200 spermatozoi, in modo da aumentare la precisione (vedi Fig. 2.3).

2.6 Determinazione degli anticorpi adesi agli spermatozoi

Gli anticorpi anti-spermatozoo nel liquido seminale appartengono quasi esclusivamente a due classi immunologiche: IgA ed IgG. Gli anticorpi IgA sembrano avere un maggior significato clinico di quelli IgG (Kremer & Jager, 1980). Gli anticorpi IgM, a causa del loro elevato peso molecolare, si ritrovano difficilmente nel liquido seminale.

La ricerca degli anticorpi viene eseguita sul liquido seminale a fresco, e può essere fatta con l'immunobead test o con il MAR test (*mixed antiglobulin reaction*; per una rassegna vedi Bronson *et al.*, 1984). Affinché questi test siano affidabili, deve essere possibile contare almeno 200 spermatozoi.

I risultati dell'immunobead test e del MAR test non sempre sono concordanti (Scarselli *et al.*, 1987; Hellstrom *et al.*, 1989). L'immunobead test ha una buona correlazione con il test di immobilizzazione eseguito su siero. Quando questi test sono positivi, dovrebbero essere eseguite ulteriori indagini (test di contatto tra sperma e muco cervicale, test in capillare tra muco cervicale e sperma; vedi Capitolo 5).

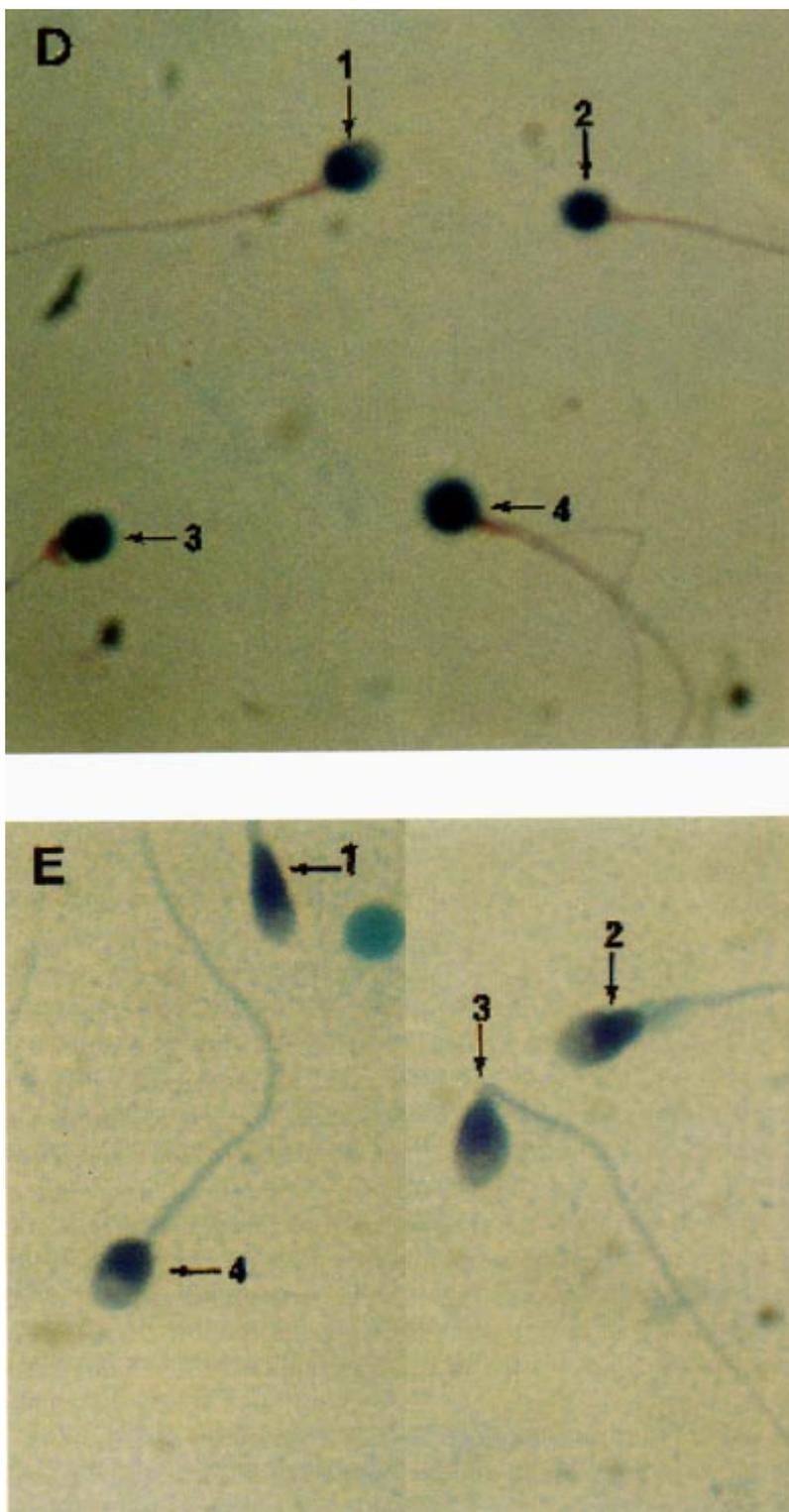
2.6.1 Immunobead test

Anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi possono essere individuati mediante l'immunobead test (Appendice VIII). Le immunobeads sono sferette di poliacrilamide con immuno-

Fig. 2.9. (continua)

(D) (1) Anomalo, regione acrosomiale ridotta, testa troppo larga (rapporto lunghezza/larghezza $< 1,5$) e rotonda. (2) Anomalo, testa piccola e rotonda priva di acrosoma. (3) Anomalo, testa piccola e tratto intermedio ispessito. (4) Anomalo, testa rotonda e tratto intermedio ispessito.

(E) (1) Anormale, testa allungata. (2) Anormale, testa piriforme. (3) Anormale, testa amorfa non ovale con collo spezzato. (4) Normale.

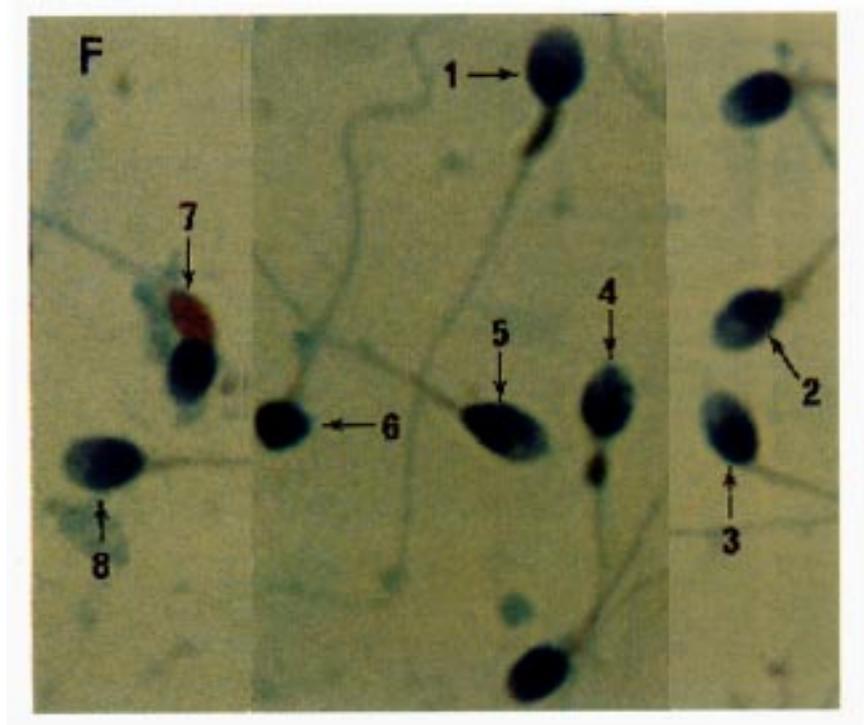


globuline antiuane di coniglio legate con legame covalente. Con questo metodo si valuta contemporaneamente la presenza di anticorpi IgG e IgA.

Gli spermatozoi, lavati dal plasma seminale mediante ripetute centrifugazioni, vengono risospesi in tampone e quindi miscelati con una sospensione di immunobeads. Il preparato viene osservato al

Fig. 2.9. (continua)

(F) (1) Anomalo, testa larga e tratto intermedio ispessito. (2) Normale. (3) Normale. (4) Anomalo, testa amorfa vacuolizzata con regione postacrosomiale asimmetrica. (5) Anomalo, testa piriforme e area acrosomiale vacuolizzata. (6) Anomalo, testa piccola e amorfa. (7) Anomalo, testa amorfa e grosso residuo citoplasmatico. (8) Normale.



microscopio a contrasto di fase a 400x. Le immunobeads aderiscono agli spermatozoi motili che hanno anticorpi legati sulla superficie. Viene determinata la percentuale di spermatozoi che presentano anticorpi legati alla superficie, viene registrata la modalità con cui avviene questo legame mentre la classe di questi anticorpi (IgG o IgA) può essere precisata dall'impiego di preparati di immunobeads specifici (Appendice VIII).

La penetrazione degli spermatozoi nel muco cervicale e la fertilità *in vitro* non sembrano danneggiare fino a che almeno il 50% degli spermatozoi motili non presenti anticorpi adesivi (Ayvaliotis *et al.*, 1985; Clarke *et al.*, 1985). Su questa base, almeno il 50% degli spermatozoi motili dovrebbe essere coperto di immunobeads prima che il fenomeno assuma un significato clinico. Inoltre, il legame delle immunobeads limitato all'estremità del flagello non è associato con una riduzione della fertilità, e può essere presente anche in uomini fertili.

2.6.2 MAR test

Il MAR test per la ricerca di IgG e IgA (Appendice IX) viene eseguito mescolando sperma fresco, non trattato, con particelle di lattice o eritrociti rivestiti con IgG o IgA umane. A questa miscela viene aggiunto un antisiero anti-IgG umane monospecifico. La formazione di agglutinati misti tra le particelle e gli spermatozoi motili indica la presenza di anticorpi IgG o IgA sugli spermatozoi. Una infertilità immunologica è ipotizzabile se oltre il 50% degli spermatozoi motili presenta particelle adese (Barrat *et al.*, 1992), ma la diagnosi deve essere confermata dai test di interazione tra spermatozoi e muco cervicale (vedi Capitolo 5).

Fig. 2.10. Microfotografie (circa 2300x) di spermatozoi colorati con il colorante di Shorr. (Da C. Garrett & W.G. Baker; vedi Appendice VI.) (1) Anomalo, collo ispessito. (2) Normale. (3) Anomalo, collo ispessito. (4) Anomalo, amorfo con acrosoma piccolo e collo ispessito. (5) Anomalo, testa piccola e rotonda priva di acrosoma. (6) Anomalo, testa piriforme con residuo citoplasmatico. (7) Anomalo, testa piccola ed amorfa con acrosoma piccolo e coda avvolta. (8) Anomalo, testa piriforme priva di flagello. (9) Anomalo, amorfo. (10) Anomalo, testa piriforme.

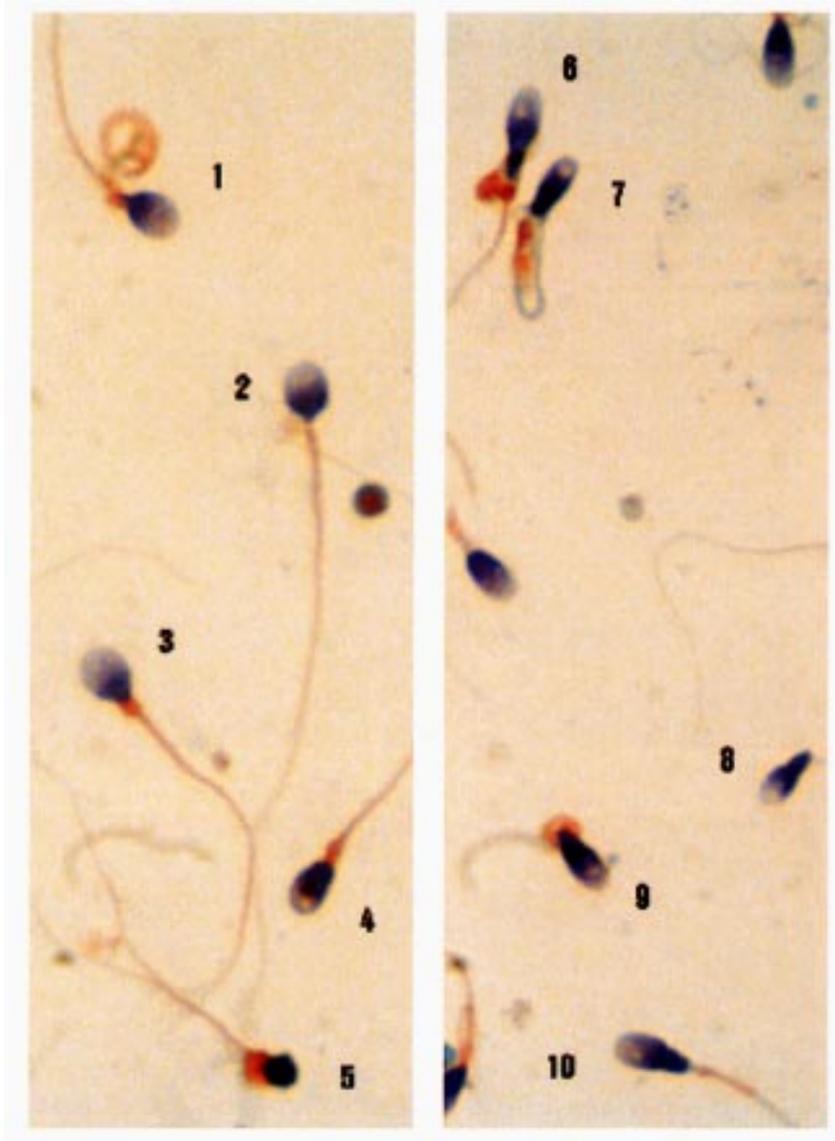
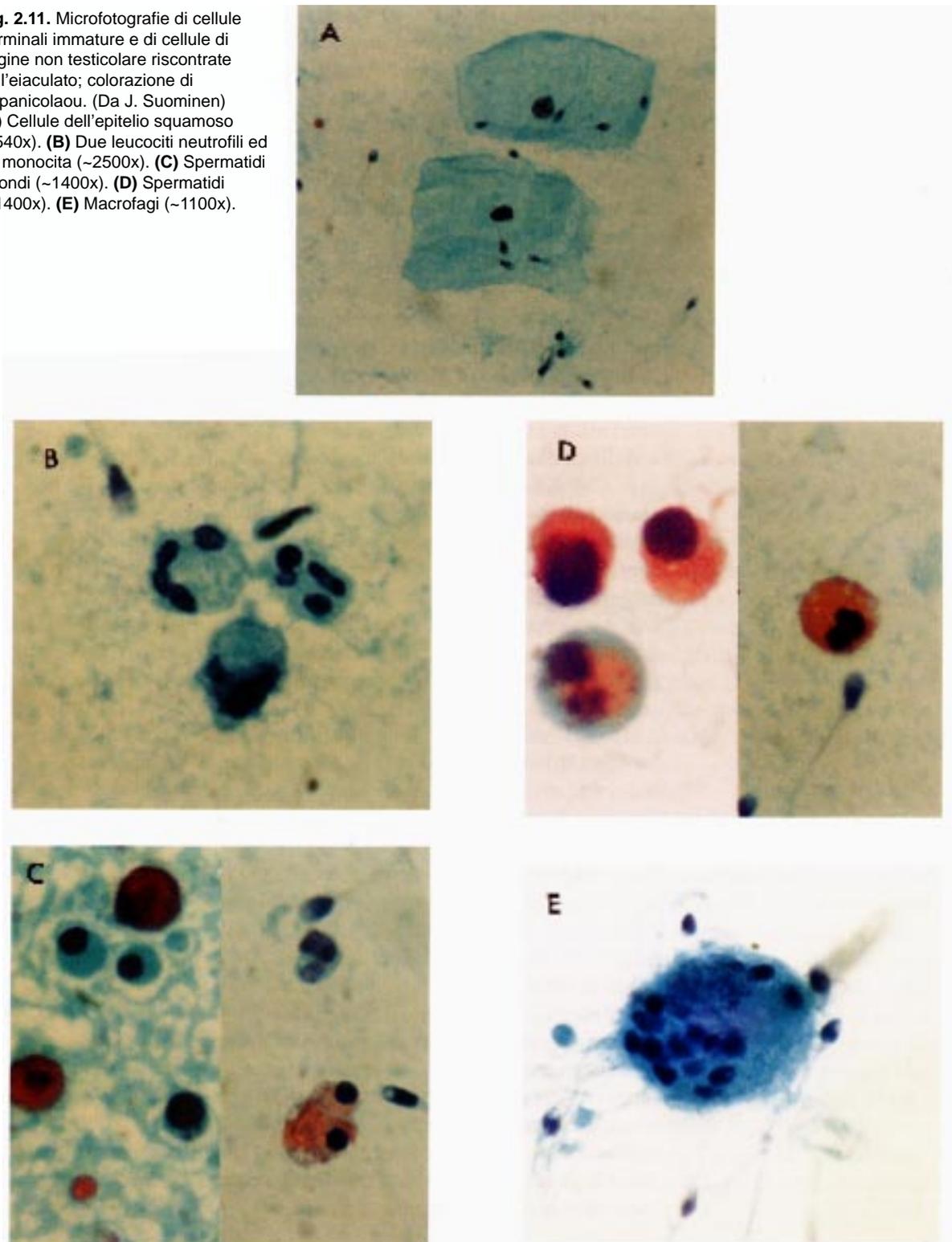


Fig. 2.11. Microfotografie di cellule germinali immature e di cellule di origine non testicolare riscontrate nell'eiaculato; colorazione di Papanicolaou. (Da J. Suominen)
(A) Cellule dell'epitelio squamoso (~540x). **(B)** Due leucociti neutrofili ed un monocita (~2500x). **(C)** Spermatidi rotondi (~1400x). **(D)** Spermatidi (~1400x). **(E)** Macrofagi (~1100x).



2 B TEST FACOLTATIVI

I test di questa sezione del manuale in genere non rientrano nell'analisi di routine del liquido seminale, ma possono comunque rivestire un valore clinico-diagnostico.

2.7 Calcolo degli indici di difetti multipli degli spermatozoi

Gli spermatozoi morfologicamente anormali hanno spesso difetti multipli. Nei precedenti protocolli, anche quando erano presenti anomalie multiple, ne veniva registrata soltanto una, con la priorità data ai difetti della testa rispetto a quelli del tratto intermedio, ed a quelli del tratto intermedio rispetto a quelli della coda. Attualmente si preferisce registrare il numero delle anomalie diviso il numero degli spermatozoi anomali, per determinare un valore detto indice di teratozoospermia (TZI) o indice di anomalie multiple (MAI) (Jouannet *et al.*, 1988; Mortimer *et al.*, 1990), ed il numero di anomalie diviso il numero totale degli spermatozoi, per ottenere l'indice di deformità spermatozoaria (SDI) (Aziz *et al.*, 1996). Questi indici sono prognostici della funzionalità degli spermatozoi, sia *in vivo* che *in vitro*.

Per questa determinazione può essere utilizzato un contatore di cellule da laboratorio, comunemente usato per le conte leucocitarie (Clay Adams Lab Counter, Fisher Scientific, Springfield, NJ, USA, numero di catalogo 02-670-13) con tasti multipli etichettati "normali", "anomalie della testa", "anomalie del tratto intermedio" e "anomalie della coda".

Uno spermatozoo con un'unica anomalia, ad esempio un'anomalia della testa, viene classificato premendo quel singolo tasto, e lo spermatozoo viene contato come una sola cellula. Uno spermatozoo con anomalie della testa, del tratto intermedio e della coda viene classificato premendo i relativi tre tasti contemporaneamente. Le anomalie (3) vengono inserite in ciascuna categoria, ma viene ugualmente contata un'unica cellula.

In alternativa, se non si dispone di un contacellule, si può eseguire la classificazione semplicemente con un foglio di carta. Viene presentato un esempio di come eseguire il calcolo degli indici di malformazioni multiple degli spermatozoi:

Numero di spermatozoi contati	200
Numero di spermatozoi normali	78
Percentuale di spermatozoi normali (78/200 x 100)	39%
Numero di spermatozoi con anomalie (200-78)	122 (61%)
Spermatozoi con anomalie della testa	110 (55%)
Spermatozoi con anomalie del tratto intermedio	18 (9%)
Spermatozoi con anomalie della coda	16 (8%)
Numero totale di anomalie (110+18+16)	144
Indice di teratozoospermia (totale delle anomalie/ numero di spermatozoi anomali) = 144/122	1,18
Indice di deformità spermatozoaria (totale delle anomalie/ numero di spermatozoi contati) = 144/200	0,72

Il valore dell'indice di teratozoospermia deve variare tra 1,00 (ogni spermatozoo anormale ha una sola anomalia) e 3,00 (ogni spermatozoo anormale ha anomalie della testa, del tratto intermedio e della coda). Studi precedenti mostrano che un TZI superiore a 1,6 è associato ad

un basso tasso di fecondazione in coppie infertili non trattate (Jouannet *et al.*, 1988) e che un SDI di 1,6 è il massimo compatibile con la fecondazione *in vitro* (Aziz *et al.*, 1996).

2.8 Test di swelling ipo-osmotico (HOS)

Questo semplice test si basa sulla semipermeabilità della membrana cellulare integra, che causa il rigonfiamento dello spermatozoo in condizioni ipo-osmotiche, quando cioè un ingresso di acqua dà luogo ad un'espansione del volume cellulare (Drevious & Eriksson, 1966). Introdotto nella clinica da Jeyendran *et al.*, (1984) il test di swelling può essere utilizzato come un test di vitalità addizionale. E' facile da interpretare e dà informazioni aggiuntive sulla integrità e sulla elasticità della membrana della coda dello spermatozoo. Il metodo è descritto nell'Appendice IV.

2.9 Spermiocoltura

La coltura del plasma seminale per indagare la presenza di organismi aerobi ed anaerobi contribuisce alla diagnosi di infezione delle ghiandole accessorie maschili (Purvis & Christiansen, 1993). Comunque, è necessario provvedere a particolari precauzioni per evitare la contaminazione durante la raccolta ed il trattamento del campione seminale da analizzare. Il paziente deve osservare un'astinenza sessuale di 5-7 giorni. Prima di raccogliere lo sperma, egli deve urinare, dopodiché deve lavarsi le mani ed il pene con sapone, e sciacquare via ogni traccia di sapone ed asciugarsi con un asciugamano pulito. Il contenitore per il liquido seminale deve essere sterile, ed il tempo intercorrente tra raccolta e l'inizio dell'analisi al laboratorio di microbiologia non deve superare le tre ore.

2.10 Indagini biochimiche sulla funzionalità delle ghiandole accessorie

Esistono diversi marcatori biochimici della funzionalità delle ghiandole accessorie, come 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; L-carnitina, glicerofosforilcolina e α -glucosidasi neutra per l'epididimo. Un'infezione talvolta può causare una diminuzione della secrezione di questi marcatori, ma nonostante ciò, la quantità totale di marcatori presenti nel liquido seminale può sempre essere nel range di normalità. Un'infezione può anche causare il danno irreversibile all'epitelio secretorio, nel qual caso anche dopo il trattamento la secrezione rimarrà ridotta (Cooper *et al.*, 1990; von der Krammer *et al.*, 1991). Il liquido seminale di uomini con ostruzione del dotto eiaculatore o agenesia dei vasi deferenti e delle vescichette seminali è caratterizzato da una riduzione di fruttosio, e da scarso volume, pH basso, assenza di coagulo ed assenza dell'odore caratteristico dello sperma.

2.10.1 Attività secretoria della prostata

Il contenuto di zinco, acido citrico (Gruber & Mollering, 1966) e fosfatasi acida (Heite & Wetteraurer, 1979) nel liquido seminale fornisce una valutazione attendibile della secrezione della prostata, che ben correla con questi marcatori. Un test spettrofotometrico per lo zinco è descritto nell'Appendice X.

2.10.2 *Attività secretoria delle vescichette seminali*

Il fruttosio seminale rispecchia la funzionalità secretoria delle vescichette seminali; nell'Appendice XI è riportato un metodo per la sua misurazione.

2.10.3 *Attività secretoria dell'epididimo*

L-Carnitina e α -glucosidasi sono marcatori epididimari utilizzati nella pratica clinica. Esistono due isoforme della α -glucosidasi nel plasma seminale: la maggiore, neutra, viene prodotta esclusivamente dall'epididimo, mentre la minore, acida, deriva principalmente dalla prostata. L' α -glucosidasi neutra è stata dimostrata essere più specifica e sensibile dell'L-carnitina e della glicerofosforilcolina per lo studio dei disordini epididimari. Il metodo per la sua determinazione è descritto nell'Appendice XII.

2.11 **Analisi computerizzata del liquido seminale**

L'utilizzo dei metodi computerizzati per l'analisi del liquido seminale (CASA) deve essere in grado di fornire due grandi vantaggi rispetto all'analisi manuale: (i) alta precisione e (ii) disponibilità di dati quantitativi sulla cinetica spermatozoaria. Per ottenere risultati attendibili e ripetibili, però, è necessario seguire procedure appropriate (Davis & Katz, 1992). E' noto che molti fattori sono in grado di ridurre l'efficienza degli strumenti CASA, come la preparazione del campione e la concentrazione degli spermatozoi (Davis & Katz, 1992; Mortimer, 1994a, b), per cui è opportuno consultare le linee guida per l'utilizzo di questi apparecchi (Mortimer *et al.*, 1995; European Society of Human Reproduction and Embriology, 1996) (vedi Appendice XIV).

Appurata la necessità di porre attenzione nella preparazione dei campioni e nell'uso dello strumento, il CASA può essere impiegato nella routine diagnostica del laboratorio per monitorare la concentrazione degli spermatozoi motili progressivi. Sono necessarie rigorose procedure di controllo di qualità per ottenere e mantenere un alto livello standard delle operazioni strumentali (vedi Appendice XIV). Anche rispettando i controlli di qualità e una cura procedurale rigorosa, fino ad oggi non è stato possibile determinare con il CASA la concentrazione degli spermatozoi, per la difficoltà di distinguere gli spermatozoi dai detriti (European Society of Human Reproduction and Embriology, 1996). Comunque, il perfezionamento tecnologico, ed in particolar modo l'abbinamento dell'impiego di filamenti di DNA fluorescente con il CASA può consentire oggi anche la determinazione della concentrazione spermatozoaria (Zinaman *et al.*, 1996).

Alcuni studi hanno suggerito che le valutazioni della concentrazione e delle caratteristiche di movimento degli spermatozoi motili progressivi, misurate con il CASA, sono correlate in modo significativo con i tassi di fecondazione *in vitro* e con il tempo per conseguire il concepimento (Barrat *et al.*, 1993; Tomlinson *et al.*, 1993; Irvine *et al.*, 1994; Krause, 1995).

2.12 **Test di penetrazione in oocita di hamster zona-free**

La fusione spermatozoo-oocita nel test di penetrazione in oocita di hamster è la stessa che avviene nell'uomo, poiché la fusione con la membrana vitellina dell'oocita inizia dalla membrana plasmatica che

riveste il segmento equatoriale dello spermatozoo umano in cui è avvenuta la reazione acrosomiale. Il test differisce dalla situazione fisiologica, invece, per l'assenza della zona pellucida. Un protocollo standardizzato per l'esecuzione di questo test viene presentato nell'Appendice XV.

Il test dell'ocita di hamster si basa sulla reazione acrosomiale, che avviene spontaneamente negli spermatozoi incubati *in vitro* per un periodo prolungato di tempo. Poiché questa procedura è meno efficiente di quanto non lo siano i processi biologici *in vivo*, e può coinvolgere anche meccanismi diversi, avviene spesso di ottenere risultati falsi negativi di pazienti i cui spermatozoi non riescono a superare il test dell'ocita di hamster ma riescono a fecondare gli oociti umani *in vitro* ed *in vivo* (World Health Organization, 1986).

I segnali intracellulari che danno il via alla reazione acrosomiale a seguito dell'interazione tra membrana acrosomiale e zona pellucida sono l'ingresso di ioni calcio e l'alcalinizzazione del citoplasma. Entrambi questi fenomeni possono essere realizzati artificialmente con lo ionoforo per cationi bivalenti A23187 (Aitken *et al.*, 1993; Appendice XV).

2 C TEST DI RICERCA

Numerosi test di ricerca sono stati presi in considerazione per l'inserimento in questa sezione. Di questi, sono stati scelti i seguenti per una possibile applicazione diagnostica in campo clinico.

2.13 Test di funzionalità spermatozoaria

2.13.1 Radicali ossigeno e infertilità maschile

L'eccessiva produzione di radicali ossigeno (ROS) e la presenza di alte concentrazioni di enzimi citoplasmatici quali la creatinafosfochinasi possono riflettere la presenza di spermatozoi anomali o immaturi, con abbondante quantità di citoplasma residuo a livello del tratto intermedio (Rao *et al.*, 1989; Gomez *et al.*, 1996).

I radicali ossigeno sono metaboliti dell'ossigeno che comprendono gli anioni superossido, il perossido di idrogeno, i radicali idrossilici, i radicali idroperossilici e l'ossido nitrico. Se presenti in eccesso, i ROS possono promuovere un danno patologico ossidando i lipidi cellulari, le proteine ed il DNA (Griveau & Le Lannou, 1997). La maggior parte delle cellule è fornita di sistemi antiossidanti enzimatici (superossido-dismutasi, glutatione-perossidasi e catalasi) e non enzimatici (acido urico, vitamina C e vitamina E). Quando queste difese non sono sufficienti, si ha un danno alla funzionalità cellulare.

Nell'eiaculato umano, i radicali ossigeno sono prodotti sia dagli spermatozoi (Aitken & Clarkson, 1987; Alvarez *et al.*, 1987; Iwasaki & Gagnon, 1992) che dai leucociti (Aitken & West, 1990). Il plasma seminale dispone di disattivatori e di enzimi, che però possono essere carenti in alcuni pazienti (Jones *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1996). Il lavaggio dal plasma seminale che viene operato durante la preparazione degli spermatozoi per la riproduzione assistita può rendere queste cellule vulnerabili all'attacco ossidante. Circa il 40% dei pazienti osservati presso i centri per la fertilità ed il 97% degli

uomini con traumi al midollo spinale mostrano livelli misurabili di attività di produzione di ROS nel liquido seminale (Iwasaki & Gagnon, 1992). Un'elevata produzione di ROS può causare un danno di perossidazione e la perdita della funzionalità spermatozoaria.

Per misurare la produzione di ROS possono essere impiegati metodi di chemiluminescenza che impiegano sonde come il luminol e la lucigenina (Appendice XVI).

2.13.2 *Test di legame alla zona pellucida umana*

Il processo di legame dello spermatozoo alla zona pellucida porta all'innescio della reazione acrosomiale, al rilascio delle sostanze litiche acrosomiali e alla penetrazione dello spermatozoo attraverso la matrice della zona. Per valutare questi eventi, possono essere impiegati oociti umani non vitali e quindi non fecondabili, derivati da autopsie, resezioni ovariche o da programmi di fecondazione *in vitro*. Questi oociti possono essere conservati in soluzione salina concentrata per diversi mesi (Yanagimach *et al.*, 1979). Un test di legame con la zona pellucida, detto emi-zona test (Burkman *et al.*, 1988; Oehninger *et al.*, 1989) prevede la microdissezione della zona pellucida in due parti uguali, e l'esposizione di una di queste parti agli spermatozoi del paziente e l'altra a quelli di un controllo, alla stessa concentrazione. Un altro tipo di test di legame spermatozoi-zona pellucida prevede invece la marcatura differenziale degli spermatozoi da testare con un particolare colorante fluorescente (es. fluoresceina) e quelli del controllo con un colorante diverso (es. rodamina; Liu *et al.*, 1988, 1989). Il numero di spermatozoi del campione e di quelli del controllo che si sono legati alla stessa zona pellucida intatta vengono contati e registrati in termini di rapporto. Entrambi questi test di legame hanno mostrato una correlazione con il tasso di fecondazione *in vitro*. Pur essendo possibile utilizzare oociti conservati (Kruger *et al.*, 1991), l'impiego di questi test è limitato dalla disponibilità di oociti umani.

Può essere utile dal punto di vista clinico valutare il numero di spermatozoi legati nei casi in cui si sia ottenuto un risultato negativo dalla fecondazione *in vitro* (Franken *et al.*, 1989; Liu & Baker, 1992). Pochi spermatozoi legati alla zona pellucida, o addirittura nessuno, di solito sono un indice di anomalia spermatozoaria.

2.13.3 *Valutazione della reazione acrosomiale*

La valutazione della funzionalità acrosomiale dopo induzione della reazione mediante ionoforo del calcio (Cummins *et al.*, 1991; Appendice XVII) individua disfunzioni della reazione acrosomiale (European Society of Human Reproduction and Embriology, 1996). Sono praticabili diverse tecniche di colorazione per evidenziare l'acrosoma degli spermatozoi umani, sia utilizzando la microscopia in campo chiaro che quella in fluorescenza (Cross *et al.*, 1986; De Jonge, 1994; Cross, 1995).

