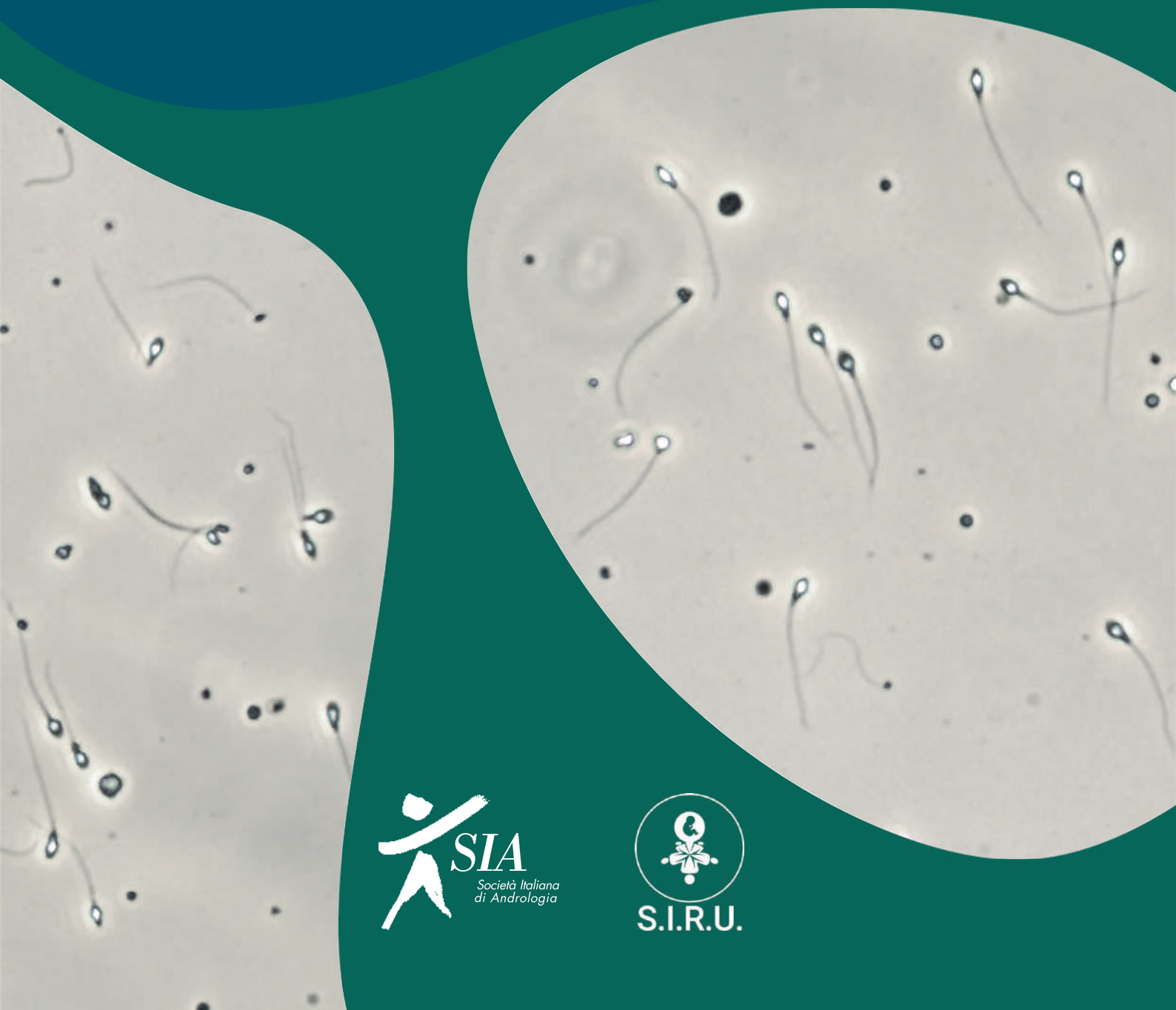


Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale

Sesta edizione



Manuale di laboratorio dell'OMS per **l'esame e il trattamento** **del liquido seminale**

Sesta edizione

Traduzione del *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition* a cura della Società Italiana di Andrologia (SIA) e della Società Italiana di Riproduzione Umana (SIRU)



Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale, Sesta edizione

© Carocci editore, 2022

Questa traduzione non è stata curata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). L'OMS non è responsabile del contenuto o dell'accuratezza di questa traduzione. L'edizione originale inglese *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition*. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO è l'edizione vincolante e autentica.

Alcuni diritti riservati. Questo lavoro è disponibile sotto la licenza Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 IGO (CC BY-NC-SA 3.0 IGO, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>).

Design grafico di Lushomo

Finito di stampare nel maggio 2022 per i tipi di Lineagrafica srl, Città di Castello (PG)

Indice

Premessa	vii
Ringraziamenti	viii
Acronimi e abbreviazioni usati in questo manuale	xii
Capitolo 1: Introduzione	1
1.1 Scopo del manuale	1
1.2 Introduzione.....	1
1.3 La sesta edizione.....	2
1.4 Metodologia per la preparazione della sesta edizione del <i>Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale</i>	4
Capitolo 2: Esame di base	9
2.1 Introduzione.....	9
2.2 Sequenza temporale delle fasi dell'esame di base del liquido seminale	12
2.3 Procedure pre-esame.....	13
2.4 Procedure di esame e post-esame	15
2.5 Informazioni e commenti aggiuntivi	64
Capitolo 3: Esame esteso	83
3.1 Indici di difetti multipli dello spermatozoo.....	83
3.2 Frammentazione del DNA nemaspermico	86
3.3 Test genetici e genomici	105
3.4 Test relativi all'immunologia e ai metodi immunologici.....	108
3.5 Valutazione delle interleuchine come marcatori di infiammazione del tratto genitale maschile.....	116
3.6 Valutazione delle cellule germinali immature nel liquido seminale	118
3.7 Analisi degli antigeni di superficie degli spermatozoi	119
3.8 Test biochimici per la funzione delle ghiandole accessorie.....	125
3.9 Valutazione della sequenza dell'eiaculazione	135
Capitolo 4: Esami avanzati	139
4.1 Test dello stress ossidativo e delle specie reattive dell'ossigeno nel liquido seminale	140
4.2 Valutazione della reazione acrosomiale.....	144
4.3 Valutazione della cromatina nemaspermica	149
4.4 Flusso e trasporto degli ioni transmembrana negli spermatozoi.....	152
4.5 Analisi computerizzata del liquido seminale (CASA)	155
4.6 Tecnologie emergenti.....	159

Capitolo 5: Tecniche di preparazione degli spermatozoi..... 161

5.1	Introduzione.....	161
5.2	Principi generali.....	163
5.3	Lavaggio semplice.....	164
5.4	Swim-up diretto.....	165
5.5	Gradienti di densità discontinui.....	166
5.6	Selezione magnetica delle cellule attivate (MACS).....	166
5.7	Preparazione di campioni di liquido seminale con infezione da HIV.....	167
5.8	Preparazione di spermatozoi testicolari ed epididimali.....	168
5.9	Preparazione di campioni da eiaculazione retrograda.....	169
5.10	Preparazione di campioni da eiaculazione stimolata.....	170

Capitolo 6: Crioconservazione degli spermatozoi..... 171

6.1	Introduzione.....	171
6.2	Indicazioni per la crioconservazione degli spermatozoi.....	172
6.3	Valutazione dei rischi della crioconservazione e dello stoccaggio degli spermatozoi umani.....	174
6.4	Protocolli di crioconservazione degli spermatozoi.....	177
6.5	Vitrificazione.....	182

Capitolo 7: Assicurazione di qualità e controllo di qualità..... 185

7.1	Controllo di qualità nel laboratorio di andrologia.....	185
7.2	La natura degli errori nell'analisi del liquido seminale.....	188
7.3	Il programma di QA.....	190
7.4	Grafici QC per valori numerici.....	193
7.5	Grafici QC per valori percentuali.....	197
7.6	Valutazione delle carte X_{bar} e S.....	197
7.7	Procedure statistiche di analisi e registrazione della variabilità tra operatori.....	199
7.8	Controllo di qualità esterno e assicurazione di qualità.....	204
7.9	Frequenza e priorità del controllo di qualità.....	205
7.10	Formazione.....	206

Capitolo 8: Appendici..... 211

8.1	Interpretazione dei risultati dell'esame del liquido seminale.....	211
8.2	Strumentazione e sicurezza.....	214
8.3	Microscopia per l'esame di base del liquido seminale.....	221
8.4	Soluzioni stock e terreni di coltura.....	226
8.5	Modello di refertazione per l'esame del liquido seminale.....	233
8.6	Materiale QC.....	235
8.7	Programmi nazionali di controllo di qualità esterno per l'esame del liquido seminale.....	246

Capitolo 9: Bibliografia..... 247

Indice delle tabelle

Tabella 2.1	Volumi sufficienti di eiaculato e volumi finali di sospensioni spermatiche diluite per una gestione adeguata.....	20
Tabella 2.2	Differenze accettabili (basate su un intervallo di confidenza del 95%) tra due percentuali per una data media determinata da conteggi replicati di 200 spermatozoi (conta totale: 400).....	26
Tabella 2.3	Confronto della differenza tra i conteggi dei replicati e relazione con l'incertezza del risultato	33
Tabella 2.4	Calcolo della concentrazione di spermatozoi dalla conta spermatica.....	35
Tabella 2.5	Fissazione e fasi della colorazione Papanicolaou.....	47
Tabella 2.6	Classificazione della morfologia nemaspermica.....	51
Tabella 2.7	Tavola di Papanicolaou 1	56
Tabella 2.8	Tavola di Papanicolaou 2.....	58
Tabella 2.9	Tavola di Papanicolaou 3.....	60
Tabella 2.10	Tavola di Papanicolaou 4.....	61
Tabella 2.11	Tavola di Papanicolaou 5.....	61
Tabella 2.12	Probabilità di non rilevare spermatozoi durante la valutazione dei preparati a fresco	66
Tabella 2.13	Probabilità di non rilevare spermatozoi dopo la centrifugazione	66
Tabella 2.14	Tavola di Shorr.....	73
Tabella 2.15	Tavola DiffQuick	76
Tabella 2.16	Errori di campionamento approssimati (%) e limiti dell'intervallo di confidenza al 95% secondo il numero totale di spermatozoi contati.....	78
Tabella 3.1	Calcolo degli indici di difetti multipli dello spermatozoo.....	85
Tabella 3.2	Indici dei difetti dello spermatozoo in uomini di coppie fertili e infertili	86
Tabella 3.3	Livelli basali della disomia dei cromosomi spermatici di uomini fertili sani.....	107
Tabella 3.4	Quantità di liquido seminale da utilizzare per l'immunobead test.....	122
Tabella 3.5	Standard raccomandati per le valutazioni dello zinco.....	127
Tabella 3.6	Standard raccomandati per il dosaggio del fruttosio.....	130
Tabella 3.7	Standard raccomandati per la valutazione dell'attività dell' α -glucosidasi.....	133
Tabella 7.1	Terminologia di garanzia e controllo della qualità	187
Tabella 7.2	Calcoli dei valori per una carta X_{bar}	194
Tabella 7.3	Fattori necessari per il calcolo dei limiti di allarme e di azione per la carta X_{bar}	195
Tabella 7.4	Calcolo dei limiti di allarme e di azione per la carta S.....	196
Tabella 7.5	Regole di controllo di base per le carte QC	198
Tabella 7.6	Concentrazioni di spermatozoi ($\times 10^6$ /ml) stimate da tre operatori su cinque campioni di QC.....	202
Tabella 7.7	Differenze dalla media del campione calcolate sottraendo la media del campione seminale da ogni osservazione	202
Tabella 7.8	Media, SD e media/errore standard di queste differenze calcolate per ogni operatore (n = numero di campioni).....	202
Tabella 7.9	Media, SD e media/errore standard di queste differenze calcolate per ogni operatore (n = numero di campioni).....	202
Tabella 7.10	Test F dall'ANOVA a due vie per gli operatori e i campioni QC	203
Tabella 7.11	Principali caratteristiche delle procedure di IQC.....	203
Tabella 7.12	Calendario per il QC	206
Tabella 7.13	Riassunto dei test di QC.....	206
Tabella 7.14	Fonti di variazione (errore) nella valutazione della concentrazione nemaspermica	208
Tabella 7.15	Fonti di variazione (errore) nella valutazione della morfologia nemaspermica	209
Tabella 7.16	Fonti di variazione (errore) nella valutazione della motilità nemaspermica.....	210
Tabella 7.17	Fonti di variazione (errore) nella valutazione della vitalità nemaspermica	210
Tabella 8.1	Definizione di popolazione di riferimento in Campbell et al. [5].....	212
Tabella 8.2	Origine dei dati per la distribuzione dei risultati [5]	212
Tabella 8.3	Distribuzione dei risultati dell'esame del liquido seminale di uomini le cui partner hanno ottenuto una gravidanza spontanea da concepimento naturale entro un anno di rapporti sessuali non protetti. Da Campbell et al. [5] (5° percentile e intervallo di confidenza del 95%)	213
Tabella 8.4	Modello esemplificativo per la registrazione dell'esame del liquido seminale	233

Indice delle figure

Figura 2.1	Aggregazione non specifica degli spermatozoi nel liquido seminale.....	21
Figura 2.2	Schema dei diversi gradi di agglutinazione nemaspermica.....	22
Figura 2.3	Supporti per valutare la motilità degli spermatozoi.....	25
Figura 2.4	Striscio di eosina-nigrosina osservato in campo chiaro.....	27
Figura 2.5	L'emocitometro di Neubauer modificato.....	30
Figura 2.6	Quali spermatozoi contare nei quadrati della griglia.....	31
Figura 2.7	Valutazione dell'intero vetrino coprioggetto per verificare la presenza di spermatozoi mobili.....	37
Figura 2.8	Spermatozoi morfologicamente "normali".....	43
Figura 2.9	Preparazione di uno striscio di liquido seminale normale.....	44
Figura 2.10	Rappresentazione schematica di alcune forme anomale di spermatozoi umani.....	50
Figura 2.11	Ordine strutturato per la valutazione della morfologia nemaspermica.....	53
Figura 2.12	Tavola di Papanicolaou 1.....	55
Figura 2.13	Tavola di Papanicolaou 2.....	57
Figura 2.14	Tavola di Papanicolaou 3.....	59
Figura 2.15	Tavola di Papanicolaou 4.....	62
Figura 2.16	Tavola di Papanicolaou 5.....	63
Figura 2.17	Rappresentazione schematica dei tipici cambiamenti morfologici negli spermatozoi sottoposti a stress ipo-osmotico.....	70
Figura 2.18	Microfotografie al microscopio a contrasto di fase di spermatozoi sottoposti a stress ipo-osmotico....	71
Figura 2.19	Tavola di Shorr.....	72
Figura 2.20	Tavola DiffQuick.....	75
Figura 3.1	TUNEL test su vetrino per l'analisi della frammentazione del DNA mediante fluorescenza.....	88
Figura 3.2	Citometria a flusso per l'analisi dello ioduro di propidio e della fluorescenza verde.....	90
Figura 3.3	Spermatozoi con alone (DNA intatto, frecce) e senza alone (DNA frammentato, punte di freccia)	98
Figura 3.4	Comet test su spermatozoi di un campione patologico con frammentazione estesa del DNA e di un campione normale senza danni visibili al DNA, colorati con bromuro di etidio.....	102
Figura 3.5	Cometa vista al microscopio, dopo conteggio con il software CASP (coda DNA = 88%).....	102
Figura 3.6	Cellule perossidasi-positive nel liquido seminale umano.....	110
Figura 3.7	Leucociti nel liquido seminale.....	115
Figura 3.8	Due esempi di dispositivi di raccolta dell'eiaculato diviso.....	136
Figura 3.9	Esempio di rappresentazione grafica dei risultati di un normale eiaculato diviso in quattro frazioni, che mostra la distribuzione del volume, degli spermatozoi, della motilità progressiva, dello zinco e del fruttosio.....	137
Figura 4.1	Esempi di spermatozoi vitali e non vitali, colorati con FITC-PNA, con acrosoma intatto e con acrosoma reatto.....	147
Figura 4.2	Esempio di spermatozoi AB-positivi (a) e AB-negativi (b) al microscopio ottico (1000×, immersione a olio).....	150
Figura 4.3	Esempi di spermatozoi CMA3-positivi (a) e CMA3-negativi (b) (riquadro di sinistra).....	152
Figura 4.4	Terminologia standard per le variabili misurate dai sistemi CASA.....	157
Figura 4.5	Esempi di espressioni grafiche di diverse applicazioni CASA.....	160
Figura 7.1	Una carta \bar{X} basata sui dati della Tabella 7.1.....	195
Figura 7.2	Carta S per la concentrazione di spermatozoi.....	197
Figura 7.3	Grafico Bland-Altman delle stime manuali e con il sistema CASA della percentuale di motilità nemaspermica progressiva.....	200
Figura 7.4	Diagramma di Youden per la stima della concentrazione degli spermatozoi.....	201
Figura 8.1	Nomogramma per determinare la forza centrifuga a partire dal raggio del rotore e dalla velocità di rotazione.....	218
Figura 8.2	Sezione di un microscopio.....	222
Figura 8.3	Supporto alla valutazione della motilità degli spermatozoi.....	237
Figura 8.4	Vista attraverso un oculare con reticolo (reticolo rosso).....	239
Figura 8.5	Immagine videoregistrata del vetrino micrometrico sul monitor e sovrapposizione dei tratti.....	239

Premessa

L'accesso a servizi sanitari di alta qualità, convenienti a livello economico e basati sulle evidenze scientifiche, inclusi quelli riguardanti la salute sessuale e riproduttiva, è fondamentale per la copertura sanitaria universale. L'accesso universale ai servizi di laboratorio è essenziale per garantire che le popolazioni interessate possano evitare le conseguenze negative sanitarie e socioeconomiche delle malattie sessuali e riproduttive.

Il *Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale e dell'interazione spermatozoi-muco cervicale* è stato pubblicato per la prima volta nel 1980, in risposta a un crescente bisogno di standardizzazione delle procedure per l'esame del liquido seminale umano. Il manuale è stato successivamente rivisto quattro volte (negli anni 1987, 1992, 1999 e 2010) e tradotto in diverse lingue.

Il manuale è un documento di riferimento per le procedure e i metodi per l'esame di laboratorio e il trattamento del liquido seminale umano e ha lo scopo di mantenere e sostenere la qualità dell'analisi e la comparabilità dei risultati ottenuti da diversi laboratori. Nel corso degli ultimi quaranta anni, è realmente diventato uno standard riconosciuto, ampiamente utilizzato dai laboratori clinici e di ricerca di tutto il mondo.

Si tratta di un manuale standard non solo per chi è alle prime armi con l'esame del liquido seminale, ma anche per tutti coloro che trattano ed esaminano il liquido seminale per definirne i parametri per la pratica clinica o per studi di ricerca. Il manuale fornisce informazioni importanti sull'esame del liquido seminale e sulla sua preparazione per la valutazione clinica, sui test specializzati, sulla crioconservazione, sul controllo di qualità nel laboratorio di analisi e sugli esami di laboratorio negli studi dell'infertilità maschile. Si tratta di dati fondamentali anche per monitorare la risposta al trattamento e ad altri interventi che mirano a migliorare la salute sessuale e riproduttiva maschile.

Questa sesta edizione del manuale costituisce una fonte essenziale di aggiornamento sulle ultime informazioni basate sulle evidenze scientifiche per le procedure di laboratorio necessarie per la cura dell'infertilità. Questa edizione contiene sezioni nuove e ampliate sulla preparazione dei campioni di liquido seminale, sulla determinazione dei marcatori di infezione, sull'analisi computerizzata del liquido seminale e sulle categorie di base estese e avanzate.

La sesta edizione del *Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale* costituirà un contributo fondamentale ai programmi che cercano di migliorare la salute sessuale e riproduttiva, compresa la cura e l'accesso alla fertilità, soprattutto tra gli uomini, sostenendo così gli sforzi dei paesi per raggiungere l'OSS 3.7 (accesso universale ai servizi di assistenza sanitaria sessuale e riproduttiva, compresa la pianificazione familiare). Il manuale sosterrà inoltre la realizzazione dell'OSS 3.8 (copertura sanitaria universale, compresa la protezione del rischio finanziario, e accesso a servizi sanitari essenziali di qualità).

L'OMS e l'HRP desiderano ringraziare i molti esperti tecnici di tutto il mondo che hanno contribuito alla revisione e al riesame di questo manuale.

Ian Askew, PhD

**Director, Department of Sexual and Reproductive Health and Research,
including the UNDP/UNFPA/UNICEF/WHO/World Bank Special Programme
on Human Reproduction
World Health Organization**

Ringraziamenti

Questa pubblicazione è stata prodotta dal Dipartimento di salute e ricerca sessuale e riproduttiva dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (che include il Programma speciale di ricerca, sviluppo e formazione alla ricerca nella riproduzione umana - HRP di UNDP/UNFPA/UNICEF/OMS/Banca Mondiale). Per la partecipazione nella preparazione, redazione e revisione del presente manuale si ringraziano i seguenti professionisti.

Editor

Dr. Lars Björndahl, MD, PhD

Laboratory medicine

Andrology Laboratory Director

ANOVA, Clinic for Endocrinology, Karolinska University Hospital and Department of Medicine, Huddinge, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Team editoriale

Professor Oleg Apolikhin, MD, PhD

Andrology

Professor and Director, Research Institute of Urology and Interventional Radiology named after N.A. Lopatkin – branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation
Mosca, Russia

Professor Elisabetta Baldi, Doctor in Biology

Laboratory medicine

Associate Professor of Clinical Pathology, Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence

Responsible of the semen cryopreservation centre, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi (AOUC)

Firenze, Italia

Professor Christopher L.R. Barratt PhD, DSc, FRSE

Head of Division Systems Medicine, Professor of Reproductive Medicine School of Medicine, University of Dundee

Dundee, United Kingdom

Professor Mario Philip R. Festin, MD, MSc, MHPEd

Obstetrics-gynaecology, clinical epidemiology, health professions education, family planning

Professor, Department of Obstetrics and Gynecology and Department of Clinical Epidemiology, College of Medicine, University of the Philippines Manila

Convenor, Philippine Study Group on Reproductive Health, National Institutes of Health, University of the Philippines

Manila, Filippine

WHO Secretariat Consultant

Dr. Jackson C. Kirkman-Brown, MBE, PhD

Reproductive science, andrology, health care science, fertility

University Reader and Director, Centre for Human Reproductive Science (ChRS), College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham

HFEA Person Responsible and Science Lead, Birmingham Women's Fertility Centre, Birmingham Women's and Children's NHS Foundation Trust

Birmingham, United Kingdom

Professor Dolores J. Lamb, MS, PhD, HCLD (ABB)

Andrology/urology, clinical chemistry (National Registry of Clinical Chemistry)
High Complexity Laboratory Director (HCLD, American Board of Bioanalysts)
Dow Professor of Urology
Vice-Chairman for Research (Urology)
James Buchanan Brady Foundation Department of Urology, Director, Center
for Reproductive Genomics, Englander Institute for Precision Medicine
Weill Cornell Medical College
New York, United States of America
American Society for Reproductive Medicine

Dr. Michael Mbizvo, PhD

Andrology and reproductive epidemiology
Professor, Reproductive Health Sciences, University of Zimbabwe Country
Director/Senior Associate, Population Council
Lusaka, Zambia

Prof. Dr. Stefan Schlatt, PhD

Reproductive biology, andrology
University Professor and Director, Centre for Reproductive Medicine and Andrology,
University of Münster, Germany
WHO Collaborating Centre for Research in Male Reproduction

Dr. Igor Toskin, MD, PhD, DSc

Public health, STI, HIV/AIDS, urology, dermatology, epidemiology, sexual
and reproductive health
Scientist, Department of Sexual and Reproductive Health and Research
World Health Organization
Geneva, Switzerland
WHO Secretariat

Dr. Christina Wang, MD

Endocrinology, andrology (male reproduction and contraception)
Professor of Medicine, David Geffen School of Medicine, UCLA
Division of Endocrinology, Department of Medicine, Harbor-UCLA Medical Center
and the Lundquist Institute
Torrance California, United States of America

Contributors

Karel Blondeel, MSc, MA

HIV/STI prevention and sexual health
Doctoral student, Department of Medicine and Health Sciences, Ghent University
Ghent, Belgium
WHO Secretariat Consultant

MUDr. Petr Houska

Laboratory medicine
Doctoral student, ANOVA, Clinic for Endocrinology, Karolinska University Hospital
and Department of Medicine, Huddinge, Karolinska Institutet
Stockholm, Sweden

Dr. Stepan Krasnyak, MD

Andrology, urology

Associate Scientist, Department of Andrology and Human Reproduction,
Research Institute of Urology and Interventional Radiology named after N.A.
Lopatkin – branch of the National Medical Research Center of Radiology
of the Ministry of Health of the Russian Federation
Moscow, Russian Federation

Il team desidera ringraziare Ian Askew, James Kiarie e Thabo Matsaseng per il loro sostegno durante le riunioni e le discussioni nel dipartimento.

Un ringraziamento speciale alla signora Natalie Narkie Maurer, assistente e segretaria presso il Dipartimento di salute e ricerca sessuale e riproduttiva, Organizzazione Mondiale della Sanità, Ginevra, Svizzera.

Il sostegno, i consigli e l'assistenza di Susan Norris, Rebekah Thomas e Ian David Coltart dell'OMS sono stati molto apprezzati.

Un ringraziamento speciale all'ex membro dello staff dell'OMS, dottor Kirsten Vogelsong, per la sua eccellente registrazione delle precedenti edizioni del manuale, che ha facilitato la revisione per l'ultima edizione, e all'editore della quinta edizione del manuale, dottor Trevor Cooper, per l'aiuto con i dati e altri elementi che sono stati importanti nella continuità di questa nuova edizione.

Il Dipartimento di Salute Sessuale e Riproduttiva e di Ricerca dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (che include il Programma Speciale di Ricerca, Sviluppo e Formazione alla Ricerca nella Riproduzione Umana - HRP di UNDP/UNFPA/UNICEF/OMS/Banca Mondiale) desidera ringraziare tutti i partecipanti alla revisione per i loro contributi.

Ulteriori ringraziamenti a:

- Dr. Christoph Brenker, Postdoctoral Scientist, Centre for Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster (for assistance with staining protocols, taking micrographs and plates for documentation of spermatozoal pathologies)
- Dr. Meurig Gallagher, Research Fellow, Centre for Systems Modelling and Quantitative Biomedicine, University of Birmingham (for help in writing the sperm motility and CASA sections)
- Dr. Monica Muratori, Research Assistant, Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence (for assistance in writing the Tunel protocol for sperm DNA fragmentation)
- Dr. Sara Marchiani, Research Assistant, Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence (for help in writing the protocol for sperm chromatin status evaluation).

Questa è la sesta edizione del *Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale*. Il manuale è stato uno dei documenti più scaricati sul sito dell'OMS negli anni passati.

La dottoressa Christina Wang è stata impegnata nel lavoro sul manuale fin dalla sua prima edizione nel 1980 (quando era il *Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale e dell'interazione spermatozoi-muco cervicale*) e continua a far parte dell'attuale sesta edizione, come membro attivo del comitato editoriale del manuale.

La dottoressa Wang insegna medicina alla David Geffen School of Medicine dell'Università della California a Los Angeles. Fa parte della Divisione di Endocrinologia, del Dipartimento di Medicina, ed è direttore del Clinical and Translational Science Institute presso il Lundquist Institute dell'Harbor-UCLA Medical Center.

La dottoressa Wang è una ricercatrice riconosciuta a livello internazionale nella medicina e biologia riproduttiva maschile, e per molti anni ha continuato a guidare gli sforzi per sviluppare un contraccettivo ormonale maschile sicuro, efficace e reversibile, metodi ottimali di terapia ormonale sostitutiva maschile e nuovi androgeni sostitutivi per gli uomini ipogonadici. Oltre a tutto ciò, la dottoressa Wang ha condotto molti altri progetti e iniziative di ricerca d'impatto – dalla ricerca di base agli studi clinici – che mirano a migliorare i risultati della salute riproduttiva.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità desidera riconoscere l'eccezionale contributo della dottoressa Wang allo sviluppo di tutte e sei le edizioni del *Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale*. Il suo contributo ha garantito sia un alto livello di competenza tecnica nello sviluppo del manuale sia la continuità istituzionale in tutte le edizioni di questo importante documento.



Christina Wang, MD

L'edizione italiana è stata curata da:

SIA

Luca Boeri

Urologo, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.

Ilaria Ortensi

PhD Biotecnologie della Riproduzione umana, Sapienza Università di Roma.

Paolo Turchi

Andrologo, Referente per l'Andrologia Azienda USL Toscana Centro, Prato.

SIRU

Filippo Giacone

PhD, Biologo della Riproduzione, Centro HERA, Unità di Medicina della Riproduzione, Sant'Agata Li Battiati, Catania.

Luigi Montano

UroAndrologo, Responsabile Medicina dello Stile di Vita in UroAndrologia, Ospedale S. Francesco d'Assisi, Oliveto Citra (SA), ASL Salerno.

Tiziana Notari

Biologa della Riproduzione, Responsabile Laboratorio PMA Centro Donna Salerno, Centri MIR Napoli e Salerno.

Acronimi e abbreviazioni usati in questo manuale

ART	tecniche di riproduzione assistita
BSA	albumina sierica bovina
BWW	Biggers, Whitten e Whittingham
CASA	computer-aided sperm analysis
CASMA	computer-aided sperm morphometric assessment
CD45	cluster di determinazione 45 (marker pan-leucocitario)
CD46	cluster di determinazione 46 (antigene acrosomiale)
CMA3	cromomicina A3
DGC	centrifugazione in gradiente di densità
DNA	acido desossiribonucleico
DNasi	desossiribonucleasi
DPBS	soluzione salina bilanciata a base di fosfato di Dulbecco
DTT	ditiotreitolo
EBSS	soluzione salina bilanciata di Earle
EDTA	acido etilendiamminotetraacetico
EQA	garanzia di qualità esterna
EQC	controllo di qualità esterno
FITC	isotiocianato di fluoresceina
FIVET	fecondazione in vitro
GEYC	glicerolo-tuorlo d'uovo-citrato
HIV	virus dell'immunodeficienza umana
HPF	campo ad alta potenza
HSA	albumina serica umana
HTF	fluido tubarico umano
ICSI	iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo
Ig	immunoglobulina
IQC	controllo di qualità interno
IU	unità internazionale
IUI	inseminazione intrauterina
NA	apertura numerica
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
QC	controllo qualità
sEBSS	soluzione salina bilanciata di Earle integrata
SD	deviazione standard
sDF	frammentazione del DNA nemaspermico
SOP	procedura operativa standard
TZI	indice di teratozoospermia

Capitolo 1: Introduzione



1.1 Scopo del manuale.....	1
1.2 Introduzione.....	1
1.3 La sesta edizione.....	2
1.4 Metodologia per la preparazione della sesta edizione del <i>Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale</i>	4

1.1 Scopo del manuale

L'obiettivo generale del manuale è quello di descrivere i metodi di laboratorio per l'esame dell'eiaculato al fine di fornire standard globali per migliorare la valutazione della funzione riproduttiva maschile e il trattamento della subfertilità maschile.

I metodi qui riportati possono essere utilizzati come procedure operative standard non solo dai laboratori di andrologia ma da ogni laboratorio che esegua l'esame del liquido seminale. I metodi di base descritti nel Capitolo 2, se adottati e praticati in laboratorio, potranno migliorare la qualità dell'esame del liquido seminale e la comparabilità dei risultati ottenuti in diversi laboratori. I metodi estesi di valutazione del liquido seminale e i test di ricerca descritti nei capitoli successivi sono stati inclusi per i tecnici, gli scienziati e i medici clinici che richiedono maggiori informazioni sulla capacità funzionale degli spermatozoi e degli organi riproduttivi maschili. Queste informazioni possono essere utili per indagare la subfertilità maschile, così come per monitorare i parametri del liquido seminale durante l'uso di metodi contraccettivi maschili, e negli studi epidemiologici sulla salute riproduttiva maschile.

1.2 Introduzione

Il *Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale e dell'interazione spermatozoi-muco cervicale* è stato pubblicato per la prima volta nel 1980 [1], in risposta a un crescente bisogno di standardizzazione delle procedure per l'esame del liquido seminale. Il manuale è stato rivisto quattro volte [2-5], ampiamente letto e tradotto in diverse lingue. Nel corso degli ultimi quaranta anni, è realmente diventato uno standard riconosciuto, utilizzato ampiamente dai laboratori clinici e di ricerca di tutto il mondo. Si tratta non solo di una guida procedurale per chi è alle prime armi con l'analisi del liquido seminale, ma di un testo di riferimento per tutti coloro che trattano il liquido seminale e hanno bisogno di analizzarne e definirne i parametri per la pratica clinica o per gli studi di ricerca clinica ed epidemiologica.

L'esame del liquido seminale è importante per diverse ragioni:

- valutazione della funzione riproduttiva maschile e della pervietà del tratto genitale per consentire un trattamento appropriato per la subfertilità maschile e per monitorare la risposta a un trattamento;
- valutazione del potenziale di fertilità e scelta della tipologia di trattamento adatta per una coppia infertile;

- misurazione dell'efficacia della contraccezione maschile (per esempio, ostruzione dei vasi deferenti e interventi che includono la contraccezione ormonale maschile e altri metodi potenziali).

La valutazione clinica del maschio, assieme all'analisi del liquido seminale, può guidare il medico nella scelta su come procedere con le indagini successive e come gestire la coppia subfertile. L'edizione precedente di questo manuale forniva intervalli di riferimento per le variabili spermatiche comunemente misurati sulla base di dati che riguardavano i parametri seminali di uomini le cui partner avevano un tempo di attesa per il concepimento di 12 mesi o meno. Queste distribuzioni di valori sono state definite secondo i metodi standard utilizzati in chimica clinica per la definizione di intervalli di riferimento, ma è importante ricordare che non possono essere utilizzate come limiti netti tra uomini fertili e subfertili [6]. Anche se i parametri del liquido seminale provenivano da un numero limitato di aree geografiche, il che non permetteva a uomini della maggior parte delle popolazioni di essere rappresentati, queste distribuzioni di valori sono state utilizzate a livello globale. Inoltre, molti fattori femminili noti e non noti ostacolano il valore di utilizzo dei soli parametri dell'esame del liquido seminale per predire la prognosi per la coppia di fecondazione spontanea o assistita. Un migliore valore prognostico dell'esame del liquido seminale può essere ottenuto utilizzando una combinazione di diversi parametri [7-9]. Le metodiche attuali per l'esame del liquido seminale possono fornire molte informazioni, ma ci sono ancora molte domande che richiedono altre indagini [10]. Per un singolo paziente, un esame del liquido seminale non è mai prognostico di fertilità, poiché è il potenziale di fertilità della coppia a definirlo fertile o subfertile.

Nonostante il successo delle precedenti edizioni, è diventato evidente che l'ultima non forniva a un tecnico di laboratorio o a uno scienziato la procedura ottimale per eseguire in laboratorio passo dopo passo un esame del liquido seminale. Inoltre, negli ultimi dieci anni, sono stati convalidati molti nuovi test sul liquido seminale per scopi clinici e di ricerca che non potevano non essere discussi nel manuale. Spinta da queste considerazioni l'OMS, con il sostegno del Segretariato dell'OMS, ha istituito un comitato editoriale per rivedere tutti i metodi descritti nel manuale al fine di confermarli, cambiarli o aggiornarli. Quando venivano ottenuti dati insufficienti utilizzando i metodi descritti nel manuale o i dati non erano convalidati in più di un laboratorio, il comitato editoriale elaborava una posizione di consenso dopo aver valutato la letteratura pertinente. Inoltre, è stata condotta una revisione aggiornata della distribuzione dei risultati per i parametri del liquido seminale e degli spermatozoi di presunti uomini fertili per includere i dati di tutte le popolazioni, quando possibile.

La mancanza di istruzioni chiare sull'ordine in cui le analisi devono essere eseguite quando un campione di liquido seminale viene consegnato al laboratorio ha portato alcuni laboratori a utilizzare metodologie descritte in altre fonti, mentre altri hanno sviluppato una propria versione di questi metodi, pur sostenendo di eseguire l'analisi del liquido seminale secondo il manuale dell'OMS [11]. Per facilitare i confronti globali, questa nuova edizione del manuale include quindi procedure passo dopo passo e checklist per garantire la facilità d'uso per i tecnici di laboratorio e gli scienziati.

1.3 La sesta edizione

La sesta edizione comprende tre parti: esame del liquido seminale (**Capitoli 2, 3 e 4**), preparazione e crioconservazione del liquido seminale (**Capitoli 5 e 6**) e valutazione e controllo della qualità (**Capitolo 7**). Le procedure per l'esame del liquido seminale sono divise in tre capitoli: esami di base, che consistono in consolidate procedure di routine per determinare le variabili seminali eseguite non solo dai laboratori di andrologia ma da qualsiasi laboratorio effettui esami del liquido seminale; analisi

estese, che possono essere usate in determinate situazioni per scelta del laboratorio o per specifica richiesta del clinico; esami avanzati, che non sono attualmente considerati di routine nella valutazione iniziale di un maschio subfertile. Dato che la coltura del liquido seminale non viene eseguita in un laboratorio di andrologia, questa viene menzionata solo nella sezione sulla raccolta sterile del liquido seminale. La sezione sulla preparazione del liquido seminale si estende oltre l'eiaculato per includere spermatozoi ottenuti dal testicolo e dall'epididimo. Da notare come il test del muco cervicale umano sia stato eliminato da questa nuova edizione perché non più utilizzati nella pratica clinica. Questa nuova edizione è scritta come un manuale procedurale facile da seguire per coloro che effettuano l'esame del liquido seminale, con informazioni di base e il rationale dei test separati dalla descrizione della procedura.

Le caratteristiche principali di questa sesta edizione sono descritte qui di seguito.

- I capitoli sull'**esame del liquido seminale** includono dettagli su come procedere passo dopo passo con le procedure, i calcoli e l'interpretazione, in modo che qualsiasi metodologia data sia essenzialmente completa, con un minimo riferimento incrociato ad altre parti del manuale.

• Esami di base

- *Valutazione del numero di spermatozoi:*
 - Le diluizioni del liquido seminale sono state semplificate, ma devono essere contati 200 spermatozoi per replicato.
 - È importante che il laboratorio non smetta di valutare il numero di spermatozoi a basse concentrazioni (2 milioni/ml), come suggerito nella precedente edizione, ma riporti concentrazioni inferiori, notando che gli errori associati al conteggio di un piccolo numero di spermatozoi possono essere molto alti. Ulteriori metodi descritti in questo capitolo possono essere necessari per migliorare l'accuratezza e la precisione nel caso di numeri di spermatozoi molto bassi.
 - Il numero totale di spermatozoi per eiaculato (spermatozoi eiaculati) ha più valore diagnostico della concentrazione di spermatozoi, ma per questo il volume del liquido seminale deve essere misurato accuratamente.
 - La sezione *per la valutazione dell'azoospermia* è mantenuta, e contiene anche le *procedure per la centrifugazione* e l'uso di *coloranti per gli spermatozoi vitali*, utilizzati come metodi per la rilevazione di spermatozoi in campioni non fissati e nel liquido seminale post-vasectomia oppure quando la produzione di liquido seminale è marcatamente soppressa da agenti contraccettivi.
- *Valutazione della motilità degli spermatozoi.* La categorizzazione della motilità degli spermatozoi è tornata a essere: motilità progressiva rapida, motilità progressiva lenta, motilità non progressiva e assenza di motilità (grado a, b, c, d) perché la presenza (o assenza) di spermatozoi progressivi rapidi è clinicamente importante [12].
- *Valutazione della morfologia nemaspermica.* La procedura per valutare la morfologia degli spermatozoi utilizzando un approccio sistematico è descritta e dovrebbe essere seguita. In questa edizione sono incluse più microfotografie e di migliore qualità di spermatozoi ottenuti da campioni di liquido seminale non trattati considerati normali, borderline o anormali, accompagnate da spiegazioni sul perché ogni spermatozoo è stato classificato in quel modo. Questo dovrebbe aiutare a formare gli operatori in modo che siano in grado di definire in modo coerente le sottili caratteristiche della morfologia degli spermatozoi.

- **Esami estesi.** Questo capitolo è stato ampiamente rivisto e ora descrive non solo procedure per rilevare leucociti, cellule germinali immature, anticorpi nel liquido seminale, indici di difetti multipli degli spermatozoi e saggi biochimici per la funzione delle ghiandole accessorie, ma anche metodi per rilevare le aneuploidie nemaspermiche e la genetica degli spermatozoi, nonché la frammentazione del DNA.
- **Esami avanzati.** Questa sezione include sia esami che sono classificati come focalizzati su metodi molto specializzati sia metodi principalmente di ricerca e altre tecnologie emergenti. Questo capitolo è stato ampiamente rivisto. I test obsoleti, come il legame dell'ovocita umano e della zona pellucida umana, e i test di penetrazione dell'ovocita di criceto sono stati rimossi. Le descrizioni di questi test sono disponibili nella quinta edizione. I test di ricerca in questa edizione includono la valutazione delle specie reattive dell'ossigeno e dello stress ossidativo, dei canali ionici di membrana, della reazione acrosomiale e della cromatina spermatica. La sezione sull'analisi computerizzata del liquido seminale (CASA, Computer-aided sperm analysis) è stata riscritta per descrivere i principi di quest'ultima e il suo uso come tecnologia di ricerca. Inoltre, i nuovi metodi emergenti che utilizzano il movimento degli spermatozoi o i cambiamenti alla luce possono costituire la base per misurare la motilità degli spermatozoi senza bisogno di un microscopio.
- I capitoli sulla **preparazione** del liquido seminale e la **crioconservazione** degli spermatozoi sono stati aggiornati.
- **Controllo di qualità.** Questo capitolo è stato rivisto per fornire un più agevole approccio per i non esperti in statistica. Un rigoroso mantenimento della qualità per l'esame del liquido seminale è necessario affinché i metodi analitici siano di forte evidenza; devono essere adottate procedure di qualità tanto interne quanto esterne. Vengono inoltre dati consigli e suggerimenti su come migliorare le prestazioni del laboratorio quando i risultati del controllo qualità sono insoddisfacenti.
- **Limiti di decisione più accurati degli intervalli e dei limiti di riferimento.** La distribuzione dei risultati da uomini presunti fertili non è sufficiente per stabilire limiti decisionali clinicamente utili. I dati che caratterizzano le caratteristiche del liquido seminale di una popolazione di riferimento (uomini le cui partner hanno avuto un tempo di attesa per il concepimento di 12 mesi o meno) sono stati rivisti (**Sezione 8.1, p. 211**); i dati non riportati in precedenza e provenienti da popolazioni maggiormente diversificate sono stati riportati e queste analisi hanno convalidato la distribuzione dei risultati definita nella quinta edizione del manuale. La distribuzione dei dati della popolazione è presentata con intervalli unilaterali (estremi dei dati della popolazione di riferimento) anche se questi percentili non rappresentano limiti netti tra uomini fertili e subfertili.

1.4 Metodologia per la preparazione della sesta edizione del *Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale*

Di Mario Philip R. Festin e Igor Toskin

Il *Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale* è giunto alla sua sesta edizione. La quinta edizione è stata una delle pubblicazioni OMS più popolari da quando il manuale è uscito nel 2010, con download in costante aumento anche negli ultimi anni (95.975 nel 2018, 120.803 nel 2019 e 132.765 nel 2020).

È stato il manuale standard utilizzato dai laboratori di andrologia, ma anche da altri laboratori di analisi del liquido seminale, analisi cliniche e istituti di ricerca in tutto il mondo. Fino al 2021 è stato citato in più di 3.000 articoli e recensioni peer-review e diffuso in congressi internazionali e riunioni scientifiche, nonché in programmi di formazione di centri che collaborano con l'OMS, società professionali e altri istituti accademici.

Per la presente revisione, il processo ha incluso quanto segue: il segretariato responsabile del manuale è stato convocato dal Dipartimento di salute e ricerca riproduttiva dell'OMS (RHR) sulla base di una lista ottenuta dal precedente board editoriale e previa consultazione con le istituzioni che collaborano con il Dipartimento; è stato elaborato un piano per arrivare a proporre una lista di membri del comitato editoriale.

Questa lista di possibili collaboratori per la sesta edizione è stata sviluppata da una selezione di relatori a congressi di andrologia, da una revisione dei collaboratori alla quinta edizione del manuale e da una selezione della letteratura medica globale peer-review in materia di andrologia e analisi del liquido seminale. La base per la selezione finale includeva un track record di ricerca e pratica sull'analisi del liquido seminale, pubblicazioni peer-review e competenze tecniche riconosciute a livello internazionale, con un equilibrio tra pratica clinica ed esperienza di laboratorio. Si è cercato di ottenere un equilibrio tra andrologi, esperti di laboratorio, urologi, scienziati, epidemiologi e altri specialisti.

È stato costituito un nucleo editoriale di otto persone per avviare l'organizzazione di un team di redattori più esteso, quando necessario. Tale nucleo editoriale è stato selezionato in base alla collaborazione attiva con il Dipartimento negli ultimi anni e all'esperienza sul precedente manuale del liquido seminale e, in base alla necessità, ha nominato il resto dei membri del team di collaboratori più esteso. Non sono stati previsti onorari o compensi per i membri del comitato editoriale né per i collaboratori.

Una volta completata la lista dei redattori principali, l'OMS li ha invitati a diventare membri del comitato editoriale, con termini di riferimento specifici. I loro curricula, gli accordi individuali e le dichiarazioni di possibili conflitti di interesse sono stati presentati e tenuti in archivio. La maggior parte delle comunicazioni è avvenuta inizialmente attraverso teleconferenze, per poi includere anche incontri in presenza a Ginevra o altrove.

I compiti proposti dal nucleo editoriale degli otto erano:

- suggerire altri membri del team di collaboratori, se necessario;
- fissare i criteri di selezione dei collaboratori generali;
- identificare gli argomenti soggetti a revisione o aggiornamento;
- ideare il processo di scoping di questa edizione.

I membri del comitato editoriale per la sesta edizione del *Manuale di laboratorio dell'OMS per l'esame e il trattamento del liquido seminale* sono:

- Oleg Apolikhin – <https://ecuro.ru/en/node/3485>
- Elisabetta Baldi – <https://www.unifi.it/p-doc2-0-0-A-3f2a3d2a393028.html>

- Christopher Barratt – <https://www.dundee.ac.uk/people/christopher-barratt>
- Lars Björndahl – <https://ki.se/en/people/larsbjor>
- Jackson Kirkman-Brown – <https://www.birmingham.ac.uk/staff/profiles/metabolism-systems/kirkman-brown-jackson.aspx>
- Dolores Lamb – <https://urology.weillcornell.org/dolores-lamb>
- Michael Mbizvo – <https://www.popcouncil.org/research/expert/michael-mbizvo>
- Stefan Schlatt – <https://www.medizin.uni-muenster.de/cera/cera-forschung/experimentelle-und-translazionale-forschung-zum-hoden/arbeitsgruppe/univ-prof-dr-rer-nat-stefan-schlatt-1.html>
- Christina Wang – <https://lundquist.org/christina-chung-lun-wang-md>

All'OMS, la segreteria del manuale comprendeva Igor Toskin e Mario Festin.

Altri membri sono stati aggiunti per supportare i membri anziani del team editoriale e sono stati riconosciuti come collaboratori:

- Petr Houska;
- Stepan Krasnyak;
- Karel Blondeel.

I termini di riferimento includevano:

- rivedere la classificazione e la presentazione delle procedure per migliorare la comprensione tra il personale tecnico;
- preparare una presentazione più chiara delle illustrazioni e delle fotografie;
- rivedere il contenuto dei box e, quando appropriato, inserirlo nel testo principale;
- verificare e aggiornare i valori standard di riferimento dell'edizione precedente.

Il Segretariato RHR dell'OMS si è consultato con il Comitato di revisione delle linee guida dell'OMS (GRC), che decide se una pubblicazione deve seguire il processo di documentazione, revisione e approvazione delle linee guida. Al momento della revisione, il GRC ha notato che le edizioni precedenti del manuale avevano affrontato le questioni di come raccogliere e preparare i campioni, di come analizzarli e della loro interpretazione, includendo i valori di riferimento per il numero, la morfologia, la motilità e altre caratteristiche; non c'erano, invece, raccomandazioni su se, quando e come trattare le anomalie.

Il presente manuale ha solo fornito procedure standardizzate da seguire per condurre test ed esami di laboratorio; non ha fatto raccomandazioni cliniche o pratiche, che sono al di fuori del suo ambito, come menzionato dal GRC. Le conclusioni e le informazioni contenute nel manuale sono basate sulle migliori evidenze scientifiche disponibili, incluse le citazioni, ove disponibili. Il manuale soddisfa gli standard dell'OMS per lo sviluppo e la pubblicazione dei documenti, compresa la dichiarazione dei conflitti d'interesse, la gestione dei comitati esterni, lo stile, il processo di autorizzazione e altri; si ricollega inoltre alle attuali linee guida dell'OMS sulla

gestione dell'infertilità e della contraccezione, se pertinenti. Il manuale mantiene il suo obiettivo di descrivere le procedure e il modo di fissare gli standard locali per i valori di riferimento. L'OMS ha ricevuto conferma dal GRC che l'attuale formato del manuale non lo rende una linea guida e non richiederebbe la sua autorizzazione o approvazione.

Anche all'OMS sono state fatte comunicazioni adeguate con il Dipartimento degli standard di laboratorio (Laboratory Standards Department) per una guida sul contenuto e le procedure, specialmente circa la definizione degli standard in un manuale.

L'autorizzazione per la pianificazione è stata garantita presso il Comitato documenti del Dipartimento di salute e ricerca riproduttiva dell'OMS e l'autorizzazione esecutiva è stata data prima della pubblicazione, una volta che il documento è stato completato. Se in futuro si dovessero sviluppare pubblicazioni derivanti dalle revisioni e dalle discussioni nella preparazione del manuale, anche queste saranno decise e concordate dal comitato editoriale.

Il nucleo editoriale ha identificato possibili argomenti riguardanti i fattori che influenzano i parametri seminali. È stata eseguita una revisione della letteratura su specifici temi di ricerca come parte della preparazione del manuale. Sugli argomenti su cui si apriva una discussione, la decisione si basava sul consenso o sul voto aperto. Per facilitare il processo di condivisione, revisione e aggiornamento dei dati è stata creata una piattaforma elettronica. Il team editoriale ha anche considerato altri argomenti da includere, modificare o eliminare dalla presente versione del manuale; sono state inoltre prese diverse decisioni riguardo al formato e alle scadenze. Tra il 2017 e il 2020 si sono tenuti una serie di teleconferenze, scambi di e-mail individuali e di gruppo e due incontri in presenza.

È stata necessaria una revisione della letteratura su alcuni specifici argomenti sui quali ci poteva essere incertezza, o perché riguardavano sviluppi tecnologici molto recenti o a causa di una mancanza di evidenze o di esperienza. Queste sono state le basi della discussione per alcune delle decisioni adottate. Alcuni degli argomenti visionati sono stati:

- procedure più nuove per la valutazione della qualità dell'eiaculato;
- fattori che influenzano la qualità del liquido seminale (fattori ambientali, uso di farmaci, fattori legati all'età, alla salute e altri; come parte del manuale o come documenti di revisione separati per la pubblicazione).

Le scadenze sono state fissate per ogni capitolo e per l'intero manuale. Esse riguardavano:

- schema del contenuto dei capitoli;
- presentazione della prima bozza;
- revisione da parte del gruppo editoriale;
- presentazione della seconda bozza;
- revisione da parte del gruppo editoriale;
- approvazione del caporedattore;
- revisione da parte dell'editor per la coerenza in tutti i capitoli;

- revisione interna da parte dell'OMS;
- revisione esterna da parte di altri esperti tecnici in andrologia o analisi del liquido seminale;
- revisione pubblica (come parte delle procedure standard nella preparazione dei documenti dell'OMS);
- completamento del documento dopo il confronto e la sintesi di tutte le revisioni e i commenti.

Hanno partecipato alla revisione pubblica gli esperti di 43 paesi in tutte e 6 le regioni dell'OMS.

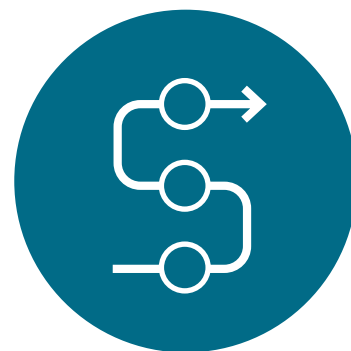
Mentre l'appendice del manuale descrive la distribuzione dei risultati ottenuti da uomini le cui partner sono rimaste gravide entro 12 mesi di tentativi (**Sezione 8.1, p. 211**), per presentare una descrizione più dettagliata degli sforzi per riesaminare e aggiornare le distribuzioni di riferimento un gruppo separato di autori, che includeva alcuni dei membri del comitato editoriale, ha preparato un documento separato con i risultati chiave menzionati nell'appendice 8. Altri argomenti che sono al di fuori dell'ambito del manuale saranno pubblicati separatamente, compresa un'analisi del panorama delle tecnologie emergenti.

Riferimento alla carta di distribuzione dei valori di riferimento:

Campbell MJ, Lotti F, Baldi E *et al.* *Distribution of semen examination results 2020 - A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010.* *Andrology.* 2021 May;9(3):817-22.

Capitolo 2:

Esame di base



2.1	Introduzione	9
2.2	Sequenza temporale delle fasi dell'esame di base del liquido seminale.....	12
2.3	Procedure pre-esame	13
2.4	Procedure di esame e post-esame	15
2.5	Informazioni e commenti aggiuntivi	64

L'esame di base del liquido seminale è quello che ogni laboratorio che analizza gli eiaculati umani dovrebbe eseguire. Le tecniche qui descritte sono concepite per fornire la migliore integrazione tra massima affidabilità e praticità dell'esecuzione. Anche se ci possono essere tecniche alternative con risultati simili, è fondamentale che vengano utilizzati metodi comparabili per ottenere una standardizzazione clinica e scientifica. Questo approccio fornisce le basi per un corretto sviluppo della scienza alla base della cura per la riproduzione del maschio.



Tutti gli aspetti della raccolta e dell'esame dell'eiaculato, se i risultati devono fornire informazioni affidabili, devono essere valutati utilizzando delle procedure adeguatamente standardizzate.



2.1 Introduzione

Diversamente dalla maggior parte delle altre secrezioni corporee esaminate ai fini della diagnosi o del follow-up del trattamento, l'eiaculato è una miscela eterogenea di secrezioni che si forma nell'organismo prima di essere espulsa. L'eiaculato è composto da una sospensione concentrata di spermatozoi, immagazzinati negli epididimi, diluiti e mescolati principalmente nell'uretra con il liquido prostatico, quindi con una secrezione proveniente dallo svuotamento delle vescicole seminali [13]. Le frazioni sequenziali di eiaculato non hanno dunque la stessa composizione. Il confronto del volume dell'eiaculato pre- e post-vasectomia rivela che circa il 90% del volume dell'eiaculato è composto da secrezioni provenienti dagli organi accessori [14], principalmente dalla prostata e dalle vescicole seminali, con un contributo minore delle ghiandole bulbouretrali (di Cowper) e degli epididimi.

L'eiaculato ha due grandi parametri quantificabili.

- **Il numero di spermatozoi** riflette la produzione di spermatozoi da parte dei testicoli, la pervietà del sistema di dotti post-testicolari, l'efficacia delle contrazioni della muscolatura liscia negli epididimi e nei vasi deferenti per trasportare attivamente

te gli spermatozoi all'uretra e l'efficienza erettile ed eiaculatoria per espellere un eiaculato ricco di spermatozoi. Questi ultimi aspetti sono influenzati dalla durata e dalla qualità dell'eccitazione sessuale e si realizzano mediante segnali nervosi alle cellule muscolari lisce (vasi deferenti, ghiandole, sfintere della vescica), così come alle cellule muscolari lisce che controllano l'afflusso e il deflusso del sangue tra i tessuti erettili del pene e i muscoli striati bulbocavernosi e perineali.

- **Il volume di fluido apportato dalle varie ghiandole accessorie** riflette l'attività secretoria delle ghiandole e le successive contrazioni della muscolatura liscia che svuotano ciascuna di esse. Queste attività avvengono in risposta alla stimolazione nervosa autonoma provocata dall'eccitazione sessuale e come preparazione all'eiaculazione.

La natura degli spermatozoi (la loro vitalità, motilità e morfologia) e la composizione del plasma seminale sono anch'esse caratteristiche importanti per la funzione spermatica. Ci sono, tuttavia, differenze significative per quanto riguarda l'esposizione degli spermatozoi ai fluidi eiaculatori tra la situazione in vivo e quella che si verifica in vitro.

Come esito del rapporto sessuale, la frazione prostatica iniziale dell'eiaculato, ricca di spermatozoi, può venire in contatto con il muco cervicale che si trova nella vagina [15] senza che avvenga alcun contatto significativo con il resto dell'eiaculato. In laboratorio, al contrario, l'intero eiaculato viene raccolto in un contenitore dove gli spermatozoi vengono intrappolati in un gel costituito da proteine seminali di origine vescicolare. In vitro, questo gel viene successivamente liquefatto dall'azione delle proteasi prostatiche; mentre questo avviene, la sua osmolarità aumenta [13, 16-18].

Alcune evidenze indicano che il volume totale e il contenuto di spermatozoi di un eiaculato variano a seconda delle circostanze in cui l'eiaculato è prodotto: quelli ottenuti mediante masturbazione e raccolti in un contenitore in una stanza vicino al laboratorio possono avere una resa inferiore rispetto a quelli recuperati da preservativi privi di spermicidi usati a casa durante un rapporto [19]. Questa differenza può rispecchiare un diverso livello e una diversa durata dell'eccitazione sessuale, poiché il tempo trascorso a produrre un campione con la masturbazione influenza anche il volume e il contenuto dell'eiaculato [20].

In determinate condizioni di raccolta, le caratteristiche dell'eiaculato dipendono da fattori che di solito non possono essere modificati, come la produzione di spermatozoi da parte dei testicoli, le secrezioni degli organi accessori e una malattia recente (in particolare febbrile), così come da altri fattori, come l'astinenza eiaculatoria, che invece devono essere registrati e considerati nell'interpretazione dei risultati.

I risultati delle misurazioni delle caratteristiche dell'eiaculato ottenute in laboratorio dipendono da quanto segue.

- La raccolta in modo completo o meno dell'eiaculato. Durante l'eiaculazione, le prime frazioni espulse sono principalmente secrezioni prostatiche ricche di spermatozoi, mentre le successive sono composte in prevalenza da liquido seminale vescicolare [13]. Pertanto, perdere la prima frazione (ricca di spermatozoi) dell'eiaculato ha più influenza sui risultati dell'analisi di quanta ne avrebbe la perdita dell'ultima porzione.
- L'attività delle ghiandole sessuali accessorie, le cui secrezioni diluiscono gli spermatozoi epididimali concentrati durante l'eiaculazione [21]. Poiché è influenzata dalla funzione secretiva di altri organi, la concentrazione nemaspermica non riflette in modo diretto la produzione di spermatozoi testicolari. Un indice migliore della capacità di produzione nemaspermica è quindi il numero totale di spermatozoi eiaculati (concentrazione di spermatozoi moltiplicata per volume seminale) [22].

Per esempio, le concentrazioni di spermatozoi negli eiaculati di uomini giovani e anziani possono essere le stesse, ma il numero totale di spermatozoi può essere diverso poiché sia il volume del liquido seminale sia la produzione totale di spermatozoi diminuiscono con l'età, almeno in alcune popolazioni [23].

- Il tempo tra l'eiaculato esaminato e la più recente eiaculazione (periodo di astinenza eiaculatoria o "periodo di astinenza", a volte meno specificamente indicato come di astinenza sessuale). Gli spermatozoi si accumulano negli epididimi fino a quando questi ultimi non sono pieni, poi traboccano nell'uretra e vengono espulsi nell'urina [24, 25]. Poiché un'eiaculazione non è mai sufficiente a svuotare completamente gli epididimi [24], alcuni spermatozoi rimangono dalla precedente, e questo influenza la qualità degli spermatozoi nell'eiaculato [26]. La vitalità nemaspermica e la cromatina non sono influenzate dall'aumento della durata dell'astinenza [27, 28], a meno che la funzione epididimale non sia alterata [29]. Studi approfonditi per determinare la produzione giornaliera di spermatozoi hanno inoltre indicato che sono necessari 2-3 giorni di eiaculazioni giornaliere per esaurire il deposito epididimale di spermatozoi [30, 31]. La raccomandazione basata sull'esperienza clinica di chiedere agli uomini di raccogliere l'eiaculato da esaminare dopo un periodo di 2-7 giorni di astinenza può dunque contribuire ad alta variabilità e a una distinzione non esatta tra risultati normali e anormali. La portata di quest'influenza è difficile da accertare e raramente considerata.

I fattori chiave relativi al paziente che influenzano l'eiaculato comprendono quanto segue.

- Le dimensioni dei testicoli, che influenzano il numero totale di spermatozoi prodotti ogni giorno e quindi indirettamente la quantità di liquido eiaculato [2, 32-34]. Il volume testicolare riflette il livello della capacità spermatogenetica, che è anche legata alla morfologia degli spermatozoi [35].
- Lo stato endocrino [36].
- I farmaci che l'uomo sta assumendo. Per esempio, il trasporto degli spermatozoi dagli epididimi all'uretra dipende dall'attivazione dei recettori alfa-1 delle cellule muscolari lisce dei vasi deferenti; il trattamento con alfa-bloccanti (farmaci antiipertensivi e trattamento sintomatico dell'ipertrofia prostatica) o con antidepressivi selettivi della ricaptazione della serotonina (per esempio, sertralina, fluoxetina, amitriptilina) può inibire la motilità dei deferenti [37], come anche lo svuotamento delle ghiandole sessuali accessorie.
- Gli integratori o i farmaci senza obbligo di prescrizione, per esempio gli steroidi anabolizzanti.

Questi fattori e variabili, per larga parte incontrollabili, contribuiscono alla ben nota variazione nella composizione del liquido seminale tra gli individui [38, 39].

È dimostrato che l'esito di un singolo esame dell'eiaculato è sufficiente per decidere le fasi successive dell'iter diagnostico di un uomo infertile [9]. D'altra parte, per definire il corretto percorso per un individuo, può essere necessario valutare due o tre eiaculati [40-44].

Benché le valutazioni effettuate sull'intera popolazione di spermatozoi dell'eiaculato non possano definire la capacità fecondante dei pochi che raggiungono il sito di fecondazione, l'analisi dell'eiaculato fornisce informazioni essenziali sullo stato funzionale degli organi riproduttivi dell'individuo. Tutti gli aspetti della raccolta e dell'esame dell'eiaculato, se i risultati devono fornire informazioni affidabili – cioè

valide e utili –, devono essere valutati utilizzando delle procedure adeguatamente standardizzate. I metodi descritti in questo capitolo sono procedure accettate e costituiscono le fasi essenziali della valutazione del liquido seminale.

2.2 Sequenza temporale delle fasi dell'esame di base del liquido seminale

L'esame di base del liquido seminale comprende le seguenti fasi (descritte nel dettaglio nelle sezioni successive) [45, 46].

2.2.1 Preparativi e procedure pre-esame

Le procedure pre-esame comprendono:

- fornire le informazioni al paziente;
- raccolta del campione;
- accettazione del campione;
- manipolazione iniziale del campione.

2.2.1.1 Nei primi 5 minuti – Manipolazione iniziale del campione

Per ragioni pratiche conviene valutare il volume del campione mediante pesatura durante la fase di pre-esame.

- È preferibile effettuare la misurazione del volume del liquido seminale in base al peso al momento della ricezione del campione, prima della liquefazione.
- Aspettare il tempo necessario per la liquefazione (di solito non più di 30 minuti).

2.2.2 Procedure dell'esame

Le procedure per l'esame dell'eiaculato si dividono in valutazioni che non possono essere ritardate senza il rischio di introdurre anomalie laboratorio-indotte e valutazioni che possono invece essere fatte successivamente senza che vi sia tale rischio. Questo permette al laboratorio di organizzare le varie fasi dell'esame in modo efficiente senza comprometterne la qualità.

2.2.2.1 Tra 30 e 60 minuti dopo la raccolta dell'eiaculato

- Valutare la liquefazione e l'aspetto macroscopico del liquido seminale.
- Allestire una preparazione a fresco per valutare l'aspetto microscopico, la motilità degli spermatozoi e la diluizione necessaria per valutare la concentrazione di spermatozoi.
- Misurare il pH del liquido seminale (se indicato).
- Valutare la vitalità degli spermatozoi (se la percentuale di cellule mobili è bassa).

- Preparare delle diluizioni per valutare la concentrazione di spermatozoi.
- Preparare strisci per valutare la morfologia degli spermatozoi; fissare tali strisci.
- Eseguire il test di reazione mista antiglobulina (MAR test) per gli anticorpi antispermatozoo (se necessario).
- Valutare la presenza di cellule leucocitarie (se necessario).
- Centrifugare le aliquote di liquido seminale (se devono essere analizzati i marcatori biochimici).

2.2.2.2 Entro 3 ore dalla raccolta dell'eiaculato

- Determinare la concentrazione di spermatozoi (può essere fatto più tardi, preferibilmente lo stesso giorno).
- Inviare i campioni al laboratorio di microbiologia (se necessario).

2.2.2.3 Più tardi, lo stesso giorno o il giorno successivo

- Colorare e valutare gli strisci per la morfologia degli spermatozoi.
- Eseguire l'analisi biochimica dei marcatori delle ghiandole accessorie (opzionale).

2.2.3 Procedure post-esame

- Calcoli.
- Presentazione dei risultati.
- Approvazione dei risultati per il rilascio.

2.3 Procedure pre-esame

Questa sezione descrive tutte le fasi necessarie prima di iniziare le analisi vere e proprie.

2.3.1 Fornire le informazioni al paziente

- Al paziente devono essere date chiare istruzioni verbali e scritte sulla raccolta del campione di liquido seminale. Le stesse informazioni dovrebbero essere date dal medico.
- La principale raccomandazione è che la raccolta dell'eiaculato avvenga mediante masturbazione.
 - Il coito interrotto non è raccomandato a causa del rischio di raccolta incompleta e di contaminazione con liquido vaginale e cellulare, e dovrebbe essere usato solo in casi eccezionali.
 - Preservativi speciali per le indagini sulla fertilità possono essere un'alternativa, in circostanze eccezionali, ma l'intero eiaculato non sarebbe disponibile per l'esame e il campione potrebbe essere contaminato dal contatto con la

pele del pene e in una certa misura anche dal liquido vaginale e dalle cellule all'esterno del preservativo. I preservativi contraccettivi non possono essere usati a causa della presenza di sostanze spermicide. I normali preservativi in lattice non devono essere utilizzati per la raccolta del liquido seminale perché contengono agenti che interferiscono con la motilità degli spermatozoi [47].