Sia la microscopia che la citometria a flusso (Fenichel *et al.*, 1989; Henley *et al.*, 1994) possono essere impiegate con lectine fluoresceinate come il *Pisum sativum* (agglutinina di pisello) ed anticorpi monoclonali per analizzare l'acrosoma (Cross, 1995). La presenza della membrana acrosomiale esterna, il contenuto dell'acrosoma e la

membrana acrosomiale interna possono essere studiate con diverse sonde, dalla scelta delle quali dipende il tempo che occorre per l'analisi degli spermatozoi che hanno subito la reazione acrosomiale (Aitken & Brindle, 1993). Contemporaneamente può essere valutata la vitalità degli spermatozoi, mediante un colorante fluorescente (H33258 bisbenzimidide, Hoechst) o attraverso il test di swelling ipo-osmotico (vedi Sezione 2.8).

La reazione acrosomiale fisiologica avviene a livello della zona pellucida, dopo il legame dello spermatozoo. Tuttora è difficile ipotizzare un valido test laboratoristico capace di valutare la reazione acrosomiale fisiologica negli spermatozoi che fecondano l'ovocita, sebbene possano essere impiegati gli ionofori del calcio ed il progesterone (Blackmore *et al.*, 1990; Aitken *et al.*, 1996) per valutare il potenziale degli spermatozoi capacitati nell'intraprendere la normale reazione acrosomiale (vedi Sezione 2.12). Rimane ancora da definire il significato clinico dello studio della reazione acrosomiale indotta.

2.14 Analisi seminale computerizzata: morfologia

Diversi studi hanno suggerito che la valutazione della morfologia spermatozoaria mediante metodi computerizzati può fornire indicazioni utili dal punto di vista clinico (Katz *et al.*, 1986; Davis & Gravance, 1993; Garrett & Baker, 1995; Garrett *et al.*, 1997; Irvine *et al.*, 1994; Kruger *et al.*, 1995, 1996). Alcuni produttori di CASA propongono programmi per l'analisi della morfologia degli spermatozoi, ma solo pochi di questi sono completamente automatizzati, e sussistono tuttora problemi di preparazione del campione per l'analisi e nella capacità di distinguere gli spermatozoi dai detriti. E' necessario, quindi, un ulteriore sviluppo prima che l'analisi seminale computerizzata possa essere consigliata per la valutazione della morfologia nella routine.

3

Tecniche di preparazione del liquido seminale

La separazione degli spermatozoi dal plasma seminale per ottenere un campione contenente un'alta percentuale di spermatozoi morfologicamente normali e motili, privo di detriti e spermatozoi morti, è importante per numerose procedure terapeutiche e diagnostiche nel campo dell'andrologia clinica. Possono essere utilizzate diverse procedure, ma i principali metodi di separazione sono due (vedi Appendice XVIII; Mortimer, 1994a, b).

In primo luogo, gli spermatozoi possono essere selezionati in base alla loro capacità di nuotare, attraverso la tecnica conosciuta con il nome di *swim-up*. Sarebbe preferibile evitare la centrifugazione degli spermatozoi (e quindi dei detriti cellulari e dei leucociti) prima dello *swim-up*, perché potrebbe danneggiare le membrane degli spermatozoi, probabilmente attraverso la produzione di radicali ossigeno liberi (vedi Sezione 2.13.1). Lo *swim-up* diretto dallo sperma è quindi il metodo preferibile per la separazione degli spermatozoi motili. Esso viene eseguito stratificando sopra al liquido seminale liquefatto un piccolo volume di terreno di coltura, in cui gli spermatozoi motili nuotando vanno a migrare (vedi Appendice XVIII.2).

Il secondo metodo per selezionare gli spermatozoi consiste nell'uso di gradienti di densità. Una semplice preparazione in due tappe è la variante più diffusa di questo metodo (vedi Appendice XVIII.3). In genere si considera che lo *swim-up* sia il metodo ottimale per i campioni seminali normali, mentre per quelli in qualche modo deficitari è più opportuno ricorrere a metodi alternativi.

Può essere necessario scegliere la metodica di preparazione del liquido seminale in funzione dello specifico campione (vedi Canale *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996). L'efficienza di ciascuna tecnica viene generalmente espressa come il numero assoluto, o relativo, degli spermatozoi recuperati, morfologicamente normali e motili. In alcuni casi, la capacità funzionale degli spermatozoi selezionati può essere valutata con un test, ad esempio il test di penetrazione in oociti zona-free di hamster (vedi Appendice XV), allo scopo di individuare il metodo di preparazione più adatto.

In passato, la ricerca clinica ha focalizzato i vantaggi e gli svantaggi dell'impiego del Percoll. Recentemente, però, l'uso del Percoll per la selezione degli spermatozoi è stato bandito nell'ambito della pratica clinica, e può essere impiegato solo in programmi di ricerca. Altri metodi sono oggi disponibili, come la preparazione di silice colloidale rivestito di silano e l'impiego di gradienti di densità (Gellert-Mortimer *et al.*, 1988; Sbracia *et al.*, 1996; vedi Appendice XVIII). Inoltre, anche le colonne di lana di vetro sono state indicate efficaci quanto i gradienti di Percoll per la separazione degli spermatozoi in campioni seminali deficitari (Rhemrev *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1996).

4

Controllo di qualità nel laboratorio di andrologia

4.1 Introduzione

Il controllo di qualità (QC) dell'analisi seminale è indispensabile per individuare e correggere gli errori sistematici ed una eccessiva variabilità. La verifica periodica attraverso il QC da parte di un supervisore è requisito per l'accreditamento del laboratorio e per mantenere l'accuratezza, la precisione e la competenza del laboratorio di andrologia. Le attività di QC eseguite entro un laboratorio sono riportate come un controllo di qualità interno (IQC), mentre la verifica esterna di qualità (EQA) è la valutazione dei risultati su uno stesso campione analizzato in laboratori diversi. La garanzia di qualità è un concetto più ampio, che comprende l'ottimizzazione dei servizi forniti.

La gestione di procedure di QC richiede la cognizione dell'origine e dell'ampiezza degli errori di misurazione. L'analisi del liquido seminale è soggetta ad errori random relativamente ampi associati al conteggio di un basso numero di spermatozoi. Le ampie discordanze tra le determinazioni di conta spermatica e morfologia in diversi laboratori (Neuwinger *et al.*, 1990; Matson, 1995) sottolineano l'importanza di migliorare i QC e la standardizzazione. Fino a quando non ci saranno metodi e definizioni standard, universalmente riconosciuti, di motilità e morfologia, non sarà possibile paragonare i risultati di diversi laboratori, ed i risultati di ogni laboratorio dovranno essere interpretati sulla base degli intervalli di riferimento di questo.

Diverse pubblicazioni propongono un QC per il laboratorio di andrologia (Mortimer *et al.*, 1986, 1989; Dunphy *et al.*, 1989; Knuth *et al.*, 1989; Cooper *et al.*, 1992; Mortimer, 1994a, b; Clements *et al.*, 1995). Gli aspetti statistici del QC possono essere reperiti in alcuni trattati e manuali di statistica (Barnett, 1979). In questo capitolo viene delineato un approccio pratico al QC per un laboratorio di andrologia.

4.2 Origine degli errori di misurazione

Ogni misurazione ha un grado di errore, la cui ampiezza è descritta come un intervallo di confidenza dotato di un limite superiore ed uno inferiore. Una misurazione è precisa quando questi limiti sono vicini tra loro, ed il risultato è accurato quando vi è un discostamento minimo dal valore reale. Esistono due classi di errori: random e sistematici.

Gli errori random, che causano mancanza di precisione, nascono da differenze nel campionamento o nella lettura; possono essere controllati ripetendo le misurazioni ad opera dello stesso operatore e con gli stessi strumenti. Gli errori sistematici (detti anche “bias”) sono più insidiosi, dal momento che nascono da fattori che alterano il risultato sempre in una stessa direzione e creano così differenze che non possono essere individuate ripetendo la misurazione. Le procedure di QC sono necessarie per individuare sia gli errori random che quelli sistematici nell’esame seminale di routine.

4.2.1 *Errori statistici di conteggio nell’analisi seminale*

La distribuzione casuale degli spermatozoi, anche quando il campione è stato ben miscelato, è responsabile della maggior parte della variabilità e della perdita di precisione nei risultati dell’analisi seminale. Le misurazioni della concentrazione di spermatozoi, della motilità e della morfologia prevedono tutte di contare un limitato numero di cellule presumendo che siano rappresentative dell’intero campione. La variazione di campionamento che nasce dalla scelta di un determinato volume per stimare la concentrazione, o di un determinato numero di spermatozoi per classificare la motilità e la morfologia è un errore random comunemente riportato ad un errore statistico di conteggio. L’ampiezza relativa dell’errore di conteggio è inversamente correlata con la radice quadrata del numero di spermatozoi analizzati. La cognizione degli errori di conteggio è essenziale per stabilire la precisione dell’analisi seminale e per perfezionare le procedure di QC nella ricerca di altre eventuali fonti di errore.

Errori di conteggio nella misurazione della concentrazione spermatozoaria

Per misurare la concentrazione degli spermatozoi, si contano con un emocitometro le cellule in un volume predefinito. Se gli spermatozoi sono casualmente distribuiti nella camera, il loro numero esatto in un dato volume segue la distribuzione di Poisson, la cui varianza è pari al numero contato. Così quando vengono contati N spermatozoi, la varianza è N , l’errore standard è \sqrt{N} , e l’errore percentuale è $100\sqrt{N}/N$. L’intervallo di confidenza al 95% per il numero di spermatozoi nel volume di sperma è, approssimativamente, $N \pm 1,96\sqrt{N}$. Per questo, se vengono contate 100 cellule, l’errore standard del conteggio sarà 10 (10%) e l’intervallo di confidenza al 95% per il numero di spermatozoi in quel volume di sperma è 80-120. Allo stesso modo, se vengono contati 200 spermatozoi, l’errore standard è 14 (7%) con un intervallo di confidenza al 95% di 172-228. Per raggiungere una precisione caratterizzata da un errore percentuale del 2,5% è necessario contare 1600 spermatozoi.

Errori di conteggio nella misurazione di motilità e morfologia degli spermatozoi

Quando gli spermatozoi vengono classificati in due o più classi (come “morfologia normale” o “anormale”, “motilità progressiva” o “non progressiva”) l’errore standard della percentuale (p) stimata entro una

classe dipende dalla percentuale reale, ma sconosciuta, così come dal numero di spermatozoi contati (N). L'errore standard stimato è pari a $\sqrt{p(100-p)/N}$. Così se vengono contati 100 spermatozoi e la reale percentuale di spermatozoi normale è 20%, l'errore standard della percentuale stimata degli spermatozoi normali è 4,0%. Il corrispondente intervallo di confidenza al 95% è 12,2%-27,8%. Se vengono contati 200 spermatozoi, l'errore standard diviene 2,8% con un intervallo di confidenza al 95% di 14,5%-25,5%. Se vengono contati 400 spermatozoi, l'errore standard è ulteriormente ridotto a 2,0% con un intervallo di confidenza al 95% di 16,1%-23,9%.

Minimizzazione dell'errore statistico di conteggio

Quando un errore di conteggio può essere ridotto aumentando il numero di spermatozoi analizzati, bisogna trovare un compromesso tra l'aumento di precisione statistica e la possibile perdita di accuratezza dovuta alla stanchezza dell'operatore.

4.2.2 Altri errori nell'analisi seminale

Analisi ripetute dallo stesso operatore e con la medesima attrezzatura possono mostrare una variabilità maggiore di quella dovuta solo all'errore di conteggio, per la frequente presenza di altri errori random. Questi possono nascere da una inadeguata miscelazione (specialmente in presenza di campioni viscosi ed agglutinati), stress dell'operatore (errori di conteggio o di registrazione dati), scarsa capacità tecnica (pipettaggio approssimativo o scarsa manualità nella preparazione del vetrino o della camera), variabilità strumentale (pipette automatiche mal funzionanti, che possono ridurre la riproducibilità durante il campionamento e le diluizioni). Al contrario, risultati meno variabili dell'errore di conteggio atteso possono suggerire errori di registrazione o un errore sistematico legato alla conoscenza dei risultati precedenti.

Misurazioni ripetute da diversi operatori possono discostarsi per differenze sistematiche o per marcati errori di calcolo, o differenze nella classificazione della motilità e della morfologia. Per esempio, la percentuale degli spermatozoi motili è generalmente sovrastimata poiché l'occhio è attratto dal movimento. Questo errore può essere eliminato contando prima tutti gli spermatozoi motili, e successivamente gli immobili nella stessa area.

4.2.3 Importanza del controllo di qualità

La precisione e la riproducibilità dell'esame seminale può essere monitorata attraverso i risultati di misurazioni ripetute dello stesso campione, un metodo che, assieme alla periodica calibrazione degli strumenti, è alla base dell'ITC. La precisione intra-operatore è determinata da valutazioni ripetute o analisi ripetute dello stesso campione "in cieco". La precisione inter-operatore nello stesso laboratorio viene determinata da analisi indipendenti dello stesso campione. La variabilità interlaboratorio viene valutata mediante EQA. IQC dovrebbe garantire che la precisione ottimale venga mantenuta nel laboratorio andrologico, e che non ci sia uno scivolamento graduale degli standard. IQC è indispensabile sia quando

un singolo operatore esegue poche analisi, sia quando numerosi operatori lavorano assieme. EQA è indispensabile per garantire che laboratori diversi producano risultati paragonabili ed è in grado di individuare l'opportunità che i metodi di un laboratorio vengano verificati.

4.3 Approccio pratico al controllo di qualità

Le procedure di QC descritte più avanti sono il requisito minimo che dovrebbe essere garantito da un laboratorio di andrologia. Le procedure di QC per altri aspetti del buon funzionamento del laboratorio, come il mantenimento della temperatura costante degli incubatori e la calibrazione delle bilance dovrebbero essere effettuate routinariamente.

Ogni volta: controllo e correlazione dei risultati intracampione.

Settimanalmente: analisi di misurazioni ripetute dei principali parametri seminali da parte dei diversi operatori.

Mensilmente: analisi delle medie risultanti dei test.

Quadrimestralmente: partecipazione ad un protocollo EQA, calibrazione delle pipette.

Annualmente: calibrazione delle camere di conteggio e degli altri strumenti (vedi Appendice XIX).

L'attività di QC in un laboratorio dipenderà dallo svolgimento del lavoro e dall'esperienza degli operatori. Nei laboratori ad alta attività, circa 1-5% delle determinazioni dovrebbe essere deputato all'IQC. E' importante che i campioni QC siano "in cieco" e che siano analizzati come facenti parte del lavoro routinario del laboratorio. In questo modo IQC potrà aiutare a mantenere l'accuratezza e la precisione dell'analisi seminale di routine.

4.3.1 *Controllo e correlazione routinaria dei risultati intracampione*

I risultati devono essere controllati per quanto riguarda errori di trascrizione e di identificazione del paziente. Risultati insoliti che non concordano con altri aspetti dell'analisi seminale possono suggerire la presenza di tali errori. Le valutazioni di conta spermatica, motilità e morfologia derivate dall'osservazione preliminare sul campione a fresco possono essere usate come un grossolano controllo del risultato finale. La percentuale di spermatozoi vivi deve accordarsi con quella dei motili. I risultati di allarme sono avvenimenti inusuali che richiedono un'immediata attenzione. Esempi di risultati di allarme per il laboratorio comprendono la mancanza, o l'inaspettata perdita, di motilità spermatica, che potrebbe essere causata da cambiamenti di temperatura o da contaminazione con agenti tossici. Per il clinico, i risultati di allarme comprendono il caso di un paziente che precedentemente aveva spermatozoi e che diviene azoospermico o incapace di raccogliere il liquido seminale.

Per la concentrazione spermatozoaria, vengono confrontati conteggi in doppio, indipendenti, in due parti della camera di conta (vedi Sezione 2.5.2, Fig. 2.6). La differenza attesa tra conteggi indipendenti su uguali volumi dello stesso campione dovrebbe essere zero, con un errore standard pari alla radice quadrata della somma dei due conteggi. Nel 95% circa di campioni in doppio, la differenza

tra i due conteggi dovrebbe essere inferiore di 1,96 volte l'errore standard. Se questo non avviene può essere sospettato un errore sistematico, ed il campione deve essere nuovamente miscelato e nuovamente diluito per poter ripetere la procedura. Nel 5% circa dei campioni, in cui differenze maggiori di 1,96 volte l'errore standard saranno dovute soltanto a variabilità casuale, il conteggio sarà stato ripetuto inutilmente. Comunque, questo piccolo sovraccarico di lavoro rappresenta un'assicurazione che non vi siano stati errori sistematici.

Procedure analoghe vengono seguite per valutazioni in doppio della percentuale di spermatozoi con i diversi gradi di motilità (Sezione 2.4.3, Fig. 2.3) e diverse caratteristiche morfologiche (Sezione 2.5.4). Due stime indipendenti, p_1 e p_2 , vengono eseguite e poi paragonate su N spermatozoi in ciascun campione. Il limite della differenza attesa d è dato da $d = |p_1 - p_2| < 1,96 \sqrt{2\bar{p}(100-\bar{p})/N}$ dove $\bar{p} = (p_1 + p_2)/2$ è la percentuale media. Usando questi limiti, il 5% delle letture in doppio verranno scartate solo per variabilità casuale.

4.3.2 *Controllo di qualità settimanale interno: valutazione della variabilità intra- e inter-operatore*

Un semplice metodo di IQC prevede misurazioni ripetute da eseguirsi su separate aliquote del campione e da condurre per tutti i passaggi dell'analisi. L'analizzare due volte lo stesso vetrino, o la stessa camera di conta, non significa ripetere l'analisi: così facendo non si valutano gli errori di preparazione e di diluizione. Il controllo in doppio dovrebbe essere eseguito nello stesso modo dei campioni di routine, con operatori all'oscuro del fatto che stanno analizzando campioni di IQC. IQC deve includere la valutazione di concentrazione spermatozoaria, gradi di motilità, morfologia, immunobead test, MAR test ed ogni altro dato refertato dal laboratorio. I campioni seminali crioconservati (vedi Appendice XIX) possono essere usati come IQC ed hanno il vantaggio che il valore atteso è conosciuto, o può essere determinato. Un approccio più semplice prevede l'uso di campioni freschi, o di un pool di campioni, che devono essere analizzati separatamente da operatori diversi, senza che questi sappiano che verrà valutata la variabilità delle loro letture; comunque, il valore reale non è conosciuto, e così l'errore sistematico del gruppo non può essere valutato. IQC della motilità spermatozoaria presenta problemi particolari, dal momento che la motilità può diminuire nel tempo, e necessita quindi di una analisi immediata e pressoché contemporanea per tutti gli operatori.

Le procedure statistiche per analizzare e registrare i risultati di IQC vengono illustrate più avanti. Alcune di queste dipendono da un valore atteso noto (o stimato attraverso le prime dieci determinazioni). Sono disponibili programmi statistici di QC per laboratorio, e possono essere usati per l'analisi e la presentazione dei risultati. Le procedure sono facilitate nel calcolo e nell'interpretazione se lo stesso numero di operatori partecipa in ciascuna delle determinazioni di QC. Se questo non è possibile, uno o più operatori possono analizzare il campione una seconda volta, in modo da ottenere il medesimo numero di misurazioni per ciascun campione di QC. Alcuni programmi computerizzati sono in grado di integrare i dati di un numero variabile di osservatori.

Tabella 4.1. Fattori per la determinazione dei limiti di controllo per le schede X_{bar} e S , basate sulla deviazione standard media (S_{bar})

Numero di operatori (n)	DS stimata (c_n)	Limiti di controllo della scheda X_{bar}		Limiti di controllo della scheda S			
		Attenzione (A_2)	Intervento (A_3)	Inferiore di intervento ($S_{0,999}$)	Inferiore di attenzione ($S_{0,975}$)	Superiore di attenzione ($S_{0,025}$)	Superiore di intervento ($S_{0,001}$)
2	1,253	1,772	2,659	0,002	0,039	2,809	4,124
3	1,128	1,303	1,954	0,036	0,180	2,167	2,966
4	1,085	1,085	1,628	0,098	0,291	1,916	2,527
5	1,064	0,952	1,427	0,160	0,370	1,776	2,286
6	1,051	0,858	1,287	0,215	0,428	1,684	2,129
7	1,042	0,788	1,182	0,263	0,473	1,618	2,017
8	1,036	0,733	1,099	0,303	0,509	1,567	1,932
9	1,032	0,688	1,032	0,338	0,539	1,527	1,864
10	1,028	0,650	0,975	0,368	0,563	1,495	1,809

IQC con campioni crioconservati: concentrazione spermatica

I risultati ottenuti da ciascun operatore sul campione QC vengono tabulati e ordinati su un grafico in funzione del numero del campione (o della settimana). La media e la deviazione standard dei risultati di ciascun campione sono calcolati ed ordinati in funzione del campione (o della settimana) su una scheda di controllo X_{bar} o S , che viene impiegata per determinare se i risultati ottenuti sul nuovo campione QC differiscono dalle precedenti determinazioni o se le differenze tra gli operatori sono maggiori di quelle che ci si potrebbe aspettare da un risultato legato alla sola variazione casuale.

Quando sono stati analizzati almeno cinque, ma preferibilmente dieci, campioni di QC, la media dei valori medi (X_{bar}) e delle deviazioni standard (S_{bar}) vengono usate per stabilire i limiti di controllo sulla scheda X_{bar} a 2 e 3 errori standard (limiti di controllo di attenzione e di intervento) da entrambi i lati del valore bersaglio.

Questi sono dati da $X_{bar} \pm A_{2,n} \times S_{bar}$ e $X_{bar} \pm A_{3,n}$, dove i valori dei coefficienti $A_{2,n}$ e $A_{3,n}$ sono riportati dalla Tab. 4.1 per il corrispondente numero di operatori (n). I limiti di controllo vengono usati per monitorare i risultati che saranno poi ottenuti dai QC. Come alternativa è possibile calcolare i limiti di controllo direttamente come $X_{bar} \pm 2s/\sqrt{n}$ e $X_{bar} \pm 3s/\sqrt{n}$ dalla deviazione standard combinata inter-operatore (s). Questa deviazione standard combinata è maggiore della media delle deviazioni standard dei campioni S_{bar} e può essere calcolata direttamente oppure ottenuta moltiplicando S_{bar} per il fattore c_n (Tab. 4.1). Questo fattore è la grandezza della quale la deviazione standard media sottostima la deviazione standard combinata in campioni di grandezza n da una distribuzione di tipo normale. Un esempio pratico è riportato nel Riquadro 4.1.

Riquadro 4.1: Determinazione dei limiti di controllo per la scheda X_{bar}

La tabella seguente mostra le concentrazioni di spermatozoi misurate da ciascuno di quattro operatori sui primi dieci campioni QC ed il calcolo della media e della deviazione standard di ciascun campione.

Concentrazione di spermatozoi (milioni/ml)

Campione	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Operatore A	38	35	40	34	38	36	44	43	39	43
Operatore B	42	36	42	40	40	40	43	43	46	40
Operatore C	38	43	40	51	38	33	39	45	35	39
Operatore D	34	36	36	37	36	39	42	43	46	34
Media	38,0	37,5	39,5	40,5	38,0	37,0	42,0	43,5	41,5	39,0
DS	3,27	3,70	2,52	7,42	1,63	3,16	2,16	1,00	5,45	3,74

Per i primi dieci campioni QC il valore medio delle medie (X_{bar}) è:

$$(38,0 + 37,5 + \dots + 39,0)/10 = 39,7.$$

Il valore medio delle deviazioni standard (S_{bar}) è:

$$(3,27+3,70+\dots+3,74)/10 = 3,40.$$

I valori dei coefficienti $A_{2,n}$ e $A_{3,n}$ nella Tab. 4.1 per campioni della dimensione $n = 4$ sono rispettivamente 1,085 e 1,628. Così, i limiti di controllo interno (attenzione: due errori standard dalla media) sono dati da:

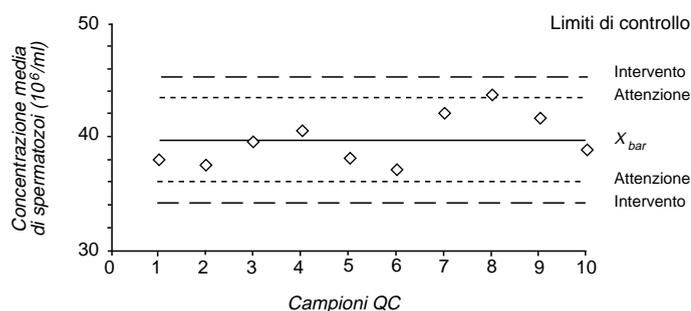
$$X_{bar} \pm A_{2,n} \times S_{bar} = 39,7 \pm 1,085 \times 3,40 = 36,0 \text{ e } 43,3 \text{ milioni/ml.}$$

Allo stesso modo, i limiti di controllo esterni (intervento) sono dati da:

$$X_{bar} \pm A_{3,n} \times S_{bar} = 39,7 \pm 1,628 \times 3,40 = 34,1 \text{ e } 45,2 \text{ milioni/ml.}$$

Questi limiti di controllo vengono inseriti nella scheda X_{bar} (Fig. 4.1) per monitorare in futuro i risultati dei campioni di QC.

Fig. 4.1. Scheda X_{bar}



La stima della deviazione standard inter-operatore può essere ottenuta moltiplicando S_{bar} per il fattore c_n ($=1,085$ per campioni di dimensione $n = 4$) per avere 3,69, che è assai vicino al valore calcolato di 3,84 della deviazione standard combinata, $s = \sqrt{[s_1^2 + s_2^2 + \dots + s_{10}^2]/10}$ dove s_1 è la deviazione standard del primo campione QC, e così via fino al decimo, nella tabella precedente. Questo risultato può essere utilizzato per calcolare i limiti di controllo di attenzione e di intervento direttamente a 2 e 3 errori standard (s/\sqrt{n}) da entrambe le parti della media. In questo esempio i limiti di attenzione sono 35,8 e 43,5 milioni/ml, e quelli di intervento sono 33,9 e 45,4 milioni/ml, molto vicini a quelli ottenuti con S_{bar} ed i coefficienti $A_{2,n}$ e $A_{3,n}$.

Tabella 4.2. Regole basilari di controllo per le schede QC

Regole di controllo	Tipo di errore
Un risultato oltre il limite di intervento	Random o sistematico
Due risultati consecutivi <i>entrambi</i> sopra il limite superiore di attenzione o <i>entrambi</i> sotto il limite inferiore di attenzione	Sistematico
Due risultati consecutivi, uno sopra il superiore ed uno sotto il limite inferiore di attenzione	Random
Otto risultati consecutivi <i>tutti</i> sopra o <i>tutti</i> sotto la media	Sistematico

Esistono regole basilari di controllo per monitorare una futura valutazione QC attraverso una scheda QC (Tab. 4.2). Se il campione di controllo è rifiutato, la sensibilità dell'allarme verso i diversi tipi di errore (casuale o sistematico) dovrebbe dirigere la ricerca verso le possibili cause. Un errore sistematico è sospettato anche quando si verifica una serie di sette determinazioni imprecise tutte per difetto o tutte per eccesso.

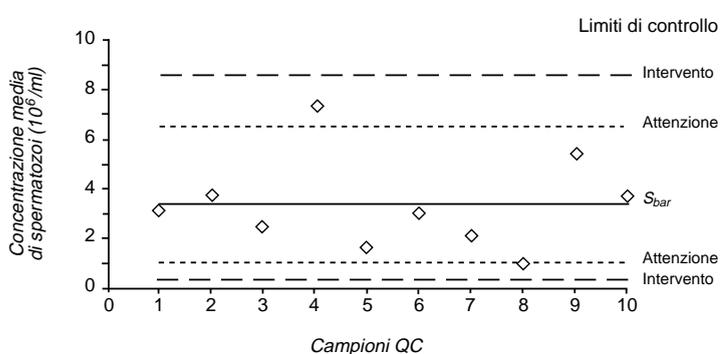
La scheda X_{bar} principalmente è stata messa a punto per individuare discostamenti dal valore bersaglio, o un complessivo aumento di variabilità. Essa è meno sensibile nello stabilire se gli operatori forniscono risultati altamente variabili che sotto- o sovrastimano sistematicamente. A questo scopo, il range di valori su ciascun campione QC può essere monitorato su una scheda R_{bar} come su una scheda X_{bar} , con limiti di attenzione ed intervento fissati di conseguenza. Una scheda simile, più sensibile è la scheda S_{bar} , basata sulle deviazioni standard del campione. Poiché la distribuzione della deviazione standard non è simmetrica, i limiti di attenzione e di intervento vengono scelti in modo che la probabilità che una nuova determinazione cada fuori dei limiti di controllo sia la stessa che per la scheda X_{bar} se non vi sono variazioni di accuratezza e precisione. Così i limiti di attenzione e di intervento verranno oltrepassati dal 5% e dallo 0,2% dei futuri campioni, esclusivamente per effetto di variabilità casuale. Questi limiti sono determinati dalla distribuzione χ^2 , ed i fattori $s_{a,n}$ richiesti per moltiplicare la deviazione standard media S_{bar} sono quelli riportati nella Tab. 4.1. Un esempio pratico è quello dato nel Riquadro 4.2. Regole simili a quelle della Tab. 4.2 per monitorare l'efficacia dei campioni di QC futuri possono essere applicati alla scheda S . Risultati che cadono sotto i limiti più bassi della scheda S suggeriscono una variazione inaspettatamente piccola, che può indicare un reale miglioramento del livello di uniformità raggiunto dagli operatori, o una loro possibile collusione.

I valori di media e deviazione standard possono essere ricalcolati dopo ogni dieci campioni, ed i limiti di controllo aggiornati ai nuovi valori di X_{bar} e S_{bar} a condizione che non vi siano stati problemi di QC. Prima di eseguire l'analisi del campione

Riquadro 4.2: Determinazione dei limiti di controllo nella scheda S

Usando i risultati dal Riquadro 4.1, la deviazione standard media S_{bar} del campione è 3,40 milioni/ml. I fattori $s_{a,n}$ per campioni della dimensione $n = 4$ sono riportati nella Tab. 4.1 per dare il limite inferiore di intervento $S_{bar} \times s_{0,999,4} = 3,40 \times 0,098 = 0,33$ milioni/ml, il limite inferiore di attenzione $S_{bar} \times s_{0,975,4} = 3,40 \times 0,291 = 0,99$ milioni/ml, il limite superiore di attenzione $S_{bar} \times s_{0,025,4} = 3,40 \times 1,916 = 6,52$ milioni/ml, e il limite superiore di intervento $S_{bar} \times s_{0,001,4} = 3,40 \times 2,527 = 8,60$ milioni/ml. Questi limiti vengono sistemati su una scheda S (Fig. 4.2) per monitorare in futuro i risultati dei campioni di QC.

Fig. 4.2. Scheda S



di QC, dovrebbe essere preparato un nuovo pool, ed i primi dieci campioni della nuova preparazione analizzati con i campioni rimanenti della precedente preparazione, per stabilire i nuovi limiti di controllo.

Valutazione di differenze sistematiche tra operatori

La concordanza dei risultati tra gli operatori di un laboratorio è un aspetto importante dell'IQC. Comunque, alcuni operatori possono sovra- o sottostimare sistematicamente la concentrazione degli spermatozoi. Questo dovrebbe essere verificato per ogni gruppo di 5-10 campioni di QC attraverso l'analisi della varianza a due vie, considerando i campioni QC e gli operatori (vedi più avanti). Dal momento che i campioni QC appartengono tutti allo stesso pool congelato, differenze significative tra operatori possono suggerire una sistematica imprecisione di valutazione da parte di uno o più operatori.

IQC con campioni conservati: motilità e morfologia degli spermatozoi

Le procedure di QC per la determinazione della motilità e della morfologia degli spermatozoi seguono le stesse tappe di quelle delineate per la concentrazione spermatica, ad eccezione del fatto che le percentuali devono essere valutate. Poiché il numero totale di spermatozoi è ampio, i limiti per le schede di controllo possono essere fissati usando una distribuzione normale. L'approssimazione è accettabile per percentuali che cadono nel range da 20% a 80%, ma è meno buona per percentuali più basse (<10%) e più alte (>90%).

Per la morfologia degli spermatozoi, molti vetrini possono essere preparati da un unico campione seminale. Questi vetrini possono essere allestiti da campioni di qualità buona, media o scadente, ed un vetrino da ciascuno di questi può essere introdotto nel QC. I vetrini non devono essere riconoscibili come QC: essi possono essere utilizzati nuovamente e ripreparati una volta che si siano deteriorati. Per il QC per la valutazione della motilità possono venire utilizzate videocassette.

I principi basilari di IQC descritti precedentemente possono essere seguiti anche in questo caso. Una volta che sia stata effettuata una serie di determinazioni di QC, possono essere costruite schede X_{bar} e S , e definiti limiti di attenzione e di intervento. La deviazione standard della percentuale stimata p è $\sqrt{p(100-p)/N}$, dove N è il numero di spermatozoi classificati. Per valori di p nel range tra 20% e 80% e un totale di 400 spermatozoi classificati, la deviazione standard cade nel range da 2,0% a 2,5%, con il valore massimo quando p è 50%. La deviazione standard di singole letture dovrebbe essere vicina a questi valori. Comunque, la deviazione standard media S_{bar} sarà superiore a 2,5% come risultato di una variazione addizionale tra gli operatori, e la riduzione di S_{bar} ai limiti teorici minimi deve rappresentare il massimo obiettivo. Solo operatori esperti che hanno raggiunto un alto grado di concordanza e standardizzazione possono raggiungere questi limiti. Se il risultato è vicino al limite teorico, allora i limiti di attenzione e di intervento sulle schede di controllo X_{bar} e S possono essere fissati usando la deviazione standard teorica piuttosto che la deviazione standard S_{bar} osservata.

Se il campione di QC ha percentuali inferiori al 20% o superiori all'80%, allora una modifica alla procedura precedentemente riportata può dare limiti di controllo più appropriati. La trasformazione angolare $z = \sin^{-1}\sqrt{p}/100$ ha la proprietà che la deviazione standard di z è data da $1/(2\sqrt{N})$ radianti e dipende solo dal numero di spermatozoi contati, N , e non dalla reale percentuale. Ciò significa che la probabilità di oltrepassare i limiti di attenzione e di intervento come risultato unicamente della variazione casuale è vicina al livello teorico. Per la motilità e morfologia spermatozoaria, basate sulla classificazione di 400 spermatozoi, la deviazione standard di z è 0,025 radianti, che corrispondono al limite teorico inferiore.

Come con il QC della concentrazione spermatozoaria, l'analisi della varianza a due vie rappresenta un passaggio importante per identificare qualsiasi rilevante sotto- o sovrastima da parte di qualche operatore, e per individuare modi attraverso i quali l'affidabilità possa essere aumentata.

IQC con campioni a fresco: concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi

Le procedure di QC basate sulla valutazione di campioni di sperma fresco sono simili a quelle descritte precedentemente per i campioni conservati, con l'eccezione che la scheda X_{bar} non può essere utilizzata, poiché non esiste un valore medio bersaglio.

Comunque, le procedure primarie di QC sono la scheda S per la valutazione della variabilità intra-operatore, che viene graficata dopo ogni campione QC, e l'analisi della varianza a due vie per valutare differenze sistematiche tra operatori dopo ogni cinque o dieci campioni di QC.

L'analisi della varianza a due vie è descritta in molti manuali di statistica (es. Altman, 1991) ed è disponibile in software per computer, insieme con test statistici per la significatività delle differenze tra operatori. L'esempio pratico (Riquadro 4.3) illustra come calcolare direttamente l'errore standard delle differenze tra operatori e valutare se queste risultano superiori a quelle che ci si potrebbe aspettare dalla sola variabilità casuale. Quando si eseguono calcoli direttamente dalle osservazioni, deve essere previsto un numero sufficiente di cifre decimali per evitare qualsiasi errore di approssimazione. Un test statistico formale per le differenze tra operatori è basato sul test- F dalla tabella dell'analisi della varianza a due vie, che può essere direttamente tratto dalla maggior parte dei programmi di statistica per computer. L'errore quadratico medio ($\hat{\sigma}$) è la radice quadrata del quadrato medio residuo tratto dalla tabella dell'analisi della varianza. Differenze medie maggiori di 2,5 errori standard sono improbabili come prodotto della sola variabilità casuale. Per stabilire se le differenze tra operatori sono significative o no è necessario rivedere le medie tra operatori o le differenze medie per determinare quelle che sono maggiori dell'attesa. Non tutti i programmi per computer forniscono l'errore standard delle differenze tra operatori, $se(m_j)$, che deve essere calcolato separatamente. Differenze sostanziali tra operatori dovrebbero indurre ad una revisione di tutte le procedure per scoprire il modo con cui migliorare la concordanza.

4.4 Monitoraggio delle medie mensili

Mentre le procedure primarie di IQC si basano sulla valutazione delle differenze tra ed intra-operatori, utili informazioni addizionali possono giungere dal monitoraggio delle tendenze dei risultati delle analisi seminali dei pazienti. I valori medi di ciascuna variabile per tutti i pazienti osservati in un certo periodo (es. un mese) possono essere riportati su una scheda X_{bar} con limiti di attenzione ed intervento a 2 e 3 deviazioni standard ad entrambi i lati della media.

L'errore standard viene stimato dalla deviazione standard delle osservazioni iniziali divisa per la radice quadrata del numero di analisi seminali in ciascun intervallo, o direttamente dalla distribuzione osservata della media (Riquadro 4.4). I limiti di controllo dovrebbero essere determinati dalle osservazioni di almeno 6 mesi, regolarmente aggiornate. Dovrebbero esserci almeno 20 risultati per ciascuna media, ed un piccolo laboratorio può dover accumulare risultati per oltre un mese. Deviazioni fuori dei limiti di controllo possono indicare variazioni non controllate nell'attività del laboratorio o una tendenza delle valutazioni a discostarsi dallo standard, dal momento che le caratteristiche dei pazienti non dovrebbero cambiare sensibilmente nel periodo dell'osservazione (vedi Knuth *et al.*, 1989).

Una rifinitura del metodo prevede il monitoraggio mensile delle medie per pazienti con valori normali e l'uso della scheda di somma cumulativa (CUSUM) (Barnett, 1979) per l'individuazione rapida di ogni discostamento sistematico dalla media.

Riquadro 4.3: Valutazione delle differenze sistematiche tra operatori

La tabella seguente mostra le concentrazioni stimate da ciascuno di tre operatori su cinque campioni di QC.

Concentrazione di spermatozoi (milioni/ml)

Campione	1	2	3	4	5
Operatore A	108	45	100	50	92
Operatore B	103	47	102	50	96
Operatore C	104	46	89	41	88
Media del campione	105,0	46,0	97,0	47,0	92,0

Le differenze dalla media del campione (d_{ij}) vengono calcolate sottraendo la media del campione seminale dalle singole osservazioni:

Differenze (d_{ij}) da ciascuna media campione (milioni/ml)

Campione	1	2	3	4	5
Operatore A	3,0	-1,0	3,0	3,0	0,0
Operatore B	-2,0	1,0	5,0	3,0	4,0
Operatore C	-1,0	0,0	-8,0	-6,0	-4,0

La media $m_j = \sum_i d_{ij}/n$, e la deviazione standard $s_j = \sqrt{\sum_i d_{ij}^2/(n-1)}$, di queste differenze vengono calcolate per ciascun operatore, dove n è il numero dei campioni seminali.

Media e deviazioni standard delle differenze (milioni/ml)

	Media (m_j)	DS (s_j)	Media/errore standard ($m_j/se(m_j)$)
Operatore A	1,600	1,949	1,301
Operatore B	2,200	2,775	1,788
Operatore C	-3,000	3,347	-3,089

La differenza media dell'operatore C è 3,8 milioni/ml sotto la media di ciascun campione di QC, o 5,7 ($= -3,8 - [1,6 + 2,2]/2$) milioni/ml meno della media degli altri due operatori. Per valutare se il grado di sottostima sia compatibile con la variabilità casuale, l'errore quadratico medio $\hat{\sigma} = \sqrt{\sum_i s_j^2/(t-1)}$, dove t è il numero degli operatori, viene calcolato dalle deviazioni standard delle differenze degli operatori. In questo esempio è 3,369 milioni/ml. L'errore standard della differenza media di ciascun operatore è data da $se(m_j) = \hat{\sigma} \sqrt{(1-1/t)/n}$ ed è 1,230 milioni/ml. Il valore assoluto della differenza media dell'operatore C (3,8 milioni/ml) è maggiore di 3 errori standard ed è significativamente differente dal valore atteso di zero se non vi sono differenze sistematiche tra operatori.

Riquadro 4.3: Valutazione delle differenze sistematiche tra operatori (continua)

Un test statistico formale sulle differenze tra operatori si basa sul test- F per l'analisi della varianza a due vie con gli operatori e i campioni di QC come fattori. La tabella di analisi della varianza, usando le precedenti concentrazioni di spermatozoi, è riportata più avanti.

Analisi della varianza a due vie

	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Media quadrata	Rapporto- F	Valore di P
Campioni QC	9 807,6	4	2541,90	216,03	<0,001
Operatori	109,2	2	54,60	4,81	0,042
Errore	90,8	8	11,35		
Totale	10 007,6	14			

L'errore quadratico medio è $\sqrt{11,35} = 3,369$ milioni/ml, uguale a quello ottenuto precedentemente. Come previsto, le differenze tra i campioni QC sono molto ampie ($P < 0,001$) poiché sono ottenute da diversi campioni di sperma fresco. Il test- F per le differenze tra operatori ($F = 4,81$ con 2 e 8 gradi di libertà, $P = 0,042$) è significativo allo 0,05 e suggerisce che queste differenze siano maggiori di quanto ci si potrebbe attendere dalla sola variabilità casuale.

4.5 Risposta ai risultati esterni ai limiti di controllo

I risultati del QC devono essere valutati regolarmente dal supervisore del laboratorio, ed il report deve essere firmato e datato. Qualora compaiano risultati esterni ai limiti di controllo, dovrebbe essere annotata la probabile causa e l'intervento risolutore adottato. Se il problema non è evidente, il campione di QC dovrebbe essere rianalizzato, per controllare che il primo risultato non sia inattendibile: se il risultato di QC ripetuto rimane nei limiti di controllo, è preferibile ripetere anche l'analisi dei campioni di routine esaminati in quel giorno, cercando di individuare la causa.

Fattori tecnici, come errori di pipettaggio o classificazione erronea della morfologia e della motilità degli spermatozoi, cambiamenti nelle procedure e nelle apparecchiature (in particolar modo pipette e camere di conteggio), deterioramento dei campioni di QC possono causare la fuoriuscita dai limiti di controllo. Per esempio, nel Riquadro 4.4, essa è la conseguenza di un cambio della procedura per misurare il volume seminale, ed una volta ripristinata la tecnica di preparazione iniziale, i risultati del QC sono tornati simili a quelli precedenti. Anche fattori associati ai pazienti possono influenzare le medie mensili. Questi comprendono variazioni nei contenitori di raccolta e nelle condizioni in cui questa avviene, variazioni stagionali della temperatura, cambiamenti nei criteri con cui i pazienti giungono al Centro, intendendo i diversi gradi di gravità dell'infertilità o il numero

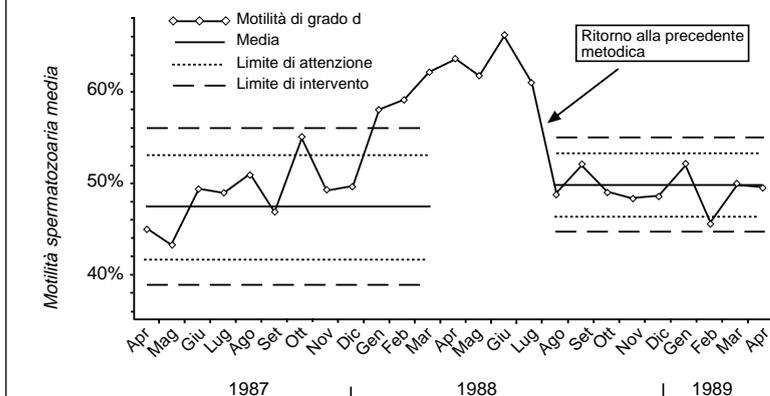
Riquadro 4.4: Monitoraggio delle medie mensili mediante scheda X_{bar}

La Fig. 4.3 mostra la percentuale media di spermatozoi immobili (motilità di grado d) in campioni seminali analizzati nel medesimo laboratorio tra l'aprile 1987 e l'aprile 1989. La media e la deviazione standard delle medie nei primi 6 mesi (aprile-settembre 1987) sono, rispettivamente, 47,3% e 2,87%. I limiti di attenzione ($47,3 \pm 2 \times 2,87$, o 41,6 e 53,0) ed i limiti di intervento ($47,3 \pm 3 \times 2,87$, o 38,7 e 55,9) vengono usati per monitorare le medie mensili successive usando le regole di controllo della Tab. 4.2.

L'aumento nella percentuale media di spermatozoi immobili dal gennaio 1988 (costantemente sopra ai limiti di azione) ha indotto a ricercare le possibili cause. Il cambiamento è stato successivamente attribuito alla modifica della metodica di routine per la misurazione del volume seminale. Una volta tornati all' tecnica precedente, i valori sono risultati simili a quelli iniziali. Vedi Knuth *et al.*, (1989) per ulteriori dettagli.

La media e la deviazione standard delle medie di 6 mesi da agosto 1988 erano, rispettivamente, 49,5% e 1,74%. Limiti di attenzione (46,0% e 53,0%) e di intervento (44,3% e 54,7%), revisionati, sono stati aggiunti nella scheda X_{bar} per monitorare le analisi successive.

Fig. 4.3. Valutazione media mensile della motilità spermatozoaria di grado d



di esami ripetuti sullo stesso paziente. Talvolta non può essere definita alcuna fonte di variabilità ed il risultato può essere ricondotto alla variabilità casuale se i successivi controlli rientrano nei limiti.

4.6 Controllo di qualità esterno

EQA è una parte integrante del processo di QC. Esistono numerosi schemi di EQA (vedi Appendice XIX). EQA è importante per valutare gli effetti della standardizzazione delle procedure, e permette ad un laboratorio di paragonare i propri risultati a quelli di altri. Permette anche la valutazione ed il confronto tra metodi diversi in un modo che non è possibile per un singolo laboratorio. Le differenze nell'interpretazione della motilità e della morfologia degli spermatozoi, probabilmente, sono attualmente la causa principale della scarsa efficienza dell'EQA per queste variabili seminali.

EQA e IQC sono procedure complementari. EQA può rivelare problemi di precisione che non vengono rilevati da IQC se i campioni di controllo non sono adeguatamente selezionati e mascherati. Anche i campioni di EQA dovrebbero essere “al buio” e trattati come i campioni della routine.

Gli schemi di EQA forniscono ai laboratori informazioni sui loro risultati confrontati con quelli degli altri partecipanti al programma. Questi possono includere il valore bersaglio derivato da misurazioni accurate, per esempio conte multiple della concentrazione spermatozoaria con un emocitometro o i risultati di analisi computerizzate della motilità spermatozoaria. Alternativamente, può essere utilizzato il risultato medio di un gruppo di laboratori di riferimento. La media e l'intervallo di variazione degli altri centri partecipanti sono spesso riportati dopo aver eliminato il 10% dei risultati estremi (in alto ed in basso). Normalmente viene fornita anche una presentazione grafica, come la scheda bar. Se lo stesso campione EQA è utilizzato in diverse occasioni, vengono rilevati il discostamento e la variabilità del laboratorio per quanto riguarda i risultati di questo campione.

I laboratori con risultati costantemente più alti o più bassi del valore medio stabilito nello schema EQA devono sottoporsi ad una verifica dei loro metodi. Per esempio, la concentrazione degli spermatozoi può essere calcolata in modo errato, o l'emocitometro può non essere delle dimensioni dovute. Risultati di EQA con una variabilità elevata sono, di solito, associati anche ad un'ampia variazione nell'IQC, ed indicano la presenza di una incongruenza nelle metodiche di analisi da campione a campione. Le procedure tecniche dovrebbero essere attentamente revisionate per aver la certezza che siano conformi a quelle illustrate in questo manuale. Anche lo scambio di personale tra i laboratori, spesso, è utile: un consulente proveniente da un laboratorio con buoni risultati di EQA sarà spesso in grado di valutare quali metodiche devono essere cambiate per migliorare la riproducibilità. Anche l'addestramento degli operatori in un laboratorio con buoni risultati di EQA potrebbe essere di grande utilità.

5

Interazione tra spermatozoi e muco cervicale

5.1 Introduzione

L'epitelio della cervice uterina umana comprende differenti tipi di cellule secretorie che, nelle sue diverse parti, variano per natura e quantità di granuli secretori. I secreti di queste cellule contribuiscono alla formazione del muco. Sono gli ormoni ovarici che controllano la secrezione di muco: il 17 β -estradiolo (estrogeno) stimola la produzione di una grossa quantità di muco acquoso, mentre il progesterone (progestinico) inibisce l'attività delle cellule secretorie. La quantità della secrezione di muco cervicale mostra variazioni cicliche: in donne normali in età riproduttiva, la produzione giornaliera di muco varia da 500 μ l a metà ciclo fino a meno di 100 μ l negli altri periodi. Inoltre, anche una piccola quantità di fluido proveniente dall'endometrio, dalle tube ed anche dal follicolo contribuisce a costituire il muco. Sono infine presenti leucociti e residui cellulari dell'epitelio uterino e cervicale.

Il muco cervicale è, quindi, una secrezione eterogenea, composta per oltre il 90% da acqua. Esso mostra particolari proprietà fisiche: consistenza, *spinnbarkeit* e *ferning* (cristallizzazione a foglia di felce).

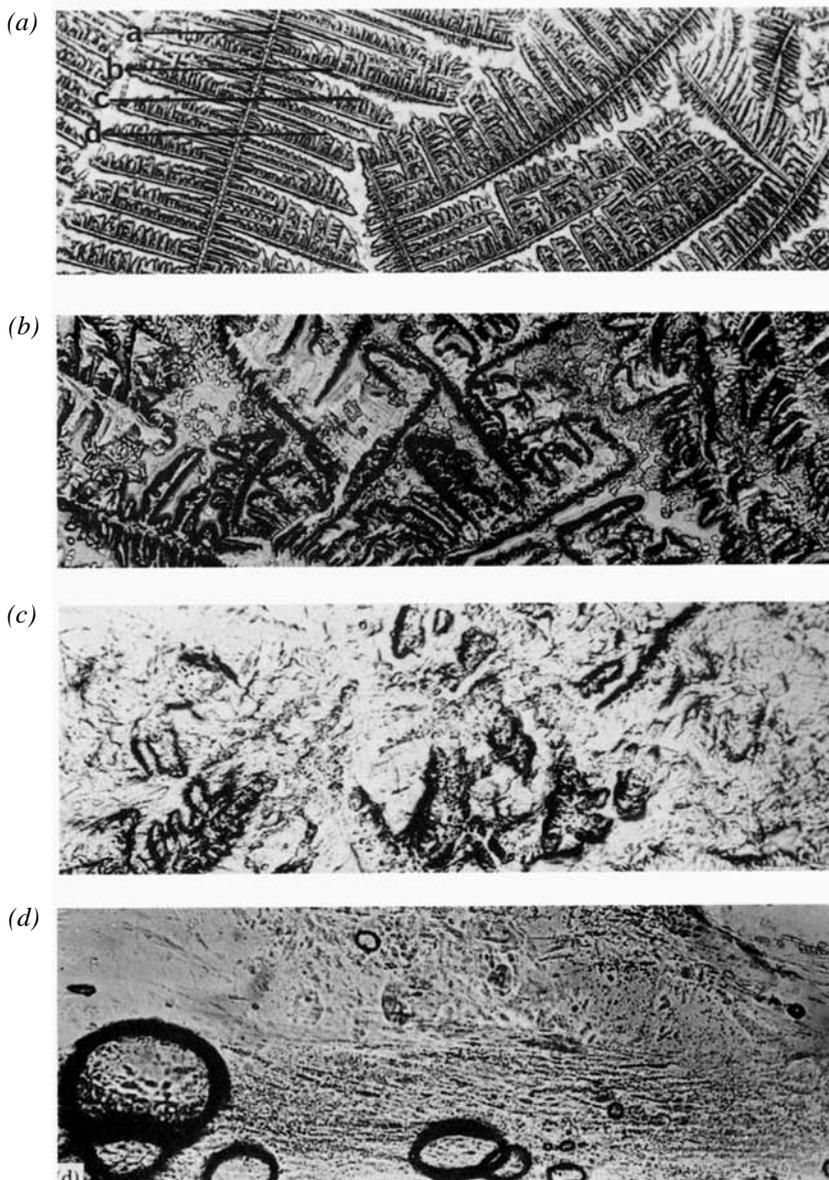
La *consistenza* è influenzata dalla aggregazione molecolare e dalla concentrazione di proteine e ioni. Il muco varia in consistenza durante il ciclo: è assai viscoso nella fase premenstruale (spesso ricco di cellule), mentre ha una consistenza acquosa a metà ciclo, subito prima dell'ovulazione. Appena avvenuta l'ovulazione, la viscosità del muco comincia nuovamente ad aumentare.

Lo *spinnbarkeit* (filanza) descrive le caratteristiche di fibrosità, filanza ed elasticità del muco cervicale.

Il *ferning* si riferisce al grado ed alle caratteristiche di cristallizzazione (appunto a foglia di felce) che si osservano quando il muco si essicca su una superficie di vetro (Fig. 5.1).

Il muco cervicale è un idrogel, formato da una componente ad alta viscosità e da una componente a bassa viscosità, che comprende elettroliti, composti organici e proteine solubili. La componente ad alta viscosità è costituita da una rete macromolecolare di mucina, che è la prima responsabile delle caratteristiche reologiche del muco. La mucina cervicale è un sistema fibrillare formato da subunità che sono costituite da un *core* peptidico e da catene laterali di

Fig. 5.1. Esempi di cristallizzazione con simmetria a felce del muco cervicale essiccato all'aria su vetrino portaoggetti (ingrandimento 100x). Il tipo di cristallizzazione è molto variabile, e dipende, per esempio, dallo spessore del preparato e dalla quantità di cellule presenti. Inoltre, una preparazione può presentare più di un tipo di cristallizzazione e, talvolta, sono evidenziati tutti i tipi possibili in un solo striscio. (a) Cristallizzazione di grado 3: a, ramo primario; b, ramo secondario; c, ramo terziario; d, ramo quaternario. (b) Prevalenza di rami primari e secondari (grado 2), con presenza di alcuni rami terziari. (c) Cristallizzazione a felce atipica (grado 1). (d) Nessuna cristallizzazione (grado 0). Le strutture rotondeggianti con parete ispessita sono bolle d'aria.



oligosaccaridi. Le alterazioni cicliche dei costituenti del muco cervicale umano possono influenzare la capacità penetrativa degli spermatozoi e la loro sopravvivenza: la penetrabilità agli spermatozoi inizia approssimativamente alla nona giornata di un ciclo normale di 28 giorni, ed aumenta gradualmente per raggiungere il massimo in corrispondenza dell'ovulazione. Successivamente, la penetrabilità inizia a diminuire, prima ancora che siano evidenti cambiamenti delle caratteristiche del muco. Esistono ampie variazioni individuali della durata e del grado di penetrabilità del muco agli spermatozoi. Gli spermatozoi possono venire guidati da filamenti di muco verso le cripte cervicali, dove sono trattenuti e successivamente rilasciati gradualmente in utero e nelle tube di Falloppio.

Le proprietà seguenti possono essere attribuite alla cervice ed alle sue secrezioni: (a) recettività alla penetrazione degli spermatozoi in corrispondenza dell'ovulazione e interferenza a tale ingresso negli

altri periodi del ciclo, (b) protezione degli spermatozoi nei confronti dell'ambiente ostile della vagina e contro i rischi di fagocitosi, (c) completamento delle richieste energetiche degli spermatozoi, (d) effetto filtro (per es. selezione degli spermatozoi in base alla motilità), (e) serbatoio a breve termine per gli spermatozoi, e (f) luogo di inizio della capacitazione degli spermatozoi.

Gli spermatozoi nel muco sono sospesi in un mezzo fluido. L'interazione con le secrezioni del tratto riproduttivo femminile è di importanza critica per la sopravvivenza e per la capacità funzionale degli spermatozoi. Al momento non esiste un metodo per valutare l'effetto del fluido uterino e tubarico, ma il muco cervicale può essere prelevato e studiato agevolmente. La valutazione dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale è perciò un importante criterio che deve essere incluso in ogni studio completo sull'infertilità. Il reperto di una alterata interazione tra sperma e muco cervicale può rappresentare un'indicazione per l'inseminazione o per qualche altra tecnica di riproduzione assistita.

5.2 Raccolta e conservazione del muco cervicale

5.2.1 Metodo di raccolta

La cervice viene esposta con uno speculum e l'orifizio esterno deve essere delicatamente pulito con un tampone di cotone per rimuovere eventuali contaminanti vaginali esterni. Il muco viene prelevato dall'endocervice aspirandolo con una siringa da tubercolina (senza ago), una siringa da muco, una pipetta o un capillare di polietilene. Se possibile, la qualità del muco dovrebbe essere valutata immediatamente dopo il prelievo, in caso contrario dovrà essere conservato con cura fino al momento dell'osservazione (Sezione 5.2.2).

Quando il muco viene raccolto per aspirazione, è importante standardizzare il metodo con cui si applica la pressione di aspirazione agli strumenti per la raccolta (siringhe, cateteri, ecc.). L'aspirazione deve iniziare dopo che la punta dello strumento sia stata introdotta di circa 1 cm nel canale cervicale, e va poi continuata fino a quando si estrae lo strumento. Solamente prima di estrarre lo strumento dalla bocca esterna della cervice bisogna interrompere l'azione di aspirazione. Durante questa estrazione è consigliabile serrare il catetere piegandolo, per evitare l'aspirazione di bolle o materiale vaginale.

Quando il muco cervicale deve essere raccolto in un momento diverso dalla metà del ciclo, la sua produzione può essere aumentata dalla somministrazione di 20-80 µg/giorno di etinil-estradiolo, iniziando dal quinto giorno del ciclo; il muco può essere raccolto entro 7-10 giorni dall'inizio della somministrazione. Questa procedura induce la produzione di un muco più idratato, e quindi meno viscoso (Eggert-Kruse *et al.*, 1989). Per quanto tale approccio possa essere utile per lo studio *in vitro* delle interazioni tra spermatozoi e muco cervicale, non rifletterà necessariamente la situazione della coppia quando non vengono somministrati ormoni.

5.2.2 *Conservazione*

Il muco può essere conservato nella stessa siringa per tuberculina, in capillari di polietilene o in piccole provette, chiuse con un tappo o con carta paraffinata per evitarne la disidratazione, e facendo attenzione a ridurre al minimo la quantità di aria nel contenitore per la conservazione. I campioni dovranno essere conservati in frigorifero a 4 °C per un periodo che non superi i 5 giorni. Il muco dovrà essere utilizzato preferibilmente entro 2 giorni dal prelievo, registrando il tempo intercorso tra la raccolta e l'utilizzo. Non devono essere effettuati test di penetrazione spermatozoaria o prove reologiche su campioni di muco che siano stati congelati e scongelati.

5.3 **Valutazione del muco cervicale**

La valutazione delle proprietà del muco cervicale comprende lo studio della filanza, della cristallizzazione, della consistenza e del pH. L'Appendice XX propone un modulo per la registrazione del post coital test dove queste caratteristiche del muco cervicale sono quantificate secondo il sistema definito da Moghissi (1976), basato sull'originaria proposta di Insler *et al.* (1972). Il punteggio massimo è 15, ma un punteggio superiore a 10 è generalmente indice di una buona qualità di muco, capace cioè di favorire la penetrazione degli spermatozoi; un punteggio inferiore a 10, invece, indica un muco di qualità scadente. Il punteggio deriva dal volume del muco cervicale raccolto (Sezione 5.3.1) e da quattro variabili che descrivono il suo aspetto e le sue caratteristiche (Sezioni 5.3.2-5.3.5). Il pH del muco non compare nel calcolo del punteggio totale del muco cervicale, ma dovrebbe essere misurato come un importante fattore nell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale (Eggert-Kruse *et al.*, 1993).

5.3.1 *Volume*

Il volume viene valutato come segue:

0 = 0 ml

1 = 0,1 ml

2 = 0,2 ml

3 = 0,3 ml o più.

5.3.2 *Consistenza*

La consistenza del muco cervicale è il più importante dei fattori che influenzano la penetrazione degli spermatozoi. Durante la fase ovulatoria, a metà ciclo, la resistenza alla progressione degli spermatozoi nel muco è minima, mentre un muco viscoso, come quello che si osserva nella fase luteinica, rappresenta una barriera impenetrabile. Detriti cellulari e leucociti, nel muco cervicale, possono impedire la migrazione degli spermatozoi, ed anche estese endocerviciti possono essere associate ad una ridotta fertilità.

Alla consistenza si attribuisce il seguente punteggio:

0 = muco premestruale, compatto, altamente viscoso

1 = muco di viscosità intermedia

2 = muco leggermente viscoso

3 = muco preovulatorio (metà ciclo), minimamente viscoso.

5.3.3 *Cristallizzazione*

La cristallizzazione (Fig. 5.1) viene valutata esaminando il muco asciugato all'aria sopra un vetrino portaoggetti. Una simile preparazione può evidenziare diversi pattern di cristallizzazione che possono avere un aspetto simile ad una felce. In funzione della composizione del muco, la "foglia di felce" può avere solo un ramo primario, o il ramo può essere ramificato una, due o tre volte, per formare, rispettivamente, rami secondari, terziari e quaternari. Devono essere analizzati diversi campi all'interno del preparato, ed il punteggio indica il più alto grado di cristallizzazione del campione, secondo le seguenti definizioni:

0 = mancanza di cristallizzazione

1 = cristallizzazione atipica

2 = cristallizzazione con ramificazioni primarie e secondarie

3 = cristallizzazione con ramificazioni terziarie e quaternarie.

5.3.4 *Filanza*

Il muco cervicale posto su un vetrino portaoggetti viene toccato con un coprioggetto o con un secondo vetrino, tenuto trasversalmente, che viene poi delicatamente sollevato. La lunghezza del filamento di muco cervicale che si forma tra i due vetrini viene misurata in centimetri, e classificata come segue:

0 = < 1 cm

1 = da 1 a 4 cm

2 = da 5 a 8 cm

3 = 9 cm o più.

5.3.5 *Cellularità*

Il conteggio di tutte le cellule dovrebbe essere espresso in cellule/mm³ (µl). Una stima del numero dei leucociti e di altre cellule nel muco cervicale, tradizionalmente, si basa sul numero contato in campo ad alto numero di ingrandimenti (HPF). Una combinazione di lenti che produce HPF è un oculare ad ampio campo (diametro di apertura 20 mm) da 10x ed un obiettivo da 40x. Dal momento che l'ampiezza del campo visivo del microscopio è uguale al diametro dell'apertura dell'oculare diviso per l'ingrandimento dell'obiettivo, questo sistema di lenti produce un campo microscopico con un diametro approssimativo di 500 µm. Lo spessore del preparato, allo stesso modo, può venire standardizzato appoggiando il coprioggetto sopra del grasso al silicone contenente sferette di vetro di 100 µm (Drobnis *et al.*, 1988). Se lo spessore del campo d'osservazione è di 100 µm, il suo volume dovrebbe essere 0,02 mm³. Di conseguenza, in queste condizioni, il conteggio di 10 cellule/HPF corrisponde ad approssimativamente a 500 cellule/mm³.

I valori per la classificazione delle cellule sono:

0 = > 20 cellule/HPF o > 1000 cellule/mm³

1 = 11-20 cellule/HPF o 501-1000 cellule/mm³

2 = 1-10 cellule/HPF 01-500 cellule/mm³

3 = 0 cellule.

5.3.6 pH

Il pH del muco del canale endocervicale dovrebbe essere misurato con una apposita cartina, range 6,4-8,0, *in situ* oppure subito dopo la raccolta. Se il pH viene misurato *in situ*, bisogna prestare attenzione ad agire correttamente, dal momento che il pH del muco esocervicale è sempre più basso di quello del muco del canale endocervicale. E' necessario inoltre prendere precauzioni per evitare la contaminazione con le secrezioni vaginali, che hanno un pH acido.

Gli spermatozoi sono sensibili alle variazioni di pH del muco cervicale: un muco acido immobilizza gli spermatozoi, mentre un muco alcalino può esaltarne la motilità. Una eccessiva basicità del muco cervicale (pH superiore a 8,5) può, tuttavia, avere un effetto negativo sulla vitalità degli spermatozoi. Il valore ottimale del pH per la migrazione e la sopravvivenza degli spermatozoi nel muco cervicale è compreso tra 7,0 e 8,5, il range di pH, cioè, del muco periovulatorio normale. Un valore di pH compreso tra 6,0 e 7,0, tuttavia, può ancora essere ritenuto compatibile con la penetrazione degli spermatozoi.

In alcuni casi il muco cervicale può essere sensibilmente più acido, sia per una alterata secrezione, sia per la presenza di un'infezione batterica.

5.4 Interazione tra spermatozoi e muco cervicale

Il muco cervicale permette la penetrazione degli spermatozoi per un limitato periodo del ciclo, sotto l'influenza degli estrogeni. La lunghezza del periodo in cui gli spermatozoi possono penetrare il muco cervicale varia considerevolmente da una donna all'altra, e può variare nello stesso individuo da un ciclo all'altro. Anomalie dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale non dovrebbero essere prese in considerazione se non dopo aver ripetuto il test in cicli diversi.