- I lubrificanti devono essere evitati, poiché possono contaminare l'eiaculato e alterarne le proprietà. Se assolutamente necessario, si devono usare lubrificanti validati non tossici per il liquido seminale.
- L'eiaculato deve essere raccolto completamente e il paziente deve segnalare qualsiasi perdita di ogni frazione del campione.
- L'eiaculato deve essere raccolto dopo un minimo di 2 e un massimo di 7 giorni di astinenza eiaculatoria.
- Per evitare l'esposizione del liquido seminale alle fluttuazioni di temperatura e misurare il tempo tra la raccolta e l'analisi, si raccomanda che il campione venga raccolto in una stanza privata vicino al laboratorio. Idealmente l'esame dovrebbe iniziare entro 30 minuti dalla raccolta, ma in ogni caso non più di 60 minuti dopo.
 - Possono naturalmente esserci esigenze individuali, e ogni individuo dovrebbe essere informato adeguatamente sulle possibilità e sui rischi.
 - Se non viene raccolto nelle vicinanze del laboratorio, il trasporto del campione deve avvenire a una temperatura tra i 20 e i 37°C.
 - Se per qualsiasi motivo il paziente deve raccogliere l'eiaculato in un altro luogo, durante il trasporto il contenitore del campione deve essere tenuto vicino al corpo, sotto i vestiti – per esempio, sotto l'ascella –, ed essere consegnato al laboratorio preferibilmente entro 30 minuti dalla raccolta, ma in ogni caso non più di 50 minuti dopo.

2.3.2 Raccolta del campione

- Prima della raccolta dell'eiaculato, il contenitore del campione deve essere mantenuto a temperatura ambiente, tra i 20 e i 37 °C, per evitare sbalzi di temperatura che potrebbero influenzare gli spermatozoi.
- Il contenitore del campione deve essere sterile, a bocca larga, in plastica, proveniente da un lotto che è stato certificato come non tossico per gli spermatozoi (**Sezione 2.5.10, p. 67**).
- Il contenitore del campione e i corrispondenti fogli di lavoro devono essere etichettati con identificatori che, in combinazione con le procedure per la ricezione del campione e ulteriori manipolazioni, eliminino il rischio di confusione tra campioni e fogli di lavoro. I requisiti legali per i marcatori d'identità dei contenitori possono essere diversi: potrebbero essere il nome del paziente e il codice di identificazione, la data e l'ora della raccolta oppure numeri univoci di identificazione del campione.
- Le seguenti informazioni dovrebbero essere registrate al ricevimento del campione e riportate sul referto finale (**Sezione 8.5, p. 233**):
 - identità del paziente (per esempio, nome, data di nascita, numero di codice personale ecc.) e idealmente conferma, da parte del paziente stesso, che il campione è suo;
 - la lunghezza del periodo di astinenza eiaculatoria;

- la data e l'ora della raccolta;
- la completezza del campione e le eventuali difficoltà nella produzione dello stesso (per esempio, se la raccolta non è stata fatta in laboratorio);
- il volume eiaculato.
- Si applicano condizioni speciali per alcune situazioni specifiche:
 - raccolta sterile per la riproduzione assistita o la crioconservazione (**Sezione 2.5.11, p. 68**)
 - raccolta sterile per l'analisi di tipo microbiologico (**Sezione 2.5.12, p. 68**).

2.3.3 Manipolazione iniziale del campione

- L'eiaculato raccolto dovrebbe essere lasciato liquefare senza inutili ritardi, preferibilmente in un incubatore a 37°C e, se possibile, su una piattaforma di miscelazione orbitale, per facilitare la liquefazione e la miscelazione del campione.
- Il tempo tra la raccolta e l'inizio dell'esame dell'eiaculato dovrebbe essere riportato all'inizio della valutazione macroscopica e presentato nel referto finale. Preferibilmente la valutazione dovrebbe iniziare entro 30 minuti dalla raccolta, ma in ogni caso non più di 60 minuti dopo.
- L'esposizione prolungata in vitro al plasma dell'eiaculato liquefatto influenzerà qualità come la motilità e la morfologia.
- Gli eiaculati possono contenere agenti infettivi pericolosi (per esempio, il virus dell'immunodeficienza umana o HIV, i virus dell'epatite o il virus dell'herpes simplex) e quindi devono essere trattati come un rischio biologico. Linee guida per la sicurezza devono essere seguite rigorosamente (**Sezione 8.2, p. 214**); le buone pratiche di laboratorio sono fondamentali per la sicurezza dello stesso [48].

2.4 Procedure di esame e post-esame

2.4.1 Valutazione del volume dell'eiaculato

La misurazione precisa del volume è essenziale in qualsiasi valutazione dell'eiaculato perché fornisce informazioni sulle funzioni secretorie delle ghiandole sessuali accessorie. Una valutazione affidabile del volume dell'eiaculato è anche necessaria per il calcolo del numero totale di spermatozoi e di cellule non spermatiche nell'eiaculato, nonché della quantità totale di marcatori biochimici.

2.4.1.1 Volume in peso

Il volume si misura meglio pesando il campione nel contenitore in cui è stato raccolto. È preferibile che questo venga fatto al ricevimento di tale contenitore, prima dell'incubazione per la liquefazione. Altri metodi presentano una maggiore imprecisione [51].

1. Utilizzare un contenitore pre-pesato per la raccolta dell'eiaculato, con il peso annotato sul contenitore stesso e sul coperchio.

- I contenitori vuoti dei campioni hanno comunemente pesi diversi, quindi ogni contenitore con coperchio dovrebbe essere pre-pesato singolarmente. Prima che il contenitore venga dato al paziente, il suo peso dev'essere annotato sul contenitore stesso e sul coperchio con un pennarello indelebile. Se si usano delle etichette – per esempio, per i marcatori di identità –, il loro peso dovrebbe essere incluso nel peso a vuoto. I contenitori sterili non dovrebbero richiedere – e non richiedono – di venire aperti per queste procedure.

2. Pesare il recipiente contenente l'eiaculato.

3. Sottrarre il peso del contenitore vuoto.

4. Calcolare il volume dal peso del campione, ipotizzando che la densità del liquido seminale sia di 1 g/ml (Auger et al., 1995) (è stato riportato che la densità del liquido seminale vari tra 1,03 e 1,04 g/ml [49], 1,00 e 1,01 g/ml [50], con una media di 1,01 g/ml [51]).

2.4.2 Valutazione macroscopica

La valutazione macroscopica comprende alcune osservazioni importanti a cui potrebbe non essere possibile assegnare un valore numerico esatto – e dunque non potrebbero essere controllate con i metodi quantitativi tradizionali – ma che possono comunque essere di grande importanza clinica.

2.4.2.1 Aspetto macroscopico dell'eiaculato

Un normale eiaculato liquefatto ha un aspetto macroscopicamente omogeneo, denso/grigio opalescente. Può apparire meno opaco se la concentrazione di spermatozoi è molto bassa; il colore può anche essere diverso, ovvero leggermente giallastro dopo periodi di astinenza più lunghi, rosso-marrone quando sono presenti globuli rossi (emospermia) o giallo più chiaro in un paziente con itterizia o che assume determinati farmaci o vitamine. Se l'eiaculato appare viscoso, totalmente chiaro e incolore, allora può trattarsi di pre-eiaculato proveniente solo dalle ghiandole di Cowper, che gli uomini producono in quantità variabile durante l'eccitazione; in questo caso bisognerebbe parlare con il paziente per capire se è avvenuta una corretta eiaculazione associata all'orgasmo.

2.4.2.2 Liquefazione

Subito dopo l'eiaculazione, nel recipiente di raccolta, l'eiaculato è tipicamente una massa semi-solida coagulata o un grumo simile a un gel. Di solito comincia a liquefarsi (diventare più fluido) a temperatura ambiente entro pochi minuti e a quel punto si osserverà nel fluido una miscela eterogenea di grumi semi-solidi. Man mano che la liquefazione continua, l'eiaculato diventa sempre più omogeneo e acquoso, ma ancora con una viscosità superiore a quella dell'acqua. Nelle fasi finali della liquefazione rimarranno solo piccole aree di coagulazione.

Una temperatura di 37°C facilita la liquefazione; anche un lento movimento circolare del contenitore del campione aiuta la liquefazione a completarsi. Se non si utilizza un vassoio mobile (miscelatore orbitale) durante la liquefazione, è essenziale che il contenitore venga fatto roteare lentamente per 15-30 secondi prima di iniziare la valutazione macroscopica della liquefazione.

A temperatura ambiente, la liquefazione completa dell'eiaculato si ottiene normalmente entro 15-30 minuti.

- Se la liquefazione non è completa entro 30 minuti, questo dovrebbe essere annotato e riportato nel referto finale. L'eiaculato potrebbe poi essere lasciato a 37°C per altri 30 minuti.
- Se la liquefazione non è completa dopo 60 minuti, anche questo dovrebbe essere riportato nel referto finale.
- I normali eiaculati liquefatti possono contenere alcuni granuli gelatinosi (corpi gelatinosi) che non si liquefanno e che sembrano non avere alcun significato clinico. La presenza di filamenti di muco però può interferire con l'esame dell'eiaculato e dovrebbe quindi essere annotata nel referto finale.

Ulteriori informazioni sui **problemi di liquefazione** sono fornite nell'ultima parte di questo capitolo.

2.4.2.3 Viscosità del liquido seminale

Dopo la liquefazione, la viscosità dell'eiaculato può essere valutata aspirandolo delicatamente mediante una pipetta di plastica monouso a foro largo (circa 1,5 mm di diametro), verificata come non tossica per gli spermatozoi e, se necessario, sterile, lasciando cadere il liquido seminale per gravità e osservando la lunghezza del filamento che si genera dalla caduta della goccia.

Un normale eiaculato liquefatto cade formando piccole gocce separate. Se la viscosità è anormale, la goccia formerà invece un filamento lungo più di 2 cm.

2.4.2.4 Odore dell'eiaculato

Nei diversi operatori c'è una notevole variabilità nella capacità di percepire l'odore normale di un eiaculato umano [45]. L'informazione di un forte odore di urina o di putrefazione può essere di importanza clinica; per questo è importante annotarlo nel referto.

2.4.2.5 PH dell'eiaculato

Il pH dell'eiaculato dipende dai contributi della secrezione prostatica acida e della secrezione vescicolare, che è alcalina. Nell'eiaculato non c'è un controllo efficiente del pH del plasma. In vitro, si verificherà una perdita continua di CO₂ che comporterà un aumento graduale del pH. L'interesse clinico nei confronti del pH dell'eiaculato è basso. Se il pH dev'essere valutato, questo andrebbe fatto in un momento specifico, preferibilmente 30 minuti dopo la raccolta, ma in ogni caso non più di 60 minuti dopo l'eiaculazione.

Per i campioni normali, si dovrebbero usare delle strisce per il test del pH dell'intervallo 6,0-10,0.

1. Mescolare bene il campione seminale.

2. Spandere una goccia di liquido seminale in modo uniforme sulla striscia pH.

3. Attendere che il colore della zona impregnata diventi uniforme (< 30 secondi).

4. Confrontare il colore della striscia con vari range riportati per leggere il pH.

Un valore di pH inferiore a 7,2 può essere indicativo di una mancanza della componente vescicolare seminale, che è alcalina, oppure può essere dovuto a contaminazione con urina.

2.4.3 Preparazione per l'indagine microscopica

Affinché i risultati dell'indagine microscopica risultino affidabili, è essenziale che le aliquote esaminate siano rappresentative dell'intero eiaculato. La natura dell'eiaculato liquefatto, che è più viscoso dell'acqua, rende molto problematico il prelievo di un campione rappresentativo di spermatozoi per l'analisi. Se il campione non è ben mescolato, l'analisi di due aliquote separate non sarà probabilmente rappresentativa dell'intero eiaculato e potrà mostrare differenze marcate nella concentrazione, motilità, vitalità e morfologia degli spermatozoi. Anche se l'eiaculato liquefatto è macroscopicamente omogeneo, piccole aliquote possono avere una composizione molto diversa.

2.4.3.1 Miscelazione dell'eiaculato

Prima di prelevare un'aliquota di liquido seminale per qualsiasi valutazione, mescolare bene il campione nel contenitore originale, ma non così vigorosamente da creare bolle d'aria. La miscelazione può essere ottenuta ponendo il contenitore del campione, durante la liquefazione, su un vassoio mobile in un incubatore a 37°C. In assenza di un miscelatore orbitale, una miscelazione base può essere ottenuta manualmente tramite un movimento circolare di circa 15-30 secondi (**Sezione 2.4.2.2, p. 16**).

2.4.3.2 Campionamento rappresentativo

Anche se gli eiaculati liquefatti possono apparire macroscopicamente omogenei, ci possono essere ancora piccoli ma significativi compartimenti con una diversa composizione di spermatozoi e secrezioni. È quindi essenziale:

- utilizzare aliquote replicate di almeno 50 µl per la diluizione per la valutazione della concentrazione di spermatozoi;
- utilizzare aliquote replicate di almeno 10 µl per la valutazione della motilità degli spermatozoi.

Il confronto di tali aliquote replicate è necessario per ridurre il rischio di errori dovuti a un campionamento non rappresentativo. I metodi di confronto sono descritti sotto ogni tecnica di valutazione.

2.4.3.3 Fare una preparazione a fresco

Subito dopo che l'eiaculato è stato adeguatamente miscelato (**Sezione 2.4.3.1**), rimuovere il volume appropriato, senza lasciare agli spermatozoi il tempo di depositarsi sul fondo della sospensione. Rimescolare sempre il campione di liquido seminale prima di prelevare le aliquote di replicato. Le valutazioni della motilità in

replicato devono essere fatte su due diverse preparazioni a fresco appena allestite (cfr. **Preparazione a fresco - principi**, p. 65).

1. Mettere un'aliquota di 10 µl ben miscelata su un vetrino pulito, preferibilmente preriscaldato a 37°C (per esempio, nell'incubatore di campioni).
 - Fare attenzione a evitare che si formino e intrappolino bolle d'aria tra il vetrino coprioggetto e il vetrino.
2. Posizionare un vetrino coprioggetto da 22×22 mm, facendolo cadere orizzontalmente sopra la goccia con attenzione. Il peso del vetrino coprioggetto spanderà il campione (usare quindi un vetrino coprioggetto di peso #1½).
3. Valutare la preparazione a fresco appena fatta non appena il contenuto si è stabilizzato.
 - Se il movimento non cessa entro un minuto dall'applicazione del vetrino coprioggetto, è necessario effettuare una nuova preparazione a fresco.

2.4.4 Valutazione al microscopio

Per la valutazione di tutti i preparati a fresco è necessario un microscopio dotato di ottica a contrasto di fase (**Sezione 8.3**, p. 221 per come impostare un microscopio).

2.4.4.1 Basso ingrandimento

Un esame microscopico iniziale prevede l'osservazione dell'aliquota di eiaculato preparato a un ingrandimento totale di 100x (ovvero la combinazione di un obiettivo 10x con un oculare 10x).

Questo fornisce una panoramica del campione, per ravvisare se gli spermatozoi sono distribuiti uniformemente nella preparazione, se sono presenti e visibili eventuali filamenti di muco e se c'è aggregazione o agglutinazione di spermatozoi. In caso di distribuzione non uniforme, la causa potrebbe essere:

- miscelazione insufficiente;
- alta viscosità;
- liquefazione insufficiente;
- raggruppamento degli spermatozoi.

2.4.4.2 Alto ingrandimento

La preparazione dovrebbe poi essere valutata con un ingrandimento totale di 200x o 400x (ovvero la combinazione di un obiettivo 20x o 40x con un oculare 10x). Questo permette:

- la valutazione della motilità nemaspermica;
- la determinazione della diluizione necessaria per una valutazione accurata del numero di spermatozoi (**Sezione 2.4.4.3**);

- la determinazione della presenza di cellule diverse dagli spermatozoi (per esempio, cellule epiteliali) o "cellule rotonde" (leucociti e cellule germinali immature) che richiedono un'ulteriore valutazione.

2.4.4.3 Scelta della corretta diluizione per la conta nemaspermica

La diluizione dell'eiaculato necessaria per permettere un calcolo accurato della concentrazione di spermatozoi è valutata in base al numero di spermatozoi osservati in un intero campo microscopico ad alto ingrandimento. Si dovrebbero usare almeno 50 µl di eiaculato ben miscelato e il volume totale della sospensione nemaspermica dovrebbe essere di almeno 200 µl (il calcolo dell'area del campo è descritto nella **Sezione 2.5.9, p. 67**).

Se non si rilevano spermatozoi, occorre esaminare una seconda preparazione a fresco replicata. Se non si trovano spermatozoi nel secondo preparato, si deve procedere come riportato nella **Sezione 2.4.8.8, p. 35**. La **Tabella 2.1** è stata sviluppata per assicurare l'uso di volumi sufficienti di eiaculato e ottenere volumi finali di sospensioni spermatiche diluite per una gestione adeguata.

Tabella 2.1 Volumi sufficienti di eiaculato e volumi finali di sospensioni spermatiche diluite per una gestione adeguata

Spermatozoi per campo 400x	Spermatozoi per campo 200x	Diluizione	Eiaculato (µl)	Fissativo (µl)
> 200	> 800	1 : 50 (1 + 49)	50	2.450
40-200	160-800	1 : 20 (1 + 19)	50	950
16-40	64-160	1 : 10 (1 + 9)	50	450
2-15	8-64	1 : 5 (1 + 4)	50	200
< 2	< 8	1 : 2 (1 + 1)	100	100

2.4.4.4 Fissativo per diluire le aliquote di eiaculato

Preparare, per esempio, 1 litro di una soluzione acquosa contenente 0,595 M di bicarbonato di sodio e circa 0,14 M di formalina (qualsiasi soluzione liquida di formaldeide è chiamata formalina). La concentrazione finale di formalina è un decimo di quella usata nei laboratori di patologia e citologia. Rispetto alla situazione in tali laboratori, l'evaporazione della formalina dai preparati della camera di conteggio è estremamente bassa. Vanno seguiti i regolamenti locali sulla manipolazione della formalina, ma la manipolazione in cappe di ventilazione è probabilmente obbligatoria solo per la preparazione della soluzione stock a bassa concentrazione.

1. Sciogliere 50 g di bicarbonato di sodio (NaHCO_3) in circa 500 ml di acqua distillata, aggiungere 10 ml di soluzione di formaldeide al 36-40% e aggiungere acqua fino a ottenere un volume finale di 1.000 ml.
2. Se lo si desidera, aggiungere 0,25 g di blu trypan (indice di colore 23859) o 5 ml di violetto di genziana saturo (> 4 mg/ml) (indice di colore 42555) per evidenziare le teste degli spermatozoi e facilitare il corretto caricamento delle camere di conteggio.
3. Conservare a 2-8°C per un massimo di 12 mesi. Se si formano cristalli nella soluzione, passarla attraverso un filtro da 0,45 µm prima dell'uso.

2.4.4.5 Diluizione per la valutazione del numero di spermatozoi

La diluizione con un fissativo è necessaria per immobilizzare gli spermatozoi (gli spermatozoi immobili sono più facili da contare in modo accurato rispetto a quelli mobili). La diluizione è importante anche per creare un campione più acquoso per un caricamento più affidabile dell'emocitometro. Almeno 50 µl di eiaculato dovrebbero essere mescolati con la soluzione diluente per garantire una rappresentatività affidabile e un volume della sospensione sufficiente per un'accurata miscelazione del campione (la miscelazione al vortex è possibile dopo la fissazione). La diluizione appropriata è decisa durante l'esame microscopico iniziale.

1. Utilizzare una pipetta a spostamento d'aria per collocare la quantità appropriata di fissativo in due vials di diluizione.
2. Mescolare accuratamente il campione di liquido seminale senza fare bolle.
3. Utilizzare una pipetta a spostamento positivo per prendere un volume di liquido seminale esatto per la diluizione.
4. Pulire l'esterno della punta della pipetta dal liquido seminale, facendo attenzione a non toccare l'apertura; accertarsi che non vi siano bolle d'aria nella punta della pipetta.
5. Immettere il liquido seminale nel fissativo e sciacquare la punta della pipetta aspirando ed espellendo il fissativo. Rimuovere la punta della pipetta con lo stantuffo completamente premuto e miscelare immediatamente la diluizione al vortex, per ridurre il rischio di formazione di precipitati visibili che renderebbero le valutazioni inaffidabili.
6. Mescolare di nuovo bene il campione di spermatozoi e preparare la diluizione replicata seguendo i passaggi precedenti.

2.4.4.6 Valutazione delle aggregazioni nemaspermiche

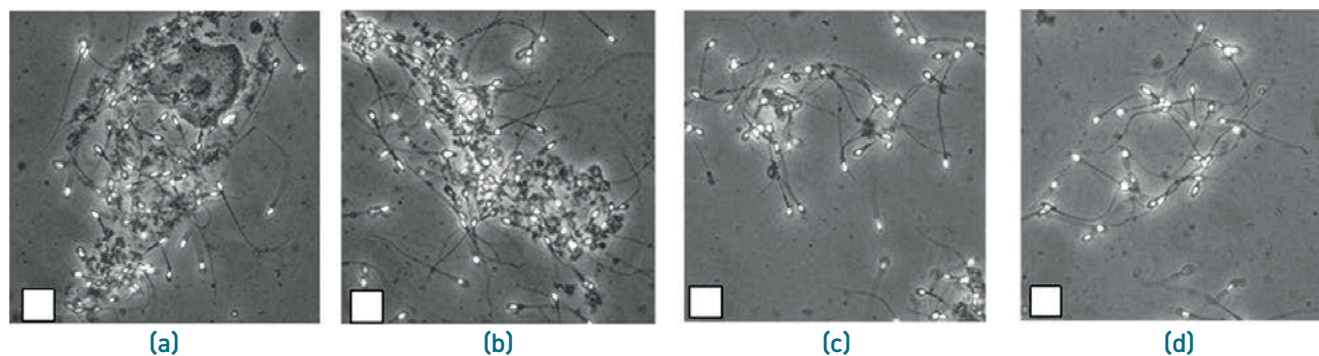
Ci sono due diversi tipi di aggregazioni nemaspermiche che è essenziale valutare separatamente.

Aggregati di spermatozoi

L'adesione di spermatozoi immobili tra loro o di spermatozoi mobili a filamenti di muco, cellule non spermatiche o detriti è definita "aggregazione non specifica" (**Figura 2.1**).

Figura 2.1 Aggregazione non specifica degli spermatozoi nel liquido seminale

Immagine di spermatozoi aggregati con una cellula epiteliale (a), detriti (b) o spermatozoi (c, d).



Microfotografie per gentile concessione di C. Brazil.

Agglutinazioni nemaspermiche

L'agglutinazione si riferisce specificamente agli spermatozoi mobili che si attaccano l'uno all'altro testa a testa, coda a coda o in modo misto. La motilità è spesso vigorosa, con un movimento frenetico, ma a volte gli spermatozoi sono così agglutinati che il loro movimento è limitato. Qualsiasi spermatozoo mobile che si agglutina per la testa, la coda o la metà del corpo dev'essere annotato. Gli spermatozoi mobili attaccati a cellule, a detriti o agli spermatozoi immobili che sono attaccati gli uni agli altri (aggregazione) non devono essere indicati come agglutinazione.

Il principale tipo di agglutinazione, che riflette il grado e il sito di attaccamento, dovrebbe essere registrato [52] (Figura 2.2).

Figura 2.2 Schema dei diversi gradi di agglutinazione nemaspermica

Localizzazione	Grado di agglutinazione			
	1. Isolata (agglutinati < 10 spermatozoi, molti spermatozoi liberi)	2. Moderata (agglutinati 10-50 spermatozoi, spermatozoi liberi)	3. Estesa (agglutinati > 50 spermatozoi, alcuni spermatozoi ancora liberi)	4. Completa (tutti gli spermatozoi agglutinati e agglutinati interconnessi)
A. Testa-testa				
B. Coda-coda, le teste sono libere e si muovono al di fuori delle agglutinazioni				
C. Estremità della coda-estremità della coda				
D. Miste (chiare agglutinazioni testa-testa e coda-coda)				
E. Groviglio (teste e code intrecciate; le teste non sono al di fuori delle agglutinazioni in quanto sono inglobate nelle agglutinazioni coda-coda)				

Tratto da Rose et al., 1976 [52], per gentile concessione.

2.4.5 Elementi cellulari diversi dagli spermatozoi

L'eiaculato contiene cellule diverse dagli spermatozoi, alcune delle quali possono essere clinicamente rilevanti; tra queste vi sono le cellule epiteliali del tratto genitourinario, i leucociti e le cellule germinali immature. Questi ultimi due tipi di cellule sono denominati assieme come "cellule rotonde" [53]. Tuttavia, non è possibile distinguere i leucociti dalle cellule germinali immature con un alto grado di certezza [54] esaminando uno striscio colorato con ingrandimento 1.000x (vedi **Figura 2.16, p. 63; Figura 2.17, p. 70 e Sezione 3.7, p. 119**). Altre tecniche per identificare le cellule infiammatorie attive sono descritte nella **Sezione 3.5, p. 116**. Il valore clinico di questi test non è chiaro, quindi non esistono limiti basati sull'evidenza [55-57]. Vedere anche la **Sezione 2.4.8, p. 28**.

2.4.6 Motilità degli spermatozoi

Il grado di motilità progressiva degli spermatozoi è correlato ai tassi di gravidanza [58-60]. Il numero totale di spermatozoi progressivamente mobili nell'eiaculato ha una significatività biologica e si ottiene moltiplicando il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato per la percentuale di cellule progressivamente mobili. I metodi di valutazione della motilità utilizzati nell'analisi computerizzata del liquido seminale (CASA) sono descritti nella **Sezione 4.5.1, p. 155**.

Se la liquefazione dell'eiaculato è completa entro 30 minuti, le indagini devono iniziare da quel momento. In caso di liquefazione incompleta dopo 30 minuti, l'eiaculato può essere lasciato nell'incubatore a 37°C per altri 30 minuti e poi si dovrebbero iniziare le indagini. Le informazioni sul ritardo o sull'assenza della liquefazione dovrebbero essere annotate nel referto.

La velocità degli spermatozoi mobili è temperatura dipendente. È quindi essenziale standardizzare la temperatura durante la valutazione della motilità. Spesso è più facile controllare una temperatura simile a quella del corpo, ma ciò richiede che il microscopio sia dotato di un tavolino portaoggetti a temperatura controllata, che i vetrini portaoggetto e coprioggetto siano preriscaldati e che il campione sia riscaldato a 37°C anche prima della valutazione. Questi aspetti possono essere facilmente eseguiti quando il campione si liquefa in un incubatore a 37°C. Usare la temperatura ambiente è più problematico, anche perché non è un valore definito e quindi può variare in modo sostanziale.

L'uso di un reticolo oculare con griglia (**Figura 2.3, p. 25**) è raccomandato per facilitare la limitazione dell'area valutata, il che è molto utile in campioni con un alto numero di spermatozoi in ogni campo.

- Iniziare sempre visualizzando diversi campi senza contare, per avere un'idea di quanto siano distribuiti gli spermatozoi. Questo può essere fatto a un basso ingrandimento (100-200× ingrandimento totale).
- Evitare di valutare aree vicine (< 5 mm) al bordo del vetrino coprioggetto per evitare artefatti legati all'essiccazione, che influenzano la valutazione della motilità.
- La scelta del campo dovrebbe essere casuale; evitare di scegliere i campi in base al numero di spermatozoi visti.
- Eseguire la valutazione del vetrino in modo sistematico per evitare di visualizzare più volte la stessa area. Si devono valutare almeno 5 campi diversi, anche se sono stati contati più di 200 spermatozoi in meno di 5 campi.

- Iniziare il conteggio di un dato campo in un istante casuale (non aspettare che gli spermatozoi nuotino nel campo o nella griglia).
- Valutare la motilità di tutti gli spermatozoi in un'area definita del campo. Selezionare la porzione di campo o di griglia da conteggiare in base alla concentrazione di spermatozoi: conteggiare solo la riga superiore della griglia se la concentrazione nemaspermica è alta; conteggiare l'intera griglia se invece è bassa.
- Contare sistematicamente, iniziando dagli spermatozoi progressivi rapidi e lenti per evitare di sovrastimarne il numero. L'obiettivo è quello di contare subito tutti gli spermatozoi progressivamente mobili nella sezione della griglia, senza contare quelli che entrano nella sezione della griglia a conteggio iniziato. In un secondo conteggio si contano gli spermatozoi non progressivi e immobili che rimangono all'interno della sezione della griglia.
- Valutare circa 200 spermatozoi per replicato; ogni replicato è una preparazione a fresco separata.
 - Se si raggiunge un conteggio di 200 spermatozoi prima che tutte le categorie di motilità di un'area siano state segnate, il conteggio deve continuare oltre i 200 spermatozoi fino a che tutte le categorie siano state contate, per evitare distorsioni verso la categoria di motilità conteggiata per prima.
- Confrontare i valori dei replicati per verificare se sono sovrapponibili in modo accettabile. In caso affermativo, procedere con i calcoli; in caso contrario, preparare nuovi preparati. Se tre serie di replicati non sono riuscite a dare risultati vicini in modo accettabile, come risultato viene data una media di tutte e sei le valutazioni, segnalando nel referto che il risultato è la media di valutazioni altamente variabili (indicando l'insolita incertezza, che potrebbe essere il risultato di aliquote incongrue).
 - Per la risoluzione dei problemi di valutazione della motilità, vedere la **Sezione 7.10.3, p. 207**.

2.4.6.1 Categorie di movimento nemaspermico

Si raccomanda un sistema a quattro categorie per classificare la motilità.

I dati clinici provenienti dalla valutazione manuale della motilità degli spermatozoi e dall'analisi computerizzata di questi ultimi dimostrano che l'identificazione degli spermatozoi in rapida progressione è importante [12, 61-70]. Pertanto, le categorie raccomandate sono (con limiti di velocità approssimativi):

- progressiva rapida ($\geq 25 \mu\text{m/s}$): spermatozoi che si muovono attivamente, linearmente o in cerchio, coprendo una distanza, dal punto di partenza a quello di arrivo, di almeno $25 \mu\text{m}$ (o $\frac{1}{2}$ della lunghezza della coda) in un secondo;
- progressiva lenta (da $5 \text{ a } < 25 \mu\text{m/s}$): spermatozoi che si muovono attivamente, linearmente o in cerchio, coprendo una distanza, dal punto di partenza a quello di arrivo, da $5 \text{ a } < 25 \mu\text{m}$ (o almeno dalla lunghezza della testa a meno di $\frac{1}{2}$ della lunghezza della coda) in un secondo;
- non progressiva ($< 5 \mu\text{m/s}$): tutti gli altri modelli di movimenti attivi della coda con assenza di progressione, ovvero nuotare in piccoli cerchi, con la forza flagellare

che sposta la testa meno di 5 μm (una lunghezza della testa), dal punto di partenza a quello di arrivo;

- immobile: nessun movimento attivo della coda.

2.4.6.2 Confronto dei replicati e calcolo dei risultati

- Calcolare separatamente le percentuali (%) delle quattro categorie di motilità per i due replicati e le percentuali di progressiva e mobile.
- Calcolare la media dei due replicati per il gruppo dominante (immobile o mobile).
- Calcolare la differenza tra i replicati per il gruppo dominante.
- Determinare l'accettabilità della differenza sulla base della **Tabella 2.2, p. 26**, che indica la differenza massima attesa tra due percentuali nel 95% dei campioni dovuta a cause casuali. Se la differenza è maggiore del valore indicato nella tabella, vi è meno del 5% di probabilità che sia dovuta a cause casuali.
- Se la differenza tra le percentuali è accettabile, riportare la percentuale media per ogni categoria di motilità: (a) progressiva rapida; (b) progressiva lenta; (c) non progressiva; (d) immobile. Se la differenza è invece troppo alta, prendere due nuove aliquote dal campione di liquido seminale, fare due nuove preparazioni e ripetere la valutazione. Se i replicati differiscono più della differenza accettabile, la valutazione non dovrebbe essere ripetuta più di due volte. In tal caso, può essere data come risultato finale una media delle sei valutazioni, insieme con un commento che il risultato è incerto a causa dell'alta variabilità tra le valutazioni replicate.
- Riportare la percentuale media per ogni grado di motilità al numero intero più vicino.
- La somma dei quattro gradi dovrebbe essere 100. Se è 99 o 101, viene corretto il valore del gruppo dominante per dare la somma di 100. Se la somma è < 99 o > 101 , bisogna eliminare un errore di conteggio o di calcolo.

Figura 2.3 Supporti per valutare la motilità degli spermatozoi

(a) Un reticolo oculare facilita il conteggio degli spermatozoi mobili e immobili. (b) Selezionare sistematicamente i campi visivi per la valutazione della motilità degli spermatozoi, ad almeno 5 mm dai bordi del vetrino coprioggetto.

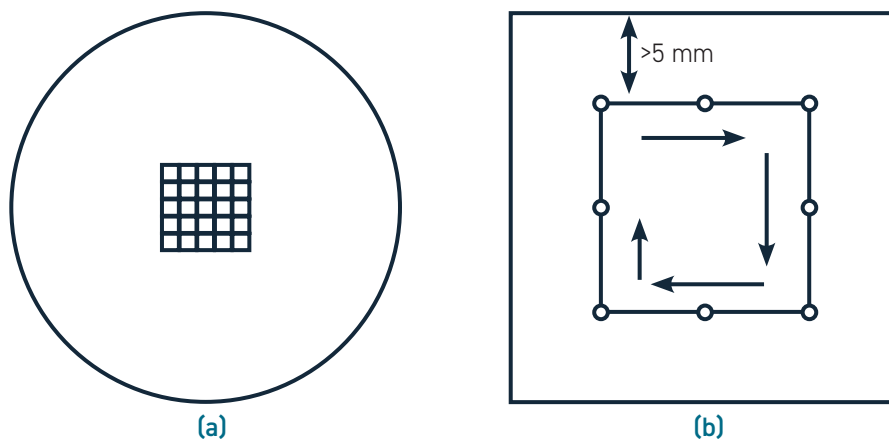


Tabella 2.2 Differenze accettabili (basate su un intervallo di confidenza del 95%) tra due percentuali per una data media determinata da conteggi replicati di 200 spermatozoi (conta totale: 400)

Media (%)	1	2-3	4-6	7-9	10-13	14-19	20-27	28-44	45-55	56-72	73-80	81-86	87-90	91-93	94-96	97-98	99
Differenza accettabile	2	3	4	5	6	7	8	9	10	9	8	7	6	5	4	3	2

2.4.7 Vitalità nemaspermica

La vitalità degli spermatozoi, valutata mediante lo studio dell'integrità della membrana cellulare, può essere determinata di routine per tutti gli eiaculati, ma non è necessaria quando gli spermatozoi mobili sono almeno il 40%. Nei campioni con scarsa motilità, il test di vitalità è importante per discriminare tra gli spermatozoi immobili morti e gli spermatozoi immobili vivi. La presenza di un'alta percentuale di cellule vive ma immobili può essere indicativa di difetti strutturali nel flagello [71, 72], mentre un'alta percentuale di cellule immobili e morte può indicare una patologia dell'epididimo [73, 74] o una reazione immunologica associata a un'infezione.

La percentuale di spermatozoi vivi viene stimata identificando quelli con la membrana cellulare intatta grazie alla mancanza di colorante (le cellule morte hanno la membrana plasmatica danneggiata, il che permette l'ingresso di colorazioni verso cui la membrana è normalmente impermeabile) o al rigonfiamento ipotonico. Il test raccomandato per uso diagnostico è il test eosina-nigrosina. I **test di vitalità alternativi** sono descritti alla fine di questa sezione.

La vitalità nemaspermica deve essere valutata il prima possibile dopo la liquefazione del campione di liquido seminale, preferibilmente entro 30 minuti, ma in ogni caso non più di 60 minuti dopo l'eiaculazione, per limitare gli effetti deleteri sulla vitalità della disidratazione o dei cambiamenti della temperatura.

2.4.7.1 Test di vitalità con eosina-nigrosina

Questa tecnica di colorazione a una fase utilizza la nigrosina per aumentare il contrasto tra lo sfondo e le teste degli spermatozoi, il che rende questi ultimi più facili da distinguere. Permette anche di conservare i vetrini per una successiva rivalutazione, per motivi di formazione e controllo di qualità [75, 76].

Preparazione dei reagenti

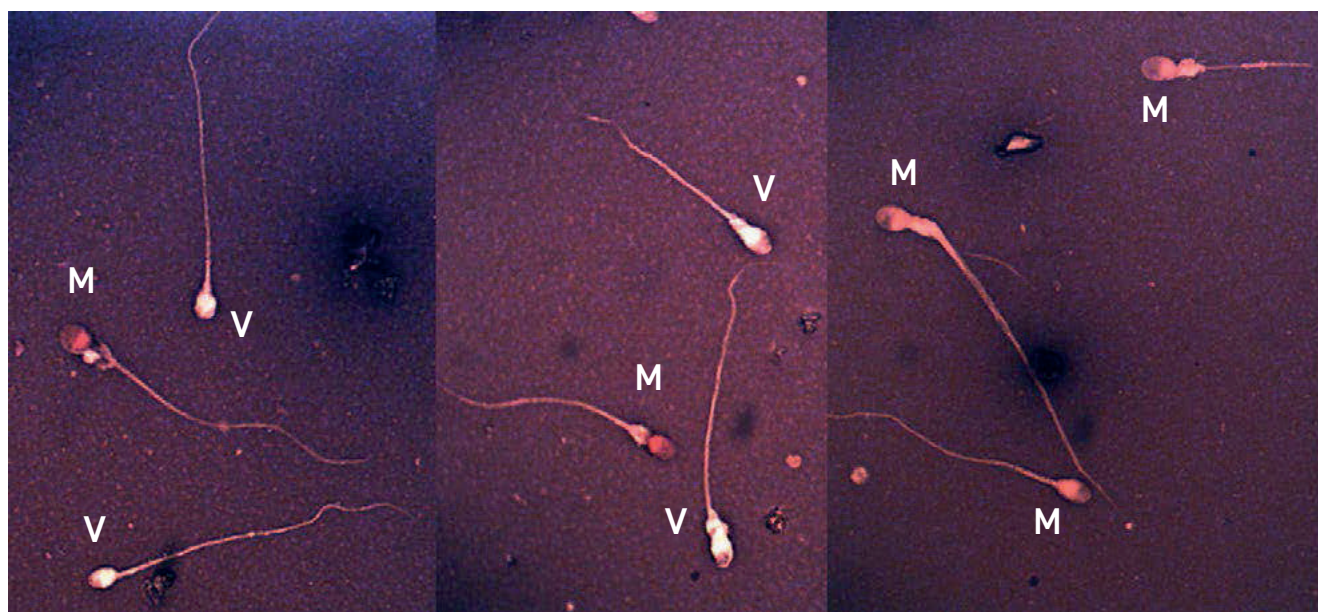
1. Eosina Y: sciogliere 0,67 g di eosina Y (indice di colore 45380) e 0,9 g di cloruro di sodio (NaCl) in 100 ml di acqua distillata.
2. Eosina-nigrosina: aggiungere 10 g di nigrosina (indice di colore 50420) ai 100 ml di soluzione di eosina Y.
3. Far bollire la sospensione, poi lasciarla raffreddare a temperatura ambiente.
4. Filtrare attraverso carta da filtro (per esempio, 90 g/m²) per rimuovere i precipitati grossolani e gelatinosi; conservare in una bottiglia di vetro scuro sigillata.

Procedura

1. Mescolare bene il campione di liquido seminale.
2. Prelevare un'aliquota di 50 µl di liquido seminale, mescolare con un uguale volume di sospensione di eosina-nigrosina (per esempio, in un pozzetto della piastra di colorazione in porcellana o in una vial) e attendere 30 secondi.
3. Fare uno striscio su un vetrino e lasciarlo asciugare all'aria.
4. Esaminare immediatamente dopo l'asciugatura (vi è però il rischio di contaminazione dell'obiettivo con la nigrosina) o più tardi, dopo il montaggio con un mezzo di montaggio permanente non acquoso.
5. Esaminare il vetrino con ottica in campo chiaro a 1.000x e a immersione in olio.
6. Contare il numero di cellule colorate (morte) o non colorate (vive) con l'aiuto di un contacellule da laboratorio (**Figura 2.4**).
7. Per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso, valutare almeno 200 spermatozoi [77].
8. Per la risoluzione di problemi associati alle valutazioni di vitalità, vedere **Sezione 7.10.4, p. 208**.

Figura 2.4 Striscio di eosina-nigrosina osservato in campo chiaro

Gli spermatozoi con la testa rossa o rosa scuro (M) sono considerati morti, mentre quelli con la testa bianca (V) sono considerati vivi.



Microfotografia per gentile concessione di L. Björndahl.

Classificazione

1. La nigrosina determina uno sfondo scuro, che rende più facile distinguere gli spermatozoi debolmente colorati.
2. Con l'ottica in campo chiaro, gli spermatozoi vivi hanno la testa bianca, mentre quelli morti hanno la testa colorata di rosso o di rosa. Gli spermatozoi con una debole colorazione rosa della testa sono valutati come morti.

- Una colorazione limitata a una parte della regione del collo, mentre il resto della zona della testa non è colorata, va considerata indice di una "lesione della membrana del collo" dello spermatozoo, non un segno di morte cellulare e disintegrazione totale della membrana. Le cellule in questione dovrebbero essere valutate come vive.

2.4.7.2 Calcoli

- Calcolare la percentuale di cellule vive.
- Riportare la percentuale di spermatozoi vitali, arrotondata al numero intero più vicino.

2.4.7.3 Interpretazione dei risultati della vitalità

L'informazione clinicamente interessante è nei campioni con nessuno o pochi spermatozoi mobili.

- Determinare la percentuale di spermatozoi vivi e immobili.
 - Sottrarre la percentuale di spermatozoi mobili (somma di rapida, lenta e non progressiva) dalla percentuale di spermatozoi vivi.
 - La percentuale di spermatozoi vivi e immobili è superiore al 25-30% di tutti gli spermatozoi?
Non c'è un limite netto, ma se più del 25-30% degli spermatozoi è vivo e immobile, la causa potrebbe essere un problema genetico ciliare, e quindi la motilità degli spermatozoi potrebbe non essere migliorabile da nessun trattamento medico.

2.4.8 Conteggio degli spermatozoi e di altre cellule

Il numero totale di spermatozoi per eiaculato e la concentrazione degli spermatozoi sono correlati sia al tempo di attesa per il concepimento [78] sia ai tassi di gravidanza [59, 79] e sono predittori di concepimento [60, 80]. Tuttavia, sono necessari più dati che correlino il numero totale di spermatozoi con il risultato riproduttivo.

Il numero di spermatozoi nell'eiaculato è calcolato a partire dalla concentrazione di spermatozoi e dal volume dell'eiaculato. Per gli eiaculati normali, quando il tratto maschile non è ostruito e il tempo di astinenza è breve, il numero di spermatozoi è correlato al volume testicolare [2, 32, 34, 81] ed è quindi una misura della capacità dei testicoli di produrre spermatozoi [82], della pervietà del tratto maschile e, potenzialmente, del numero di spermatozoi trasferiti alla femmina durante il coito.

La concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato, correlata ai tassi di fecondazione e gravidanza, è influenzata dal volume delle secrezioni delle vescicole seminali e della prostata [83] e non è una buona misura della funzione testicolare.

Il termine "densità spermatica" (massa per unità di volume) non dev'essere usato quando si intende la concentrazione spermatica (numero per unità di volume).

2.4.8.1 Panoramica sul conteggio degli spermatozoi

- Scegliere la diluizione più appropriata partendo dall'osservazione del campione a fresco (**Sezione 2.4.4.3, p. 20**).
- Preparare le diluizioni mescolando volumi esatti di eiaculato e fissativo (**Tabella 2.1, p. 20; Sezione 2.4.4.3, p. 20**).
 - Se un'aliquota di liquido seminale da 50 μl viene prelevata con una pipetta a spostamento positivo e diluita correttamente, è sufficiente effettuare una sola diluizione [84, 85]. Le aliquote replicate della sospensione di spermatozoi devono essere esaminate e confrontate.
- Preparare la camera di conteggio (emocitometro).
- Caricare la camera dell'emocitometro e lasciarla in una camera umida per permettere agli spermatozoi di depositarsi sul fondo.
- Valutare il numero di spermatozoi subito dopo la rimozione dalla camera umida (per evitare gli effetti negativi dell'evaporazione dalla camera di conteggio).
- Contare almeno 200 spermatozoi per replicato.
- Confrontare i conteggi dei replicati per vedere se sono accettabilmente vicini. In caso affermativo, procedere con i calcoli; in caso contrario, preparare nuove diluizioni.
 - In caso di difficoltà nel conteggio degli spermatozoi, vedere la **Tabella 7.14, p. 208**.
- Calcolare la concentrazione in spermatozoi/ml.
- Calcolare il numero di spermatozoi per eiaculato.

2.4.8.2 L'emocitometro di Neubauer modificato

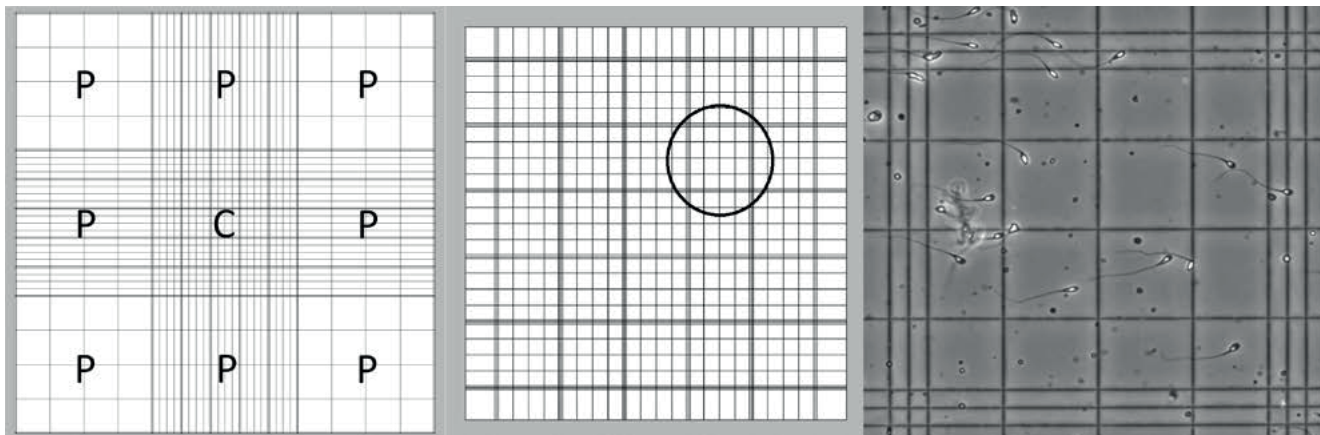
Si raccomanda l'utilizzo dell'emocitometro di Neubauer modificato. I fattori di diluizione per la camera dell'emocitometro di Neubauer modificata sono indicati nella **Sezione 2.4.4.3, p. 20**. Si possono usare altre camere per emocitometri, ma se hanno modelli di griglie e aree diverse sono necessari altri fattori di calcolo. Gli emocitometri usa e getta con camera di Neubauer devono essere convalidati [86].

L'emocitometro di Neubauer modificato ha due camere di conteggio separate, ciascuna delle quali ha una serie di linee orizzontali e verticali, microscopiche, di 3 mm \times 3 mm, incise sulla superficie del vetro. Viene utilizzato con uno speciale vetrino coprioggetto spesso (spessore numero 4; 0,44 mm) che viene appoggiato sopra le griglie ed è sostenuto da colonnine di vetro di 0,1 mm (100 μm) sopra il pavimento della camera. Ogni area di conteggio è divisa in nove griglie di 1 \times 1 mm. Queste griglie saranno indicate con i numeri mostrati in **Figura 2.5, p. 30**.

A seconda della diluizione e del numero di spermatozoi contati, si utilizzano diverse aree della camera per determinare la concentrazione di spermatozoi. In generale, per il conteggio è usata la griglia centrale. Le otto griglie periferiche vengono utilizzate quando nella griglia centrale sono stati contati meno di 200 spermatozoi.

Figura 2.5 L'emocitometro di Neubauer modificato

Schema dell'area inscritta (*riquadro a sinistra*) che mostra tutte le nove griglie presenti in una camera dell'emocitometro: quella centrale (C) e le otto periferiche (P). La griglia centrale consiste di 25 grandi quadrati (*riquadro centrale*). La microfotografia (*riquadro a destra*), parte di una camera piena, mostra uno dei 25 quadrati della griglia centrale (il quadrato cerchiato nel *riquadro centrale*) delimitato da linee triple e contenente 16 quadrati più piccoli. Le otto griglie periferiche hanno la stessa dimensione della griglia centrale, ma le dimensioni e il numero dei rettangoli più piccoli variano. Con una profondità di 100 µm, ciascuna delle nove griglie contiene 100 nl.



Grafica e microfotografia per gentile concessione di L. Björndahl.

Principi di conteggio in una griglia per emocitometro

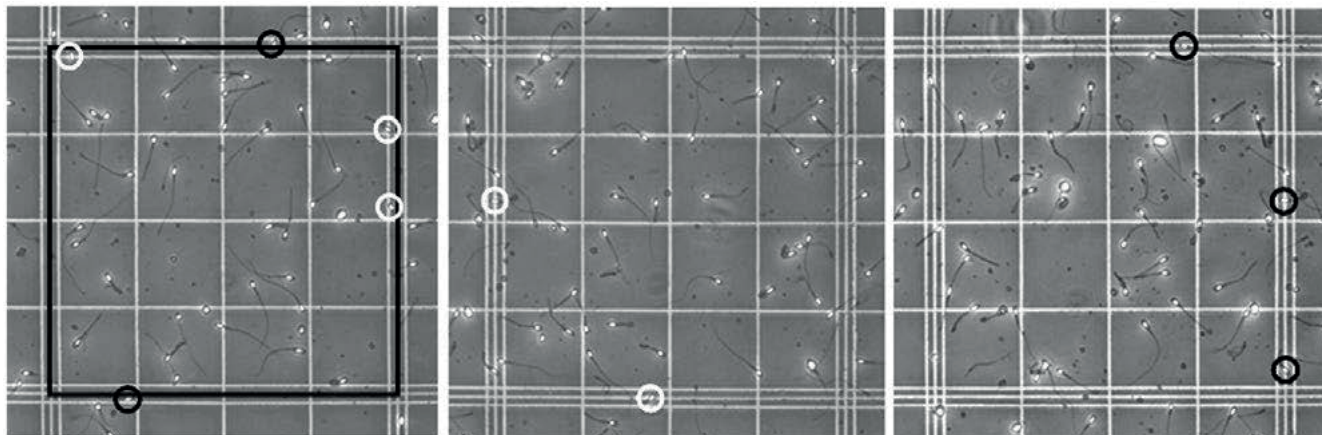
- Si contano solo gli spermatozoi interi (con una testa e una coda).
 - Se ci sono molte code di spermatozoi senza testa (i cosiddetti spermatozoi "acefali") o teste senza coda, la loro presenza deve essere registrata nel referto. La concentrazione può essere stimata in relazione agli spermatozoi interi (per esempio, "45 code senza testa per 100 spermatozoi").
 - Se le teste di spermatozoi con più di una coda sono più di una su cinque (20 su 100 spermatozoi contati), la relativa frequenza dovrebbe essere riportata.
- Il confine di un quadrato grande è indicato dalla centrale delle tre linee.
 - Il conteggio o meno di uno spermatozoo è determinato dalla posizione della sua testa; l'orientamento della coda non è importante.
 - Si contano tutti gli spermatozoi all'interno dei confini (centro della linea tripla) di un quadrato grande (**Figura 2.6, riquadro a sinistra**: i cerchi bianchi si intendono contati).
 - Si contano solo gli spermatozoi a contatto con i confini inferiori o di sinistra, non quelli a contatto con i confini superiori o di destra (**Figura 2.6, riquadro centrale**: i cerchi bianchi s'intendono contati; **riquadro a destra**: i cerchi neri si intendono contati).

2.4.8.3 Preparazione e caricamento delle camere dell'emocitometro

1. Rendere leggermente umida la superficie di fissaggio del vetrino coprioggetto dell'emocitometro ("pilastri della camera").
2. Fissare il vetrino coprioggetto sulle camere di conteggio premendolo saldamente sui pilastri della camera. L'iridescenza (anelli di Newton multipli) tra le due superfici di vetro conferma il corretto posizionamento del vetrino coprioggetto. Più

Figura 2.6 Quali spermatozoi contare nei quadrati della griglia

Il centro delle tre linee definisce il confine del quadrato (*riquadro a sinistra, linea nera*). Si contano tutti gli spermatozoi all'interno del quadrato centrale (*cerchi bianchi*). Uno spermatozoo con la testa sulla linea centrale viene contato solo se quella linea è il limite inferiore o sinistro del quadrato (*riquadro centrale, cerchi bianchi*), non se è la linea superiore o destra (*riquadro a destra, cerchi neri*).



Microfotografie per gentile concessione di C. Brazil.

linee ci sono, migliore è l'adattamento; solo una o due linee indicano che le superfici di vetro non sono abbastanza vicine e causeranno una profondità di camera non corretta. Assicurarsi che il vetrino coprioggetto sia saldamente fissato e non si muova al tocco delicato di una punta di pipetta.

3. Mescolare accuratamente la prima diluizione per 15 secondi con il vortex ad alta velocità. Per evitare la sedimentazione degli spermatozoi, rimuovere immediatamente un volume della sospensione fissata sufficiente a riempire l'intera area sotto il vetrino coprioggetto su una camera di conteggio (in genere circa 10 μl).
4. Toccare con attenzione il bordo del vetrino coprioggetto di una delle camere con la punta della pipetta.
5. Premere lentamente lo stantuffo della pipetta, permettendo alla camera di riempirsi per azione capillare. Il vetrino coprioggetto non deve essere spostato durante il riempimento e la camera non deve essere riempita troppo o troppo poco (quando l'aria occupa parte dell'area della camera).
6. Mescolare la seconda diluizione, come sopra, e prelevare immediatamente una seconda aliquota. Caricare la seconda camera dell'emocitometro seguendo i passaggi precedenti.
7. Tenere l'emocitometro in posizione orizzontale per almeno 10-15 minuti (per consentire la completa sedimentazione degli spermatozoi nella camera profonda 100 μm) a temperatura ambiente, in una camera umida (per esempio, su carta da filtro satura d'acqua in una capsula Petri coperta) per evitare che si secchi.

2.4.8.4 Valutazione del numero di spermatozoi nelle camere di conteggio

Il numero di spermatozoi deve essere valutato in entrambe le camere dell'emocitometro. Se i due valori concordano sufficientemente, le aliquote prelevate possono

essere considerate rappresentative del campione (**Sezione 2.4.3.2, p. 18**). È importante ricordare che l'assenza di spermatozoi dall'aliquota esaminata non significa necessariamente che siano assenti dal resto dell'eiaculato.

1. Esaminare l'emocitometro con l'ottica di contrasto di fase a un ingrandimento 200x (o 400x, se l'ottica del microscopio lo permette).
2. L'obiettivo è quello di contare almeno 200 spermatozoi in ogni replicato, per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso.
3. Per prima cosa valutare il quadrato grande in alto a sinistra nella griglia centrale di un lato della camera di Neubauer modificata. Usare il numero risultante per decidere quanti quadrati grandi della griglia centrale valutare:

- < 10 spermatozoi: contare tutta la griglia (25 quadrati grandi);
- 10-40 spermatozoi: contare 10 quadrati grandi;
- > 40 spermatozoi: contare 5 quadrati (per esempio, i 4 angolari e quello centrale).



Nota: se nel numero predeterminato di quadrati grandi si contano meno di 200 spermatozoi, estendere il conteggio al successivo numero di quadrati grandi di cui sopra. Se tutti i 25 quadrati grandi della griglia centrale sono stati valutati senza raggiungere 200 spermatozoi, considerare il conteggio anche delle griglie periferiche da 1 a 8 (**Figura 2.5, p. 30**).

4. Prendere nota del numero di quadrati grandi o griglie valutati per raggiungere almeno 200 spermatozoi. Lo stesso numero di quadrati grandi o griglie dev'essere valutato nell'altra camera dell'emocitometro.
5. Contare il numero di spermatozoi con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.
6. Passare alla seconda camera dell'emocitometro ed eseguire il conteggio replicato sullo stesso numero di quadrati o griglie del primo replicato, anche se questo produce meno di 200 spermatozoi.
7. Calcolare la somma e la differenza dei due numeri.
8. Determinare se la differenza tra i conteggi replicati è accettabile (**Sezione 2.4.8.5, p. 33**).
 - Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione (**Sezione 2.4.8.6, p. 34**) e il numero totale di spermatozoi per eiaculato (**Sezione 2.4.8.7, p. 35**).
 - Se la differenza è troppo alta:
 - innanzitutto, caricare un nuovo emocitometro dalle diluizioni replicate e contare; se la differenza è ancora troppo alta, contare una terza volta;
 - se la differenza è ancora troppo alta dopo tre conteggi di replicati, viene calcolata la media di tutti i conteggi e sul referto finale viene riportato un commento sull'aumentata incertezza del risultato.

2.4.8.5 Confronto della differenza tra i conteggi dei replicati

Trovare, nella colonna con i range delle somme, la riga che contiene la somma degli spermatozoi contati; se la differenza trovata tra i conteggi dei replicati è inferiore o uguale al corrispondente limite della colonna "Differenze di limite", è possibile accettare le valutazioni dei replicati e calcolare il risultato finale.

La terza colonna dà un'indicazione dell'incertezza del risultato finale basata sul numero di osservazioni (numero di spermatozoi valutati). Con poche osservazioni, i conteggi dei replicati possono essere accettati con una differenza minore, ma il risultato finale è ancora meno certo a causa del numero limitato di osservazioni (vedere **Sezione 8.6, p. 235**).

Tabella 2.3 Confronto della differenza tra i conteggi dei replicati e relazione con l'incertezza del risultato

Range delle somme	Differenza di limite	Errore del risultato finale basato sul numero di osservazioni
969-1.000	61	3,2%
938-968	60	3,3%
907-937	59	3,3%
876-906	58	3,4%
846-875	57	3,4%
817-845	56	3,5%
788-816	55	3,6%
760-787	54	3,6%
732-759	53	3,7%
704-731	52	3,8%
678-703	51	3,8%
651-677	50	3,9%
625-650	49	4,0%
600-624	48	4,1%
576-599	47	4,2%
551-575	46	4,3%
528-550	45	4,4%
504-527	44	4,5%
482-503	43	4,6%
460-481	42	4,7%
438-459	41	4,8%
417-437	40	4,9%
396-416	39	5,0%
376-395	38	5,2%
357-375	37	5,3%
338-356	36	5,4%
319-337	35	5,6%

Range delle somme	Differenza di limite	Errore del risultato finale basato sul numero di osservazioni
301-318	34	5,8%
284-300	33	5,9%
267-283	32	6,1%
251-266	31	6,3%
235-250	30	6,5%
219-234	29	6,8%
206-218	28	7,0%
190-205	27	7,3%
176-189	26	7,5%
163-175	25	7,8%
150-162	24	8,2%
138-149	23	8,5%
126-137	22	8,9%
115-125	21	9,3%
105-114	20	9,8%
94-104	19	10,3%
85-93	18	10,8%
76-84	17	11,5%
67-75	16	12,2%
59-66	15	13,0%
52-58	14	13,9%
44-51	13	15,1%
38-43	12	16,2%
32-37	11	17,7%
27-31	10	19,2%
22-36	9	21,3%
17-21	8	24,3%
13-16	7	27,7%
10-12	6	31,6%
7-9	5	37,8%
5-6	4	44,7%
3-4	3	57,7%
2	2	70,7%
1	1	100,0%

2.4.8.6 Calcolo della concentrazione nemaspermica dalla conta degli spermatozoi

La somma dei due conteggi di replicati accettati viene divisa per un fattore che è determinato dalla diluizione e dal numero di quadrati grandi o griglie valutati in entrambe le camere di conteggio (se sono stati fatti tre tentativi senza raggiungere un accordo sufficiente tra i conteggi dei replicati, viene utilizzata la media delle tre somme).

Tabella 2.4 Calcolo della concentrazione di spermatozoi dalla conta spermatica

Dilui- zione	Numero di <i>quadrati grandi</i> contati in ogni camera			Numero di <i>griglie</i> contate in ogni camera								
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9	
												Valori del fattore di correzione
1 : 2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800	900	
1 : 5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360	
1 : 10	4	8	20	40	60	80	100	120	140	160	180	
1 : 20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1 : 50	0,8	1,6	4	8	12	16	20	24	28	32	36	



Nota: Un emocitometro di Neubauer modificato ha due camere di conta. Ogni camera di conta è composta da nove griglie (3×3) di uguali dimensioni. La griglia centrale consiste di 25 quadrati grandi, ciascuno circondato da una linea tripla, mentre gli 8 campi periferici consistono ciascuno di 16-20 rettangoli.

Se si contano meno di 25 spermatozoi in ogni camera, la concentrazione sarà < 55.555 spermatozoi/ml se si usa la diluizione 1+1 (1 : 2) [87]; l'errore stimato del risultato (vedi **Tabella 2.3, p. 33**) è superiore al 14% (con una diluizione maggiore, il risultato della concentrazione sarà più alto ma con lo stesso errore stimato elevato, > 14%). Riportare il numero di spermatozoi osservati con il commento "Troppo pochi spermatozoi contati per una determinazione accurata della concentrazione (< 56.000/ml)". Vedere anche la **Sezione 2.4.8.8** quando è necessaria una valutazione accurata del basso numero di spermatozoi.

2.4.8.7 Calcolo del numero totale di spermatozoi

- È essenziale calcolare e riportare il numero totale di spermatozoi per eiaculato, poiché questo parametro fornisce una misura migliore della produzione spermatica testicolare e del numero di spermatozoi trasferiti alla partner durante il coito. Il numero totale di spermatozoi per eiaculato si ottiene moltiplicando la concentrazione di spermatozoi per il volume dell'intero eiaculato.
- Il numero totale di spermatozoi dovrebbe essere riportato come un numero intero (senza decimali) di milioni di spermatozoi, anche se la variabilità analitica giustifica l'uso di un decimale. Fanno eccezione i numeri inferiori a 10 milioni, per i quali un decimale può essere accettabile per motivi di chiarezza nel range inferiore dei risultati.

2.4.8.8 Basso numero di spermatozoi

Se non si osservano spermatozoi nei preparati a fresco dei replicati, si può sospettare una mancanza totale di spermatozoi (azoospermia). Anche se è stato suggerito che la definizione dovrebbe cambiare [88, 89], l'azoospermia rimane una descrizione dei risultati nell'eiaculato e non una diagnosi o una base per la terapia. È generalmente accettato che il termine "azoospermia" possa essere usato solo se non si trovano spermatozoi nel sedimento di un campione centrifugato [90].

Tuttavia, bisogna tenere presente che:

- la presenza o meno di spermatozoi nel pellet dipende dal tempo e dalla velocità di centrifugazione [91, 92] e da quanta parte del pellet viene esaminata;
- la centrifugazione a 3.000 g per 15 minuti non raccoglie tutti gli spermatozoi da un campione [93];
- dopo la centrifugazione, la motilità può essere persa [46] e la concentrazione sarà sottostimata [87]; se i conteggi sono stati eseguiti su un campione centrifugato, questo dovrebbe essere chiaramente indicato nel referto finale.

La questione da cui dipende il modo in cui questi campioni sono trattati è se i dati qualitativi sulla presenza e la motilità degli spermatozoi siano sufficienti o se sia necessario un numero preciso di spermatozoi (vedere **Esame degli eiaculati non centrifugati per rilevare gli spermatozoi mobili**, di seguito, ed **Esame di campioni centrifugati per rilevare gli spermatozoi indipendentemente dalla motilità**, p. 41) quando è richiesta la valutazione di un basso numero di spermatozoi.

Anche se si possono ottenere stime approssimative delle basse concentrazioni di spermatozoi utilizzando una diluizione 1+1 (1 : 2) se si esaminano tutte e nove le griglie, l'errore stimato è elevato. Inoltre, l'analisi degli eiaculati così poco diluiti può determinare un'eccessiva quantità di fondo al microscopio. La scansione di camere grandi può richiedere 10-20 minuti, ma il rilevamento rapido degli spermatozoi può essere facilitato dall'uso di un colorante fluorescente [87]. Occorre notare che i valori ottenuti con i metodi seguenti devono essere considerati una stima, perché vengono contati pochi spermatozoi e i volumi possono essere poco accurati.

Esame degli eiaculati non centrifugati per individuare gli spermatozoi mobili

Quando il rilevamento di spermatozoi mobili è essenziale, è importante determinare se le procedure di centrifugazione utilizzate possono danneggiare gli spermatozoi e compromettere la motilità nemaspermica, falsando così i risultati. Se si usano campioni centrifugati, il laboratorio deve assicurarsi che le procedure non danneggino la motilità né la capacità di fecondazione degli spermatozoi.

Stima della concentrazione mediante scansione dei preparati a fresco

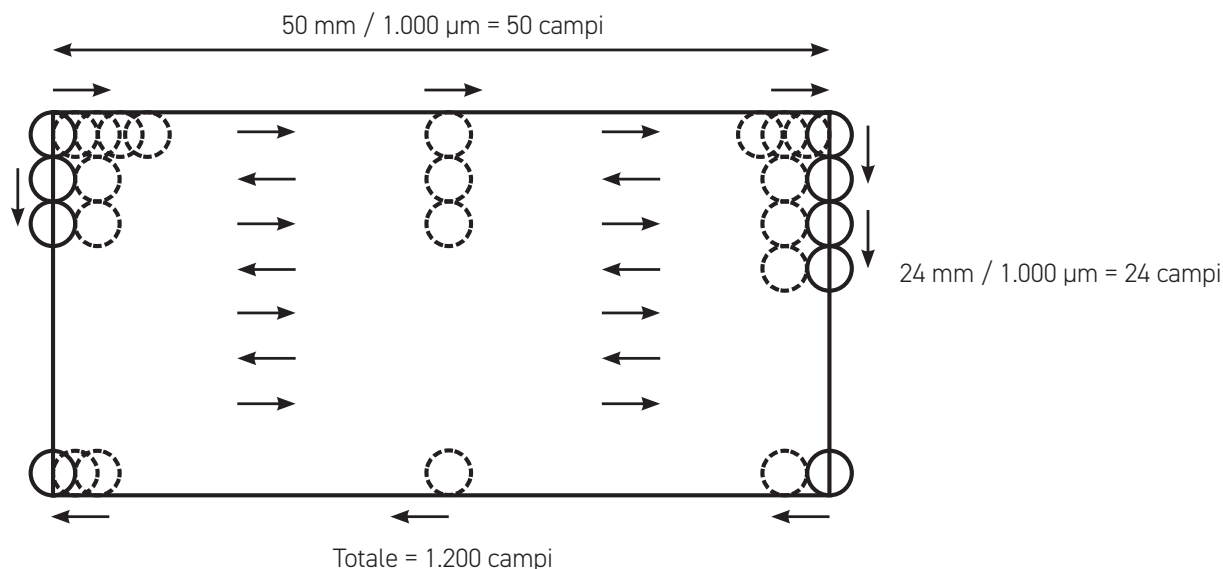
1. Usare due preparati a fresco consecutivi (**Sezione 2.4.3.3, p. 18**).
2. Esaminare l'intero vetrino coprioggetto campo per campo: iniziare da un angolo e fare la lettura lungo l'asse x fino al lato opposto, poi spostarsi di un campo lungo l'asse y e fare la lettura indietro per tutta la larghezza. Continuare in questo modo a zig-zag per fare una ricerca completa e sistematica dell'intera aliquota (**Figura 2.7, p. 37**). Continuare a osservare il vetrino mentre si cambia campo.
 - Con un obiettivo 20x e un oculare 10x di 20 mm di apertura, il campo del microscopio ha un diametro di circa 1.000 μm (**Sezione 2.5.9, p. 67**). Ci saranno quindi circa 484 campi per ogni vetrino coprioggetto da 22×22 mm da esaminare.
3. Dal numero di spermatozoi mobili e immobili osservati in 10 μl o 20 μl si può calcolare una concentrazione approssimativa moltiplicando il volume totale dell'eiaculato per il numero di spermatozoi osservati e per un fattore.