5.4.1 Test in vivo (*post coital*)

(i) *Scelta del momento in cui eseguire il test.* - Il post coital test dovrebbe essere eseguito prima dell'ovulazione ed il più vicino possibile al momento dell'ovulazione, determinato con criteri clinici, come la lunghezza abituale del ciclo, la temperatura basale, le modificazioni del muco cervicale, la citologia vaginale e, se possibile, il dosaggio degli estrogeni sierici o urinari e l'ecografia. E' importante che ogni laboratorio valuti il muco ad un tempo standard dal coito, compreso tra 9 e 24 ore.

(ii) *Suggerimenti ai pazienti in preparazione per il post coital test.* -

- (a) Astenersi dai rapporti sessuali per almeno due giorni prima del test.
- (b) Il giorno più adatto per il test è: (giorno)(mese)(anno). Il rapporto sessuale deve aver luogo la notte precedente il giorno stabilito, secondo le proprie abitudini.
- (c) Non usare alcun lubrificante durante il rapporto e non eseguire irrigazioni vaginali dopo di esso. La donna può fare la doccia dopo il rapporto, ma non un bagno completo
- (d) Riferire al medico, per il test, l'ora e la data.

(iii) *Tecnica del post coital test.* - Introdurre in vagina uno speculum non lubrificato ed aspirare un campione di fluido dal fornice vaginale posteriore, utilizzando una siringa da tuberculina (senza ago), una pipetta o un catetere di polietilene. Mediante un'altra siringa o catetere, aspirare poi un campione di muco dal canale endocervicale (Sezione 5.2.1), depositarlo su un vetrino portaoggetto, coprirlo con un coprioggetto ed esaminarlo con un microscopio a contrasto di fase a medio ingrandimento (Sezione 5.3.5).

(iv) *Campione vaginale.* - Normalmente gli spermatozoi in vagina muoiono entro due ore. Lo scopo dell'esame del campione vaginale è quello di assicurarsi che il liquido seminale sia stato realmente depositato in vagina.

(v) *Campione del canale cervicale.* - Il numero di spermatozoi presenti nella parte inferiore del canale cervicale varia con il tempo trascorso dal rapporto. Circa 2-3 ore dopo il coito si ha un notevole accumulo di spermatozoi nella parte inferiore del canale cervicale.

E' consigliabile esprimere la concentrazione di spermatozoi nel muco in modo standard (numero di spermatozoi/mm³), allo stesso modo di come si misura la cellularità del muco (Sezione 5.3.5).

La motilità degli spermatozoi nel muco cervicale viene classificata come segue: a = motilità rapida progressiva; b = lenta o non lineare progressiva; c = non progressiva; d = spermatozoi immobili (Sezione 2.4.3). L'indicatore più importante della funzione cervicale normale è la presenza di spermatozoi con motilità rapida progressiva.

(vi) *Interpretazione.* - Lo scopo del post coital test non è solo quello di determinare il numero di spermatozoi attivi nel muco cervicale, ma anche quello di valutare la loro sopravvivenza ed il comportamento molte ore dopo il coito (funzione di riserva). Per questo, un test eseguito 9-24 ore dopo il rapporto sessuale fornisce informazioni sulla longevità e sopravvivenza degli spermatozoi.

La presenza di spermatozoi con motilità rapida progressiva nell'endocervice, testimonia contro la presenza di fattori cervicali come possibile causa di infertilità (Oei *et al.*, 1995).

Il post coital test deve essere ripetuto se il primo risultato è negativo o anormale. Quando non si ritrovino spermatozoi nel canale cervicale o in vagina, è necessario chiedere conferma alla coppia che vi sia stata la deposizione di sperma in vagina. Un test negativo può anche essere dovuto ad una scelta sbagliata del giorno del rapporto. Un test eseguito troppo presto o troppo tardi rispetto all'ovulazione può essere negativo anche in una donna fertile, ed in alcune donne il test risulta positivo solo in uno o due giorni nel corso dell'intero ciclo. Quando non si riesce a monitorare l'ovulazione con un ragionevole grado di precisione, può essere necessario ripetere il post coital test diverse volte durante un ciclo oppure eseguire numerosi test *in vitro*. Sono necessari ripetuti post coital test anormali in cicli con un buon *timing* dell'ovulazione per individuare in un fattore cervicale la possibile causa dell'infertilità.

5.4.2 Test in vitro

Una precisa valutazione delle interazioni tra spermatozoi e muco cervicale può essere ottenuta mediante i test di penetrazione *in vitro*. Questi test in genere vengono eseguiti dopo un reperto di post coital test negativo, e sono più informativi se vengono effettuati incrociati con liquido seminale e muco di donatori.

Quando lo scopo del test di interazione tra spermatozoi e muco cervicale è quello di comparare diversi campioni di muco cervicale, dovrebbe essere utilizzato un solo eiaculato, dotato di conta spermatozoaria, motilità e morfologia normali. D'altra parte quando l'intento è quello di comparare diversi campioni seminali, ci si dovrebbe attenere all'uso di un unico campione di muco cervicale per testare la capacità di penetrazione degli spermatozoi. Quando si ottiene un risultato patologico impiegando lo sperma del marito ed il muco della moglie, è necessario eseguire test incrociati con muco di donatrice e spermatozoi di donatore, per stabilire se il fallimento del test è dovuto al muco cervicale o agli spermatozoi. Il muco cervicale di donatrice può essere prelevato da donne, in fase ovulatoria, che sono in lista per una inseminazione artificiale. Il muco deve essere prelevato prima dell'inseminazione, in cicli naturali o in cicli in cui l'ovulazione sia stata indotta mediante trattamento con gonadotropine. Donne a cui è stato somministrato clomifene citrato per indurre l'ovulazione non dovrebbero essere impiegate come donatrici di muco a causa dell'effetto di questo farmaco antiestrogeno sulla cervice.

I test *in vitro* dovrebbero essere eseguiti entro un'ora dalla raccolta del liquido seminale, e deve essere usato muco periovulatorio. Sostanze sostitutive, come il muco cervicale bovino o gel sintetici non possono essere ritenuti equivalenti al muco cervicale umano per valutare *in vitro* l'interazione tra spermatozoi e muco cervicale.

(i) *Test su vetrino semplificato*. - Una goccia di muco cervicale viene posta su un vetrino e coperta con un coprioggetto (22 mm x 22 mm). Lo spessore del preparato può essere standardizzato mediante grasso di silicone contenente microsferi di vetro del diametro di 100 µm (Sezione 5.3.5). Si depone una goccia di liquido seminale da entrambi i lati, a contatto con il margine del coprioggetto, in modo che il liquido seminale penetri sotto di esso per capillarità. Si ottiene così una evidente interfaccia tra sperma e muco.

Il vetrino così preparato deve essere incubato in termostato a 37 °C per 30 minuti, in ambiente umidificato.

Dopo pochi minuti, all'interfaccia si formano proiezioni digitiformi di liquido seminale, dette falangi, che penetrano dentro il muco. La maggior parte degli spermatozoi percorre questi canali prima di entrare nel muco: in molti casi un unico spermatozoo sembra guidare la colonna di spermatozoi attraverso il muco. Una volta all'interno del muco cervicale gli spermatozoi si disperdono ed iniziano a muoversi a caso. Alcuni tornano nel plasma seminale, mentre la maggior parte migra profondamente nel muco cervicale, fino ad incontrare resistenza nei detriti cellulari e nei leucociti.

(ii) *Interpretazione.* - L'interpretazione di questo test è soggettiva, perché è impossibile standardizzare le dimensioni e la forma dell'interfaccia tra liquido seminale e muco in un preparato eseguito su un comune vetrino. Di conseguenza è necessario che questo test venga impiegato esclusivamente per valutare in modo qualitativo le interazioni tra spermatozoi e muco.

Da questo test, comunque, si possono ottenere le seguenti utili informazioni:

- (a) Gli spermatozoi penetrano nel muco e oltre il 90% di questi sono mobili con capacità progressiva (risultato normale).
- (b) Gli spermatozoi penetrano nel muco ma non avanzano oltre 500 μm (circa la lunghezza di 10 spermatozoi) dall'interfaccia tra sperma e muco (risultato insufficiente).
- (c) Gli spermatozoi penetrano nel muco ma presto si immobilizzano o presentano un movimento sussultorio *in situ* (*shaking*) (risultato anomalo che suggerisce la presenza di anticorpi antispermatozoo).
- (d) Non avviene alcuna penetrazione di spermatozoi attraverso l'interfaccia tra sperma e muco. Le falangi possono formarsi o non formarsi, ma gli spermatozoi si aggregano lungo l'interfaccia dal lato del liquido seminale (risultato anomalo).

(iii) *Test in capillare.* - (vedi Appendice XXI).

Appendice IA

Valori di riferimento delle variabili del liquido seminale

Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire il proprio intervallo di riferimento per ogni variabile. Per ottenere i valori di normalità del liquido seminale, bisogna valutare gli eiaculati di uomini che hanno conseguito da poco tempo una gravidanza, preferibilmente entro 12 mesi dall'interruzione dei metodi anticoncezionali. La necessità di operare su un alto numero di casi (intorno a 1000), le complesse relazioni intercorrenti tra parametri dello spermioγραμμα e fecondazione, ed il tempo necessario per conseguire la gravidanza rendono difficoltosa la conduzione di uno studio simile. Per questo attualmente non esistono veri intervalli di riferimento, al contrario di quanto avviene per altre analisi di laboratorio. Inoltre, fino ad oggi, non sono stati individuati fattori razziali in grado di influenzare i parametri seminali.

E' necessario ancora una volta sottolineare che questo manuale non è diretto unicamente ai laboratori che operano nel settore della lotta all'infertilità, ma anche a quei laboratori che studiano possibili metodi per la regolazione della fertilità maschile o che operano nel campo della tossicologia riproduttiva maschile. In questo contesto i seguenti intervalli di riferimento vengono proposti sulla base dell'esperienza clinica di molti ricercatori che hanno studiato popolazioni di uomini sani e fertili. Dal momento che questi valori non rappresentano i requisiti minimi seminali per ottenere una gravidanza, come sarebbe, per esempio, se fossero stati indagati i tassi di fertilità *in vivo* ed *in vitro* in una popolazione di subfertili, la loro definizione è stata cambiata da "valori normali" a "valori di riferimento". Pertanto anche uomini con parametri seminali inferiori a quelli riportati in questo manuale possono essere fertili.

I seguenti valori di riferimento descrivono un campione seminale analizzato usando i metodi riportati in questo manuale.

Valori di riferimento

Volume	maggiore o uguale a 2,0 ml
pH	maggiore o uguale a 7,2
Concentrazione spermatozoi	maggiore o uguale a 20×10^6 spermatozoi/ml
Numero totale di spermatozoi	maggiore o uguale a 40×10^6 spermatozoi per eiaculato

Motilità	50% o più di spermatozoi mobili (gradi a + b), oppure 25% o più spermatozoi mobili progressivi (grado a) entro 60 minuti dall'eiaculazione
Morfologia	(*)
Vitalità	almeno 50% vivi (che escludono il colorante)
Leucociti	meno di $10^6/ml$
Immunobead test	meno del 50% di spermatozoi mobili con particelle adese
MAR test	meno del 50% di spermatozoi mobili con particelle adese

(*) Studi multicentrici che impiegano i metodi di valutazione della morfologia descritti in questo manuale sono tuttora in corso.

Dati provenienti dai programmi di fecondazione assistita rilevano che il tasso di fecondazione *in vitro* diminuisce quando la morfologia spermatozoaria scende sotto al 15% se valutata con i metodi ed i criteri interpretativi riportati in questo manuale.

Appendice IB

Terminologia di alcune variabili seminali

Dal momento che spesso è difficile descrivere con parole o numeri tutte le alterazioni dei parametri seminali, è stata introdotta una terminologia per indicarne i tipi principali (Eliasson *et al.*, 1970). È importante precisare che essa ha solo un valore descrittivo per le variabili seminali e non indica nessuna relazione causale. Fatta questa premessa, la terminologia dovrebbe essere così utilizzata:

Normozoospermia	Eiaculato normale, secondo i valori di riferimento
Oligozoospermia	Concentrazione spermatica inferiore ai valori di riferimento
Astenozoospermia	Motilità inferiore ai valori di riferimento
Teratozoospermia	Morfologia inferiore ai valori di riferimento
Oligoastenoteratozoospermia	Indica un'alterazione di tutte e tre le variabili (si può usare anche la combinazione di soli due prefissi)
Azoospermia	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato
Aspermia	Assenza di eiaculato

Bibliografia

Eliasson, R., Hellinga, F., Lubcke, F., Meyhofer, W., Niermann, H., Steeno, O. & Schirren, C. (1970) Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia*, **2**: 1257.

Appendice II

Linee guida per la sicurezza del laboratorio di andrologia^a

Norme comportamentali del personale del laboratorio

1. I fluidi umani, come lo sperma ed il sangue, devono essere considerati come potenzialmente infetti ed essere, pertanto, maneggiati con particolari attenzioni.
2. I campioni seminali possono essere contaminati con microrganismi infettivi o patogeni, i più importanti dei quali, in un laboratorio di andrologia, sono il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e quello dell'epatite B (HBV).
3. Tutto il personale del laboratorio deve essere vaccinato contro l'epatite B.
4. Occorre prendere severe precauzioni contro ferite fortuite ad opera di strumenti contaminati con sperma, ed evitare il contatto dello sperma con pelle, ferite, abrasioni o lesioni.
5. Gettare gli oggetti taglienti (aghi, lame, ecc.) in un apposito contenitore, che deve essere chiuso e sigillato prima del completo riempimento, ed eliminato come materiale infetto. Raccogliere ogni oggetto monouso (guanti, recipienti, ecc.) per lo smaltimento specifico.
6. Infezioni possono avvenire per la fuoriuscita di liquido seminale o sangue. E' indispensabile prendere precauzioni per prevenire ed ovviare alle possibili contaminazioni.
7. La manipolazione di un campione deve essere effettuata in modo da evitare la formazione di schizzi o aerosol. E' indispensabile indossare mascherine chirurgiche quando si effettuano passaggi che comportano rischio di formazione di schizzi o aerosol, in particolare, la vortizzazione e la centrifugazione di recipienti aperti.
8. Guanti monouso di gomma o plastica devono essere indossati quando si maneggia lo sperma o il plasma seminale, fresco o congelato, o qualsiasi contenitore che ne sia venuto a contatto. I guanti devono essere tolti e gettati quando si esce dal laboratorio, e quando si tocca il telefono o le maniglie delle porte. I guanti non devono essere riutilizzati.

^a Adattato da: Schrader, S.M. (1989) Safety guidelines for the andrology laboratory. *Fertility and Sterility*, **51**: 387-9.

9. Nel laboratorio di andrologia devono essere indossati indumenti da laboratorio, o un camice monouso. Togliere questi indumenti nel momento in cui si lascia il laboratorio, e non indossarli all'esterno, particolarmente nelle stanze di ristoro.
10. Sapone disinfettante o detergente antisettico per epidermide deve essere a portata di mano, ed il personale deve lavarsi le mani regolarmente, in particolare prima di uscire dal laboratorio, dopo aver maneggiato i campioni, e dopo essersi tolto camice e guanti.
11. Se l'esterno di un contenitore di sperma è contaminato, deve essere lavato con una soluzione disinfettante (es. ipoclorito di sodio 5,25 g/l o candeggina diluita 1:10).
12. Decontaminare le superfici di lavoro del laboratorio, che devono essere impermeabili, con un disinfettante (es. ipoclorito di sodio 5,25 g/l o candeggina diluita 1:10) immediatamente dopo ogni contaminazione, e giornalmente, alla fine delle analisi.
13. Gli accessori di laboratorio, quando possibile, devono essere monouso e gettati con attenzione.
14. In laboratorio, per la manipolazione dei liquidi, devono essere utilizzate pipette meccaniche. Mai eseguire il pipettaggio a bocca.
15. Deve essere prevista la possibilità di un risciacquo oculare.
16. Reagenti, prodotti chimici e coloranti tossici devono essere mantenuti sotto cappa aspirante.
17. Nel laboratorio deve essere proibito mangiare, bere, fumare, truccarsi, conservare cibo, ecc.

Per ulteriori dettagli, il lettore è rimandato alle due pubblicazioni del *WHO: Laboratory Biosafety Manual*, Geneva, World Health Organization, 1983; e *Guidelines on Sterilization and High-level Disinfection Methods Effective Against Human Immunodeficiency Virus*, 2nd ed., Geneva, World Health Organization, 1989 (AIDS Series, N°2) p.10.

Appendice III

Metodi di studio dei leucociti

Il metodo tradizionale per lo studio dei leucociti nel liquido seminale umano impiega una tecnica istochimica che riconosce l'enzima perossidasi, caratteristico dei granulociti polimorfonucleati (Fig. 2.4(a)). Essa ha il vantaggio di essere facile da eseguire, ma non individua i polimorfonucleati attivati che hanno rilasciato i granuli; inoltre non riconosce i leucociti che, come i linfociti, non contengono perossidasi. Questi ultimi possono essere individuati da metodi immunocitochimici.

III.1 Colorazione della perossidasi con orto-toluidina^a

III.1.1 Reagenti

1. Soluzione satura di NH₄Cl (250 g/l)
2. Na₂EDTA, 50 g/l in tampone fosfato (pH 6,0)
3. Orto-toluidina (0,25 mg/ml)^b
4. H₂O₂, 30% in acqua distillata

La soluzione di lavoro è composta da: 1 ml del reagente 1; 1 ml del reagente 2; 9 ml del reagente 3; ed una goccia del reagente 4.

Questa soluzione deve essere utilizzata entro 24 ore dalla preparazione.

III.1.2 Procedura

- (i) Mescolare 0,1 ml di sperma con 0,9 ml di soluzione di lavoro.
- (ii) Agitare per 2 minuti.
- (iii) Lasciare riposare per 20-30 minuti a temperatura ambiente.
- (iv) Agitare nuovamente.
- (v) Le cellule perossidasi-positivo si colorano di marrone, quelle perossidasi-negative rimangono incolori.
- (vi) Contare in doppio 200 leucociti in un emocitometro e valutare la percentuale di cellule perossidasi-positivo e negative.

^a Nahoum, C.R.D. & Cardozo, D. (1980) Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostate-vesicular fluid. *Fertility and Sterility*. **34**: 68-9.

^b L'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha stabilito che l'orto-toluidina venga usata con cautela, per scopi pratici, come potenziale carcinogeno per l'uomo. (*IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* (1982), vol. 27, suppl. 4, pp. 169-70).

III.2 Immunocitochimica

Tutti i tipi di leucociti umani esprimono un antigene specifico (CD45), individuato da uno specifico anticorpo monoclonale (vedi Fig. 2.4(b)). Cambiando l'anticorpo, questa procedura generica può essere adattata per riconoscere i diversi tipi di leucociti, come macrofagi, neutrofilii, cellule B o T.

III.2.1 Reagenti

1. Soluzione fosfato tamponata di Dulbecco (PBS).
Costituenti della soluzione PBS

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,132 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1 g
NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g

Portare ad un litro con acqua.

2. Soluzione salina Tris tamponata (TBS): preparare una soluzione stock 10x da diluire 1:10 immediatamente prima dell'uso.
Costituenti della soluzione 10x TBS

Trizma base	60,55 g
NaCl	85,2 g

Aggiungere acqua, portare a pH 8,6 con HCl 1 (mol/l)
Portare ad un litro con acqua

3. Il substrato della fosfatasi alcalina viene preparato come descritto, e filtrato

Naftolo fosfato AS-MX	2 mg
Dimetilformamide	0,2 ml
0,1 M tampone Tris, pH 8,2 ^a	9,7 ml
Levamisole 1 M	0,1 ml
Fast red TR, aggiunto subito prima dell'uso	10 mg

^a 1,21 g di Trizma base sciolto in acqua, pH aggiustato a 8,2 con HCl 1 M, portato a 100 ml con acqua.

4. Anticorpo primario. Anticorpo monoclonale di topo diretto verso un antigene leucocitario comune, codificato CD45, e facilmente reperibile sul mercato.
5. Anticorpo secondario. Immunoglobuline anti-topo di coniglio; la diluizione dipende dal titolo dell'anticorpo e dalla sua provenienza (es., diluizione 1:25 per l'anticorpo Z259 prodotto dalla DAKO Corp., 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013, USA).

6. Complesso fosfatasi alcalina:anti-fosfatasi alcalina (APAAP).
Anche in questo caso la diluizione dipende dal titolo dell'anticorpo e dalla sua provenienza (es., 1:50 per l'anticorpo D651 prodotto dalla DAKO Corp., 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013, USA).

III.2.2 Preparazione delle cellule

Procedura

- (i) Mescolare un'aliquota di liquido seminale liquefatto (circa 0,5 ml) con 5 volumi di PBS e centrifugare a 500 g per 5 minuti a temperatura ambiente.
Ripetere la procedura 2 volte, e risospendere il pellet cellulare in PBS al volume iniziale del campione seminale. La sospensione viene quindi diluita 2-5 volte con PBS, in funzione della concentrazione degli spermatozoi.
Lasciare asciugare all'aria su un vetrino portaoggetti pulito due gocce da 5 μ l di questa sospensione cellulare e fissare; il vetrino può essere colorato immediatamente, o può essere avvolto in un foglio di alluminio e conservato a -70 °C per una successiva analisi.
- (ii) Fissare il vetrino asciugato in una miscela di acetone, metanolo e formaldeide al 37% (con una proporzione volumetrica 95:95:10) per 90 secondi, sciacquare due volte con TBS (vedi III.2.1) e lasciare asciugare.
- (iii) Ciascuna aliquota di cellule fissate viene ricoperta con 10 μ l di anticorpo monoclonale primario ed incubato in camera umida per 30 minuti a temperatura ambiente. I vetrini vengono quindi sciacquati ancora due volte con TBS e lasciati asciugare.
- (iv) Coprire le cellule con 10 μ l di anticorpo secondario, incubare per 30 minuti in camera umida, lavare due volte con TBS ed asciugare.
- (v) Aggiungere a ciascun campione 10 μ l di complesso fosfatasi alcalina:anti-fosfatasi alcalina (APAAP), ed incubare per un'ora in camera umida a temperatura ambiente prima di sciacquare due volte con TBS ed asciugare.
- (vi) Per intensificare il prodotto della reazione, la colorazione con l'anticorpo secondario e l'APAAP può essere ripetuta, con una incubazione di 15 minuti per ciascun reagente.
- (vii) Lavare le cellule due volte con TBS, asciugare ed incubare con 10 μ l di substrato della fosfatasi alcalina per 18 minuti.
- (viii) Dopo lo sviluppo del colore di reazione della fosfatasi alcalina, sciacquare i vetrini con TBS e, alla fine, controcolorare per alcuni secondi con ematossilina, prima di sciacquare in acqua corrente e montare in un mezzo acquoso.

Appendice IV

Tecniche per la vitalità spermatozoaria

Questi test rappresentano un valido controllo interno della stima della motilità. La somma delle percentuali di spermatozoi morti e di quelli mobili non deve superare il 100%.

IV.1 Sola eosina

IV.1.1 Reagenti

Eosina Y: preparare una soluzione 5 g/l di Eosina Y (Colour Index, C.I. 45380) in una soluzione acquosa di cloruro di sodio di 9 g/l. Alternativamente, il colorante standard può essere ottenuto da molte altre ditte nei diversi Paesi.

IV.1.2 Procedura

- (i) Mescolare una goccia di sperma fresco con una goccia della soluzione di eosina su un vetrino portaoggetto, coprire con un coprioggetto ed osservare dopo 30 secondi al microscopio ottico a 400x.

I preparati devono essere subito analizzati: gli spermatozoi vivi appaiono incolore (bianchi); le cellule morte sono colorate di rosso. *Oppure*: mescolare sperma ed eosina su un vetrino e dopo 1 minuto strisciare e lasciare asciugare. Il preparato può essere esaminato successivamente, con olio di immersione (1000x), ad un microscopio a contrasto di fase negativo.

- (ii) Contare gli spermatozoi incolore (vivi) e quelli colorati (morti) come descritto nel testo (Sezione 2.5.1).

IV.2 Eosina-nigrosina (tecnica di Blom modificata)

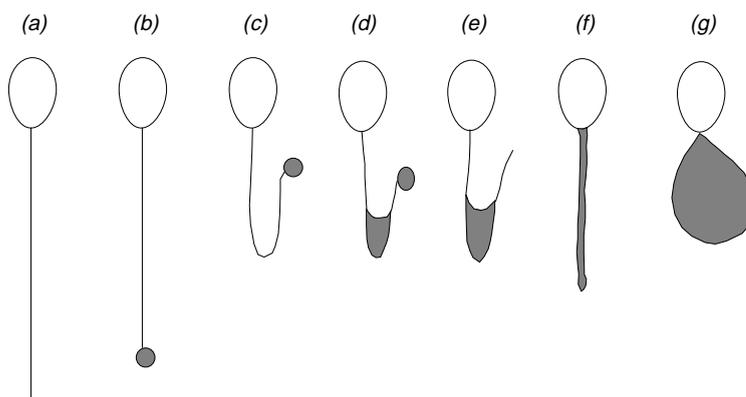
IV.2.1 Reagenti

- (i) Eosina Y (C.I. 45380), 10 g/l in acqua distillata (1%).
(ii) Nigrosina (C.I. 50420), 100 g/l in acqua distillata (10%).

IV.2.2 Procedura

- (i) Mescolare una goccia di sperma con due gocce di Eosina Y.
(ii) Dopo 30 secondi, aggiungere 3 gocce di soluzione di nigrosina e mescolare.

Fig. IV.1. Rappresentazione schematica delle modificazioni morfologiche degli spermatozoi umani sottoposti a stress ipo-osmotico: (a) = nessun cambiamento; (b-g) = diversi tipi di modificazioni della coda. Le regioni del flagello che subiscono rigonfiamento sono indicate dalle aree tratteggiate.



- (iii) Mettere una goccia della miscela sperma-eosina-nigrosina su un vetrino portaoggetto ed eseguire lo striscio entro 30 secondi dall'aggiunta della nigrosina. Lo striscio non deve essere troppo spesso. Lasciare asciugare all'aria ed osservare con olio da immersione (1000x) ad un microscopio ottico.

Gli spermatozoi vivi sono bianchi e quelli morti si colorano di rosso. La nigrosina dà una colorazione di fondo scura che rende più agevole l'analisi.

IV.3 Test di swelling (HOS)

IV.3.1 Soluzione ipo-osmotica

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

IV.3.2 Metodo

Riscaldare a 37°C , per 5 minuti, 1 ml di soluzione ipo-osmotica in una provetta Eppendorf chiusa. Aggiungere 0,1 ml di sperma liquefatto e mescolare delicatamente con una pipetta. Mantenere a 37°C per almeno 30 minuti (ma non oltre 120) ed osservare con un microscopio a contrasto di fase. Il rigonfiamento degli spermatozoi viene rilevato dalla presenza di modificazioni del profilo del flagello, come mostrato dalla Fig. IV.1. Contare in doppio gli spermatozoi rigonfi su un totale di 200 spermatozoi e calcolare la percentuale media.

IV.3.3 Interpretazione dei risultati

Il test di swelling (HOS) viene considerato normale quando almeno il 60% degli spermatozoi va incontro al rigonfiamento della coda. Se meno del 50% delle cellule mostra il rigonfiamento, l'eiaculato deve essere considerato anomalo.

Poiché alcuni liquidi seminali contengono spermatozoi con flagello avvolto prima dell'esposizione alla soluzione ipo-osmotica, è essenziale che l'eiaculato sia osservato prima del trattamento. La percentuale di spermatozoi con coda avvolta nel campione non trattato dovrebbe essere sottratta dalla percentuale ottenuta dopo trattamento, per ottenere quella degli spermatozoi che realmente hanno risposto al test.

IV.3.4 *Controllo di qualità*

Prima di essere utilizzate nella diagnostica, le nuove preparazioni di soluzione ipo-osmotica devono sempre essere testate con quelle precedenti, e la differenza di efficacia non deve essere significativa ($p > 0,05$ al t-test per dati appaiati). Se essa risulta significativa, invece, la nuova soluzione deve essere scartata e deve esserne preparata una ulteriore.

Bibliografia

- Eliasson, R. & Treschl, L. (1971) Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, **22**: 134-7.
- Eliasson, R. (1981) Analysis of semen. In *The Testis*, ed. H. Burger & D. de Kretser, pp. 381-99. New York: Raven Press.
- 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 other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, **70**: 219-28.

Appendice V

Colorazione di Papanicolaou modificata per gli spermatozoi

La colorazione di Papanicolaou differenzia chiaramente le componenti cellulari basofile da quelle acidofile e permette una descrizione dettagliata delle caratteristiche della cromatina nucleare. Sebbene questo metodo sia stato utilizzato per la citologia diagnostica di routine, il metodo standard di Papanicolaou per la citologia vaginale fornisce risultati abbastanza scadenti se applicato agli spermatozoi. La tecnica di colorazione modificata che qui viene presentata, invece, si è dimostrata utile nell'analisi della morfologia spermatozoaria e nello studio delle cellule germinali immature (vedi Fig. 2.9 e 2.11).

V.1 Preparazione del campione

Lo striscio (vedi Sezione 2.5.3) deve essere asciugato all'aria e fissato con una miscela di alcol etilico al 95% ed etere, in parti uguali, per 5-15 minuti.

V.2 Procedura di colorazione

Gli strisci fissati devono essere colorati secondo la seguente procedura:

etanolo 80% ^a	10 immersioni ^b
etanolo 70%	10 immersioni
etanolo 50%	10 immersioni
acqua distillata (deionizzata, demineralizzata)	10 immersioni
ematossilina di Harris o di Mayer	3 minuti esatti
acqua corrente	3-5 minuti
etanolo acido	2 immersioni
acqua corrente	3-5 minuti
soluzione di Scott ^c	4 minuti
acqua distillata	1 immersione
etanolo 50%	10 immersioni
etanolo 70%	10 immersioni
etanolo 80%	10 immersioni
etanolo 90%	10 immersioni
Orange G ^d	2 minuti
etanolo 95%	10 immersioni

etanolo 95%	10 immersioni
EA-50 ^d	5 minuti
etanolo 95%	5 immersioni
etanolo 95%	5 immersioni
etanolo 95%	5 immersioni
etanolo 99,5%	2 minuti
Xylene ^e o Rotisol ^f (3 vaschette di colorazione)	1 minuto ciascuna

^a Testare l'acidità dell'acqua prima di preparare i diversi bagni di alcol etilico. Il pH deve essere 7,0.

^b Ogni immersione si deve intendere della durata di 1 secondo circa.

^c La soluzione di Scott (vedi Sezione V.3.4) viene usata quando la normale acqua di rubinetto è "dura".

^d Coloranti e soluzioni: il colorante di Papanicolaou pronto (EA-50 e Orange G6) è reperibile sul mercato. Le stesse ditte, generalmente, possono fornire anche l'ematossilina.

^e Cambiare lo Xilene se diviene lattiginoso. Montare con DPX (BDH 36029) o altro medium (es. Eukitt, Riedel de Haen, D-30926, Germania). Lo Xilene è vietato in alcune nazioni perché tossico all'inhalazione.

^f Carl Roth GmbH & Co. Schoemperstrasse 1-5, D-75185, Karlsruhe, Germania.

V.3 Preparazione dei coloranti

I coloranti reperibili sul mercato sono generalmente soddisfacenti, ma essi possono anche essere preparati in laboratorio come segue:

V.3.1 *Costituenti dell'EA-36, equivalente all'EA-50*

Eosina Y (Colour Index, C.I. 45380)	10 g
Bruno Bismarck Y (C.I. 21000)	10 g
Light-Green SF, giallastro (C.I. 42095)	10 g
Acqua distillata	300 ml
Etanolo 95%	2000 ml
Acido fosfotungstenico	4 g
Soluzione satura di carbonato di litio (in acqua distillata)	0,5 ml

V.3.1.1 *Procedura*

Soluzione stock

- (i) Preparare separatamente le soluzioni al 10% di ciascuno dei coloranti nel modo seguente:
 - 10 g di Eosina Y in 100 ml di acqua distillata
 - 10 g di Bruno Bismarck Y in 100 ml di acqua distillata
 - 10 g di Light-Green SF in 100 ml di acqua distillata
- (ii) Preparare 2 litri di colorante, miscelando le precedenti soluzioni stock come segue:
 - 50 ml di Eosina Y
 - 10 ml di Bruno Bismarck Y
 - 12,5 ml di Light-Green SF
- (iii) Portare a 2 litri con etanolo al 95%; aggiungere 4 g di acido fosfotungstenico e 0,5 ml di soluzione satura di carbonato di litio.
- (iv) Mescolare bene e conservare la soluzione a temperatura ambiente in una bottiglia scura ben chiusa. Questa soluzione rimane stabile per 2-3 mesi. Filtrare prima dell'uso.

V.3.2 *Costituenti dell'Orange G6*

Orange G in cristalli (C.I. 16230)	10 g
Acqua distillata	100 ml
Etanolo 95%	1000 ml
Acido fosfotungstenico	0,15 g

V.3.2.1. *Procedura*

Soluzione stock n°1 (soluzione Orange G6, 10%)

Preparare una soluzione acquosa al 10% sciogliendo 10 g di cristalli di Orange G in 100 ml di acqua distillata. Agitare bene e lasciare riposare in una bottiglia scura a temperatura ambiente per una settimana prima dell'uso.

Soluzione stock n°2 (soluzione Orange G6, 0,5%)

- (i) Prendere 50 ml di soluzione stock n°1.
- (ii) Portarla a 1000 ml con etanolo al 95%.
- (iii) Aggiungere 0,15 g di acido fosfotungstenico.
- (iv) Mescolare bene e conservare a temperatura ambiente in una bottiglia scura ben chiusa. Filtrare prima dell'uso. La soluzione rimane stabile per 2-3 mesi.

V.3.3 *Costituenti dell'ematosilina di Harris senza acido acetico*

Ematosilina (cristalli scuri; C.I. 75290)	8 g
Etanolo 95%	80 ml
$\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	160 g
Acqua distillata	1600 ml
HgO	6 g

V.3.4 *Procedura di preparazione della miscela di colorazione*

- (i) Sciogliere al calore 160 g di solfato di ammonio-alluminio in 1600 ml di acqua distillata.
- (ii) Sciogliere 8 g di cristalli di ematosilina in 80 ml di etanolo al 95%.
- (iii) Aggiungere la soluzione di ematosilina a quella di solfato di ammonio-alluminio.
- (iv) Portare la miscela alla temperatura di 95 °C.
- (v) Togliere la miscela dal calore ed aggiungere delicatamente l'ossido di mercurio, mescolando mediante agitatore magnetico. La soluzione deve diventare di colore rosso scuro.
- (vi) Immergere immediatamente il contenitore in un recipiente contenente acqua fredda e filtrare la soluzione una volta raffreddata.
- (vii) Conservare in una bottiglia scura a temperatura ambiente e lasciare riposare per 48 ore.
- (viii) Diluire la quantità necessaria con una parte uguale di acqua distillata e filtrare nuovamente.

V.3.5. *Costituenti della soluzione di Scott*

NaHCO ₃	3,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20,0 g
Acqua distillata	1000 ml

La soluzione di Scott deve essere usata solo quando l'acqua è contraddistinta da una elevata durezza e dovrebbe essere cambiata spesso (dopo aver sciacquato 20-25 vetrini).

V.3.6. *Costituenti della soluzione di etanolo acido*

Etanolo 99,5%	300 ml
HCl concentrato	2,0 ml
Acqua distillata	100 ml

Appendice VI

Metodo di colorazione di Shorr per la morfologia spermatozoaria

Vedi Fig. 2.10

VI.1 Preparazione dello striscio

Lo striscio (vedi Sezione 2.5.3) deve essere asciugato all'aria e quindi fissato in etanolo al 75% per circa 1 minuto.

VI.2 Procedura di colorazione

I vetrini devono essere colorati seguendo la seguente procedura:

acqua corrente	12-15 immersioni ^a
ematossilina	1-2 minuti
acqua corrente	12-15 immersioni
alcol ammonico	5 passaggi di 5 secondi ciascuno
acqua corrente	12-15 immersioni
etanolo 50%	5 minuti
colorante di Shorr	3-5 minuti
etanolo 50%	5 minuti
etanolo 75%	5 minuti
etanolo 95%	5 minuti
etanolo assoluto	2 passaggi di 5 minuti ciascuno
xylene	2 passaggi di 5 minuti ciascuno

^aOgni immersione si deve intendere della durata di 1 secondo circa.

VI.3 Reagenti

1. Ematossilina Papanicolaou n°1 (Merck, cat. n° 9253)
2. Alcol ammonico
95 ml di etanolo 75% + 5 ml di idrossido di ammonio al 25%
3. (i) Soluzione di Shorr (Merck, cat. n° 9275)
oppure
(ii) 4 g di polvere di Shorr (BDH 34147-26) sciolti in 220 ml di etanolo al 59% caldo e lasciato raffreddare, con aggiunta di 2,0 ml di acido acetico glaciale (sotto cappa aspirante) e successiva filtrazione.

Appendice VII

Metodo di colorazione rapida per la morfologia spermatozoaria

E' disponibile un kit di colorazione differenziale, denominato Diff-Quik (Cat. n° B4132-1, Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, Illinois 60085-6787, USA).

VII.1 Reagenti

- (i) Fissativo: tri-arilmetano 1,8 mg/l in alcol metilico.
- (ii) Soluzione 1: xantene 1 g/l in tampone conservante di sodio azide.
- (iii) Soluzione 2: miscela di tiazina 1,25 g/l (0,625 g/l di Azure A e 0,625 g/l di Blu di metilene) in tampone.

VII.2 Procedura

- (i) Fissare i vetrini per 15 secondi in fissativo.
- (ii) Eliminare l'eccesso di fissativo posizionando verticalmente i vetrini su carta assorbente.
- (iii) Colorare i vetrini nella soluzione 1 per 10 secondi, e quindi nella soluzione 2 per 5 secondi. Eliminare l'eccesso di soluzione tra i due passaggi.
- (iv) Immergere i vetrini in acqua corrente 10-15 volte per rimuovere l'eccesso di colorante.
- (v) Porre i vetrini verticalmente e lasciarli all'aria fino a completa asciugatura.
- (vi) Montare i vetrini.
- (vii) Se ci sono problemi di background, lavare un'aliquota di sperma, preparare nuovi vetrini e ripetere la colorazione (vedi Sezione 2.5.3).

Bibliografia

Kruger, T.F., Ackerman, S.B., Simmons, K.F., Swanson, R.J., Brugo, S.S. & Acosta, A.A. (1987) A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of Andrology*, **18**: 275-7.
Enginsu, M.E., Dumoulin, J.C.M., Pieters, M.H.E.C., Bras, M., Evers, J.L.H. & Geraedts, J.P.M. (1991) Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization *in vitro*. *Human Reproduction*, **16**: 854-8.

Appendice VIII

Immunobead test

VIII.1 Reagenti

1. Immunobeads: particelle anti IgG, IgA e IgM possono essere richieste alla Irvine Scientific, Santa Ana, California 92705, USA, o alla Laboserv GmbH, Am Boden 25-26, 35460 Staunfenberg, Germania. A scopo di screening possono essere usate particelle combinate anti-Ig capaci di riconoscere tutti gli isotipi. Ricostituire le immunobeads secondo le istruzioni del produttore. Esse possono essere mantenute per diversi mesi a + 4 °C in presenza di conservante.
2. Tampone stock: possono essere utilizzate le soluzioni saline fosfato tamponate di Tyrode o di Dulbecco (PBS), facilmente reperibili presso numerosi fornitori, es. Irvine Scientific.

Tyrode (g/l)		Dulbecco (g/l)	
CaCl ₂	0,2	CaCl ₂	0,1
KCl	0,2	KCl	0,2
NaH ₂ PO ₄	0,05	KH ₂ PO ₄	0,2
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,2	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,1
NaCl	8,0	NaCl	8,0
NaHCO ₃	1,0	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2,16
Glucosio	1,0		

3. Tampone I: contiene albumina sierica bovina (BSA: Cohn fraction V) al 3%: pesare 0,3 g di BSA e portarla a 100 ml con tampone stock.
4. Tampone II: BSA al 5%: pesare 0,5 g di BSA e portarla a 100 ml con tampone stock.
5. Filtrare le soluzioni con un filtro a 0,22 o 0,45 µm e riscaldarle (25-35 °C) prima dell'uso.

VIII.2 Procedura

- (i) Per ciascun tipo di immunobead, aggiungere 0,2 ml di sospensione stock di particelle e 10 ml di tampone I, in distinte provette a fondo conico.

- (ii) Trasferire lo sperma in una provetta da centrifuga a fondo conico e portarla a 10 ml con il tampone I. La quantità necessaria di sperma viene determinata dalla concentrazione e dalla motilità degli spermatozoi, secondo la seguente tabella.

Concentrazione (10 ⁶ /ml)	Motilità (gradi a+b)% ^a	Volume necessario ^b (ml)
>50		0,2
20-50	>40	0,4
20-50	<40	0,8
<20	>40	1,0
<20	<40	2,0
<10		>2,0

^a Vedi sezione 2.4.3.

^b Aliquote maggiori di 1,0 ml necessitano di 3 lavaggi.

- (iii) Centrifugare tutte le provette a 500 g per 5-10 minuti.
- (iv) Campioni seminali: eliminare il sopranatante. Risospendere delicatamente il pellet in 10 ml di tampone I fresco e centrifugare ancora a 500 g per 5-10 minuti. Eliminare il sopranatante. Risospendere delicatamente in 0,2 ml di tampone II.
- (v) Provette di immunobeads: eliminare il sopranatante e risospendere delicatamente in 0,2 ml di tampone II.
- (vi) Porre gocce di 5 µl di ciascun tipo di immunobead su uno o più vetrini. Aggiungere 5 µl di sospensione seminale lavata a ciascuna delle goccioline di particelle e mescolare bene usando il puntale di una pipetta o il bordo di un vetrino coprioggetto. Applicare un coprioggetto (20-24 mm) su ciascuna delle miscele, lasciare per 10 minuti in una camera umida e osservare a 400-500x a contrasto di fase.
- (vii) Contare separatamente la percentuale degli spermatozoi *mobili* che hanno due o più immunobeads adese (ignorare il legame alla punta del flagello). Per ogni preparato contare almeno 200 spermatozoi mobili in doppio. Registrare la classe (IgG o IgA) ed il sito di legame delle particelle allo spermatozoo (testa, tratto intermedio, coda).

Interpretazione. - Il test assume un valore clinico se almeno il 50% degli spermatozoi mobili (progressivi o non progressivi) è ricoperto da particelle. Il legame alla punta del flagello non è clinicamente rilevante.

VIII.3 Immunobead test indiretto

L'immunobead test indiretto viene usato per ricercare anticorpi antispermatozoo nel siero inattivato al calore, nel plasma seminale o nel muco cervicale solubilizzato con bromelina.

- (i) Lavare gli spermatozoi di un donatore normale due volte con tampone I, come descritto precedentemente ai punti (ii), (iii), (iv).
- (ii) Portare la concentrazione degli spermatozoi lavati a 50 x 10⁶/ml col tampone II.

- (iii) Diluire 10 µl del liquido da testare con 40 µl di tampone II e miscelare con 50 µl della sospensione di spermatozoi preparati. Incubare a 37 °C per 1 ora.
- (iv) Lavare gli spermatozoi ancora due volte come descritto ai punti (iii) e (iv), ed eseguire il test come riportato ai punti (vi) e (vii).

VIII.4 Controlli

Un controllo positivo ed uno negativo devono essere previsti in ciascuna esecuzione di test. Il controllo positivo può essere preparato usando il siero di un donatore (es. un uomo vasectomizzato) con alto titolo di anticorpi antispermatozoi sierici, verificati con l'immunobead test indiretto. Questo siero viene preparato come indicato nella Sezione VIII.3 e testato in parallelo ad ogni procedura di analisi.

Bibliografia

- Bronson, R.A., Cooper, G.W. & 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. & Rosenfeld D. (1984) Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility*, **42**: 171-83.
- Clarke, G.N., Stojanoff A. & Cauchi, M.N. (1982) Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. In *Immunology of Reproduction*, ed. K. Bratanov, pp. 482-5. Sofia, Bulgaria: Bulgarian Academy of Science Press.
- Clarke, G.N. (1990) Detection of antisperm antibodies using immunobeads. In *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, ed. B.A. Keel & B.W. Webster, pp. 177-92. Boca Raton, Florida: CRC.

Appendice IX

Mixed antiglobulin reaction test (MAR test)

Poiché gli anticorpi IgA quasi mai sono presenti in assenza degli anticorpi IgG, la ricerca di questi ultimi è sufficiente per lo screening routinario. I reagenti per il MAR test sono reperibili alla Fertility Technologies, Natick, Massachusetts 017601, USA e alla Fertipro N.V., Beernem, Belgio.

XI.1 Procedura

- (i) 10 µl di sperma fresco non trattato, 10 µl di particelle di lattice coperte con IgG e IgA (Fertility Technologies Inc.) e 10 µl di antisiero verso le IgG umane (Hoechst-Behring ORCM-04/05, o Dakopatts A089, Danimarca) o verso IgA umane vengono poste su un vetrino portaoggetto.
- (ii) Le gocce di sperma e le particelle di lattice coperte di IgG (o IgA) vengono mescolate per prime, e successivamente la goccia di antisiero viene aggiunta utilizzando un largo coprioggetto (40 mm x 24 mm) che viene quindi appoggiato sulla miscela. Il preparato fresco viene quindi osservato al microscopio, all'ingrandimento di 400x o 600x, con ottica in campo chiaro o contrasto di fase dopo 2-3 minuti, e successivamente dopo 10 minuti.

IX.2 Interpretazione

Se non sono ricoperti di anticorpi, gli spermatozoi saranno liberi di nuotare tra le particelle che, aggregate tra di loro, costituiscono il controllo dell'efficacia della metodica. Se sullo spermatozoo sono presenti anticorpi, le cellule mobili porteranno adese particelle di lattice. In un primo tempo gli spermatozoi mobili nuoteranno portando attaccate particelle singole o in grappoli. In alcuni casi l'agglutinazione diviene poi così massiva da restringere notevolmente la possibilità di movimento.

Contare almeno 200 spermatozoi mobili e calcolare la percentuale di quelli con particelle adese.

Appendice X

Dosaggio dello zinco seminale

X.1 Presupposti

E' stato messo a punto un metodo colorimetrico atto alla determinazione dello zinco nel plasma seminale. Il metodo che qui viene presentato deriva dalla modifica di quello di Johnson ed Eliasson (1987).

E' disponibile un kit per il dosaggio dello zinco nel liquido seminale (Wako Chemicals GmbH, Nissanstrasse 2, 41468 Neuss 1, Germania). La tecnica descritta impiega un lettore di piastre a 96 pozzetti. Il volume del campione e dei reagenti varia proporzionalmente per spettrofotometri che prevedono l'uso di cuvette da 3 ml oppure 1 ml.

X.2 Principio

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow 5\text{-Br-PAPS-Zn}$ complesso, rilevato alla lunghezza d'onda di 560 nm.

5-Br-PAPS è l'abbreviazione di 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(*N*-propil-*N*-sulfopropil-amino)-fenolo.

X.3 Reagenti

1. Zinco kit (Wako Chemicals), stabile a temperatura ambiente per un anno. Usare solo il reagente colore A (2 flaconi da 60 ml) ed il reagente colore B (flacone da 30 ml).
2. Standard zinco: sciogliere 0,144 g di $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 50 ml di acqua e diluirlo 100 volte aggiungendo 99 ml di acqua ad 1 ml di soluzione, per raggiungere la concentrazione di 0,1 mM (0,1 mmol/ml); conservare a temperatura ambiente o a -20 °C.

X.4 Metodo

1. Preparazione di una curva standard: diluire lo zinco standard 100 μM con acqua per ottenere gli standard addizionali di 80, 60, 40, 20 e 10 μM .
2. Preparazione del reagente colore: mescolare 4 parti di reagente colore A con 1 parte di reagente colore B (per una piastra a 96 pozzetti occorrono circa 25 ml). Questa soluzione cromogena è stabile per 2 giorni a temperatura ambiente e per 1 settimana a 4 °C.

3. Preparazione del campione:
 - (i) Centrifugare il liquido seminale per 10 minuti a 1000 g, rimuovere il plasma seminale e mantenerlo a -20 °C fino al momento dell'analisi.
 - (ii) Scongellare il plasma seminale così isolato e mescolarlo bene su un agitatore vortex. (Devono essere testati anche campioni per il controllo di qualità interno, contenenti concentrazioni alte, medie e basse di zinco).
 - (iii) Ciascun campione di plasma seminale, allestito in doppio, deve essere diluito: aggiungere 5 µl di plasma seminale a 300 µl di acqua in una provetta da 1,5 ml e mescolare.
 - (iv) Distribuire aliquote di 40 µl di plasma seminale diluito, in doppio, nei pozzetti della piastra. Preparare anche due pozzetti come bianco (40 µl di acqua) e gli standard.
 - (v) Leggere la piastra alla lunghezza d'onda di 560 nm.

X.5 Calcolo

1. Leggere la concentrazione di zinco nel campione mediante la curva standard (mM).
2. Moltiplicare per il fattore di diluizione per ottenere la concentrazione di zinco (mM) nel campione di plasma seminale non diluito.
3. Moltiplicare per il volume dell'ejaculato per ottenere le µmol per ejaculato.
4. Scartare le letture che cadono al di sopra dello standard massimo e dosare nuovamente questi campioni ad una diluizione maggiore.

X.6 Valore di riferimento

Oltre 2,4 µmol per ejaculato.

Bibliografia

Johnson, O. & 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.

Appendice XI

Dosaggio del fruttosio nel plasma seminale

XI.1 Presupposti

Il metodo riportato è una modifica di quello di Karvonen & Malm (1955). E' disponibile un kit per la determinazione del fruttosio nel liquido seminale (FertiPro N.V., Lotenhulle, Belgio). La tecnica descritta è legata all'impiego di un lettore di piastre a 96 pozzetti. Il volume del campione e dei reagenti è regolabile proporzionalmente per spettrofotometri che prevedono l'uso di cuvette da 3 ml oppure 1 ml.

XI.2 Principio

Fruttosio + indolo $\xrightarrow{\text{calore, acidità}}$ con assorbanza massima alla lunghezza d'onda di 470 nm.

XI.3 Reagenti

1. Agenti deproteinizzanti: 63 μM ($\mu\text{mol/l}$) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sciogliere 1,8 g in 100 ml di acqua) e 0,1 M (mol/l)-NaOH (sciogliere 0,4 g in 100 ml di acqua).
2. Reagente colore (indolo 2 μM in conservante benzoato 16 μM): sciogliere 200 mg di acido benzoico in 90 ml di acqua, agitando in bagnomaria a 60 °C; aggiungere, sciogliendo, 25 mg di indolo e portare a 100 ml; filtrare e conservare a 4 °C.
3. Standard fruttosio (2,24 mM): sciogliere 40,32 mg di fruttosio in 100 ml di acqua; conservare a 4 °C o congelare in aliquote.

XI.4 Metodo

1. Preparazione della curva standard: diluire lo standard 2,24 mM con acqua, per ottenere quattro ulteriori standard, 1,12, 0,56, 0,28 e 0,14 mM.
2. Preparazione del campione:
 - (i) Centrifugare lo sperma per 10 minuti a 1000 g, raccogliere il plasma seminale e conservarlo a -20 °C fino al momento del dosaggio.
 - (ii) Scongellare il plasma seminale e mescolarlo bene su agitatore vortex. Dovrebbero essere dosati anche campioni per il controllo interno di qualità, con bassa, media ed alta concentrazione di fruttosio.
 - (iii) Diluire ciascun campione seminale, allestito in doppio: a 50 μl aggiungere 5 μl di plasma seminale in una provetta da 1,5 ml e miscelare.

- (iv) Deproteinizzazione: aggiungere 12,5 μl di ZnSO_4 63 μM e 12,5 μl di NaOH 0,1 M a 55 μl di plasma diluito, mescolare e lasciare riposare per 15 minuti a temperatura ambiente prima di centrifugare a 8000 g per 5 minuti.
- (v) Portare 50 μl di sopranatante nella provetta analitica. Includere due provette di bianco (50 μl di acqua) e 50 μl degli standard, in doppio.
- (vi) Aggiungere 50 μl di reagente indolo a ciascuna provetta e miscelare. Aggiungere a ciascun campione 0,5 ml di HCl concentrato (32%), coprire con Parafilm ed agitare delicatamente sotto cappa aspirante; riscaldare per 20 minuti a 50 °C in bagnomaria e mescolare; raffreddare in acqua e ghiaccio (15 minuti)^a.
- (vii) Trasferire con cautela 250 μl di soluzione nei pozzetti della piastra, sotto cappa aspirante.
- (viii) Leggere la piastra (con il coperchio, per proteggere lo spettrofotometro) su un lettore alla lunghezza d'onda di 470 nm.

XI.5 Calcolo

1. Determinare la concentrazione di fruttosio del campione in base alla curva standard (mM).
2. Moltiplicare per il fattore di diluizione (16) per ottenere la concentrazione di fruttosio (mM) nel plasma seminale non diluito.
3. Moltiplicare per il volume dell'eiaculato per ottenere le μmol /eiaculato.
4. Scartare i risultati sopra allo standard più alto e ridosare i relativi campioni dopo diluizione.

XI.6 Valore di riferimento

Oltre 13 μmol per eiaculato.

Bibliografia

Karvonen, M.J. & Malm, M. (1955) Determinazione colorimetrica del fruttosio mediante indolo. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, **7**: 305-7.

^a Può essere effettuato un metodo enzimatico alternativo, ma più costoso, che utilizza la spettrofotometria ultravioletta (Boehringer Mannheim n° 139106) qualora non si voglia impiegare HCl concentrato.

Appendice XII

Dosaggio dell' α -glucosidasi neutra nel plasma seminale

XII.1 Presupposti

Il plasma seminale contiene sia un isoenzima neutro dell' α -glucosidasi che viene prodotto negli epididimi, che un isoenzima acido proveniente dalla prostata. Quest'ultimo può essere inibito selettivamente (Paquin *et al.*, 1984) per permettere il dosaggio dell' α -glucosidasi neutra, che riflette la funzione epididimaria. Sono disponibili alcuni kit per la valutazione della glucosidasi nel liquido seminale (Boehringer Mannheim, Cat. n° 1 742 027; FertiPro N.V., Beernem, Belgio). Il metodo proposto è quello di Cooper *et al.*, (1990), che prevede l'impiego di un lettore di piastre a 96 pozzetti. I volumi di campione e reagenti possono essere proporzionalmente regolati per spettrofotometri che impiegano cuvette da 1 o 3 ml. L'opportuna correzione deve essere eseguita per il calcolo dei risultati.

XII.2 Principio

α -glucosidasi

p-nitrofenolo- α -glucopiranoside $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ *p*-nitrofenolo, che in presenza di Na₂CO₃ ha un massimo di assorbanza a 405 nm.

XII.3 Reagenti

1. Tampone fosfato 0,2 M (mol/l), pH 6,8: preparare a partire da K₂HPO₄ · 3H₂O 0,2 M (sciogliere 4,56 g in 100 ml) e KH₂PO₄ 0,2 M (sciogliere 2,72 g in 100 ml), sciogliendo volumi approssimativamente uguali delle due soluzioni, ed aggiustando il pH a 6,8.
2. Tampone contenente sodio dodecil solfato (SDS) all'1%: sciogliere 1 g di SDS in 100 ml del tampone precedente. Questo precipita durante la conservazione a 4 °C, ma torna in soluzione una volta riscaldato delicatamente.
3. Reagente colore 1 (per lo stop della reazione): Na₂CO₃ · H₂O 0,1 M. Sciogliere 6,20 g di Na₂CO₃ · H₂O in 500 ml di acqua.
4. Reagente colore 2 (per diluire il prodotto di reazione): reagente colore 1 contenente 0,1% (peso/volume) di SDS.
5. Substrato *p*-nitrofenolo glucopiranoside (PNPG), 5 g/l: preparare fresco per ciascun dosaggio sciogliendo 0,1 g di PNPG (Sigma N1377) in 20 ml di tampone contenente SDS all'1% e riscaldare la soluzione

su piastra magnetica riscaldante a 50 °C circa, agitando per circa 10 minuti. Alcuni cristalli possono rimanere non sciolti. La soluzione deve essere mantenuta a 37 °C durante l'uso.

6. Inibitore della glucosidasi per il bianco campione (castanospermina): preparare una soluzione stock 10 mM sciogliendo 0,0189 g di castanospermina (Sigma C3784) in 10 ml di acqua, e portare successivamente, sempre con acqua, alla soluzione di lavoro 1 mM. Aliquotare e congelare a -20 °C.
7. Standard, 5 mM *p*-nitrofenolo (PNP): sciogliere 0,0695 g di PNP (Sigma 104-8) in 100 ml di acqua. Scaldare la soluzione se necessario e conservare a 4 °C in una bottiglia scura. Preparare una nuova soluzione standard ogni tre mesi.

XII.4 Metodo

1. Preparazione della curva standard (entro l'ultima ora di incubazione):
 - (i) Porre 400 µl di soluzione stock di PNP 5 mM in una fiasca da 10 ml, e portare a 10 ml con il reagente colore 2 (200 µM).
 - (ii) Diluire lo standard 200 µM con il reagente colore 2, per ottenere quattro altri standard di PNP 160, 120, 80 e 40 µM.
2. Preparazione dei campioni:
 - (i) Centrifugare il campione seminale per 10 minuti a 1000 g, separare il plasma e conservarlo a 20 °C fino al momento dell'analisi.
 - (ii) Scongelerare il plasma seminale e mescolarlo bene sul vortex. Dovrebbero essere dosati anche campioni per il controllo interno di qualità, con bassa, media ed alta attività di α -glucosidasi neutra.
 - (iii) Mettere in doppio campioni di 15 µl di plasma seminale in provette da 1,5 ml. Aggiungere in doppio il bianco (15 µl di acqua) ed i campioni seminali per il controllo interno di qualità, con media e bassa attività di glucosidasi, ed in quadruplo i campioni seminali per il controllo di qualità interno con alta attività di glucosidasi.
 - (iv) A due dei campioni con alta attività di glucosidasi per il controllo di qualità aggiungere 8 µl di castanospermina 1 mM, come bianco campione.
 - (v) Porre 100 µl di substrato di PNPG (a 37 °C circa) in ciascuna provetta Eppendorf.
 - (vi) Vortizzare ciascuna provetta ed incubare a 37 °C per 2 ore (il controllo della temperatura e del tempo di reazione è determinante).
 - (vii) Arrestare l'incubazione dopo 2 ore aggiungendo 1 ml di reagente colore 1 ed agitare.
 - (viii) Trasferire 250 µl di campioni e standard nella piastra a 96 pozzetti.
 - (ix) Leggere la piastra con un lettore di piastre a 96 pozzetti alla lunghezza d'onda di 405 nm, entro 60 minuti, utilizzando il bianco-acqua per fissare lo zero.

XII.5 Calcolo

Una unità (U) di attività glucosidasica equivale alla produzione di 1 µmol di prodotto (PNP) per minuto a 37 °C. In questo dosaggio l'attività viene derivata da 15 µl di liquido seminale in un volume totale di 1,115 ml per 120 minuti, così che si rende necessario un fattore di correzione di $1115/15/120 (= 0,6194)$.

1. Leggere la concentrazione di PNP prodotto dal campione confrontando la curva standard (μM).
2. Moltiplicare il fattore di correzione (0,6194) per ottenere l'attività della glucosidasi neutra nel plasma seminale non diluito (U/l).
3. Sottrarre l'attività (U/l) del bianco plasma-castanospermina da ciascun campione, per ottenere l'attività corretta (correlata alla glucosidasi).
4. Moltiplicare l'attività corretta per il volume dell'eiaculato per ottenere l'attività glucosidasica (mU) per eiaculato.
5. Scartare i risultati sopra allo standard più alto e ridosare i relativi campioni dopo diluizione.

XII.6 Valore di riferimento

20 mU per eiaculato (minimo).

Bibliografia

- Cooper, T.G., Yeung, C.H., Nashan, D., Jockenhovel, 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 XIII

Istruzioni per la raccolta del campione e modulo per la registrazione dei risultati dell'analisi seminale

Istruzioni per la raccolta ed il trasporto del campione seminale

1. Astenersi da rapporti sessuali e da masturbazione per un periodo compreso tra 2 e 7 giorni.
2. Raccogliere il campione per masturbazione, senza ricorrere ad interventi strumentali. Qualora ciò non sia possibile, utilizzare appositi preservativi (non quelli comuni di lattice; vedi Sezione 2.1 (e)).
3. Raccogliere il campione in un contenitore pulito, provvisto di un'ampia apertura, di vetro o di plastica. E' importante che venga raccolto l'intero eiaculato. Se questo non avviene, il campione dovrebbe essere indicato come "incompleto".
4. Entro un'ora dalla raccolta, portare il contenitore con il prelievo al laboratorio, procurando di mantenerlo caldo, in una tasca interna vicino al corpo.
5. I prelievi possono anche essere effettuati in una stanza vicina al laboratorio.
6. Etichettare il campione con nome (e/o numero di identificazione), data e ora della raccolta.

Modulo per la raccolta dei dati dell'analisi seminale

Presentiamo qui un modello di registrazione dei dati dello spermogramma. Esso contiene una griglia per registrare tutte le osservazioni effettuate durante l'analisi seminale, usando i metodi descritti in questo manuale. Nella clinica, può essere utile aggiungere alcune variabili derivate, che sono la combinazione dei dati risultanti. Esempio di una simile variante è la conta totale degli spermatozoi mobili (ottenuta moltiplicando la concentrazione spermatozoaria, il volume dell'eiaculato e la percentuale degli spermatozoi mobili). Variabili di questo tipo non sono state incluse in questo modello, poiché il loro uso dipende da particolari circostanze cliniche e dall'importanza che il medico attribuisce loro. Per scopo di ricerca, i dati di questa scheda possono essere inseriti direttamente in un database, e qualsiasi variabile derivata può essere ricavata elettronicamente.

Questa scheda di raccolta dati è stata stampata con colonne multiple che permettono di registrare i risultati di analisi effettuate in date diverse. Questo è un sistema pratico per presentare i risultati di analisi seriali. Allo stesso modo, uno spazio aggiuntivo può rendersi necessario in certe circostanze per permettere l'inserimento di commenti ed osservazioni che non possono essere codificate in una scheda.

MODULO PER LA RACCOLTA DEI DATI DELL'ANALISI SEMINALE

	Giorno Mese Anno	Giorno Mese Anno	Giorno Mese Anno
Data delle raccolta	_ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _
Durata astinenza (giorni)	_ _	_ _	_ _
Intervallo tra l'eiaculazione e l'inizio dell'analisi (min)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
Aspetto (1 normale; 2 anormale)	_	_	_
Liquefazione (1 normale; 2 anormale)	_	_	_
Viscosità (1 normale; 2 anormale)	_	_	_
Volume (ml)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
pH	_ , _	_ , _	_ , _
Motilità (spermatozoi %)			
a – progressione rapida	_ _ _	_ _ _	_ _ _
b – progressione lenta	_ _ _	_ _ _	_ _ _
c – motilità non progressiva	_ _ _	_ _ _	_ _ _
d – immobili	_ _ _	_ _ _	_ _ _
Agglutinazione (%)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
Vitalità (% vivi)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
Concentrazione (10 ⁶ /ml)	_ _ _ , _	_ _ _ , _	_ _ _ , _
Morfologia (%)			
- normale	_ _ _	_ _ _	_ _ _
- anomalie della testa	_ _ _	_ _ _	_ _ _
- anomalie del collo	_ _ _	_ _ _	_ _ _
- anomalie della coda	_ _ _	_ _ _	_ _ _
- residui citoplasmatici	_ _ _	_ _ _	_ _ _
Leucociti (10 ⁶ /ml)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
Cellule germinali immature (10 ⁶ /ml)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
Immunobead/MAR test (% con particelle-Ig adese)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
MAR test (% con particelle adese)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
Biochimica			
- zinco (mmol/l)	_ , _ _	_ , _ _	_ , _ _
- fruttosio (mmol/l)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
- α-glucosidasi (neutra) (U/l)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _

Appendice XIV

Spermiogramma computerizzato (CASA)

XIV.1 Sistemi disponibili

Numerose ditte producono sistemi CASA, come l'Hamilton Thorne (Hamilton Thorne Research, Beverly MA, USA), l'Hobson Sperm Tracker (Hobson Sperm Tracker, Sheffield, Gran Bretagna) e ciascuno di questi sistemi è disponibile in diverse versioni.

XIV.2 Settaggi dei parametri

La corretta messa a punto di ciascun sistema CASA è essenziale per ottenere una prestazione analitica ottimale. Le ditte produttrici provvedono ad un settaggio affidabile, tuttavia l'utilizzatore deve effettuare una messa a punto dell'apparecchio in funzione del grado di sensibilità e ripetibilità richiesto. E' inoltre indispensabile l'uso di strumenti idonei per il controllo di qualità, come le videocassette (vedi Capitolo 4). Diversi autori hanno affrontato il tema del settaggio del CASA in un contesto generale (Davis & Katz, 1992; Mortimer, 1994b).

XIV.3 Preparazione dei campioni

I criteri per la raccolta dello sperma e per la sua preparazione prima dell'applicazione del CASA sono gli stessi riportati nel Capitolo 2. I sistemi CASA devono mantenere il campione alla temperatura di 37 °C, perché le variabili della mobilità spermatozoaria sono dipendenti dalla temperatura. Le caratteristiche del movimento e la densità di spermatozoi possono essere valutate sul campione non diluito. Spesso, comunque, in campioni con un'alta conta spermatica (superiore a $50 \times 10^6/\text{ml}$) possono avvenire frequenti collisioni, che possono portare ad errori di valutazione. In questi casi, quindi, si raccomanda la diluizione del campione. Qualora non sia possibile effettuare una diluizione con plasma seminale omologo, può essere fatta una diluizione con terreno di coltura, per ottenere una concentrazione finale standard ($25-50 \times 10^6/\text{ml}$). Può essere usata la soluzione PBS di Dulbecco-glucosio-BSA (per una discussione dei media che supportano la motilità degli spermatozoi, vedi Farrell *et al.*, 1996). Per la standardizzazione dei risultati, dovrebbe essere impiegato rigorosamente sempre lo stesso terreno di diluizione.