N = numero di spermatozoi osservati
 Vol = volume dell'eiaculato (ml)
 Fattore (100 per 10 μl esaminati, 50 per 20 μl esaminati)
 Concentrazione (spermatozoi/ml) = N × Vol × fattore

4. Il referto deve dichiarare che si tratta di un'approssimazione e non di un valore esatto.
5. Per i calcoli delle probabilità di presenza di spermatozoi nonostante la scansione dei preparati a fresco, vedere **Sezione 2.5, p. 64**.

Figura 2.7 Valutazione dell'intero vetrino coprioggetto per verificare la presenza di spermatozoi mobili

Questa scansione comporta la valutazione di campi microscopici ad alto ingrandimento (200x) per un vetrino coprioggetto di 22x22 mm.



Stima della concentrazione basata sulle osservazioni HPF

Se ci sono meno di quattro spermatozoi per 400x HPF (cioè approssimativamente meno di 1×10^6 /ml), per gli uomini con subfertilità maschile può essere sufficiente segnalare che la concentrazione stimata di spermatozoi è di circa 1×10^6 /ml, indicando con una nota nel referto che è una concentrazione di spermatozoi molto approssimativa e specificando se sono stati visti spermatozoi mobili. Questa stima imprecisa dovrebbe essere fatta solo quando lo scopo della valutazione della concentrazione spermatica è scegliere se richiedere ulteriori indagini cliniche o decidere la tecnica di riproduzione assistita (ART) più adatta per la coppia. Questa valutazione non dovrebbe essere usata per l'analisi di routine del liquido seminale, soprattutto quando si monitorano gli effetti di potenziali agenti contraccettivi maschili e la risposta alla stimolazione endocrina della spermatogenesi. Quando è importante contare una concentrazione di spermatozoi molto bassa o il numero totale di spermatozoi per eiaculato, bisogna contare tutti i nove quadrati grandi come descritto nella **Sezione 2.4.8.4, p. 31**.

Valutazione del basso numero di spermatozoi in camere monouso di grande volume

L'uso di camere di grande volume e profonde 100 µm può aumentare la sensibilità della valutazione della concentrazione [85]. La camera a grande volume ha due camere profonde 100 µm, ognuna delle quali contiene 25 µl. Per ridurre gli errori di campionamento, è necessario contare un numero acritico di spermatozoi, preferibilmente un totale di almeno 400 da conteggi di replicati di circa 200 (**Tabella 2.16, p. 78**).

1. Miscelare bene il campione di liquido seminale.
2. Prelevare un'aliquota di liquido seminale. Se si prevede un basso numero di spermatozoi, la diluizione può non essere necessaria e ciò permette di osservare facil-

mente gli spermatozoi mobili; se si diluisce, invece, diluire 1+1 (1 : 2) con fissativo (**Sezione 2.4.4.4, p. 20**).

- La diluizione 1+1 (1 : 2) per i campioni con meno di 2 spermatozoi alla valutazione iniziale (**Tabella 2.1, p. 20**) è appropriata per un range di concentrazioni di spermatozoi, per consentire la presenza di almeno 200 spermatozoi nell'intera camera.

3. Se è disponibile il microscopio a fluorescenza, la colorazione degli spermatozoi fissati, "diluisti" con un colorante appropriato come il DAPI, o 4',6-diamidin-2-fenilindolo, può aiutarne l'identificazione.

Raggiungere 200 spermatozoi per replicato in una camera monouso di grande volume

- Se si osserva solo uno spermatozoo per campo visivo ad alto ingrandimento nel preparato a fresco iniziale di 4 nL, ci sono teoricamente 0,25 spermatozoi per nL (250/μL o 250.000/ml).
- La camera di grande volume contiene 25 μL, quindi ci sarebbero 6.250 spermatozoi al suo interno. Diluendo il campione 1+1 (1 : 2) si ridurrebbero il fondo e il numero di spermatozoi a 3.125 per camera, abbastanza per un errore di campionamento accettabilmente basso.
- Questo valore, tuttavia, può essere solo una stima approssimativa perché vengono contati pochi spermatozoi e i volumi possono essere imprecisi.

Procedura

1. Prelevare il relativo campione come sopra (diluito o puro).
2. Riempire ogni camera del vetrino con 25 μL di liquido seminale.
3. Conservare la camera in posizione orizzontale per 10-15 minuti a temperatura ambiente in una camera umida (per esempio, su carta da filtro satura d'acqua in una capsula di Petri coperta) per evitare che si secchi. Se si usa la fluorescenza, durante questo tempo il colorante si legherà alle teste degli spermatozoi e le cellule immobilizzate si sedimenteranno sul pavimento della camera.
4. Esaminare il vetrino con ingrandimento 250x.
5. Per mantenere basso l'errore di campionamento, contare almeno 200 spermatozoi in ogni replicato (**Tabella 2.16, p. 78**).
6. Esaminare una camera, campo per campo, in modo sistematico: iniziare da un angolo e fare la valutazione lungo l'asse x fino al lato opposto, poi spostarsi di un campo lungo l'asse y e fare la valutazione indietro per tutta la lunghezza. Continuare in questo modo, percorrendo il vetrino a zig-zag. Continuare a osservare il vetrino mentre si cambia campo. Continuare il conteggio fino a quando non sono stati osservati almeno 200 spermatozoi.
7. Prendere nota del numero di campi valutati per raggiungere almeno 200 spermatozoi. Lo stesso numero di campi sarà contato dall'altra camera.
8. Contare il numero di spermatozoi e di campi con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.
9. Passare alla seconda camera ed eseguire il conteggio del replicato sullo stesso numero di campi (lo stesso volume) del primo replicato, anche se questo produce meno di 200 spermatozoi.

10. Calcolare la somma e la differenza dei due numeri.
11. Valutare l'accettabilità della differenza in base alla **Tabella 2.3, p. 33** (la differenza massima tra due conteggi, che dovrebbe verificarsi nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento).
12. Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione. Se la differenza è troppo alta, fare due nuovi preparati e ripetere la valutazione.
13. Riportare la concentrazione media di spermatozoi arrotondando alla seconda cifra.
14. Moltiplicare la concentrazione di spermatozoi per il volume di liquido seminale (ml) per ottenere il numero totale di spermatozoi per eiaculato.

Calcolo delle basse concentrazioni di spermatozoi dal campo esaminato

La concentrazione di spermatozoi nel liquido seminale corrisponde al loro numero (N) diviso per il volume del numero totale di campi microscopici esaminati (n), con il volume di un singolo campo (v) calcolato come nella **Sezione 2.5.9, p. 67**, moltiplicato per la diluizione. Quindi: $C = (N/n) \times (1/v) \times \text{fattore di diluizione}$.

All'ingrandimento totale 250x, il volume di campo è di 80 nl (**Sezione 2.5.9**), e per una diluizione di 1+1 (1 : 2) la concentrazione è:

$C = (N/n) \times (1/80) \times 2 \text{ spermatozoi/nl} = (N/n) \times (1/40) \text{ spermatozoi/nl}$ (milioni di spermatozoi/ml per eiaculato).

All'ingrandimento totale 400x, il volume di campo è di 20 nl (**Sezione 2.5.9**), e per una diluizione di 1+1 (1 : 2) la concentrazione è:

$C = (N/n) \times (1/20) \times 2 \text{ spermatozoi/nl} = (N/n) \times (1/10) \text{ spermatozoi/nl}$ (milioni di spermatozoi/ml per eiaculato).

Quando l'intera area di entrambe le camere è stata valutata, il numero totale di spermatozoi viene diviso per il volume totale di entrambe le camere (50 µl) e moltiplicato per il fattore di diluizione (2) per ottenere la concentrazione in spermatozoi/µl (migliaia/ml per eiaculato).

Se il campione non è stato diluito, il fattore di diluizione è 1.

Volume osservato per campo visivo ad alto ingrandimento in una camera monouso di grande volume e profonda 100 µm

- Il volume del liquido seminale in ogni campo microscopico dipende dall'area del campo (πr^2 , dove π è circa 3,142 e r è il raggio del campo microscopico) e dalla profondità della camera (qui 100 µm).
- Il diametro del campo microscopico può essere misurato con un micrometro o stimato dividendo il diametro dell'apertura della lente oculare per l'ingrandimento dell'obiettivo.
- Con un obiettivo 40x e un oculare 10x di apertura 20 mm, il campo del microscopio ha un diametro di circa 500 µm (20 mm/40). In questo caso, $r = 250 \mu\text{m}$, $r^2 = 62.500 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196.375 \mu\text{m}^2$ e il volume è $19.637.500 \mu\text{m}^3$ o circa 20 nl.
- Con un obiettivo 25x e un oculare 10x di apertura 25 mm, il campo del microscopio ha un diametro di circa 1.000 µm (25 mm/25). In questo caso, $r = 500 \mu\text{m}$, $r^2 = 250.000 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 785.500 \mu\text{m}^2$ e il volume è $78.550.000 \mu\text{m}^3$ o circa 80 nl.

Sensibilità del metodo

Se ci sono meno di 200 spermatozoi in ogni camera, l'errore di campionamento supererà il 5%. Quando si trovano meno di 400 spermatozoi in entrambe le camere, riportare l'errore di campionamento per il numero di cellule contate.

Se si contano meno di 25 spermatozoi per camera, la concentrazione sarà < 2.000 spermatozoi/ml, con un errore stimato > 14%. Riportare il numero di spermatozoi osservati con il commento "Troppo pochi spermatozoi contati per una determinazione accurata della concentrazione (< 2.000/ml)".

È importante notare che l'assenza di spermatozoi dall'aliquota esaminata non significa necessariamente che siano assenti dal resto del campione.

Esempi pratici

Esempio 1

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2), il replicato 1 risulta contenere 210 spermatozoi in 300 campi, mentre il replicato 2 contiene 300 spermatozoi in 300 campi. La somma dei valori (210 + 300) è 510 in 600 campi e la differenza (300 - 210) è 90. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che la differenza supera quella prevista per il solo effetto della variabilità casuale (44), quindi i risultati vengono scartati e vengono fatte due nuove diluizioni per i replicati.

Esempio 2

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2), il replicato 1 risulta contenere 200 spermatozoi in 400 campi, mentre il replicato 2 contiene 230 spermatozoi in 400 campi. La somma dei valori (200 + 230) è 430 in 800 campi e la differenza (230 - 200) è 30. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che la differenza è inferiore a quella prevista per il solo effetto della variabilità casuale (40), quindi i valori sono accettati.

La concentrazione di spermatozoi nel campione, per una diluizione di 1+1 (1 : 2), è $C = (N/n) \times (2/v)$ spermatozoi/nl. Se $v = 20$ nl (ingrandimento 400x), $C = (430/800) \times (2/20) = 0,0538$ spermatozoi/nl o 54.000 spermatozoi per ml di eiaculato (arrotondando alla seconda cifra).

Esempio 3

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2) il replicato 1 risulta contenere 50 spermatozoi in tutta la camera, mentre il replicato 2 contiene 70 spermatozoi in tutta la camera. La somma dei valori (50 + 70) è 120 nelle due camere e la differenza (70 - 50) è 20. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che la differenza è inferiore a quella prevista per il solo effetto della variabilità casuale (21), quindi i valori sono accettati.

Quando l'intera area di entrambe le camere è stata valutata (per un totale di 50 μ l), la concentrazione del campione, per una diluizione di 1+1 (1 : 2), è $C = (N/50) \times 2$ spermatozoi per μ l = $(120/50) \times 2 = 4,8$ spermatozoi/ μ l o 4.800 spermatozoi/ml di liquido seminale (arrotondando alla seconda cifra). Poiché sono stati contati meno di 400 spermatozoi, riportare l'errore di campionamento per 120 spermatozoi dato nella **Tabella 2.3, p. 33** (9,3%).

Esempio 4

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2), il replicato 1 risulta contenere 20 spermatozoi in tutta la camera, mentre il replicato 2 contiene 18 spermatozoi in tutta la camera. Poiché in ogni camera si trovano meno di 25 spermatozoi, la concentrazione sarà di < 2.000 spermatozoi/ml. Segnalare: "Sono stati visti 38 spermatozoi nei campioni, troppo pochi per una determinazione accurata della concentrazione (< 2.000/ml)".

Esempio 5

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2) non si trovano spermatozoi in nessuno dei due replicati. Poiché in ogni camera si trovano meno di 25 spermatozoi, la concentrazione sarà < 2.000 spermatozoi/ml. Segnalare: "Nessuno spermatozoo è stato visto nei replicati, troppo pochi per una determinazione accurata della concentrazione (< 2.000 /ml)".

Calcolo del numero totale di spermatozoi

Si raccomanda di calcolare e riportare il numero totale di spermatozoi per eiaculato, poiché questo parametro fornisce una misura della produzione spermatica testicolare e del numero di spermatozoi trasferiti alla partner mediante il coito. Tale numero si ottiene moltiplicando la concentrazione di spermatozoi per il volume dell'intero eiaculato.

Esame di campioni centrifugati per rilevare gli spermatozoi indipendentemente dalla motilità

Quando non si osservano spermatozoi in nessuno dei preparati a fresco e lo stato di motilità degli spermatozoi non è importante, il campione può essere centrifugato per determinare se sono presenti spermatozoi in un volume più grande.

1. Mescolare bene il campione di liquido seminale.
2. Prelevare un'aliquota di 1 ml di eiaculato e centrifugare idealmente a 3.000 g per 15 minuti.
3. Rimuovere la maggior parte del surnatante e risospingere il pellet di spermatozoi nei rimanenti 50 μ l circa di plasma seminale.
4. Fare uno o due preparati a fresco da 10 μ l (**Sezione 2.4.3, p. 18**) e valutare come descritto in precedenza (**Sezione 2.4.4, p. 19**).
 - La presenza di spermatozoi nel campione indica:
 - passaggio dal testicolo (o dai testicoli) all'uretra;
 - produzione di spermatozoi gravemente limitata o trasporto del liquido seminale ostacolato.
 - L'assenza di spermatozoi suggerisce:
 - possibile assenza completa di spermatozoi (azoospermia), causata probabilmente da:
 - produzione di spermatozoi estremamente bassa o nulla;
 - nessun passaggio dal/i testicolo/i all'uretra.

2.4.9 Morfologia nemaspermica

L'importanza della valutazione della morfologia degli spermatozoi non risiede solo nel limitato valore prognostico per quanto riguarda gravidanze spontanee o esito dell'ART, ma sta soprattutto nell'informazione diagnostica sullo stato funzionale degli organi riproduttivi maschili, principalmente i testicoli e gli epididimi. Per la valutazione degli organi riproduttivi maschili non è sufficiente determinare solo la percentuale di spermatozoi "normali", ma è importante valutare la morfologia specifica di testa, collo/corpo e coda e la possibile presenza di residui citoplasmatici anomali.

Tutti gli eiaculati umani contengono una vasta gamma di spermatozoi morfologicamente molto diversi. Le prime definizioni di morfologia nemaspermica erano basate principalmente su esperienze di medicina veterinaria e indagini al microscopio.

I criteri qui presentati provengono da studi sulla morfologia degli spermatozoi in grado di penetrare il muco cervicale e legarsi alla zona pellucida.

Il termine spermatozoo "normale" è in qualche modo ambiguo, in grado di causare incomprensioni e persino conflitti accademici. Generalmente, col termine "normale" ci si riferisce a una qualità che è comune, per esempio, in una popolazione, ma questo significato non si applica parlando di "morfologia normale dello spermatozoo" negli esseri umani. Un altro significato è quello per cui "normale" è la cellula (o l'individuo) non affetto da malattia, ma una morfologia normale non indica che uno spermatozoo non possa presentare un'altra causa di patologia (per esempio, coda immobile o DNA danneggiato).

La variabilità morfologica degli spermatozoi umani rende difficile la valutazione, ma le osservazioni sugli spermatozoi recuperati dal tratto riproduttivo femminile, soprattutto nel muco endocervicale postcoitale [94, 95] e dalla superficie della zona pellucida [96, 97] (Figura 2.8, p. 43), hanno contribuito a definire l'aspetto degli spermatozoi potenzialmente fecondi (morfologicamente normali o, meglio, "ideali" o "tipici"). Applicando rigorosamente alcuni criteri di morfologia spermatica, sono state stabilite relazioni tra la percentuale di forme "normali" e vari aspetti della fertilità (tempo di attesa per il concepimento, tassi di gravidanza in vivo e in vitro) [58, 96, 98-103] che possono essere utili per la prognosi della fertilità.

Il sistema di classificazione qui descritto si basa sull'idea di limitare ciò che viene identificato come "tipico" per la sottopopolazione potenzialmente fertile di spermatozoi prevalente nel muco endocervicale. È probabile che la gamma di forme normali sia, tanto per gli uomini fertili quanto per quelli infertili, ben al di sotto la percentuale del 30% [104]. Questo produrrà inevitabilmente soglie basse che discrimineranno tra le popolazioni fertili e infertili; sono stati infatti rilevati limiti di riferimento e soglie del 3-5% di forme normali in studi di fecondazione in vitro (IVF) [99], inseminazione intrauterina (IUI) [101] e fertilità in vivo [105]. Inoltre, va sottolineato che le differenze osservate nelle medie di gruppo tra uomini infertili e subfertili non indicano automaticamente che i "limiti" calcolati possano essere utilizzati per l'interpretazione dei risultati dei singoli uomini. Per ottenere limiti utili è necessario determinare i valori predittivi positivi e negativi. Questo è difficile, per esempio, quando si tratta della percentuale di spermatozoi "normali" (o "ideali" o "tipici"). Per esempio, per distinguere statisticamente tra il 3% e il 5% di forme "normali" per i singoli uomini, devono essere valutati 1.500 spermatozoi da personale altamente qualificato.

Gli spermatozoi legati alla zona pellucida umana mostrano anche una sottopopolazione di spermatozoi morfologicamente simili [103].

Per una migliore comprensione della morfologia degli spermatozoi umani a livello microscopico, può essere utile una revisione completa dell'ultrastruttura e della funzione degli spermatozoi [106].

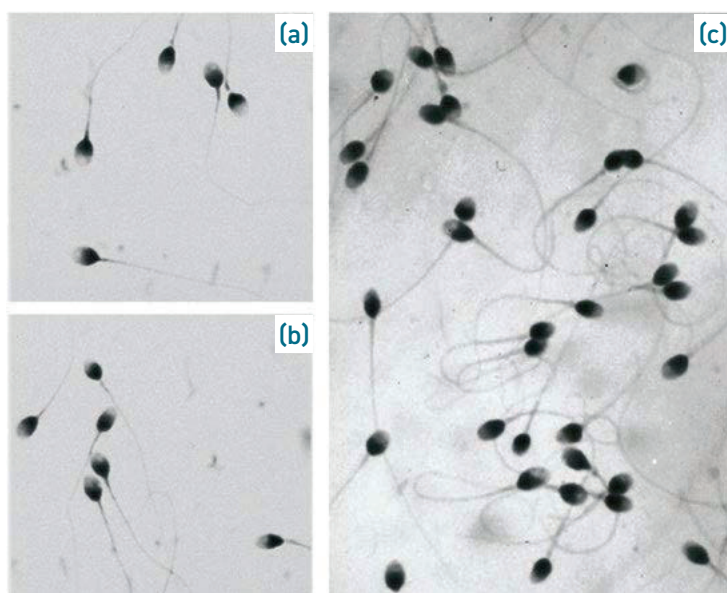
La valutazione pratica della morfologia del liquido seminale comprende le seguenti fasi:

- preparare uno striscio di eiaculato su un vetrino (Sezione 2.4.9.1);
- asciugare all'aria, fissare e colorare il vetrino (Sezione 2.4.9.2, p. 46);

- se il vetrino dev'essere conservato a lungo, montarlo con un vetrino coprioggetto (**Sezione 2.4.9.5, p. 48**);
- esaminare il vetrino con ottica in campo chiaro a ingrandimento 1.000x con immersione in olio (**Sezione 2.4.9.6, p. 48**);
- valutare circa 200 spermatozoi (**Sezione 2.4.9.6**).
- *Per la risoluzione dei problemi delle valutazioni morfologiche, vedere la **Sezione 7.10.2, p. 207**.*

Figura 2.8 Spermatozoi morfologicamente "normali"

(a, b) Spermatozoi con colorazione di Shorr recuperati dalla zona pellucida in vitro. (c) Spermatozoi colorati con Papanicolaou recuperati dal muco endocervicale dopo un rapporto sessuale. Si osservano pochissimi difetti sulla testa degli spermatozoi, sul tratto intermedio o sul tratto principale. Le code possono essere curve, ma non fortemente angolate.



(a, b) Microfotografie riprodotte da Liu et al., 2003 [103], con il permesso della European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE); (c) riprodotta da Menkveld et al., 1990 [95], per gentile concessione.

2.4.9.1 Preparazione di strisci di eiaculato

La rapida aggiunta di fissativo all'eiaculato non permette un'adeguata visualizzazione degli spermatozoi, in quanto questi ultimi sono oscurati dalle proteine seminali denaturate. Per l'analisi morfologica, è consuetudine preparare strisci di eiaculato che vengono asciugati all'aria prima della fissazione e della colorazione. Tuttavia, tale processo porta ad artefatti morfologici, poiché l'asciugatura all'aria degli strisci di spermatozoi è associata a:

- cambiamenti nelle dimensioni degli spermatozoi: gli spermatozoi essiccati, fissati e colorati sono più piccoli di quelli vivi visualizzati nel liquido seminale [107];
- espansione delle teste degli spermatozoi immaturi (Soler et al., 2000);
- perdita di goccioline citoplasmatiche osmoticamente sensibili [108, 109], anche se vengono mantenute grandi quantità di citoplasma residuo in eccesso.

Si dovrebbero eseguire due o più strisci dal campione di eiaculato fresco in caso di problemi con la colorazione o di rottura del vetrino.

1. Mescolare bene il campione di eiaculato.
2. Rimuovere immediatamente un'aliquota, senza lasciare il tempo agli spermatozoi di stabilirsi fuori dalla sospensione.
3. Rimescolare il campione di spermatozoi prima di rimuovere le aliquote replicate (il secondo striscio è da usare come riserva in caso di problemi con la colorazione).

Eiaculati con caratteristiche normali

In questa procedura un'aliquota di liquido seminale viene spalmata su tutta la superficie del vetrino con la tecnica dello striscio (**Figura 2.9**).

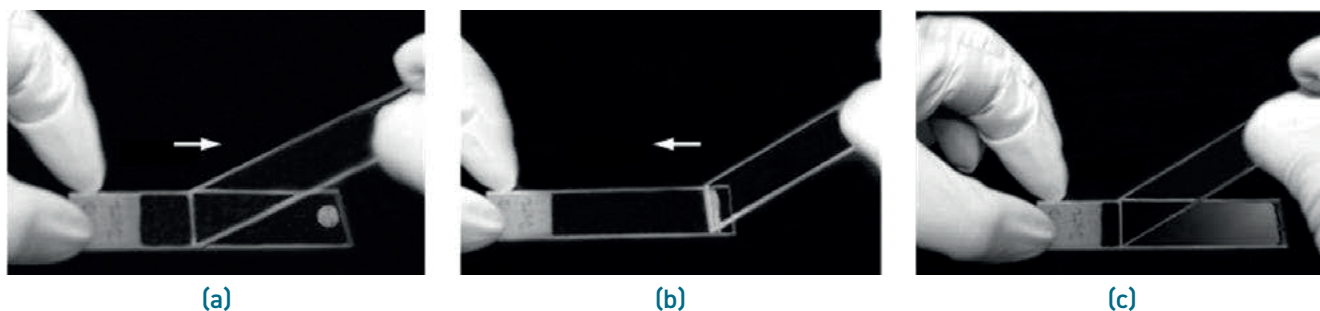
1. Pulire entrambe le superfici dei vetrini smerigliati strofinando vigorosamente con carta velina priva di lanugine o pulendo con etanolo.
2. Etichettare la parte smerigliata con informazioni identificative con due identificatori unici; assicurarsi che la marcatura non possa essere resa illeggibile dal fissaggio, dalla colorazione o dal montaggio.
3. Applicare un'aliquota di 5-10 μl di liquido seminale, a seconda della concentrazione di spermatozoi, all'estremità del vetrino. Usare un secondo vetrino per distribuire la goccia di eiaculato lungo la superficie (**Figura 2.9**). Se il vetrino trascinatore non è congelato, i bordi di entrambe le estremità del vetrino possono essere usati per fare quattro strisci diversi.
4. Lasciare asciugare i vetrini all'aria e colorare come descritto nella **Sezione 2.4.9.2, p. 46**.

La qualità dello striscio (sovrapposizione minima di spermatozoi sul vetrino) dipende da:

- il volume del liquido seminale e la concentrazione di spermatozoi: meno sono gli spermatozoi, meno è probabile che si sovrappongano tra loro;
- l'angolazione del vetrino di trascinamento: più piccolo è l'angolo, più sottile è lo striscio;
- la velocità di trascinamento: più rapido è il movimento, più sottile è lo striscio.

Figura 2.9 Preparazione di uno striscio di liquido seminale normale

Per ottenere la sensibilità del movimento, porre il vetrino trascinatore con un'angolazione di 45° e muoverlo fino a farlo entrare in contatto con l'aliquota di liquido seminale (a), che si diffonderà lungo il bordo del vetrino (b). Spingere il vetrino trascinatore lentamente indietro (per circa 1 secondo) per tutta la lunghezza del vetrino al fine di ottenere lo striscio (c).



Fotografie per gentile concessione di C. Brazil.

Iniziare con un volume di 10 µl, un angolo di 45° e un trascinarsi di circa 1 secondo; questi parametri possono poi essere cambiati, se necessario, per ridurre la sovrapposizione degli spermatozoi sul vetrino [95]. Lo striscio risulta buono quando la viscosità del liquido seminale è bassa, ma spesso non è una tecnica adatta a un eiaculato estremamente viscoso (Figura 2.9).

Eiaculati con caratteristiche anormali

Con basse concentrazioni di spermatozoi (meno di $2 \times 10^6/\text{ml}$), campioni viscosi o carichi di detriti potrebbero essere necessari approcci diversi.

Eiaculati con bassa concentrazione di spermatozoi

Se la concentrazione di spermatozoi è bassa (per esempio, meno di $2 \times 10^6/\text{ml}$), concentrare il campione come segue.

1. Centrifugare il campione a 600 g per 10 minuti.
2. Rimuovere la maggior parte del surnatante.
3. Risospendere il pellet nel resto del surnatante pipettando delicatamente.
4. Ottenere la più alta concentrazione di spermatozoi possibile, non superiore a circa $50 \times 10^6/\text{ml}$.
5. Trattare come un campione normale (Sezione 2.4.9.2, p. 46).



Nota: questa procedura può influenzare la morfologia nemaspermica e il suo utilizzo dev'essere registrato nel referto finale.

Eiaculati viscosi

A volte è difficile preparare buoni strisci perché il plasma seminale è altamente viscoso e ne risultano strisci di spessore non uniforme. I campioni viscosi possono essere trattati allo stesso modo dei campioni poco liquefatti (Sezione 2.5.2, p. 64) oppure lavati.



Nota: queste procedure possono influenzare la morfologia nemaspermica e il loro utilizzo dev'essere registrato.

Eiaculati carichi di detriti o viscosi

I detriti e una grande quantità di materiale particolato (come nei campioni viscosi) possono far sì che gli spermatozoi giacciono con la testa sul bordo e siano dunque difficili da classificare. Questi campioni possono essere lavati come segue.

1. Diluire un'aliquota di eiaculato ben miscelato (0,2-0,5 ml, a seconda della concentrazione di spermatozoi) utilizzando una soluzione salina a 170 mM per ridurre i cambiamenti osmotici agli spermatozoi. A seconda del tempo che passa tra l'eiaculazione e il preparato, l'osmolalità della prima può essere aumentata a 350-400 mOsm/kg. Un mezzo che è isotonico all'osmolalità generale del corpo (290 mOsm/kg) indurrà uno shock ipotonico agli spermatozoi adattati alla maggiore osmolalità nell'eiaculato liquefatto [17, 18].
2. Centrifugare a 800 g per 10 minuti.
3. Rimuovere la maggior parte del surnatante.
4. Risospendere il pellet nel surnatante rimanente (tipicamente 20-40 µl) pipettando delicatamente.

5. Fare uno striscio della sospensione spargendo 5-10 μl di sospensione spermatica su un vetrino portaoggetti con una pipetta Pasteur (**Figura 2.9b**).
6. Scansionare il vetrino con un'ottica a contrasto di fase a un ingrandimento di 400x per assicurarsi che lo striscio sia distribuito in modo uniforme.
7. Controllare che ci siano almeno 40 spermatozoi per campo visivo a ingrandimento 400x senza raggruppamenti o sovrapposizioni.
8. Lasciare asciugare i vetrini all'aria e colorare come descritto nella **Sezione 2.4.9.2**.
 - Se troppi spermatozoi si sovrappongono sul vetrino, fare un altro striscio usando un'aliquota più piccola di eiaculato.
 - Se gli spermatozoi sono troppo scarsi sul vetrino, fare un altro striscio usando un'aliquota più grande di eiaculato.
 - Queste procedure possono influenzare la morfologia nemaspermica e il loro utilizzo dev'essere registrato.

2.4.9.2 Fissazione e colorazione

Una volta che gli strisci di eiaculato sono stati asciugati all'aria, devono essere fissati e colorati per evidenziare i dettagli degli spermatozoi. Si raccomanda l'uso della colorazione Papanicolaou, dato che convalide e valutazioni approfondite per i rigorosi criteri di Tygerberg sono state fatte utilizzando questo tipo di colorazione, che dà la miglior visibilità complessiva di tutte le regioni dello spermatozoo umano [95, 110-113]. L'uso di altre colorazioni, adattate agli spermatozoi umani, dovrebbe essere convalidato in rapporto alla descritta colorazione Papanicolaou.

Con il metodo di colorazione raccomandato con ottica in campo chiaro (illuminazione Köhler), la testa è colorata di blu chiaro nella regione acrosomiale e di blu scuro nella regione post-acrosomiale. Questo metodo colora le regioni acrosomiali e post-acrosomiali della testa, il citoplasma residuo in eccesso, il tratto intermedio e il segmento principale. Il tratto intermedio può mostrare alcune colorazioni rosse e la coda è colorata di blu o di rossastro. L'eccesso di citoplasma residuo, solitamente situato dietro la testa e intorno al tratto intermedio, di norma è colorato di verde; se è colorato di rosso può indicare altre anomalie.

La colorazione Papanicolaou conferisce una buona colorazione anche alle altre cellule. La tecnica di colorazione qui descritta è talvolta utile nella distinzione tra cellule germinali immature e cellule non spermatiche (**Figura 2.15, p. 62** e **Figura 2.16, p. 63**). Le procedure di routine sono state modificate per lavorare senza etere (come fissativo) né xilene (per il montaggio) [114] (**Sezione 2.4.9.3**). I vetrini colorati con la procedura Papanicolaou possono essere montati in modo permanente e conservati per uso futuro nei programmi di formazione e di controllo interno della qualità. Se conservati al buio, dovrebbero essere stabili per mesi o anni.

Ci sono altre tecniche comuni descritte nell'ultima parte di questo capitolo: la colorazione di Shorr e la colorazione rapida. Si raccomanda tuttavia la colorazione Papanicolaou perché è ancora ritenuta la tecnica migliore, e per un uso globale è essenziale che le tecniche e i criteri di valutazione siano standardizzati. Altre tecniche possono essere utilizzate, ma con un'adeguata valutazione e convalida con metodi standard, soprattutto se utilizzate per studi scientifici.

2.4.9.3 Fissazione e fasi della colorazione Papanicolaou¹

Comprende i passaggi indicati nella **Tabella 2.5**.

Tabella 2.5 Fissazione e fasi della colorazione Papanicolaou

FISSAZIONE				
Etanolo	95% (v/v)	almeno 15 minuti	per fissare le cellule, che inoltre disidrata	
COLORAZIONE				
1	Etanolo	80% (v/v) ²	30 secondi	per reidratare gradualmente gli strisci fissati e permettere la colorazione con ematossilina solubile in acqua
2	Etanolo	50% (v/v)	30 secondi	
3	Acqua distillata		30 secondi	per reidratare gli strisci essiccati e permettere la colorazione solubile in acqua
4	Ematossilina di Harris		4 minuti	per colorare il nucleo di blu
5	Acqua distillata		30 secondi	per rimuovere l'ematossilina nucleare non legata
6	Etanolo acido ³		4-8 immersioni ^{4,5}	per rimuovere il colorante non specificamente legato dal citoplasma (decolorazione)
7	Acqua distillata		30 secondi	per ridurre l'acidità e restituire il colore blu al nucleo; può essere usata la soluzione di Scott se l'acqua del rubinetto è insufficiente
8	Acqua fredda di rubinetto		5 minuti	
9	Etanolo	50% (v/v)	30 secondi	per disidratare gli strisci e permettere la colorazione di etanolo solubile arancione G/EA-50
10	Etanolo	80% (v/v)	30 secondi	
11	Etanolo	95% (v/v)	almeno 15 minuti	
12	Colorazione arancione G-6		1 minuto	per colorare il citoplasma di rosa
13	Etanolo	95% (v/v)	30 secondi	
14	Etanolo	95% (v/v)	30 secondi	
15	Etanolo	95% (v/v)	30 secondi	
16	Colorazione verde EA-50		1 minuto	per colorare il citoplasma e i nucleoli di rosa
17	Etanolo	95% (v/v)	30 secondi	per disidratare gradualmente gli strisci colorati e permettere l'uso di materiali di montaggio solubili in etanolo
18	Etanolo	95% (v/v)	30 secondi	
19	Etanolo	100%	15 secondi	
20	Etanolo	100%	15 secondi	
21	Xilene			per permettere l'uso di materiali di montaggio insolubili in etanolo

¹ Colorazioni costituenti di Papanicolaou: disponibili in commercio o vedere **Sezione 8.4.11, p. 230**.

² La fissazione con etanolo causa la disidratazione delle cellule. Pertanto, gli strisci prelevati direttamente dalla fase di fissazione in etanolo al 95% per la colorazione possono aver bisogno di soli 10 secondi nell'etanolo all'80%, mentre gli strisci che si sono asciugati all'aria dopo la fissazione devono rimanere più a lungo (2-3 minuti) nell'etanolo al 50%.

³ Etanolo acido: aggiungere 1 ml di acido cloridrico concentrato a 200 ml di etanolo al 70% (v/v).

⁴ La durata di un'immersione è di circa 1 secondo.

⁵ Iniziare con quattro immersioni; continuare fino a quando i risultati sono soddisfacenti. Questa è una fase critica, poiché la durata della decolorazione altera drasticamente l'intensità della colorazione finale. Se questa fase viene omessa, gli spermatozoi e il fondo saranno scuri. Aumentando il numero di immersioni, gli spermatozoi e il fondo saranno più sbiaditi.

I vetrini possono essere visualizzati montati o non montati (con o senza un vetrino coprioggetto). Il montaggio dei vetrini permette la conservazione a lungo termine di questi ultimi, in modo che possano essere rivalutati, se necessario, e utilizzati nei programmi di controllo interno della qualità (IQC). L'indice di rifrazione (RI) dei montanti dopo l'essiccazione (1,498-1,55) è simile a quello del vetro (1,50-1,58), e la migliore qualità ottica si ottiene con l'uso di olio da immersione, che ha un RI simile (1,515).

2.4.9.4 Trattamento degli strisci seminali colorati prima del montaggio

Esistono due tipi di fluidi di montaggio della preparazione: mezzi di montaggio solubili in etanolo e mezzi di montaggio insolubili in etanolo.

- Utilizzare mezzi di montaggio solubili in etanolo direttamente sugli strisci ancora bagnati di etanolo.
- Se si utilizzano mezzi di montaggio insolubili in etanolo, procedere direttamente dal punto 19, sopra descritto, ai seguenti passaggi (da eseguire in una cappa aspirante):
 - Sostituto dello xilene⁶: etanolo, 1+1 (1 : 2) 1 minuto
 - Sostituto dello xilene 100% 1 minuto
 - Rimuovere un vetrino alla volta dal contenitore per la colorazione con sostituto dello xilene e lasciarlo scolare per soli 1-2 secondi: il vetrino deve essere abbastanza bagnato di xilene al momento del montaggio.

2.4.9.5 Montaggio degli strisci colorati di eiaculato

Montando gli strisci colorati, non c'è rischio di contaminazione degli obiettivi del microscopio.

1. Posizionare il vetrino coprioggetto (24×50 mm o 24×60 mm) su un tovagliolo di carta piegato.
2. Posizionare il montante a forma di manubrio sul vetrino coprioggetto.
3. Posizionare il vetrino, con lo striscio rivolto verso il basso, sul vetrino coprioggetto.
4. Premere sul vetrino per spandere il montante.
5. Lasciare che lo striscio montato si asciughi orizzontalmente, con il vetrino coprioggetto rivolto verso l'alto, in una rastrelliera per l'asciugatura dei vetrini o su carta assorbente, in una cappa aspirante per tutta la notte.

2.4.9.6 Esaminare il preparato colorato

Classificazione della morfologia nemaspermica

Per una valutazione utile della morfologia degli spermatozoi, è essenziale che questa sia eseguita da personale di laboratorio addestrato che esegua regolarmente

⁶ Lo xilene è pericoloso per la salute e non dovrebbe essere usato. Ci sono ora dei sostituti, come NeoClear.

l'IQC. Per fare confronti interlaboratorio e implementare tecniche e limiti decisionali sviluppati in altri centri, è essenziale partecipare anche ad adeguate valutazioni esterne della qualità (EQA). La classificazione qui raccomandata è quella di spermatozoi sia ideali ("spermatozoi tipici in grado di raggiungere il sito di fecondazione") sia anormali, in base al riconoscimento di anomalie in tutte le sedi dello spermatozoo. Per eseguire una corretta valutazione morfologica, il clinico deve conoscere tutti i criteri, il che significa che anche se il laboratorio sceglie di riportare solo la percentuale di spermatozoi tipici o anormali, IQC ed EQA devono valutare la capacità di riconoscere correttamente le anomalie in tutte le sedi. Nel valutare la normalità morfologica dello spermatozoo si devono applicare i criteri che seguono [95, 99, 115].

Gli spermatozoi sono composti da una testa e una coda. La parte della coda che è collegata alla testa e alla parte più spessa che contiene i mitocondri è chiamata tratto o segmento intermedio. Il resto della coda consiste nel tratto o segmento principale (un assonema, o struttura ciliare, circondato da fibre esterne dense), in una guaina fibrosa con colonne longitudinali [116] e nel tratto terminale. Dato che la parte terminale è difficile da vedere con un microscopio ottico, la cellula può essere considerata come composta da una testa (e collo) e da una coda (tratto intermedio e tratto principale). Affinché uno spermatozoo sia considerato senza anomalie, la testa, il tratto intermedio, la coda e il residuo citoplasmatico devono essere considerati normali. Tutte le forme borderline dovrebbero essere considerate anormali.

In generale, la forma della testa sembra essere più importante della dimensione esatta (Sezione 2.5.16, p. 80). Va notato che le teste grandi in maniera anormale non sono normali: esistono spermatozoi diploidi con un'area della testa laterale piatta ~1,6 volte la dimensione di una testa di spermatozoo ideale. Si può valutare al meglio la morfologia normale degli spermatozoi imparando a riconoscerne le sottili variazioni di forma (teste e code di spermatozoi normali/borderline; Figure 2.13, p. 57, 2.14, p. 59 e 2.15, p. 62).

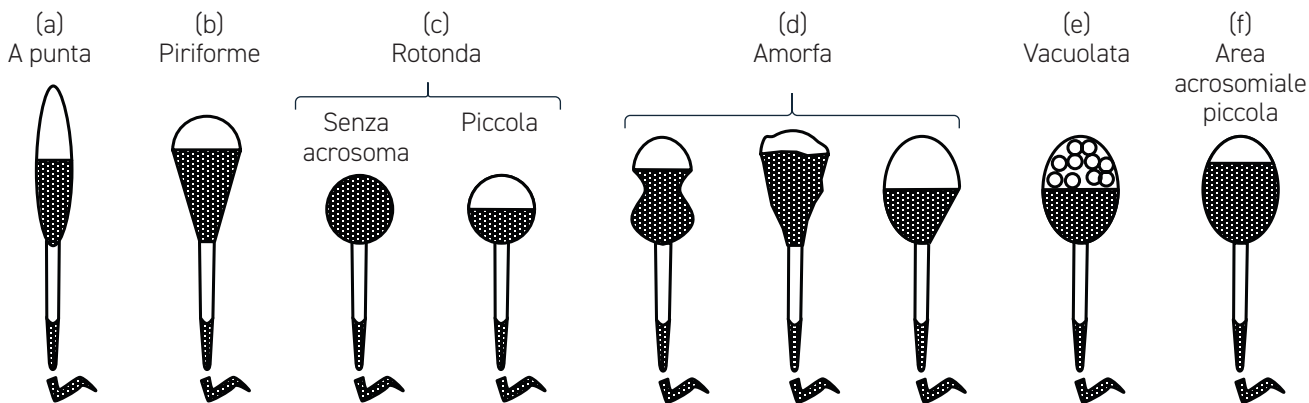
La spermatogenesi difettosa e alcune patologie epididimali sono comunemente associate a un'augmentata percentuale di spermatozoi con forme anomale. I difetti morfologici sono di solito misti. Gli spermatozoi anormali hanno generalmente un potenziale di fecondazione inferiore, a seconda del tipo di anomalia, e possono anche avere un DNA anormale. I difetti morfologici sono stati associati a una maggiore frammentazione del DNA [117], a un'augmentata incidenza di aberrazioni cromosomiche strutturali [118], a cromatina immatura [119] e aneuploidia [120, 121]. L'enfasi è quindi data alla forma della testa, ma per la comprensione della salute del tratto riproduttivo maschile è importante considerare anche la coda dello spermatozoo (tratto intermedio e principale).

I residui citoplasmatici [122] sono componenti normali degli spermatozoi umani fisiologicamente funzionali. Sono osmoticamente sensibili e non si conservano bene con le procedure di routine di asciugatura all'aria [109, 123]. Non sono evidenti nei preparati colorati, dove possono apparire come piccole distensioni del tratto intermedio. Se ingrossati, possono estendersi per tutta la lunghezza del tratto intermedio, come osservato al contrasto di fase, al contrasto di interferenza differenziale e alla microscopia a raggi X di cellule nemaspermiche vive nel muco cervicale e nel terreno di coltura [108, 124]. L'eccesso di residuo citoplasmatico è associato a spermatozoi anormali prodotti da un processo di spermiogenesi difettoso. Quest'eccesso anormale di citoplasma non dev'essere confuso con i residui citoplasmatici più fisiologici, che possono essere osservati nella microscopia diretta dell'eiaculato ma non negli strisci morfologici essiccati, fissati e colorati [16].

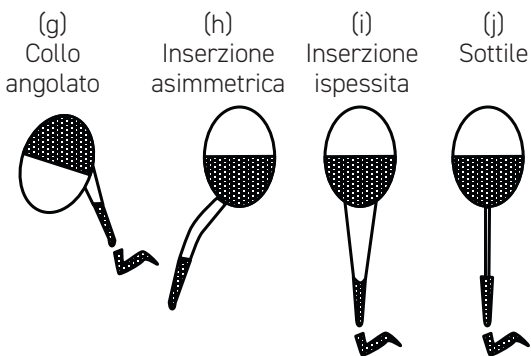
Le code arrotolate (più di 360°, Figura 2.10, p. 50) possono indicare una disfunzione epididimaria [125].

Figura 2.10 Rappresentazione schematica di alcune forme anomale di spermatozoi umani

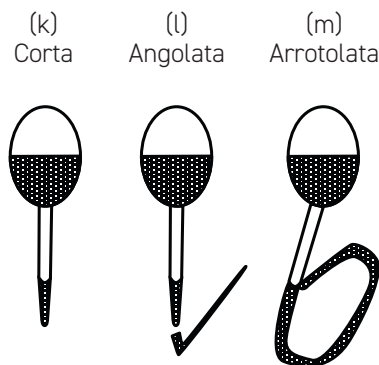
A. Difetti della testa



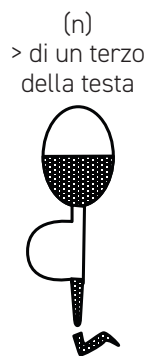
B. Difetti del collo e del tratto intermedio



C. Difetti della coda



D. Residuo citoplasmatico in eccesso



Adattato da Kruger et al., 1993, e riprodotto con il permesso di MQ Medical.

Tabella 2.6 Classificazione della morfologia nemaspermica

Posizione	Aspetto normale (ideale/tipico)	Anomalie
Testa	La testa dovrebbe essere liscia, dai contorni regolari e generalmente di forma ovale. Ci dovrebbe essere una regione acrosomiale ben definita che comprende il 40-70% dell'area della testa [96]. La regione acrosomiale non dovrebbe contenere grandi vacuoli e non più di due piccoli vacuoli, i quali non dovrebbero occupare più di un quinto della testa dello spermatozoo. La regione post-acrosomiale non dovrebbe contenere vacuoli.	<ul style="list-style-type: none"> • acrosoma inferiore al 40% o superiore al 70% dell'area di una testa normale • rapporto lunghezza/larghezza inferiore a 1,5 (rotondo) o superiore a 2 (allungato) • forma piriforme (a forma di pera), amorfa, asimmetrica o non ovale della parte apicale • i vacuoli costituiscono più di un quinto dell'area della testa o si trovano nella zona post-acrosomiale • teste doppie • qualsiasi combinazione tra le caratteristiche precedenti
Tratto intermedio	Il tratto intermedio dovrebbe essere snello, regolare e più o meno della stessa lunghezza della testa dello spermatozoo. L'asse maggiore del tratto intermedio dovrebbe essere allineato con l'asse maggiore della testa dello spermatozoo.	<ul style="list-style-type: none"> • forma irregolare • sottile o spesso • inserimento asimmetrico o angolato alla testa • piegato bruscamente • qualsiasi combinazione tra le caratteristiche precedenti
Tratto principale	Il tratto principale dovrebbe avere un calibro uniforme per tutta la lunghezza, essere più sottile del corpo centrale e lungo circa 45 µm (circa 10 volte la lunghezza della testa). Può essere riavvolto su sé stesso a condizione che non ci sia un'angolazione netta, indicativa di un flagello rotto.	<ul style="list-style-type: none"> • curve fortemente angolate • pieghe lisce • arrotolato • corto (rotto) • larghezza irregolare • code multiple • qualsiasi combinazione tra le caratteristiche precedenti
Residuo citoplasmatico	Le goccioline citoplasmatiche (meno di un terzo delle dimensioni della testa di uno spermatozoo normale) sono normali.	<ul style="list-style-type: none"> • il citoplasma residuo è considerato un'anomalia solo quando supera un terzo della dimensione normale della testa dello spermatozoo

Categorie di anomalie nemaspermiche

Le categorie, o regioni, di interesse sono:

- testa (%H);
- collo e tratto intermedio (%NM);
- coda (%T);
- eccesso di citoplasma residuo (%C).

Si può usare un contacellule a più tasti, con un tasto per l'aspetto normale (ideale/tipico), uno per le anomalie e uno per ciascuna delle quattro categorie anomale (H, NM, T, C). Per l'inserimento di più anomalie può essere utilizzato un contatore meccanico, di cui va tenuto premuto il primo tasto mentre si inseriscono le altre anomalie osservate sul singolo spermatozoo.

Con questa operazione, ogni spermatozoo viene contato solo una volta e ogni sua anomalia viene valutata separatamente.

- Dalla valutazione di 200 spermatozoi è possibile ottenere la percentuale di spermatozoi ideali e anomali (le due cifre dovrebbero sommarsi al 100%), così come la percentuale di ogni tipo di anomalia, ovvero %H, %NM, %T e %C (se la valutazione è stata fatta correttamente, la somma di queste percentuali dovrebbe essere superiore a 100%).
- La percentuale di spermatozoi in queste classi di anomalie si ottiene dividendo il numero totale di spermatozoi con un difetto nella categoria per il numero totale conteggiato. Questi numeri sono usati per calcolare l'indice di teratozoospermia, o TZI (**Sezione 3.2, p. 86**).

Descrizioni di altri difetti specifici dello spermatozoo e di altri tipi di cellule

Occasionalmente, s'incontreranno spermatozoi con un difetto strutturale specifico. Per esempio, l'acrosoma può non svilupparsi, dando origine al "difetto della testa rotonda" o "globozoospermia". Se la placca basale non riesce ad attaccarsi al nucleo al polo opposto all'acrosoma durante la spermiiazione, le teste vengono assorbite e nello spermatozoo si trovano solo le code (il cosiddetto "difetto della testa di spillo"). Le teste di spillo (code libere) non sono contate come difetti della testa, poiché non possiedono cromatina o struttura della testa anteriormente alla piastra basale. I pazienti i cui spermatozoi mostrano tutti uno di questi difetti sono solitamente sterili; si tratta di casi rari, ma è fondamentale che siano identificati e correttamente segnalati. Se ci sono molte teste di spillo o teste libere, può essere determinata la loro prevalenza rispetto agli spermatozoi (**Sezione 2.5.16 e 2.5.17, p. 80**).

Riportare la presenza e la prevalenza relativa agli spermatozoi di:

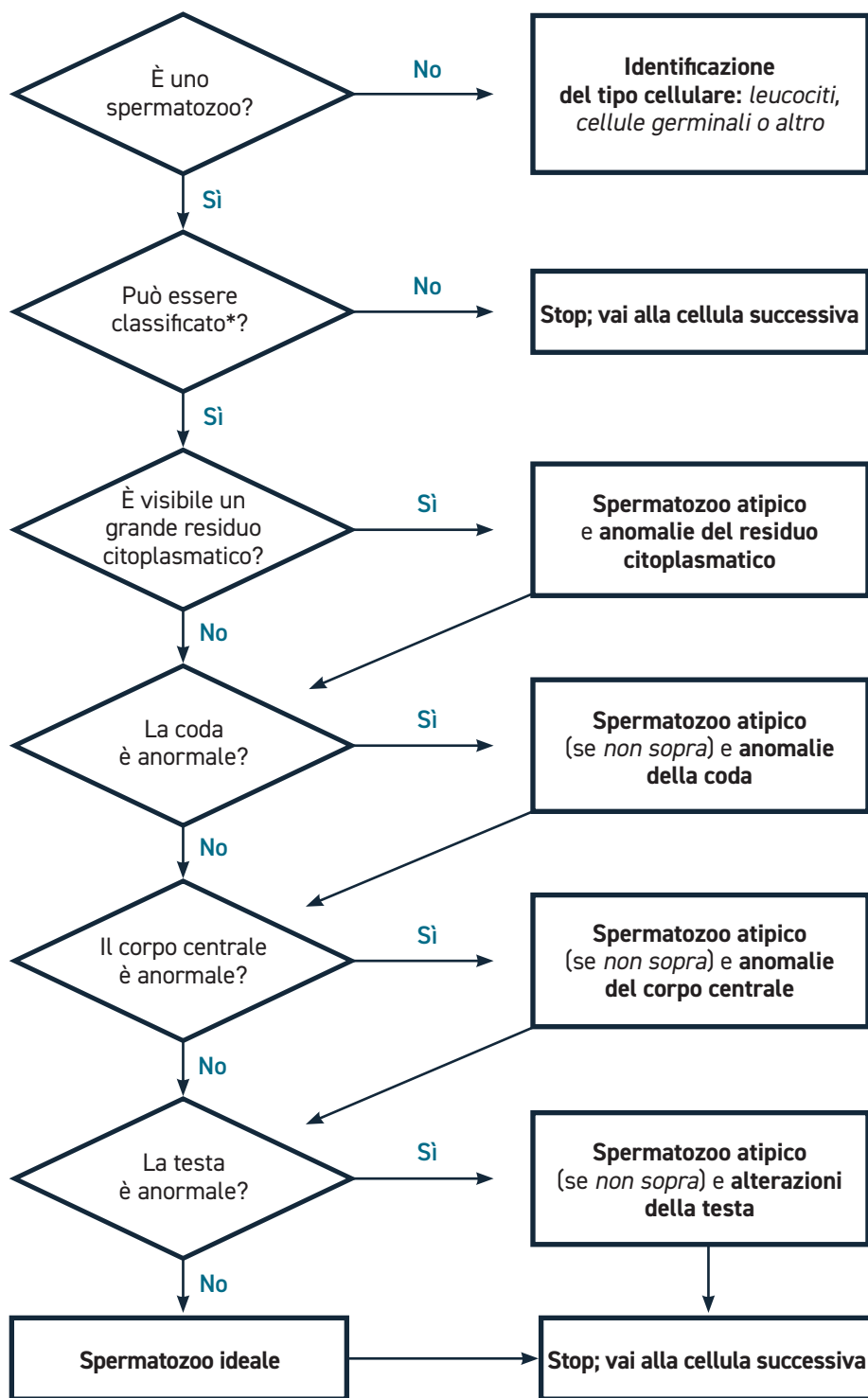
- difetti specifici degli spermatozoi, per esempio teste di spermatozoi libere, teste di spillo (code libere), teste prive di acrosomi;
- cellule germinali immature (**Figure 2.15, p. 62 e 2.16, p. 63**);
- cellule non spermatiche (**Figure 2.15, p. 62 e 2.16, p. 63**).

Se ci sono molti di questi difetti o cellule non spermatiche, si può determinare la loro prevalenza rispetto agli spermatozoi.

Un ordine strutturato per la valutazione della morfologia nemaspermica

La valutazione sequenziale didattica di ogni spermatozoo è utile sia per la formazione che per l'analisi di routine [126].

Figura 2.11 Ordine strutturato per la valutazione della morfologia nemaspermica



* Completo di testa e coda, chiaramente visibile e non sovrapposto ad altre cellule o componenti.

Valutazione microscopica e calcolo dei risultati

Con il paradigma di valutazione morfologica qui raccomandato, tutte le regioni funzionali dello spermatozoo dovrebbero essere considerate. Non è necessario distinguere tutte le variazioni di dimensione e forma della testa, né i vari difetti del tratto intermedio e di quello principale. Anche se il laboratorio riporta solo la percentuale di spermatozoi ideali, l'esaminatore del laboratorio dev'essere in grado di identificare tutte le anomalie. Per evitare una selezione distorta di particolari spermatozoi, la valutazione morfologica dovrebbe essere eseguita su ogni spermatozoo valutabile in diverse aree del vetrino selezionate sistematicamente.

Si raccomanda di iniziare a controllare lo striscio, per esempio, con un ingrandimento totale 400x (ottica in campo chiaro) per ottenere un'impressione generale della distribuzione e dell'aspetto degli spermatozoi, delle altre cellule, dei detriti ecc.

La valutazione dettagliata viene fatta usando un obiettivo in campo chiaro a immersione in olio 100x e almeno un oculare 10x. L'olio d'immersione è essenziale per una migliore visualizzazione al microscopio (indice di rifrazione, RI ~1,5).

1. Valutare tutti gli spermatozoi in ogni campo, passando da un campo microscopico all'altro.

- Valutare solo gli spermatozoi intatti (quelli con una testa e una coda). Non includere nella conta le cellule immature. Le teste senza coda devono essere conteggiate separatamente e annotate nel referto se sono più di 20 su 100 spermatozoi.
- Non valutare i campi con spermatozoi sovrapposti o con uno spermatozoo posizionato di lato. Gli spermatozoi in questi campi vengono valutati solo se tutti i campi hanno tale problema, e in tal caso si annota un commento aggiuntivo nel referto.

2. Valutare almeno 200 spermatozoi per avere un errore di campionamento accettabilmente basso.

3. Contare il numero di spermatozoi tipici/normali e le anomalie nelle quattro regioni con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.

4. Calcolare:

- le percentuali delle forme tipiche e le percentuali delle anomalie nelle diverse regioni;
- il TZI (la somma di tutte le anomalie divisa per la somma degli spermatozoi anormali; il risultato è sempre tra 1,00 e 4,00). Il TZI ha un massimo di quattro difetti per spermatozoo anormale: uno ciascuno per la testa, il tratto intermedio e il tratto principale e uno per l'eccesso di citoplasma residuo.

5. Riportare le percentuali delle forme tipiche al numero intero più vicino e il TZI con due cifre decimali.

Figura 2.12 Tavola di Papanicolaou 1

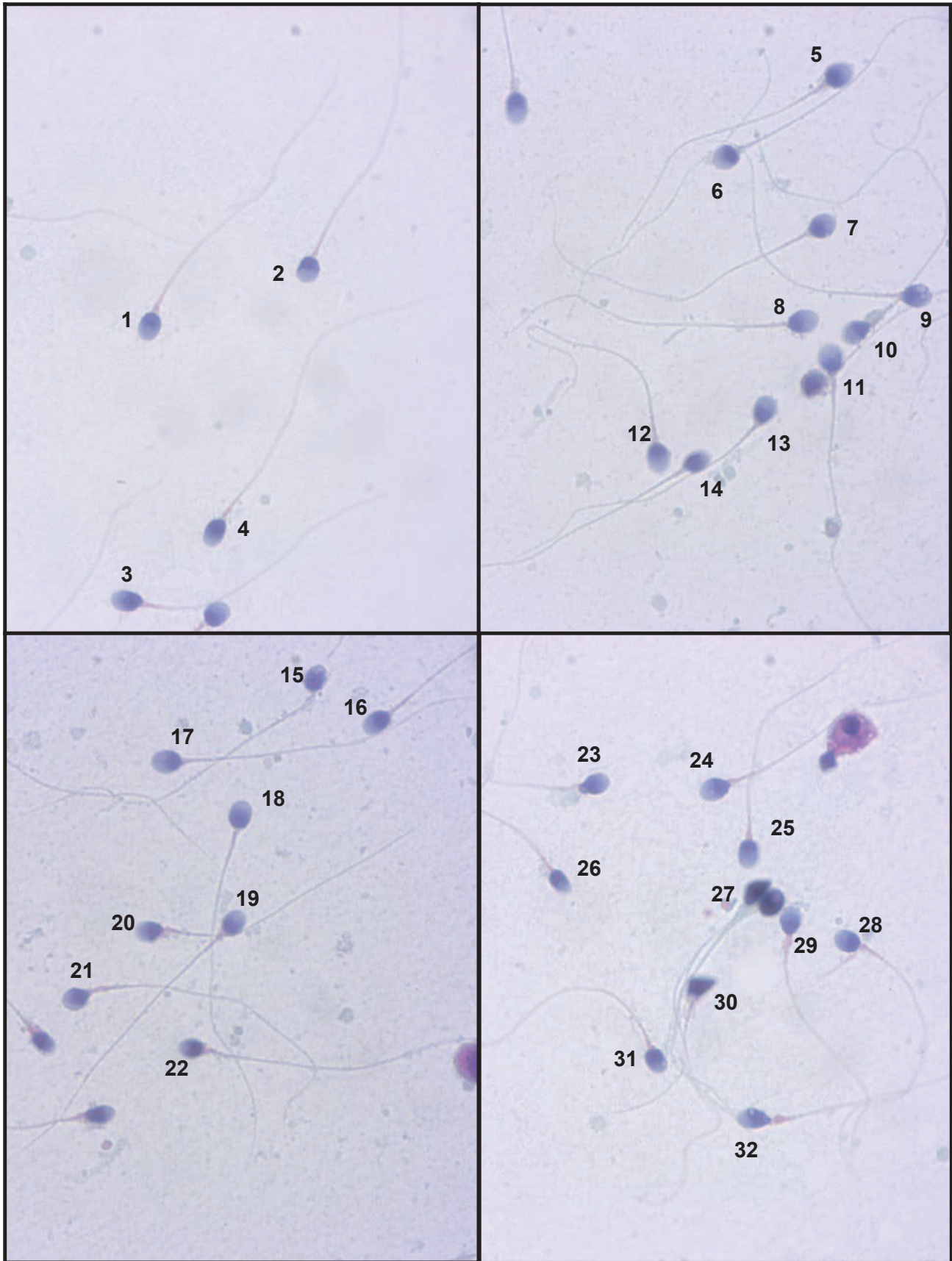


Tabella 2.7 Tavola di Papanicolaou 1

	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione complessiva dello spermatozoo
1	normale		normale	normale	tipico
2	atipica	amorfa	normale	normale	atipico
3	atipica	amorfa	ispessito	normale	atipico
4	atipica		normale	normale	atipico
5	atipica	amorfa	ispessito	normale	atipico
6	atipica	amorfa	normale	normale	atipico
7	atipica	PA vac	ispessito	normale	atipico
8	normale		normale	normale	atipico
9	atipica	vac	normale	normale	atipico
10	atipica	amorfa	ispessito	normale	atipico
11	atipica	amorfa	ispessito	normale	
12	normale		normale	normale	tipico
13	atipica		ispessito/angolato	normale	atipico
14	atipica	piccola	normale	normale	atipico
15	atipica		ispessito	normale	atipico
16	atipica		normale	ND	atipico
17	normale		normale	normale	tipico
18	normale		normale	normale	tipico
19	normale		ispessito	normale	atipico
20	atipica		ispessito	normale	atipico
21	atipica		ispessito	normale	atipico
22	atipica		ispessito	normale	atipico
23	atipica		ispessito	ND	atipico
24	atipica		ispessito	normale	atipico
25	normale		ispessito	normale	atipico
26	atipica	a punta	ispessito	ND	atipico
27	atipica	amorfa	ispessito	normale	atipico
28	normale		ispessito	normale	tipico
29	atipica		ispessito	normale	atipico
30	atipica	amorfa	ispessito	doppio	
31	atipica		asimmetrico	normale	atipico
32	atipica	amorfa/PA vac	normale	normale	atipico

Figura 2.13 Tavola di Papanicolaou 2

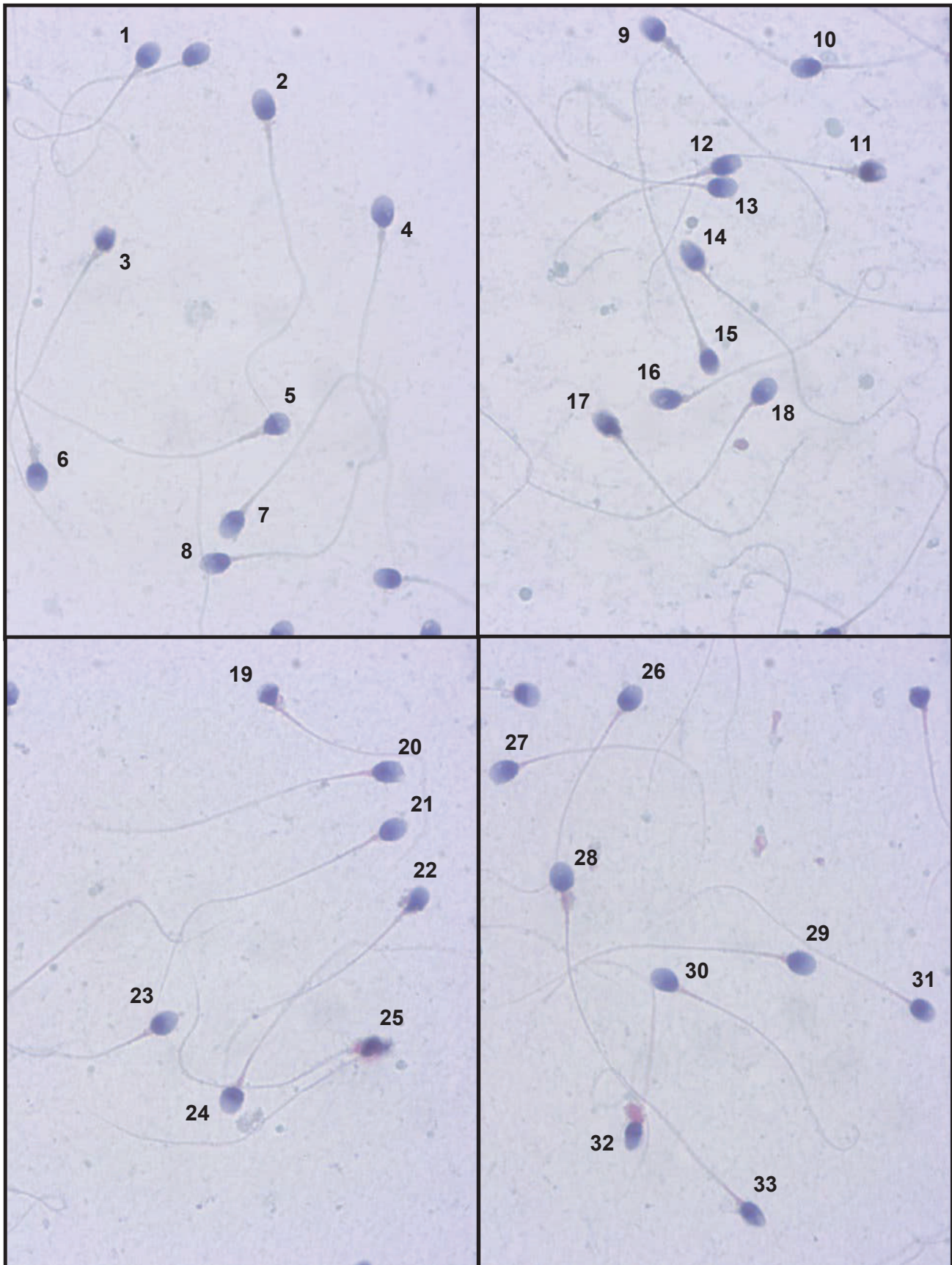


Tabella 2.8 Tavola di Papanicolaou 2

	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione complessiva dello spermatozoo
1	normale		ispessito	normale	atipico
2	atipica		normale	normale	tipico
3	atipica		ispessito	normale	atipico
4	atipica		ispessito	normale	atipico
5	atipica		ispessito	normale	atipico
6	normale		ispessito	normale	atipico
7	normale		normale	normale	tipico
8	atipica		normale	asimmetrico	atipico
9	atipica		ispessito	normale	atipico
10	atipica		normale	ND	atipico
11	atipica		ispessito	normale	atipico
12	atipica		ispessito	asimmetrico	atipico
13	normale		normale	ND	atipico
14	atipica		normale	normale	atipico
15	atipica	piccola	ispessito/asimmetrico	normale	atipico
16	atipica		ispessito	normale	atipico
17	atipica		ispessito	normale	atipico
18	normale		normale	normale	tipico
19	atipica		ispessito	normale	atipico
20	atipica		normale	normale	atipico
21	normale		normale	normale	atipico
22	atipica		normale	normale	atipico
23	atipica		ispessito	atipico	atipico
24	atipica	troppo larga	ispessito	atipico	atipico
25	atipica		ispessito	normale	atipico
26	atipica		normale	normale	atipico
27	normale		normale	normale	tipico
28	atipica		ispessito	normale	atipico
29	normale		normale	normale	tipico
30	atipica	piccola	normale	normale	atipico
31	atipica		normale	normale	atipico
32	atipica		ispessito	asimmetrico	atipico
33	atipica	a punta	ispessito	normale	atipico