Composizione del medium PBS di Dulbecco-glucosio-BSA

	(g/l)	(mmol/l)
NaCl	8,000	137
KCl	0,200	3
CaCl ₂ (anidro) ^a	0,100	1
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	1,150	8
KH ₂ PO ₄	0,200	1
MgCl ₂ (anidro) ^a	0,047	<1
D-Glucosio	1,000	6
Rosso fenolo	0,005	-
Piruvato di sodio	0,036	<1
BSA ^b	3,000	-

Aggiungere soluzione antibiotica allo 0,4%
(GIBCO, Grand Island, New York, USA)

^a Da aggiungere separatamente per evitare l'agglutinazione.

^b BSA albumina sierica bovina (Cat. n° A6003, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) priva di acidi grassi, da aggiungere alla fine.

Sono disponibili specifiche camere da impiegare in sistemi CASA. Una camera di conta dello spessore di 20 µm Microcell (Conception Technologies, San Diego, CA, USA) è in grado di fornire risultati ottimali nell'analisi del liquido seminale. Entrambi i settori di conta dovrebbero essere allestiti ed analizzati. Diversi campi devono essere esaminati: 6 campi per settore (12 in tutto) sono necessari per un risultato affidabile. Dovrebbero essere analizzati almeno 200 spermatozoi per ciascun settore. Applicare gli stessi principi di controllo di qualità usati per la valutazione standard della concentrazione (vedi Sezione 2.5.2). Qualora si vogliano esaminare spermatozoi iperattivati, separati dal plasma seminale, lo spessore della camera deve essere di almeno 20 µm.

XIV.4 Uso del CASA

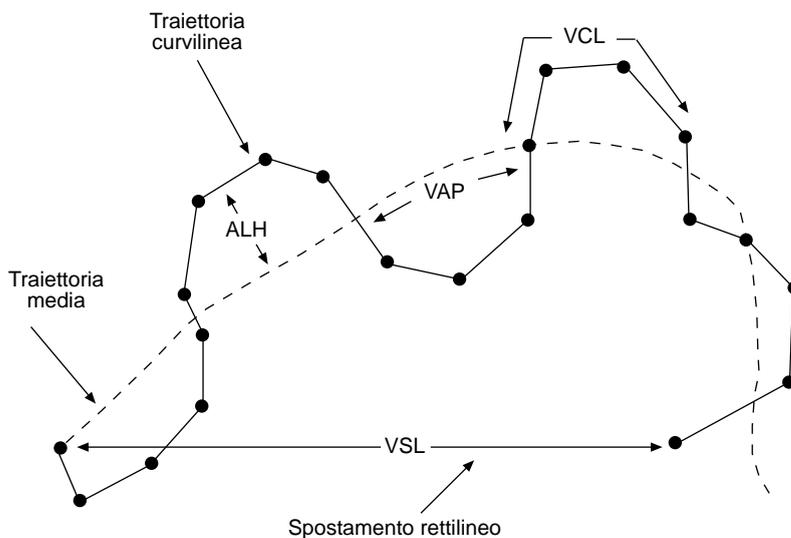
I campioni possono venire analizzati direttamente oppure mediante videoregistrazione. L'analisi su videocassetta migliora la standardizzazione e permette l'applicazione di procedure atte a fornire una garanzia di qualità (Capitolo 4). Il costruttore darà le opportune informazioni sull'uso della videoregistrazione ed il settaggio ottimale dell'illuminazione per ottenere il massimo contrasto tra le teste degli spermatozoi e lo sfondo.

E' controverso quale sia il tempo di osservazione necessario per ottenere una misurazione ottimale. L'Hamilton Thorne e l'Hobson Tracker seguono gli spermatozoi per un minimo di un secondo, il che dovrebbe essere sufficiente per fornire una valutazione realistica delle variabili CASA di base nell'osservazione del liquido seminale.

XIV.5 Terminologia CASA

Esiste una terminologia standard per le variabili misurabili con i sistemi CASA, alcune delle quali sono riportate nella Fig. XIV.1.

Fig. XIV.1. Terminologia standard per le variabili misurate dai sistemi CASA.



VCL = *velocità curvilinea* ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa di spermatozoo lungo la sua attuale traiettoria curvilinea, come rilevata bidimensionalmente al microscopio.

VSL = *velocità rettilinea* ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa di spermatozoo lungo la linea retta che unisce la sua posizione iniziale con quella finale.

VAP = *velocità intermedia* ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa di spermatozoo lungo la sua traiettoria intermedia. Questa traiettoria viene dedotta per interpolazione della traiettoria reale per mezzo di algoritmi inseriti nel sistema CASA. Questi algoritmi sono diversi da un apparecchio all'altro.

ALH = *ampiezza dello spostamento laterale della testa* (μm). Ampiezza dello spostamento laterale di una testa di spermatozoo dalla sua traiettoria media. Può essere espressa come valore massimo o valore medio dello spostamento. Diversi strumenti CASA calcolano l'ALH mediante differenti algoritmi, così che i valori ottenuti non sono del tutto comparabili.

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

WOB = *oscillazione*. Misura dell'oscillazione della traiettoria reale da quella intermedia, VAP/VCL.

STR = *rettilineità*. Linearità della traiettoria intermedia, VSL/VAP.

BCF = *frequenza del battito* (battiti/s). Frequenza media con cui la traiettoria curvilinea dello spermatozoo incrocia quella intermedia.

MAD = *spostamento angolare medio* (gradi). La media dei valori assoluti dell'angolo di rotazione istantanea della testa dello spermatozoo rispetto alla sua traiettoria curvilinea.

Diversi sistemi CASA impiegano differenti algoritmi per calcolare molte di queste variabili di movimento. Non è attualmente definibile il grado di comparabilità delle rilevazioni ottenute dai diversi strumenti.

XIV.6 Analisi statistica

E' consigliabile che l'analisi computerizzata del liquido seminale venga utilizzata per ottenere i parametri di motilità su almeno 200 traiettorie di spermatozoi mobili per campione. Si noti che questo

richiede la ricerca di molti più spermatozoi. Qualora si voglia classificare gli spermatozoi entro sottogruppi in base alla motilità, oppure effettuare altre analisi della motilità entro un dato campione, saranno necessarie le traiettorie di almeno 200, e se possibile 400, spermatozoi mobili. Studi sperimentali dovrebbero prevedere la standardizzazione del numero di spermatozoi da analizzare per ciascun campione. E' consigliabile interfacciare gli apparecchi CASA con programmi computerizzati che permettano l'organizzazione dei dati e l'analisi statistica. La distribuzione di molti parametri di movimento all'interno di un campione non è di tipo normale. Per questo dovrebbe essere utilizzata la mediana, piuttosto che il valore medio, per riassumere la tendenza prevalente di ciascuna di queste variabili. Può essere anche necessaria la trasformazione matematica delle misurazioni per singolo spermatozoo prima di eseguire particolari valutazioni statistiche.

Bibliografia

(vedi la Bibliografia per quelle citazioni che appaiono anche nelle Sezioni 2.11 e 2.14)

Davis, R.O. & Katz, D.F. (1992) Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology*, **13**: 81-6.

Farrel, P.B., Foote, R.H., McArdle, M.M., Trouern-Trend, V.L. & Tardif, A.L. (1996) Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *Journal of Andrology*, **17**: 293-300.

Mortimer, D. (1994b) *Practical Laboratory Andrology*, Oxford, Oxford University Press.

Appendice XV

Protocollo per il test di penetrazione negli oociti zona-free di hamster

XV.1 Protocollo standard

XV.1.1 Procedura

- (i) Mantenere per 30-60 minuti il campione seminale, fino a completa liquefazione.
- (ii) Il terreno di coltura per questo test è il medium BWW (Biggers *et al.*, 1971). Questo terreno viene preparato sotto forma di una soluzione stock (vedi più avanti) che può essere conservata senza danno per diverse settimane a 4 °C. Al momento dell'uso, 100 ml di soluzione stock vengono supplementati con 210 mg di bicarbonato di sodio, 100 mg di glucosio, 0,37 ml di una soluzione di 600 g/l di sodio lattato, 3 mg di piruvato di sodio, 350 mg di frazione V di albumina sierica bovina, 10000 unità di penicillina, 10 mg di streptomina solfato e sali di HEPES 20 mM. Il medium deve essere riscaldato a 37 °C prima dell'uso, preferibilmente in un'atmosfera di CO₂ al 5% ed aria al 95%.

Componenti della soluzione stock di BWW

Sostanza	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 vengono preparati mediante le metodiche descritte nell'Appendice XVIII. Se viene usata la procedura di "swim-up", è opportuno allestire più di una provetta (da tre a dieci, in rapporto al volume dell'eiaculato ed alla concentrazione di spermatozoi).

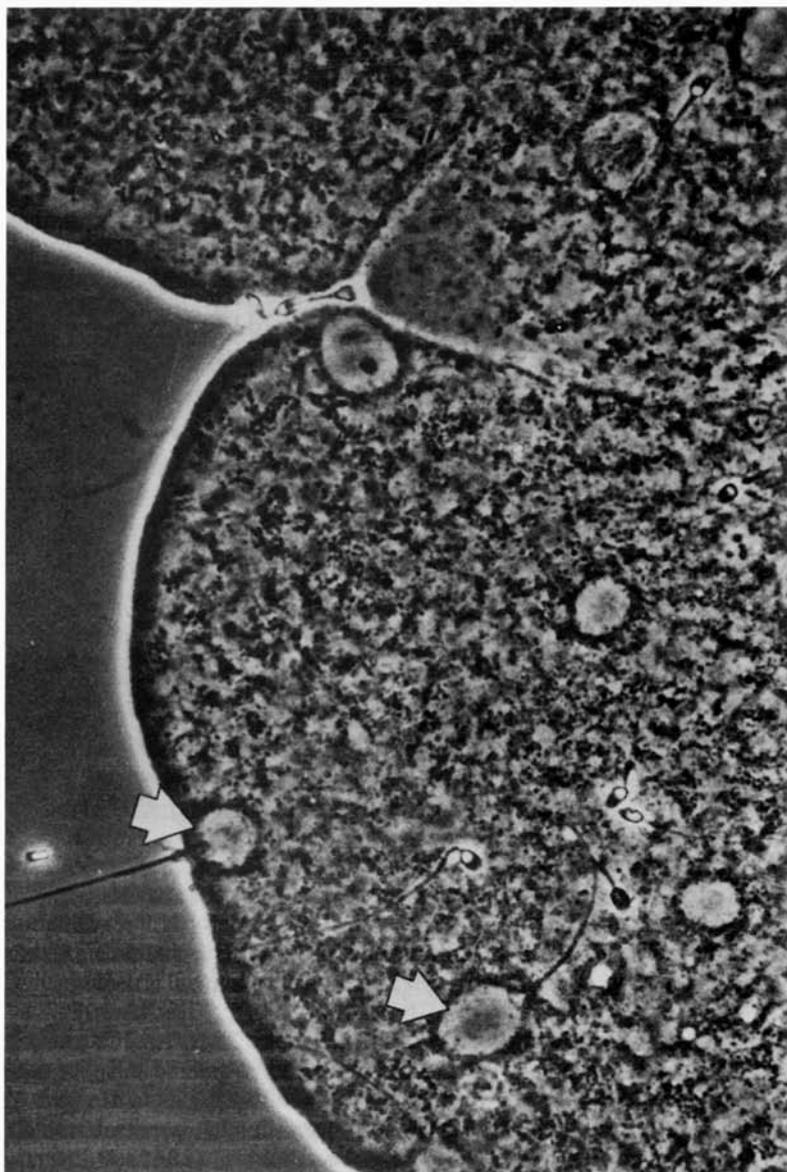
Le provette sono incubate a 37 °C per un'ora, in un'atmosfera di CO₂ al 5% ed aria al 95%. Se non è disponibile un incubatore adeguato possono venire mantenute a 37 °C all'aria, avendo la cura di serrare bene il tappo. Durante il tempo di incubazione, la maggior parte degli spermatozoi mobili migra dal plasma seminale al medium stratificato sopra di esso.

- (iv) La sospensione di spermatozoi viene centrifugata a 500 g per 5 minuti, risospesa per ottenere una concentrazione di 10×10^6 spermatozoi/ml in un volume non inferiore a 0,5 ml ed incubata per 18-24 ore a 37 °C in un'atmosfera di CO₂ al 5% ed aria al 95%. Se non è disponibile un incubatore adeguato, le provette possono venire mantenute a 37 °C all'aria, dopo aver serrato bene il tappo. Durante l'incubazione, le provette dovrebbero stare inclinate con un angolo di 20° rispetto all'orizzontale, per evitare la sedimentazione di spermatozoi nel pellet e per aumentare la superficie disponibile per gli scambi gassosi.
- (v) Gli oociti possono essere ottenuti da femmine immature di hamster, oppure mature, trattate al primo giorno del ciclo estrale. Siero di cavalla gravida (PMS) e gonadotropina corionica umana (hCG) vengono iniettate intraperitoneo al dosaggio di 30-40 UI, a 48-72 ore, separatamente. In seguito, gli oociti dovrebbero essere prelevati entro 18 ore dall'iniezione di hCG e trattati a temperatura ambiente con ialuronidasi allo 0,1% e tripsina allo 0,1% per rimuovere, rispettivamente, le cellule del cumulo e la zona pellucida. Ciascun trattamento enzimatico dovrà essere seguito da due lavaggi in medium BWB. Gli oociti isolati possono essere riscaldati a 37 °C ed introdotti immediatamente nella sospensione di spermatozoi, oppure conservati a 4 °C fino a 24 ore.
- (vi) Alla fine della fase di capacitazione, le provette di incubazione vengono riportate in posizione verticale per 20 minuti per far sedimentare le cellule immobili, dopo di che gli spermatozoi mobili vengono aspirati con il soprannatante e portati alla concentrazione di $3,5 \times 10^6$ spermatozoi mobili/ml. Gli spermatozoi vengono quindi posti sotto paraffina liquida in gocce di 50-100 µl, a cui vengono aggiunti gli oociti "zona-free" di hamster nella misura di almeno 15 per gocciolina. I gameti vengono quindi incubati a 37 °C in un'atmosfera di CO₂ al 5% ed aria al 95% per 3 ore.
- (vii) Il numero di spermatozoi che sono penetrati negli oociti viene quindi valutato accuratamente, dopo aver rimosso gli oociti ed averli liberati, con un lavaggio, dagli spermatozoi lassamente adesi; successivamente gli oociti vengono compressi allo spessore di 30 µm sotto un coprioggetto 22 x 22 mm ed esaminati al microscopio in contrasto di fase. (E' possibile la fissazione e conservazione degli oociti, ad esempio in glutaraldeide all'1%, seguita dalla colorazione con orceina acetica).
- (viii) Gli oociti dovrebbero essere quindi osservati per determinare la percentuale di quelli che hanno spermatozoi nel citoplasma ed il numero medio di spermatozoi incorporati in ciascun oocita (Fig. XV.1). La presenza di spermatozoi che rimangono legati alla superficie dell'oocita dopo il lavaggio iniziale dovrebbe, inoltre, essere annotato, dal momento che esso può fornire indicazioni sulla percentuale di spermatozoi che hanno avuto la reazione acrosomiale.

XV.2 Protocollo che prevede l'introduzione dello ionoforo del calcio (A23187)

Si prepara un campione di spermatozoi altamente mobili attraverso centrifugazione in gradienti di Percoll con un gradiente discontinuo a due stadi, come descritto nell'Appendice XVIII. Il pellet sul fondo

Fig. XV.1. Un oocita zona-free di hamster contenente spermatozoi umani, come appare in microscopia a contrasto di fase. Le frecce indicano la presenza di teste spermatozoarie decondensate entro l'ooplasma (scala X = 500).
Da Aitken *et al.* (1983).



della frazione all'80% viene quindi risospeso in 8 ml di terreno BWB, centrifugato a 500 g per 5 minuti ed infine risospeso alla concentrazione di 5×10^6 spermatozoi mobili/ml.

L'A23187 viene preparato nel seguente modo: preparare una soluzione 1 mM dell'acido libero di A23187 a partire da una soluzione stock 10 mM in dimetilsolfossido (DMSO) attraverso una diluizione 1:10 con terreno BWB. Questa soluzione deve essere mantenuta a 4 °C per *almeno 3 giorni* prima dell'uso.

Il giorno del test, l'A23187 viene aggiunto agli spermatozoi in modo da ottenere due diverse concentrazioni di 1,25 e 2,5 μ M. La curva dose-risposta per il trattamento con lo ionoforo varia da individuo ad individuo, e pertanto conviene testare ciascun paziente sia a 1,25 che a 2,5 μ M. Gli spermatozoi vengono incubati con lo ionoforo per 3 ore, dopo le quali le cellule vengono raccolte per centrifugazione a 500 g e risospese in un uguale volume di terreno BWB.

A questo punto, viene valutata la percentuale di spermatozoi mobili, e la concentrazione degli spermatozoi viene aggiustata a $3,5 \times 10^6$ spermatozoi mobili/ml prima di essere suddivisi in goccioline di 50-100 μ l sotto olio di paraffina. Comunque, risultati attendibili possono essere ottenuti anche a concentrazioni più basse, fino a 1×10^6 spermatozoi mobili/ml (Aitken & Elton, 1986)

Gli oociti zona-free di hamster, preparati secondo Yanagimachi *et al.* (1976), vengono distribuiti nelle goccioline nella misura di circa 5 oociti per gocciolina e 20 oociti per campione.

Dopo altre 3 ore gli oociti vengono raccolti dalle goccioline, lavati degli spermatozoi adesi lassamente, compressi allo spessore di 30 μ m sotto un coprioggetto 22 x 22 mm ed esaminati per evidenziare la presenza di teste spermatozoarie decondensate, con una coda adesa o strettamente associata, utilizzando un microscopio a contrasto di fase. Viene registrato il numero di spermatozoi che penetrano ciascun oocita, ed il risultato viene espresso come numero medio di spermatozoi penetrati per oocita.

XV.3 Controllo di qualità

Il test deve essere eseguito con un adeguato livello di controllo di qualità. Il coefficiente di variazione intra-dosaggio deve essere stabilito mediante ripetizione, almeno 10 volte, dell'analisi su un singolo campione. In queste condizioni il coefficiente di variazione intra-dosaggio non dovrebbe superare il 15%. Il coefficiente di variazione inter-dosaggio non dovrebbe superare il 25%; esso deve essere determinato usando un pool di spermatozoi crioconservati dotati di un grado di penetrazione noto. Ogni analisi in cui il valore ottenuto per la preparazione standard si discosta di oltre due deviazioni standard dalla media dovrebbe essere scartata in quanto non affidabile. Quando si rileva un punteggio di penetrazione pari a zero si deve ripetere l'analisi su un diverso campione 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**: 733-9.
- 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, pp. 147-65. Berlin: Springer.
- Biggers, J.D., Whitten, W.K. & Whittingham, D.G. (1971) The culture of mouse embryos *in vitro*. In *Methods in Mammalian Embryology*, ed. J.C. Daniel, pp. 86-116. San Francisco: Freeman.
- 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 XVI

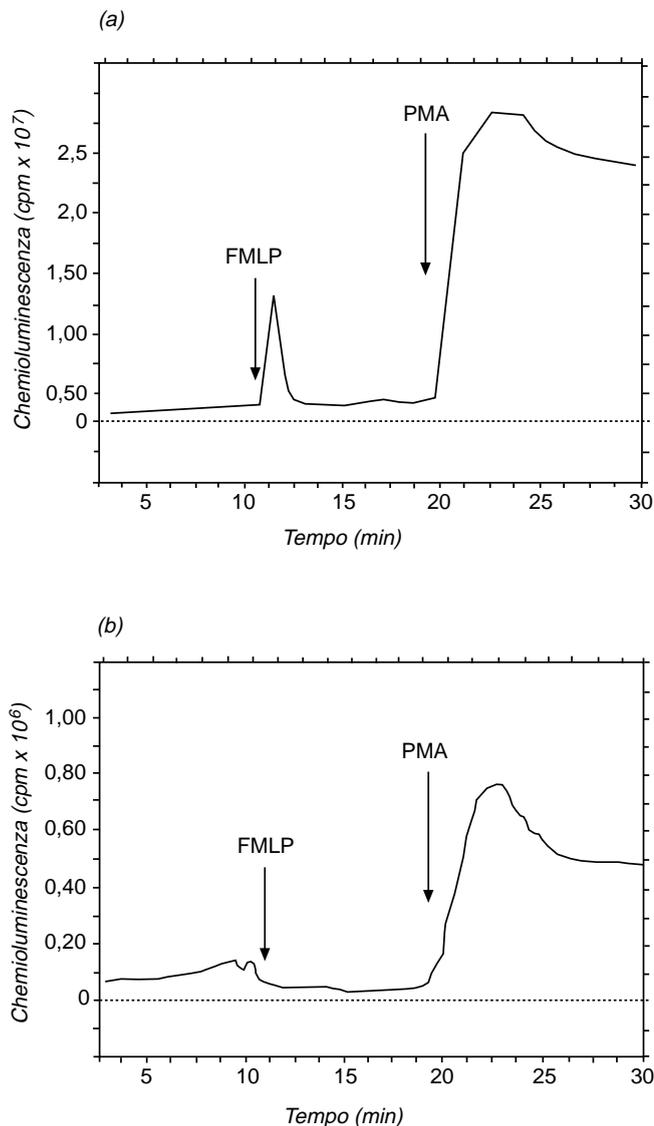
Dosaggio dei radicali ossigeno prodotti dalle sospensioni spermatozoarie

XVI.1 Protocollo

Questa procedura richiede l'uso di un luminometro sensibile (es. Berthold LB 9505) per misurare i bassi livelli di luce prodotta dagli spermatozoi umani in presenza di una sonda chemio-luminescente come il luminol o la lucigenina. Il metodo descritto impiega una miscela di luminol e perossidasi di rafano per ottenere sensibili misure della produzione di perossido di idrogeno. Comunque, anche altre sonde sono state usate per monitorare la produzione di radicali ossigeno attivi (ROS) da parte di eiaculati umani lavati, compresa la lucigenina che sembra misurare il rilascio extracellulare di anioni superossido (Aitken *et al.*, 1992; McKinney *et al.*, 1996).

- (i) Pipettare 400 μ l di spermatozoi umani lavati (10×10^6 spermatozoi/ml) sospesi in un semplice terreno di Krebs-Ringer senza rosso fenolo, in un idoneo contenitore per luminometro, avendo la cura di evitare la formazione di bolle d'aria.
- (ii) Aggiungere 4 μ l di 5-ammino-2,3 diidro-1,4 ftalazinedione (luminol; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) preparato come una soluzione stock 25 mM in DMSO (dimetilsulfossido), insieme a 8 μ l di perossidasi di rafano (12,4 U di perossidasi di rafano tipo VI, 310 U/mg; Sigma Chemical Company).
- (iii) Monitorare il segnale chemioluminescente a 37 °C per almeno 5 minuti, fino a che non sia stabilizzato.
- (iv) Test di provocazione FLMP per i leucociti.
Aggiungere 2 μ l della sonda leucocita-specifica formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), da una soluzione stock 10 mM in DMSO, alla miscela di reazione, per stimolare un segnale chemioluminescente da ciascun polimorfonucleato presente nella sospensione di sperma (Krausz *et al.*, 1992). Poiché i recettori FMLP non sono presenti sulla superficie degli spermatozoi, il segnale è specifico per la popolazione di leucociti, e può essere calibrato utilizzando sospensioni contenenti un numero noto di leucociti polimorfonucleati.
- (v) Provocazione PMA della generazione di ROS da parte di leucociti e spermatozoi.

Fig. XVI.1. Distribuzione della chemiluminescenza osservata con una sospensione di spermatozoi usando il sistema luminol-perossidasi. (a) In presenza di contaminazione di leucociti si osserva un picco nella produzione di ROS all'aggiunta della sonda leucocita-specifica FMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina). La successiva aggiunta di PMA (sorbolo 12-miristato 13-acetato estere) genera un elevato, intenso segnale da entrambe le popolazioni di spermatozoi e leucociti. (b) In assenza di contaminazione leucocitaria la risposta FMLP viene a mancare mentre la PMA produce un marcato segnale chemiluminescente dagli spermatozoi (Krausz *et al.*, 1992).



Dopo che il segnale FMLP si è abbassato, trattare la sospensione di sperma con 4 μ l di sorbolo 12-miristato 13-acetato (PMA), preparato da una soluzione stock 1 nM in DMSO diluita 1:100, fino ad ottenere una soluzione di lavoro 10 μ M ed una concentrazione finale di 100 nM. Questo reagente dà un'indicazione dei contributi forniti dalle sottopopolazioni dei leucociti e degli spermatozoi alla capacità della sospensione di produrre radicali ossigeno (Fig. XVI.1).

Nota: La capacità di un leucocita di generare specie radicali ossigeno è almeno 100 volte maggiore di quella di uno spermatozoo. Un basso livello di contaminazione leucocitaria può, pertanto, avere una grossa influenza sul segnale di chemiluminescenza generato da una sospensione di spermatozoi.

Bibliografia

Aitken, R.J., Buckingham, D.W. & West, K.M. (1992) Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *Journal of Cellular Physiology*, **151**: 466-77.

- Krausz, C., West, K., Buckingham, D. & Aitken, R.J. (1992) Analysis of the interaction between *N*-formylmethionyl-leucyl phenylalanine and human sperm suspensions: development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leukocytes. *Fertility and Sterility*, **57**: 1317-25.
- McKinney, K.A., Lewis, S.E.M. & Thompson, W. (1996) Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probe. *Archives of Andrology*, **36**: 119-25.

Appendice XVII

Test di induzione della reazione acrosomiale

La reazione acrosomiale (AR) è un processo di esocitosi che avviene dopo che lo spermatozoo si è legato alla zona pellucida e che deve aver luogo prima che lo spermatozoo possa penetrare i rivestimenti dell'ovocita e fecondarlo. Si ritiene che l'ingresso di calcio sia uno degli eventi iniziali della AR normale. Inducendo questo ingresso di calcio con un agente di trasporto specifico come lo ionoforo A23187, o con un trattamento con progesterone si ha la possibilità di testare l'efficacia degli spermatozoi capacitati nell'andare incontro alla AR. Comunque, lo studio dello stato dell'acrosoma richiede ancora ulteriori valutazioni prima che possa essere considerato un test clinico di routine.

XVII.1 Induttori della reazione acrosomiale

Preparare una soluzione stock 2-5 mM di ionoforo del calcio A23187 (acido libero) in dimetilsulfossido (DMSO) e conservarla in piccole aliquote a -20 °C.

Nota: A23187 è fotosensibile, per cui è necessario prendere le opportune precauzioni onde evitarne l'esposizione alla luce.

Preparare la soluzione di lavoro a partire dalla stock per diluizione con terreno di coltura in modo che un piccolo volume (2,5-10 µl) possa essere aggiunta alle provette per ottenere una concentrazione finale di A23187 di 10 µM ed una di DMSO inferiore all'1%.

XVII.2 Procedura generale

- (i) Attendere 30-60 minuti fino alla completa liquefazione dello sperma.
- (ii) E' preferibile, seppure non indispensabile, ricorrere ad una tecnica di preparazione del liquido seminale, in modo da ottenere una popolazione di spermatozoi dotati di velocità rapida e priva di contaminanti, quali i leucociti, le cellule germinali e gli spermatozoi morti (vedi Appendice XVIII).
- (iii) Per indurre la capacitazione degli spermatozoi in coltura, utilizzare un medium tamponato con bicarbonato, come il BWW (vedi Appendice XVI), l'Ham's F-10, o fluido tubarico umano sintetico (HTF), con un contenuto di 10-35 g/l di albumina sierica. Scaldare il medium prima dell'uso a 37 °C, preferibilmente in un incubatore con atmosfera al 5% di CO₂ e 95% di aria. Il medium dovrebbe essere preparato fresco per ogni test.

- (iv) Preparare un controllo e la provetta campione, ciascuna contenente 1×10^6 spermatozoi mobili/ml ed incubare per 3 ore per indurre la capacitazione.
- (v) Aggiungere alla provetta campione un volume sufficiente della soluzione di lavoro di A23187 per ottenere una concentrazione finale di 10 μ M. Alla provetta controllo aggiungere lo stesso volume di DMSO.
- (vi) Incubare entrambe le provette a 37 °C per 15 minuti. Prelevare una piccola quantità dal campione e dal controllo per la determinazione della motilità prima di arrestare la reazione, usando glutaraldeide al 3% o etanolo.
- (vii) Trasferire gli spermatozoi fissati su un portaoggetti pulito e lasciare asciugare all'aria.
- (viii) Colorare gli spermatozoi con marcatori fluorescenti da rilevare in microscopia a fluorescenza.
- (ix) Annotare la percentuale di spermatozoi con reazione avvenuta nel campione (% AR campione) e nel controllo (% AR controllo).

XVII.3 Risultati

Il potenziale di reazione acrosomiale dopo ionoforo (ARIC) è dato dalla percentuale AR del campione meno la percentuale AR del controllo. Il valore normale è 15%. Valori inferiori al 10% sono considerati anomali. Valori compresi tra 10% e 15% indicano una funzionalità spermatozoaria normale. Se oltre il 20% degli spermatozoi della provetta controllo mostrano una AR spontanea dopo 3 ore di incubazione, significa che è avvenuta una AR prematura.

XVII.4 Controllo di qualità

Un campione di controllo positivo dovrebbe essere testato ogni volta che viene eseguita l'analisi. Per garanzia che ogni nuova preparazione di colorante sia stata effettuata correttamente, eseguire un test crociato con il vecchio colorante su un controllo positivo di spermatozoi a potenziale conosciuto.

Bibliografia

European Society of Human Reproduction and Embryology (1996)
Consensus workshop on advanced diagnostic andrology. *Human Reproduction*, **11**: 1463-79.

Appendice XVIII

Tecniche di preparazione del liquido seminale

XVIII.1 Procedure

Vengono descritte diverse tecniche di preparazione del liquido seminale. Per tutte queste, il terreno di coltura deriva da una soluzione bilanciata di sali di Earle supplementata, sebbene possano essere usati altri terreni che consentano una vitalità ed una motilità degli spermatozoi per almeno 18 ore a 37 °C, come l'Ham's F-10 e l'Human tubal fluid (HTF).

XVIII.2 Swim-up

Un'aliquota di medium di Earle supplementato (1,2 ml) viene stratificato delicatamente sopra il liquido seminale (1 ml) in una provetta da centrifuga a fondo conico, sterile, da 15 ml. La provetta viene inclinata con un angolo di 45° ed incubata per un'ora a 37 °C. Essa viene quindi riportata in posizione verticale e viene prelevato 1 ml della parte superiore del suo contenuto. Questo volume, contenente spermatozoi mobili, viene quindi diluito con otto volumi di soluzione di Earle supplementata, centrifugata a 500 g per 5 minuti, ed infine il pellet risospeso in 0,5 ml di medium di Earle per la valutazione della concentrazione degli spermatozoi, della loro funzionalità o per qualsiasi altro scopo.

Costituenti del terreno di Earle supplementato

46 ml di soluzione bilanciata di sali di Earle
 4 ml di siero inattivato (56 °C per 20 minuti) del paziente
 1,5 mg di piruvato di sodio
 0,18 ml di lattato di sodio (soluzione al 60%)
 100 mg di bicarbonato di sodio

oppure

50 ml di soluzione bilanciata di sali di Earle
 300 mg di albumina sierica umana^a
 1,5 mg di piruvato di sodio
 0,18 ml di lattato di sodio (soluzione al 60%)
 100 mg di bicarbonato di sodio

^a Per le procedure di fecondazione assistita come la fertilizzazione *in vitro* (IVF), l'inseminazione artificiale, o il trasferimento gametico intratubarico, è indispensabile che l'albumina sierica umana sia altamente purificata e priva di forme virali, batteriche e di altre contaminazioni. Alcune preparazioni di albumina sono indicate per queste procedure (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA; Armour Pharmaceuticals, Eastbourne, United Kingdom).

XVIII.3 Gradiente di densità discontinuo

- (i) Pipettare 3 ml di Percoll all'80%, o prodotto analogo, in una provetta a fondo conico, sterile, da 15 ml.
- (ii) Deposare delicatamente 3 ml di Percoll al 40%, o prodotto analogo, sopra lo strato all'80%, avendo cura di non turbare la superficie di contatto tra i due strati.
- (iii) Deposare delicatamente 1-2 ml di sperma sopra al gradiente e centrifugare a 500 g per 20 minuti.
- (iv) Risospendere il pellet alla base della frazione all'80% in 5-10 ml di medium di Earle e centrifugare a 500 g per 5 minuti prima di risospendere in 1 ml di medium di Earle.
- (v) Valutare la concentrazione, la motilità e la funzionalità degli spermatozoi.

Si tenga presente che l'uso del Percoll non è più consentito per applicazioni cliniche sull'uomo. Sono comunque disponibili altri preparati adatti per l'impiego nella clinica umana, come il PureSperm (NidaCon Labs, Gothenburg, Svezia) o Isolate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Al momento, per queste tecniche sono disponibili solo le istruzioni dei produttori. Esistono poche pubblicazioni che comparano la loro efficienza con quella di altri sistemi di centrifugazione in gradienti di densità, sebbene alcuni clinici abbiano rilevato per esse un'efficacia simile a quelle che impiegano il Percoll (Perez *et al.*, 1997). Sia il PureSperm che l'Isolate sono isotonici; sono richieste diluizioni volumetriche (8+2 e 4+6). Il PureSperm è sciolto in medium tamponato con Hepes, per cui i gradienti devono essere ottenuti impiegando un medium tamponato con Hepes.

Costituenti del Percoll isotonico o di prodotti analoghi

10 ml di medium Earle concentrato 10x (es. Flow Laboratories)
 90 ml sostanza per gradiente di densità
 300 mg di albumina sierica umana
 3 mg di piruvato di sodio
 0,37 ml di lattato di sodio (soluzione al 60%)
 200 mg di bicarbonato di sodio

Costituenti del gradiente di densità 80%

40 ml di materiale isotonico
 10 ml di medium Earle supplementato

Costituenti del gradiente di densità 40%

20 ml di materiale isotonico
 30 ml di medium Earle supplementato

XVIII.4 Preparazione di campioni seminali deficitari

In casi di grave oligozoospermia e/o astenozoospermia, l'uso dei gradienti di densità è preferibile rispetto al metodo dello *swim-up*, perché permette un miglior recupero. Inoltre, la gradualità e la

composizione dei gradienti può essere variata per andare incontro alle specifiche necessità di un singolo campione. Ad esempio, si può trattare il campione con diversi minigradienti di densità (Mortimer, 1994b) contenenti solo volumi di 0,3 ml di materiale ai gradienti di densità 40% e 80%.

Bibliografia

Mortimer, D. (1994b) *Practical Laboratory Andrology*, p. 393, Oxford: Oxford University Press.

Perez, S.M., Chan, P.J., Patton, W.C. & King, A. (1997). Silane-coated silica particle colloid processing of human sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **14**: 388-93.

Appendice XIX

Procedure di controllo di qualità (QC)

XIX.1 Campioni per il test QC

I campioni per il controllo di qualità dovrebbero rappresentare l'intero campo di variazione dei campioni seminali trattati nel laboratorio. Se possono essere analizzati solo pochi campioni per il QC, questi devono essere scelti in modo da coprire il range clinicamente significativo dei parametri seminali (concentrazione 5×10^6 - 30×10^6 /ml, motilità 10-40% e morfologia normale inferiore al 20%). I centri che forniscono i campioni per la valutazione della qualità devono accertarsi che essi siano negativi per l'epatite e l'HIV.

XIX.2 Materiali per il controllo di qualità

Aliquote di pool di campioni seminali possono essere conservate congelate oppure mantenute liquide con conservanti (100 μ l di formalina al 10% per ogni ml di sperma) a 4 °C e testati periodicamente per la conta spermatica. Campioni crioconservati possono essere anche usati per il QC della mobilità. Per la motilità possono essere utilizzate anche videocassette, mentre per la morfologia possono essere impiegate fotografie, videocassette e strisci fissati su vetrino, colorati o no. Comunque, usando questi materiali si possono individuare alcuni problemi. La miscelazione del pool seminale può non essere appropriata, particolarmente. Le videocassette sono particolarmente utili per migliorare la propria esperienza nella valutazione della motilità e della morfologia. Il loro impiego nel QC, tuttavia, tende a portare ad una sovrastima nella valutazione, per cui non dovrebbe portare ad escludere l'esecuzione di controlli ripetuti sui campioni seminali. I vetrini colorati per la morfologia spermatica tendono a sbiadire, e gli strisci prefissati possono deteriorarsi. Gli spermatozoi possono non sopravvivere in maniera adeguata alla crioconservazione per poter costituire una forma utilizzabile di QC interno ed esterno per l'analisi della mobilità e degli anticorpi spermatozoari. Il siero positivo per gli anticorpi spermatozoari può essere utilizzato per il QC del test di immunobead indiretto, ma non è specifico per quello diretto. Per questo, un QC in cui tutte le procedure siano testate da un unico pool seminale non è attuabile.

XIX.3 Calibrazione del materiale

Le pipette possono essere calibrate pesando la quantità di acqua distillata raccolta con una e più pipettate, anche ripetendo la procedura, in modo da poter calcolare contemporaneamente l'accuratezza e la precisione. Se necessario, eseguire una correzione per l'effetto della temperatura sulla densità dell'acqua, es. a 20 °C 1 ml di acqua distillata pesa 0,9982 g. In alternativa, le micropipette possono essere calibrate diluendo una sostanza colorata che può essere misurata con precisione mediante uno spettrofotometro. La profondità della camera di conta può essere verificata con la scala di Vernier applicata alla messa a fuoco fine di un microscopio, mettendo a fuoco la griglia e successivamente una macchiolina di inchiostro, segnata sulla superficie inferiore del coprioggetto. Le misurazioni devono essere fatte in replicato (ad esempio, 10 volte). I risultati dovrebbero coincidere con il volume o la profondità prestabilita entro un errore di misurazione di ± 2 DS. Le bilance dovrebbero essere testate regolarmente con calibratori interni ed attraverso una calibrazione esterna durante il servizio di normale manutenzione del laboratorio. La temperatura degli incubatori e delle piastre riscaldate dovrebbe essere verificata con termometri sottoposti a calibrazione regolarmente. La miscela di gas dovrebbe essere controllata giornalmente con il display dell'incubatore, settimanalmente o mensilmente con il Fyrite o altri sistemi analoghi, e con il dosaggio del gas alla manutenzione. Il resto della strumentazione, come i pHmetri, ed i reagenti dovrebbero essere controllati con gli standard ad intervalli di 3-6 mesi.

XIX.4 Alcuni protocolli per il controllo di qualità esterno

AUSTRALIA – ASIA Fertility Society of Australia External Quality Assurance Schemes for Reproductive Medicine PO Box 1101 West Leederville Western Australia 6901, Australia	EUROPA UKNEQUAS Schemes for Andrology Department of Reproductive Medicine St. Mary's Hospital Whitworth Park Manchester M13 0JH, United Kingdom
SCANDINAVIA NAFA (Nordic Association for Andrology) Andrology Unit Reproductive Medicine Centre Karolinska Hospital PO Box 140 SE-171 76 Stockholm, Sweden	USA American Association of Bioanalysts Proficiency Testing Service 205 West Levee Brownsville Texas 78520-5596, USA

Nota: Programmi nazionali di controllo di qualità sono stati allestiti in Belgio, Olanda e Francia, e sono in fase di messa a punto in altri paesi.

Bibliografia

- Altman, D.G. (1991) *Practical Statistics for Medical Research*, London: Chapman and Hall.
- Barnett, R.N. (1979) *Clinical Laboratory Statistics*, 2nd ed. Boston: Little, Brown.

Appendice XX

Scheda di registrazione del punteggio dei campioni di muco cervicale e del post coital test

Data dell'ultimo ciclo mestruale	Giorno Mese Anno			
	_ _ _ _ _ _ _ _			
Punteggio giornaliero del muco cervicale				
Data	Giorno Mese	Giorno Mese	Giorno Mese	Giorno Mese
	_ _ _ _	_ _ _ _	_ _ _ _	_ _ _ _
Giorni del ciclo	_ _	_ _	_ _	_ _
Volume	_	_	_	_
Consistenza	_	_	_	_
<i>Ferning</i> (cristallizzazione)	_	_	_	_
<i>Spinnbarkeit</i> (filanza)	_	_	_	_
Cellularità	_	_	_	_
Punteggio totale	_ _	_ _	_ _	_ _
pH	_ , _	_ , _	_ , _	_ , _
Post coital test				
Data	Giorno Mese			
	_ _ _ _			
Tempo trascorso dal coito (ore)	_ _			
Spermatozoi/mm ³	Prelievo vaginale		Prelievo endocervicale	
	_ _ _ _		_ _ _ _	
Motilità (spermatozoi %)				
(a) Progressivi rapidi	_ _		_ _	
(b) Progressivi lenti	_ _		_ _	
(c) Non progressivi	_ _		_ _	
(d) Immobili	_ _		_ _	

Appendice XXI

Interazione liquido seminale-muco cervicale: il capillary tube test

Il capillary tube test è stato originariamente descritto da Kremer (1965). Esso misura la capacità degli spermatozoi di penetrare in una colonna di muco cervicale all'interno di un capillare. In seguito sono state proposte numerose varianti di questo test. La procedura che viene qui descritta si basa sul test originale messo a punto da Kremer, e che la maggior parte degli specialisti ha adottato.

XXI.1 Materiale

Diversi tipi di capillare possono essere impiegati, ma sono preferibili i capillari piatti, lunghi 5 cm, larghi 3 mm e dello spessore interno di 0,3 mm. Questi capillari possono essere richiesti a Camlab Ltd., Cambridge, United Kingdom.

Il misuratore della penetrazione spermatozoaria di Kremer (Fig. XXI.1) può essere costruito in laboratorio nel seguente modo:

- (i) Applicare su un vetrino tre coppette (R) di sezione semicircolare (raggio circa 3,5 mm).
- (ii) Un secondo vetrino deve essere poi incollato sul primo. Il secondo vetrino deve essere più corto di 1,5 cm rispetto al precedente, e deve essere posizionato a circa 5 mm dalle coppette.

Questa struttura impedisce al liquido seminale di interpersi tra i capillari e la superficie di vetro. Una scala centimetrata deve essere presente sul vetrino.

XXI.2 Metodo

E' necessario utilizzare liquido seminale fresco, non oltre un'ora dopo l'ejaculazione. Il muco cervicale viene aspirato dentro il capillare, facendo attenzione a non introdurre bolle d'aria. Un'estremità del capillare viene chiusa con plastilina, cera per modellare o altro, in modo che il muco non possa più fuoriuscire dall'altra estremità. L'estremità aperta del capillare viene quindi posizionata sul vetrino in modo che sia immersa per circa 0,5 cm nella coppetta contenente lo sperma. Durante il processo di penetrazione degli spermatozoi, il vetrino dovrebbe stare in una capsula di Petri chiusa, con spugna bagnata ai lati, in modo da mantenere una condizione di umidità che prevenga l'essiccamento del muco e dello sperma. Le misurazioni devono essere preferibilmente eseguite alla temperatura ambientale di 37 °C.

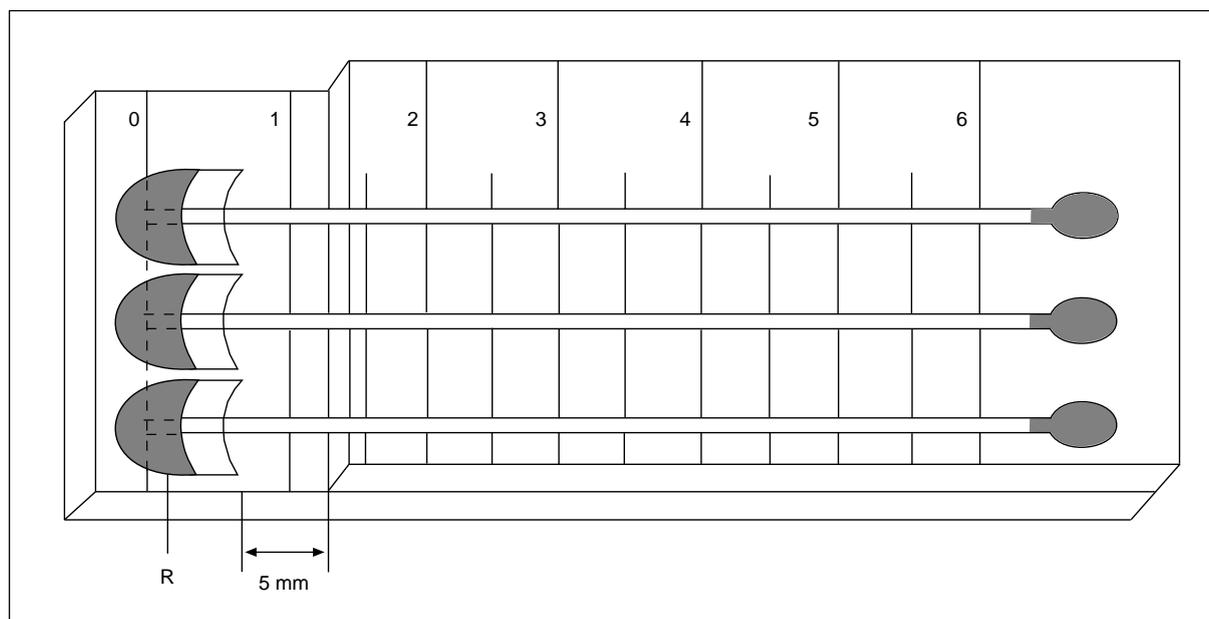


Fig. XXI.1. Il misuratore della penetrazione spermatozoaria di Kremer (vedi testo).

XXI.3 Valutazione del test

Dopo 2 ore, vengono valutate la distanza di migrazione, la densità di penetrazione, la riduzione di migrazione e la presenza di spermatozoi con motilità progressiva.

I capillari possono essere esaminati ancora dopo 24 ore, solo per verificare la presenza di spermatozoi con motilità progressiva.

Le variabili da valutare dopo due ore sono così definite:

XXI.3.1 Distanza di migrazione

La distanza tra l'estremità del capillare immersa nella coppetta e lo spermatozoo più avanzato.

XXI.3.2 Densità di penetrazione

Viene determinata alla distanza di 1 e 4,5 cm dall'estremità del capillare immersa nella coppetta. A ciascuna distanza viene determinato il numero medio di spermatozoi per campo a basso ingrandimento (10 x 10). Il numero medio si ottiene dal conteggio di cinque diversi campi adiacenti. La media dei conteggi viene espressa attraverso una delle classi di densità di penetrazione (vedi Tab. XXI.1). Per la classificazione del test viene registrata la più alta classe di densità di penetrazione.

XXI.3.3 Riduzione della migrazione

Indica la *diminuzione* della densità di migrazione a 4,5 cm raffrontata a quella a 1 cm. E' espressa come differenza del numero di coefficiente.

Esempi

1. La densità di penetrazione a 1 cm è 51-100 e a 4,5 cm è 6-10. La riduzione della migrazione è 3 (da coefficiente 6 a coefficiente 3; Tab. XXI.1).

Tabella XXI.1. Classi di densità di penetrazione

Classi di densità di penetrazione	Coefficiente
0	1
0-5	2
6-10	3
11-20	4
21-50	5
51-100	6
>100	7

2. La densità di penetrazione a 1 cm è 21-50 e a 4,5 cm è 51-100. La riduzione della migrazione è zero perché non c'è diminuzione della densità di migrazione.

XXI.3.4 *Durata della motilità progressiva*

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

I risultati sono classificati secondo la Tab. XXI.2.

Tabella XXI.2. Classificazione dei risultati del test

Distanza di migrazione (cm)	Densità di penetrazione (spermatozoi per campo a basso ingrandimento)	Riduzione della migrazione da 1 a 4,5 cm (diminuzione di coefficiente)	Durata della motilità progressiva nel muco cervicale (ore)	Classificazione
1 <3 oppure	0 <10 oppure	- >3 oppure	- 2	Negativo Debole Dubbio
4,5 e	>50 e	<3 e	>24	Positivo

Tutte le combinazioni di risultati che non possono essere classificate come: negativo, debole, positivo

Bibliografia

Kremer, J. (1965) A simple penetration test. *International Journal of Fertility*, **10**: 209-15.

Appendice XXII

Requisiti di base per il laboratorio di andrologia

La lista che segue rappresenta l'occorrente e la strumentazione che dovrebbe permettere ad un laboratorio di esplicitare la funzione di un laboratorio di andrologia e di eseguire i test di base illustrati in questo manuale. Ovviamente devono essere disponibili un frigorifero, una centrifuga ed un incubatore.

A. Sicurezza nel laboratorio di andrologia

1. Guanti di gomma
2. Mascherine per il viso
3. Teli da laboratorio
4. Ipoclorito di sodio, 5,25 g/l (varechina diluita 1:10 con acqua)
5. Occhiali protettivi di sicurezza
6. Kit di pronto soccorso
7. Soluzione per lavaggio oculare
8. Doccia (facoltativo)
9. Contenitore per oggetti taglienti

B. Analisi seminale

1. *Manuale di laboratorio della WHO per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale* (quarta edizione).
2. Moduli di registrazione per lo spermioγραμμα.
3. Recipienti ad ampia apertura con tappo. Essi dovrebbero essere testati per la presenza di eventuali effetti tossici sugli spermatozoi, nel seguente modo:
 - (i) selezionare campioni seminali con alta concentrazione di spermatozoi e buona motilità;
 - (ii) dividere ciascun campione seminale e porne metà in un contenitore di vetro di provata non-tossicità (controllo) e l'altra metà nel contenitore da testare;
 - (iii) valutare la motilità e la vitalità degli spermatozoi ad ogni ora per 4 ore;
 - (iv) ripetere (i) – (iii) per diversi campioni. Se non si rilevano differenze tra le valutazioni nei controlli e nei test, i contenitori possono essere considerati essere non-tossici.

4. Pipette Pasteur con tettarella di lattice o pipette monouso di plastica.
5. Pipettatrice automatica (Eppendorf, Oxford, FinnpiPET, Pipetman, reperibili presso i migliori fornitori).
6. Pipetta di precisione per misurare 50 μ l, come la Wiretrol II W-100 (Drummond Scientific Co., 500 Parkway, Bromhall, PA 19008, USA); e la SMI Digital Adjust Micro/Pettor Model P5068-20D per volumi da 20 μ l a 100 μ l (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 n° 02-670-13) e l' "Assistant" (Karl Willers, Laborbedarf D48151 Munster, Germania).
8. Emocitometro (Neubauer perfezionato).
9. Piatto riscaldante (da banco).
10. Agitatore vortex.
11. Microscopio a contrasto di fase, con obiettivi x10, x20, x40; x100 ad immersione ed oculari x10 a campo largo. Il microscopio dovrebbe essere periodicamente controllato per assicurare che gli anelli di fase siano disposti per una resa ottimale.
12. Lampada da 50 watt.
13. Vetrini da microscopio.
14. Controllo di qualità idoneo.

C. Interazione sperma-muco cervicale

1. Moduli per la registrazione del punteggio.
2. Siringa per il prelievo del muco, come l'Aspiglaire (BICEF, l'Aigle, Francia).
3. Tubi capillari di vetro per l'esecuzione del capillary tube test, larghi 3 mm, profondi 0,3 mm e lunghi 5 cm (Camlab Ltd. Cambridge, Gran Bretagna).

D. Reagenti per i test immunobead e MAR

Vedi le Appendici VIII e IX.

E. Reagenti per la morfologia spermatozoaria

Vedi le Appendici da III a VII.

F. Grafici

Figure 2.3 e 2.6 di questo manuale da esporre nel laboratorio.

Fig. 2.3. Range dell'intervallo di confidenza approssimato al 95% per differenze tra due percentuali determinate da conteggi in doppio di 100, 200 e 400 spermatozoi. Per la valutazione delle percentuali da due conteggi di 200 calcolare la loro media e differenza. Se la differenza è maggiore di quanto indicato dalla curva $N = 200$, il campione deve essere analizzato nuovamente. La curva inferiore mostra l'aumento della precisione per due valutazioni di 400 spermatozoi ($N = 400$). Per un risultato medio del 5%, l'intervallo di confidenza al 95% è 3%. L'ampio errore statistico di conteggio associato alla conta di soli 100 spermatozoi è visibile nella parte alta della curva ($N = 100$). Per un risultato atteso del 5% due singoli conteggi di 100 spermatozoi possono dare 3% e 9% solo per effetto del caso.

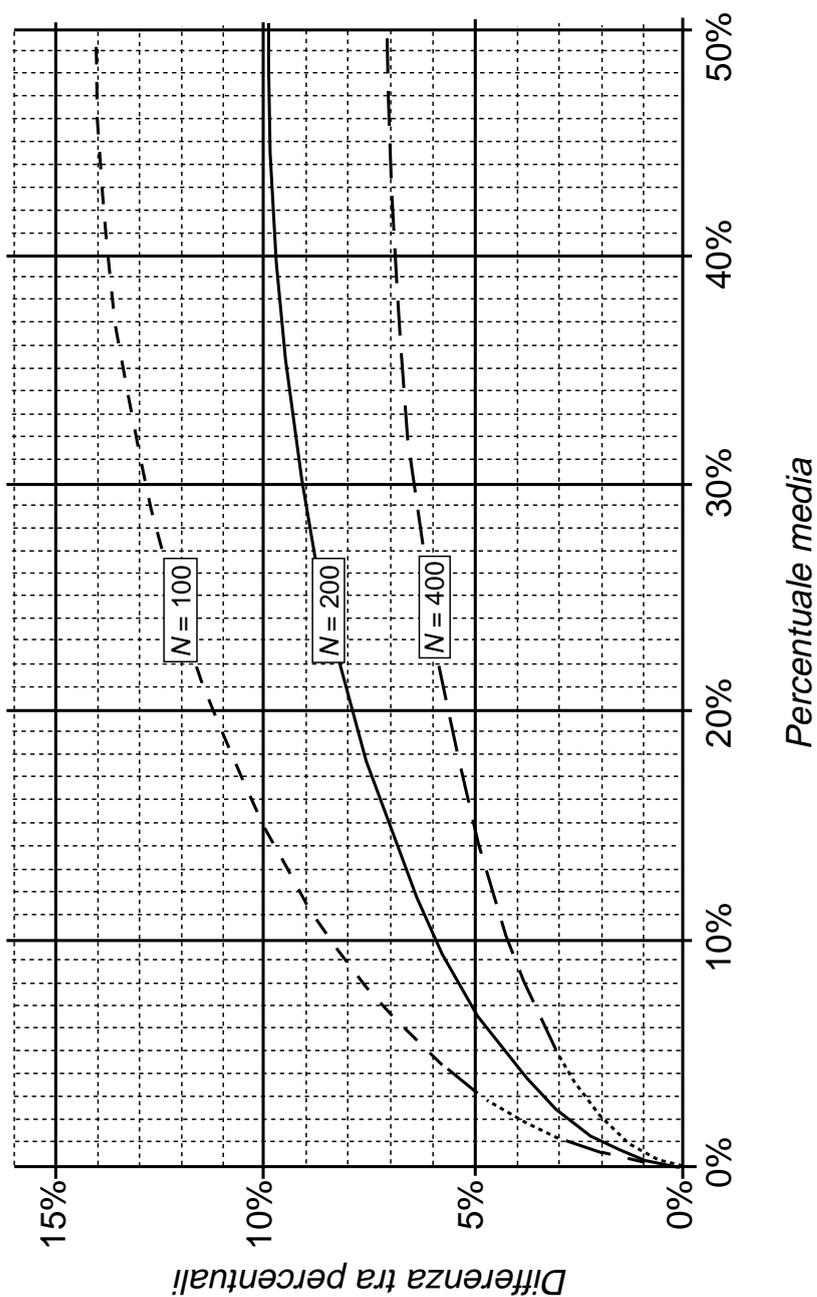
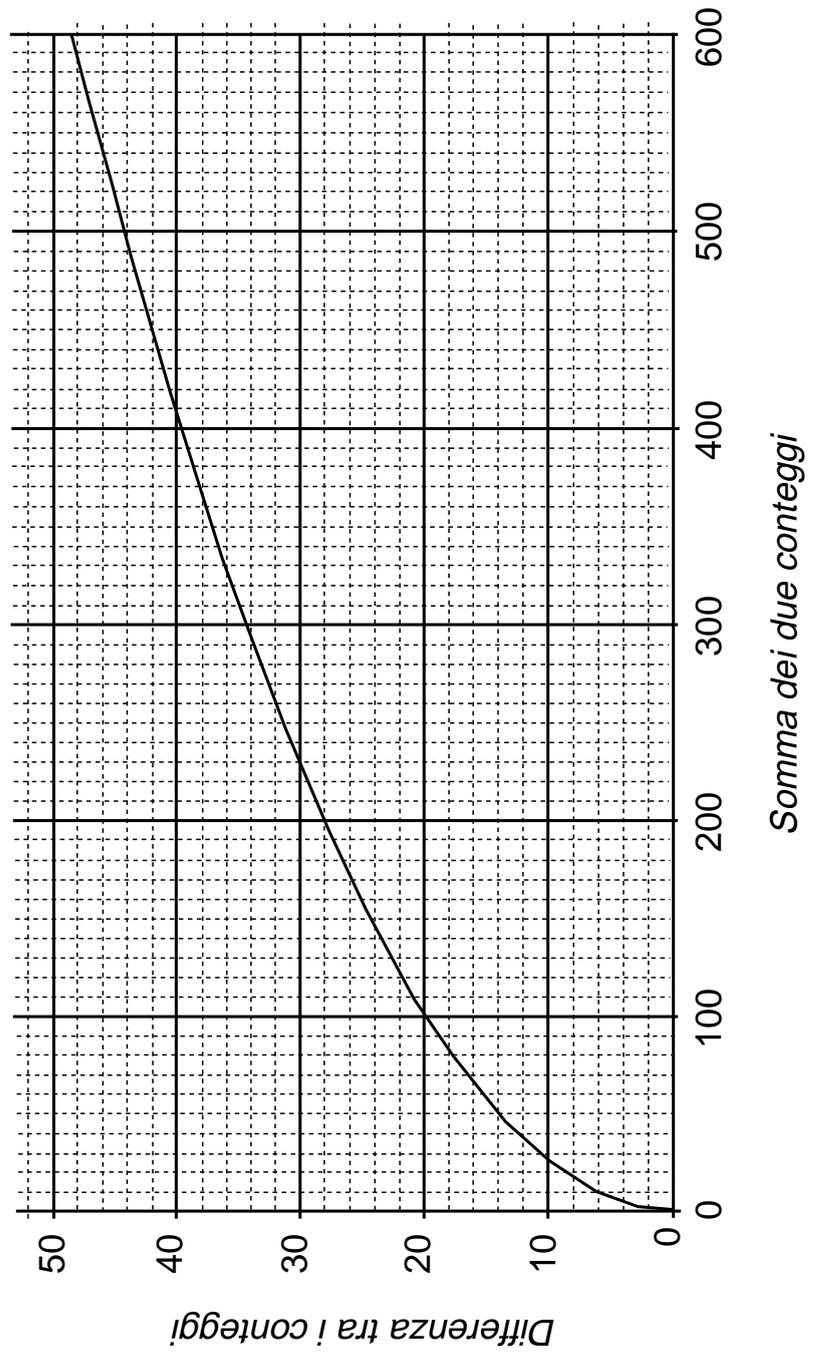


Fig. 2.6. Range dell'intervallo di confidenza approssimato al 95% per differenze tra due conteggi. Per verificare questi conteggi calcolare la loro somma e differenza. Se la differenza è maggiore di quella indicata dalla curva, è possibile la presenza di un errore sistematico (vedi Capitolo 4) per cui il campione deve essere analizzato nuovamente. È visibile l'ampio errore statistico di conteggio associato alla conta di meno di 200 spermatozoi. Ad esempio, per una conta media di 60 spermatozoi (somma 120), le due conte potrebbero essere 50 e 70 solo per effetto del caso.



Bibliografia

L'asterisco indica 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. & 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.
- Aitken, R.J. & Brindle, J.P. (1993) Analysis of the ability of three probes targeting the outer acrosomal membrane or acrosomal contents to detect the acrosome reaction in human spermatozoa. *Human Reproduction*, **8**: 1663-9.
- Aitken, R.J., Buckingham, D.W. & Huang, G.E. (1993) Analysis of the response of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *Journal of Andrology*, **14**: 132-41.
- Aitken, R.J., Buckingham, D.W., Harkiss, D., Paterson, M., Fisher, H. & Irvine, D.S. (1996) The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **117**: 83-93.
- Altman, D.G. (1991) *Practical Statistics for Medical Research*. London: Chapman and Hall.
- 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.
- Aziz, N., Buchan, I., Taylor, C., Kingland, C.R. & Lewis-Jones, I. (1996) The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, **66**: 1000-8.
- Barnett, R.N. (1979) *Clinical Laboratory Statistics*, 2nd ed. Boston: Little, Brown.
- Barratt, C.L.R., Dunphy, B.C., McLeod, I. & Cooke, I.D. (1992) The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface bound antibodies. *Human Reproduction*, **7**: 95-8.
- Barratt, C.L.R., Tomlinson, M.J. & Cooke, I.D. (1993) Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertility and Sterility*, **60**: 1069-75.
- Blackmore, P.E., Beebe, S.J., Danforth, D.R. & Alexander, N. (1990) Progesterone and 17-hydroxyprogesterone: novel stimulators of calcium influx in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 1376-80.
- Bland, J.M. & Altman, D.G. (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, **i**: 307-10.
- Bronson, R.A., Cooper, G.W. & 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. & Rosenfeld, D. (1984) Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility*, **42**: 171-83.

- Burkman, L.J., Kruger, T.E., 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.
- Canale, D., Giorgi, M., Gasperini, M., Pucci, E., Barletta, D., Gasperi, M. & Martino, E. (1994) Inter and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different techniques: layering, swimup from pellet and Percoll. *Journal of Endocrinological Investigation*, **17**: 729-32.
- Clarke, G.N., Stojanoff, A. & Cauchi, M.N. (1982) Immunoglobulin class of spermbound antibodies in semen. In *Immunology of Reproduction*, ed. K. Bratanov, pp. 482-5. Sofia, Bulgaria: Bulgarian Academy of Sciences Pres.
- Clarke, G.N., Elliott, E.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.
- Clements, S., Cooke, I.D. & Barratt, C.L.R. (1995) Implementing comprehensive quality control in the andrology laboratory. *Human Reproduction*, **10**: 2096-106.
- Comhaire, E., Verschraegen, G. & Vermeulen, L. (1980) Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. *International Journal of Andrology*, **3**: 32-45.
- 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.
- Cooper, T.G., Neuwinger, J., Bahrs, S. & Nieschlag, E. (1992) Internal quality control of semen analysis. *Fertility and Sterility*, **58**: 172-8.
- *Cross, N.L. (1995) Methods for evaluating the acrosomal status of human sperm. In *Human Sperm Acrosome Reaction*, ed. P. Fenichel & J. Parinaud, pp. 277-85. (Colloques INSERM) John Libbey Eurotext.
- Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W. & Hanson, E.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. & Gravance, C.G. (1993) Standardization of specimen preparation, staining and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertility and Sterility*, **59**: 412-17.
- *De Jonge, C.J. (1994) The diagnostic significance of the induced acrosome reaction. *Reproductive Medicine Review*, **3**: 159-78.
- Drevious, L. & Eriksson, H. (1966) Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research*, **42**: 136-56.
- 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.
- 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.
- Eggert-Kruse, W., Leinhos, G., Gerhard, I., Tilgen, W. & Runnebaum, B. (1989) Prognostic value of in vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus. *Fertility and Sterility*, **51**: 317-23.
- Eggert-Kruse, W., Uhler, A., Rohr, G. & Runnebaum, B. (1993) The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertility and Sterility*, **59**: 617-28.
- *Eliasson, R. (1971) Standards for investigation of human semen. *Andrologia*, **3**: 49-64.
- *Eliasson, R. (1981) Analysis of semen. In: Burger, H. & de Kretser, D. ed. *The Testis*. New York. Raven Press, pp. 381-99.
- Enginsu, M.E., Dumoulin, C.J.M., Pieters, M.H.E.C., Bras, M., Evers, J.L.H. & Geraedts, J.P. M. (1991) Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Human Reproduction*, **6**: 854-8.
- European Society of Human Reproduction and Embryology (1996) Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. *Human Reproduction*, **11**: 1463-79.
- Fenichel, P., Hsi, B.L., Farahifar, D., Donzeau, M., Barrier-Delpech, D. & Yehy, C.J. (1989) Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence activated cell sorter. *Journal of Reproduction and Fertility*, **87**: 699-706.