Figura 2.14 Tavola di Papanicolaou 3

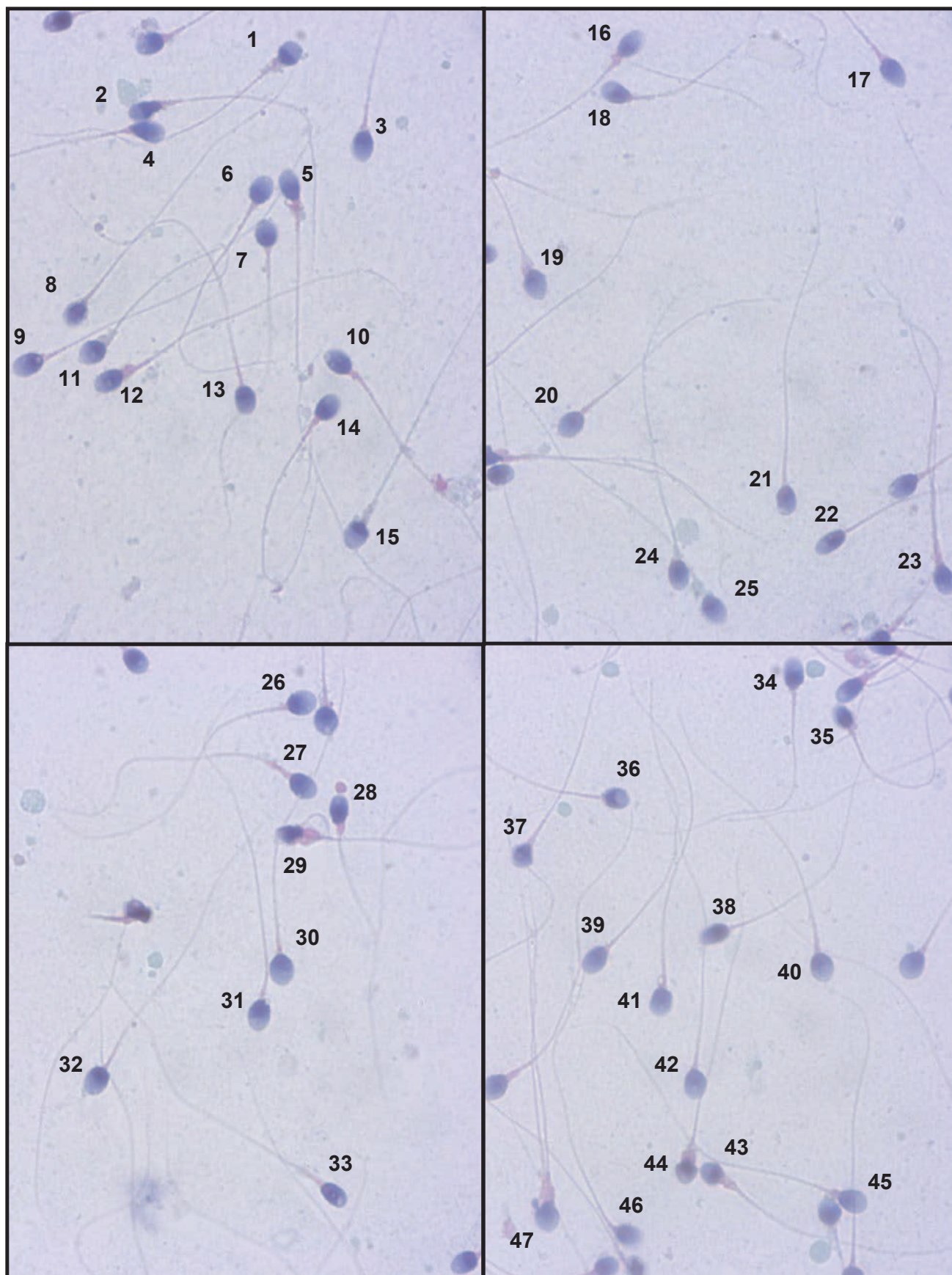


Tabella 2.9 Tavola di Papanicolaou 3

	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione complessiva dello spermatozoo
1	atipica		ispessito	normale	atipico
2	atipica		ispessito	angolato	atipico
3	atipica		ispessito/asimmetrico	ND	atipico
4	atipica		ispessito	ND	atipico
5	atipica		ispessito	normale	atipico
6	normale		normale	normale	tipico
7	normale		normale	normale	tipico
8	atipica	piccola	normale	normale	atipico
9	atipica	PA vac	ispessito	normale	atipico
10	atipica		ispessito	normale	atipico
11	atipica		ispessito	normale	atipico
12	normale		normale	normale	tipico
13	atipica		ispessito	normale	atipico
14	normale		ispessito	normale	atipico
15	atipica		ispessito	normale	atipico
16	atipica		ispessito	normale	atipico
17	atipica		normale	normale	atipico
18	atipica		normale	ND	atipico
19	atipica		ispessito	ND	atipico
20	normale		normale	normale	tipico
21	atipica		normale	normale	atipico
22	atipica	a punta	normale	normale	atipico
23	atipica		ispessito	doppio	atipico
24	atipica	piccola	ispessito	normale	atipico
25	atipica		ispessito	normale	atipico
26	normale		normale	normale	tipico
27	normale		ispessito	normale	atipico
28	atipica		ispessito	angolato	atipico
29	atipica	piccola	ispessito	normale	atipico
30	normale		normale	normale	tipico
31	atipica		normale	normale	atipico
32	normale		normale	normale	tipico
33	atipica	a punta	normale	normale	atipico
34	atipica		normale	normale	atipico

	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione complessiva dello spermatozoo
35	atipica	piccola	ispessito	normale	atipico
36	atipica	piccola	normale	normale	atipico
37	atipica	piccola	normale	normale	atipico
38	atipica		normale	normale	atipico
39	atipica	a punta	normale	normale	atipico
40	normale		normale	normale	tipico
41	atipica		ispessito	normale	atipico
42	atipica		asimmetrico	normale	atipico
43	atipica		ispessito	normale	atipico
44	atipica		ispessito	normale	atipico
45	atipica		ispessito	normale	atipico
46	atipica		normale	normale	atipico
47	atipica		ispessito	doppio	atipico

Tabella 2.10 Tavola di Papanicolaou 4

Cellula	Tipo di cellula
1	macrofago
2	spermatozoo atipico
3	citoplasma
4	spermatozoo atipico
5	spermatocita
6	spermatozoo atipico
7	spermatozoo atipico? testa inglobata nel citoplasma?
8	citoplasma

Cellula	Tipo di cellula
9	spermatide in divisione
10	spermatocita
11	spermatide degenerato
12	spermatide
13	spermatide degenerato
14	spermatocita in divisione
15	citoplasma
16	spermatide degenerato

Cellula	Tipo di cellula
17	spermatocita in divisione
18	spermatozoo atipico
19	citoplasma
20	spermatozoo atipico
21	spermatide
22	macrofago in fagocitosi
23	spermatocita
24	citoplasma

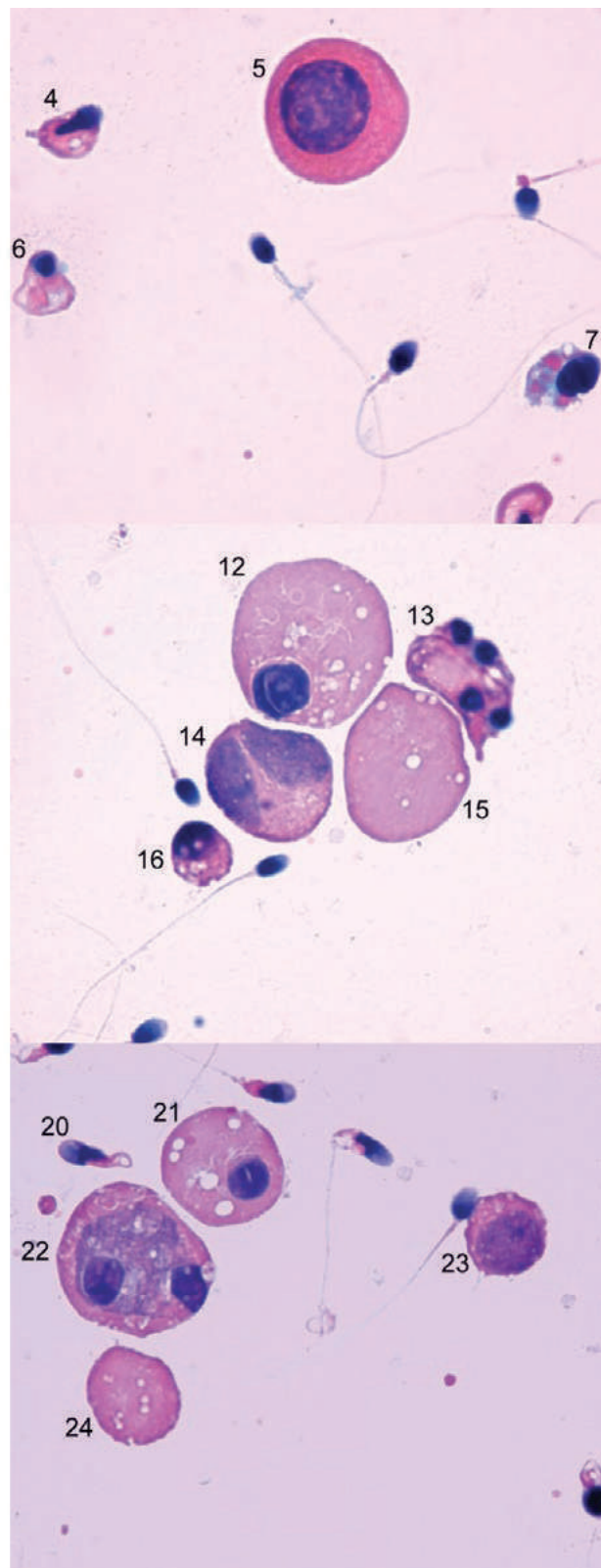
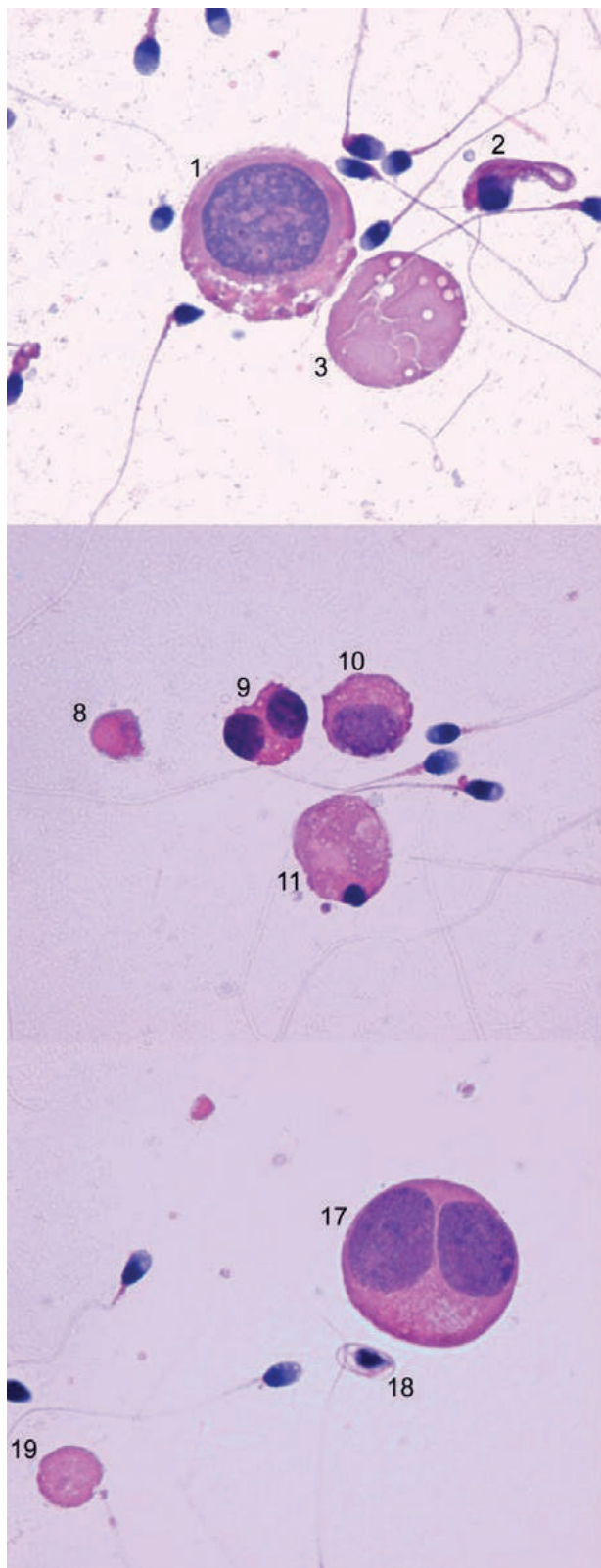
Tabella 2.11 Tavola di Papanicolaou 5

Cellula	Tipo di cellula
1	macrofago
2	spermatozoo atipico
3	spermatide in divisione
4	spermatide in divisione
5	citoplasma
6	non classificabile

Cellula	Tipo di cellula
7	spermatide degenerato
8	spermatide degenerato?
9	spermatide degenerato
10	spermatide degenerato
11	macrofago
12	spermatide degenerato

Cellula	Tipo di cellula
13	spermatide degenerato
14	spermatide degenerato
15	spermatide degenerato
16	macrofago

Figura 2.15 Tavola di Papanicolaou 4



1. Introduzione

2. Esame di base

3. Esame esteso

4. Esami avanzati

5. Tecniche di preparazione degli spermatozoi

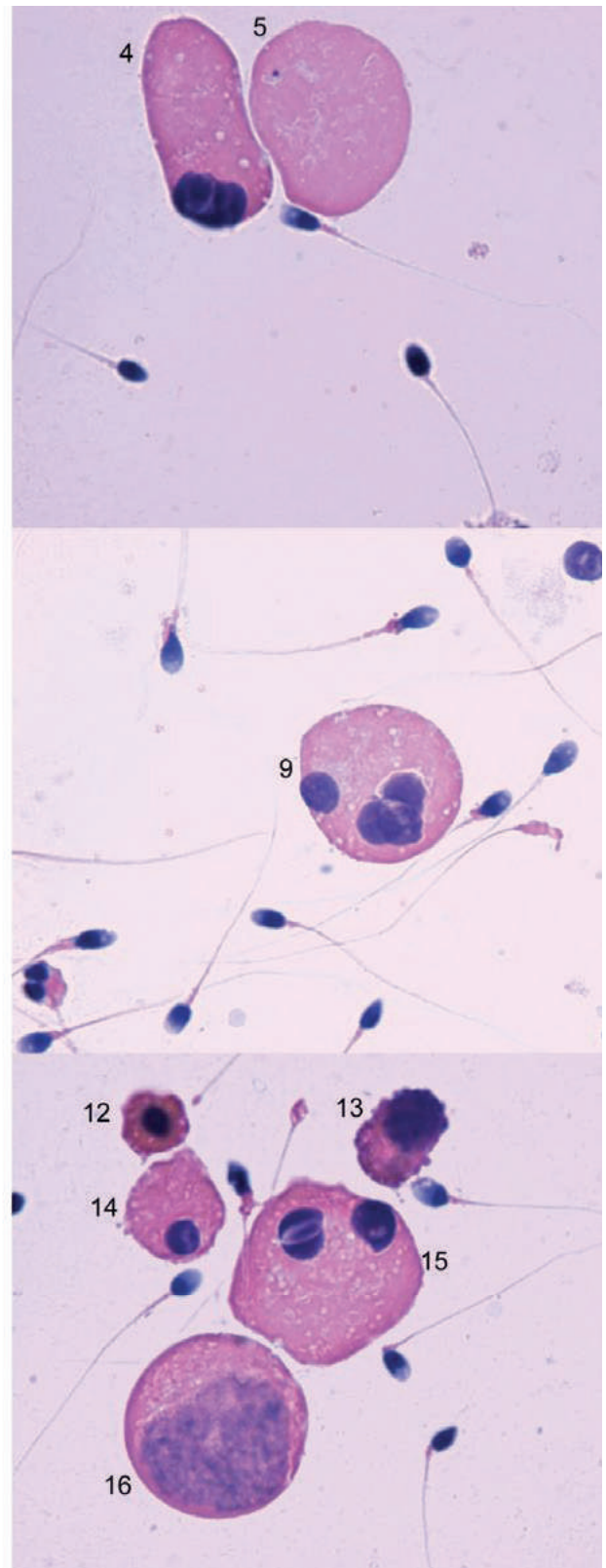
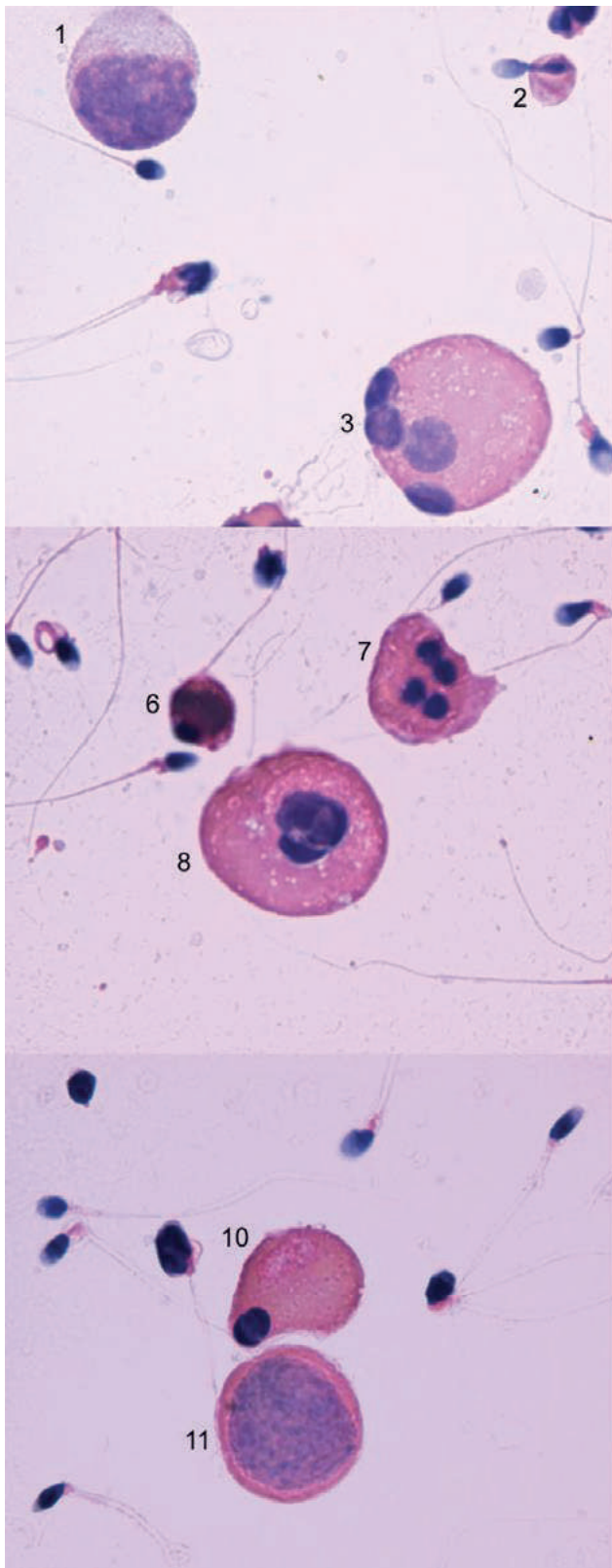
6. Crioconservazione degli spermatozoi

7. Assicurazione di qualità e controllo di qualità

8. Appendici

9. Bibliografia

Figura 2.16 Tavola di Papanicolaou 5



2.5 Informazioni e commenti aggiuntivi

2.5.1 Elementi per la valutazione del volume dell'eiaculato

- Il volume misurato con una pipetta di misurazione sarà sempre soggetto a una perdita di 0,3-0,9 ml [50, 51, 127]. Ci possono anche essere, all'interno di una pipetta volumetrica, bolle d'aria invisibili in grado di determinare una sovrastima del volume dell'eiaculato. Inoltre, un po' di volume viene perso nella pipetta stessa, il che può causare difficoltà per altre valutazioni negli eiaculati a basso volume.
- Un basso volume di liquido seminale è caratteristico nell'ostruzione dei dotti eiaculatori o nell'assenza congenita bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD) [128-131], una condizione in cui le vescicole seminali sono anche poco sviluppate.
- Un basso volume di liquido seminale può anche essere il risultato di problemi di raccolta (perdita di una frazione dell'eiaculato), eiaculazione retrograda parziale o carenza di androgeni.
- Un alto volume di liquido seminale può riflettere un'essudazione degli organi accessori nei casi di infiammazione.

2.5.2 Alterazioni della fluidificazione

- Occasionalmente i campioni possono non liquefarsi, rendendo praticamente impossibile la valutazione diagnostica del liquido seminale. In questi casi il trattamento aggiuntivo, la miscelazione meccanica o la digestione enzimatica possono permettere ulteriori valutazioni, anche se le manipolazioni influenzano la biochimica del plasma seminale e la motilità e la morfologia degli spermatozoi; pertanto, il loro uso dev'essere segnalato. La diluizione del liquido seminale con il terreno di coltura dev'essere presa in considerazione quando si calcola la concentrazione di spermatozoi. Per consentire la maggiore accuratezza possibile, bisognerebbe usare il pipettaggio a spostamento positivo del liquido seminale.
- Alcuni campioni possono essere indotti a liquefarsi con l'aggiunta di un uguale volume di terreno di coltura fisiologico o di soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (vedi **Sezione 8.4.5, p. 228**), seguita da ripetuti pipettaggi delicati. Tuttavia, l'aggiunta di un mezzo di coltura cambia la motilità e la concentrazione degli spermatozoi, così come anche i marcatori biochimici.
- Le disomogeneità possono essere ridotte da ripetuti (6-10 volte) passaggi delicati attraverso un ago smussato calibro 18 (diametro interno 0,84 mm) o calibro 19 (diametro interno 0,69 mm) collegato a una siringa. Non si tratta tuttavia di una pratica raccomandata, poiché le forze di taglio possono danneggiare gli spermatozoi e quindi influenzare negativamente l'integrità del DNA [132].
- La digestione con la bromelina, un enzima proteolitico ad ampia specificità (EC 3.4.22.32), può aiutare a promuovere la liquefazione, ma modifica sia i marcatori biochimici che la motilità degli spermatozoi.
Preparare 10 UI/ml di bromelina in soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (**Sezione 8.4.5, p. 228**); è difficile da sciogliere, ma con la miscelazione la maggior parte dovrebbe sciogliersi entro 15-20 minuti. Diluire il liquido seminale 1+1 (1 : 2) con la bromelina 10 IU/ml, mescolare con la punta di una pipetta e incubare a 37°C per 10 minuti. Mescolare bene il campione prima di ulteriori analisi.

2.5.3 Valutazioni alternative della viscosità

- In alternativa, la viscosità può essere valutata introducendo una bacchetta di vetro nel campione e osservando la lunghezza del filamento che si forma all'estrazione della bacchetta.
- A differenza di un campione parzialmente non liquefatto, un campione di eiaculato viscoso presenta una viscosità omogenea e la sua consistenza non cambia nel tempo. L'alta viscosità può ostacolare la corretta valutazione della motilità e della concentrazione degli spermatozoi, il rilevamento di anticorpi antispermatozoo e la valutazione dei marcatori biochimici. I metodi per ridurre la viscosità sono gli stessi che vengono utilizzati per i problemi di liquefazione (**Sezione 2.5.2, p. 64**) e dunque influiscono su diversi aspetti delle caratteristiche dell'eiaculato. Anche se la viscosità può essere migliorata, questo influenza i risultati dell'esame dell'eiaculato.

2.5.4 pH dell'eiaculato

- Se il pH è inferiore a 7,0 in un eiaculato senza spermatozoi, ci può essere un'assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti [129-131, 133]; anche le vescicole seminali, per via della comune origine embrionale, possono mancare o essere poco sviluppate, il che può essere causa di un basso volume e un basso pH.
- Nel caso di campioni viscosi, il pH di una piccola aliquota dell'eiaculato può essere valutato con un misuratore di pH progettato per la misurazione di soluzioni viscosse [134].

2.5.5 Miscelazione dei campioni

- In alternativa, la miscelazione può essere ottenuta aspirando il campione ~10 volte in una pipetta di plastica monouso (sterile se necessario) a foro largo (circa 1,5 mm di diametro). Bisogna fare attenzione a non provocare bolle d'aria. Non mescolare con un mixer vortex, perché danneggia gli spermatozoi.

2.5.6 Preparazione a fresco – principi

- Il volume dell'eiaculato e le misure del vetrino coprioggetto (dimensioni e peso) devono essere regolati per ottenere una preparazione di profondità fissa di circa 20 mm, che permetta agli spermatozoi di nuotare liberamente [135, 136]. Una preparazione più profonda può causare difficoltà, perché la profondità focale del microscopio non sarà in grado di cogliere la profondità della preparazione e gli spermatozoi appariranno e scompariranno muovendosi dentro e fuori dal fuoco.
- La profondità di un preparato ($D \mu\text{m}$) si ottiene dividendo il volume del campione ($V, \mu\text{l} = \text{mm}^3$) per l'area su cui è distribuito (A, mm^2): $D = V/A$. Così, un volume di 10 μl su un vetrino pulito e coperto con un vetrino coprioggetto di 22×22 mm (area 484 mm^2) fornisce una camera di profondità di 20,7 μm .

2.5.6.1 Probabilità di non rilevare spermatozoi durante la valutazione dei preparati

Se non si rilevano spermatozoi in uno o due preparati a fresco, una probabilità che possano essere presenti nell'eiaculato esiste ancora ma è bassa e dipende in parte dal

volume totale dell'eiaculato. La probabilità di un certo numero di spermatozoi non rilevati può essere stimata calcolando l'intervallo di confidenza del valore da una distribuzione di Poisson [137], il che significa che se non si trovano spermatozoi nel preparato a fresco è prevedibile trovare nell'intero eiaculato, con rispettivamente il 95% e il 99,5% di probabilità, meno del numero di spermatozoi indicato nella **Tabella 2.12**. La tabella mostra i risultati di diversi volumi e di uno o due preparati a fresco da 10 µl esaminati.

Tabella 2.12 Probabilità di non rilevare spermatozoi durante la valutazione dei preparati a fresco

Volume dell'eiaculato (ml)	Spermatozoi non rilevati (intervallo di confidenza del 95%)		Spermatozoi non rilevati (intervallo di confidenza del 99,5%)	
	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl
1	300	150	530	265
2	600	300	1.060	530
4	1.200	600	2.120	1.060
8	2.400	1.200	4.240	2.120

2.5.6.2 Probabilità di non rilevare spermatozoi dopo la centrifugazione

Se non si rilevano spermatozoi in uno o due preparati a fresco da pellet dopo centrifugazione, una probabilità che possano essere presenti nell'eiaculato esiste ancora ma è bassa e dipende in parte dal volume totale dell'eiaculato. La probabilità di un certo numero di spermatozoi non rilevati può essere stimata calcolando l'intervallo di confidenza del valore da una distribuzione di Poisson [137], il che significa che se non si trovano spermatozoi nel preparato a fresco è prevedibile trovare nell'intero eiaculato, con rispettivamente il 95% e il 99,5% di probabilità, meno del numero di spermatozoi indicato nella **Tabella 2.13**. La tabella mostra i risultati di diversi volumi e di uno o due preparati a fresco da 10 µl esaminati; la concentrazione per centrifugazione è stata calcolata come 1 ml a 50 µl (20×).

Tabella 2.13 Probabilità di non rilevare spermatozoi dopo la centrifugazione

Volume dell'eiaculato (ml)	Spermatozoi non rilevati (intervallo di confidenza del 95%)		Spermatozoi non rilevati (intervallo di confidenza del 99,5%)	
	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl
1	15	8	27	14
2	30	15	53	27
4	60	30	106	53
8	120	60	212	106

2.5.7 Agglutinazioni di spermatozoi

- La presenza di agglutinazione non è una prova sufficiente per dedurre una causa immunologica di infertilità, ma suggerisce la presenza di anticorpi antispermatozoo; possono essere necessari ulteriori test (**Sezione 3.7, p. 119**).
- Una forte agglutinazione può influenzare la valutazione della motilità e della concentrazione degli spermatozoi.

2.5.8 Camere di conta degli spermatozoi

- Gli spermatozoi si attaccano facilmente alle superfici di vetro. Una pulizia accurata è quindi essenziale.
- Pulire la camera dell'emocitometro e il vetrino coprioggetto con acqua e detergente.
- Strofinando delicatamente la superficie della griglia si rimuovono eventuali spermatozoi residui del campione precedente.
- Asciugare bene con un panno dopo l'uso, poiché qualsiasi residuo secco può inibire il caricamento.
- Secondo le norme vigenti in materia di salute e sicurezza, il rischio di contaminazione con un agente potenzialmente infettivo dovrebbe essere contrastato, per esempio immergendo le camere riutilizzabili e i vetrini coprioggetto in un disinfettante durante la notte (**Sezione 8.2.5, p. 219**)
- Sono disponibili camere monouso per determinare la concentrazione di spermatozoi [86, 138-141], ma possono produrre risultati diversi da quelli dell'emocitometro di Neubauer modificato.
- Le camere poco profonde (tipicamente 20 μm) che si riempiono per azione capillare non hanno una distribuzione uniforme degli spermatozoi a causa dell'effetto del flusso di trascinamento capillare [142, 143]. Potrebbe essere possibile correggerla [143], ma non è consigliabile [144].

2.5.9 Area e volume di un campo microscopico ad alto ingrandimento (HPF)

Il volume di liquido seminale osservato in ogni campo microscopico dipende dalla profondità del preparato, dall'area del campo (πr^2 , dove π è circa 3,142 e r è il raggio del campo microscopico) e dalla profondità della camera (20,7 μm per il preparato a fresco). Il diametro del campo microscopico può essere misurato con un micrometro o stimato dividendo il diametro dell'apertura della lente oculare per l'ingrandimento dell'obiettivo.

Con un obiettivo 40x e un oculare 10x di apertura 20 mm, il campo del microscopio ha un diametro di circa 500 μm (20 mm/40). In questo caso, $r = 250 \mu\text{m}$, $r^2 = 62.500 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196.375 \mu\text{m}^2$ e il volume è 4.064 962 μm^3 , o circa 4 nl.

Con un obiettivo 20x e un oculare 10x di apertura 20 mm, il campo del microscopio ha un diametro di circa 1.000 μm (20 mm/20). In questo caso, $r = 500 \mu\text{m}$, $r^2 = 250.000 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 785.500 \mu\text{m}^2$ e il volume è 16.259 850 μm^3 , o circa 16 nl.

2.5.10 Test di tossicità dei contenitori per la raccolta dell'eiaculato

Selezionare almeno cinque eiaculati con un'alta concentrazione di spermatozoi e una buona motilità degli stessi. Questi eiaculati devono essere raccolti in contenitori riconosciuti come sicuri (controllo) e poi trasferiti per metà nei contenitori sconosciuti (test). Valutare la motilità degli spermatozoi (**Sezione 2.4.6, p. 23**) direttamente e dopo 4 ore. È suggerita questa durata poiché è il doppio del probabile tempo di esposizione del liquido seminale al contenitore. Si dovrebbe usare liquido

seminale prodotto in loco, dato che l'esposizione del fluido è importante. Se in nessuno dei punti temporali ci sono differenze tra le valutazioni di controllo e quelle di test ($P > 0,05$, come giudicato da un test t a coppie), i contenitori possono essere considerati non tossici per gli spermatozoi e soddisfacenti per i requisiti di raccolta del liquido seminale. Altri oggetti usati nell'analisi diagnostica del liquido seminale, come i puntali delle pipette, dovrebbero essere testati per valutarne gli effetti, con il tempo di esposizione debitamente tenuto in considerazione.

2.5.11 Raccolta sterile di liquido seminale per la riproduzione assistita e la crioconservazione

Si esegue come la raccolta a fini diagnostici, ma i contenitori del campione, i puntali e le pipette per la miscelazione devono essere sterili. I requisiti legali possono variare, ma è spesso richiesto che le procedure per la preparazione del liquido seminale riducano il rischio di contaminazione con microrganismi e altre particelle. Sono spesso necessari spazi puliti (cappa a flusso laminare) e una qualità dell'aria controllata.

2.5.12 Raccolta sterile di liquido seminale per analisi microbiologiche

È noto che è difficile ottenere informazioni utili dalle colture microbiologiche di liquido seminale. È quindi importante ridurre al minimo la contaminazione microbiologica da fonti non spermatiche (per esempio, organismi commensali della pelle). I contenitori dei campioni, i puntali e le pipette per la miscelazione devono essere sterili. L'ideale sarebbe prendere le aliquote per i test microbiologici prima di eseguire qualsiasi altra valutazione sull'eiaculato. Tra la raccolta del campione e l'inizio dell'indagine in laboratorio microbiologico non devono passare più di 3 ore.

L'uomo dovrebbe:

- urinare;
- lavarsi le mani e il pene con il sapone, per ridurre il rischio di contaminazione del campione con organismi commensali della pelle;
- sciacquare il sapone;
- asciugare le mani e il pene con un asciugamano fresco monouso;
- eiaculare in un contenitore sterile.

2.5.13 Test di vitalità alternativi

2.5.13.1 Test di vitalità utilizzando solo l'eosina

Questo metodo è semplice e rapido, ma i preparati a fresco non possono essere conservati per scopi di controllo della qualità. Inoltre, per ottenere risultati affidabili, sono necessarie ottiche a contrasto di fase negative molto difficili da trovare: il più comune contrasto di fase positivo rende le teste rosa chiaro difficili da distinguere.

Preparazione dei reagenti

1. 0,9% (w/v) NaCl: sciogliere 0,9 g di NaCl in 100 ml di acqua purificata.

2. 0,5% (w/v) eosina Y: sciogliere 0,5 g di eosina Y (indice di colore 45380) in 100 ml di NaCl 0,9%.

- Se la soluzione di eosina disponibile in commercio è una soluzione acquosa ipotonica, può danneggiare alcuni spermatozoi e dare risultati falsi positivi [75]. Se si usa tale soluzione, usare una soluzione salina a 170 mM per renderla approssimativamente isotonica con l'eiaculato [17].

Procedura

1. Mescolare bene l'eiaculato.
2. Rimuovere un'aliquota di 5 µl di eiaculato e combinarla con 5 µl di soluzione di eosina su un vetrino da microscopio. Mescolare con la punta di una pipetta, facendo roteare il campione sul vetrino.
3. Coprire immediatamente con un vetrino da 22×22 mm e lasciare agire per 30 secondi.
4. Esaminare il vetrino con un'ottica a contrasto di fase negativo a un ingrandimento di 200x o 400x.
5. Contare il numero di cellule colorate (morte) e non colorate (vitali) con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.
6. Valutare 200 spermatozoi per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso.
7. Calcolare la proporzione di cellule vive.
8. Riportare la percentuale di spermatozoi vitali al numero intero più vicino.

Conteggio

- Gli spermatozoi vitali hanno la testa bianca, mentre quelli non vitali hanno la testa colorata di rosso o di rosa.
- Se la colorazione è limitata solo a una parte della regione del collo ma il resto della zona della testa non è colorata, questo è considerato una "perdita membranaria del collo", non un segno di morte cellulare e disintegrazione totale della membrana. Le cellule che presentano questa colorazione dovrebbero essere valutate come vive.

2.5.13.2 Test di vitalità tramite rigonfiamento ipo-osmotico

In alternativa a quello dell'esclusione del colorante, per valutare la vitalità può essere utilizzato il test del rigonfiamento ipo-osmotico [145]. Si tratta di un test utile quando si deve evitare la colorazione degli spermatozoi, per esempio quando si scelgono gli spermatozoi per l'iniezione intracitoplasmatica (ICSI). Il test di rigonfiamento ipo-osmotico parte dal presupposto che solo le cellule con membrane intatte (cellule vive) possano gonfiarsi in soluzioni ipotoniche. In un mezzo ipo-osmotico, gli spermatozoi con membrane intatte si gonfiano entro 5 minuti e tutte le forme flagellari sono stabilizzate entro 30 minuti [146].

- Utilizzare un'incubazione di 30 minuti per la diagnostica di routine.
- Utilizzare un'incubazione di 5 minuti quando gli spermatozoi devono essere trattati per uso terapeutico.

Preparazione dei reagenti

1. Soluzione di rigonfiamento a scopo diagnostico: sciogliere 0,735 g di citrato di sodio diidrato e 1,351 g di D-fruttosio in 100 ml di acqua purificata.

- Aliquote da 1 ml di questa soluzione possono essere congelate a -20°C.

2. Per gli spermatozoi destinati alla PMA (Procreazione Medicalmente Assistita), diluire il mezzo di coltura da utilizzare 1+1 (1 : 2) con adeguata acqua sterile e purificata.

Procedura

1. Scongelare la soluzione di rigonfiamento congelata e mescolare bene prima dell'uso.

2. Riscaldare 1 ml di soluzione di rigonfiamento o 1 ml di 1+1 (1 : 2) di mezzo diluito in una vial da microcentrifuga chiusa a 37°C per 5 minuti.

3. Mescolare bene l'eiaculato.

4. Rimuovere un'aliquota di 100- μ l di eiaculato e aggiungerla alla soluzione di rigonfiamento. Mescolare delicatamente tirando dentro e fuori la pipetta.

5. Incubare a 37°C per esattamente 5 o 30 minuti (vedi sopra), poi trasferire un'aliquota di 10- μ l su un vetrino pulito e coprire con un vetrino coprioggetto da 22×22 mm.

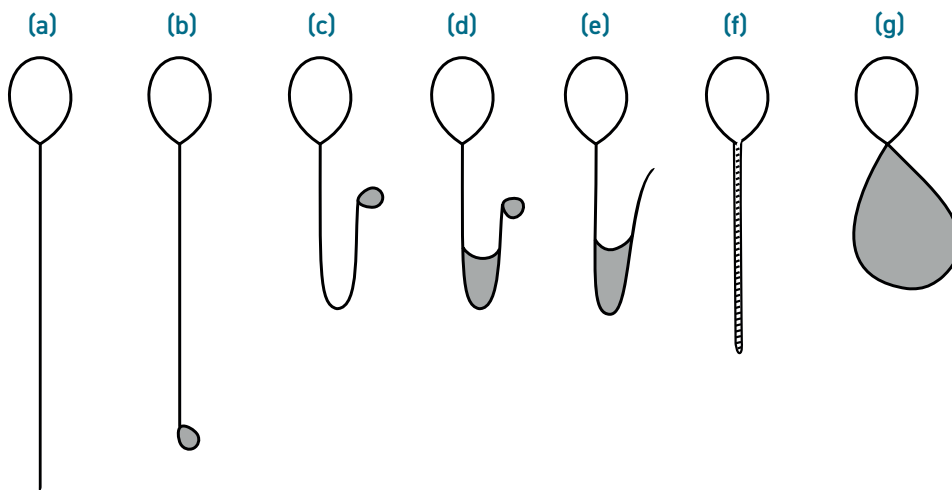
6. Rimescolare il campione seminale, rimuovere un'aliquota di replicato, mescolare con la soluzione di rigonfiamento e preparare un vetrino di replicato, come sopra.

7. Esaminare ogni vetrino con l'ottica di contrasto di fase a un ingrandimento di 200x o 400x.

8. Contare il numero di cellule gonfie (vitali) e non gonfie (non vitali) con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.

9. Valutare 200 spermatozoi in ogni replicato, per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso.

Figura 2.17 Rappresentazione schematica dei tipici cambiamenti morfologici negli spermatozoi sottoposti a stress ipo-osmotico

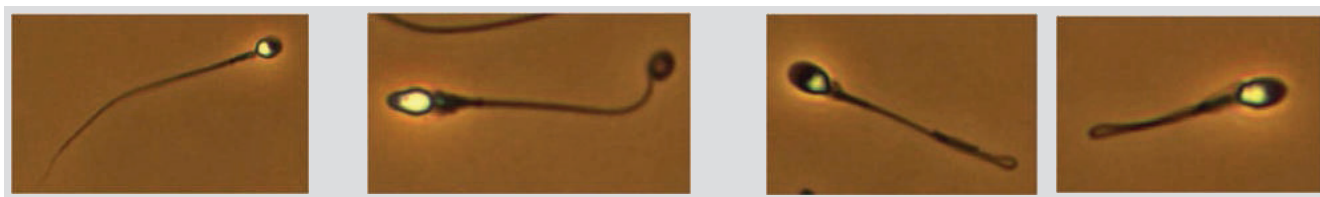


(a) nessun cambiamento; (b)-(g) vari tipi di cambiamento della coda; il rigonfiamento della coda è indicato dall'area in grigio.

Tratto da Jeyendran et al., 1984 [145], con permesso.

Figura 2.18 Microfotografie al microscopio a contrasto di fase di spermatozoi sottoposti a stress ipo-osmotico

1. Coda normale 2. Avvolgimento della punta della coda 3. <50% di coda piegata 4. >50% di coda piegata



Per gentile concessione di E. Holmes [147].

Punteggio

1. Gli spermatozoi gonfi sono identificati da cambiamenti nella forma della cellula, come indicato dall'arrotolamento della coda (Figura 2.16, p. 63).
2. Le cellule vive si distinguono per l'evidenza del rigonfiamento della coda (Figura 2.17); conteggiare tutte le forme di coda rigonfia come spermatozoi vivi.

2.5.14 Tecniche alternative di colorazione morfologica

2.5.14.1 Colorazione di Shorr

La colorazione di Shorr fornisce percentuali di forme normali simili alla colorazione Papanicolaou, ma non è stata convalidata e valutata secondo i rigorosi criteri raccomandati dall'OMS [148]. Inoltre, i confronti effettuati non hanno valutato se la colorazione di Shorr dia gli stessi risultati della colorazione Papanicolaou adattata allo spermatozoo.

Reagenti

1. Ematossilina di Harris (vedere Sezione 8.4.11.3, p. 232): uguale alla colorazione Papanicolaou.
2. Soluzione di Shorr: acquistare già pronta o prepararla come segue: sciogliere 4 g di polvere di Shorr in 220 ml di etanolo caldo al 50% (v/v); lasciare raffreddare, aggiungere 2,0 ml di acido acetico glaciale (in cappa) e filtrare.
3. Etanolo acetico: aggiungere 25 ml di acido acetico glaciale a 75 ml di etanolo al 95% (v/v).
4. Etanolo ammoniacale: aggiungere 5 ml di idrossido di ammonio 25% (v/v) a 95 ml di etanolo 75% (v/v).

Fissare lo striscio di eiaculato essiccato all'aria

Immergere i vetrini in etanolo acetico o etanolo al 75% (v/v) per 1 ora.

Colorazione dello striscio di eiaculato fissato

Immergere in sequenza i vetrini in:

- | | |
|-------------------|-------------------------------|
| 1. acqua corrente | 12-15 immersioni ⁷ |
| 2. ematossilina | 1-2 minuti |
| 3. acqua corrente | 12-15 immersioni |

⁷ La durata di un'immersione è di circa 1 secondo.

- | | |
|-------------------------|------------------|
| 4. etanolo ammoniacale | 10 immersioni |
| 5. acqua corrente | 12-15 immersioni |
| 6. 50% (v/v) etanolo | 5 minuti |
| 7. colorazione di Shorr | 3-5 minuti |
| 8. 50% (v/v) etanolo | 5 minuti |
| 9. 75% (v/v) etanolo | 5 minuti |
| 10. 95% (v/v) etanolo | 5 minuti |

Montaggio dello striscio di eiaculato colorato

I vetrini possono essere analizzati non montati o montati, ma i vetrini montati possono essere utilizzati per la formazione, per l'IQC e per il confronto intra-laboratorio. Inoltre, non vi è alcun rischio di contaminazione degli obiettivi del microscopio quando i vetrini sono montati correttamente.

Figura 2.19 Tavola di Shorr

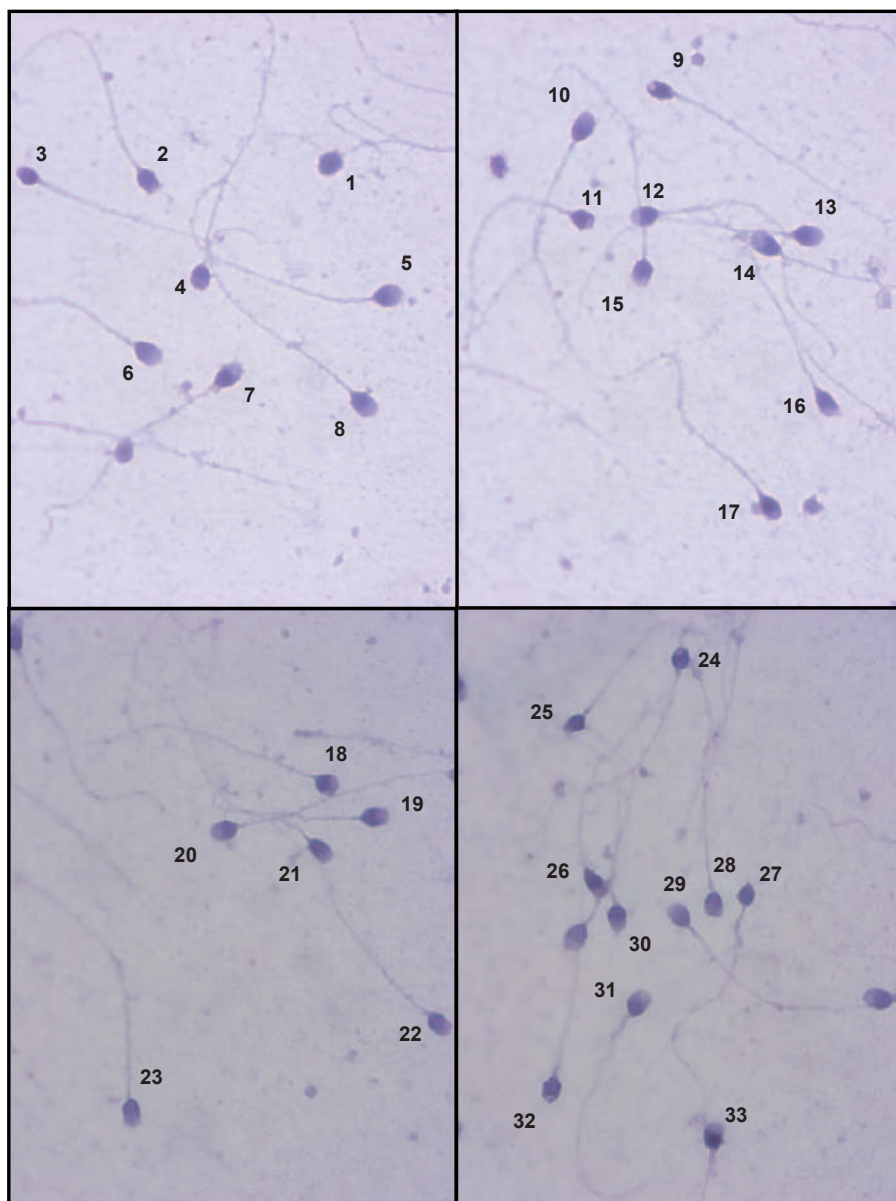


Tabella 2.14 Tavola di Shorr

	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione complessiva dello spermatozoo
1	atipica	nessun acrosoma	normale	normale	atipico
2	atipica		normale	normale	atipico
3	atipica		normale	normale	atipico
4	atipica		normale	normale	atipico
5	normale		normale	normale	tipico
6	atipica		normale	normale	atipico
7	atipica		anormale	normale	atipico
8	atipica		normale	normale	atipico
9	atipica	troppo lunga	normale	normale	atipico
10	atipica		normale	normale	atipico
11	atipica		normale	normale	atipico
12	normale		normale	normale	tipico
13	atipica		anormale	normale	atipico
14	atipica		normale	normale	atipico
15	atipica		normale	normale	atipico
16	atipica		normale	normale	atipico
17	atipica		normale	normale	atipico
18	atipica		anormale	normale	atipico
19	atipica		normale	normale	atipico
20	normale		normale	normale	tipico
21	atipica		normale	normale	atipico
22	atipica		normale	normale	atipico
23	atipica		normale	normale	atipico
24	atipica		anormale	normale	atipico
25	atipica		normale	normale	atipico
26	atipica		normale	normale	atipico
27	atipica		normale	normale	atipico
28	atipica		normale	normale	atipico
29	normale		normale	normale	tipico
30	atipica		anormale	normale	atipico
31	atipica		anormale	normale	atipico
32	atipica		anormale	normale	atipico
33	atipica		anormale	ND	atipico

- 1. Introduzione
- 2. Esame di base
- 3. Esame esteso
- 4. Esami avanzati
- 5. Tecniche di preparazione degli spermatozoi
- 6. Crioconservazione degli spermatozoi
- 7. Assicurazione di qualità e controllo di qualità
- 8. Appendici
- 9. Bibliografia

2.5.14.2 Colorazione rapida

I metodi di colorazione rapida possono essere utili quando i risultati sono necessari il giorno stesso. Sono disponibili diversi set di colorazione differenziale e, sebbene siano stati riportati risultati simili [149], alcuni studi hanno sottolineato la necessità di limiti di riferimento separati per via delle differenze nelle anomalie rilevate [150, 151]. Alcuni strisci colorati con procedure rapide hanno un'elevata colorazione di fondo e possono essere di qualità inferiore rispetto a quelli colorati con la colorazione Papanicolaou. Soprattutto, le dimensioni delle teste di spermatozoo fissate e colorate differiscono rispetto alla colorazione Papanicolaou [152].

Reagenti

- Kit di colorazione rapida DiffQuick
- Fissativo: metanolo al 95% (v/v) da solo o 1,8 mg di triarilmetano sciolto in 1.000 ml di metanolo al 95% (v/v).

Fissazione dello striscio di eiaculato essiccato all'aria

Immergere i vetrini nel triarilmetano fissativo per 15 secondi o nel solo metanolo al 95% per 1 ora. Drenare la soluzione in eccesso mettendo i vetrini in verticale su carta assorbente.

Colorazione dello striscio di eiaculato fissato

Immergere in sequenza i vetrini in:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1. soluzione di colorazione rapida 1 | 10 secondi |
| 2. soluzione di colorazione rapida 2 | 5 secondi |
| 3. acqua corrente | 10-15 immersioni per rimuovere la colorazione in eccesso |

Rimuovere la soluzione in eccesso a ogni passaggio mettendo i vetrini in verticale su carta assorbente.

Montaggio degli spermatozoi colorati

I vetrini possono essere analizzati non montati o montati, ma i vetrini montati possono essere utilizzati per la formazione, per l'IQC e per il confronto intra-laboratorio. Inoltre, non vi è alcun rischio di contaminazione degli obiettivi del microscopio quando i vetrini sono montati correttamente.

Figura 2.20 Tavola DiffQuick

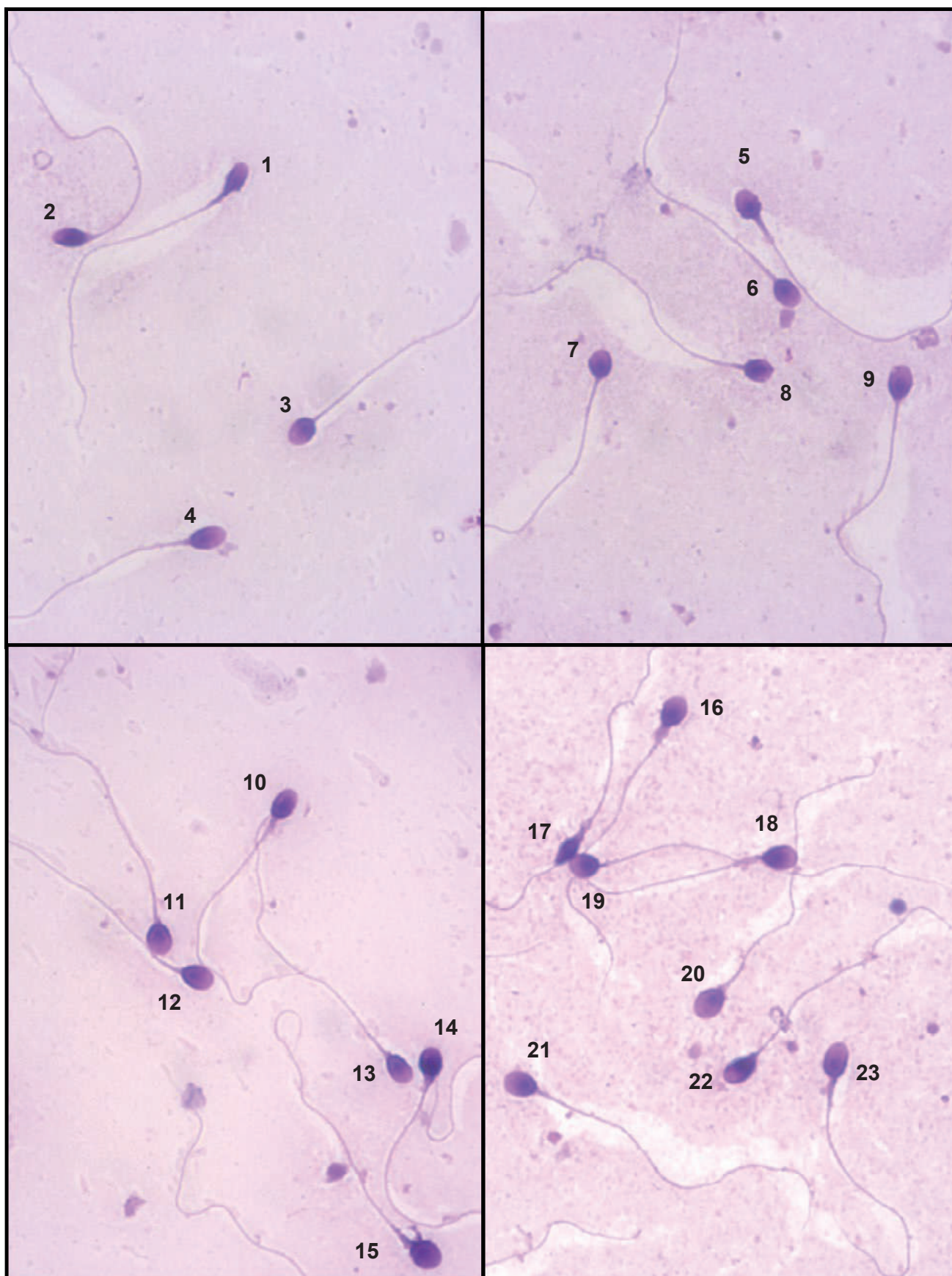


Tabella 2.15 Tavola DiffQuick

	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione complessiva dello spermatozoo
1	atipica		normale	normale	atipico
2	atipica		ispessito	normale	atipico
3	normale		normale	normale	tipico
4	atipica	amorfa	normale	normale	atipico
5	atipica	amorfa	ispessito	normale	atipico
6	normale		normale	normale	tipico
7	atipica	amorfa	normale	normale	atipico
8	atipica		normale	normale	atipico
9	normale		normale	normale	tipico
10	atipica	amorfa	ispessito	normale	atipico
11	normale		normale	normale	tipico
12	normale		normale	normale	tipico
13	atipica	a punta	normale	normale	atipico
14	atipica	piccola	ispessito	normale	atipico
15	normale		ispessito	normale	atipico
16	atipica	amorfa	ispessito	normale	atipico
17	atipica	a punta	ispessito	normale	atipico
18	normale		asimmetrico	normale	atipico
19	atipica	amorfa	ispessito	normale	atipico
20	normale		normale	normale	tipico
21	normale		normale	normale	tipico
22	atipica		normale	normale	atipico
23	atipica	amorfa	asimmetrico	normale	atipico

2.5.15 Considerazioni statistiche

2.5.15.1 Raggiungere 200 spermatozoi per replicato nelle griglie della camera di Neubauer modificata

- Se ci sono 10 spermatozoi per campo visivo ad alto ingrandimento HPF della preparazione a fresco, ce ne sarebbero 2,5/nl e 250/griglia centrale. Diluendo il campione 1+1 (1 : 2) si ridurrebbe il fondo e il numero di spermatozoi a circa 125 per griglia; valutando una seconda griglia il numero aumenterebbe a circa 250, che è sufficiente per un errore di campionamento accettabile.
- Queste concentrazioni calcolate sono solo stime approssimative perché vengono contati pochi spermatozoi e anche i volumi sono piuttosto inesatti. Le concentrazioni stimate dai preparati non diluiti possono essere tra il 30% e il 130% delle concentrazioni derivate dai campioni diluiti nelle camere di conteggio.

2.5.15.2 Errori di campionamento stimati e limiti di confidenza secondo il numero totale di spermatozoi contati

- Contando troppo pochi spermatozoi si ottiene un risultato incerto, che può avere conseguenze per la diagnosi e la terapia. Questo può essere inevitabile quando gli spermatozoi vengono raccolti per scopi terapeutici e il loro numero è basso.
- Quando il volume del liquido seminale è basso e si contano meno spermatozoi di quelli raccomandati, la precisione dei valori ottenuti sarà notevolmente ridotta. Se vengono contati meno di 200 spermatozoi per replicato, riportare l'errore di campionamento come indicato nella **Tabella 2.16**.
- L'errore di campionamento è una misura dell'errore previsto nei risultati in base al numero di osservazioni. L'intervallo di confidenza al 95% fornisce i limiti superiore e inferiore dell'intervallo in cui si trova il vero valore della popolazione, in base al numero di osservazioni nell'aliquota studiata.

Tabella 2.16 Errori di campionamento approssimati (%) e limiti dell'intervallo di confidenza al 95% secondo il numero totale di spermatozoi contati

Numero di osservazioni (N)	Errore di campionamento (%)	Limiti dell'intervallo di confidenza al 95%		Numero di osservazioni (N)	Errore di campionamento (%)	Limiti dell'intervallo di confidenza al 95%	
		inferiore	superiore			inferiore	superiore
1	100	0	6	55	13	41	72
2	71	0	7	60	13	46	77
3	58	1	9	65	12	50	83
4	50	1	10	70	12	55	88
5	45	2	12	75	12	59	94
6	41	2	13	80	11	63	100
7	38	3	14	85	11	68	105
8	35	3	16	90	11	72	111
9	33	4	17	95	10	77	116
10	32	5	18	100	10	81	122
15	26	8	25	150	8	127	176
20	22	12	31	200	7	173	230
25	20	16	37	250	6	220	283
30	18	20	43	300	6	267	336
35	17	24	49	350	5	314	389
40	16	29	54	400	5	362	441
45	15	33	60	450	5	409	494
50	14	37	66	500	4	457	546

2.5.15.3 Errori nella stima delle percentuali

Quanto sia certa la stima di una percentuale dipende non solo dal numero (N) di spermatozoi contati, ma anche dalla percentuale vera ma sconosciuta (p) (distribuzione binomiale). L'errore standard approssimativo (SE) è $\sqrt{(p(100-p))/N}$ per percentuali tra 20 e 80. Al di fuori di questo intervallo, un metodo più appropriato da usare è la trasformazione angolare (arco sin radice quadrata), $z = \sin^{-1}\sqrt{p/100}$, con una deviazione standard di $1/(2\sqrt{N})$ radianti, che dipende solo dal numero di spermatozoi contati e non dalla vera percentuale.

2.5.15.4 Confronto delle percentuali dei replicati

Una differenza tra i replicati più grande di quella accettabile suggerisce che ci sono stati un conteggio errato o degli errori di pipettaggio, oppure che le cellule non sono state mescolate bene, con una distribuzione non casuale nella camera o sul vetrino. Con questi valori di cut-off dell'intervallo di confidenza del 95%, circa il 5% dei replicati sarà fuori dai limiti solo per caso. I limiti di confidenza binomiali esatti possono ora essere generati dal computer; questo manuale li utilizza, arrotondati per accertare che le probabilità ipotizzate, per esempio di "meno del 5%", siano corrette.

2.5.15.5 Importanza di contare un numero sufficiente di spermatozoi

Per ridurre l'influenza della variazione casuale, è importante che le valutazioni siano basate su un numero sufficiente di osservazioni (preferibilmente un totale di almeno 400, da conteggi di replicati di circa 200) (**Tabella 2.16, p. 78**). La precisione della stima del numero di spermatozoi dipende dal numero di spermatozoi contati. In una distribuzione di Poisson, l'errore standard (SE) di un conteggio (N) è la sua radice quadrata (\sqrt{N}) e l'intervallo di confidenza (CI) al 95% per il numero di spermatozoi nel volume di liquido seminale è circa $N \pm 1,96\sqrt{N}$ (o $N \pm$ circa $2\sqrt{N}$).

Se si contano 100 spermatozoi, il SE è 10 ($\sqrt{100}$) e il CI 95% è 80-120 (100 ± 20 , o 20%). Se si contano 200 spermatozoi, il SE è 14 ($\sqrt{200}$) e il CI 95% è 172-228 (200 ± 28 , o 14%). Se si contano 400 spermatozoi, il SE è 20 ($\sqrt{400}$) e il CI 95% è 360-440 (400 ± 40 , o 10%).

Va notato che con un cut-off del 4% per le forme normali, sarebbe necessario valutare più di 1.500 spermatozoi per poter affermare che il 3% e il 5% sono diversi.

2.5.15.6 Nozioni statistiche alla base dei confronti dei conteggi di replicati

La differenza tra conteggi indipendenti dovrebbe essere zero, con un SE uguale alla radice quadrata della somma dei due conteggi. Così $(N1-N2)/(\sqrt{[N1+N2]})$ dovrebbe essere $< 1,96$ solo per caso per un CI al 95%.

Se la differenza tra i conteggi è inferiore o uguale a quella indicata nella **Tabella 2.3, p. 33** per la somma data, le stime sono accettate e la concentrazione è calcolata dalla loro media (**Tabella 2.4, p. 35**).

Differenze maggiori suggeriscono che si è verificato un conteggio errato, che ci sono stati errori di pipettaggio o che le cellule non sono state ben mescolate, con una conseguente distribuzione non casuale nella camera o sul vetrino.

Quando la differenza tra i conteggi è maggiore di quella accettabile, scartare i primi due valori e preparare e valutare due nuove diluizioni di liquido seminale (non contare un terzo campione e prendere la media dei tre valori, oppure la media dei due valori più vicini).

Questo vale per la conta degli spermatozoi e delle cellule positive alla perossidasi (**Sezione 3.4.1.1, p. 108**). Per le cellule CD45-positivo (**Sezione 3.4.2, p. 113**) e le cellule germinali immature (**Sezione 3.6, p. 118**), i preparati colorati dovrebbero essere rivalutati.

Con questi valori di cut-off del CI al 95%, circa il 5% dei replicati sarà fuori dai limiti solo per caso.

2.5.16 Misure dello spermatozoo

Un micrometro a oculare può essere utile per distinguere tra teste di spermatozoo di dimensioni normali e anormali.

Le dimensioni della testa di 77 spermatozoi colorati con Papanicolaou, classificati come normali secondo i criteri qui riportati e misurati con un sistema computerizzato (coefficiente di variazione per misure ripetute 2-7%), erano le seguenti: lunghezza mediana 4,1 μm , CI 95% 3,7-4,7 μm ; larghezza mediana 2,8 μm , CI 95% 2,5-3,2 μm ; rapporto mediano lunghezza-larghezza 1,5, CI 95% 1,3-1,8.

I tratti intermedi di 74 spermatozoi colorati con Papanicolaou, classificati come normali secondo i criteri qui riportati e misurati dallo stesso sistema computerizzato, avevano le seguenti dimensioni: lunghezza mediana 4,0 μm , CI 95% 3,3-5,2 μm ; larghezza mediana 0,6 μm , CI 95% 0,5-0,7 μm .

2.5.17 Esempi pratici

2.5.17.1 Calcolo della concentrazione di altre cellule

Le concentrazioni di altre cellule e, per esempio, di parti di spermatozoi (code senza testa, teste senza coda) possono essere calcolate in relazione alla concentrazione degli spermatozoi. A condizione che la presenza di tali elementi sia stata contata nello stesso volume (HPF) in cui sono stati contati gli spermatozoi, si può utilizzare la seguente formula:

$$C = S \times N_i / N_s$$

Dove:

C = concentrazione di altre cellule, parti di cellule o altri elementi di interesse;

S = concentrazione di spermatozoi calcolata;

N_i = numero di altre cellule, parti di cellule o altri elementi contati;

N_s = numero di spermatozoi contati nello stesso volume (area) degli elementi ricercati.

2.5.17.2 Percentuali di spermatozoi con morfologia tipica e TZI

Su 200 spermatozoi conteggiati con un contacellule a 6 tasti, 12 sono conteggiati come tipici e 188 come atipici. Dei 188 spermatozoi atipici, 184 hanno difetti della testa, 102 del tratto intermedio, 30 del tratto principale e 44 hanno un eccesso di citoplasma residuo.

- forme tipiche $12/200 = 6\%$
- teste atipiche $184/200 = 91\%$
- collo/tratto intermedio atipici $102/200 = 51\%$
- coda atipica $30/200 = 15\%$
- percentuale con eccesso di citoplasma residuo $44/200 = 22\%$
- TZI $(184+102+30+44)/188 = 1,91$.

2.5.17.3 Calcolo delle parti di spermatozoi o delle cellule non nemaspermiche negli strisci morfologici

C = concentrazione desiderata di altre cellule, parti di cellule o altri elementi.

N = numero di cellule non nemaspermiche o parti di spermatozoo contate nello stesso numero di campi di 200 spermatozoi.

S = concentrazione di spermatozoi in milioni per ml.

$C = S \times (N/200)$ in milioni per ml.

2.5.17.4 Concentrazione di spermatozoi

Esempio 1

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2), il replicato 1 risulta contenere 200 spermatozoi in 2 griglie, mentre il replicato 2 contiene 250 spermatozoi in 2 griglie. La somma dei valori (200+250) è 450 in 4 griglie, e la differenza (250-200) è 50. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che questo numero supera la differenza limite (41) prevista per il solo effetto della variabilità casuale; i risultati vengono quindi scartati e vengono fatte due nuove diluizioni di replicati.

Esempio 2

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2), il replicato 1 risulta contenere 219 spermatozoi in 3 griglie, mentre il replicato 2 contiene 180 spermatozoi in 3 griglie. La somma dei valori (219+180) è 399 in 6 griglie, e la differenza (219-180) è 39. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che questo numero è uguale alla differenza limite (39), dunque meno di quello trovato per caso, quindi i valori sono accettati.

La concentrazione di spermatozoi nel campione per una diluizione di 1+1 (1 : 2) è $C = (N/n)/50$ spermatozoi/nl o $(410/6)/50 = 1,37$ spermatozoi/nl, o $1,4 \times 10^6$ spermatozoi/ml di spermatozoi (arrotondando alla seconda cifra).

Esempio 3

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2), il replicato 1 risulta contenere 120 spermatozoi in tutte le 9 griglie, mentre il replicato 2 contiene 140 spermatozoi in tutte le 9 griglie. La somma dei valori (120+140) è 260 in 18 griglie, e la differenza (140-120) è 20. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che questo numero è inferiore alla differenza limite (31), quindi i valori sono accettati.

Quando tutte le nove griglie sono valutate in ogni camera (un totale di 1,8 μ l), la concentrazione di spermatozoi nel campione per una diluizione di 1+1 (1 : 2) è $C = (N/1,8) \times 2$ spermatozoi per μ l = $(260/1,8) \times 2 = 288,8$ spermatozoi/ μ l, o 290×10^3 spermatozoi per ml di sperma (arrotondando alla seconda cifra). Poiché sono stati contati meno di 400 spermatozoi, riportare l'errore di campionamento per 260 spermatozoi come indicato nella **Tabella 2.3, p. 33** (circa 6,3%).

Esempio 4

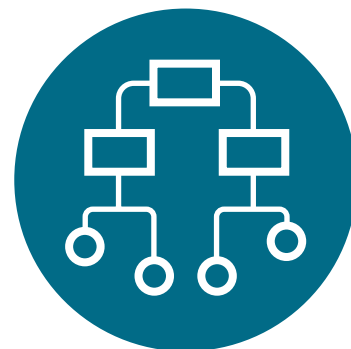
Con una diluizione di 1+1 (1 : 2) il replicato 1 è risultata contenere 10 spermatozoi in tutte le 9 griglie, mentre il replicato 2 conteneva 8 spermatozoi in tutte le 9 griglie. Poiché in tutte e 9 le griglie si trovano meno di 25 spermatozoi, la concentrazione è < 56.000/ml; riportare che "nei campioni sono stati visti 18 spermatozoi, troppo pochi per una determinazione accurata della concentrazione (< 56.000/ml)".

Esempio 5

Con una diluizione di 1+1 (1 : 2) non si trovano spermatozoi in nessuno dei due replicati. Poiché sono stati contati meno di 25 spermatozoi, la concentrazione è < 56.000/ml; riportare che "Non sono stati visti spermatozoi nei replicati, troppo pochi per una determinazione accurata della concentrazione (< 56 000/ml)".

Capitolo 3:

Esame esteso



3.1	Indici di difetti multipli dello spermatozoo.....	83
3.2	Frammentazione del DNA nemaspermico	86
3.3	Test genetici e genomici	105
3.4	Test relativi all'immunologia e ai metodi immunologici ..	108
3.5	Valutazione delle interleuchine come marcatori di infiammazione del tratto genitale maschile.....	116
3.6	Valutazione delle cellule germinali immature nel liquido seminale.....	118
3.7	Analisi degli antigeni di superficie degli spermatozoi.....	119
3.8	Saggi biochimici per la funzione delle ghiandole accessorie	125
3.9	Valutazione della sequenza di eiaculazione	135

I test descritti in questo capitolo non sono necessari per l'analisi di routine del liquido seminale, ma possono essere utili in alcune circostanze per scopi diagnostici o di ricerca. Alcune pubblicazioni possono suggerire l'utilità di un test in base all'alto coefficiente di correlazione. Tuttavia, anche con elevati coefficienti di correlazione, per valutare se un test è utile per il singolo individuo bisogna considerare i valori predittivi positivi e negativi (le misure di probabilità che un risultato positivo o negativo sia vero).

Alcuni dei test inclusi in questo manuale sono stati descritti seguendo i procedimenti standard raccomandati. Per motivi di standardizzazione e chiarezza delle raccomandazioni, i test alternativi sono stati raccolti in questo capitolo. I laboratori possono prendere in considerazione l'uso di tali test come alternativa agli esami di base raccomandati, a patto che la relazione con questi ultimi sia stabilita e spiegata.



Clinicamente, c'è una crescente consapevolezza che le anomalie cromosomiche e le mutazioni genetiche siano alla base di uno spettro diversificato di problemi di infertilità maschile, che a loro volta sono alla base di molte delle anomalie viste nell'analisi del liquido seminale. ”

3.1 Indici di difetti multipli dello spermatozoo

Gli spermatozoi morfologicamente atipici presentano spesso difetti multipli (della testa, del tratto intermedio o del tratto principale, o anche combinazioni di questi difetti). Una valutazione dettagliata dell'incidenza delle alterazioni morfologiche può essere più utile di una semplice valutazione della percentuale di spermatozoi

morfologicamente normali, specialmente negli studi sull'entità del danno alla spermatogenesi umana [58, 153]. Il conteggio, con un sistema a più vie, degli spermatozoi morfologicamente normali e di quelli con anomalie della testa e del tratto intermedio e principale fornisce il numero medio di atipie per spermatozoo valutato. Dal conteggio delle atipie dettagliate della testa, del tratto intermedio e del tratto principale con un sistema a più vie possono derivare tre indici:

- l'indice di teratozoospermia (TZI) [104, 154], come raccomandato nel **Capitolo 2**;
- l'indice di anomalie multiple (MAI) [58];
- l'indice di deformità dello spermatozoo (SDI) [155-157].

Questi indici sono stati correlati con la fertilità in vivo (MAI e TZI) [58, 104] e in vitro (SDI) [155] e possono essere utili nella valutazione di alcune esposizioni o condizioni patologiche [153, 156, 157].

3.1.1 Calcolo degli indici di difetti morfologici multipli

Ogni spermatozoo atipico viene valutato per i difetti della testa, del tratto centrale e del tratto principale, nonché per la presenza di residuo citoplasmatico in eccesso (ovvero dal volume superiore a un terzo della dimensione della testa dello spermatozoo). Si possono usare contacellule da laboratorio, con un numero di vie d'ingresso adattato al tipo di indice che si sta valutando. Se non è disponibile un contacellule, si può usare un semplice foglio per appunti.

- Il TZI ha un massimo di quattro difetti per spermatozoo atipico: uno ciascuno per la testa, il tratto intermedio e quello principale e uno per il residuo citoplasmatico in eccesso. Possono essere utilizzati i criteri morfologici forniti in questo manuale (vedere anche **Valutazione microscopica e calcolo dei risultati, p. 54**).
- Il MAI è simile al TZI, in quanto si basa sul numero medio di anomalie per spermatozoo atipico. Tutte le anomalie della testa, del tratto intermedio e di quello principale sono incluse nel calcolo. I criteri morfologici utilizzati per questa analisi sono tratti da David et al., 1980 [158] e modificati da Auger et al., 2000 [159] e differiscono da quelli presentati in questo manuale (**Sezione 2.4.9, p. 41**).
- L'SDI è il numero di difetti diviso per il numero totale degli spermatozoi (non solo quelli atipici). Esso comprende diverse categorie di anomalie della testa, ma solo una per ogni difetto del tratto intermedio e di quello principale. Si possono usare i criteri morfologici indicati in questo manuale.

La **Tabella 3.1** mostra un esempio dei calcoli per la generazione di questi indici, per dimostrare le differenze tra loro.

Tabella 3.1 Calcolo degli indici di difetti multipli dello spermatozoo

	MAI	TZI	SDI
Valore massimo		4,00	3,00
Denominatore	spermatozoo atipico	spermatozoo atipico	tutti gli spermatozoi
(A) Numero di spermatozoi contati	200	200	200
Spermatozoi normali (N)	46	46	46
Spermatozoi normali (%)	23	23	23
(B) Numero di spermatozoi con difetti (200-46)	154	154	154
(1) Numero di difetti della testa (MAI, SDI) o numero di spermatozoi con > 1 difetto della testa (TZI)	284	154	212
(2) Numero di difetti del tratto intermedio (MAI) o numero di spermatozoi con > 1 difetto del tratto intermedio (TZI, SDI)	54	52	52
(3) Numero di difetti del tratto principale (MAI) o numero di spermatozoi con > 1 difetto del tratto principale (TZI, SDI)	54	46	46
(4) Numero di spermatozoi con residuo citoplasmatico in eccesso	14	14	14
(C) Difetti totali (1)+(2)+(3) (= C) (MAI)	392		
(D) Difetti totali (1)+(2)+(3)+(4) (= D) (TZI, SDI)		266	324
Calcolo dell'indice	C/B	D/B	D/A
Valore dell'indice	2,55	1,72	1,62



Nota: Questa descrizione del TZI è in accordo con quella del documento originale di Menkveld et al. [104] e dei manuali della Società Europea di Riproduzione Umana ed Embriologia [12] e dell'Associazione Nordica di Andrologia [160], che danno valori da 1,00 a 4,00. Differisce invece dalla descrizione di una precedente edizione di questo manuale [4], in cui il residuo citoplasmatico in eccesso non veniva registrato separatamente e dava valori TZI da 1,00 a 3,00.

3.1.2 Interpretazione

La **Tabella 3.2** presenta i valori di MAI e TZI per gli uomini che si sono rivolti ai centri di infertilità e quelli che hanno avuto un figlio negli ultimi tre anni. Va notato che c'è una sovrapposizione tra uomini fertili e uomini in coppie subfertili, il che significa che anche per quanto riguarda queste misure non esiste un limite netto tra uomini completamente fertili e uomini subfertili.

Tuttavia, bisogna ricordare che la valutazione della morfologia dello spermatozoo umano non è utilizzata esclusivamente per la prognosi della fecondazione spontanea o assistita. I disturbi della spermatogenesi negli uomini con una produzione quantitativa ordinaria di spermatozoi danno ulteriori informazioni e possono indicare uno stress testicolare, un malfunzionamento epididimario o anche disordini genetici della coda dello spermatozoo. In quest'ultimo caso, qualsiasi stimolazione ormonale non avrà probabilmente successo, e alla coppia potrebbe essere proposta un'indagine genetica per capire il rischio di patologie nella prole.

Le differenze rilevate negli indici di difetto degli spermatozoi nei partner maschili di coppie fertili e infertili sono minime, il che rende difficile l'utilizzo di questi criteri per tentare di distinguere i gruppi. Utilizzando per la classificazione un sistema un po' diverso, relativo alle alterazioni morfologiche multiple del flagello (MMAF) [161] e rivisto in Coutton et al., 2015 [162], le carenze morfologiche possono essere associate a una serie di difetti genetici che interessano la funzione dello spermatozoo.

Tabella 3.2 Indici dei difetti dello spermatozoo in uomini di coppie fertili e infertili

	Coppie infertili		Coppie fertili	
	MAI ^a	TZI ^b	MAI ^c	TZI ^b
Media	1,94	1,81	1,58	1,51
Deviazione standard	0,37	0,30	0,20	0,20
Minimo	1,12	1,26	1,04	1,17
Massimo	3,9	2,64	2,38	2,07
Percentili				
5	1,44		1,27	154
10	1,51	1,74	1,34	1,33
25	1,67		1,44	52
50	1,88	1,81	1,58	1,54
75	2,14		1,72	14
90	2,44		1,86	
95	2,65		1,94	324
N	4.930	103	994	107

a. Dati non pubblicati da Auger, Parigi, utilizzando la classificazione morfologica di David et al., 1980 [158], modificata da Auger et al., 2000 [159].

b. Menkveld et al., 2001 [104].

c. Jørgensen et al., 2001 [163], usando la classificazione morfologica di David et al., 1980 [158], modificata da Auger et al., 2000 [159].

3.2 Frammentazione del DNA nemaspermico

3.2.1 Premessa

Il danno al DNA nemaspermico può essere definito come qualsiasi cambiamento chimico nella normale struttura del DNA. Tra questi cambiamenti, la frammentazione del DNA spermatico (sDF) è uno dei disturbi più comuni che interessano il materiale genetico sotto forma di rotture a singolo o doppio filamento. L'sDF può essere innescata da diversi processi, tra cui l'impacchettamento difettoso del DNA durante la spermatogenesi e i processi di morte cellulare e stress ossidativo che possono essere associati a diverse condizioni patologiche e ambientali [164-166].

Anche se la capacità di fecondazione degli spermatozoi contenenti sDF può non essere compromessa, molteplici meta-analisi pubblicate negli ultimi anni indicano che l'sDF può influenzare lo sviluppo embrionale, l'impianto e la gravidanza sia nella riproduzione naturale che in quella assistita [167-170]. È anche noto che l'sDF è presente prevalentemente tra gli uomini con parametri seminali alterati, ed è stato proposto che potrebbe essere legata a casi di infertilità in individui normozoospermici. Poiché l'sDF è solo parzialmente correlata alla qualità del liquido seminale [164, 171], potrebbe rappresentare un esame aggiuntivo importante nel percorso diagnostico dell'infertilità maschile, diventando uno dei biomarcatori più discussi e promettenti in andrologia di base e clinica.

Sono stati sviluppati diversi metodi per testare l'sDF della cromatina nemaspermica e valutare la presenza di frammentazione del DNA (cioè la presenza di rotture di DNA a singolo o doppio filamento). Quelli qui riportati sono stati ampiamente utilizzati negli ultimi 20 anni nei laboratori di andrologia e riproduzione assistita.

Per la valutazione dell'sDF possono essere utilizzati test che variano notevolmente sia nel metodo che nel tipo di danno che vanno a rilevare. La terminal desossinucleotidil transferase (dUTP) nick end labelling (TUNEL) e l'elettroforesi su gel di una singola cellula (Comet) valutano direttamente la presenza di rotture a singolo e doppio filamento di DNA, mentre la citometria a flusso con arancio di acridina (AO FCM) e il test di dispersione della cromatina nemaspermica (SCD) rilevano la suscettibilità della cromatina al trattamento acido.

Le soglie diagnostiche (chiamate anche "valori di cut-off") di questi metodi sono specifiche per ogni test e per ogni metodo con cui il test viene eseguito. Per l'uso clinico, le soglie appropriate dovrebbero essere determinate e convalidate dal laboratorio che le esegue. Per l'utilità rispetto al singolo paziente, è importante che non vengano studiate solo le correlazioni di popolazione; i dati sui valori predittivi positivi e negativi sono necessari per valutare e convalidare l'utilità dei test nella pratica clinica reale.

3.2.2 TUNEL test

Il TUNEL test è una delle tecniche più comuni per la valutazione della frammentazione del DNA spermatico. Il test evidenzia le rotture del filamento di DNA *in situ* marcandole con fluorocromi o con sonde legate alla biotina, da utilizzare con streptavidina-HRP (perossidasi di rafano) e un substrato cromogenico HRP. Il principio del TUNEL è quello di marcare le rotture presenti nel DNA con desossinucleotidi (di solito desossiuridina trifosfato, dUTP). Il dUTP potrebbe essere direttamente coniugato con un colorante fluorescente o marcato con biotina.

Le estremità 3'-OH terminali delle rotture del filamento di DNA servono come primer e in questa procedura vengono marcate con bromo desossiuridina (BrdU) in una reazione catalizzata da una DNA polimerasi indipendente dallo stampo chiamata Terminal deoxynucleotidyl Transferasi (TDT) [172]. Il metodo è in grado di valutare direttamente sia le rotture a singolo che a doppio filamento; dunque, più siti di rottura del filamento di DNA sono presenti, più il marcatore viene incorporato all'interno di una cellula. Il dUTP è il substrato che viene aggiunto dall'enzima TDT all'estremità 3'-OH terminale. Il dUTP aggiunto può essere colorato direttamente, e quindi fungere da marcatore diretto delle rotture del DNA, oppure il segnale può essere amplificato dall'uso di un dUTP modificato su cui può essere assorbito un anticorpo anti-dUTP marcato (può essere utilizzato non solo il dUTP, ma anche altri desossinucleotidi) [173].

Figura 3.1 TUNEL test su vetrino per l'analisi della frammentazione del DNA mediante fluorescenza

I pannelli superiori mostrano spermatozoi colorati con DAPI (blu) e spermatozoi colorati con fluorescenza (verde) che evidenziano danni al DNA e presentano un livello di danno basale; i pannelli inferiori rappresentano un controllo positivo in cui virtualmente sono rappresentati tutti gli spermatozoi colorati (blu) e quelli che presentano frammentazione del DNA sono evidenziati dalla fluorescenza verde.

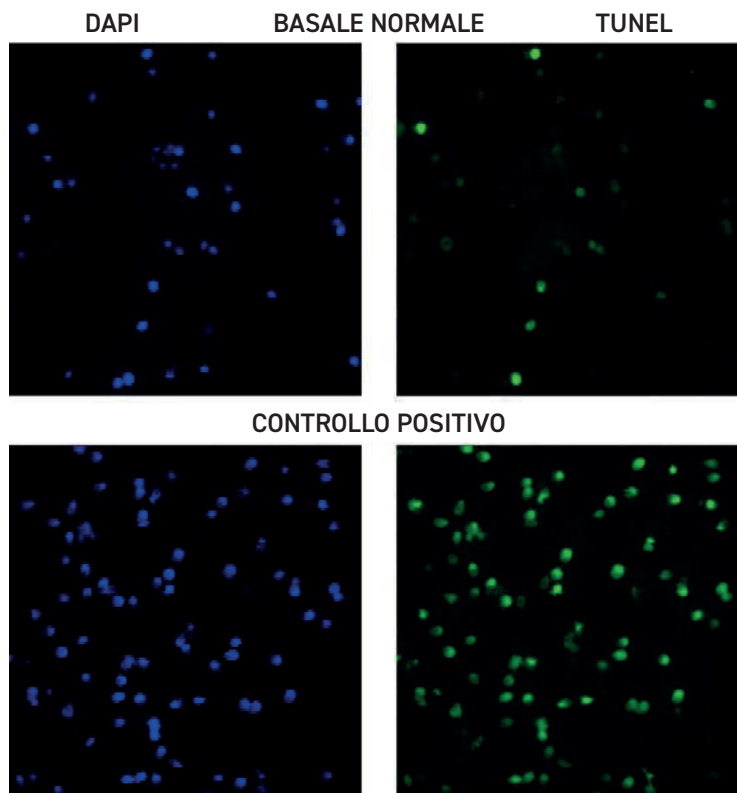


Foto concesse da C. Roman-Montanana e da J. Kirkman-Brown.

Ci sono diversi kit commerciali che forniscono sonde marcate e l'enzima TDT necessario per legare la sonda alle rotture del DNA. Dopo la marcatura, la percentuale di spermatozoi fluorescenti può essere determinata mediante microscopia a fluorescenza o citometria a flusso. Nel caso di sonde legate con biotina, per rivelare gli spermatozoi marcati sono necessari streptavidina-HRP (perossidasi di rafano) e un substrato cromogenico HRP. Le cellule colorate con questo metodo possono essere visualizzate e analizzate al microscopio (**Figura 3.1**); tuttavia, per un esame clinico più efficiente dei campioni di spermatozoi, il TUNEL test può essere utilizzato in combinazione con la citometria a flusso, con cui è possibile fare una valutazione quantitativa della percentuale di cellule geneticamente danneggiate all'interno di un campione di spermatozoi.

Quando si usa il microscopio, si dovrebbero conteggiare almeno 200 spermatozoi. È stato riportato che le variazioni nelle diverse fasi del TUNEL test possono influenzare notevolmente le misure ottenute [174], quindi è importante che ogni laboratorio standardizzi la tecnica e stabilisca i propri valori di cut-off.

3.2.2.1 Metodo primario

Reagenti

- Fluido tubarico umano o Biggers, Whitten e Whittingham (vedere **Appendice**, p. 229 per la composizione; HTF, BWW).

- Soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (vedere **Appendice, p. 227** per la composizione; DPBS).
- DPBS contenente 1% di sieroalbumina bovina (BSA).
- DPBS contenente 0,1% citrato e 0,1% triton.
- Paraformaldeide 3,7% preparata in DPBS ogni settimana.
- 3.000 U/ml-3 U/ml di nucleasi micrococcica o deossiribonucleasi ricombinante (DNasi I) in 50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 1 mg/ml BSA.

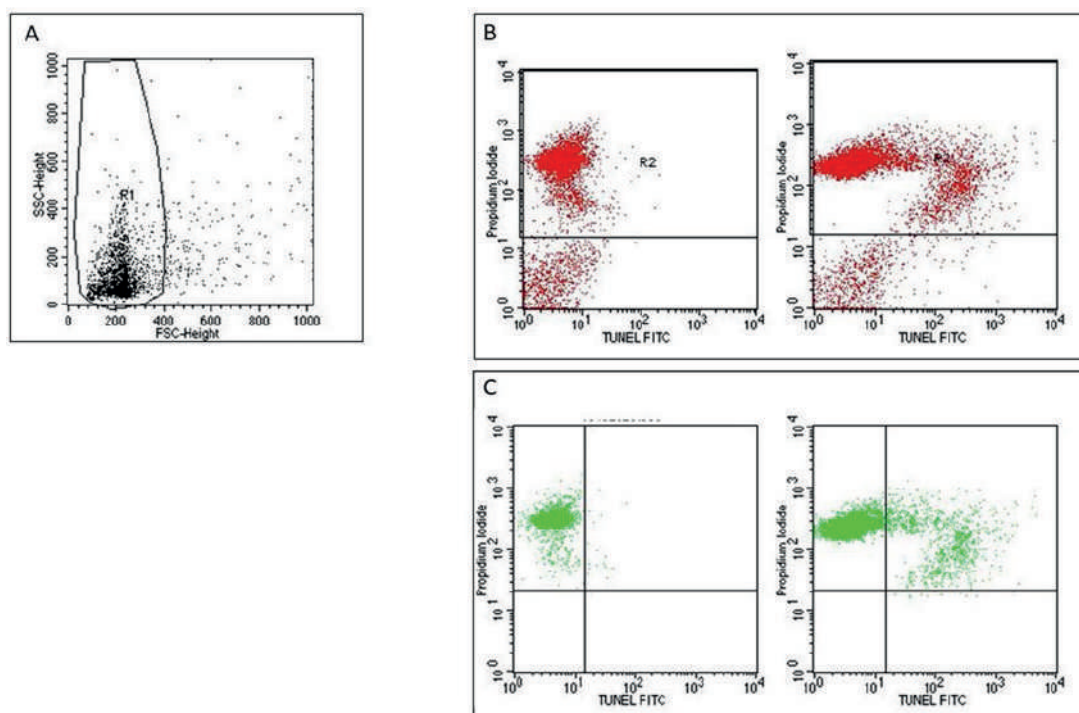
Procedura

1. Un'aliquota di liquido seminale, contenente almeno 2 milioni di spermatozoi (per i campioni con un basso numero di spermatozoi) ma preferibilmente 10 milioni, viene lavata due volte con un tampone (HTF o BWB, vedere **Appendice, p. 228** per la composizione); per i campioni inferiori a 2 milioni si può usare, invece, la microscopia a fluorescenza e valutare la percentuale di spermatozoi TUNEL-positivi, centrifugando a 500 g per 5 minuti. Per i campioni con un numero di spermatozoi inferiore a 2 milioni, dopo la procedura di colorazione gli spermatozoi TUNEL-positivi possono essere valutati come riportato nella sezione **TUNEL con microscopia a fluorescenza, p. 92**.
2. Il pellet viene risospeso in 500 µl di paraformaldeide (3,7% preparato fresco in DPBS ogni settimana) per la fissazione a temperatura ambiente per 30 minuti.
3. Centrifugare a 500 g per 5 minuti e lavare il pellet due volte in 200 µl di DPBS contenente 1% BSA come sopra.
4. Per permeabilizzare gli spermatozoi, aggiungere 100 µl di tampone contenente citrato (0,1%) e triton (0,1%) e incubare in ghiaccio per 4 minuti.
5. Per fermare la permeabilizzazione, aggiungere 300 µl di DPBS contenente 1% BSA e centrifugare a 500 g per 5 minuti.
6. Rimuovere il surnatante e risospesare il pellet con 400 µl di DPBS contenente 1% BSA e dividere in due aliquote, rispettivamente controllo negativo (TDT-) e campione da analizzare (TDT+).
7. Un controllo positivo può essere utile per dimostrare che la procedura può riconoscere il DNA frammentato. In questo caso, un'altra aliquota di spermatozoi dev'essere preparata come sopra e, dopo la permeabilizzazione, incubata con nucleasi micrococcica o DNasi I ricombinante (3.000 U/ml-3 U/ml in 50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 1 mg/ml BSA) per 10 minuti a 15-25°C per indurre rotture del filamento di DNA, prima delle procedure di marcatura.
8. Centrifugare le tre aliquote (a 500 g per 5 minuti) e risospesare come segue: a TDT- aggiungere solo il tampone contenente la sonda marcata; a TDT+ e controllo positivo aggiungere il tampone contenente la sonda marcata e TDT (30 unità o come diversamente indicato nei kit commerciali).
9. Incubare (nel caso di sonde fluorescenti al buio) per 1 ora a 37°C.
10. Lavare due volte con 200 µl di DPBS contenente 1% BSA e risospesare in DPBS. Il volume finale di DPBS varia a seconda del metodo usato per rivelare la sonda marcata. Quando si usa un microscopio, un piccolo volume (massimo 100 µl) dovrebbe essere usato per allestire i vetrini con un numero sufficiente di sper-

matozoi da osservare al microscopio a fluorescenza o al microscopio ottico. Si dovrebbero conteggiare almeno 200 spermatozoi.

- In caso di analisi con citometria a flusso, i campioni devono essere lavati due volte, risospesi in 500 μ l di DPBS, colorati con ioduro di propidio (PI, 30 μ g/ml in DPBS) o un'altra colorazione nucleare compatibile con la fluorescenza del TUNEL e incubati al buio per 10 minuti a temperatura ambiente per identificare gli eventi nucleati. Per ogni campione, devono essere registrati 8.000-10.000 eventi positivi PI all'interno della regione contenente spermatozoi (regione a forma di fiamma; R1 nella **Figura 3.2 A**) [174] tracciata nel diagramma a punti generato dal rivelatore frontale e laterale di eventi cellulari (FSC/SSC), per escludere altre cellule (come cellule germinali o leucociti che sono al di fuori della fiamma) e interferenti presenti nell'eiaculato (compresi eventi PI negativi come corpi apoptotici che possono essere presenti all'interno di R1) [174, 175]. La fluorescenza verde (relativa ai nucleotidi coniugati con la fluoresceina) e la fluorescenza rossa (eventi PI) sono rivelate rispettivamente dai rivelatori di banda di lunghezza d'onda 515-555 e 563-607 nm. Una regione R2 viene poi tracciata per includere tutti gli eventi PI positivi all'interno della regione R1 (**Figura 3.2 B**, entrambi i riquadri). Una soglia per la fluorescenza della frammentazione del DNA (spermatozoi TUNEL-positivi) è fissata nel controllo negativo e comprende il 99% degli eventi PI positivi (**Figura 3.2 C**, riquadro sinistro). Questa soglia viene poi riportata nel campione in esame (**Figura 3.2 C**, riquadro destro) per calcolare la percentuale di eventi positivi alla fluorescenza PI e verde oltre la soglia, che rappresenta la percentuale di spermatozoi con frammentazione del DNA.

Figura 3.2 Citometria a flusso per l'analisi dello ioduro di propidio e della fluorescenza verde



Per gentile concessione di Elisabetta Baldi.

- (A) La tipica regione a forma di fiamma (R1) nel diagramma a punti FSC/SSC contenente spermatozoi e corpi apoptotici. (B) Intorno agli eventi positivi di PI (R2) viene tracciato un riquadro, escludendo i corpi apoptotici. (C, riquadro sinistro) Controllo negativo dove è impostato un marcatore, comprendente il 99% degli eventi negativi. (C, riquadro destro) Campione di test in cui vengono tradotti i marcatori impostati nel controllo negativo. La percentuale di spermatozoi con frammentazione del DNA si trova nel quadrante superiore destro.

3.2.2.2 Procedura alternativa TUNEL

Adattata da Darzynkiewicz et al., 2008 [176] e Sharma et al., 2013 [173].

Reagenti

- Soluzione salina tamponata con fosfato (DPBS, p. 228), pH 7,4.
- 1-3,7% (v/v) di formaldeide in DPBS.
- Etanolo al 70%, pH 7,4.
- Tampone di reazione TDT 5X: 1 M potassio (o sodio) cacodilato, 125 mM HCl, pH 6,6, 1,25 mg/ml BSA.
- Soluzione stock di BrdUTP: 2 mM BrdUTP in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.
- 12,5 unità di TDT, fornite nel buffer di stoccaggio: 60 mM fosfato di potassio a pH 7,2, 150 mM KCl, 1 mM 2-mercaptoetanol e 0,5% Triton X-100, 50% glicerolo.
- 10 mM CoCl₂.
- H₂O distillata.
- 0,1% Triton X-100 e 5 mg/ml BSA sciolti in DPBS.
- Soluzione di isotiocianato di fluoresceina (FITC) – o Alexa Fluor 488 – coniugato anti-BrdU mAb: 0,1-0,3 µg del fluorocromo coniugato anti-BrdU Ab in 100 µl di DPBS contenente 0,3% Triton X-100 e 1% (w/v) BSA.
- Soluzione di colorazione PI: 5 µg/ml di PI, 100 µg/ml di RNasi A (senza DNasi) in DPBS.

Protocollo

1. Sospendere 1-5×10⁶ spermatozoi in 0,5 ml di DPBS, pH 7,4.
2. Trasferire questa sospensione con una pipetta Pasteur in una vial di polipropilene da 5 ml contenente 4,5 ml di formaldeide raffreddata 1-3,7% (v/v) in DPBS, pH 7,4. Tenere la vial in ghiaccio per 30-60 minuti.
3. Centrifugare a 300 g per 5 minuti e risospendere il pellet di spermatozoi in 5 ml di DPBS.
4. Centrifugare nuovamente a 300 g per 5 minuti e risospendere il pellet di spermatozoi in 0,5 ml di DPBS.
5. Utilizzando nuovamente una pipetta Pasteur, trasferire la sospensione in una vial contenente 4,5 ml di etanolo raffreddato al 70%, pH 7,4. Se è necessario o conveniente, la sospensione di spermatozoi può essere conservata in etanolo per diverse settimane a -20°C.
6. Centrifugare a 200 g per 3 minuti per rimuovere l'etanolo e risospendere gli spermatozoi in 5 ml di DPBS.
7. Centrifugare nuovamente a 300 g per 5 minuti e risospendere il pellet in 50 µl di una soluzione contenente:

- 10 µl di tampone di reazione TDT 5X: 1 M potassio (o sodio) cacodilato, 125 mM HCl, pH 6,6, 1,25 mg/ml BSA;
 - 2,0 µl di soluzione stock di BrdUTP: 2 mM BrdUTP in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5;
 - 0,5 µl (12,5 unità) di TDT, fornito in tampone di conservazione: 60 mM fosfato di potassio a pH 7,2, 150 mM KCl, 1 mM 2-mercaptoetanololo e 0,5% Triton X-100, 50% glicerolo;
 - 5 µl di 10 mM CoCl₂;
 - 33,5 µl di H₂O distillata.
8. Incubare le cellule in questa soluzione per 40 minuti a 37°C.
 9. Dopo il tempo di incubazione, aggiungere 1,5 ml di tampone di risciacquo: 0,1% Triton X-100 e 5 mg/ml BSA sciolti in DPBS, e centrifugare a 300g per 5 minuti.
 10. Risospendere il pellet di cellule in 100 µl di soluzione FITC – o Alexa Fluor 488 – coniugata anti-BrdU mAb: 0,1-0,3 µg del fluorocromo coniugato anti-BrdU Ab in 100 µl di DPBS contenente 0,3% Triton X-100 e 1% (w/v) BSA.
 11. Incubare a temperatura ambiente per 1 ora.
 12. Aggiungere 1 ml di soluzione di colorazione PI: 5 µg/ml di PI, 100 µg/ml di RNasi A (senza DNasi) (Sigma) in DPBS.
 13. Incubare al buio per 30 minuti a temperatura ambiente o per 20 minuti a 37°C.

3.2.2.3 Risultati

TUNEL con citometria a flusso

Analizzare le cellule per citometria a flusso utilizzando un laser a luce blu di 488 nm. Misurare la fluorescenza verde di FITC – o Alexa Fluor 488 – anti-BrdU Ab a 530/20 nm. Misurare la fluorescenza rossa di PI a > 600 nm.

TUNEL con microscopia a fluorescenza

1. Caricare un'aliquota del campione colorato su un vetrino e coprire con un vetrino coprioggetto.
2. Segnare un minimo di 500 spermatozoi per campione sotto obiettivo 40× con un microscopio a epifluorescenza (eccitazione tra 460 e 490 nm e un'emissione > 515 nm).
3. Contare il numero di spermatozoi per campo colorato con PI (rosso).
4. Contare il numero di cellule che emettono fluorescenza verde (TUNEL-positive) nello stesso campo.
5. Calcolare la percentuale di cellule TUNEL-positive.

3.2.2.4 Interpretazione clinica

Il TUNEL può essere eseguito con differenti metodiche. A seconda del protocollo utilizzato, i laboratori hanno riportato diversi limiti che sono stati utilizzati per di-

stinguere campioni seminali sani e campioni correlati all'infertilità maschile [164, 173, 177-179]. Ciascun laboratorio, pertanto, dovrebbe stabilire il proprio intervallo di riferimento utilizzando controlli appropriati, basati su valori predittivi positivi e negativi, e chiarire a cosa si riferisca il valore predittivo (per esempio, concepimento, aborto spontaneo o altri fenomeni).

3.2.2.5 Note tecniche

- Per prevenire la perdita di DNA altamente frammentato durante i ripetuti lavaggi previsti dalla procedura, la prefissazione con un agente reticolante come la formaldeide è un passaggio cruciale per il successo del test. La formaldeide appena preparata deve essere usata per ogni ciclo di esperimenti.
- Data l'elevata condensazione della cromatina nemaspermica, alcuni autori suggeriscono l'inclusione di una fase di decondensazione della cromatina nel protocollo TUNEL per aumentare la sensibilità del test. In tale procedura, prima della fase 5 i campioni vengono risospesi in una soluzione di decondensazione (1,4-Ditiotreitolo, o DTT, 5 mM; eparina 100 U/ml e 0,1% Triton X-100, **DPBS, p. 228**) e incubati al buio a temperatura ambiente (25°C) per 30 minuti. Per ulteriori informazioni su questa procedura, si rimanda ad Antonucci et al., 2013 [180].
- È essenziale includere controlli positivi e negativi in ogni ciclo di esperimenti per garantire la coerenza dei risultati ed evitare la perdita di attività TDT, la degradazione della bromodesossiridina trifosfato (BrdUTP) e altri problemi metodologici in caso di risultati negativi. Per il controllo positivo del liquido seminale, il danno al DNA può essere indotto dalla digestione con DNasi I incubando un campione da donatore sano con 100 µl di DNasi I (1 mg/ml) per 1 ora a 37°C. Per il controllo negativo del liquido seminale, gli spermatozoi possono essere incubati nella stessa soluzione del punto 7, ma senza TDT. Conservare aliquote fisse di questi controlli in cui la percentuale di frammentazione del DNA è stata precedentemente determinata per trattarli insieme ai futuri lotti di campioni da analizzare.
- Le fasi multiple di centrifugazione possono causare una perdita casuale di cellule; per ridurla al minimo, si raccomandano vials in polipropilene o vetro siliconato.
- Evitare l'attaccamento elettrostatico delle cellule alla superficie delle vials eseguendo tutte le fasi della procedura (compresa la fissazione) nella stessa vial. Anche l'aggiunta di BSA all'1% o al 2% nelle soluzioni di risciacquo diminuisce la perdita di cellule.
- Lasciare 50-100 µl di surnatante sul pellet durante l'aspirazione per evitare inutili centrifugazioni che potrebbero causare la perdita di cellule.
- Le incubazioni devono essere effettuate in camera umida per evitare essiccamento.
- Se si usa una marcatura diretta, il desossinucleotide coniugato con fluorocromo è incluso nella soluzione di reazione (0,25-0,5 nmoli per 50 µl). In questo caso, dopo la fase di incubazione (punto 8), colorare gli spermatozoi direttamente con la soluzione di PI (passo 12) ed eseguire l'analisi mediante citometria a flusso utilizzando le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione appropriate per il fluorocromo utilizzato.
- A causa del breve tempo di attività della soluzione di colorazione (~24 ore a 4 °C), preparare non più del necessario poco prima di eseguire il test.

- Le cellule devono essere analizzate il più rapidamente possibile. Un ritardo prolungato (> 1 ora) provocherebbe un'eccessiva colorazione e la degradazione delle cellule.
- Sono stati sviluppati anche metodi TUNEL modificati che incorporano la valutazione della vitalità degli spermatozoi [181-183].

3.2.3 Test di dispersione della cromatina spermatica

3.2.3.1 Premessa

Il test di dispersione della cromatina spermatica (SCD) è un metodo di microscopia ottica per valutare la suscettibilità del DNA spermatico alla denaturazione acida. L'SCD si basa sul principio per cui le anse di DNA intatte si espandono in seguito alla denaturazione e all'estrazione delle proteine nucleari, mentre quando il DNA è frammentato la dispersione non si sviluppa o è minima. Questo metodo si basa sulla capacità della cromatina spermatica intatta di formare aloni di dispersione, dopo essere stata esposta all'acido e a una soluzione lisante; tali aloni corrispondono alle anse di DNA rilassate attaccate alla struttura nucleare residua, che vengono rilasciate dopo la rimozione delle proteine nucleari. Le rotture del DNA, essendo suscettibili alla denaturazione, impediscono questa dispersione. Il metodo consiste in tre passaggi principali: (1) incorporazione degli spermatozoi in una matrice di agarosio, che fornisce un substrato inerte simile a una sospensione per manipolare le cellule; (2) incubazione in una soluzione acida di srotolamento del DNA seguita da una lisi cellulare; la soluzione acida agisce come un denaturante del DNA, che ne dissolve la doppia elica solo in presenza di danni al DNA stesso, e la soluzione lisante è usata per rimuovere le proteine nucleari; (3) lavaggio, disidratazione in soluzioni di etanolo crescenti e colorazione per la visualizzazione al microscopio in campo chiaro [184, 185].

Il test SCD è anche disponibile in kit commerciali che forniscono tutti i reagenti del test per garantire la sua facile applicazione e il funzionamento tecnico e per fornire risultati ripetibili e coerenti in diversi laboratori clinici.

3.2.3.2 Metodo principale

Adattato da Fernández et al., 2011 e 2003 [185, 186]

Reagenti

- 1% di agarosio acquoso a basso punto di fusione.
- 0,65% agarosio standard.
- **DPBS, p. 228.**
- 0,08 N HCl.
- Soluzione neutralizzante e lisante (0,4 M Tris, 0,8 M DTT, 1% SDS e 50 mM di acido etilendiamino tetra-acetico, o EDTA, pH 7,5).
- Una seconda soluzione neutralizzante e lisante (0,4 M Tris, 2 M NaCl e 1% SDS, pH 7,5).

- Tampone Tris-borato-EDTA (0,09 M Tris-borato e 0,002 M EDTA, pH 7,5).
- 70%, 90% e 100% etanolo.
- Soluzione di Wright con **DPBS, p. 228** (1 : 1).

Procedura

1. Diluire la concentrazione iniziale dei campioni di spermatozoi con DPBS in modo da ottenere una concentrazione finale di $5-10 \times 10^6$ spermatozoi/ml. I campioni freschi sono preferibili, ma possono essere utilizzati campioni direttamente congelati in azoto liquido. Il test deve essere convalidato per liquido seminale fresco e congelato.
2. Mescolare le sospensioni di spermatozoi con 1% di agarosio acquoso a basso punto di fusione (per ottenere una concentrazione finale di agarosio dello 0,7%) a 37°C.
3. Pipettare 50 μ l delle miscele su vetrini pre-rivestiti con lo 0,65% di agarosio standard essiccato a 80°C.
4. Coprire i preparati con vetrini coprioggetto (24×60 mm), evitando di intrappolare bolle d'aria.
5. Posizionare il vetrino orizzontalmente su una superficie fredda, per esempio una piastra di metallo o di vetro pre-raffreddata a 4°C.
6. Mettere la piastra fredda con il vetrino nel frigorifero a 4°C per 5 minuti, per permettere all'agarosio di solidificare.
7. Rimuovere il vetrino coprioggetto facendolo scorrere delicatamente.
8. Immergere immediatamente i vetrini in posizione orizzontale in un vassoio con soluzione fresca di denaturazione acida (0,08 N HCl) per 7 minuti a 22°C al buio.
9. Trasferire i vetrini in un vassoio con soluzione neutralizzante e lisante (0,4 M Tris, 0,8 M DTT, 1% SDS e 50 mM EDTA, pH 7,5) per 10 minuti a temperatura ambiente.
10. Incubare i vetrini in una seconda soluzione neutralizzante e lisante (0,4 M Tris, 2 M NaCl e 1% SDS, pH 7,5) per 5 minuti a temperatura ambiente.
11. Lavare accuratamente i vetrini in tampone Tris-borato-EDTA (0,09 M Tris-borato e 0,002 M EDTA, pH 7,5) per 2 minuti.
12. Disidratare le cellule attraverso immersioni sequenziali in etanolo al 70%, 90% e 100% per 2 minuti ciascuna.
13. Lasciare il vetrino ad asciugare orizzontalmente, a temperatura ambiente, o in un forno a 37°C.
14. Coprire il microgel essiccato con uno strato di soluzione colorante a fresco (soluzione Wright con DPBS (1 : 1)).
15. Tenere il vetrino orizzontale per 10-15 minuti, soffiandoci sopra di tanto in tanto.
16. Decantare la soluzione colorante e lavare brevemente e delicatamente il vetrino in acqua di rubinetto, poi asciugare all'aria.

17. Una volta che il livello di colorazione desiderato è raggiunto e il vetrino è perfettamente asciutto, può essere montato in una soluzione di montaggio permanente, se lo si desidera.

18. Esaminare il campione al microscopio ottico utilizzando un obiettivo a olio a immersione 100×. Si raccomanda l'osservazione di un minimo di 500 spermatozoi per campione.

Risultati

Gli aloni degli spermatozoi nei campioni possono essere classificati secondo i criteri di Fernández et al., 2005 [25]:

- **grande:** la larghezza dell'alone è simile o superiore al diametro minore del nucleo;
- **medio:** la dimensione dell'alone è a metà tra quelli con grande e con piccolo alone;
- **piccolo:** la larghezza dell'alone è simile o inferiore a un terzo del diametro minore del nucleo;
- **senza alone;**
- **senza aloni degradati:** non mostrano alcun alone e presentano un nucleo irregolarmente o debolmente colorato. Questa categoria è associata a gravi danni a carico sia del DNA che del composto proteico.

I risultati dovrebbero essere rappresentati come percentuale di ogni categoria. La percentuale di spermatozoi con DNA frammentato è la somma di quelli con piccolo alone, senza alone e senza alone degradato.

Interpretazione clinica

Una serie di piccoli studi, tra cui Gosalvez et al., 2014 [187], ha cercato di esaminare l'uso clinico del test SCD. Come per altri test del DNA, ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio intervallo di riferimento utilizzando controlli appropriati, basati su valori predittivi positivi e negativi, e dovrebbe essere chiaro a cosa si riferisce il valore predittivo (per esempio, concepimento, aborto spontaneo o altri fenomeni).

Note tecniche

- L'uso di sospensioni di spermatozoi con le concentrazioni cellulari raccomandate è essenziale per evitare la sovrapposizione di cellule di spermatozoi all'interno della matrice di agarosio e per facilitare un rapido conteggio.
- Se le condizioni di incubazione non sono attentamente controllate, si possono perdere gli aloni a causa dell'azione delle soluzioni acide e lisanti, producendo falsi positivi.
- Dopo l'asciugatura (passaggio 13), i vetrini trattati possono essere conservati in scatole d'archivio a temperatura ambiente e al buio per diversi mesi o colorati immediatamente.
- I nuclei cellulari che non hanno una coda devono essere registrati ma non inclusi nel risultato finale.
- Mescolare la sospensione cellulare con l'agarosio liquido quando si è stabilizzata a 37°C, per evitare danni alle cellule a causa del calore.
- In parallelo ai campioni, come controllo interno, elaborare una sospensione di spermatozoi di controllo con un livello noto di frammentazione del DNA. Questi campioni di controllo possono essere conservati congelati in aliquote.

3.2.3.3 Metodo alternativo

Reagenti

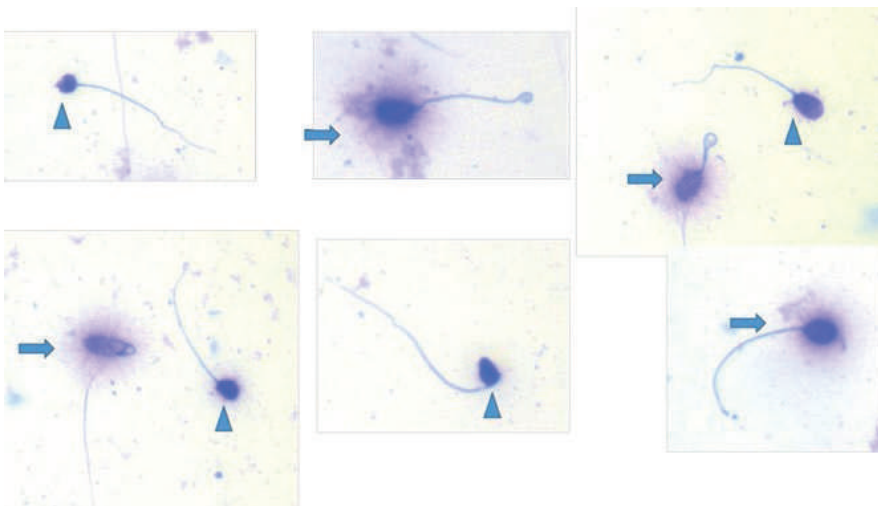
- Preparazione dell'agarosio: sciogliere l'agarosio (dopo la fusione a 95-100°C) e mettere 100 µl di agarosio fuso in provette Eppendorf.
- **BWW, p. 228** o HTF.
- Soluzione di denaturazione acida appena preparata (0,08N HCl).
- Soluzione di lisi Tris-Hcl 0,4 M, NaCl 2 M, EDTA 0,05 M e 1% SDS, pH 7,5.
- H₂O distillata.
- 70% etanolo, 90% etanolo e 100% etanolo.
- Soluzione tampone di Wright.

Procedura

1. Ricoprire i vetrini con lo 0,65% di agarosio standard e lasciarlo solidificare.
2. Diluire i campioni di spermatozoi in un terreno appropriato (HTF, BWW) per raggiungere una concentrazione di 5-20 milioni di spermatozoi/ml.
3. Dispensare 60 µl di campioni di spermatozoi diluiti (contenenti un minimo di 300.000 spermatozoi) nelle provette Eppendorf contenenti agarosio fuso. Mescolare bene. Questa fase deve essere eseguita a 37°C.
4. Incubare a 37°C per 5 minuti a temperatura ambiente per ridurre la temperatura dell'agarosio.
5. Mettere 8 µl della miscela contenente spermatozoi sui vetrini pre-rivestiti e coprire delicatamente (senza premere) con un vetrino coprioggetto. Mettere ogni vetrino a 2-8°C per 5 minuti.
6. Rimuovere delicatamente il vetrino coprioggetto, spingendolo verso un lato e poi rimuovendolo orizzontalmente e con attenzione.
7. Immergere i vetrini orizzontalmente in un vassoio con una soluzione di denaturazione acida appena preparata (0,08N HCl) per 7 minuti a temperatura ambiente al buio.
8. Rimuovere i vetrini dalla soluzione di denaturazione e immergerli in 25 ml di soluzione lisante (Tris-HCl 0,4 M, NaCl 2 M, EDTA 0,05 M e 1% SDS, pH 7,5) per 25 minuti a temperatura ambiente.
9. Lavare i vetrini in acqua distillata per 5 minuti, cambiando l'acqua una o due volte.
10. Rimuovere i vetrini dall'acqua, pulire la superficie di ciascuno e introdurli in vaschette per vetrini contenenti etanolo al 70% (per 2 minuti), poi etanolo al 90% (per 2 minuti) e infine etanolo al 100% (per 2 minuti).
11. Lasciare asciugare tutti i vetrini.
12. Colorare con la soluzione tampone di Wright dispensando 10-15 gocce della soluzione colorante direttamente sui vetrini e attendere 15 minuti prima di sciacquare i vetrini con acqua distillata.

13. Asciugare all'aria i vetrini e osservarli al microscopio ottico con lente 40×. Distinguere gli spermatozoi con l'alone (DNA intatto, frecce) da quelli con alone piccolo o assente, come in **Figura 3.3**. Contare almeno 500 spermatozoi.

Figura 3.3 Spermatozoi con alone (DNA intatto, frecce) e senza alone (DNA frammentato, punte di freccia)



Per gentile concessione di Elisabetta Baldi.

3.2.4 Comet test

3.2.4.1 Premessa

Il Comet test è un metodo per valutare la sDF nei singoli spermatozoi ed è basato sulla migrazione differenziale dei filamenti di DNA rotti sotto l'influenza di un campo elettrico a seconda della carica e delle dimensioni dei filamenti [188, 189]. Il nome del test è legato all'aspetto "a cometa" osservato al microscopio a fluorescenza dei frammenti di DNA srotolati colorati che si staccano dalla testa dello spermatozoo dopo il movimento elettroforetico.

In questo metodo, gli spermatozoi sono incorporati in una sottile matrice di agarosio, dove viene indotta una lisi con detergenti in condizioni di alta salinità.

Questo trattamento rimuove le proteine nucleari, consentendo la generazione di strutture simil-nucleoidi, che in condizioni alcaline consentono al DNA a doppio filamento all'interno dei nucleoidi di srotolarsi. Durante una successiva fase di elettroforesi, i filamenti rotti del DNA migrano verso l'anodo, generando il caratteristico modello di dispersione che assomiglia a una coda di cometa. Il DNA intatto è la testa della cometa, mentre i filamenti di DNA frammentati costituiscono la coda della cometa. La fluorescenza relativa di quest'ultimo elemento rispetto alla testa serve come misura del livello di danno al DNA [190].

Il principio del Comet test è una denaturazione alcalina del DNA. Il test esiste in molte varianti; la procedura qui presentata è stata pubblicata da Simon e Carrell, 2013 [190]. Per gli spermatozoi in questo metodo, la cromatina viene prima decondensata, per esempio con DTT, e successivamente denaturata con un tampone alcalino. Nella versione "alcalina" del Comet test con pH 13, il più comunemente usato nel laboratorio di

andrologia (per una revisione del pH di altri protocolli che utilizzano diversi pH, vedere Baumgartner et al., 2009 [191]), i siti labili alle sostanze alcaline sono convertiti in rotture del DNA. Durante l'elettroforesi, i filamenti di DNA si muovono nel gel lateralmente per formare la coda della cometa. Il DNA senza rotture rimane nella testa della cometa. Dopo la colorazione, possono essere viste al microscopio strutture simili a comete. Il conteggio delle comete può essere fatto visivamente [192] o con l'aiuto di diversi software di conteggio [193, 194]. Si dovrebbero conteggiare almeno 50 comete per vetrino duplicato. Sono disponibili anche kit commerciali e software di rilevamento.

3.2.4.2 Procedura

3.2.4.3 Reagenti

- Preparare 25 ml di gel a punto di fusione normale (NMP) allo 0,5% (0,250 g di agarosio NMP (gel allo 0,5%) in 25 ml di **DPBS, p. 228**) e 0,5% agarosio a basso punto di fusione (LMP) in DPBS (0,125 g di agarosio LMP (0,5% gel) a 25 ml di DPBS), fondere per riscaldamento e mettere in bagno termostatico a 45°C e 37°C, rispettivamente.
- DPBS.
- 250 ml di Triton X-100.
- Soluzione di lisi Tris-HCl 0,4 M, NaCl 2 M, EDTA 0,05 M e 1% SDS, pH 7,5.
- Soluzione DTT.
- Soluzione fresca di elettroforesi alcalina (60 ml di NaOH 10 M + 10 ml di EDTA 200 mM portati a un volume di 2.000 ml con acqua purificata).
- Tampone di neutralizzazione (vedere **Sezione 8.4.1, p. 226**).
- Colorante per il DNA stechiometrico (per esempio, bromuro di etidio, SYBR Green I o colorazione con argento).



Nota: il bromuro di etidio è un colorante intercalare mutageno e cancerogeno. SYBR Green I è un colorante intercalare più sicuro.

3.2.4.4 Procedura

Adattato da Simon e Carrell, 2013 [190]:

1. Riscaldare i flaconi in un microonde per sciogliere l'agarosio.
2. Mettere il gel NMP nel bagno termostatico a 45°C e il gel LMP nel bagno termostatico a 37°C.
3. Pipettare con cura 200 µl di gel NMP sul lato smerigliato del vetrino, coprire immediatamente con un vetrino coprioggetto e lasciarlo sul banco a temperatura ambiente per permettere all'agarosio di solidificarsi.
4. Regolare la concentrazione di spermatozoi a 6×10^6 spermatozoi/ml usando DPBS.
5. Sollevare i vetrini coprioggetto molto delicatamente, per evitare di rimuovere lo strato di agarosio.

6. Mettere 10 µl del campione di spermatozoi (diluito alla concentrazione di 6×10^6 /ml usando DPBS) in una provetta Eppendorf da 0,5 ml e aggiungere al campione seminale 75 µl di gel LMP incubato a 37°C.
7. Mescolare accuratamente e pipettare sopra lo strato di gel di agarosio NMP goccia a goccia.
8. Coprire rapidamente con un vetrino coprioggetto e lasciarlo sul banco a temperatura ambiente per permettere all'agarosio di solidificarsi a temperatura ambiente per 15 minuti.
9. Togliere la soluzione di lisi dal frigorifero, aggiungere 250 µl di Triton X-100 e 22,5 ml di soluzione stock di lisi e mescolare accuratamente in un portavetrini Coplin.
10. Rimuovere i vetrini coprioggetto dai vetrini e immergere questi ultimi nella soluzione di lisi per 1 ora a 4°C.
11. Togliere i vetrini dal Coplin, aggiungere 1,25 ml di DTT, capovolgere per garantire la miscelazione, quindi rimettere i vetrini nel Coplin e incubare per 30 minuti a 4°C.
12. Togliere i vetrini dal Coplin, aggiungere 1,25 ml di 4 mM litio diiodosalicilato (LIS), capovolgere per garantire la miscelazione, poi rimettere i vetrini nel Coplin e incubare per 90 minuti a temperatura ambiente.
13. Rimuovere i vetrini e drenare accuratamente il liquido rimanente mettendoli in verticale su carta bibula contro un supporto.
14. Riempire la vasca orizzontale per l'elettroforesi del gel con una soluzione alcalina fresca per elettroforesi (60 ml di 10 M NaOH + 10 ml di 200 mM EDTA portati a un volume di 2.000 ml con acqua purificata).
15. Immergere i vetrini nel buffer per 20 minuti e iniziare l'elettroforesi applicando corrente a 25 V (0,714 V/cm) regolata a 300 mA aggiungendo o togliendo (± 1 -20 ml) il buffer nel serbatoio con una siringa da 20 ml. Eseguire l'elettroforesi per 10 minuti.
16. Dopo l'elettroforesi, far sgocciolare i vetrini su carta bibula come prima, metterli su un vassoio e immergerli per tre volte nel tampone di neutralizzazione per 5 minuti ciascuno.
17. Far sgocciolare accuratamente i vetrini per rimuovere il tampone di neutralizzazione, colorare con un colorante stechiometrico per il DNA (per esempio, aggiungere 50 µl di 20 mg/ml EtBr) ciascun vetrino e coprire con un vetrino coprioggetto.
18. Visualizzare i vetrini con un microscopio e analizzare 50 comete per vetrino (**Figure 3.4, 3.5**).

3.2.4.5 Risultati

Conteggiare le prime 50 comete selezionate a caso in ogni vetrino usando un software appropriato per le comete. Non contare le comete con code sovrapposte. Le comete senza testa dovrebbero essere considerate come spermatozoi contenenti DNA con il 100% di danno.

3.2.4.6 Interpretazione clinica

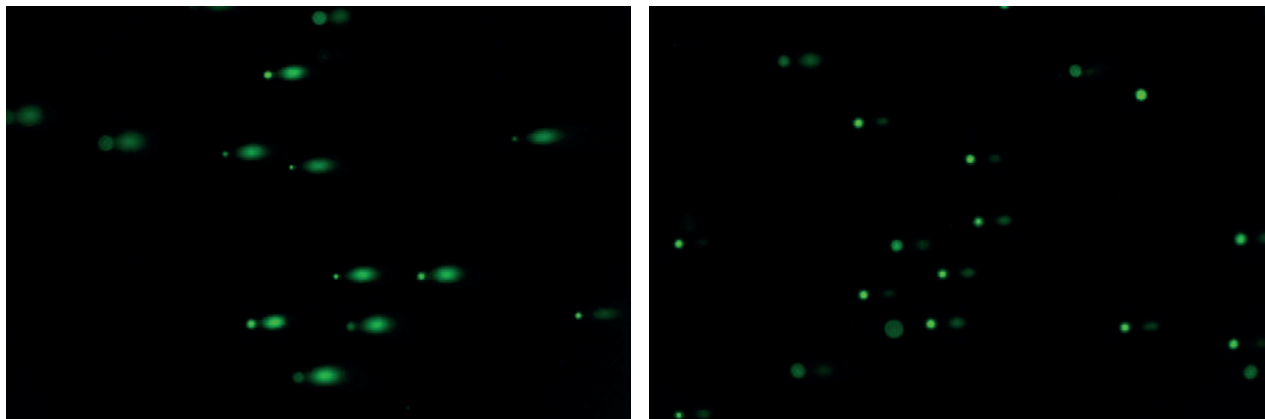
Diversi studi hanno riportato soglie diagnostiche di sDF valutate con il Comet test. Tali limiti differiscono notevolmente l'uno dall'altro e dipendono dalle condizioni esatte in cui viene eseguito il test e dal fenotipo studiato [195-198]. Come per altri test del DNA, ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio intervallo di riferimento utilizzando controlli appropriati, basati su valori predittivi positivi e negativi, e dovrebbe chiarire a cosa si riferisce il valore predittivo (per esempio, concepimento, aborto spontaneo o altri fenomeni). Tuttavia, poiché il Comet test implica passaggi metodologici multipli, richiede competenze elevate per l'interpretazione dei risultati e comunque presenta un importante livello di variazione inter-laboratorio, il suo uso potrebbe non essere appropriato per alcuni laboratori.

3.2.4.7 Note tecniche

Per maggiori dettagli, vedere Simon e Carrell, 2013 [190].

- Tutte le soluzioni stock devono essere preparate con acqua bidistillata e conservate a temperatura ambiente, se non diversamente specificato.
- Per mantenerne l'efficacia, il tampone di lisi non dovrebbe essere conservato per più di una settimana. Si raccomanda di preparare il buffer fresco in piccoli volumi in base alle esigenze del momento.
- Gli avanzi di agarosio possono essere utilizzati fino a 5-7 giorni prima che la concentrazione aumenti a causa dell'evaporazione dell'acqua dal gel durante la fusione dell'agarosio nel microonde.
- Se il gel si rompe durante la rimozione del vetrino coprioggetto, l'esperimento può continuare senza influenzare il risultato del test. Tuttavia, i gel rotti sono più suscettibili a scivolare via.
- Se il gel di agarosio scivola via durante le fasi successive del protocollo, aumentare la concentrazione dell'agarosio NMP da 0,5% a 1%. Non cambiare la concentrazione del gel LMP.
- Per un'adeguata lisi delle membrane nemaspermiche, assicurare la corretta miscelazione del Triton X-100 nel tampone di lisi agitando delicatamente per evitare la formazione di bolle.
- Assicurare la corretta miscelazione di DTT e litio diiodosaliciclato (LIS) nel buffer di lisi per evitare falsi negativi.
- La sensibilità del test diminuirà se il tampone di elettroforesi non viene mantenuto a pH 13.
- Concentrazioni più elevate di EtBr aumenteranno la colorazione di fondo, con conseguente diminuzione della visibilità del DNA di coda migrato.

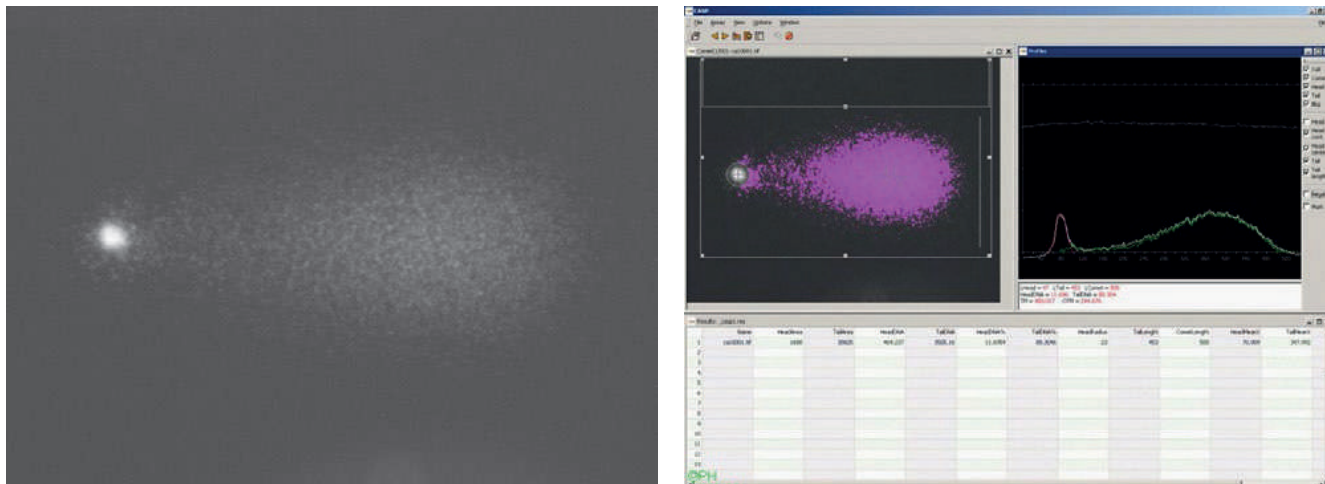
Figura 3.4 Comet test su spermatozoi di un campione patologico con frammentazione estesa del DNA e di un campione normale senza danni visibili al DNA, colorati con bromuro di etidio



Microfotografia di Dolores Lamb e Alexander Bolyakov.

Il riquadro sinistro (anormale) mostra i risultati del Comet test di un individuo con un'estesa frammentazione del DNA. Gli spermatozoi nel campione anormale mostrano la colorazione brillante con le piccole macchie verdi (che sono le teste degli spermatozoi); la "coda di cometa" è resa visibile dalla grande colorazione più diffusa che si irradia dalla testa dello spermatozoo. Quando questo viene confrontato con quello di un individuo normale in cui il DNA è strettamente impacchettato nella testa dello spermatozoo, non si vede DNA frammentato, ma solo piccole teste di spermatozoo colorate brillanti.

Figura 3.5 Cometa vista al microscopio, dopo conteggio con il software CASP (coda DNA = 88%)



Microfotografia e analisi di Petr Houska.

3.2.5 Citometria a flusso con arancio di acridina

3.2.5.1 Premessa

Questo metodo si basa sulla proprietà unica dell'arancio di acridina (AO) di emettere una fluorescenza verde quando è intercalato tra il DNA a doppio filamento e una fluorescenza rossa quando è associato al DNA a filamento singolo. La versione at-

tuale, descritta da Evenson, 2013 [199], può essere usata per valutare campioni freschi e/o congelati e comprende solo due fasi metodologiche principali. Nella prima fase, gli spermatozoi sono trattati con una soluzione detergente a basso pH (1,2) per denaturare la cromatina e permetterne la successiva colorazione. Nella seconda fase, la sospensione di spermatozoi viene neutralizzata e le cellule vengono colorate con una seconda soluzione contenente AO.

I dati per la fluorescenza rossa e verde vengono raccolti dalla citometria a flusso e trasformati per determinare il grado di fluorescenza rossa nella popolazione di spermatozoi, noto come indice di frammentazione del DNA (DFI). L'analisi dei dati raccolti può essere fatta con qualsiasi software di citometria a flusso. È disponibile anche un software di analisi commerciale.

3.2.5.2 Procedure

Reagenti

- Una soluzione detergente a basso pH (1,2): 0,08 M HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, regolata al pH 1,2 con HCl e/o NaOH.
- Una soluzione di colorazione AO contenente 6 mg/l di AO purificato, 0,1 M di acido citrico, 0,2 M di Na_2HPO_4 , 1 mM di EDTA disodico e 150 mM di NaCl, regolata a pH 6,0 con NaOH. Proteggere la soluzione dalla luce usando un foglio di alluminio o un bicchiere ambrato.
- TNE (10 Tris Cl, 150 NaCl e 10 EDTA, pH 7,4).
- Preparare una ghiacciaia (preferibilmente con un coperchio per mantenere i campioni al buio) e mettere la soluzione di colorazione AO, TNE e la soluzione di detergente acido all'interno (se si valutano i campioni congelati, i campioni devono essere diluiti con TNE prima del congelamento).

Metodologia

Adattato da Evenson, 2013 [199] ed Evenson e Jost, 2000, 2001 [200, 201].

1. Scongela un campione di riferimento e mettilo nella ghiacciaia (per preparare un campione di riferimento, vedere Evenson e Jost, 2001 [201]).
2. Avviare il citometro a flusso ed eseguire il tampone di equilibrio AO per 15 minuti, quindi misurare un campione di riferimento (per come misurare i campioni, vedere sotto) e regolare la sensibilità dei tubi fotomoltiplicatori verde e rosso a 475 e 125, rispettivamente.
3. Diluire i campioni a $1-2 \times 10^6$ /ml con TNE e metterli nella ghiacciaia (se si misurano campioni congelati, devono essere diluiti con TNE prima del congelamento in LN_2).
4. Pipettare 200 μl di campione diluito in una vial per citometria a flusso, aggiungere 400 μl di detergente acido (avviare il cronometro al momento esatto in cui si aggiunge il detergente), agitare delicatamente e rimettere immediatamente la vial nella ghiacciaia.
5. Dopo esattamente 30 secondi aggiungere 1,2 ml di soluzione colorante, mescolare con la punta della pipetta e rimettere immediatamente la vial nella ghiacciaia.
6. Mettere la vial nel citometro a flusso e dopo 3 minuti, misurati con il cronometro, iniziare a raccogliere dati.

7. Ripetere la procedura con un replicato.
8. Lasciare scorrere il tampone di equilibratura nel citometro a flusso e iniziare a preparare il campione successivo (possono essere raggruppati fino a sei campioni, come per la misurazione del campione di riferimento).
9. Utilizzare il campione di riferimento per regolare la sensibilità delle vials di fotomoltiplicazione verdi e rosse a 475 e 125, rispettivamente.
10. Analizzare 5.000 spermatozoi per campione a un tasso di eventi di 100-200 cellule/secondo.
11. Quando tutti i campioni saranno stati valutati, sciacquare il citometro a flusso con acqua bidistillata per 10 minuti per rimuovere la maggior parte dell'AO.
12. Pulire il citometro a flusso secondo il protocollo suggerito dal produttore dello strumento.

Risultati

Per l'analisi dei dati, la popolazione di spermatozoi viene selezionata applicando una soglia nella regione di diffusione della luce frontale/laterale. In una fase successiva, un citogramma di fluorescenza del DNA a doppio filamento verde vs il DNA a filamento singolo rosso viene utilizzato per includere all'interno della soglia solo le cellule AO-positive e sottrarre dall'analisi i detriti cellulari e i corpi apoptotici privi di materiale genetico. Consecutivamente, lo spostamento della fluorescenza dal verde al rosso – o DFI – è calcolato per ogni spermatozoo AO-positivo usando la formula:

Indice di frammentazione del DNA (DFI) = (fluorescenza rossa)/(fluorescenza rossa + fluorescenza verde)

In un ulteriore passaggio, i valori di DFI sono rappresentati in un istogramma, in cui, con l'uso di un campione di riferimento, i valori di DFI da moderato ad alto possono essere trovati alla destra della popolazione cellulare principale. La percentuale delle cellule a destra, che rappresenta il totale degli eventi AO-positivi, è nota come %DFI, che è il parametro utilizzato per l'interpretazione clinica del test. L'istogramma DFI fornisce anche i valori di media e deviazione standard per DFI.