- Franken, D.R., Oehinger, S., Burkman, L.J., Coddington, C.C., Kruger, T.E., Rosenwaks, Z., Acosta, A.A. & Hodgen, G.D. (1989) The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in in vitro fertilization (IVF) treatment. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, **6**: 44-50.
- Fredricsson, B. & Bjork, R. (1977) Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertility and Sterility*, **28**: 841.
- Garrett, C. & Baker, H.W.G. (1995) A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertility and Sterility*, **63**: 1306-17.
- Garrett, C., Liu, D.Y. & Baker, H.W.G. (1997) Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. *Fertility and Sterility*, **67**: 362-71.
- 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**: 883-7.
- Gomez, E., Buckingham, D.W., Brindle, J., Lanzafame, E., Irvine, D.S. & Aitken, R.J. (1996) Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology*, **17**: 276-87.
- *Griveau, J.E. & LeLannou, D. (1997) Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*, **20**: 61-9.
- Gruber, W. & Möllering, H. (1966) Determination of citrate with citrate lyase. *Analytical Biochemistry*, **17**: 369-76.
- Heite, H.-J. & Wetterauer, W. (1979) Acid phosphatase in seminal fluid: method of estimation and diagnostic significance. *Andrologia*, **11**: 113-22.
- 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.
- Henley, N., Baron, C. & Roberts, K.D. (1994) Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *International Journal of Andrology*, **17**: 78-84.
- Inslar, V., Melmed, H., Eichenbrenner, L., 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**: 223-8.
- Irvine, D.S., Macleod, I.C., Templeton, A.A., Masterton, A. & Taylor, A. (1994) A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Human Reproduction*, **9**: 2324-34.
- Iwasaki, A. & Gagnon, C. (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*, **57**: 2409-16.
- 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.
- Johnson, D.E., Confino, E. & Jeyendran, R.S. (1996) Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples. *Fertility and Sterility*, **66**: 459-62.
- Jones, R., Mann, T. & Sherins, R. (1979) Peroxidative breakdown of phospholipids by human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, **31**: 531-7.
- Jouannet, E., Ducot, B., Feneux, D. & Spira, A. (1988) Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. 1. Study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*, **11**: 379-94.
- Katz, D.E., 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.
- 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.
- Kobayashi, T., Jinno, M., Sugimura, K., Nozaxva, S., Sugiyama, T. & Lida, E. (1991) Sperm morphological assessment based on strict criteria and in vitro fertilization outcome. *Human Reproduction*, **6**: 983-6.

- Krause, W. (1995) Computer-assisted sperm analysis system: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Human Reproduction*, **10**: suppl. 1. 60-6.
- 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.
- Kruger, T.E., Menkveld, R., Slander, F.S.H., Lombard, C.J., Van der Merwe, J.P., Van Zyl, J.A. & Smith, K. (1936). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, **46**: 1118-23.
- Kruger, T.F., Ackerman, S.B., Simmons, K.F., Swanson, R.I., Brugo, S.S. & Acosta, A.A. (1987) A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of Andrology*, **18**: 275-7.
- Kruger, T.E., Acosta, A.A., Simmons, K.E., Swanson, R.I., Matta, J.E. & Oehninger, S. (1988) Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, **49**: 112-17.
- Kruger, T.F., Oehninger, S., Franken, D.R. & Hodgen, G.D. (1991) Hemizona assay: use of fresh versus salt-stored human oocytes to evaluate sperm binding potential to the zona pellucida. *Journal of In-vitro Fertilization and Embryo Transfer*, **8**: 154-6.
- Kruger, T.F., Franken, D.R. & Menkveld, R. (1993) *The Self Teaching Programme for Strict Sperm Morphology*. Bellville. South Africa: MQ Medical.
- Kruger, T.F., du Toit, T.C., Franken, D.R., Menkveld, R. & Lombard, C.J. (1995) Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fertility and Sterility*, **63**: 134-41.
- Kruger, T.F., Lacquet, F.A., Sarmiento, C.A.S., Menkveld, R., Ozgur, K., Lombard, C.J. & Franken, D.R. (1996) A prospective study on the predictive value of normal sperm morphology evaluated by computer (IVOS). *Fertility and Sterility*, **66**: 285-91.
- Liu, D.Y. & Baker, H.W.G. (1992) Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, **94**: 71-84.
- Liu, D.Y., Lopata, A., Johnston, W.I.H. & 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, G.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*, **52**: 281-7.
- Makler, A. (1980). The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertility and Sterility*, **33**: 337-8.
- Matson, P.L. (1995) External quality control assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Human Reproduction*, **10**: 620-5.
- Mearns, E.M. & Stamey, T.A. (1972) The diagnosis and management of bacterial prostatitis. *British Journal of Urology*, **44**: 175-9.
- Menkveld, R. & Kruger, T.F. (1996). Evaluation of sperm morphology by light microscopy. In *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*, ed. A.A. Acosta & T.F. Kruger, pp. 89-107, 2nd ed. Parthenon Publishing Group.
- Menkveld, R., Stander, F.S.H., Kotze, T.J.V.W., Kruger, T.F. & van Zyl, J.A. (1990) The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, **5**: 586-92.
- Meschede, D., Keck, C., Zander, M., Cooper, T.G., Yeung, C.H. & Nieschlag, E. (1993) Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *International Journal of Andrology*, **16**: 362-9.
- Moghissi, K.S. (1976) Post-coital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*, **27**: 117-29.
- *Mortimer, D. (1994a) Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review*, **3**: 97-111.
- *Mortimer, D. (1994b) *Practical Laboratory Andrology*. Oxford. Oxford University Press.
- 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., 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., Shu, M.A., Tan, R. & Mortimer, S.T. (1989) A technical note on diluting semen for the haemocytometric determination of sperm concentration. *Human Reproduction*, **4**: 166-8.
- Mortimer, D., Mortimer, S.T., Shu, M.A. & Swart, R. (1990) A simplified approach to sperm-cervical mucus interaction testing using a hyaluronate migration test. *Human Reproduction*, **5**: 835-41.

- Mortimer, D., Aitken, R.J., Mortimer, S.T. & Pacey, A.A. (1995) Workshop report: clinical CASA - the quest for consensus. *Reproduction, Fertility and Development*, **7**: 951-9.
- 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.R. & Hodgen, G.D. (1989) Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in-vitro fertilization outcome. *Fertility and Sterility*, **51**: 665-70.
- Oei, S.G., Helmerhorst, F.M. & Keirse, M.J.N. (1995) When is the post-coital test normal? A critical appraisal. *Human Reproduction*, **10**: 1711-14.
- *Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T.F. & Steeno, O. (1995). Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Human Reproduction*, **1**: 543-57.
- Purvis, K. & Christiansen, E. (1993) Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *International Journal of Andrology*, **16**: 1-13.
- 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.
- Rhemrev, J., Jeyendran, R.S., Vermeiden, J.P.W. & Zaneveld, L.J.D. (1989) Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*, **51**: 685-90.
- Sbracia, M., Sayme, N., Grasso, J., Vigue, L. & Huszar, G. (1996) Sperm function and choice of preparation media: comparison of Percoll and Accudenz discontinuous density gradients. *Journal of Andrology*, **17**: 61-7.
- 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.
- Smith, R., Vantman, D., Ponce, J., Escobar, J. & Lissi, E. (1996) Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction*, **11**: 1655-60.
- Tomlinson, M.J., Barratt, C.L., Bolton, A.E., Lenton, E.A., Roberts, H.B. & Cooke, I.D. (1992) Round cells and sperm fertilizing capacity: the presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, **58**: 1257-9.
- Tomlinson, M.J., Barratt, C.L.R. & Cooke, I.D. (1993) Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertility and Sterility*, **60**: 1069-75.
- von den Kammer, H., Scheit, K.H., Weidner, W. & Cooper, T.G. (1991) The evaluation of markers of prostatic function. *Urological Research*, **19**: 343-7.
- 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*. pp. 1-123. Geneva: World Health Organization.
- 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 (1993) *Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple*. Cambridge: Cambridge University Press.
- 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.
- World Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility (1996) Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertility and Sterility*, **65**: 821-9.
- 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.
- Yeung, C.H., Cooper, T.G. & Nieschlag, E. (1997) A technique for standardisation and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis. *Fertility and Sterility*, **67**: 1156-8.
- de Ziegler, D., Cedars, M.I., Hamilton, E., Moreno, T. & Meldrum, D.R. (1987) Factors influencing maintenance of sperm motility during in vitro processing. *Fertility and Sterility*, **48**: 816-20.
- Zinaman, N.I.J., Uhler, M.L., Vertuno, E., Fisher, S.G. & Clegg, E.D. (1996) Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*, **17**: 288-92.

Indice analitico

- A23187, *vedi* ionoforo del calcio
 abbigliamento protettivo 62
 accuratezza 35
 acido citrico 28
 acrosoma 18, 20
 acrosomiale, reazione dopo
 prova con ionoforo (ARIC) 100-101
 valutazione 31, 100-101
 agenti infettivi, misure di sicurezza 6, 62-63
 agglutinazione spermatozoi 13
 aggregazione spermatozoi 13
 analisi seminale computerizzata (CASA)
 28-29, 89-92
 analisi statistica 91-92
 morfologia 32
 preparazione campione 89-90
 settaggio parametri 89
 terminologia 90-91
 uso dello strumento 90
 anticorpi spermatozoari 22-26
 test semplificato su vetrino 57
 antiossidanti, sistemi 30
 aspermia 61
 aspetto, liquido seminale 6-7
 astenozoospermia 61
 astinenza sessuale 4
 attrezzatura
 calibrazione 106
 requisiti di base 111-112
 azoospermia 61
- bias (errore sistematico) 36
 bilancia, calibrazione 106
 Blom, tecnica modificata
 (eosina-nigrosina) 67-68
 bromelina 6
 Bryan-Leishman, colorazione 12
- camera di conta 14, 16, 90
 calibrazione 106
 vedi anche emocitometro
 capillary tube test 108-110, 112
- L-carnitina 28
 CASA, *vedi* analisi seminale computerizzata
 castanospermina 85
 CD45, anticorpo monoclonale 12, 65
 cellule
 conteggio 12-13
 epiteliali desquamate 11
 germinali immature 11, 20, 26
 nel muco cervicale 54
 nello sperma (non spermatozoi) 10-13, 26
 vedi anche leucociti
 centrifugazione dello sperma 9, 17
 chemioluminescenza, radicali ossigeno 97-99
 citometria a flusso 31
coitus interruptus 5
 concentrazione spermatozoaria 59
 conta preliminare 8-9
 controllo di qualità 38-45, 105
 errori di conteggio 36
 valutazione 14-16
 contatore di cellule 27, 112
 conteggio
 cellule non spermatozoarie 12-13
 differenze tra due 15, 114
 errore statistico 15, 36-37
 morfologia spermatica 21-22
 spermatozoi 14-16
 contraccezione maschile 1
 controllo di qualità (QC) 28-29, 35-49
 approccio pratico 38-45
 calibrazione degli strumenti 105-106
 campioni di controllo 105
 controllo routinario 38-39
 correlazioni intra-test 38-39
 importanza 37-38
 limiti, *vedi* limiti di controllo
 materiale necessario 105
 monitoraggio medie mensili 45-48
 procedure 105-106
 risposta a risultati esterni 47-48

- tabelle 40-48
 variabilità intra- e inter-operatore 39-47
 controllo di qualità esterno (EQC) 35, 37-38, 48-49
 protocolli 106
 controllo di qualità interno (IQC) 35, 37-38
 concentrazione spermatozoi 40-43
 mensile 45-48
 motilità e morfologia 43-44
 procedure 105-106
 risposta a risultati fuori controllo 47-48
 settimanale 39-44
 creatina-fosfochinasi 30
 cristallizzazione (*ferning*) 50-51, 54
 crioconservazione spermatozoi 105
- deviazione standard (S_{bar}) 40-41, 43-44
 Diff-Quik, colorazione 18, 75
 digestione enzimatica, sperma 6
 disinfezione 64
 Dulbecco, soluzione salina bilanciata (PBS) 66
- EA-50 71
 Earl's medium supplementato 102
 ematossilina di Harris 72
 emizona test 31
 emocitometro 13-16, 36
 eosina, test di esclusione 67
 eosina-nigrosina (Blom) test di esclusione 67-68
 epatite B, virus (HBV) 62
 epididimo, funzione secretoria 28, 84-86
 errore quadratico medio 45-47
 errore standard 36-37
 tra operatori 45-46
 errori
 misurazione 35-38
 nelle analisi seminali 36-37
 random 35
 sistematico (bias) 35-36
 esclusione del colorante, test 13, 67-68
 estrogeni 50
 etanolo acido, soluzione 73
 etinil-estradiolo 52
- feathering*, tecnica 16-17
ferning (cristallizzazione) 50-51, 54
 filanza (*spinnbarkeit*) 50, 54
 FMLP, test di provocazione 97, 98
 forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) 97-98
 fosfatasi acida 28
 fosfatasi alcalina
 complesso APAAP 66
 substrato 65
 fruttosio seminale 28, 82-83
 F-test 45, 47
- ghiandole accessorie maschili
 test biochimici di funzionalità 28, 80-86
 infezioni 10, 27
 globozoospermia 20
- α -glucosidasi neutra 28, 84-86
 gocce citoplasmatiche 18-20
 gradiente di densità
 preparazione liquido seminale 33-34, 103
 grafici illustrativi da laboratorio 113-114
 guanti 62
- Hamilton Thorne, sistema CASA 89-90
 hamster test, oociti zona-free 29, 33, 93-96
 con ionoforo del calcio (A23187) 94-95
 controllo di qualità 96
 protocollo standard 93-94
 Hobson Tracker, sistema CASA 89-90
- IgA, anticorpi spermatozoari 22-24
 IgG, anticorpi spermatozoari 22-24
 IgM, anticorpi spermatozoari 22
 immunobead test 22-24, 76-78
 controlli 78
 controllo di qualità 105
 indiretto 77-78
 procedura 76-77
 reagenti 76
 valori di riferimento 59
- immunocitochimica, leucociti 10, 12, 65-66
 immunodeficienza umana, virus (HIV) 62
 indice di anomalie multiple (MAI) 25
 indice di malformazione spermatozoi (SDI) 26-27
 indice di teratozoospermia (TZI) 25-27
 infertilità maschile, terapia 1
 infezioni ghiandole accessorie 10, 27
 interazione spermatozoo/muco cervicale 50-52, 55-58
 strumentazione di base 111-112
 test *in vitro* 57, 108-113
 test *in vivo*, *vedi* post coital test
 intervalli di confidenza 35-36
 ionoforo del calcio (A23187)
 in test di reazione acrosomiale 30-31, 100-101
 in hamster test 29, 94-96
 ipospermatogenesi 12
 Isolate 103
 istruzioni al paziente
 post coital test 55
 raccolta liquido seminale 87
- Kremer, misuratore di penetrazione 108-110
- laboratorio
 controllo di qualità 35-49
 grafici illustrativi 113-114
 norme di sicurezza 62-63
 requisiti di base 111-114
 variabilità, *vedi* controllo di qualità esterno
 lame usa e getta 62
 lana di vetro, colonne 34
 lectina, con marcatura fluorescente 31

- leucociti
 - FMLP, test di provocazione 97-98
 - liquido seminale 10-11, 26, 60
 - conteggio 12-13
 - metodi di ricerca 10-12, 64-66
 - preparazione 66
 - mucos cervicale 54-55
- leucospermia 10
- limiti di controllo
 - azione 40-45
 - mensili 45-48
 - risultati esterni 47-49
 - soglia attenzione 40-45
 - tabella settimanale 40-45
- liquefazione, sperma 6
- lucigenina 97
- luminol 97

- Makler, camera 16
- mani, lavaggio 63
- MAR (mixed antiglobulin reaction) 22, 24, 60, 79
- mascherina chirurgica 62
- medie, *vedi* X_{bar}
- medium BWW 93
- microbiologici, test
 - in leucospermia 10-11
 - sperma 27-28
- Microcell, camera di conteggio 16, 90
- microscopia, sperma 7-22
- microscopio
 - contrasto di fase 7-8, 112
 - ottico 8
- misurazioni ripetute 40
- moduli dati
 - analisi seminale 87-88
 - mucos cervicale/post coital test 107
- morfologia spermatozoaria 16-21, 60
 - analisi computerizzata 32
 - classificazione 18-21
 - conteggio 21-22
 - controllo di qualità 39, 43-45, 105
 - errori di conteggio 36-38
 - indice di difetti multipli 27-28
 - metodi di colorazione 17-18, 70-75
 - preparazione strisci 16-17
- motilità spermatozoaria 60
 - analisi computerizzata (CASA) 29, 89-92
 - controllo di qualità 39, 43-45, 105
 - errori di conteggio 36-37
 - post coital test 55
 - valutazione 9-10
- mucina, cervicale 50
- mucos cervicale 50-58
 - cellularità 54
 - conservazione 53
 - consistenza 50, 53
 - donatrice, per test *in vitro* 57
 - modulo raccolta dati 107
 - penetrazione/sopravvivenza spermatozoi 50-52
 - pH 53, 55
 - raccolta 52-53
 - spinbarkeit* (filanza) 50, 54
 - surrogati 57
 - valutazione 53-55
 - volume 53
- Neubauer, emocitometro 14-15, 112
- p*-nitrofenolo glicopiranoside (PNPG) 84
- normozoospermia 61
- oligoastenoteratozoospermia 61
- oligozoospermia 61
- oociti
 - umani conservati 30
 - zona-free di hamster 93-94, 96
- operatori
 - valutazione dell'inter-variabilità 37, 39-47
 - valutazione dell'intra-variabilità 37, 39-45
- Orange G6 72
- orto-toluidina 64
- ostruzione dotto eiaculatore 7, 28

- Papanicolaou, colorazione per spermatozoi 17-18, 70-73
- percentuali, differenze tra due 10-11, 113
- Percoll, gradienti 33-34, 103
- perossidasi, tecnica 10, 64
- perossidasi di rafano 97
- pH
 - mucos cervicale 53, 55
 - sperma 7, 59
- pinhead*, malformazione 21
- pipette 8, 14, 112
 - calibrazione 105-106
 - sicurezza 63
- plasma seminale
 - falangi 57-58
 - separazione spermatozoi 33-34, 102-104
 - test biochimici 12, 80-86
- Poisson, distribuzione 36
- post coital test 53, 55-56
 - campione di mucos cervicale 56
 - interpretazione 56
 - istruzione ai pazienti 55
 - pool* di campioni vaginali 56
 - ripetizione 56
 - scheda raccolta dati 107
 - tecnica 56
 - timing* 55
- precisione 35
 - valutazione 37
- preparazione del liquido seminale 33-34, 102-104
 - gradiente di densità discontinuo 33-34, 103
 - campioni di bassa qualità 103-104
 - metodo dello *swim-up* 33, 102
- profilattici 5
- progesterone 32, 50, 100
- prostata, funzione secretoria 28
- PureSperm 103

- radicali ossigeno (ROS) 30, 97-99
- recipiente di raccolta sperma 5, 108
- riproducibilità 37
- round cells* 10-12

- sangue, trattamento di sicurezza 62-63
- scheda di controllo
 - R_{bar} 42
 - S 40, 42-44
 - X_{bar} 40-48

- Scott, soluzione 73
 secreto prostatico, test microbiologici 10
 Sertoli, cellule 12
 Shorr, colorante 18, 25, 74
 sicurezza
 equipaggiamento 111
 norme 6, 62-63
 somma cumulativa, tabella (CUSUM) 45
 sperma
 anticorpi spermatozoari, test 28
 aspetto 6-7
 cellule (non spermatozoi) 10, 12
 centrifugazione 9, 17
 coltura 28
 decremento della qualità 1
 donatore, per test *in vitro* 57
 liquefazione 6
 manipolazione di sicurezza 6, 62-63
 omogeneità 9
 osservazione macroscopica 6-7
 osservazione microscopica
 iniziale 7-13
 successiva 13-22
 pH 7, 59
 raccolta e consegna 2-6, 87
 striscio 16-17
 tecniche di preparazione 33-34, 102-104
 terminologia delle variabili 61
 test microbiologici 12-13
 viscosità 7
 volume 7, 59
 spermatidi 11, 20, 26
 spermatociti 11
 spermatogoni 11
 spermatozoo
 agglutinazione 13
 anomalie del collo e tratto intermedio 20
 anomalie della coda 20
 crioconservazione 105
 residui citoplasmatici 18-21
 lunghezza e larghezza 18
 numero totale 59
 regione acrosomiale 18-19
 test funzionali 30-32
 spermioγραμμα
 errori 36-37
 modulo registrazione dati 87-88
 procedure standard 4-24
 routine 7-8
 strumentazione di laboratorio 111-112
 test aggiuntivi 27-29
 test scientifici 30-32
 valori di riferimento 59-60
spinnbarkeit (filanza) 50, 54
 striscio di sperma 16-17
 swelling iposmotico, test (HOS) 28, 68-69
swim-up, tecnica 33, 102
 tampone fosfato (PBS) 65
 temperatura di esecuzione spermioγραμμα 8
 teratozoospermia 61
 test su vetrino, semplificato 57
 testa spermatozoaria
 malformazioni 18-21
 normale morfologia 18
 Tris, tampone (TBS) 65
 trypan blue 14
 urina, test microbiologici 10
 valori di allarme 38
 varianza, analisi a due vie 43, 45, 47
 varicocele 12
 vasi deferenti, agenesia bilaterale congenita 7, 28
 vescichette seminali, funzione secretoria 28
 violetto di genziana 14
 viscosità sperma 7
 vitalità, test 13-14, 31, 60, 67-69
 metodo di esclusione del colorante 13, 67-68
 swelling iposmotico (HOS) 28, 68-69
 volume
 muco cervicale 53
 sperma 7, 59
 zinco, nel plasma seminale 28, 80-81
 zona pellucida, test di legame 31

Istruzioni per gli Autori

Gli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* pubblicano rassegne, monografie, articoli originali, brevi note tecniche nei diversi campi attinenti alla sanità pubblica.

PRESENTAZIONE DEI MANOSCRITTI. - I lavori devono essere inviati alla Redazione degli *Annali*, Servizio per le Attività Editoriali, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma.

Possono essere presentati solo lavori originali, ovvero che non siano stati pubblicati né presentati per la pubblicazione altrove, in lingua italiana o, preferibilmente, in lingua inglese.

Tutti i lavori saranno sottoposti a revisione da parte di persone qualificate.

Gli Autori che intendano richiedere la pubblicazione di fascicoli monografici o rassegne su argomenti tecnici e scientifici devono consultare in anticipo la direzione o la redazione della rivista.

I dattiloscritti devono essere presentati (possibilmente anche su *floppy disk*) in duplice copia di cui una originale con doppia spaziatura ed ampi margini. Essi, ed in particolare le tabelle e la bibliografia, devono essere accuratamente riguardati dagli Autori.

I lavori devono essere scritti nel modo più conciso possibile compatibilmente con la chiara comprensione del testo; le tabelle e le figure devono essere presentate solo se necessarie per la documentazione dei risultati.

Il titolo, su pagina separata, deve essere seguito dai nomi completi degli Autori (nome per esteso e cognome) e dall'indicazione del Laboratorio e dell'Istituto di appartenenza, città e stato. Deve inoltre essere chiaramente indicato il nome dell'Autore al quale dovrà essere indirizzata la corrispondenza, il suo indirizzo, numero di telefono e fax.

Di regola i lavori originali devono essere suddivisi in sezioni (per es.: Introduzione, Materiali e metodi, Risultati, Conclusione). In ogni caso, titoli di capitoli e sottocapitoli vanno chiaramente indicati alla Redazione.

Ogni articolo deve essere necessariamente accompagnato da:

- un *riassunto* in italiano ed un *summary* in inglese (contenente la traduzione del titolo) presentati su pagine separate, di circa 120 parole ciascuno;

- *parole chiave* (descrittori o soggetti) in italiano e inglese, fino a un numero massimo di cinque.

Si danno di seguito alcune indicazioni sulla lunghezza dei contributi che potrebbero essere presentati per la pubblicazione sugli *Annali*, intendendosi come pagina dattiloscritta una pagina di 72 battute per 30 righe.

La *breve nota* non dovrà superare le 11 pagine dattiloscritte comprese la bibliografia essenziale (che non dovrà superare i 15 riferimenti bibliografici), una tabella e una figura.

L'*articolo* non dovrà superare le 20 pagine dattiloscritte inclusa la bibliografia (circa 40 riferimenti). Non più di tre tabelle e due figure, di formato convenzionale, possono essere accluse al testo.

La *rassegna* non dovrà superare le 28 pagine dattiloscritte inclusa la bibliografia (non più di 120 riferimenti). Quattro tabelle e tre figure possono essere accluse al testo.

PRESENTAZIONE DEL TESTO SU FLOPPY DISK. - Si prega vivamente di presentare il testo anche su floppy disk. Sono accettati preferibilmente dischetti da 3.5 pollici, Macintosh o IBM compatibili, formattati a 720/1.44 Mb, usando i programmi Microsoft Word versione MS-DOS o Windows, WordPerfect o altri programmi registrati in ASCII.

Per le figure e i grafici, registrare nel dischetto in formato: WMF, Excel, Freehand (per PC-IBM compatibili); Freehand-illustrator (versione 6) Excel (per Macintosh).

TABELLE E FIGURE. - Le *tabelle* devono essere presentate su pagina separata; ciascuna tabella deve essere fornita di un titolo e deve poter essere comprensibile anche senza riferimenti al testo. All'interno della tabella, ciascuna colonna deve riportare in alto l'indicazione di ciò

a cui i dati in essa contenuti si riferiscono (unità di misura o altro). Vanno evitate linee di divisione orizzontali o verticali se non quelle necessarie per la chiarezza e leggibilità della tabella stessa.

Le *figure* (disegni, grafici e fotografie) devono essere presentate su pagine separate in forma adatta per la riproduzione. Le fotografie dovranno essere chiare stampe su carta lucida. Sul retro di ciascuna ne dovrà essere indicato l'orientamento, insieme al nome del primo autore dell'articolo cui si riferisce e alla numerazione (numero della figura).

Le *didascalie* delle figure devono essere dattiloscritte in pagina separata e devono fornire una sufficiente spiegazione dell'oggetto.

Tabelle e figure devono avere numerazione progressiva e indipendente (in numeri arabi) ed essere chiaramente citate all'interno del testo.

CONVENZIONI. - Tutti i termini in lingua straniera o in latino devono essere scritti in corsivo o sottolineati. Si possono usare abbreviazioni o simboli solo se questi siano largamente adottati nella letteratura scientifica (p. es. DNA, ATP, DDT). Ogni altra abbreviazione può essere adottata solo in seguito all'indicazione del suo significato sia nel testo che nel riassunto e non dovrà apparire nel titolo. Una lista delle abbreviazioni usate nel testo può, ove necessario, essere fornita su pagina separata.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI. - Tutti i riferimenti bibliografici devono essere numerati nel testo fra parentesi quadre, ad es. [1, 2, 3-6], e riportati alla fine dell'articolo in ordine di citazione in accordo con le "Uniform Requirements for Manuscript Submitted to Biomedical Journals" (note come *Vancouver style* www.icmje.org), con alcune variazioni secondo gli esempi riportati.

I titoli dei periodici devono essere abbreviati in conformità con l'Index Medicus, consultabile gratuitamente sia dal sito della National Library of Medicine (attivando da Pubmed il Journal browser: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) che dal sito di Medscape: www.medscape.com/Home/Search/IndexMedicus/IndexMedicus.html.

• Articoli di rivista:

Weber DJ, Hoffmann KK, Rutala WA. Management of the healthcare worker infected with human immunodeficiency virus: lessons from nosocomial transmission of hepatitis B virus. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;12(10):625-30.

• Libri o parti dei medesimi:

1. Spilker B. *Guide to clinical trials*. New York: Raven Press; 1991.
2. Pierson RN, Kriss JP, Jones RH, MacIntyre WJ (Ed.). *Quantitative nuclear cardiology*. New York: Wiley; 1975.

3. Vanngard, N. Copper proteins. In: Swartz HM, Bolton JR, Borg DC (Ed.). *Biological applications of electron spin resonance*. New York: Wiley; 1972. p. 411-47.

• Atti di congressi:

1. Melrose, JC. Thermodynamics of surface phenomena. In: Landsberg PT (Ed.). *Proceedings of international conference on thermodynamics*. Cardiff, 1-4 April 1970. London: Butterworths; 1970. p. 273-86.

Tutti i riferimenti citati nel testo dovranno essere riportati in bibliografia e viceversa.

AUTORIZZAZIONI E RICONOSCIMENTI. - Le citazioni estese e i materiali illustrativi ripresi da pubblicazioni precedenti debbono essere accompagnati dalle autorizzazioni originali rilasciate dagli Autori e dalle Case editrici, in conformità con le norme che regolano il copyright.

ESTRATTI. - Per ogni lavoro saranno inviati 100 estratti gratuiti all'Autore responsabile della corrispondenza con la Redazione, il quale avrà il compito di suddividerli tra gli eventuali co-autori. Estratti oltre questo numero potranno essere richiesti dagli Autori alla Redazione degli *Annali* al momento della restituzione delle bozze.

Instructions to Authors

Annali dell'Istituto Superiore di Sanità (Annals of the Italian National Health Institute) publish reviews, monographic issues, original articles, brief and technical notes in the different fields of public health.

PRESENTATION OF THE MANUSCRIPT. - Manuscripts should be sent to: Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, Redazione, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Rome, Italy.

All works presented for publication on *Annali* must be original and are submitted for review to qualified referees.

Authors who wish to submit for publication on *Annali* monographic issues or technical reviews should contact the Direction or Editorial Office in advance.

Manuscripts should be written as concisely as possible to allow a clear understanding of the text and presented in two copies and also, if possible, on floppy disk; tables and figures should be kept to a minimum and must be presented only if necessary for the documentation of results. The title, on a separate sheet, should be followed by the complete name of the Authors and the Laboratory or Institute where they work, town and country. The name and address, telephone and telefax numbers of the corresponding Author should also be indicated.

Original articles should normally be organized into different sections (i.e.: Introduction, Materials and methods, Results, Conclusions).

Each article must be accompanied by:

- a *summary* (with the title translated) both in Italian and in English, of about 120 words, presented on separate sheet and in two copies;

- *key words* (descriptors or subjects) in Italian and English, up to a maximum number of five.

The specifications that follow have been developed from our editorial experience and represent what is needed to provide a final printed article that meets the requirements of our publication.

The *brief note* should not exceed 11 typed pages (72 strokes per line, maximum 30 lines) including: 15 references, one table and one figure.

The *article* should have a length of about 20 typed pages including about 40 references. No more than three tables and two figures, of conventional size, may be provided.

The *review* should be about 28 typed pages long, including no more than 120 references. Four tables and three figures may be provided.

PRESENTATION OF THE TEXT ON FLOPPY DISK. - The Authors are kindly requested to present their manuscripts also on floppy disk.

Only disks with the following characteristics will be accepted: 3.5 inches (720/1.44 Mb), Macintosh or IBM compatible, using Microsoft Word MS-DOS or Windows version, WordPerfect or other programmes registered in ASCII.

Figures and graphs should be registered in: WMF, Excel or Freehand (for PC-IBM compatible); Freehand-illustrator (version 6) or Excel (for Macintosh).

TABLES AND FIGURES. - *Tables* should be typewritten on a separate sheet (presented in two copies) and preceded by a title; they should be understandable also without reference to the text.

Figures (drawings, diagrams) must have a size appropriate for reproduction. Photographs must be provided in the form of high quality glossy paper and they must bear an indication of their orientation for a right arrangement in the text. The number of figure and the name of the first author should also be indicated in the back.

Captions of figures and photographs should be typewritten on a separate sheet and must contain a sufficient explanation of their object.

Tables and figures should be numbered in Arabic numerals in a consecutive and independent way and must be referred to in the text.

CONVENTIONS. - All Latin or foreign words should be underlined. You should use internationally accepted abbreviations, if possible (e.g. DNA, ATP, DDT). All other abbreviations should be spelled out in full the first time they occur in the text, followed by the shortened term in parentheses; afterwards use the abbreviation only.

REFERENCES. - All references in the text must be numbered in square parentheses, i.e. [1, 2, 3-6], and mentioned at the end of the article, in the order in which they are quoted. They should conform to the "Uniform Requirements for Manuscript Submitted to Biomedical Journals" (known as *Vancouver style* www.icmje.org), with some variations according to the following examples.

Titles of periodicals should be abbreviated in accordance with Index Medicus (available online www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi or www.medscape.com/Home/Search/Index_Medicus/IndexMedicus.html).

• Articles in journal:

Weber DJ, Hoffmann KK, Rutala WA. Management of the healthcare worker infected with human immunodeficiency virus: lessons from nosocomial transmission of hepatitis B virus. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;12(10):625-30.

• Books and chapters in a book:

1. Spilker B. *Guide to clinical trials*. New York: Raven Press; 1991.
2. Pierson RN, Kriss JP, Jones RH, MacIntyre WJ (Ed.). *Quantitative nuclear cardiology*. New York: Wiley; 1975.
3. Vanngard, N. Copper proteins. In: Swartz HM, Bolton JR, Borg DC (Ed.). *Biological applications of electron spin resonance*. New York: Wiley; 1972. p. 411-47.

• Proceedings:

1. Melrose, JC. Thermodynamics of surface phenomena. In: Landsberg PT (Ed.). *Proceedings of international conference on thermodynamics*. Cardiff, 1-4 April 1970. London: Butterworths; 1970. p. 273-86.

The Authors should check that each reference cited in the text appears in bibliography and viceversa.

References should not include the ones referring to works submitted for publication but not yet accepted or unpublished results, etc. These can be mentioned in the text in parentheses.

LICENCES AND AGREEMENTS. - Extended quotations and illustrative material taken from other publications must be accompanied by the original permission granted by the Authors and by the publisher.

REPRINTS. - One hundred reprints for each article will be sent, free of charge, to the corresponding Author who will distribute them among the co-authors. A higher number of reprints may be requested from the Authors to the Editorial Office of *Annali* at the moment of the return of proofs.