Conteggio e interpretazione clinica

Diversi studi hanno riportato soglie diagnostiche per il DFI misurato tramite citometria a flusso con arancio acridina [202, 203]. Come per altri test del DNA, ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio intervallo di riferimento utilizzando controlli appropriati, basati su valori predittivi positivi e negativi, e dovrebbe essere chiaro a cosa si riferisce il valore predittivo (per esempio, concepimento, aborto spontaneo o altri fenomeni).

Controllo di qualità

- Il citometro a flusso deve essere impostato secondo un campione di spermatozoi di riferimento ogni giorno, e dopo ripetute analisi di campioni di pazienti (6-10 campioni) deve essere nuovamente eseguita la ricalibrazione con il campione di riferimento.
- Per garantire che l'AO sia equilibrato con le vials del campione, il tampone di equilibratura dell'AO deve essere fatto scorrere attraverso le linee di flusso dello strumento per ~15 minuti prima della misurazione del campione e dei campioni diversi.
- Durante la valutazione del campione, se il tasso di eventi è superiore a 250 eventi/secondo, deve essere preparato un nuovo campione, per garantire un equilibrio preciso tra il colorante AO e il campione di spermatozoi.

3.3 Test genetici e genomici

Negli ultimi 15 anni, è diventato sempre più ovvio che una percentuale significativa di casi di infertilità maschile ha una base genetica o genomica. Clinicamente, c'è una crescente consapevolezza che le anomalie cromosomiche (numeriche, strutturali, [comprese le microdelezioni e le microduplicazioni]) e le mutazioni genetiche siano alla base di uno spettro diversificato di problemi di infertilità maschile, che a loro volta sono alla base di molte delle anomalie viste nell'analisi del liquido seminale. Alcuni laboratori di andrologia eseguono test genetici e genomici, anche se questi test sono più abitualmente eseguiti nel laboratorio di genetica medica. La metodologia per la maggior parte dei test diagnostici genetici e genomici non è specifica per i difetti legati al liquido seminale, con l'eccezione dei test di aneuploidia dello spermatozoo; questa metodologia per testare lo spermatozoo è unica e descritta di seguito.

3.3.1 Test di aneuploidia nemaspermica

3.3.1.1 Premessa

L'aneuploidia è la presenza di uno o pochi cromosomi al di sopra o al di sotto del numero abituale di cromosomi. Normalmente gli spermatozoi hanno un complesso di cromosomi aploide (22 autosomi e 1 cromosoma sessuale (X, Y)); in uno spermatozoo aneuploide c'è perdita o guadagno di uno o più autosomi e/o cromosomi sessuali. Uomini infertili non selezionati presentano un'incidenza 10 volte maggiore di aneuploidie cromosomiche nel liquido seminale, anche con un cariotipo fenotipico normale, a causa di problemi con la segregazione cromosomica durante la meiosi, con conseguente guadagno (disomia) o perdita (nullisomia) di un cromosoma. Gli ovociti aneuploidi aumentano con l'invecchiamento materno e danno origine a embrioni aneuploidi, con conseguente perdita. Le uniche aneuploidie coerenti con una nascita con patologie sono dovute a modifiche nel numero dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y. Le traslocazioni robertsoniane sono una causa ben nota di aumento dei livelli di spermatozoi aneuploidi. Negli uomini con tale aumento, ci può essere un accumulo di anomalie cromosomiche numeriche e prodotti di segregazione sbilanciati nello stesso nucleo spermatico [204, 205]. Anche gli uomini con traslocazioni reciproche bilanciate sono a rischio. I padri di bambini con la sindrome di Down costituiscono una preponderanza di portatori di traslocazioni reciproche bilanciate [204]. L'aumento dell'aneuploidia dello spermatozoo è anche associato a un aumento dei livelli di frammentazione del DNA [206]. L'altro grande gruppo di individui sono i partner maschili nelle coppie con aborti ricorrenti [207]. Livelli anormali di spermatozoi aneuploidi sono più comunemente osservati negli uomini con insufficienza spermatica, oligozoospermia o oligoastenozoospermia, e tra gli uomini normozoospermici che sono partner in coppie con aborti ricorrenti.

3.3.1.2 Ibridazione *in situ* in fluorescenza

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza è un test diagnostico clinico citogenetico che valuta le frequenze delle anomalie cromosomiche. I cromosomi X, Y, 13, 18 e 21 sono valutati nel test di aneuploidia del liquido seminale perché le aneuploidie in questi cromosomi sono associate a una prole vitale ma con patologie (sindrome di Klinefelter [XXY-XXXXY], sindromi di Turner [XO], Patau [trisomia 13], Edwards [trisomia 18] e Down [trisomia 21]). Probabilmente, ciò che potrebbe essere più utile sarebbe analizzare tutti i cromosomi, perché altre aneuploidie possono essere letali per gli embrioni, ma queste analisi hanno costi proibitivi. Come strumento di screening, il risultato di un test di aneuploidia spermatica è utile nella consulenza genetica delle coppie con difficoltà procreative [208] (in particolare quelle con aborti ricorrenti o con

precedenti fallimenti di ART e, in misura minore, quelle con astenoteratozoospermia e oligozoospermia severa) e in alcuni casi permette alle coppie di prendere decisioni consapevoli sulla riproduzione [209]. La metodologia fornita di seguito è adattata da Ryu et al., 2001 [210].

Reagenti

- SSC (diluito da 20× SSC) (3 M NaCl, 0,3 M trisodio citrato 2H₂O, pH 7,0).
- 2× SCC (diluito da 20× SCC).
- Lavaggi con etanolo (100% e diluito al 70% e 80%).
- 25 mM DTT.
- Sonde alfa satelliti specifiche per i cromosomi marcate direttamente (kit di sonde DNA multicolore disponibile).
- DAPI II (colorante nucleare, 4,6-diamidino2-fenilindolo).

Procedura

Secondo Ryu et al., 2001 [210]:

1. La colorazione e l'olio vengono rimossi mettendo i vetrini in xilene per 5 minuti e in etanolo per 5 minuti e poi asciugandoli all'aria.
2. I nuclei vengono poi fissati in metanolo per 15 minuti. I vetrini vengono incubati in 2× SSC e poi sottoposti a tre lavaggi in etanolo (70%, 80% e 100%) per 2 minuti ciascuno e lasciati asciugare all'aria.
3. I vetrini vengono poi incubati per 6-8 minuti a 37°C in una soluzione appena preparata di 25 mM DTT, permettendo alle teste degli spermatozoi di decondensarsi e gonfiarsi. I vetrini vengono immediatamente posti in 2× SSC a temperatura ambiente per 3 minuti, poi disidratati in tre lavaggi con etanolo e lasciati asciugare all'aria.
4. Si esegue l'ibridazione *in situ* con fluorescenza a cinque colori per rilevare i cromosomi X, Y, 13, 18 e 21, con sonde alfa satelliti specifiche per i cromosomi, marcate direttamente e disponibili in commercio (sonde DNA multicolore).
5. La miscela di sonde viene sigillata sul vetrino e poi posta in un termostato a 80°C per 2-3 minuti per denaturare simultaneamente il DNA cellulare e le sonde.
6. Dopo un'ibridazione notturna a 37°C, il vetrino viene lavato in 0,25× SSC (pH 7,0) a 68°C per 10 secondi e risciacquato in 1× tampone fosfato detergente (sonde DNA multicolore).
7. Viene applicata la soluzione DAPI II. L'efficienza complessiva di ibridazione dovrebbe essere > 97%.

Criteri di punteggio

- Le sonde specifiche del cromosoma sono identificate dal colore e i nuclei sono analizzati per la presenza di zero, uno, due, tre o più segnali per ciascuna delle tre sonde.
- I nuclei che contengono segnali di dimensioni inaspettate o che sembrano al di fuori della membrana nucleare vengono eliminati dall'analisi.
- Si considera che i segnali rappresentino un dominio diviso se: (1) la dimensione e l'intensità di ciascuno dei due segnali sono inferiori a quella del segnale dell'altro

omologo; (2) la distanza tra i due segnali è inferiore al diametro di uno dei due segnali. I risultati sono riportati in percentuale di spermatozoi che presentano una disomia o più (due cromosomi o più) rispetto a un campione seminale normalmente aploide. Gli spermatozoi monosomici (mancanti di un intero cromosoma) non vengono contati.

Nota tecnica

I sistemi automatizzati di imaging citogenetico migliorano la precisione e l'accuratezza e sono una necessità. Includono un microlocalizzatore e prevedono analisi secondo una serie di regole per la citologia in cui otto piani focali sono catturati e veicolati per la microscopia fluorescente. La messa a fuoco e l'esposizione per campo controllate dal software permettono di catturare più strati focali, di massimizzare l'intensità del segnale e di mantenere bassi livelli di rumore di fondo [211].

Calcoli statistici

La distribuzione dei segnali di ibridazione *in situ* in fluorescenza viene confrontata collettivamente tra i gruppi infertili e quelli di controllo. Le variabili continue sono analizzate utilizzando il test t indipendente a due campioni. Il test della somma dei ranghi Mann-Whitney è usato per le variabili con varianze disuguali. La significatività statistica è definita come $P < 0,05$ per le analisi continue.

Livelli basali di disomia dei cromosomi spermatici

L'incidenza dell'aneuploidia spermatica è rara negli uomini fertili. I risultati sono simili tra i diversi laboratori che eseguono questo test (Tabella 3.3).

Tabella 3.3 Livelli basali della disomia dei cromosomi spermatici di uomini fertili sani

Cromosoma n.	Templado et al.	Neusser et al.
1	0,08	0,16
2	0,09	0,09
3	0,20	0,20
4	0,08	0,10
6	0,04	0,07
7	0,06	0,10
8	0,03	0,18
9	0,16	0,13
12	0,14	0,09

Cromosoma n.	Templado et al.	Neusser et al.
13	0,12	0,13
15	0,10	0,10
16	0,07	0,12
18	0,06	0,10
20	0,12	0,12
21	0,17	0,21
22	0,47	0,41
X,Y	0,27	0,21

Adattato da Neusser et al., 2015 [212], e Templado et al., 2013 [213].

3.4 Test relativi all'immunologia e ai metodi immunologici

3.4.1 Valutazione dei leucociti nel liquido seminale

I leucociti, prevalentemente quelli polimorfonucleati (neutrofilo), sono presenti nella maggior parte del liquido seminale umano [53, 214]. A volte possono essere differenziati da spermatozoi e spermatozoi su uno striscio di liquido seminale colorato con Papanicolaou (Sezione 2.4.9.3, p. 47). La differenziazione si basa sulle diversità di colorazione e sulla dimensione e forma del nucleo [53]. Morfologicamente, i leucociti polimorfonucleati possono essere facilmente confusi con gli spermatozoi multinucleati, ma si presentano di un colore bluastrò, in contrasto con quello più rosato degli spermatozoi [53]. Anche le dimensioni del nucleo possono aiutare nell'identificazione: i nuclei dei monociti mostrano un'ampia variazione di dimensioni, da circa 7 µm per i linfociti a oltre 15 µm per i macrofagi. Queste dimensioni sono solo indicative, in quanto la degenerazione e la divisione cellulare influenzano la dimensione del nucleo.

Esistono molte altre differenti tecniche per quantificare la popolazione di leucociti nel liquido seminale. Poiché i granulociti perossidasi-positivi sono la tipologia predominante di leucociti nel liquido seminale, il test di routine dell'attività perossidasi è utile come tecnica di screening iniziale [53, 215] (vedere Sezione 3.4.1.1).

I leucociti possono essere ulteriormente differenziati con analisi immunocitochimiche più lunghe e costose rispetto ai comuni antigeni leucocitari e spermatici [98, 216] (Sezione 3.4.2, p. 113).

3.4.1.1 Colorazione della perossidasi cellulare mediante l'orto-toluidina

Questo test è rapido ed economico ed è un utile screening iniziale per i granulociti.

Principio

Tradizionalmente, i leucociti nel liquido seminale umano sono contati mediante una procedura istochimica che identifica l'enzima perossidasi, caratteristico dei granulociti (Figura 3.6, p. 110). Questa tecnica ha il vantaggio di essere relativamente facile da eseguire, ma non rileva:

- polimorfi attivati che hanno rilasciato i loro granuli;
- altri tipi di leucociti, come linfociti, macrofagi e monociti, che non contengono perossidasi.

Il test può essere utile per distinguere i leucociti polimorfonucleati dagli spermatozoi multinucleati, che sono privi di perossidasi [53]. L'analisi che segue è basata sui protocolli forniti da Nahoum e Cardozo, 1980 [217]. In commercio è disponibile un kit per questo test.

Reagenti

- Buffer fosfato, 67 mmol/l, pH 6,0: sciogliere 9,47 g di idrogeno fosfato di sodio (Na_2HPO_4) in 1.000 ml di acqua distillata H_2O e 9,08 g di diidrogeno fosfato di potassio (KH_2PO_4) in 1.000 ml di acqua distillata H_2O . Aggiungere una soluzione all'altra (circa 12 ml di soluzione di Na_2HPO_4 a 88 ml di soluzione di KH_2PO_4) fino a che il pH non è pari a 6,0.

- Soluzione satura di cloruro di ammonio (NH_4Cl): aggiungere 250 g di NH_4Cl a 1.000 ml di H_2O distillata.
- 148 mmol/l di acido disodico etilendiamina tetra-acetico (Na_2EDTA): sciogliere 50 g/l in tampone fosfato (pH 6,0) preparato nella fase 1.
- Substrato: sciogliere 2,5 mg di o-toluidina in 10 ml di soluzione salina 0,9% (9 g/l).
- Perossido di idrogeno (H_2O_2) 30% (v/v): come acquistato.
- Soluzione di lavoro: a 9 ml di soluzione di o-toluidina aggiungere 1 ml di soluzione satura di NH_4Cl , 1 ml di 148 mmol/l Na_2EDTA e 10 μl di 30% (v/v) H_2O_2 e mescolare bene. Questa soluzione può essere usata fino a 24 ore dopo la preparazione.



Nota: L'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC, 1982) ha stabilito che l'orto-toluidina dovrebbe essere considerata, ai fini pratici, a rischio cancerogeno per l'uomo. Prendere le opportune precauzioni (Sezione 8.2, p. 214).

Procedura

1. Miscelare accuratamente il campione di liquido seminale (vedere nota tecnica sotto).
2. Prelevare un'aliquota di 0,1 ml di liquido seminale e miscelare con 0,9 ml di soluzione di lavoro (diluizione 1+9 (1 : 10)).
3. Miscelare con il vortex delicatamente la sospensione di spermatozoi per 10 secondi e incubare a temperatura ambiente per 20-30 minuti. In alternativa, agitare continuamente con un sistema di dondolamento per vials.
4. Miscelare nuovamente il campione di spermatozoi prima di prelevare un'aliquota di replicato e mescolarla con la soluzione di lavoro come sopra.

Nota tecnica: miscelazione accurata del campione di liquido seminale

Prima di prelevare un'aliquota di liquido seminale per la valutazione, mescolare bene il campione nel contenitore originale, ma non così vigorosamente da creare bolle d'aria. Questo può essere ottenuto aspirando il campione 10 volte in una pipetta di plastica monouso a foro largo (circa 1,5 mm di diametro), sterile se necessario. Non miscelare con un mixer vortex ad alta velocità perché danneggia gli spermatozoi.

Valutazione del numero di cellule perossidasi-positive nelle camere dell'emocitometro

1. Dopo 20-30 minuti, miscelare nuovamente le sospensioni di liquido seminale e riempire ogni lato di un emocitometro con una delle preparazioni del replicato.
2. Tenere l'emocitometro in posizione orizzontale per almeno 4 minuti a temperatura ambiente in una camera umida (per esempio, una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita d'acqua) per prevenirne l'essiccamento e permettere alle cellule di depositarsi.
3. Esaminare la camera, griglia per griglia, con un microscopio ottico a contrasto di fase a un ingrandimento 200x o 400x.
4. Contare almeno 200 cellule perossidasi-positive in ogni replicato, per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso (Tabella 2.3, p. 33). Le cellule perossidasi-positive risultano colorate di marrone, mentre le cellule perossidasi-negative non risultano colorate (Figura 3.6, p. 110).

5. Esaminare una camera, griglia per griglia; continuare a contare fino a quando non saranno osservate almeno 200 cellule perossidasi-positivo e non sia stata esaminata una griglia completa. Il conteggio deve essere fatto per griglie complete; non interrompere il conteggio a metà griglia.
6. Prendere nota del numero di griglie valutate per raggiungere almeno 200 cellule perossidasi-positivo. Lo stesso numero di griglie andrà contato nell'altra camera dell'emocitometro.
7. Contare il numero di cellule e griglie perossidasi-positivo con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.
8. Passare alla seconda camera dell'emocitometro ed eseguire il conteggio del replicato sullo stesso numero di griglie del primo replicato, anche se questo dovesse produrre meno di 200 cellule perossidasi-positivo.
9. Calcolare la somma e la differenza dei due numeri di cellule perossidasi-positivo.
10. Determinare l'accettabilità della differenza da **Tabella 2.3, p. 33**, la differenza massima tra due conteggi che ci si aspetta si verifichi nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento.
11. Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione. Se la differenza è troppo alta, preparare due nuove diluizioni e ripetere la conta del replicato.
12. Riportare la concentrazione media di cellule perossidasi-positivo arrotondando alla seconda cifra.
13. Calcolare il numero totale di cellule perossidasi-positivo per eiaculato (vedere **Calcolo della concentrazione di cellule perossidasi-positivo, p. 111**).

Figura 3.6 Cellule perossidasi-positivo nel liquido seminale umano



Un granulocita perossidasi-positivo (P) (colore marrone) e una cellula rotonda perossidasi-negativa (N). Scala 10 µm.

Micrografia per gentile concessione di T.G. Cooper.

Calcolo della concentrazione di cellule perossidasi-positivo

La concentrazione di cellule perossidasi-positivo nel liquido seminale è il loro numero (N) diviso per il volume del numero totale (n) di griglie esaminate per i replicati (dove il volume di una griglia è 100 nl), moltiplicato per il fattore di diluizione.

Per una diluizione di 1+9 (1 : 10), la concentrazione è $C = (N/n) \times (1/100) \times 10$ cellule per nl = $(N/n) \times (1/10)$ cellule per nl. Quindi (N/n) viene diviso per 10 per ottenere la concentrazione di cellule perossidasi-positivo per nl (= milioni di cellule per ml).

Quando tutte e nove le griglie di ogni camera dell'emocitometro sono state valutate, il numero totale di cellule perossidasi-positivo può essere diviso per il volume totale di entrambe le camere (1,8 μ l) e moltiplicato per il fattore di diluizione (10) per ottenere la concentrazione in cellule per μ l (migliaia di cellule per ml).



Nota: Questa procedura può essere usata per calcolare la concentrazione di cellule rotonde quando il numero totale di cellule rotonde contate (perossidasi-positivo e negativo) è usato per N nel calcolo.

Sensibilità del metodo

Se nella camera ci sono meno di 200 cellule positive alla perossidasi, l'errore di campionamento supererà il 5%. Quando si trovano meno di 400 cellule perossidasi-positivo in tutte le griglie di entrambe le camere, segnalare l'errore di campionamento per il numero di cellule contate (**Tabella 2.3, p. 33**).

Se si contano meno di 25 cellule perossidasi-positivo in ogni camera, la concentrazione sarà < 277.000 cellule/ml. Segnalare il numero di cellule perossidasi-positivo osservate con il commento "Troppe poche cellule per una determinazione accurata della concentrazione (< 277.000/ml)". L'assenza di cellule perossidasi-positivo nell'aliquota esaminata non significa necessariamente che siano assenti nel resto del campione.

Esempi pratici

Esempio 1

Con una diluizione di 1+9 (1 : 10), il replicato 1 contiene 60 cellule perossidasi-positivo in 9 griglie, mentre il replicato 2 contiene 90 cellule perossidasi-positivo in 9 griglie. La somma dei valori (60+90) è 150 in 18 griglie e la differenza (90-60) è 30. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che questa supera la differenza prevista per il solo effetto della variabilità casuale (24), quindi i risultati vengono scartati e vengono preparati nuovi replicati.

Esempio 2

Con una diluizione di 1+9 (1 : 10), il replicato 1 contiene 204 cellule perossidasi-positivo in 5 griglie, mentre il replicato 2 contiene 198 cellule perossidasi-positivo in 5 griglie. La somma dei valori (204+198) è 402 in 10 griglie e la differenza (204-198) è 6. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che questa è inferiore a quella prevista per il solo effetto della variabilità casuale (39), quindi i valori sono accettati.

La concentrazione di cellule positive alla perossidasi nel campione è calcolata con l'aiuto della **Tabella 2.4, p. 35** per una diluizione di 1+9 (1 : 10), $C = (N/n)/10$ cellule per nl, o $(402/10)/10 = 4,02$ cellule/nl, o $4,0 \times 10^6$ cellule per ml (arrotondando alla seconda cifra).

Esempio 3

Con una diluizione di 1+9 (1 : 10), il replicato 1 contiene 144 cellule perossidasi-positivo in 9 griglie, mentre il replicato 2 contiene 162 cellule perossidasi-positivo in 9

griglie. La somma dei valori (144+162) è 306 in 18 griglie e la differenza (162-144) è 18. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che questa è inferiore a quella prevista per il solo effetto della variabilità casuale (34), quindi i valori sono accettati.

Quando tutte le nove griglie sono state valutate in ogni camera, la concentrazione del campione per una diluizione di 1+9 (1 : 10), calcolata utilizzando la **Tabella 2.4, p. 35**, è pari a $C = 1,7 \times 10^6$ cellule per ml arrotondando alla seconda cifra. Poiché sono state contate meno di 400 cellule, segnalare l'errore di campionamento per 306 cellule dato nella **Tabella 2.3, p. 33** (circa il 6%).

Esempio 4

Con una diluizione di 1+9 (1 : 10), non si evidenziano cellule positive alla perossidasi in nessuno dei due replicati. Poiché in tutte le 9 griglie si trovano meno di 25 cellule positive alla perossidasi, la concentrazione è < 277.000 per ml; segnalare "Non sono state viste cellule positive alla perossidasi nei campioni. Troppe poche cellule per una determinazione accurata della concentrazione ($< 277.000/\text{ml}$)".

3.4.1.2 Limiti tra risultato normale e patologico

Attualmente, non ci sono intervalli di riferimento basati sull'evidenza per le cellule perossidasi-positivie nel liquido seminale di uomini fertili. In attesa di ulteriori prove, questo manuale mantiene il valore di consenso di $1,0 \times 10^6$ cellule perossidasi-positivie per ml come valore di soglia per la rilevanza clinica. Di conseguenza, valori maggiori o uguali a $1,0 \times 10^6$ di cellule perossidasi-positivie per ml sono considerati anormali. Per questo test risultano rilevanti diversi punti.

- Il numero totale di cellule perossidasi-positivie nell'eiaculato può riflettere la gravità di una condizione infiammatoria [215]. Il numero di cellule perossidasi-positivie si ottiene moltiplicando la concentrazione di cellule perossidasi-positivie per il volume dell'intero eiaculato.
- Le segnalazioni di valori di cut-off per le cellule perossidasi-positivie negli uomini fertili variano a partire da $0,5 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^6$ leucociti polimorfonucleati/ml o a partire da 1×10^6 - 2×10^6 leucociti totali/ml [215]. Le edizioni precedenti di questo manuale hanno considerato 1×10^6 leucociti/ml come soglia per la leucocitospermia. Alcuni hanno ritenuto questo valore troppo basso [215], mentre altri lo hanno considerato troppo alto [218, 219], a seconda dell'endpoint esaminato (qualità del liquido seminale, risultati della FIV, presenza di batteri, risposta del liquido seminale alle specie reattive dell'ossigeno).
- Un numero eccessivo di leucociti nell'eiaculato (leucocitospermia, piospermia) può essere associato a un'infezione e a una scarsa qualità del liquido seminale.
- Il danno agli spermatozoi dipendente dai leucociti è condizionato dal numero totale dei leucociti nell'eiaculato e dal numero di leucociti rispetto al numero degli spermatozoi.
- I leucociti possono compromettere la motilità nemespermica e l'integrità del DNA attraverso un'attività ossidativa (Sezione 4.1, p. 140). Tuttavia, la possibilità che il livello di infiltrazione leucocitaria produca danni dipende da fattori impossibili da dedurre da un campione di liquido seminale, come la causa, i tempi e la posizione anatomica dell'infiltrazione, così come la natura dei leucociti coinvolti e se questi siano in uno stato attivato [214, 220, 221].

3.4.2 Colorazione immunocitochimica dei panleucociti (CD45)

I leucociti polimorfonucleati che hanno rilasciato i loro granuli e altre specie di leucociti, come linfociti, macrofagi o monociti, che non contengono perossidasi non possono essere rilevati dal test dell'o-toluidina per la perossidasi cellulare (**Sezione 3.4.1.1, p. 108**), ma possono essere rilevati con mezzi immunocitochimici. La colorazione immunocitochimica è più costosa e richiede più tempo della valutazione dell'attività della perossidasi dei granulociti, ma è utile per distinguere leucociti e cellule germinali.

3.4.2.1 Principio

Tutte le classi di leucociti umani esprimono un antigene specifico (CD45), che può essere rilevato con un appropriato anticorpo monoclonale. Cambiando la natura dell'anticorpo primario, questa procedura generale può essere adattata per consentire la rilevazione di diversi tipi di leucociti, come macrofagi, monociti, neutrofilo, cellule B o cellule T, se questi dovessero essere il centro dell'interesse.

3.4.2.2 Reagenti

- **DPBS, p. 228.**
- Soluzione salina tamponata con Tris (TBS; vedere **Sezione 8.4, p. 226**), pH 8,2.
- Tetramisolo-HCl (levamisolo) 1,0 mol/l: sciogliere 2,4 g di levamisolo in 10 ml di acqua purificata.
- Substrato: a 9,7 ml di TBS (pH 8,2) aggiungere 2 mg di naftolo AS-MX fosfato, 0,2 ml di dimetilformammide e 0,1 ml di levamisolo 1,0 mol/l. Poco prima dell'uso, aggiungere 10 mg di Fast Red TR salino e filtrare (dimensione dei pori 0,45 µm).
- Fissativo: solo acetone o acetone/metanolo/formaldeide; a 95 ml di acetone aggiungere 95 ml di metanolo assoluto e 10 ml di formaldeide al 37% (v/v).
- Anticorpo primario: un anticorpo monoclonale di topo contro l'antigene leucocitario comune, codificato CD45.
- Anticorpo secondario: immunoglobuline di coniglio anti-topo. La diluizione utilizzata dipenderà dal titolo anticorpale e dalla fonte.
- Complesso fosfatasi alcalina - fosfatasi-antialcalina (APAAP).
- **Ematossilina di Harris, p. 232:** miscela di colorazione di Harris (come controcolore).

3.4.2.3 Procedura

Preparazione del campione di eiaculato

1. Miscelare bene il campione di liquido seminale senza creare bolle d'aria.
2. Miscelare un'aliquota di circa 0,5 ml con cinque volumi di DPBS.
3. Centrifugare a 500 g per 5 minuti, rimuovere il surnatante e sospendere il pellet di spermatozoi in cinque volte il suo volume di DPBS.

4. Centrifugare a 500 g per 5 minuti.
5. Ripetere questa procedura ancora una volta e risospendere il pellet in DPBS diluendo fino a ottenere una concentrazione di circa 50×10^6 spermatozoi per ml.

Preparazione degli strisci di liquido seminale

1. Fare strisci di replicati su vetrini puliti (**Sezione 2.4.7.1, p. 26**) da aliquote di 5 μ l della sospensione e lasciare asciugare all'aria.
2. Fissare le cellule asciugate all'aria in acetone assoluto per 10 minuti o in acetone/etanolo/formaldeide per 90 secondi.
3. Lavare due volte con TBS e lasciare defluire il liquido in eccesso.
4. I vetrini possono poi essere colorati immediatamente o avvolti in un foglio di alluminio e conservati a -70°C per analisi successive.

Incubazione con anticorpi

1. Su ogni vetrino, segnare con una matita a mina morbida (penna di delimitazione) un'area di cellule fissate (un cerchio di circa 1 cm di diametro) e coprirlo con 10 μ l di anticorpo monoclonale primario.
2. Tenere il vetrino in posizione orizzontale per 30 minuti a temperatura ambiente in una camera umida (per esempio, una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua) per evitare l'essiccamento.
3. Lavare i vetrini due volte con **TBS, p. 230**, e lasciare defluire il liquido in eccesso.
4. Coprire la stessa area dello striscio con 10 μ l di anticorpo secondario e incubare per 30 minuti in una camera umida a temperatura ambiente.
5. Lavare due volte con TBS e lasciare scolare.
6. Aggiungere 10 μ l di APAAP nella stessa area.
7. Incubare per 1 ora in una camera umida a temperatura ambiente.
8. Lavare due volte in TBS e lasciare defluire il liquido in eccesso.
9. Incubare con 10 μ l di substrato fosfato di naftolo per 20 minuti in una camera umida a temperatura ambiente.



Nota: Per intensificare il prodotto di reazione, la colorazione con l'anticorpo secondario e APAAP può essere ripetuta, con un periodo di incubazione di 15 minuti per ogni reagente.

Controcolorazione e montaggio

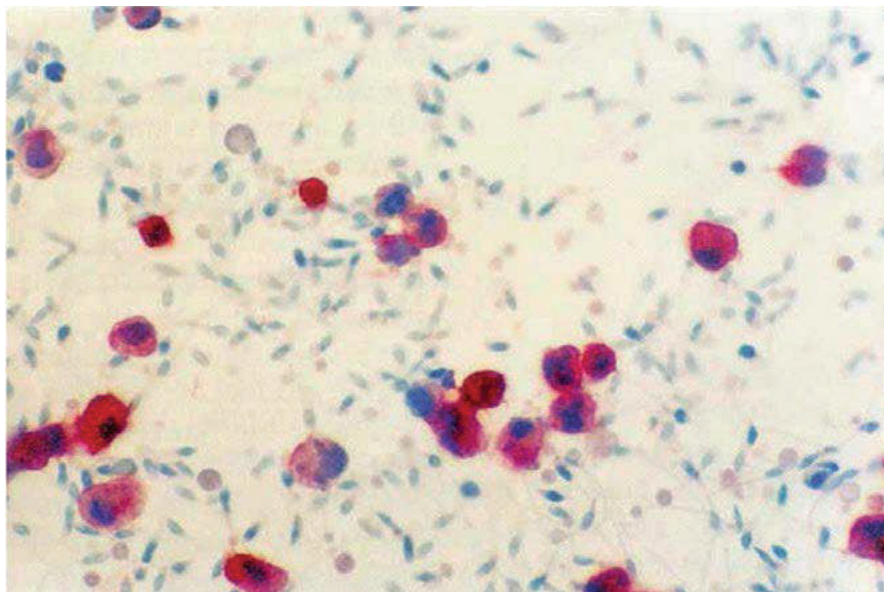
1. Una volta che i vetrini hanno sviluppato un colore rossastro, lavare con TBS.
2. Controcolorare per alcuni secondi con ematosilina; lavare con acqua corrente e montare in un mezzo di montaggio acquoso (**Sezione 2.4.9, p. 41**).

Valutazione del numero di cellule CD45-positivo

1. Esaminare l'intera area colorata del vetrino con ottica in campo chiaro a un ingrandimento di 200x o 400x. Le cellule CD45-positivo (leucociti) sono colorate di rosso (**Figura 3.7**).

2. Conteggiare separatamente le cellule positive al CD45 e gli spermatozoi fino a quando non sono stati osservati almeno 200 spermatozoi in ogni replicato, per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso (Tabella 2.3, p. 33).
3. Contare il numero di cellule CD45-positive e di spermatozoi con l'aiuto di un contattacelle da laboratorio.
4. Valutare il secondo striscio allo stesso modo (fino a quando non sono stati contati 200 spermatozoi).
5. Calcolare la somma e la differenza dei due conteggi delle cellule CD45-positive.
6. Determinare l'accettabilità della differenza dalla Tabella 2.3, p. 33, la differenza massima tra due conteggi che ci si aspetta si verifichi nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento.
7. Se la differenza è accettabile, calcolare la concentrazione (Tabella 2.4, p. 35). Se la differenza è troppo alta, rivalutare i vetrini in replicato.
8. Riportare la concentrazione media di cellule CD45-positive arrotondando alla seconda cifra.
9. Moltiplicare la concentrazione di cellule CD45-positive per il volume totale dell'eiaculato (ml) per ottenere il numero totale di cellule CD45-positive per eiaculato.

Figura 3.7 Leucociti nel liquido seminale



Le cellule portatrici di CD45 (leucociti) sono colorate di rosso.

Micrografia per gentile concessione di R.J. Aitken.

Calcolo della concentrazione

La concentrazione di cellule CD45-positive è calcolata rispetto a quella degli spermatozoi. Se N è il numero di cellule CD45-positive contate nello stesso numero di campi di 400 spermatozoi e S è la concentrazione di spermatozoi in milioni per ml, allora la concentrazione (C) di cellule CD45-positive in milioni per ml può essere calcolata mediante la formula $C = S \times (N/400)$.

Esempi pratici

Esempio 1

Nel replicato 1 ci sono 20 cellule CD45-positivo per 200 spermatozoi, mentre nel replicato 2 ci sono 40 cellule CD45-positivo per 200 spermatozoi. La somma dei valori (20+40) è 60 e la differenza (40-20) è 20. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che questa supera la differenza prevista per il solo effetto della variabilità casuale (15), quindi i risultati vengono scartati e vengono fatte nuove valutazioni.

Esempio 2

Nel replicato 1 ci sono 25 cellule CD45-positivo per 200 spermatozoi, mentre nel replicato 2 ci sono 35 cellule CD45-positivo per 200 spermatozoi. La somma dei valori (25+35) è 60 e la differenza (35-25) è 10. Dalla **Tabella 2.3, p. 33** si vede che questa è inferiore a quella prevista per il solo effetto della variabilità casuale (15), quindi i valori sono accettati.

Per 60 cellule CD45-positivo per 400 spermatozoi e una concentrazione di spermatozoi di 70×10^6 cellule/ml, la concentrazione di cellule CD45-positivo è $C = S \times (N/400)$ cellule/ml = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10,5 \times 10^6$ cellule/ml, o 10×10^6 cellule/ml arrotondando alla seconda cifra. Poiché sono state contate meno di 400 cellule, riportare l'errore di campionamento per 60 cellule come indicato in **Tabella 2.3, p. 33** (circa il 13%).

3.4.2.4 Limiti tra risultati normali e patologici

Attualmente, non ci sono valori di riferimento basati sull'evidenza per le cellule CD45-positivo nel liquido seminale di uomini fertili. Il valore soglia di consenso di $1,0 \times 10^6$ cellule/ml per le cellule perossidasi-positivo implica una concentrazione maggiore di leucociti totali, poiché non tutti i leucociti sono granulociti perossidasi-positivi.

3.5 Valutazione delle interleuchine come marcatori di infiammazione del tratto genitale maschile

3.5.1 Premessa

Le condizioni infiammatorie croniche del tratto genitale maschile (MGT) giocano un ruolo importante nei disturbi della fertilità. Le caratteristiche del liquido seminale nei pazienti affetti da infezioni/infiammazioni da MGT sono la presenza di leucociti oltre 1 milione/ml e l'aumento della viscosità, mentre il sintomo clinico più frequentemente riportato dai pazienti è il dolore pelvico cronico. Le infezioni/infiammazioni dell'MGT possono compromettere la fertilità danneggiando gli spermatozoi attraverso un effetto diretto dei mediatori infiammatori o delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte dalle cellule infiammatorie oppure alterando il microambiente dell'MGT.

Le chemochine sono una grande famiglia di piccole citochine costituita da due sottofamiglie, chemochine CXC e CC, che si distinguono sulla base della posizione delle prime due cisteine: separate da un aminoacido in CXC e adiacenti in CC.

Le chemochine sono prodotte da diversi tipi di cellule, compresi i monociti, i linfociti T attivati e i neutrofili, e agiscono in modo sinergico o additivo sulla funzione delle cellule bersaglio.

La valutazione delle chemochine e delle citochine nel liquido seminale può essere richiesta da andrologi e urologi per approfondire l'iter diagnostico dei maschi infer-

tili affetti da stati infiammatori dell'MGT. Ci sono diversi studi che riportano alterazioni di citochine e chemochine seminali nelle prostatiti e in altri stati infiammatori dell'MGT. Penna et al. hanno quantificato i livelli plasmatici seminali di otto citochine e nove chemochine mediante array multiplex di citochine e chemochine nei controlli e in uomini con sintomi di prostatite cronica o sindrome da dolore pelvico cronico. Hanno scoperto che i livelli di IL-8 sono il migliore predittore, con alta precisione e sensibilità, nella diagnosi di entrambe le condizioni. In commercio sono disponibili diversi kit per la misurazione delle interleuchine (IL) nel siero, nel plasma e nel surnatante delle colture cellulari e possono essere facilmente adattati al liquido seminale.

3.5.2 Protocollo

Principio: per misurare l'IL con il test ELISA viene utilizzato un anticorpo anti-IL biotinilato umano.

3.5.2.1 Reagenti

- Tampone di rivestimento: 0,1 M di carbonato di sodio, pH 9,5.
- 8,4 g NaHCO_3 + 3,56 g Na_2CO_3 + 1 L di H_2O distillata (pH 9,5).
- Tampone PBS pH 7.
- Tampone di diluizione: **DPBS, p. 228**, con 10% di siero bovino fetale, pH 7.
- Tampone di lavaggio: DPBS con 0,05% TWEEN 20.
- Soluzione di substrato: tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (Sigma T0440, pronto all'uso).
- Soluzione di bloccaggio: 1 M H_3PO_4 o 2 N_2SO_4 .

3.5.2.2 Preparazione dei reagenti

- Soluzione di rivestimento: anticorpo di cattura, anti-IL umano (diluito nel tampone di rivestimento).
- Soluzione A/B: 50 μl di anticorpo di rilevamento (anti-IL biotinilato umano opportunamente diluito in tampone di diluizione) + 50 μl di reagente enzimatico (coniugato streptavidina-perossidasi di rafano) + 12,4 ml di tampone di diluizione. Possono essere utilizzate le anti-IL umane commerciali.

3.5.2.3 Procedura

- Giorno 1: rivestire la piastra aggiungendo l'anticorpo anti-IL nel tampone di rivestimento in ogni pozzetto, coprendo la piastra e incubando una notte a 4°C.
- Giorno 2:
 - lavare la piastra tre volte con 300 μl di tampone di lavaggio;
 - aggiungere 200 μl di tampone di diluizione e lasciare a temperatura ambiente per 1 ora;

- capovolgere la piastra e lavare di nuovo tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio;
- nei rispettivi pozzetti aggiungere soluzioni standard IL (0,1-1-10-50-100-500 pg/ml) e campioni di liquido seminale (in alcuni casi può essere necessaria una diluizione) e incubare per 2 ore a temperatura ambiente;
- capovolgere la piastra e lavare cinque volte con 300 µl di tampone di lavaggio;
- aggiungere 100 µl di soluzione blu di anilina (AB) e incubare 1 ora a temperatura ambiente;
- capovolgere la piastra e lavare sette volte con 300 µl di tampone di lavaggio, aspettando almeno 30 secondi a ogni lavaggio;
- aggiungere 100 µl di soluzione di substrato e incubare al buio per 30 minuti a temperatura ambiente;
- aggiungere 50 µl di soluzione di bloccaggio;
- leggere l'assorbanza a 450 nm e 570 nm entro 30 minuti. Sottrarre dall'assorbanza di 570 nm quella di 450 nm. Costruire una curva standard e leggere i valori di assorbanza di ogni campione di liquido seminale.

3.6 Valutazione delle cellule germinali immature nel liquido seminale

Le cellule germinali includono spermatidi rotondi e spermatociti, ma raramente spermatogoni. Questi possono essere rilevati in strisci di campioni seminali colorati, ma possono essere difficili da distinguere dalle cellule infiammatorie quando le cellule stanno degenerando. Il *Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale e dell'interazione spermatozoi-muco cervicale, Quarta edizione* afferma che una quantità > 6 milioni di cellule germinali immature/ml è anormale [4]. Questo non è più indicato come riferimento, poiché non è stato possibile trovare una solida base di prove per questo valore di cut-off.

Spermatidi e spermatociti possono talvolta essere differenziati dai leucociti in uno striscio di liquido seminale colorato usando la procedura Papanicolaou [53]. L'identificazione può essere basata sulla colorazione, la dimensione e la forma del nucleo, sull'assenza di perossidasi intracellulare e sulla mancanza di antigeni specifici dei leucociti. Gli spermatidi multinucleati possono essere facilmente confusi morfologicamente con i leucociti polimorfonucleati, ma si colorano di rosa, in contrasto con i leucociti polimorfonucleati più bluastri [53]. Gli spermatidi rotondi possono essere identificati utilizzando colorazioni specifiche per l'acrosoma in via di sviluppo [222], con lectine o con anticorpi specifici [216, 223].

Anche le dimensioni del nucleo possono aiutare nell'identificazione: gli spermatogoni (raramente rilevati nel liquido seminale) hanno un nucleo di circa 8 µm, mentre gli spermatociti hanno un nucleo di circa 10 µm e gli spermatidi di circa 5 µm. Queste dimensioni sono solo indicative, poiché la degenerazione e la divisione influenzano la dimensione del nucleo.

3.7 Analisi degli antigeni di superficie degli spermatozoi

Se gli spermatozoi presentano agglutinazione (per esempio, spermatozoi mobili adesi tra loro testa-testa, coda-coda o in forma mista), la causa potrebbe essere legata alla presenza di anticorpi antispermatozoo. È importante fare alcuni commenti sugli anticorpi.

- Gli anticorpi antispermatozoo possono essere presenti senza spermio-agglutinazione; allo stesso tempo, l'agglutinazione può essere causata da fattori diversi dagli anticorpi antispermatozoo.
- La sola presenza di anticorpi antispermatozoo non è sufficiente per fare diagnosi di autoimmunità antispermatozoo. È necessario dimostrare che gli anticorpi interferiscono severamente con la funzione degli spermatozoi; questo è solitamente fatto mediante un test di penetrazione del muco. Gli anticorpi, inoltre, possono interferire con il legame alla zona pellucida e con la reazione acrosomiale. La presenza di anticorpi antispermatozoo (ASAB) può anche compromettere il transito degli spermatozoi attraverso il muco cervicale [224].

Gli ASAB del liquido seminale appartengono quasi esclusivamente a due classi di immunoglobuline: IgA e IgG. Gli anticorpi IgM, a causa delle loro maggiori dimensioni e della loro funzione principale nella fase acuta dell'infezione, vengono raramente ritrovati nel liquido seminale. Gli anticorpi IgA possono avere un'importanza clinica maggiore rispetto agli anticorpi IgG [225], ma più del 95% dei casi con presenza di anticorpi IgA spermatici risultano anche positivi per le IgG. Entrambe le classi possono essere rilevate sulle cellule nemaspermiche o nei fluidi biologici mediante i relativi test di screening.

- Test per gli anticorpi adesi agli spermatozoi ("test diretti"). Di seguito vengono descritti due test diretti: il Mixed Antiglobulin Reaction (MAR) test (per una revisione, vedere Bronson et al., 1984 [226, 227]) e l'Immunobead (IB) test [228, 229]. Il MAR test viene eseguito su un campione di liquido seminale in toto, mentre l'IB test utilizza spermatozoi lavati. I risultati dei due test non sempre concordano [230-233], ma i risultati dell'IB test sono ben correlati con i risultati del test di immobilizzazione che individua gli anticorpi nel siero. I protocolli sperimentali per i test IB e MAR variano, ma per entrambi la preparazione dello spermatozoo/bead viene valutata con l'utilizzo di un microscopio. Le beads aderiscono agli spermatozoi mobili e immobili che presentano anticorpi legati in superficie; viene calcolata la percentuale di spermatozoi mobili con anticorpi legati.
- Test per la ricerca di ASAB in fluidi privi di spermatozoi, per esempio plasma seminale, siero ematico e muco cervicale solubilizzato ("test indiretti"): in questi test il fluido, diluito e inattivato al calore, che potrebbe contenere ASAB viene incubato con spermatozoi di donatore privi di anticorpi che sono stati lavati dal plasma seminale. Qualsiasi ASAB nel fluido sospetto si legherà specificamente agli spermatozoi del donatore, i quali saranno poi valutati mediante test diretto, come sopra. Per ottenere risultati affidabili, è importante consentire un tempo sufficiente all'interazione tra spermatozoo e anticorpi, poiché la visibilità dell'agglutinazione potrebbe impiegare fino a 10 minuti di tempo. Tuttavia, bisogna tenere presente che la motilità degli spermatozoi diminuisce con il tempo, e i test dipendono dalla presenza di spermatozoi mobili.
- La penetrazione degli spermatozoi nel muco cervicale e la fecondazione in vivo tendono a essere significativamente compromesse quando il 50% o più degli spermatozoi mobili ha un anticorpo legato a sé [224, 234]. Il legame delle par-

ticelle limitato alla punta della coda non è associato a una ridotta fertilità e può essere presente in uomini fertili [235].



Nota 1: I MAR test qui descritti sono disponibili in commercio, mentre l'IB test non è disponibile; tuttavia, gli IB possono essere realizzati in laboratorio. Entrambi dipendono dalla presenza di spermatozoi mobili. Se gli spermatozoi mobili sono insufficienti, si deve ricorrere a test indiretti sul plasma seminale o sul siero del sangue.



Nota 2: Gli anticorpi citotossici che possono uccidere gli spermatozoi o inibirne severamente la motilità non possono essere rilevati con questi test.

3.7.1 Mixed Antiglobulin Reaction test

Il MAR test è un esame di screening economico, rapido e sensibile [236], ma fornisce meno informazioni dell'IB test diretto (Sezione 3.7.2, p. 121).

Nel MAR test un anticorpo "ponte" (anti-IgG o anti-IgA) viene utilizzato per fare in modo che le beads, rivestite di anticorpi, vengano in contatto con gli spermatozoi non lavati che hanno sulla loro superficie gli anticorpi IgG o IgA. I MAR test diretti IgG e IgA vengono eseguiti mescolando separatamente liquido seminale in toto e non trattato con particelle di lattice (microsfere) o globuli rossi trattati rivestiti di IgG o IgA umane. Alle sospensioni viene addizionato un siero monospecifico anti-IgG o anti-IgA umano. La formazione di agglutinazioni miste tra beads e spermatozoi mobili indica la presenza di anticorpi IgG o IgA sugli spermatozoi (l'agglutinazione tra le beads serve come controllo positivo per il riconoscimento antigene-anticorpo).

3.7.1.1 Procedura

1. Miscelare accuratamente il campione seminale senza creare bolle.
2. Prelevare aliquote di 3,5 µl di liquido seminale in replicato e posizionarle, su vetrini separati, al microscopio.
3. Includere un vetrino con 3,5 µl di seme ASAB-positivo e uno con 3,5 µl di seme ASAB-negativo come controlli in ogni test diretto. Questo liquido seminale dovrebbe provenire da uomini con e senza ASAB, rispettivamente, come mostrato nei precedenti MAR test diretti. In alternativa, possono essere prodotti spermatozoi positivi mediante l'incubazione in un siero noto per la presenza di anticorpi.
4. Aggiungere 3,5 µl di particelle di lattice rivestite di IgG (beads) a ciascuna goccia del campione seminale e dei controlli e miscelare con la punta della pipetta.
5. Aggiungere 3,5 µl di antisiero contro le IgG umane a ciascuna miscela di liquido seminale e beads e miscelare con la punta della pipetta.
6. Coprire la sospensione con un vetrino coprioggetto (22×22 mm) per fornire una profondità di circa 20 µm.
7. Tenere il vetrino in posizione orizzontale per 3 minuti a temperatura ambiente in una camera umida (per esempio, una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua) al fine di prevenirne l'essiccamento.
8. Esaminare la preparazione a fresco con microscopio ottico a contrasto di fase a ingrandimento 200x o 400x dopo 3 minuti e di nuovo dopo 10 minuti.

9. Ripetere la procedura utilizzando beads rivestite di IgA invece di IgG e anticorpi anti-IgA invece di anti-IgG.

3.7.1.2 Calcolo

Se gli spermatozoi presentano anticorpi sulla loro superficie, le beads di lattice vi aderiranno. Gli spermatozoi mobili inizialmente si muoveranno con poche o con un gruppo di particelle adese. Successivamente, le zone di agglutinazione diventeranno così estese che il movimento degli spermatozoi sarà significativamente limitato. Gli spermatozoi che non presentano anticorpi di rivestimento si muoveranno liberamente tra le beads.

L'obiettivo del test è quello di determinare la percentuale di spermatozoi mobili che hanno beads adese. Un problema che si verifica comunemente avviene nel caso in cui gli spermatozoi non progressivi siano vicini alle beads ma non attaccati a esse. Il legame alle beads può essere facilmente verificabile picchiando leggermente il vetrino coprioggetto con la punta di una piccola pipetta: il movimento delle beads in contemporanea con gli spermatozoi mobili è indice di positività di adesione.

1. Contare solo gli spermatozoi mobili e determinare la percentuale di spermatozoi mobili che hanno due o più beads di lattice adese. Ignorare i legami a livello della punta della coda.
2. Valutare almeno 200 spermatozoi mobili in ogni replicato per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso.
3. Calcolare la percentuale di spermatozoi mobili che hanno beads adese.
4. Registrare la classe (IgG o IgA) e il sito di legame delle beads di lattice agli spermatozoi (testa, tratto intermedio, tratto principale).



Nota 1: Se il 100% degli spermatozoi mobili è legato alle beads dopo 3 minuti, prendere questo come risultato del test; non è necessario rileggere dopo 10 minuti.



Nota 2: Se meno del 100% degli spermatozoi mobili è legato alle beads entro 3 minuti, il vetrino dovrà essere riletto dopo 10 minuti.



Nota 3: Se gli spermatozoi risultano immobili dopo 10 minuti, andrà calcolato come risultato il valore percentuale osservato dopo 3 minuti.

3.7.1.3 Limiti tra risultati normali e patologici

Attualmente, non ci sono valori di riferimento basati sull'evidenza per gli spermatozoi legati agli anticorpi nel MAR test su liquido seminale di uomini fertili. Come per tutti i test di diagnostica clinica di laboratorio, ogni laboratorio dovrebbe definire i suoi intervalli di riferimento normali testando un numero sufficientemente grande di uomini normofertili.

3.7.2 L'immunobead test

Oggi non ci sono test IB disponibili in commercio, il che significa che le immunobeads devono essere fatte in laboratorio usando beads di sefarosio attivate con CNBr

per coniugare IgG o IgA anti-umane alle beads secondo i protocolli dei produttori. Anche la convalida e la verifica della funzionalità del sistema dei test devono essere eseguite dal laboratorio. La produzione e il controllo della produzione di immunosfere non sono descritti in questo manuale.

3.7.2.1 L'immunobead test diretto

Questo esame richiede un tempo più lungo rispetto al MAR test ma fornisce informazioni circa anticorpi adesi agli spermatozoi che sono stati separati dal plasma seminale e dai suoi possibili interferenti.

Nell'IB test diretto, le beads rivestite con legame covalente con le immunoglobuline di coniglio dirette contro IgG o IgA umane vengono miscelate direttamente con gli spermatozoi lavati. Il legame delle beads con anti-IgG o anti-IgA umane agli spermatozoi mobili indica la presenza di anticorpi IgG o IgA sulla superficie degli spermatozoi.

Reagenti

1. DPBS-BSA o soluzione di Tyrode-BSA (**Sezione 8.4, p. 226**).
2. Tampone 1: aggiungere 0,3 g di V frazione di Cohn BSA a 100 ml di DPBS o soluzione di Tyrode.
3. Tampone 2: aggiungere 5 g di V frazione di Cohn BSA a 100 ml di DPBS o soluzione di Tyrode.
4. Filtrare tutte le soluzioni attraverso filtri da 0,45 µm e riscaldare a 25-35°C prima dell'uso.

Preparazione delle immunobeads

1. Per ogni tipo di immunobeads (IgG, IgA) aggiungere 0,2 ml di sospensione stock di beads a 10 ml di tampone 1 in vials separate da centrifuga.
2. Centrifugare a 500 g o 600 g per 5-10 minuti.
3. Decantare e scartare il surnatante delle immunobeads lavate.
4. Risospendere delicatamente le beads in 0,2 ml di tampone 2.

Preparazione degli spermatozoi

La quantità di liquido seminale necessaria per questi test è determinata dalla concentrazione e dalla motilità degli spermatozoi, come mostrato nella **Tabella 3.4**.

Tabella 3.4 Quantità di liquido seminale da utilizzare per l'Immunobead test

Concentrazione nemespermica (10 ⁶ /ml)	Percentuale di spermatozoi con motilità progressiva (a+b) (%)	Volume di liquido seminale richiesto (ml)
> 50	-	0,2
21-50	> 40	0,4
21-50	< 40 > 10	0,8
10-20	> 40	1,0
10-20	< 40 > 10	2,0
< 10 > 5	> 10	> 2,0

1. Miscelare accuratamente il campione di liquido seminale.
2. Trasferire la quantità necessaria di liquido seminale in una vial da centrifuga e portare a 10 ml con il tampone 1.
3. Centrifugare a 500 g per 5-10 minuti.
4. Decantare ed eliminare il surnatante dopo il lavaggio degli spermatozoi.
5. Risospendere delicatamente il pellet in 10 ml di tampone 1 fresco.
6. Centrifugare di nuovo a 500 g per 5-10 minuti.
7. Decantare ed eliminare il surnatante.
8. Risospendere delicatamente il pellet in 0,2 ml di tampone 2.



Nota 1: Aliquote con volume superiore a 1,0 ml richiedono tre lavaggi.



Nota 2: I campioni con una bassa percentuale di spermatozoi dotati di motilità progressiva (per esempio, il 10% o meno) possono non fornire risultati chiaramente interpretabili. In questo caso, considerare l'IB test indiretto (Sezione 3.7.2.2, p. 124).

Procedura

Gli spermatozoi ASAB-positivi e quelli ASAB-negativi dovrebbero essere inclusi come controlli in ogni test. Il liquido seminale dovrebbe provenire da uomini con e senza ASAB, rispettivamente, come identificati nei precedenti IB test diretti.

1. Posizionare 5 µl della sospensione di spermatozoi lavati da analizzare su un vetrino da microscopio prima di iniziare il test.
2. Preparare vetrini separati con 5 µl di spermatozoi ASAB-positivi e 5 µl di spermatozoi ASAB-negativi.
3. Aggiungere 5 µl di sospensione di immunobeads anti-IgG accanto a ciascuna goccia di spermatozoi.
4. Miscelare insieme le gocce di immunobeads anti-IgG e di spermatozoi con la punta di una pipetta.
5. Posizionare un vetrino coprioggetto da 22×22 mm sopra la goccia miscelata per ottenere uno spessore di circa 20 µm.
6. Tenere i vetrini orizzontalmente per 3-10 minuti a temperatura ambiente in una camera umida (per esempio, una capsula di Petri chiusa rivestita di carta da filtro imbibita di acqua). Non aspettare più di 10 minuti prima di valutare i vetrini, poiché il legame delle immunobeads diminuisce significativamente durante l'incubazione [237].
7. Esaminare i vetrini con un microscopio ottico a contrasto di fase a un ingrandimento di 200x o 400x.
8. Contare solo gli spermatozoi mobili che hanno una o più beads legate, come descritto nella Sezione 3.7.1.2, p. 121. Ignorare i legami sulla punta della coda.

9. Ripetere la procedura utilizzando la sospensione di immunoglobuline anti-IgA.



Nota: Per assicurarsi che tutti i legami tra beads e spermatozoi vengano valutati entro 10 minuti, è preferibile scaglionare la preparazione dei vetrini.

Interpretazione clinica e limiti tra risultati normali e patologici

Attualmente, non ci sono valori di riferimento basati sull'evidenza per gli anticorpi legati agli spermatozoi nell'IB test sul liquido seminale di uomini fertili. Come per tutti i test di diagnostica clinica di laboratorio, il laboratorio dovrebbe definire e convalidare i propri intervalli di riferimento utilizzando uomini con comprovata fertilità, con parametri seminali normali.

Secondo le versioni precedenti del manuale, la diagnosi di infertilità immunologica veniva fatta quando il 50% o più degli spermatozoi mobili (progressivi e non progressivi) aveva particelle adese, ma tale valore-soglia era ricavata da un piccolo studio [238]. Pertanto, è necessario utilizzare cautela nell'interpretazione di un risultato specifico come causa di subfertilità. Il legame delle particelle limitato alla punta della coda non è associato a una ridotta fertilità e può essere presente in uomini fertili [235].

3.7.2.2 L'immunobead test indiretto

L'IB test indiretto è utilizzato per identificare gli ASAB in fluidi privi di spermatozoi (siero, fluido testicolare, plasma seminale o muco cervicale solubilizzato con bromelina) e inattivati al calore. In questo test, il fluido privo di spermatozoi viene incubato insieme agli spermatozoi lavati del donatore per permettere agli ASAB presenti di legarsi agli spermatozoi. Gli spermatozoi del donatore, privi di anticorpi, si legano agli ASAB presenti nel fluido in esame e vengono poi valutati come nell'IB test diretto.

Reagenti

Vedere la sezione **Reagenti** per l'IB test diretto, **p. 122**.

Se deve essere analizzato il muco cervicale, preparare 10 UI/ml di bromelina, un enzima proteolitico ad ampio spettro (EC 3.4.22.32).

Preparazione delle immunobeads

Vedere la sezione **Preparazione delle immunobeads**, **p. 122**.

Preparazione degli spermatozoi del donatore

Vedere la sezione **Preparazione degli spermatozoi**, **p. 122**.

Preparazione del fluido del paziente da esaminare

1. Se si analizza il muco cervicale, diluire 1+1 (1 : 2) con 10 IU/ml di bromelina, miscelare con la punta di una pipetta e incubare a 37°C per 10 minuti. Quando la fluidificazione è completa, centrifugare a 2.000 g per 10 minuti. Usare il surnatante immediatamente per l'analisi oppure congelarlo a -70°C.
2. Inattivare il complemento presente nel muco cervicale solubilizzato, nel siero, nel plasma seminale o nel fluido testicolare riscaldando a 56°C per 30-45 minuti.
3. Diluire il campione inattivato al calore 1+4 (1 : 5) con il tampone 2 (per esempio, 10 µl del fluido biologico da analizzare con 40 µl di tampone 2).

- Includere campioni noti positivi e negativi, per esempio il siero di uomini con e senza ASAB, rispettivamente, come rilevato nell'IB test indiretto, come controlli in ogni test indiretto. Gli uomini che hanno subito una vasectomia possono essere una fonte di siero, se positivi (> 50% di spermatozoi con legame delle microbeads, escludendo il legame alla punta della coda).

Incubazione degli spermatozoi del donatore con il fluido da esaminare

- Miscelare 50 µl di sospensione lavata di spermatozoi del donatore con 50 µl di fluido biologico da esaminare diluito 1+4 (1 : 5).
- Incubare a 37°C per 1 ora.
- Centrifugare a 500 g per 5-10 minuti.
- Decantare ed eliminare il surnatante.
- Risospendere delicatamente il pellet di spermatozoi in 10 ml di tampone 1 fresco.
- Centrifugare di nuovo a 500 g per 5-10 minuti.
- Decantare ed eliminare il surnatante.
- Ripetere le fasi di lavaggio 5, 6 e 7 sopramenzionati.
- Risospendere delicatamente il pellet di spermatozoi in 0,2 ml di tampone 2.

Procedura

- Eseguire l'IB test come descritto a **p. 123** con gli spermatozoi del donatore incubati.
- Valutare e interpretare il test come descritto alle **pp. 123-124**.

3.8 Test biochimici per la funzione delle ghiandole accessorie

Un liquido seminale di scarsa qualità può derivare da secrezioni alterate delle ghiandole accessorie. Le secrezioni di queste ghiandole possono essere esaminate per valutare la funzione delle stesse, per esempio, acido citrico, zinco, glutamil transpeptidasi e fosfatasi acida per la prostata; fruttosio e prostaglandine per le vescicole seminali; L-carnitina libera, glicero-fosfocolina (GPC) e α -glucosidasi neutra per l'epididimo.

Un'infezione in una qualsiasi delle ghiandole può talvolta causare una diminuzione temporanea della secrezione dei marcatori. Un'infezione può anche causare danni irreversibili all'epitelio secretorio, tanto che, anche dopo la risoluzione della fase acuta, la secrezione potrebbe rimanere bassa [239, 240].

- Capacità secretoria della prostata. Le quantità di zinco, acido citrico [241] o fosfatasi acida [242] nel liquido seminale forniscono una misura affidabile della secrezione della ghiandola prostatica, e ci sono buone correlazioni tra questi marcatori. Un test spettrofotometrico per lo zinco è descritto nella **Sezione 3.8.1, p. 126**.
- Capacità secretoria delle vescicole seminali. Il fruttosio nel liquido seminale riflette la funzione secretoria delle vescicole seminali. Un metodo spettrofotometrico per la sua stima è descritto nella **Sezione 3.8.2, p. 129**.

- Capacità secretoria dell'epididimo. L-carnitina, GPC e α -glucosidasi neutra sono marcatori epididimali utilizzati clinicamente. L' α -glucosidasi neutra ha dimostrato di essere più specifica e sensibile per i disturbi epididimali rispetto alla L-carnitina e alla GPC [240]. Ci sono due isoforme di α -glucosidasi nell'eiaculato: la forma maggiore, neutra, proviene esclusivamente dall'epididimo, mentre la forma minore, acida, principalmente dalla prostata. Un semplice metodo spettrofotometrico per l' α -glucosidasi neutra è descritto nella **Sezione 3.8.3, p. 132**.
- Il contenuto totale della secrezione di qualsiasi ghiandola accessoria nell'eiaculato riflette la funzione secretoria complessiva di quella ghiandola [83]. Il valore totale si ottiene moltiplicando la concentrazione del marcatore per il volume dell'eiaculato.

3.8.1 Dosaggio dello zinco nel plasma seminale

3.8.1.1 Premessa

Esistono kit disponibili in commercio. Un metodo dettagliato e utile per la valutazione della presenza di zinco in differenti fluidi è descritto qui di seguito [243]. Questo metodo può essere adattato per il liquido seminale come un precedente test commerciale [244], modificato per l'uso di un lettore di piastre a 96 pozzetti con sensibilità 4 $\mu\text{mol/l}$ [245]. I volumi del liquido seminale e dei reagenti possono essere regolati proporzionalmente per gli spettrofotometri utilizzando cuvette da 3 ml o 1 ml. Le correzioni appropriate devono essere fatte nel calcolo dei risultati.

3.8.1.2 Principio

Il composto 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-solfopropilammino)-fenolo (5-Br-PAPS) si lega allo zinco, producendo un cambiamento di colore.

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow$ complesso 5-Br-PAPS-Zn, che assorbe la luce a una lunghezza d'onda massima di 552 nm.

3.8.1.3 Reagenti

- Soluzioni di stock:
 - H_2O bidistillata – per ogni preparazione sottostante: in totale 400 ml necessari.
 - Tampone bicarbonato carbonato, pH 9,8, 200 mmol/l
 - Per esempio, Sigma-Aldrich C3041: sciogliere 13 capsule in 325 ml di acqua purificata.
 - Controllare che il pH sia 9,8.
 - Conservare a +4°C; durata di conservazione di almeno 3 mesi.
 - 5-Br-PAPS, 0,7 mmol/l
 - Per esempio, Sigma-Aldrich 180017 (Mw 537,3): 19 mg in 50 ml di tampone di bicarbonato.
 - Conservare a +4°C; durata di conservazione di almeno 3 mesi.
 - Sodio citrato, 850 mmol/l
 - Per esempio, Sigma-Aldrich C3674 (Mw 258,1): 11,0 g in 50 ml di tampone di bicarbonato.

- Conservare a +4°C; durata di conservazione di almeno 3 mesi.
- Mesilato di deferoxamina, 205 mmol/l
 - Per esempio, Sigma-Aldrich D9533 (Mw 656,8): 96 mg in 60 ml di tampone bicarbonato carbonato.
 - Conservare a +4°C; durata di conservazione almeno 3 mesi.
- Salicilaldoxima, 29 mmol/l
 - Per esempio, Sigma-Aldrich 84172 (Mw 137,1): 239 mg in 60 ml di acqua purificata.
 - Conservare a +4°C; durata di conservazione almeno 3 mesi.
- Zinco standard (50 µmol/l)
 - Preparazione:
 - sciogliere 0,288 g di ZnSO₄·7H₂O in 100 ml di acqua purificata (concentrazione di zinco 10 mmol/l);
 - diluire questo 200× (aggiungere 0,5 ml a 99,5 ml di acqua purificata) per ottenere 50 µmol/l di stock;
 - mescolare bene e conservare congelato a -20°C per un massimo di 1 anno in aliquote da 2 ml in vials ermetiche.
 - Curva standard: diluire lo zinco standard da 50 µmol/l con acqua purificata per ottenere quattro standard aggiuntivi da 40, 20, 10 e 5 µmol/l.

Tabella 3.5 Standard raccomandati per le valutazioni dello zinco

Standard	Corrispondente ⁸ allo zinco seminale (mM)	Zinco standard 50 µmol/l (ml)	Acqua purificata
40 µmol/l	8	0,8	0,2
20 µmol/l	4	0,4	0,6
10 µmol/l	2	0,2	0,8
5 µmol/l	1	0,1	0,9
0 µmol/l	0	0	1,0

- Soluzioni di lavoro (preparate durante il giorno per il test)
 - Soluzione A: preparare mescolando:
 - tampone di bicarbonato di carbonio, 7,0 ml;
 - soluzione stock di 5-Br-PAPS, 4,0 ml;
 - soluzione stock di citrato di sodio, 4,0 ml;
 - soluzione stock di deferoxamina mesilato, 5,0 ml.
 - Soluzione di lavoro finale: prepararla mescolando:
 - soluzione A, 20 ml;
 - salicilaldoxima, 5 ml;
 - durata di conservazione di 1 settimana a +4-8°C.
- Pool di controllo di qualità interno congelato di plasma seminale: vedere **Sezione 3.8.4, p. 135**.

⁸ Fattore di diluizione ×200 come descritto nella **Sezione 3.9.1**. In un materiale di circa 45.000 eiaculati, più del 99,5% aveva meno di 8 mM in concentrazione di zinco [246].

3.8.1.4 Procedura

I passi 1-3 possono preferibilmente essere fatti in comune con la valutazione del fruttosio (**Sezione 3.8.2, p. 129**) e dell' α -glucosidasi (**Sezione 3.8.3, p. 132**); anche la diluizione 1 nel passaggio 4 può essere fatta preferibilmente in comune con la valutazione del fruttosio.

1. Centrifugare il campione residuo dopo l'analisi del liquido seminale per 10-15 minuti a 3.000 g, decantare e conservare il plasma seminale privo di spermatozoi a -20°C fino al momento dell'analisi.
2. Scongelerare il plasma seminale privo di spermatozoi. Scongelerare anche un'aliquota di plasma seminale per il controllo di qualità interno (**Sezione 3.8.4, p. 135**).
3. Mescolare bene i campioni di plasma seminale in un mixer vortex.
4. Procedura di diluizione. La diluizione del plasma seminale non diluito richiede l'uso di una pipetta a spostamento positivo per ottenere un corretto volume di plasma seminale. In genere, si procede con una diluizione di 1 : 200. La procedura in due passaggi qui descritta semplifica l'intera analisi biochimica, poiché le diluizioni usate nel primo passaggio possono essere utilizzate anche per la determinazione del fruttosio.
 - Diluizione 1: diluizione 1 : 40 (1+39) di ogni campione di plasma seminale: a 975 μl di H_2O purificata in ciascuna delle due vials da 1,5 ml, aggiungere 25 μl di plasma seminale (con una pipetta a spostamento positivo) e mescolare agitando per 5 secondi. Le diluizioni preparate possono essere utilizzate anche per le valutazioni del fruttosio (**Sezione 3.8.2, p. 129**) senza ulteriore diluizione.
 - Diluizione 2: diluire la prima diluizione 1 : 5 (1+4): a 400 μl di H_2O purificata, aggiungere 100 μl del plasma seminale diluito 1 : 40 dal passaggio 1 di cui sopra (diluizione finale 1 : 200). La pipetta a spostamento positivo non è necessaria in questa fase.
5. Aggiungere aliquote replicate di 40 μl dei campioni di plasma seminale diluiti dal punto 2 in una piastra a 96 pozzetti. Includere come controlli bianchi acqua purificata (40 μl di acqua purificata) e 40 μl di replicati di ciascuno degli standard.
6. Aggiungere 200 μl di reagente colorato a ogni pozzetto e mescolare per 5 minuti su un agitatore per piastre a 96 pozzetti.
7. Leggere la piastra alla lunghezza d'onda di 552 nm [243].

3.8.1.5 Calcolo

1. Sottrarre i valori di assorbanza di fondo (standard 0 $\mu\text{mol/l}$) dagli standard, dai plasma seminali testati e dai controlli.
2. Leggere la concentrazione di zinco nel campione dalla curva standard ($\mu\text{mol/l}$) confrontando i valori di assorbanza.
3. I risultati al di sopra dello standard superiore sono estremamente insoliti [246] e non indicano un possibile disturbo clinico. I valori possono non essere esatti e possono essere riportati come $> 8 \text{ mmol/l}$, e un nuovo test non è solitamente necessario.

4. Moltiplicare i risultati per il fattore di diluizione di 200 per ottenere la concentrazione di zinco (mmol/l) nel plasma seminale non diluito.
5. Per ogni campione di eiaculato, viene calcolata la media dei due replicati.
 - Per risultati > 1,5 mmol/l, i replicati dovrebbero concordare entro il 10%, cioè (differenza tra stime/media delle stime) < 10%. In caso contrario, ripetere il test su due nuove aliquote di liquido seminale.
 - Per i risultati < 1,5 mmol/l, qualsiasi differenza superiore a 0,1 mmol/l dovrebbe essere valutata per determinare se un errore in uno dei replicati indica una possibilità di errore diagnostico o se la differenza è clinicamente irrilevante. Se pertinente, ripetere il test su due nuove aliquote di liquido seminale.
6. Moltiplicare la concentrazione per il volume totale di liquido seminale (ml) per ottenere il contenuto totale di zinco (μmol/l) nell'eiaculato.

3.8.1.6 Limite di riferimento inferiore

Il limite di riferimento inferiore per lo zinco è 2,4 μmol per eiaculato [245 e dati non pubblicati da TG Cooper].

3.8.2 Dosaggio del fruttosio nel plasma seminale

3.8.2.1 Premessa

Il metodo descritto di seguito è basato su quello di Karvonen e Malm [247], modificato per l'uso di un lettore di piastre a 96 pozzetti con sensibilità 74 μmol/l [240]. I volumi di liquido seminale e dei reagenti possono essere regolati proporzionalmente per gli spettrofotometri utilizzando cuvette da 3 ml o 1 ml. Le correzioni appropriate devono essere fatte nel calcolo dei risultati. Il basso contenuto di fruttosio nel liquido seminale è caratteristico dell'ostruzione dei dotti eiaculatori, dell'assenza congenita bilaterale dei vasi deferenti [130, 131, 133], dell'eiaculazione retrograda parziale o della carenza di androgeni.

3.8.2.2 Principio

Sotto l'influenza del calore e di un pH basso, il fruttosio forma un complesso colorato con l'indolo, che assorbe la luce di lunghezza d'onda 470 nm.

3.8.2.3 Reagenti

Esistono in commercio kit per il dosaggio del fruttosio nel plasma seminale. In alternativa, preparare i seguenti reagenti.

- Agente deproteinizzante 1 (63 μmol/l ZnSO₄): sciogliere 1,8 g di ZnSO₄·7H₂O in 100 ml di acqua purificata.
- Agente deproteinizzante 2 (1 mol/l NaOH): sciogliere 0,4 g di NaOH in 100 ml di acqua purificata.

- Colorante (indolo 2 µmol/l in conservante benzoato 16 µmol/l):
 - sciogliere 200 mg di acido benzoico in 90 ml di acqua purificata agitando in un bagno d'acqua a 60°C;
 - sciogliere 25 mg di indolo in questo e portare a 100 ml con acqua purificata;
 - se ci sono segni di particolato nella soluzione, filtrare (dimensione dei pori 0,45 µm);
 - conservare a +4°C.
- Soluzione stock standard di fruttosio (22,4 mmol/l):
 - sciogliere 403 mg di D-fruttosio in 100 ml di acqua purificata;
 - conservare a 4°C o congelare (-20°C) in aliquote.
- Curva standard: diluire lo standard di 2,24 mmol/l con acqua purificata per ottenere quattro standard aggiuntivi di 1,12, 0,56, 0,28 e 0,14 mmol/l.

Tabella 3.6 Standard raccomandati per il dosaggio del fruttosio

Standard (mmol/l)	Corrispondente ⁹ al fruttosio seminale (mmol/l)	Standard di fruttosio 22.4 mmol/l (µl)	Acqua purificata (µl)
2,24	89,6	100	900
1,12	44,8	50	950
0,56	22,4	25	975
0,28	11,2	12,5	988
0,14	5,6	6,3	994
0,0	0,0	0	1.000

- Pool di controllo di qualità interno congelato di plasma seminale: vedere **Sezione 3.8.4, p. 135**.

3.8.2.4 Procedura

Per i passaggi 1-3, la procedura può essere fatta in comune con le valutazioni dello zinco (**Sezione 3.8.1, p. 126**) e dell'α-glucosidasi (**Sezione 3.8.3, p. 132**), e preferibilmente il passo 4 è fatto in comune con le valutazioni dello zinco.

1. Centrifugare il campione residuo dopo l'analisi del liquido seminale per 10-15 minuti a 3.000 g, decantare e conservare il plasma seminale privo di spermatozoi a -20°C fino al momento dell'analisi.
2. Scongellare il plasma seminale privo di spermatozoi. Scongellare anche un'aliquota di plasma seminale per il controllo di qualità interno (**Sezione 3.8.4, p. 135**).

⁹ Fattore di diluizione ×40 come descritto nella **Sezione 3.8.2.4**.

3. Mescolare bene i campioni di plasma seminale in un mixer vortex.
4. Diluizione: la diluizione raccomandata è 1 : 40. Se combinato con valutazioni dello zinco, ulteriori diluizioni per le misurazioni di zinco possono essere fatte dalla diluizione iniziale di 1 : 40 necessaria per il dosaggio del fruttosio:
 - diluizione A 1: diluire 40 (1+39) di ogni campione di plasma seminale: a 975 μ l di H₂O purificata in ciascuna delle due vials da 1,5 ml, aggiungere 25 μ l di plasma seminale (con una pipetta a spostamento positivo) e mescolare agitando per 5 secondi.
5. Deproteinizzare: a 200 μ l di campione diluito a 1 : 40, aggiungere 50 μ l di 63 μ mol/l ZnSO₄ e 50 μ l di 0,1 mol/l NaOH e mescolare. Lasciare riposare per 15 minuti a temperatura ambiente, poi centrifugare a circa 8.000 g per 5 minuti.
6. Trasferire 100 μ l di surnatante da ogni campione in una vial. Includere aliquote da 100 μ l di ogni standard (inclusi i bianchi).
7. Aggiungere 100 μ l di reagente di indolo in ogni vial e mescolare.
8. Aggiungere 1 ml di acido cloridrico (HCl) concentrato (37% v/v) a ciascun campione, coprire con una pellicola da laboratorio modellabile e autosigillante e mescolare accuratamente in una cappa aspirante.
9. Riscaldare per 20 minuti a 50°C in un bagno d'acqua. Mescolare e raffreddare in acqua ghiacciata per 15 minuti.
10. Trasferire con cura 250 μ l in replicato a una piastra a 96 pozzetti in una cappa aspirante.
11. Sigillare la piastra a 96 pozzetti con una pellicola da laboratorio adesiva per proteggere lo spettrofotometro dall'acido.
12. Leggere la piastra alla lunghezza d'onda di 470 nm, utilizzando l'acqua come bianco per impostare lo zero.

3.8.2.5 Calcolo

1. Sottrarre i valori di assorbanza di base (standard 0 μ mol/l) dagli standard, dai plasma seminali testati e dai controlli.
2. Leggere la concentrazione di fruttosio nel campione dalla curva standard (mmol/l) confrontando i valori di assorbanza.
3. I risultati al di sopra dello standard superiore non indicano un possibile disturbo clinico. I valori possono non essere esatti e possono essere riportati come > 90 mmol/l e un nuovo test non è solitamente necessario.
4. Moltiplicare i risultati di ogni campione per il fattore di diluizione di 40 per ottenere la concentrazione di fruttosio (mmol/l) nel plasma seminale non diluito.
5. Per ogni plasma seminale si calcola la media dei due replicati:
 - per i risultati > 10 mmol/l, i replicati non dovrebbero discostarsi oltre il 10%, cioè (differenza tra stime/media delle stime) \leq 10%;

- in caso contrario, ripetere il test su due nuove aliquote di liquido seminale;
 - per i risultati <10 mmol/l, qualsiasi differenza superiore a 0,5 mmol/l dovrebbe essere valutata per determinare se un errore in uno dei replicati indica una possibilità di errore diagnostico o se la differenza è clinicamente irrilevante. Se pertinente, ripetere il test su due nuove aliquote di eiaculato.
6. Moltiplicare la concentrazione per il volume del liquido seminale (ml) per ottenere il contenuto totale di fruttosio (μmol) dell'eiaculato.

3.8.2.6 Limite di riferimento inferiore

Il limite di riferimento inferiore per il fruttosio è di 13 μmol per eiaculato [245 e dati non pubblicati da TG Cooper].

3.8.3 Dosaggio della α -glucosidasi neutra nel plasma seminale

3.8.3.1 Premessa

Il plasma seminale contiene sia un isoenzima α -glucosidasi neutro, che ha origine nell'epididimo, sia un isoenzima acido prodotto dalla prostata. Quest'ultimo può essere inibito selettivamente dal sodio dodecil solfato (SDS) [248] per permettere la misurazione dell' α -glucosidasi neutra, che riflette la funzione epididimaria. Calcolare l'esaurimento del substrato, non glucosidasi correlato, utilizzando l'inibitore castanospermina, che rende il test più sensibile. Il metodo descritto di seguito è da utilizzare con un lettore di piastre a 96 pozzetti con sensibilità 1,9 mU/ml [249]. I volumi del liquido seminale e dei reagenti possono essere regolati proporzionalmente per gli spettrofotometri con cuvette da 3 ml o da 1 ml. Le correzioni appropriate devono essere fatte nel calcolo dei risultati.

3.8.3.2 Principio

La glucosidasi converte il substrato sintetico glucopiranoside in p-nitrofenolo, che diventa giallo (lunghezza d'onda 405 nm) con l'aggiunta di carbonato di sodio.

3.8.3.3 Reagenti

È disponibile in commercio un kit per il dosaggio, nel liquido seminale, dell' α -glucosidasi neutra epididimaria. Solo i kit che includono SDS e castanospermina sono raccomandati per la misurazione di questo enzima nel liquido seminale. In alternativa, preparare i seguenti reagenti.

- Tampone 1 (fosfato 0,2 mol/l, pH 6,8):
 - sciogliere 4,56 g di $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml di acqua purificata;
 - sciogliere 2,72 g di K_2HPO_4 in 100 ml di acqua purificata;
 - miscelare approssimativamente uguali volumi di ciascuna soluzione fino a un pH di 6,8.

- Tampone 2: sciogliere 1 g di SDS in 100 ml di tampone 1. L'SDS precipita durante la conservazione a +4°C ma si ridissolve con un leggero riscaldamento.
- Reagente colorato 1 (per fermare la reazione, carbonato di sodio 0,1 mol/l): sciogliere 6,20 g di $N_2CO_3 \cdot H_2O$ in 500 ml di H_2O .
- Reagente colorato 2: sciogliere 0,1 g di SDS in 100 ml di reagente colorato 1.
- Substrato *p*-nitrofenolo glucopiranoside (PNPG) (5 mg/ml): sciogliere 0,1 g di PNPG in 20 ml di tampone 2 e scaldare la soluzione su una piastra a circa 50°C, agitando per circa 10 minuti. Alcuni cristalli possono rimanere insoluti. La soluzione dev'essere mantenuta a 37°C durante l'uso. Preparare una nuova soluzione per ogni test.
- Inibitore della glucosidasi per il bianco (castanospermina, 10 mmol/l):
 - sciogliere 18,9 mg di castanospermina in 10 ml di acqua purificata;
 - diluire 10 volte in acqua purificata per dare una soluzione di lavoro di 1 mmol/l;
 - congelare aliquote di circa 1 ml a -20°C.
- Curva standard.
 - Soluzione stock di prodotto *p*-nitrofenolo (stock-PNP) (5 mmol/l):
 - sciogliere 69,5 mg di PNP in 100 ml di acqua purificata, riscaldando la soluzione se necessario;
 - conservare a +4°C al buio in un flacone ricoperto di foglio di alluminio o di vetro marrone;
 - preparare una nuova soluzione standard ogni 3 mesi.
 - Preparare la soluzione di lavoro (200 $\mu\text{mol/l}$ standard di lavoro) per la curva standard (entro l'ultima ora di incubazione): mettere 400 μl di 5 mmol/l stock-PNP in un matraccio graduato da 10 ml e portare a 10 ml con il reagente colorato 2.
 - Diluire lo standard di lavoro di 200 $\mu\text{mol/l}$ con il reagente colorato 2 per ottenere quattro standard aggiuntivi di 160, 120, 80 e 40 $\mu\text{mol/l}$ PNP.

Tabella 3.7 Standard raccomandati per la valutazione dell'attività dell' α -glucosidasi

Concentrazione finale di PNP	Corrispondente all'attività del liquido seminale(mIU/ml)	Soluzione di lavoro 200 $\mu\text{mol/l}$ (μl)	Reagente colorato 2 (μl)
200 $\mu\text{mol/l}$ PNP	124	1.000	0
160 $\mu\text{mol/l}$ PNP	99	800	200
120 $\mu\text{mol/l}$ PNP	74	600	400
80 $\mu\text{mol/l}$ PNP	50	400	600
40 $\mu\text{mol/l}$ PNP	25	200	800
0 $\mu\text{mol/l}$ PNP	0	0	1.000

- Pool di controllo di qualità interno congelato di plasma seminale: vedere **Sezione 3.8.4, p. 135**.

3.8.3.4 Procedura

I passaggi 1-3 possono essere fatti in comune con le valutazioni dello zinco (**Sezione 3.8.1, p. 126**) e del fruttosio (**Sezione 3.8.2, p. 129**).

1. Centrifugare il campione di liquido seminale residuo dopo l'analisi per 10-15 minuti a 3.000 g. Decantare e conservare il plasma seminale senza spermatozoi a -20°C fino al momento dell'analisi. Il plasma seminale privo di spermatozoi può essere unito ad altri campioni per fornire un pool di controllo di qualità come standard interno per i test futuri.
2. Scongellare il plasma seminale privo di spermatozoi e mescolare bene in un mixer vortex. Scongellare anche un'aliquota di plasma seminale per il controllo di qualità interno.
3. Mescolare bene i campioni di plasma seminale in un mixer vortex.
4. Mettere aliquote di 15 µl di plasma seminale in ciascuna delle due vials da 1,5 ml usando una pipetta a spostamento positivo. Includere i bianchi di replicato (15 µl di acqua) e i campioni quadruplicati di controllo di qualità interno da 15 µl dai pool di plasma seminale.
5. A due dei campioni interni di controllo qualità aggiungere 8 µl di castanospermina 1 mmol/l per fornire il valore del bianco del plasma seminale.
6. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato PNPG, a circa 37°C, in ogni vial.
7. Miscelare con vortex ogni vial e incubare a 37°C per 2 ore (il controllo esatto della temperatura e del tempo sono fondamentali).
8. Fermare l'incubazione dopo 2 ore aggiungendo 1 ml di reagente di colorato 1 e miscelare.
9. Trasferire 250 µl di campioni e standard in una piastra a 96 pozzetti.
10. Leggere la piastra in un lettore di piastre a 96 pozzetti alla lunghezza d'onda di 405 nm entro 60 minuti, utilizzando l'acqua come bianco per impostare lo zero.

3.8.3.5 Calcolo

1. Leggere la concentrazione di PNP prodotta dal campione dalla curva standard (µmol/l) confrontando i valori di assorbanza.
2. I risultati al di sopra dello standard superiore non indicano un possibile disturbo clinico. I valori possono non essere esatti e possono essere riportati come > 124 mIU/ml, e un nuovo test non è solitamente necessario.
3. Moltiplicare per il fattore di correzione (0,6194) per ottenere l'attività della glucosidasi neutra nel plasma seminale non diluito (IU/l).
4. Sottrarre l'attività (IU/l) della castanospermina del bianco del plasma seminale da ogni campione per ottenere l'attività corretta (legata alla glucosidasi).
5. La differenza tra i replicati non dovrebbe essere superiore al 10% (cioè la differenza tra valori/media dei valori deve essere ≤10%). Se non concordano, ripetere

il dosaggio su due nuove aliquote se i due risultati divergenti indicano esiti diagnostici diversi.

6. Moltiplicare l'attività corretta per il volume totale del liquido seminale (ml) per ottenere l'attività della glucosidasi (mU) dell'eiaculato.



Nota: Un'unità internazionale (UI) di attività della glucosidasi è definita come la produzione di 1 μmol di prodotto (PNP) al minuto a 37°C. In questo test l'attività è derivata da 15 μl di plasma seminale in un volume totale di 1,115 ml per 120 minuti, quindi il fattore di correzione è $(1.115/15)/120 = 0,6194$.

3.8.3.6 Limiti di riferimento

Un limite di riferimento inferiore per l' α -glucosidasi neutra è di 20 mU/eiaculato [245 e dati non pubblicati da TG Cooper]. In un confronto tra 1.262 eiaculati post-vasectomia senza spermatozoi e 1.106 eiaculati con > 40 milioni di spermatozoi, il cut-off migliore è stato 23,1 mU/eiaculato [250]. Ci sono anche indicazioni che gli eiaculati post-vasectomia raccolti dopo un lungo periodo di astinenza eiaculatoria possono avere valori elevati di α -glucosidasi neutra, soprattutto quelli con un alto contenuto di zinco, indicando una possibile interazione dell' α -glucosidasi prostatica con il test [250].

3.8.4 Pool di plasma seminale per il controllo di qualità interno

Una componente necessaria delle valutazioni biochimiche del liquido seminale è l'uso sistematico di campioni IQC da eseguire in ogni lotto analitico. Il plasma seminale privo di spermatozoi ottenuto dopo la centrifugazione (3.000 g per 10-15 minuti) deve essere conservato a -20°C fino alla valutazione. I quantitativi residui di plasma seminale, dopo l'analisi, possono essere ricongelati e una o due volte all'anno utilizzati per fare un grande pool di plasma seminale misto che, dopo un'accurata miscelazione (agitatore magnetico, temperatura ambiente), viene diviso in aliquote in volumi sufficienti per le analisi biochimiche a batch. I campioni QC possono essere conservati a -20°C in vials ermetiche per un massimo di 12 mesi.

Un nuovo lotto di pool di plasma seminale viene eseguito in parallelo con i campioni QC in corso in diversi replicati in almeno tre test diversi per ogni analita. In questo modo viene valutata la variabilità intra- e inter-test e viene determinata la variabilità totale accettabile del nuovo lotto QC del plasma seminale.

3.9 Valutazione della sequenza dell'eiaculazione

La normale sequenza dell'eiaculazione è di importanza fisiologica per la funzione seminale e la normale capacità di fecondazione e sviluppo embrionale. Con sequenza normale si intende che la grande maggioranza degli spermatozoi viene espulsa nelle prime frazioni dell'eiaculato, insieme a una secrezione principalmente prostatica, mentre gli ultimi due terzi dell'eiaculato sono dominati dal liquido seminale vescicolare [251, 252]. È confermato che la motilità degli spermatozoi, la loro sopravvivenza e la stabilità della cromatina sono determinate dal contatto immediato con la secrezione prostatica, che è ricca di zinco, mentre avviene il contrario nel caso degli spermatozoi che vengono a contatto immediato con il liquido seminale vescicolare alcalino, che lega lo zinco [13, 253-257].

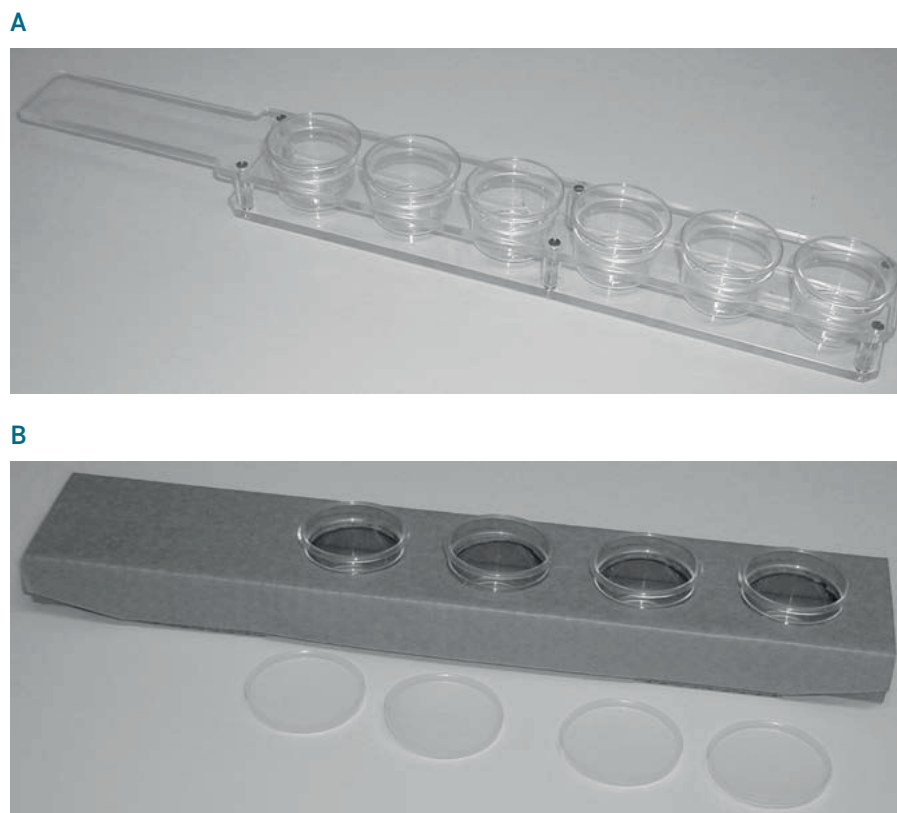
Processi infiammatori nella prostata o malformazioni congenite possono causare stenosi (od ostruzione del dotto eiaculatorio, EDO) in corrispondenza o in prossimità delle aperture dei dotti eiaculatori nell'uretra [258-265]. L'effetto di una stenosi consisterebbe in un ritardo dell'ingresso degli spermatozoi nell'uretra fino a quando la pressione della contrazione delle vescicole seminali costringe il contenuto del condotto eiaculatorio nell'uretra. Il risultato di laboratorio all'esame seminale di routine sarebbe principalmente una scarsa motilità. Nemmeno la valutazione biochimica dell'intero eiaculato potrebbe rivelare se gli spermatozoi hanno un'esposizione anomala al liquido vescicolare seminale. L'unico modo per diagnosticare l'EDO attraverso l'esame del liquido seminale è quello di raccogliere le singole frazioni di eiaculato ed esaminare il contenuto, la motilità e la composizione biochimica del liquido seminale (secrezioni prostatiche e vescicolari seminali, rispettivamente) [13].

Se viene diagnosticata una sequenza alterata di eiaculazione, esistono tecniche chirurgiche mini-invasive per trattare l'EDO [266-272]; può anche essere possibile ridurre l'influenza negativa del liquido seminale vescicolare lasciando che l'uomo raccolga l'intero eiaculato direttamente in un mezzo di lavaggio del liquido seminale.

3.9.1 Attrezzature - in aggiunta all'esame di routine dell'eiaculato

Questo include qualsiasi serie di dispositivi di raccolta dell'eiaculato che permette al paziente di raccogliere le frazioni di eiaculato nell'ordine in cui vengono espulse.

Figura 3.8 Due esempi di dispositivi di raccolta dell'eiaculato diviso



Riprodotta, con autorizzazione, da *A practical guide to practical laboratory andrology*, Cambridge University Press [273].

3.9.2 Procedure per i pazienti

Il paziente viene istruito a raccogliere le frazioni di eiaculato nell'ordine in cui vengono espulse, ordine confermato dal paziente quando i contenitori vengono presentati al laboratorio. I contenitori devono essere numerati in ordine sequenziale, oltre ad avere un'etichettatura di identificazione di routine.

3.9.3 Procedure di esempio

È probabile che la formazione di coaguli o gel si verifichi solo nelle frazioni dominate dalla secrezione vescicolare seminale. L'esame delle frazioni dominate dalla secrezione prostatica può iniziare dopo 5-10 minuti di regolazione della temperatura a 37°C (per la valutazione della motilità). Le frazioni con coagulo possono essere dissolte entro 30 minuti a 37°C. Le frazioni prive di proteasi di origine prostatica possono resistere alla liquefazione più a lungo.

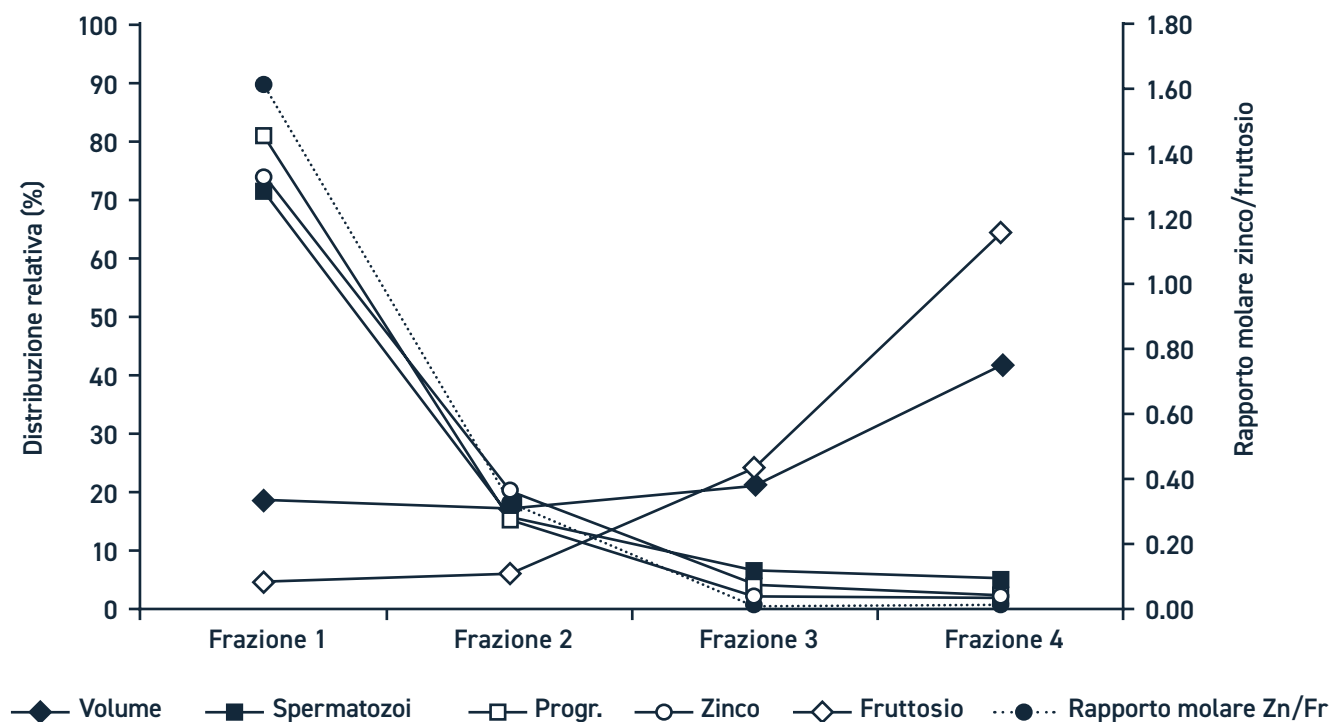
3.9.4 Esame

La valutazione del volume, della motilità e della conta degli spermatozoi, dello zinco (marcatore prostatico) e del fruttosio (marcatore delle vescicole seminali) viene fatta secondo l'esame di routine degli eiaculati interi.

3.9.5 Calcoli

Calcolare la distribuzione relativa del volume, degli spermatozoi, della percentuale di spermatozoi con motilità progressiva e dei marcatori biochimici. Calcolare prima i numeri totali in ogni frazione, poi la distribuzione relativa in ogni frazione (Figura 3.9).

Figura 3.9 Esempio di rappresentazione grafica dei risultati di un normale eiaculato diviso in quattro frazioni, che mostra la distribuzione del volume, degli spermatozoi, della motilità progressiva, dello zinco e del fruttosio



Riprodotta, con autorizzazione, da *A practical guide to practical laboratory andrology*, Cambridge University Press [273].

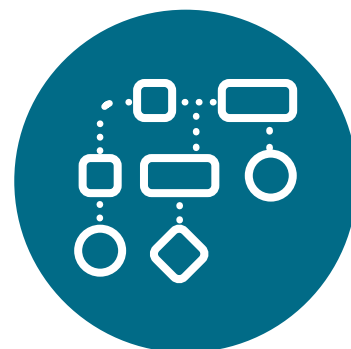
3.9.6 Interpretazione

La maggior parte degli spermatozoi dovrebbe trovarsi nel primo terzo dell'eiaculato, caratterizzato dalla secrezione prostatica ricca di zinco. La presenza di abbondante liquido seminale vescicolare nella frazione o nelle frazioni ricche di spermatozoi indica una condizione non fisiologica che probabilmente ostacola la capacità funzionale degli spermatozoi.

L'identificazione di una frazione di eiaculato con una buona motilità progressiva può essere utile per la futura selezione di spermatozoi per l'ART, un fatto descritto molto prima dell'era della FIVET [274].

Inoltre, per i laboratori che non sono in grado di determinare i marcatori zinco e fruttosio delle ghiandole accessorie, si possono ottenere informazioni utili valutando la distribuzione relativa degli spermatozoi e la loro motilità progressiva, per identificare possibili fonti di spermatozoi con una maggiore probabilità di successo di fecondazione.

Capitolo 4: Esami avanzati



4.1 Test dello stress ossidativo e delle specie reattive dell'ossigeno nel liquido seminale	140
4.2 Valutazione della reazione acrosomiale	144
4.3 Valutazione della cromatina nemaspermica.....	149
4.4 Flusso e trasporto degli ioni transmembrana negli spermatozoi	152
4.5 Analisi computerizzata del liquido seminale (CASA)	155
4.6 Tecnologie emergenti.....	159

L'infertilità maschile è spesso dovuta a una produzione insufficiente di spermatozoi, a una morfologia anormale di questi ultimi, a una loro alterata motilità oppure a una combinazione di queste cause. Queste alterazioni sono evidenziate nell'analisi del liquido seminale. Tuttavia, in molti pazienti, l'infertilità può essere dovuta a una disfunzione degli spermatozoi, laddove l'esame dell'eiaculato fornisce parametri che sembrano completamente normali. I meccanismi alla base della disfunzione degli spermatozoi non sono stati ancora del tutto chiariti. Gli spermatozoi umani devono compiere una serie di compiti impegnativi all'interno del tratto genitale femminile e devono percorrere distanze di diversi centimetri, dove potrebbero ricevere informazioni chimiche e fisiche per localizzare l'ovulo. Inoltre, gli spermatozoi devono subire l'esocitosi acrosomiale e la motilità iperattivata per poter attraversare gli involucri protettivi dell'ovulo. Gli spermatozoi acquisiscono la maggior parte di queste capacità solo all'interno del tratto genitale femminile, durante un processo di maturazione chiamato capacitazione. Sebbene siano essenziali per la fecondazione, nessuna di queste funzioni spermatiche è valutata in un classico esame del liquido seminale.



Per approfondire la conoscenza delle basi biologiche dell'infertilità maschile, è stata sviluppata una serie di test funzionali per valutare la competenza degli spermatozoi a compiere i processi fondamentali essenziali al concepimento.



Per colmare questa lacuna diagnostica, è necessario promuovere la conoscenza della fisiologia molecolare e cellulare dello spermatozoo. Inoltre, implementare al giorno d'oggi la ricerca nel campo dell'infertilità maschile è di fondamentale importanza, poiché la recente letteratura evidenzia che le alterazioni dei parametri seminali possono essere associate alla salute generale dell'individuo [275]. Inoltre, ci sono evidenze attuali secondo cui i contaminanti ambientali giocano un ruolo importante nell'infertilità maschile [276], così come nella documentata diminuzione del numero di spermatozoi osservata negli ultimi decenni [277]. È meno noto se le

funzioni del liquido seminale necessarie per la fecondazione siano anche uno specchio della salute generale e se siano influenzate da contaminanti ambientali. Man mano che la nostra conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano la funzione degli spermatozoi aumenta, aumentano anche le opportunità per lo sviluppo di nuovi test diagnostici. Per esempio, dati recenti sottolineano l'importanza della compattazione e dell'integrità del DNA nucleare nel determinare la competenza funzionale degli spermatozoi umani. Evidenze emergenti suggeriscono associazioni tra l'integrità del DNA e l'organizzazione della cromatina negli spermatozoi e la fertilità [278] (**Sezione 3.2, p. 86**).

Allo stesso modo, i progressi della nostra comprensione delle vie di trasduzione del segnale che regola la funzione spermatica avranno implicazioni per lo sviluppo di test diagnostici in grado di fornire informazioni dettagliate sull'esatta natura dei processi patologici negli spermatozoi di uomini infertili. Per approfondire la conoscenza delle basi biologiche dell'infertilità maschile è stata sviluppata una serie di test funzionali per valutare la competenza degli spermatozoi a compiere i processi fondamentali essenziali al concepimento, come il legame con la zona pellucida, l'esocitosi acrosomale e la fusione con la membrana vitellina dell'ovocita.

Alcuni test a scopo di ricerca richiedono che gli spermatozoi siano separati/selezionati dal liquido seminale. Tali procedure dovrebbero avvenire il prima possibile, al massimo entro 1 ora dall'eiaculazione, per limitare qualsiasi danno agli spermatozoi da parte di cellule non nemaspermiche. Inoltre, bisogna ricordare che il modo classico di raccogliere l'intero eiaculato in un contenitore porta a indagini di spermatozoi esposti ad ambienti non fisiologici come il liquido vescicolare seminale [251, 252] (vedere anche **Sezione 3.9, p. 135**).

4.1 Test dello stress ossidativo e delle specie reattive dell'ossigeno nel liquido seminale

4.1.1 Premessa

L'ipotesi che uno squilibrio nelle reazioni di riduzione-ossidazione (REDOX) nel tratto maschile o nelle secrezioni seminali possa essere dannoso per la fertilità è stata suggerita per decenni [279-283]. È generalmente accettato che le specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotte dai leucociti, siano alla base dei loro effetti deleteri quando sono presenti ad alto livello nel liquido seminale (**Sezione 3.4, p. 108**). Non ci sono ancora evidenze forti che dimostrino l'associazione fra le reazioni REDOX e gli esiti del concepimento naturale o assistito. Tuttavia, è generalmente accettato che lo stress ossidativo sia probabilmente un importante modulatore della funzione spermatica umana e dei risultati del concepimento [284]. Poiché una conseguenza dello stress ossidativo è il danno al DNA nemaspermico (**Sezione 3.2, p. 86**), questo è il risultato più spesso misurato, ma esistono diversi altri metodi di ricerca che possono essere utilizzati per esaminare più direttamente l'equilibrio di antiossidanti e ROS. Da un punto di vista clinico-diagnostico, quest'insieme di test dovrebbe essere usato e interpretato con cautela fino a quando non ci saranno evidenze maggiormente conclusive sulla sua rilevanza diagnostica. Le procedure qui presentate sono state ampiamente utilizzate nella ricerca andrologica, così come in alcuni laboratori di diagnostica andrologica clinica e riproduzione assistita. I test che possono essere utilizzati per valutare l'equilibrio REDOX o ROS variano sia nel metodo che nel tipo di ROS che rilevano.

4.1.2 Luminol

Questo metodo si basa sulla risposta chemiluminescente del luminol quando reagisce con un radicale libero. Questa risposta può essere misurata con la luminometria e il numero di unità di luce relativa (RLU) per milione di spermatozoi calcolato.

4.1.2.1 Procedura

Adattata da Dias, 2021 [285].

1. Preparare 100 mM di luminol (5-ammino-2,3-diidro-1,4-ftalazinedione) soluzione stock in 10 ml di dimetilsolfossido (DMSO) pesando 177,1 mg di luminol in una vial di polistirene. Avvolgere la vial in un foglio di alluminio, poiché questa soluzione è sensibile alla luce. La soluzione dovrebbe essere stabile a temperatura ambiente, ma può anche essere conservata in frigorifero.
2. Soluzioni "sonda" di lavoro: 5 mM di luminol in DMSO, per diluizione di 20 μ l di soluzione stock di luminol in 380 μ l di DMSO. Questa dovrebbe essere preparata immediatamente prima dell'uso (è stabile solo per 24 ore). Dev'essere protetta dalla luce.
3. L'eiaculato dovrebbe essere lasciato liquefare prima della misurazione (meno di 30 minuti ma, in conformità con i metodi di esame dell'eiaculato di base dell'OMS, non più di 1 ora).
4. Le misurazioni in luminometria dovrebbero essere eseguite in duplicato (come minimo).
 - Per ogni eiaculato si prepara una singola vial mescolando 390 μ l dell'eiaculato con 10 μ l della soluzione "sonda" di lavoro. Mescolare con il vortex per 5 secondi prima di dividere in aliquote in almeno due vials di misurazione (o pozzetti in una piastra).
5. In tutti i set di analisi dovrebbero esserci:
 - spazi vuoti di **DPBS, p. 228** o solo mezzo;
 - un controllo negativo di 390 μ l di DPBS o mezzo + 10 μ l di "sonda";
 - controlli positivi, entrambi con aggiunta di 50 μ l di perossido di idrogeno (30%) + 10 μ l di "sonda" di:
 - eiaculato (340 μ l) o
 - DPBS o mezzo (340 μ l).
6. I dati dovrebbero essere presi su un certo numero di letture, equamente distanziate e nell'ordine di ogni analita, uno per volta e poi ripetute, secondo il tipo di strumento, e ne andrebbe calcolata la media.
7. I controlli positivi possono essere utilizzati per valutare la sensibilità del test nell'impostazione specifica, tramite serie di diluizioni, e anche per confermare che in qualsiasi set di test avvenga il rilevamento di un risultato significativo.

8. I dati sono normalizzati sottraendo il risultato medio del campione dal controllo medio negativo. Questo può essere corretto per spermatozoo dividendo per la concentrazione di spermatozoi in milioni per ml, ma non è chiaro al momento se i risultati per spermatozoo abbiano più significato o meno che per campione, quindi entrambi i risultati potrebbero essere riportati.

4.1.2.2 Problemi

- I luminometri non sono generalmente accreditati per la diagnostica in vitro, essendo pensati solo per la ricerca.
- Il design degli strumenti (come il volume del campione) e quindi la calibrazione, la sensibilità, il range dinamico e anche le unità utilizzate variano molto.
- A causa della variazione descritta tra le macchine e le metodologie e della bassa qualità degli studi per la prognosi, non ci sono valori di riferimento concordati.
- Le forze di taglio/miscelazione cambiano il segnale, quindi i risultati sono molto sensibili alla manipolazione del campione e al momento della misurazione.
- Il luminol è sensibile al pH, ai cambiamenti di temperatura e all'interferenza delle sostanze chimiche che spesso variano tra gli eiaculati, come l'acido ascorbico (che diminuisce il segnale) o le molecole contenenti tioli (che aumentano i risultati) e i livelli di altre proteine presenti.

4.1.3 Potenziale di ossido-riduzione

Questo metodo si basa sulla misurazione diretta dell'equilibrio REDOX di un campione per via elettrochimica. Essendo una misura integrante del campione combinato che richiede una manipolazione minima, quindi abbastanza standardizzabile, è oggi argomento di molte ricerche nella subfertilità. Attualmente, esiste una sola macchina sul mercato ed è protetta da un brevetto. Utilizza sensori monouso per la misurazione. Nell'uso si dovrebbero seguire i più recenti protocolli del produttore, che non sono argomento di discussione in questo manuale.

4.1.3.1 Problemi

- Manca una forte base di evidenza pubblicata per il test; attualmente è ancora considerato un test di ricerca, fino a quando non emergeranno dati conclusivi relativi all'esito riproduttivo.
- La viscosità del campione e la scarsa fluidificazione possono ostacolare il flusso del campione e quindi il riempimento della camera di riferimento.
- Come per tutte le analisi del liquido seminale, il tempo di analisi dopo l'eiaculazione dovrebbe essere standardizzato.

4.1.4 Capacità antiossidante totale

Questa metodica è utilizzata per valutare la capacità totale dell'eiaculato di bilanciare qualsiasi stress ossidativo. Si tratta quindi di quantificare all'interno del plasma seminale la capacità degli enzimi e dei sistemi antiossidanti, così come qualsiasi

antiossidante derivato da cibo o altro che finisce nel plasma seminale (ma non negli spermatozoi; questi vengono rimossi per centrifugazione). Nel test, gli antiossidanti presenti inibiscono l'ossidazione dell'acido 2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin solfonico) (ABTS) da parte di un radicale cationico. Questo è stato sviluppato per essere usato, ed è effettivamente usato, in molti fluidi corporei, e non è quindi specifico per il plasma seminale [286]. Trolox, un analogo della vitamina E (tocoferolo), è usato per creare un intervallo standard, quindi il test è solitamente espresso come micromoli di Trolox equivalenti. Il test viene letto con metodo colorimetrico; è perciò necessario un analizzatore appropriato.

4.1.4.1 Procedura

1. A causa del suo ampio utilizzo al di là della fertilità, il test è disponibile come kit confezionato da un certo numero di produttori. Si devono quindi seguire le istruzioni relative a ciascun kit. È anche possibile costruire i kit a partire dagli ingredienti costitutivi acquistati separatamente.
2. L'eiaculato deve essere lasciato fluidificare completamente e poi centrifugato a 1.000 g per 15 minuti. Il plasma seminale centrifugato può quindi essere rimosso. 10 µl di questo plasma possono essere controllati per confermare l'assenza di spermatozoi. Se fossero presenti ancora degli spermatozoi, è necessario centrifugare nuovamente.
3. Il plasma seminale centrifugato può essere diviso in aliquote e subito dopo congelato per analisi successive. Questo può essere vantaggioso per consentire il raggruppamento in lotti del test. La stabilità dei risultati a qualsiasi temperatura di congelamento dovrebbe essere controllata e convalidata dal laboratorio che esegue il test.
4. Nella preparazione del test per le misurazioni, tutti i componenti dovrebbero essere portati prima a temperatura ambiente. I componenti del test sono tutti sensibili alla luce, quindi la luce dovrebbe essere ridotta il più possibile – per esempio, spegnendo le luci del laboratorio – mentre il test viene preparato ed eseguito.
5. Le misurazioni dovrebbero essere eseguite in duplicato (come minimo). L'assorbimento viene letto a 750 nm.

4.1.4.2 Problemi

- Esiste un'ampia letteratura, solida e chiaramente definita, per la procedura del test e degli agenti che possono influenzare i risultati nei vari sistemi [287], ma attualmente questo test – per trarre una conclusione medica sui parametri del liquido seminale maschile e sugli effetti dei ROS sulla fertilità – è ancora considerato come un test di ricerca, e sarà così fino a quando non emergeranno dati conclusivi relativi al risultato riproduttivo.
- A causa della variazione tra gli strumenti e le metodologie e della bassa qualità delle evidenze per la prognosi, non ci sono valori di riferimento basati sulle evidenze.
- Idealmente, il test viene letto in un lettore di micropiastre a causa del numero di duplicati e standard.

4.2 Valutazione della reazione acrosomiale

4.2.1 Premessa

L'integrità dell'acrosoma, nella sua struttura, e la capacità di effettuare l'esocitosi acrosomiale sono necessarie per la normale fertilità. La reazione acrosomiale è un processo che, *in vivo*, avviene in prossimità dell'ovocita e deve avvenire prima che lo spermatozoo possa penetrare gli involucri dell'ovocita e fondersi con questo. Si ritiene che l'afflusso di calcio sia un evento iniziale nella normale reazione dell'acrosoma. Nei casi di teratozoospermia e oligozoospermia, alcuni pazienti possono avere risultati normali all'esame dell'eiaculato, ma gli spermatozoi possono mostrare alterazioni nella struttura acrosomiale o nella capacità di rispondere agli stimoli della reazione acrosomiale [288].

Diversi stimoli sono noti per indurre la reazione acrosomiale. Tra questi, le proteine della zona pellucida [289] e il progesterone [290] sono considerati possibili induttori fisiologici della reazione acrosomiale in considerazione della loro elevata concentrazione in prossimità dell'ovocita. Altri stimoli, come gli ionofori di calcio, indurranno la reazione acrosomiale, ma i risultati non sono correlati, o lo sono meno, a quelli ottenuti dalla reazione acrosomiale indotta dalla zona pellucida [291]. Una recente meta-analisi [288] ha dimostrato una correlazione significativa tra la percentuale di spermatozoi con avvenuta reazione acrosomiale, dopo l'induzione con stimoli, e il tasso di fertilizzazione degli ovociti. Lo stato dell'acrosoma, dopo l'induzione della reazione acrosomiale, può essere valutato mediante microscopia o citometria a flusso [292] con lectine marcate con fluorescenza, come agglutinina di *Pisum sativum* (pisello) (Sezione 4.4.1, p. 152) o lectina di *Arachis hypogaea* (arachide), oppure anticorpi monoclonali contro l'antigene acrosomiale CD46 [293]. Indurre l'afflusso di calcio utilizzando un induttore della reazione acrosomiale è un modo per testare la competenza degli spermatozoi capacitati a subire la reazione acrosomiale [294, 295]. Tuttavia, sono necessarie ulteriori valutazioni e convalide prima che il test dello stato dell'acrosoma possa essere considerato un test clinico di routine.

Qui saranno descritte le procedure per la valutazione statica dell'acrosoma e la reazione acrosomica dinamica e indotta.

4.2.2 Valutazione dello status acrosomiale

4.2.2.1 Procedura

Il metodo è stato originariamente sviluppato da Cross [296], ed è basato sullo studio di Mortimer et al. [297], che ha dimostrato che l'agglutinina di *Arachis hypogaea* (arachide) (FITC-PNA) si lega alla membrana acrosomiale esterna degli spermatozoi. Il metodo è stato successivamente modificato da Aitken [294] introducendo il reagente di rigonfiamento ipo-osmotico (Sezione 2.5.13.2, p. 69) per valutare la reazione acrosomiale solo in spermatozoi vivi. La procedura è semplice e riproducibile e genera immagini molto chiare (Figura 4.1, p. 147). È preferibile utilizzare una preparazione di spermatozoi altamente mobili priva di contaminanti come leucociti, cellule germinali e spermatozoi morti. Quindi, a seconda della qualità del campione e del protocollo di studio da seguire, il campione dev'essere lavato (Sezione 5.3, p. 164) oppure devono essere fatte preparazioni swim-up o a gradiente di densità (Sezione 5.4, p. 165 e Sezione 5.5, p. 166).

4.2.2.2 Reagenti

- Agglutinina di *Pisum sativum* (PSA) marcata con isotiocianato di fluoresceina (FITC) (PSA-FITC).
- Lectina agglutinata di *Arachis hypogaea* (arachide) marcata con isotiocianato di fluoresceina (FITC) (AHLPCA-FITC).
- **DPBS, p. 228**, pH 7,4.
- 0,9% (9 g/l) NaCl: sciogliere 0,9 g di NaCl in 100 ml di acqua purificata.
- 95% (v/v) etanolo.
- Soluzione stock di PSA e AHLPCA: diluire 2 mg di PSA-FITC o AHLPCA-FITC in 4 ml di DPBS e conservare in aliquote da 0,5 ml a -20°C.
- Soluzione di lavoro PSA: diluire 0,5 ml di soluzione stock di PSA in 10 ml di DPBS e conservare a 4°C. Questa soluzione è stabile fino a 4 settimane.

4.2.2.3 Lavaggio semplice degli spermatozoi

1. Mescolare bene il campione seminale e prelevare un'aliquota di circa 0,2 ml.
2. Diluire a 10 ml con una soluzione salina allo 0,9% (9 g/l).
3. Centrifugare a 800 g per 10 minuti.
4. Rimuovere e scartare tutto il surnatante tranne 20-40 µl.
5. Risospendere il pellet di spermatozoi nel surnatante rimanente pipettando delicatamente.
6. Ripetere la procedura di lavaggio.

4.2.2.4 Preparazione del liquido seminale trattato

1. Diluire lo swim-up (**Sezione 5.4, p. 165**) o le preparazioni a gradiente di densità lavate una volta (**Sezione 5.5, p. 166**) a 10 ml con tampone per ottenere una concentrazione di 10 milioni/ml.
2. Centrifugare a 800 g per 10 minuti.
3. Rimuovere e scartare tutto il surnatante tranne 20-40 µl.
4. Risospendere il pellet di spermatozoi in un tampone di rigonfiamento ipo-osmotico per 30 minuti.
5. Centrifugare a 800 g per 10 minuti.
6. Eliminare e scartare il surnatante e risospendere in un piccolo volume di tampone con una delicata pipettatura.

4.2.2.5 Allestimento di uno striscio

1. Preparare strisci replicati di liquido seminale lunghi circa 1 cm da circa 5 µl di sospensione.
2. Valutare gli strisci ancora umidi al microscopio a contrasto di fase (400x).
3. Assicurarsi che gli spermatozoi siano distribuiti uniformemente sui vetrini senza sovrapposizioni.
4. Lasciare asciugare i vetrini all'aria.
5. Fissare in etanolo 95% (v/v) per 30 minuti.
6. Lasciare asciugare all'aria.

4.2.2.6 Colorazione con PSA-FITC

1. Versare 10 ml di soluzione di lavoro PSA-FITC o AHL-FITC in una vaschetta di colorazione verticale.
2. Immergere i vetrini fissati e asciugati all'aria nella colorazione PSA-FITC.
3. Lasciare colorare per più di 1 ora a 4°C. Tempi di colorazione più lunghi – fino a 18 ore – non influiscono sui risultati del PSA. Tempi più brevi – meno di 1 ora – rendono difficile l'analisi del vetrino.
4. Lavare ogni vetrino con acqua purificata e montare in un mezzo solubile in acqua (**Sezione 2.4.9.5, p. 48**).

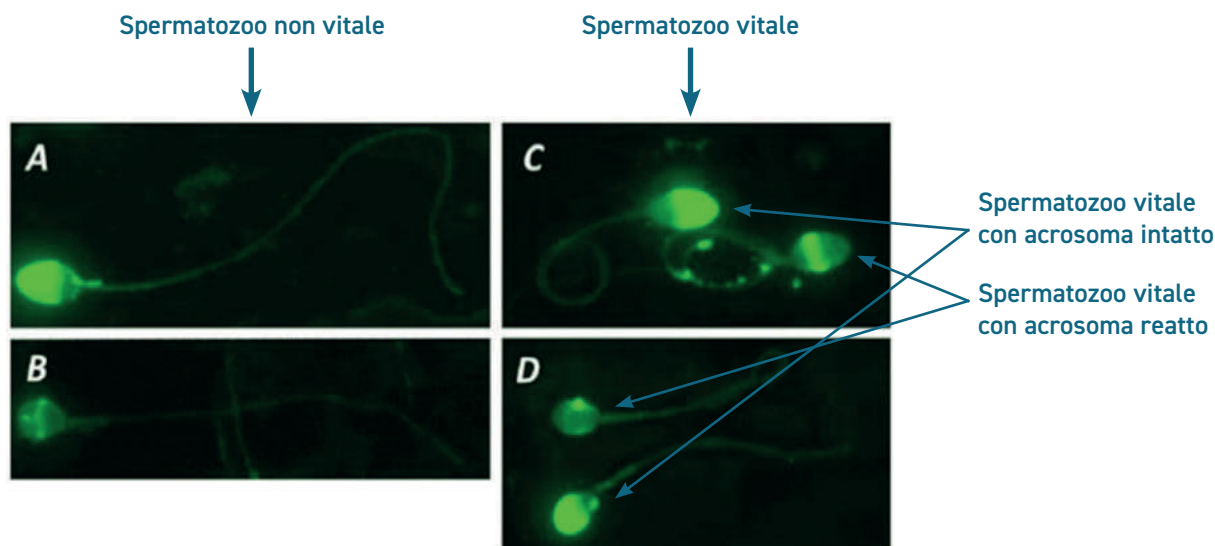
4.2.2.7 Valutazione

Visualizzare il vetrino con microscopia a fluorescenza a ingrandimento 1.000x a immersione a olio con filtro di eccitazione di 450-490 nm e obiettivo dicroico con combinazione di filtri adatti per l'osservazione del picco di emissione a 519 nm.

Valutare gli spermatozoi come segue:

- vivi con acrosoma intatto: spermatozoi con coda arricciata in cui più della metà della testa è brillante e uniformemente fluorescente (**Figura 4.1**);
- vivi con reazione acrosomiale avvenuta: spermatozoi con coda arricciata che mostrano solo una banda fluorescente nel segmento equatoriale o nessuna colorazione fluorescente nella regione dell'acrosoma (**Figura 4.1**).
- Di solito gli spermatozoi morti non vengono conteggiati in questo test, ma valutare contestualmente la percentuale di cellule morte può consentire la risoluzione di eventuali errori di conteggio/elaborazione tra gli operatori che eseguono il test. La percentuale di cellule morte non dovrebbe essere significativamente diversa dalla valutazione iniziale.

Figura 4.1 Esempi di spermatozoi vitali e non vitali colorati con FITC-PNA, con acrosoma intatto e con acrosoma reatto



Vengono mostrati spermatozoi con acrosoma intatto, con teste prossimali colorate (acrosoma), e spermatozoi con acrosoma reatto, con bande equatoriali o regioni post-acrosomali colorate. Le code arricciate indicano la vitalità dello spermatozoo dopo la procedura HOS (vedere anche [Sezione 2.5.13.2, p. 69](#)).

4.2.2.8 Valutazione degli spermatozoi con acrosoma reatto

1. Contare il numero in ogni categoria acrosomiale (acrosoma intatto e acrosoma reatto) con l'aiuto di un contacellule da laboratorio.
2. Valutare 200 spermatozoi in ogni replicato, per ottenere un errore di campionamento accettabilmente basso.
 - Calcolare la media e la differenza delle due percentuali di spermatozoi reatti dai vetrini replicati.
 - Determinare l'accettabilità della differenza dalla [Tabella 2.3, p. 33](#) (la differenza massima tra due conteggi attesa nel 95% dei campioni a causa del solo errore di campionamento).
 - Se la differenza tra le percentuali è accettabile, riportare la percentuale media di spermatozoi con acrosoma reatto. Se la differenza è troppo alta, rivalutare i due vetrini.
 - Riportare la percentuale di spermatozoi reatti arrotondando al numero intero più vicino.

4.2.3 Test di reazione acrosomiale indotta

La reazione acrosomiale può essere indotta utilizzando ionofori (Acrosome Reaction following Ionophore Challenge, ARIC) [298] o usando il progesterone (Acrosome Reaction following Progesterone Challenge, ARPC) [290] o altri stimoli.

4.2.3.1 Reagenti

- Soluzione salina bilanciata di Earle integrata (sEBSS; vedere **Sezione 8.4, p. 226**) contenente il 3,0% (30 g/l) di BSA.
Nota: Se si intraprende l'induzione con progesterone, il siero delipidato/rimosso con carbone dovrebbe essere usato per evitare gli effetti della contaminazione di altre molecole liposolubili (incluso l'ormone).
- Dimetil solfossido (DMSO).
- Ionoforo A23187, soluzione stock 1 mmol/l: sciogliere 5,23 mg di A23187 in 10 ml di DMSO, progesterone 2-10 µg/ml [299] o altri induttori di reazione acrosomiale [288].
Nota: Possono esistere requisiti legali riguardanti le precauzioni di sicurezza, e i rischi dovrebbero essere attentamente valutati prima di usare lo ionoforo.
- 70% (v/v) di etanolo.

4.2.3.2 Procedura

1. Attendere 30-60 minuti per la completa fluidificazione del liquido seminale fresco.
2. Preparare per ogni test il mezzo di induzione della capacitazione sEBSS fresco.
3. Riscaldare il mezzo a 37°C prima dell'uso, preferibilmente in un ambiente con 5% (v/v) di CO₂ in un incubatore ad aria.
4. Preparare una popolazione di spermatozoi altamente mobili, liberi da contaminanti come leucociti, cellule germinali e spermatozoi morti, mediante centrifugazione in gradiente di densità (DGC) (**Sezione 5.5, p. 166**) o swim-up utilizzando un mezzo sEBSS fresco.
5. Preparare le vials dei controlli e dei replicati, ciascuna contenente circa 1 ml di sospensione con 1×10⁶ di spermatozoi mobili.
6. Incubare le sospensioni di spermatozoi per 3 ore a 37°C in un'atmosfera di 5% (v/v) di CO₂ in aria per indurre la capacitazione (allentare il tappo della vial per consentire lo scambio di gas). Se non è disponibile un incubatore con CO₂, utilizzare un terreno di coltura tamponato con HEPES (**Sezione 8.4, p. 226**),appare bene le vials e incubare a 37°C in aria.
7. Aggiungere 10 µl di soluzione stock di A23187 (1 mmol/l) alle vials dei campioni e dei replicati per ottenere una concentrazione finale di 10 µmol/l.
8. Aggiungere 10 µl di DMSO alla vial di controllo.
9. Incubare tutte le vials a 37°C per 15 minuti.
10. Prelevare una piccola aliquota da ogni vial per la determinazione della motilità.
11. Passi successivi su come preparare gli spermatozoi (**Sezione 4.2.2.4, p. 145**).

Procedura (**Sezioni 4.2.2.5 e 4.2.2.6, p. 146**), valutazione (**Sezione 4.2.2.7, p. 146**) e conta (**Sezione 4.2.2.8, p. 147**) sono descritte alle rispettive pagine.

4.2.3.3 Controllo di qualità

- Un campione di controllo positivo (liquido seminale di un uomo i cui spermatozoi hanno precedentemente risposto bene allo ionoforo o al progesterone) dovrebbe essere disponibile ogni volta che il test viene eseguito.
- Ogni volta che viene preparato un nuovo lotto di colorante, eseguire un test di crossover con il vecchio colorante, utilizzando – come controllo positivo – spermatozoi con una risposta nota, per garantire che il colorante sia stato realizzato correttamente.

4.3 Valutazione della cromatina nemaspermica

4.3.1 Premessa

La stabilità della struttura della cromatina nemaspermica è di fondamentale importanza per lo sviluppo e la qualità dell'embrione, probabilmente a causa della protezione e della rapida disponibilità del genoma paterno [300]. L'insulto alla stabilità della cromatina spermatica è associato a un minor tasso di fertilizzazione nella riproduzione assistita [301]. Anomalie nella struttura della cromatina spermatica possono causare danni al DNA dello spermatozoo, come rotture di doppi o singoli filamenti di DNA, a causa di una compattazione difettosa (cioè anomalie nella sostituzione degli istoni con le protamine) del DNA. La normalità della cromatina degli spermatozoi può essere analizzata sia attraverso la valutazione delle rotture del filamento di DNA (**Sezione 3.2, p. 86**) sia mediante coloranti che si legano agli istoni (blu di anilina) o all'acido nucleico (cromomicina A3) e vengono valutati istologicamente o mediante citometria a flusso.

4.3.2 Valutazione del blu di anilina

Il blu di anilina (AB) si lega ai residui di lisina degli istoni. La percentuale di spermatozoi colorati con AB può essere valutata sia nel liquido seminale intero che in spermatozoi selezionati (swim-up o preparato a gradiente di densità; vedere **Sezione 5.5, p. 166**).

4.3.2.1 Protocollo

Reagenti

- Dissolvere polvere AB in acqua contenente il 4% di acido acetico glaciale (pH 3,5) alla concentrazione finale del 5%.

Procedura

1. Prelevare 1×10^6 spermatozoi (non meno di 200.000 spermatozoi, nel caso in cui 1 milione non sia disponibile).
2. In caso di liquido seminale intero, lavare due volte gli spermatozoi in un qualsiasi terreno di coltura adatto agli spermatozoi (**Sezione 5.3, p. 164**) (centrifugare a 500 g per 5 minuti a temperatura ambiente). In caso di spermatozoi selezionati, centrifugare una volta a 500 g per 5 minuti.
3. Rimuovere il surnatante e fissare il pellet in 50 μ l di paraformaldeide al 4% (concentrazione finale: 200.000 spermatozoi/10 μ l) per 30 minuti a temperatura ambiente.

4. Mettere una goccia da 10 µl del campione e lasciare asciugare all'aria.
5. Immergere il vetrino nella soluzione AB per 7 minuti a temperatura ambiente.
6. Lavare il vetrino due volte in acqua per eliminare il colorante in eccesso.
7. Lasciare asciugare il vetrino all'aria.
8. Valutare al microscopio ottico, con immersione a olio (obiettivo 100x e ingrandimento oculare 10-12,5x). Si dovrebbero conteggiare almeno 200 spermatozoi.

Figura 4.2 Esempio di spermatozoi AB-positivi (a) e AB-negativi (b) al microscopio ottico (1.000x, immersione a olio)



Tratto da Marchiani et al., 2017 [302].

4.3.2.2 Problemi

- Il conteggio può essere difficile in alcuni casi. In particolare, si possono incontrare difficoltà in caso di agglutinazione degli spermatozoi.
- Il conteggio è operatore-dipendente.

4.3.3 Valutazione della cromomicina A3

La cromomicina A3 (CMA3) compete con le protamine per legarsi al solco minore dell'elica del DNA. La percentuale di spermatozoi colorati con CMA3 può essere valutata sia nel liquido seminale intero che negli spermatozoi selezionati per swim-up.

4.3.3.1 Protocollo

Reagenti

1. Preparare la soluzione stock di CMA3.

- Preparare il tampone Mcllvaine (20 ml da conservare a temperatura ambiente):
 - aggiungere 16,47 ml di una soluzione di Na_2HPO_4 a 0,2 M e 3,53 ml di una soluzione di acido citrico 0,1 M10;
 - aggiungere MgCl_2 per raggiungere una concentrazione finale di 10 mM. Il pH dovrebbe essere 7,0.
- Sciogliere 5 mg di polvere di CMA3 in 10 ml di tampone Mcllvaine per ottenere una soluzione stock 2×. Le aliquote della soluzione stock di CMA3 possono essere conservate a -20°C.

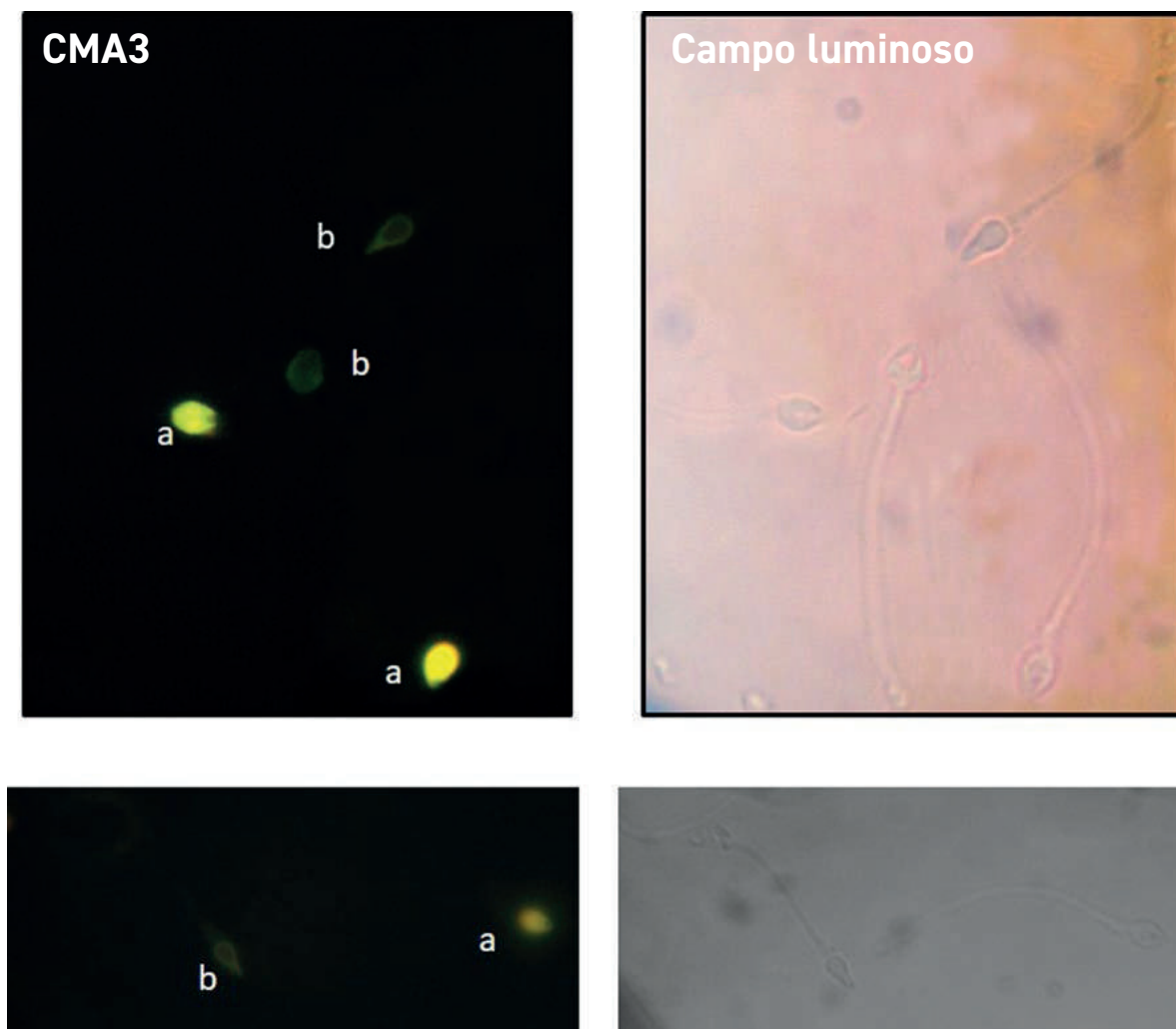
2. Al momento dell'uso, diluire le aliquote di spermatozoi 1 : 1 in tampone Mcllvaine per ottenere una concentrazione finale di CMA3 di 0,25 mg/ml.

Procedura

1. Prendere 1×10^6 spermatozoi (non meno di 400.000 spermatozoi, nel caso in cui 1 milione non sia disponibile).

- In caso di liquido seminale intero, lavare due volte gli spermatozoi in un qualsiasi terreno di coltura nemaspermica (**Sezione 5.3, p. 164**) e centrifugare a 500 g per 5 minuti a temperatura ambiente.
 - In caso di spermatozoi selezionati, centrifugare una volta a 500 g per 5 minuti.
2. Rimuovere il surnatante e fissare il pellet in 50 μl di paraformaldeide al 4% (concentrazione finale: 400.000 spermatozoi/10 μl) per 30 minuti a temperatura ambiente.
 3. Prelevare 20 μl di campione e centrifugare a 300 g per 7 minuti a temperatura ambiente.
 4. Rimuovere il surnatante e lavare una volta in **DPBS, p. 228** centrifugando a 300 g per 7 minuti a temperatura ambiente.
 5. Rimuovere il surnatante, aggiungere 100 μl di soluzione di CMA3 (0,25 mg/ml) e incubare per 20 minuti a temperatura ambiente.
 6. Aggiungere 200 μl di tampone Mcllvaine e centrifugare a 300 g per 7 minuti a temperatura ambiente.
 7. Scartare il surnatante, risospendere il pellet in 10 μl di tampone Mcllvaine e posizionarlo su un vetrino.
 8. Lasciare asciugare la goccia all'aria, aggiungere una goccia di DPBS e posizionare sopra un vetrino coprioggetto.
 9. Leggere con ingrandimento 1.000× (immersione in olio) con un microscopio a fluorescenza (lunghezza d'onda di eccitazione: 445 nm; lunghezza d'onda di emissione: 575 nm). Si dovrebbero conteggiare almeno 200 spermatozoi.

Figura 4.3 Esempi di spermatozoi CMA3-positivi (a) e CMA3-negativi (b) (riquadro di sinistra)



Nel riquadro di destra (campo luminoso) è possibile visualizzare la presenza di spermatozoi CMA3-negativi nello stesso campo. Adattato da Marchiani et al., 2014 [303].

4.3.3.2 Problemi

- Il conteggio può essere difficile in alcuni casi. In particolare, si possono incontrare difficoltà in caso di agglutinazione degli spermatozoi o con un fondo fluorescente.
- Il conteggio è operatore-dipendente.

4.4 Flusso e trasporto degli ioni transmembrana negli spermatozoi

4.4.1 Premessa

L'analisi funzionale del flusso e del trasporto degli ioni transmembrana negli spermatozoi può essere una via da percorrere nella ricerca di strumenti diagnostici per comprendere meglio l'infertilità maschile e i disturbi degli organi riproduttivi maschili. Il movimento orientato, la capacitazione, l'iperattivazione e l'esocitosi acro-

somiale sono orchestrati da cambiamenti nel pH intracellulare (pH_i), tensione di membrana (V_m) e concentrazione intracellulare di Ca^{2+} . Questi segnali cellulari sono mediati da canali ionici, scambiatori e trasportatori unici e per lo più specifici per gli spermatozoi, per esempio i canali CatSper Ca^{2+} , i canali Slo3 K^+ , i canali H_v1 H^+ , gli scambiatori Na^+/H^+ (sNHE, NHA1, NHA2), le ATPasi Ca^{2+} (PMCA4) e i trasportatori Mg^{2+} (CNNM2, CNNM4). Molti casi di disfunzione spermatica inspiegabile potrebbero essere dovuti al malfunzionamento di uno di questi canali. A sostegno di quest'ipotesi, aberrazioni genetiche che interessano i geni CatSper, la funzione o l'espressione difettosa di CatSper e la funzione difettosa dei canali K^+ sono state associate all'infertilità maschile [304]. Finora mancano procedure diagnostiche di routine per valutare la funzione dei canali ionici, degli scambiatori e dei trasportatori negli spermatozoi. Tuttavia, sono stati sviluppati protocolli di ricerca per indagare (in maniera non ancora del tutto efficiente) l'attività dei canali ionici negli spermatozoi dei pazienti nel quadro degli studi clinici.

4.4.2 Elettrofisiologia e fluorimetria cinetica del Ca^{2+} per valutare la funzione di CatSper

Il canale CatSper, specifico per lo spermatozoo e attivato dal progesterone, controlla l'afflusso di Ca^{2+} nel flagello, influenzando così il movimento flagellare. La perdita della funzione CatSper è associata all'infertilità maschile e al fallimento della FIVET [304-307], e questo suggerisce che gli spermatozoi disfunzionali di CatSper possono fecondare solo attraverso le procedure ICSI.

La funzione di CatSper negli spermatozoi umani può essere studiata rispettivamente tramite elettrofisiologia e fluorimetria cinetica del Ca^{2+} . Gli spermatozoi mobili vengono selezionati con la procedura di swim-up o DGC. RegISTRAZIONI elettrofisiologiche di correnti CatSper da spermatozoi umani vengono eseguite in soluzioni prive di ioni divalenti nelle cellule intatte, con l'elettrodo di vetro posizionato nella gocciolina citoplasmatica o nella regione del collo. Una volta stabilito un valore di gigaohm (una misura della resistenza elettrica, $\text{G}\Omega$) per la cellula integra, le correnti monovalenti CatSper tipiche possono essere generate dalla depolarizzazione della tensione di membrana. La mancanza di attenuazione significativa di queste correnti indica la disfunzione di CatSper.

Per la fluorimetria del Ca^{2+} , gli spermatozoi in sospensione vengono addizionati con un colorante indicatore di Ca^{2+} fluorescente (per esempio, Fura-2 o Fluo-4). Per rimuovere l'eccesso di indicatore extracellulare dopo l'aggiunta, gli spermatozoi vengono sedimentati per centrifugazione e risospesi in tampone fresco e il $[\text{Ca}^{2+}]_i$ degli spermatozoi in sospensione viene monitorato attraverso l'emissione di fluorescenza degli indicatori, per esempio, in piastre da microtitolazione o in una cuvetta utilizzando un lettore di piastre a fluorescenza o uno spettrometro, rispettivamente. La fluorescenza emessa dall'indicatore Ca^{2+} viene registrata prima e dopo l'iniezione di un agonista CatSper (per esempio, progesterone, prostaglandine), del tampone (controllo negativo) e dello ionoforo Ca^{2+} ionomicina (controllo positivo) nei pozzetti o nella cuvetta. Il fallimento dell'agonista o degli agonisti di CatSper, ma non della ionomicina, per aumentare la fluorescenza, cioè $[\text{Ca}^{2+}]_i$, è indicativo di una perdita della funzione CatSper. Solo recentemente, questa tecnica ha identificato due pazienti infertili che soffrono di una perdita di funzione di CatSper. La diagnostica genetica ha rivelato che la perdita di funzione di CatSper e, quindi, l'infertilità era dovuta a un'aberrazione genetica del gene CatSper. Da notare che anche l'imaging $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a singolo spermatozoo è stato utilizzato per studiare il CatSper nei nemaspermi per ottenere informazioni sui singoli spermatozoi, per esempio, la frazione di cellule reattive e la presenza di sottopopolazioni. Questa scoperta ha rivelato che una ridotta sensibilità al progesterone è comune nei pazienti subfertili e si correla con il tasso di fecondazione [308].

4.4.3 Metodi elettrofisiologici e fluorimetrici per studiare la funzione dei canali K^+

La funzione dei canali K^+ , cioè Slo3, negli spermatozoi umani può essere studiata con un'attendibilità medio-bassa tramite registrazioni patch-clamp a cellule intere e fluorimetria V_m . Slo3 rappresenta il principale canale K^+ negli spermatozoi umani. È attivato dal Ca^{2+} e, quindi, imposta il potenziale di membrana degli spermatozoi umani in una modalità $[Ca^{2+}]_i$ -dipendente.

Nelle registrazioni elettrofisiologiche delle cellule intere, utilizzando soluzioni extracellulari contenenti ioni divalenti per sopprimere le correnti CatSper e una pipetta con una soluzione a base di K^+ , le correnti prototipiche Slo3 possono essere evocate dalla depolarizzazione della tensione di membrana. Questo approccio ha portato alla scoperta di diversi pazienti con un'attività anomala dei canali K^+ e un potenziale di membrana a riposo depolarizzato, nonché un basso tasso di fecondazione nella FIVET.

Un approccio di screening per valutare l'attività del canale K^+ negli spermatozoi si basa su indicatori fluorescenti sensibili al voltaggio. Questi indicatori riportano i cambiamenti di V_m come cambiamenti nella loro emissione di fluorescenza, per esempio, attraverso una ridistribuzione dipendente da V_m tra il mezzo extracellulare e il citoplasma. Per lo screening, gli spermatozoi – purificati o diluiti dall'eiaculato – vengono incubati con l'indicatore per alcuni minuti. In seguito, la fluorescenza viene registrata sia in pool di piastre da microtitolazione sia in una cuvetta usando un lettore di piastre a fluorescenza o uno spettrometro, rispettivamente, oppure a livello di singola cellula usando la citometria a flusso. Successivamente, gli spermatozoi vengono testati con il K^+ ionoforo valinomicina e con soluzioni contenenti diverse concentrazioni di K^+ . La valinomicina imposta il potenziale di membrana al rispettivo potenziale di K^+ -Nernst. In questo modo, la fluorescenza può essere convertita in valori V_m , permettendo la quantificazione del potenziale di membrana a riposo dello spermatozoo (V_{rest}), soprannominata calibrazione del punto nullo K^+ . Diversi studi che hanno utilizzato quest'approccio per determinare V_{rest} e, quindi, indirettamente l'attività dei canali K^+ negli spermatozoi hanno suggerito una relazione tra V_{rest} e il tasso di fecondazione nella FIVET.

4.4.4 Metodi per rilevare il (mal)funzionamento di trasportatori e scambiatori di ioni

Finora, non ci sono tecniche per valutare con attendibilità ragionevole l'attività degli scambiatori e dei trasportatori di ioni negli spermatozoi umani. Pertanto, il loro ruolo nella disfunzione nemaspermica rimane da indagare.

4.4.5 Riassunto

Nell'ultimo decennio, tecnologie nuove ed emergenti hanno dimostrato che la funzione degli spermatozoi – e quindi la fecondazione – è orchestrata da un insieme unico di canali ionici, trasportatori e scambiatori per lo più specifici per gli spermatozoi. Tuttavia, le disfunzioni di queste componenti di segnalazione chiave non possono essere rilevate da un'analisi seminale di routine. Per la maggior parte di queste proteine mancano test funzionali e le tecniche attuali per valutare la funzione di CatSper o Slo3 sono troppo impegnative per essere implementate nel laboratorio clinico. Quindi, per ottenere ulteriori informazioni sui meccanismi patologici alla base della disfunzione spermatica, è necessario un insieme di test nuovi, facili da usare e adatti a una perfetta integrazione nel quadro dell'attuale analisi del liquido seminale.

4.5 Analisi computerizzata del liquido seminale (CASA)

4.5.1 Utilizzo del CASA per valutare la motilità degli spermatozoi

4.5.1.1 Premessa

I sistemi CASA sono i più utilizzati per l'analisi della cinetica degli spermatozoi, poiché possono rilevare e analizzare le cellule mobili. Le stime della percentuale di motilità possono essere però inaffidabili, poiché dipendono dalla determinazione del numero di spermatozoi immobili e dal fatto che i detriti possono essere confusi con questi ultimi.

Molti fattori influenzano le prestazioni degli strumenti CASA, per esempio, la preparazione del campione, la frequenza dei fotogrammi, la concentrazione degli spermatozoi e la profondità della camera di conteggio [45, 46, 136, 309, 310]. Tuttavia, è possibile ottenere risultati affidabili e riproducibili se si seguono procedure appropriate [309]. Le linee guida sull'uso del CASA [311, 312] dovrebbero essere consultate e tutto il personale dovrebbe essere adeguatamente formato all'uso delle apparecchiature CASA per conoscerne i punti di forza e di debolezza.

Quando si usa CASA per ottenere i parametri di movimento, si devono analizzare le tracce di almeno 200 spermatozoi mobili per campione. Questo implica che dovranno essere rilevati molti più spermatozoi. Se gli spermatozoi devono essere classificati per tipo di movimento, o se sono previste altre analisi di variabilità all'interno di un campione, saranno necessarie le tracce di almeno 200, e se possibile 400, spermatozoi mobili.

Lo strumento CASA dovrebbe essere collegato a un software che permetta l'organizzazione dei dati e l'analisi statistica. Le distribuzioni di molti dei parametri di movimento non sono gaussiane; la mediana, piuttosto che la media, è quindi più appropriata come sintesi della tendenza centrale di ogni variabile. Le misurazioni sui singoli spermatozoi possono aver bisogno di essere trasformate matematicamente prima di effettuare analisi statistiche.

4.5.1.2 Procedura

Ogni unità CASA deve essere installata correttamente per garantire un funzionamento ottimale. I produttori indicano impostazioni specifiche, ma gli utenti dovrebbero verificare che lo strumento funzioni entro il grado richiesto di affidabilità e riproducibilità. L'uso di materiali QC adeguati, come le registrazioni video, è essenziale (Sezione 8.6.2, p. 235). Alcuni autori hanno esaminato i sistemi CASA nei loro lavori [46, 309, 312-314].

4.5.1.3 Preparazione del campione di spermatozoi

I campioni di liquido seminale per CASA devono essere raccolti e preparati come descritto nel Capitolo 2. Il sistema CASA deve mantenere il campione a una temperatura stabile di 37°C, poiché il movimento degli spermatozoi è particolarmente sensibile ai cambiamenti di temperatura. Le caratteristiche di motilità e la concentrazione di spermatozoi possono essere valutate nell'eiaculato non diluito, a condizione che

non ci sia un eccesso di detriti o di altri contaminanti. La motilità degli spermatozoi può essere calcolata su campioni con concentrazione di spermatozoi da $2 \times 10^6/\text{ml}$ a $50 \times 10^6/\text{ml}$ [102], a seconda del sistema CASA. Gli errori possono spesso verificarsi in campioni con un'elevata concentrazione di spermatozoi (per esempio, superiore a $50 \times 10^6/\text{ml}$). Tali campioni devono essere diluiti, preferibilmente con liquido seminale dello stesso paziente. Se si tratta di un'analisi di liquido seminale grezzo:

1. centrifugare una parte del campione di eiaculato ad alta velocità (fino a 16.000 g o al massimo disponibile) per 6 minuti per ottenere il plasma seminale privo di spermatozoi;
2. diluire il campione di eiaculato nativo con plasma seminale puro per raggiungere una concentrazione inferiore a $50 \times 10^6/\text{ml}$.

Va notato che questo può ancora modificare le proprietà degli spermatozoi; quindi, i parametri di motilità che sono governati da effetti fluidodinamici (viscosità, viscoelasticità) o altri fattori ambientali potrebbero essere soggetti ad alterazioni.

Le camere di conteggio monouso con una profondità di 20 μm forniscono risultati di motilità affidabili, e di solito dovrebbero essere conteggiate due camere. Inoltre, dovrebbero essere analizzati diversi campi visivi rappresentativi. Come la scelta esatta di questi campi influenzi i risultati non è stato studiato in dettaglio. Tuttavia, i campi dovrebbero attraversare l'area della camera, e i sistemi suggeriscono che un'analisi minima di sei campi visivi per camera (12 campi in totale) possa dare solitamente un risultato affidabile. Se possibile, almeno 200 spermatozoi mobili dovrebbero essere valutati in ogni camera. Principi simili di QC sono usati come valutazione standard della motilità (Sezione 2.4.6, p. 23). I campioni possono essere analizzati immediatamente o dopo la registrazione. L'analisi delle registrazioni si presta a una migliore standardizzazione e a procedure di QC (Sezione 8.6.2, p. 235).

C'è un certo disaccordo sul tempo di osservazione degli spermatozoi per ottenere risultati accurati, ma almeno 1 secondo è sufficiente per le misurazioni CASA di base [46]. La durata dell'osservazione delle cellule natanti può avere un impatto significativo sui risultati [315]; i confronti tra analisi con tempi diversi devono essere fatti con cura.

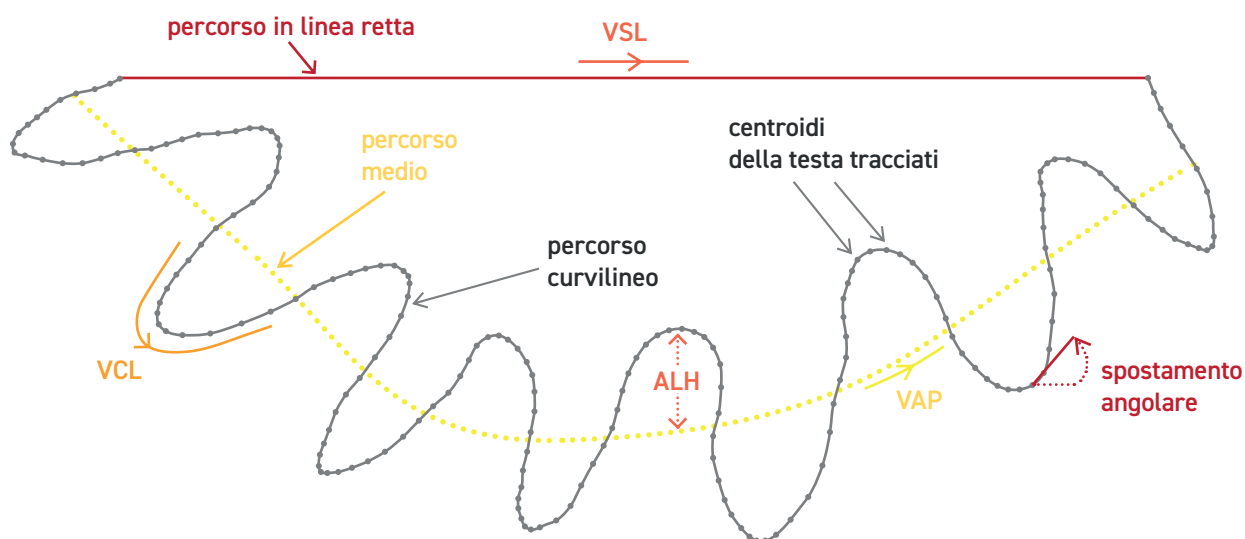
4.5.1.4 Terminologia CASA

Alcune variabili standard misurate con i sistemi CASA, come mostrato in Figura 4.4, sono:

- VCL, velocità curvilinea ($\mu\text{m}/\text{s}$): velocità media della testa dello spermatozoo lungo la sua traiettoria curvilinea come osservato in due dimensioni al microscopio.
- VSL, velocità rettilinea ($\mu\text{m}/\text{s}$): la velocità calcolata lungo una linea retta tra il primo e l'ultimo punto del percorso.
- VAP, velocità media della traiettoria ($\mu\text{m}/\text{s}$): la velocità media calcolata lungo la traiettoria media. Questa traiettoria viene calcolata arrotondando la traiettoria curvilinea secondo gli algoritmi del sistema CASA; questi algoritmi variano a seconda della strumentazione, quindi i valori potrebbero non essere comparabili tra i sistemi o con diversi parametri di acquisizione come la frequenza dei fotogrammi (framerate).

- ALH, ampiezza dello spostamento laterale della testa (μm): la grandezza dello spostamento laterale della testa dello spermatozoo lungo la sua traiettoria media. ALH è spesso espresso come il valore massimo o medio di tali spostamenti. Diversi sistemi CASA calcolano l'ALH usando differenti algoritmi, quindi i valori potrebbero non essere comparabili.
- MAD, spostamento angolare medio (gradi): valori assoluti della media dell'angolo di curvatura della testa dello spermatozoo lungo la sua traiettoria curvilinea. Va notato che questo non misura l'angolo di rotazione della direzione in cui punta la testa dello spermatozoo.
- Altre misure, comunemente usate, sono derivate dal calcolo di queste cinque variabili:
 - LIN, linearità: linearità di una traiettoria curvilinea (velocità in linea retta/velocità curvilinea);
 - WOB, oscillazione: misura dell'oscillazione della traiettoria lungo la traiettoria media (velocità media del percorso/velocità curvilinea);
 - STR, rettilineità: linearità della traiettoria media (velocità in linea retta/velocità media del percorso);
 - BCF, frequenza di battito (Hz): la frequenza media in cui la traiettoria curvilinea interseca la traiettoria media (tuttavia, va notato che il BCF ha dimostrato di non essere correlato alla frequenza dei battiti flagellari [316]);
 - D, dimensione frattale: la valutazione quantitativa delle proprietà di "riempimento dello spazio" delle curve su un piano [310].

Figura 4.4 Terminologia standard per le variabili misurate dai sistemi CASA



Nota: Diversi strumenti CASA utilizzano diversi algoritmi matematici per calcolare molte di queste variabili di movimento. La comparabilità delle misurazioni tra tutti gli strumenti non è ancora nota.

4.5.2 Utilizzo del CASA per valutare l'iperattivazione dello spermatozoo

L'iperattivazione è un importante fenomeno biologico dello spermatozoo umano che si manifesta attraverso la capacitazione (il processo di acquisizione della capacità di fecondare) e comprende un cambiamento comportamentale nella forma d'onda flagellare. L'iperattivazione è di solito caratterizzata da un aumento dell'ampiezza dei battiti flagellari, una diminuzione della frequenza dei battiti e un battito laterale non progressivo [317].

I complessi parametri del movimento flagellare degli spermatozoi iperattivati sono difficili da identificare in modo affidabile e inequivocabile attraverso l'analisi manuale. Di conseguenza, gli autori hanno proposto diversi algoritmi e sistemi informatici per l'analisi quantitativa del movimento dei singoli spermatozoi per valutare gli stereotipi di motilità. Queste analisi si sono basate su quantità ottenute tracciando il movimento della testa [318, 319]. Le moderne capacità di calcolo permettono la valutazione simultanea dei parametri cinetici di migliaia di spermatozoi e la loro classificazione [320]. La misurazione diretta della forma d'onda flagellare può anche essere utilizzata per comprendere più accuratamente il cambiamento dei parametri cinematici durante l'iperattivazione [321].

4.5.3 Utilizzo del CASA per valutare la morfologia dello spermatozoo

L'analisi delle immagini ha la potenzialità di fornire avanzamenti considerevoli nella quantificazione, nell'obiettività e nella riproducibilità della valutazione morfologica dello spermatozoo. Sono disponibili sistemi commerciali per quantificare la morfologia della testa e del tratto intermedio dello spermatozoo, ed eventualmente del tratto principale. Tuttavia, i difetti della coda che influenzano la motilità possono essere valutati più direttamente utilizzando CASA per misurare la motilità e il movimento. L'uso dei sistemi CASA per la valutazione morfologica si basa su un alto livello di standardizzazione e sulla qualità della colorazione delle cellule, con risultati facilmente distorti a causa della variazione della colorazione. Per questo motivo, i sistemi di colorazione automatizzati possono spesso essere un abbinamento opportuno per la valutazione della morfologia con i sistemi CASA, che aiuta ad eliminare la variabilità dei risultati.

I sistemi di analisi morfologica automatizzati hanno il potenziale di una maggiore obiettività, precisione e riproducibilità rispetto ai sistemi manuali [95]. La precisione e la riproducibilità possono raggiungere almeno il 92% [322], che è superiore alla valutazione manuale da parte di un operatore esperto. La riproducibilità e l'accuratezza dei risultati della valutazione morfometrica computerizzata degli spermatozoi (CASMA) può, tuttavia, essere compromessa da variabili metodologiche come la messa a fuoco, l'illuminazione, la preparazione del campione e la colorazione [323, 324] e da difficoltà tecniche nel differenziare correttamente le teste degli spermatozoi dai detriti seminali, in particolare quando la concentrazione degli spermatozoi è bassa [322, 324-326]. La natura della valutazione automatica significa che non c'è modo di compensare difetti artefatti della preparazione. Pertanto, piccole differenze nell'ombreggiatura del fondo rispetto alla colorazione delle cellule possono produrre una classificazione errata o l'impossibilità di identificare la cellula come uno spermatozoo, con una conseguente distorsione dei risultati.

Come per la valutazione manuale della morfologia, le procedure e gli strumenti devono essere standardizzati e il QC mantenuto per garantire risultati comparabili e affidabili. Il liquido seminale può essere trattato come descritto nella sezione **Eiaculati carichi di detriti o viscosi, p. 45** per ridurre il fondo per le registrazioni CASMA. Se la concentrazione di spermatozoi è bassa ($< 2 \times 10^6$ /mL), i campioni do-

vranno essere concentrati mediante centrifugazione, come descritto nella sezione **Eiaculati con bassa concentrazione di spermatozoi**, p. 45. Tuttavia, va notato che la centrifugazione può influenzare la morfologia dello spermatozoo, e il suo uso deve essere registrato.

Due studi hanno riportato relazioni significative tra i risultati del CASMA e gli endpoint di fertilità. Coetzee et al., 1999 [327] hanno dimostrato che i risultati normali dell'analisi automatizzata della morfologia spermatica sono predittori significativi sia dei tassi di fecondazione in vitro che della gravidanza. Garrett et al., 2003 [102] hanno dimostrato che la percentuale di spermatozoi che mostravano una morfologia della testa tipica, di quelli che si legano alla zona pellucida ("zona-preferred", %Z), insieme alla velocità rettilinea (VSL) erano significativamente e indipendentemente correlati ai tassi di gravidanza naturale in un ampio gruppo di coppie subfertili. Le relazioni sia della %Z che del VSL con la fertilità sembravano essere continue, e non è stato identificato alcun valore soglia oltre il quale non vi è un ulteriore aumento del tasso di gravidanza. Sono necessari più studi sulla fertilità, così come sulla funzione e i disturbi dell'apparato riproduttivo maschile, in grandi popolazioni per perfezionare l'applicazione del CASA alla misurazione della morfologia degli spermatozoi.

I sistemi automatizzati possono essere utili per ottenere ulteriori dati di ricerca (anche su sottopopolazioni morfologiche di spermatozoi, integrità della membrana plasmatica, indice energetico dello spermatozoo) [328-330] e per i sistemi QC, ma sono necessarie ulteriori ricerche per dimostrare i loro benefici a fini clinici.

La mancanza di IQC può portare a un gran numero di errori CASA tra sistemi e laboratori. Pertanto, è necessario standardizzare il processo e il QC per CASA [331]. Nonostante i risultati emergenti degli studi comparativi [332-337] non ci sono ancora abbastanza evidenze che consentirebbero l'uso di analisi computerizzate CASA nell'ampia pratica clinica.

4.6 Tecnologie emergenti

Negli ultimi anni, si sono sviluppate molte tecnologie potenzialmente in grado di aumentare significativamente l'efficienza dell'analisi informatica nel prossimo futuro. Queste tecnologie possono essere classificate come computazionali (sviluppi algoritmici) o tecnologiche (incorporazione di nuovi dispositivi o test funzionali).

4.6.1 Progressi computazionali

I progressi negli algoritmi di elaborazione delle immagini stanno permettendo l'analisi degli spermatozoi in un numero maggiore e più dettagliato di quanto sia stato possibile in precedenza. È stato dimostrato che i nuovi sistemi sono in grado di estrarre le tracce delle singole cellule nei campioni a una concentrazione di cellule molto più alta rispetto al CASA tradizionale, come mostrato in **Figura 4.5**, p. 160 [338, 339]. L'uso delle misurazioni cinetiche CASA per classificare gli spermatozoi in diverse sottopopolazioni si sta dimostrando capace di migliorare la comprensione e il monitoraggio dei cambiamenti nella motilità cellulare [320].

Andando oltre le misure di motilità derivate dalla testa, è ora possibile tracciare automaticamente la forma d'onda flagellare delle cellule mobili (vedere **Figura 4.5b**, p. 160) [316]. Sebbene sia necessaria una maggiore attenzione nell'imaging delle cellule per garantire che il flagello battente sia visibile e a fuoco, il tracciamento fla-

gellare può consentire molte possibilità diagnostiche, tossicologiche e terapeutiche nella ricerca sul liquido seminale umano. La visualizzazione del battito flagellare in un fluido di viscosità nota permette anche di valutare l'energia spesa dalla cellula, o la varianza di questa nella popolazione.

Oltre ai sistemi CASA commerciali, sono state sviluppate diverse offerte liberamente disponibili o open-source per aumentare l'accesso alle analisi assistite dal computer [316, 340].



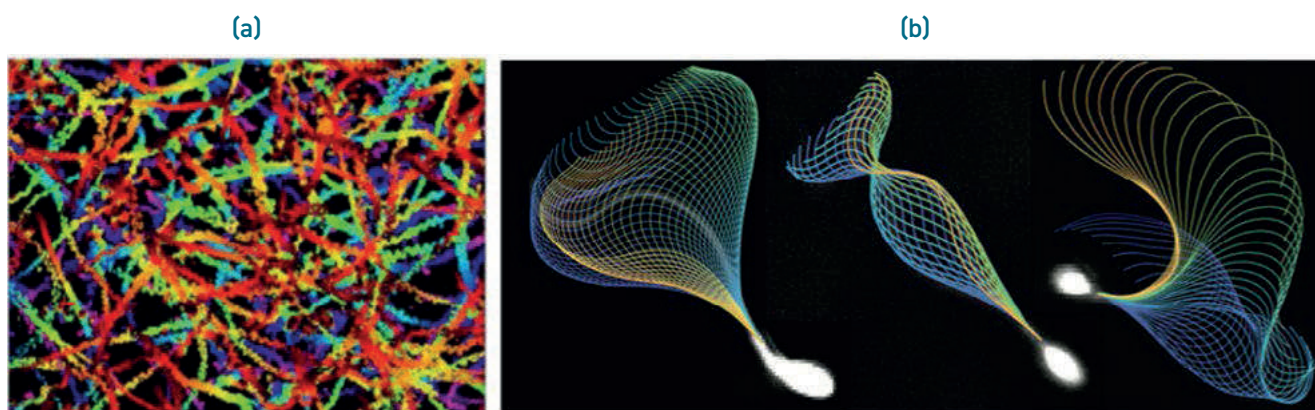
Commento: Bisogna fare attenzione quando si impiegano tecnologie emergenti che non sono state certificate per l'uso clinico, ma il loro utilizzo per cercare di rispondere alle domande della ricerca è da incoraggiare.

4.6.2 Progressi tecnologici

Sempre più spesso, lo sviluppo del CASA e di altre tecnologie computazionali emergenti viene integrato dall'uso di ulteriori tecnologie per migliorare la qualità e l'accesso alla diagnostica.

I sistemi CASA esistenti, solitamente progettati per l'uso in laboratorio, sono spesso costosi e inaccessibili. L'uso degli smartphone può avere un grande potenziale per l'analisi degli spermatozoi perché si tratta di dispositivi portatili, dotati di fotocamere digitali di alta qualità e che possono essere facilmente collegati a un microscopio [341]. Attualmente, i dispositivi basati su smartphone non possono raggiungere la qualità e l'accuratezza necessarie per un'analisi completa del liquido seminale; tuttavia, l'uso diffuso di tali dispositivi potrebbe diventare utile come strumento per gli uomini per cercare tempestivamente una consulenza medica adeguata, per effettuare indagini diagnostiche e per il trattamento delle cause. Bisogna fare attenzione quando si impiegano tecnologie emergenti che non sono state certificate per l'uso clinico, ma il loro utilizzo per cercare di rispondere alle domande della ricerca è da incoraggiare.

Figura 4.5 Esempi di espressioni grafiche di diverse applicazioni CASA



(a) Tipica immagine a colori di un campione densamente concentrato per 10 secondi sotto un obiettivo 10× (ogni traiettoria rappresenta uno spermatozoo mobile) [339]; (b) La forma d'onda flagellare di uno spermatozoo; da sinistra a destra, in mezzi a bassa viscosità e in mezzi ad alta viscosità e iperattivati [316].

Capitolo 5:

Tecniche di preparazione degli spermatozoi



5.1	Introduzione	161
5.2	Principi generali	163
5.3	Lavaggio semplice	164
5.4	Swim-up diretto	165
5.5	Gradienti di densità discontinui	166
5.6	Selezione magnetica delle cellule attivate (MACS)	166
5.7	Preparazione di campioni di liquido seminale con infezione da HIV	167
5.8	Preparazione di spermatozoi testicolari ed epididimali ...	168
5.9	Preparazione di campioni da eiaculazione retrograda ...	169
5.10	Preparazione di campioni da eiaculazione stimolata.....	170

5.1 Introduzione

5.1.1 Razionale

Gli spermatozoi possono essere separati dal plasma seminale per una serie di motivi, come test diagnostici e di ricerca per la competenza funzionale, per la valutazione degli effetti della composizione dei mezzi e il recupero degli spermatozoi per le tecniche di riproduzione assistita (ART). La premessa su cui si basano le tecniche di preparazione dell'eiaculato per la riproduzione assistita è quella di garantire una buona qualità degli spermatozoi e l'eliminazione dei fattori che sono dannosi per la fecondazione. Se si devono eseguire test della funzione spermatica, è fondamentale che gli spermatozoi siano separati dal plasma seminale entro 1 ora dall'eiaculazione, per limitare qualsiasi danno da parte di cellule non nemaspermiche [284] e per ridurre gli effetti dannosi dell'aumento dell'osmolalità che si verifica negli eiaculati conservati *in vitro* [147, 342].

“

Una tecnica ottimale di preparazione del liquido seminale dovrebbe recuperare una popolazione di spermatozoi altamente funzionale che preservi il DNA e non induca disfunzioni attraverso la produzione di ROS seminali e dei leucociti.

”

Anche se alcuni componenti del plasma seminale misto sembrano aiutare gli spermatozoi a penetrare il muco cervicale rispetto, per esempio, alla **soluzione di Tyrode, p. 230** (Overstreet et al., 1980), l'impatto negativo del liquido seminale vescicolare sulla motilità, la sopravvivenza e la protezione del DNA degli spermatozoi è ben documentato [13, 256], così come la presenza di "fattori decapacitanti" nel plasma seminale [343]. Inoltre, alcuni componenti del plasma seminale possono essere un ostacolo al raggiungimento della gravidanza quando le barriere naturali vengono superate dall'ART, come nella IUI o nell'IVF. Per la pratica clinica e per le soglie prognostiche di ricerca è importante la separazione degli spermatozoi dal plasma seminale al fine di ottenere una preparazione finale contenente un'alta percentuale di cellule morfologicamente normali e mobili, con ridotti danni al DNA, priva di detriti, di cellule non germinali e spermatozoi morti.

5.1.1.1 Scelta della metodica

La scelta della tecnica di preparazione degli spermatozoi è dettata dalla natura del campione seminale [344, 345] e dal suo scopo. Per la riproduzione assistita, comprese le procedure IVF, le tecniche di preparazione dell'eiaculato devono ottenere una popolazione di spermatozoi con minimi danni al DNA [346]. Una tecnica ottimale di preparazione del liquido seminale dovrebbe recuperare una popolazione di spermatozoi altamente funzionale [347], che preservi il DNA e non induca disfunzioni attraverso la produzione di ROS seminali e dei leucociti [348, 349]. Gli spermatozoi recuperati devono avere una morfologia idonea e devono mantenere una motilità funzionale per la tipologia di ART che si sta considerando. La diluizione del liquido seminale con terreni di coltura e la successiva centrifugazione sono state suggerite per la preparazione di campioni normozoospermici per la IUI [345, 350], mentre la scelta del metodo è dettata anche dall'indicazione o dallo scopo d'uso. Per esempio, la tecnica dello swim-up diretto è utile per selezionare gli spermatozoi mobili, poiché riflette la capacità motoria degli spermatozoi di nuotare nel mezzo di coltura. Gli studi hanno dimostrato che la frammentazione del DNA, caratterizzata dalla presenza di danni al DNA a singolo o doppio filamento, è correlata negativamente con i risultati dell'ART [346, 351, 352] (**Sezione 3.2, p. 86**). Entrambe le tecniche – swim-up diretto e swim-up da pellet – hanno diminuito significativamente il tasso totale di frammentazione del DNA, anche se lo swim-up da pellet comporta la centrifugazione, che potrebbe influenzare altri parametri funzionali degli spermatozoi [353, 354]. La tecnica dello swim-up diretto viene spesso utilizzata quando i campioni di liquido seminale sono considerati in gran parte normali, mentre nei casi di oligozoospermia grave, teratozoospermia o astenozoospermia, la centrifugazione a gradiente di densità (DGC) è di solito preferita per la maggiore resa e quindi per il probabile numero totale di spermatozoi mobili recuperati. I gradienti di densità possono anche essere modificati per ottimizzare la gestione delle proprietà specifiche dei singoli campioni: il volume totale del materiale del gradiente può essere ridotto, limitando la distanza che gli spermatozoi sedimentano e massimizzando il recupero totale degli spermatozoi mobili, oppure il tempo di centrifugazione può essere aumentato per i campioni con alta viscosità.

Ogni laboratorio deve determinare la forza e il tempo di centrifugazione necessari per formare un pellet sufficiente di spermatozoi. Quando il numero di spermatozoi è estremamente basso, può essere necessario modificare la forza o il tempo della centrifuga per aumentare le possibilità di recuperare il maggior numero possibile di spermatozoi. Modifiche dei tempi raccomandati e delle forze di centrifugazione dovrebbero essere rigorosamente testate prima dell'implementazione clinica. Il metodo di preparazione più adatto può essere identificato dalla capacità funzionale degli spermatozoi preparati, come determinato, per esempio, dalla motilità (**Sezione 2.4.6, p. 23**) e dalla vitalità degli spermatozoi (**Sezione 2.4.7, p. 26**).

5.1.1.2 Efficacia della separazione degli spermatozoi dal plasma seminale e manipolazione degli agenti infettivi

L'efficacia di una tecnica di selezione degli spermatozoi è solitamente espressa come il numero assoluto di spermatozoi, il numero totale di spermatozoi mobili o il recupero di spermatozoi mobili morfologicamente normali. Lo swim-up produce generalmente un recupero inferiore di spermatozoi mobili (< 20%) rispetto al DGC (> 20%). Nella preparazione finale degli spermatozoi, lo swim-up e il DGC producono anche diversi livelli di contaminazione con componenti seminali. Utilizzando lo zinco della secrezione prostatica come marker di componenti seminali solubili, è stata dimostrata una diffusione tempo-dipendente dello zinco dal liquido seminale al terreno di swim-up sovrapposto [355]. La concentrazione finale di zinco nelle preparazioni swim-up era maggiore di quella dei preparati con gradiente di densità.

I campioni seminali possono contenere agenti infettivi nocivi, e gli operatori devono maneggiarli con estrema attenzione in quanto rappresentano un rischio biologico. Oltre all'eliminazione degli spermatozoi di bassa qualità, compresi quelli immobili, la preparazione del seme dovrebbe permettere l'eliminazione di altre cellule, come i leucociti e i batteri [356], così come di sostanze tossiche o bioattive [347]. Le tecniche di preparazione del liquido seminale non possono essere considerate efficaci al 100% nel rimuovere gli agenti infettivi (Sezione 5.7, p. 167). Le linee guida per la sicurezza, come delineato nella Sezione 8.2, p. 214, devono essere rigorosamente osservate. Le buone pratiche di laboratorio sono fondamentali per la sicurezza del laboratorio [48, 357].

5.2 Principi generali

Nelle sezioni seguenti sono descritte alcune delle tecniche disponibili per la preparazione degli spermatozoi. Per tutte, il terreno di coltura suggerito è una soluzione salina bilanciata integrata con proteine e contenente un tampone adeguato alle condizioni ambientali in cui gli spermatozoi saranno processati. Per le procedure di riproduzione assistita, come ICSI, IVF e inseminazione artificiale, è imperativo che l'albumina sierica umana sia altamente purificata e libera da contaminazioni virali, batteriche e prioniche. È disponibile in commercio albumina specificamente progettata per tali procedure. Per scopi diagnostici si può usare un BSA molto meno costoso (Sezione 8.4, p. 226). Se l'incubatore contiene solo aria atmosferica e la temperatura è di 37°C, il terreno deve essere tamponato (vedi Sezione 8.4.1, p. 226). Il rispetto di questa misura assicura che il pH della coltura sia compatibile con la sopravvivenza degli spermatozoi. L'utilizzo finale degli spermatozoi trattati determinerà quale tipologia di tampone è più appropriata. Per esempio, i test sulla funzione spermatica in generale richiedono un terreno che supporti la capacitazione degli spermatozoi, che tipicamente contiene bicarbonato di sodio (25 mmol/l).

Il liquido seminale per l'ART deve essere raccolto in modo sterile (Sezione 2.5.12, p. 68). Quando si esegue una tecnica di preparazione del liquido seminale, tecniche e materiali sterili sono essenziali per le applicazioni terapeutiche.



Nota: Anche se i terreni di coltura possono essere preparati in laboratorio, va notato che le prestazioni e la sicurezza della soluzione non possono essere controllate con precisione. Di solito ci si aspetta che, laddove disponibili, nell'ART siano usati terreni prodotti commercialmente, testati e approvati per l'uso terapeutico.

Esempi di terreni che possono essere preparati o acquistati sono forniti di seguito, ma questa non è una raccomandazione per il loro uso terapeutico in ART.

5.3 Lavaggio semplice

Questa semplice procedura di lavaggio fornisce un alto recupero di spermatozoi se i campioni di liquido seminale sono di buona qualità, ma non elimina i detriti o i leucociti che sono presenti in esso.

5.3.1 Reagenti

- BWW, EBSS, sEBSS, HTF (disponibili in commercio o vedere [Sezione 8.4, p. 226](#)) o altri terreni di coltura propri opportunamente testati, supplementati preferibilmente con sieroalbumina umana (HSA) o con siero, come descritto di seguito.
- HSA, altamente purificata e priva di contaminazioni virali, batteriche e prioniche e di endotossine.
- Supplemento di HSA: a 50 ml di terreno aggiungere 300 mg di HSA, 1,5 mg di piruvato di sodio, 0,18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.
- Supplemento di siero, se necessario (per esempio, ai terreni non registrati descritti): a 46 ml di mezzo aggiungere 4 ml di siero del paziente inattivato al calore (56°C per 20 minuti), 1,5 mg di piruvato di sodio, 0,18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.

5.3.2 Procedura

1. Miscelare bene il campione seminale.
2. Diluire l'intero campione seminale 1+1 (1 : 2) con un terreno di coltura per facilitare la rimozione del plasma seminale.
3. Trasferire la sospensione diluita in più vials da centrifuga, preferibilmente non più di 3 ml per vial.
4. Centrifugare a 300-500 g per 5-10 minuti.
5. Aspirare con cura e scartare i surnatanti.
6. Risospendere il pellet di spermatozoi combinato in 1 ml di terreno con una leggera pipettatura.
7. Centrifugare di nuovo a 300-500 g per 3-5 minuti.
8. Aspirare con cura e scartare il surnatante.
9. Risospendere il pellet di spermatozoi, pipettando delicatamente, in un volume di terreno appropriato per lo scopo finale, per esempio l'inseminazione.

Il numero di lavaggi per rimuovere il plasma seminale può essere ridotto usando meno vials e aumentando il volume in ogni vial. Se ciò viene fatto, la forza e la durata della centrifugazione devono essere aumentate per assicurare la completa formazione del pellet degli spermatozoi, per esempio 500-600 g per 8-10 minuti. Si noti che la forza di centrifugazione varia con il raggio e il numero di giri al minuto (rpm) (vedere [Sezione 8.2.2, p. 217](#) per il calcolo delle forze centrifughe).

5.4 Swim-up diretto

Gli spermatozoi possono essere selezionati in base alla loro capacità di migrare dal plasma seminale al terreno di coltura. Questa tecnica è conosciuta come "swim-up". Il seme, preferibilmente, non dovrebbe essere diluito e non dovrebbe essere centrifugato prima dello swim-up, perché questo può provocare danni perossidativi alle membrane spermatiche [348]. Per questo, lo swim-up diretto degli spermatozoi dal liquido seminale è il metodo privilegiato per separare gli spermatozoi mobili [per esempio, 45, 46]. La tecnica dello swim-up diretto può essere eseguita sia stratificando il terreno di coltura sopra il liquido seminale fluidificato, sia stratificando il liquido seminale fluidificato sotto il terreno di coltura. Gli spermatozoi mobili migrano così nel terreno di coltura. Questa procedura dà una resa inferiore di spermatozoi rispetto al lavaggio, ma li seleziona per la loro motilità ed è utile quando la percentuale di spermatozoi mobili nel liquido seminale è bassa, per esempio per la FIVET e l'ICSI.

5.4.1 Reagenti

- BWW, EBSS o eBSS (**Sezione 8.4, p. 226**) integrato preferibilmente con HSA, o siero, come descritto di seguito.
- HSA, altamente purificata e priva di contaminazioni virali, batteriche e prioniche e di endotossine.
- Supplemento HSA: a 50 ml di mezzo aggiungere 300 mg di HSA, 1,5 mg di piruvato di sodio, 0,18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.
- Supplemento di siero: a 46 ml di mezzo aggiungere 4 ml di siero del paziente inattivato al calore (56°C per 20 minuti), 1,5 mg di piruvato di sodio, 0,18 ml di lattato di sodio (60% (v/v) di sciroppo) e 100 mg di bicarbonato di sodio.

5.4.2 Procedura

1. Miscelare bene il campione seminale.
2. Mettere 1 ml di liquido seminale in una vial da centrifuga sterile da 15 ml e stratificare delicatamente 1,2 ml di terreno su di esso. In alternativa, pipettare il seme con attenzione sotto il terreno di coltura.
3. Inclinare la vial formando un angolo di circa 45°, per aumentarne l'area di superficie dell'interfaccia liquido seminale-terreno di coltura, e incubare per 1 ora a 37°C.
4. Riportare delicatamente la vial in posizione verticale e rimuovere 1 ml della parte superiore del terreno. Questo conterrà cellule spermatiche altamente mobili.
5. Diluire tale frazione con 1,5-2,0 ml di terreno.
6. Centrifugare a 300-500 g per 5 minuti e scartare il surnatante.
7. Risospendere il pellet di spermatozoi in 0,5 ml di terreno per valutare la concentrazione nemaspermica, la motilità totale e la motilità progressiva (**Sezione 2.4.6, p. 23** e **Sezione 2.4.8, p. 28**).
8. Il campione può essere utilizzato direttamente per scopi terapeutici o di ricerca.

5.5 Gradienti di densità discontinui

I gradienti di densità discontinui possono essere utilizzati come un metodo efficace e adattabile per selezionare spermatozoi di alta qualità per l'ART. Possono fornire una buona selezione di spermatozoi mobili, libera da altri tipi di cellule e detriti. Sono più facili da standardizzare rispetto alla tecnica dello swim-up, quindi i risultati sono più coerenti. Questa tecnica è utilizzata per preparare e selezionare gli spermatozoi per l'utilizzo in FIVET e ICSI.

Questo metodo utilizza la centrifugazione del liquido seminale su gradienti di densità costituiti da silice colloidale rivestita con silano, che separa le cellule solo in base alla loro densità. Il metodo più applicato è una semplice preparazione di gradiente discontinuo di densità a due fasi. Dovrebbero essere seguite le indicazioni del produttore [84]. La preparazione del seme utilizzando la centrifugazione a gradiente di densità (DGC) solitamente permette di ottenere una frazione di spermatozoi altamente mobili libera da detriti, leucociti contaminanti, cellule non germinali e cellule germinali degenerate.

Sono disponibili in commercio prodotti per realizzare gradienti di densità utili per la preparazione del liquido seminale. Qualsiasi deroga alle procedure raccomandate dovrebbe essere basata sull'evidenza. La maggior parte dei mezzi a gradiente di densità contiene componenti ad alta massa molecolare relativa che hanno bassa osmolalità, quindi sono solitamente preparati in un mezzo che è iso-osmotico con i fluidi del tratto riproduttivo femminile.

5.6 Selezione magnetica delle cellule attivate (MACS)

Con l'arrivo dell'ART, si è creata la necessità di recuperare spermatozoi per il concepimento assistito e come nelle ICSI, in caso di infertilità maschile, si sono sviluppate ulteriori metodiche addizionali per il recupero dei migliori spermatozoi da un punto di vista funzionale, privi di danni significativi del DNA.

Una revisione sistematica Cochrane [358] non ha riscontrato differenze in termini clinici o di nati vivi tra MACS e spermatozoi selezionati tramite legame con acido ialuronico (HA-ICSI) o altre tecniche di selezione. Inoltre, è stato osservato un aumento della frammentazione del DNA in seguito a DGC, con conseguente minore probabilità di gravidanza tra le coppie IVF/ICSI [354].

5.6.1 Reagenti e materiali per il recupero degli spermatozoi tramite MACS

- Tampone HTF modificato con HEPES.
- Microbeads coniugate con annessina V.
- Kit di microbeads di annessina V (Miltenyi Biotec, Huburn, CA, USA; MACS Good Manufacturing Practive (GMP) kit annessina V, Miltenyi Biotec, Germania).
- Colonna di separazione o magnete dotato di globo di ferro (Mini MACS, Miltenyi Biotec).

- Provette Eppendorf (1,5 ml).
- Centrifuga.
- Incubatrice.

5.6.2 Procedura

1. Un'aliquota di 0,5 ml di spermatozoi è risospesa in tampone HTF modificato con HEPES ottenuto dopo il lavaggio del liquido seminale per rimuovere il plasma seminale, o prima del DGC, quando viene aggiunta la procedura.
2. Centrifugare e sospendere il pellet in 80 µl di tampone di legame, con 20 µl di microbeads coniugate con annessina V (kit di microbeads annessina V, Miltenyi Biotec, Huburn, CA, USA), per 15 minuti a temperatura ambiente.
3. Aggiungere 400 µl di soluzione legante e mettere nella colonna di separazione; le cellule non marcate (vitali) passano attraverso la colonna.
4. La frazione non marcata viene recuperata e trattata come descritto [359].

5.7 Preparazione di campioni di liquido seminale con infezione da HIV

Se il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è presente nel liquido seminale, l'acido ribonucleico virale (RNA) e il DNA provirale possono essere trovati liberi nel plasma seminale e nelle cellule non seminali. In una revisione sistematica e meta-analisi [360] che ha coinvolto 11.585 cicli di ART con l'utilizzo di liquido seminale lavato di 3.994 coppie HIV-discordanti, il 56,3% ha ottenuto una gravidanza clinica e non si è verificata alcuna sierconversione dell'HIV senza soppressione virale del plasma. Poiché i recettori dell'HIV (CD4, CCR5, CXCR4) sono espressi solo nelle cellule non nemaspermiche, una combinazione di DGC seguita da swim-up è stata proposta come modalità per prevenire l'infezione della partner femminile non infetta [361, 362], ma esistono anche altri metodi convalidati [363]. Queste procedure sono state sviluppate per separare il plasma seminale e le cellule non nemaspermiche infettate dal virus (nel surnatante del gradiente di densità) dagli spermatozoi mobili liberi da HIV nello swim-up (dal pellet del gradiente di densità). I campioni preparati dovrebbero essere testati con la reazione a catena della polimerasi a trascrizione inversa (RT-PCR) prima dell'uso, e solo i campioni non infettati da HIV dovrebbero essere usati per l'ART. Anche se i risultati finora sono incoraggianti, non ci sono ancora evidenze sufficienti dell'eliminazione del rischio di infezione da HIV attraverso la preparazione del liquido seminale.



Nota: Questa tecnica dovrebbe essere usata solo in strutture sicure, per minimizzare il rischio di contaminazione incrociata di campioni privi di HIV [364]. Evidenze recenti [365-368] hanno dimostrato che nelle coppie HIV-discordanti, dove si raggiunge la soppressione virale, la trasmissione dell'HIV al partner è minima o nulla.

5.8 Preparazione di spermatozoi testicolari ed epididimali

Gli spermatozoi recuperati dal tessuto testicolare e dall'epididimo richiedono una preparazione speciale. L'indicazione tipica per l'aspirazione epididimale è l'azoospermia ostruttiva piuttosto che la disfunzione testicolare. Di conseguenza, un numero relativamente grande di spermatozoi può essere raccolto per scopi terapeutici.

Gli aspirati epididimali spesso possono essere ottenuti con una contaminazione minima di globuli rossi e cellule non germinali, rendendo l'isolamento e la selezione degli spermatozoi epididimali mobili relativamente semplici. Se si ottiene un gran numero di spermatozoi epididimali, la DGC è un metodo di preparazione efficace per un uso successivo (**Sezione 5.4, p. 165**). Se il numero di spermatozoi è basso, si può eseguire un semplice lavaggio (**Sezione 5.3, p. 164**).

Gli spermatozoi testicolari possono essere recuperati tramite biopsia (con o senza microdissezione) o tramite agobiopsia percutanea. I campioni testicolari sono sempre contaminati da cellule non germinali e da un gran numero di globuli rossi; quindi, sono necessari ulteriori passaggi per isolare una preparazione pulita di spermatozoi. Per liberare gli spermatidi allungati legati al tubulo seminifero ("spermatozoi testicolari") sono necessari metodi enzimatici o meccanici. Gli spermatozoi testicolari sono preparati per l'ICSI, poiché il numero di spermatozoi è basso e la loro motilità è scarsa.

5.8.1 Metodo enzimatico

1. Incubare il tessuto testicolare con collagenasi (per esempio, 0,8 mg di *Clostridium histolyticum*, tipo 1A per ml di terreno) per 1,5-2 ore a 37°C, agitando con vortex ogni 30 minuti.



Nota: Gli enzimi possono causare danni agli spermatozoi e, se utilizzati, devono essere adatti all'uso terapeutico.

2. Centrifugare a 100 g per 10 minuti ed esaminare il pellet.

5.8.2 Metodo meccanico

1. Sminuzzare il tessuto testicolare nel terreno di coltura con vetrini coprioggetto fino a quando il tessuto non è finemente disgregato.

2. In alternativa, rimuovere le cellule dai tubuli seminiferi usando aghi sottili (attaccati a siringhe da tuberculina monouso) piegati parallelamente alla base della piastra di coltura.

5.8.3 Preparazione delle sospensioni di spermatozoi per l'iniezione intracitoplasmatica

1. Lavare i campioni ottenuti aggiungendo 1,5 ml di terreno di coltura.

2. Centrifugare a 300 g per 8-10 minuti.

3. Rimuovere il surnatante e risospingere il pellet in 0,5 ml di terreno di coltura fresco.

4. Stimare la motilità e il numero di spermatozoi nel pellet (alcuni campioni con un basso numero di spermatozoi possono aver bisogno di essere risospesi in un volume inferiore di terreno).
5. Mettere una goccia da 5-10 µl di terreno di coltura in una piastra.
6. Coprirla con olio minerale (pre-equilibrato con CO₂).
7. Introdurre 5-10 µl di sospensione spermatica nel terreno di coltura.
8. Aspirare con cura gli spermatozoi mobili posizionati nell'interfaccia tra il terreno di coltura e l'olio con una pipetta ICSI.
9. Trasferirli in una goccia di soluzione viscosa, per esempio polivinilpirrolidone (7-10% (100 g/l) nel terreno).

5.9 Preparazione da campioni da eiaculazione retrograda

In alcuni uomini, il liquido seminale passa nella vescica al momento dell'eiaculazione, con conseguente aspermia, o assenza di eiaculato. La conferma di questa situazione si ottiene esaminando un campione di urina post-eiaculazione per la ricerca di spermatozoi. Se il trattamento farmacologico non è possibile o non ha successo, gli spermatozoi possono essere recuperati dalle urine. L'alcalinizzazione dell'urina per assunzione di bicarbonato di sodio, per esempio, aumenterà la possibilità che gli spermatozoi che passano nelle urine conservino le loro caratteristiche di motilità [369].

5.9.1 Nessun trattamento di alcalinizzazione prima della raccolta degli spermatozoi

In laboratorio si dovrebbe chiedere al paziente di:

- urinare senza svuotare completamente la vescica;
- produrre un eiaculato tramite masturbazione in un contenitore sterile;
- urinare nuovamente in un secondo recipiente contenente un terreno di coltura (per alcalinizzare ulteriormente l'urina).

5.9.2 Trattamento di alcalinizzazione somministrato prima della raccolta degli spermatozoi

L'alcalinizzazione dell'urina può essere ottenuta bevendo acqua con aggiunta di cloruro di sodio e bicarbonato di sodio 1-2 ore prima del tentativo di raccogliere un eiaculato. Questo può essere combinato con il trattamento con lo stimolatore del recettore alfa-1.

In laboratorio si dovrebbe chiedere al paziente di:

- produrre un eiaculato tramite masturbazione in un contenitore sterile;
- urinare dopo l'orgasmo in un secondo contenitore (almeno 500 ml di volume).

5.9.3 Analisi degli eiaculati anterogradi e delle urine post-orgasmiche

Sia l'eiaculato, se presente, sia i campioni di urina devono essere analizzati. Poiché può essere prodotto un grande volume di urina, è spesso necessario concentrare il campione mediante centrifugazione (500 g per 8 minuti). Il campione retrogrado, una volta concentrato, e il campione anterogrado, se prodotto, possono essere trattati più efficacemente utilizzando il metodo di preparazione a gradiente di densità (**Sezione 5.5, p. 166**).

5.10 Preparazione di campioni da eiaculazione stimolata

Il liquido seminale di uomini con disturbi dell'eiaculazione, o che non possono eiaculare, può essere raccolto tramite stimolazione vibratoria diretta del pene o elettrostimolazione rettale degli organi accessori. Gli eiaculati dei pazienti con lesioni del midollo spinale presentano spesso alte concentrazioni di spermatozoi con una ridotta motilità e contaminazioni di globuli rossi e bianchi. I campioni ottenuti con l'elettroeiaculazione possono essere trattati più efficacemente con il DGC (**Sezione 5.5, p. 166**). Indipendentemente dal metodo di preparazione, questi tipi di eiaculato contengono spesso un'alta percentuale di spermatozoi immobili.

Capitolo 6: Crioconservazione degli spermatozoi



6.1	Introduzione	171
6.2	Indicazioni per la crioconservazione degli spermatozoi...	172
6.3	Valutazione dei rischi della crioconservazione e dello stoccaggio degli spermatozoi umani.....	174
6.4	Protocolli di crioconservazione degli spermatozoi.....	177
6.5	Vitrificazione.....	182

6.1 Introduzione

La crioconservazione degli spermatozoi è una parte importante del lavoro di molti laboratori di seminologia, in particolare di quelli associati alle cliniche per il trattamento dell'infertilità.

La storia della criobiologia degli spermatozoi umani inizia alla fine degli anni '40. La scoperta che il glicerolo protegge gli spermatozoi dai danni da congelamento ha consentito di conservare gli spermatozoi umani in ghiaccio secco a -79°C [370-372]. Successivamente, è stato utilizzato l'azoto liquido e la crioconservazione del liquido seminale si è diffusa rapidamente in molti paesi con l'istituzione di banche del seme commerciali o di servizi nazionali coordinati [373-377].



La sopravvivenza delle cellule dopo il congelamento e lo scongelamento dipende in gran parte dalla capacità di ridurre al minimo la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari.



Diversi protocolli di crioconservazione sono attualmente utilizzati con diverse procedure di congelamento e crioprotettori. La sopravvivenza delle cellule dopo il congelamento e lo scongelamento dipende in gran parte dalla capacità di ridurre al minimo la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari. Questo viene fatto utilizzando adeguati crioprotettori e applicando velocità di raffreddamento e riscaldamento che riducono al minimo la quantità di acqua intracellulare soggetta alla formazione di ghiaccio [378-380]. Se gli spermatozoi permangono per lungo tempo al di sopra di -130°C (la temperatura di transizione vetrosa), in particolare durante il processo di scongelamento, può verificarsi una ricristallizzazione, con la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari potenzialmente dannosi. Ci sono due categorie di crioprotettori: permeabili, come il dimetilsolfossido (DMSO) e il glicerolo, e impermeabili, come albumine, destrani e citrato di tuorlo d'uovo.

Gli spermatozoi umani tollerano una serie di velocità di raffreddamento e riscaldamento. Non sono molto sensibili ai danni causati da un rapido raffreddamento iniziale (shock freddo), probabilmente a causa dell'alta fluidità della membrana dovuta agli acidi grassi insaturi del doppio strato lipidico [381]. Possono anche essere più resistenti di altre cellule ai danni della crioconservazione per il loro basso contenuto d'acqua (circa il 50%). Tuttavia, la crioconservazione ha un effetto negativo sulla funzionalità degli spermatozoi umani, in particolare sulla loro motilità. Dopo la crioconservazione, la percentuale di spermatozoi mobili può diminuire dal 50,6% al 30,3%, a seconda degli studi [382]. L'ottimizzazione del processo di crioconservazione probabilmente ridurrà al minimo questo danno.

I tassi di gravidanza dopo l'inseminazione artificiale con liquido seminale di donatore crioconservato sono spesso legati alla qualità degli spermatozoi dopo scongelamento al momento dell'inseminazione e anche ai fattori della ricevente, come l'età, precedenti gravidanze con inseminazione da donatore, disturbi ovulatori e delle tube uterine [383]. Se il seme viene conservato in condizioni adeguate, non c'è un deterioramento evidente della qualità degli spermatozoi con il tempo; sono nati bambini a seguito della fecondazione con liquido seminale conservato per oltre 28 anni [384, 385]. In casi selezionati (per esempio, quando sono presenti alti livelli di leucociti nell'eiaculato), è consigliata la selezione di spermatozoi altamente mobili (Capitolo 5, p. 161), in quanto può dare un migliore recupero [386].

6.2 Indicazioni per la crioconservazione degli spermatozoi

Si possono identificare due grandi aree di crioconservazione del liquido seminale umano: il futuro uso personale (ART omologa) e la conservazione da donatore in una banca del seme (ART eterologa).

Gli spermatozoi possono essere conservati per un uso futuro per una varietà di motivi in accordo con le linee guida nazionali [371]. In particolare, secondo l'American Society of Clinical Oncology, gli operatori sanitari dovrebbero sempre proporre la crioconservazione del liquido seminale a tutti i maschi post-puberale in età riproduttiva che devono affrontare una terapia per il cancro, poiché è l'unico trattamento efficace per questi pazienti [387]. Gli uomini dovrebbero anche essere informati di un potenziale maggior rischio genotossico nel liquido seminale raccolto dopo l'inizio della chemioterapia o della radioterapia, per cui la conservazione del liquido seminale in una banca del seme dovrebbe essere fatta prima. In alcuni casi, potrebbe essere necessario modificare la procedura di crioconservazione (Sezione 6.2.2, p. 173).

I dati attuali non evidenziano alcuna differenza importante tra l'uso di liquido seminale crioconservato o fresco durante l'ART [388-390], ma vale la pena menzionare che ci sono dati che riportano una maggiore frammentazione del DNA a seguito di crioconservazione [391].

6.2.1 Liquido seminale da donatore

Gli eiaculati di donatori sani, fertili o presunti fertili, possono essere conservati per un uso futuro. In molti paesi il seme del donatore deve essere messo in quarantena per 6 mesi in modo che su di esso si possano effettuare i test per le infezioni sessualmente trasmissibili, per accertare quindi che gli eiaculati dei donanti non contengano microrganismi come l'HIV. I donatori possono essere arruolati da una clini-

ca o da una banca del seme e i loro spermatozoi possono essere utilizzati in modo anonimo o meno, secondo le linee guida e le legislazioni nazionali. Gli spermatozoi dei donatori possono essere utilizzati per l'inseminazione artificiale, IUI, IVF o ICSI:

- per la partner di un uomo infertile che non ha spermatozoi vivi o spermatidi allungati adatti all'ICSI, o quando il trattamento è fallito o è troppo costoso;
- per prevenire la trasmissione di un disturbo ereditario;
- dopo aborti ricorrenti, laddove l'inseminazione con spermatozoi di donatori potrebbe portare a un successo della gravidanza;
- per le donne che desiderano concepire ma non hanno un partner maschile, in quei paesi dove è permesso.

La legislazione locale e nazionale riguardante lo screening genetico e delle infezioni dovrebbe essere sempre rispettata.

6.2.2 Conservazione della fertilità

Gli eiaculati possono essere ottenuti e conservati prima che un uomo si sottoponga a una procedura o a un'esposizione che potrebbe compromettere la sua fertilità, come per esempio:

- vasectomia (in caso di un futuro cambiamento della situazione della coppia o del desiderio di altri figli);
- trattamento con agenti citotossici o radioterapia, che può compromettere la spermatogenesi in modo permanente [387];
- professione pericolosa, per esempio nelle forze armate, in paesi dove la procreazione postuma è consentita o nel caso si verifichino lesioni genitali;
- adulti e adolescenti transgender maschio-femmina [392];
- trauma testicolare (in alcune circostanze dopo l'estrazione di spermatozoi testicolari, TESE) [393].



Nota 1: Per la conservazione della fertilità o il trattamento dell'infertilità, idealmente si dovrebbero conservare abbastanza campioni normali per 10 o più inseminazioni, per garantire buone possibilità di gravidanza.



Nota 2: Dato che è necessario solo un singolo spermatozoo per l'ICSI di ogni ovocita, è utile la crioconservazione di qualsiasi spermatozoo vivo.



Nota 3: La conservazione del liquido seminale raccolto prima di una procedura che possa potenzialmente indurre sterilità ha spesso un importante valore psicologico, perché dà la speranza di una futura paternità. Per i pazienti che stanno per sottoporsi a una terapia con agenti alchilanti o a radioterapia, il liquido seminale deve essere raccolto prima dell'inizio della terapia, a causa del rischio di mutagenesi negli spermatozoi. A tutti i pazienti che necessitano di chemioterapia o radioterapia, compresi gli adolescenti [394], dovrebbe essere offerta la possibilità di conservare gli spermatozoi.

6.2.3 Trattamento dell'infertilità

Gli spermatozoi possono essere conservati per i trattamenti, usando così i propri spermatozoi nelle IUI, IVF o ICSI, per esempio nei casi di:

- grave oligozoospermia o presenza a intermittenza nel liquido seminale di spermatozoi mobili (come supporto per la ICSI) [395], o nei soggetti Klinefelter (durante la pubertà) quando è possibile raccogliere un campione di liquido seminale [396];
- trattamento dell'infertilità che può non essere persistente, come nella chirurgia per l'ostruzione del tratto genitale o nel trattamento con gonadotropine per l'ipogonadismo ipotalamo-ipofisario;
- necessità di una raccolta speciale, come nell'eiaculazione assistita nei pazienti con lesioni del midollo spinale, spermatozoi nelle urine provenienti da eiaculazione retrograda o prelievo chirurgico dal tratto genitale;
- pazienti che non sono in grado di raccogliere il liquido seminale fresco il giorno della procedura ART, come per esempio:
 - uomini che non possono essere presenti nel laboratorio ART il giorno dell'inseminazione o che hanno difficoltà a raccogliere il liquido seminale per motivi psicologici;
 - uomini con azoospermia non ostruttiva che richiedono l'estrazione testicolare degli spermatozoi*;
 - uomini con lesioni del midollo spinale che richiedono l'estrazione testicolare degli spermatozoi;
 - uomini sottoposti a vasovasostomia o a vasoepididimostomia per azoospermia ostruttiva con aspirazione epididimaria microchirurgica o estrazione di spermatozoi testicolari per la conservazione della fertilità*.

* In questi casi, si dovrebbe seguire la procedura descritta nella **Sezione 6.4.2, p. 180**.

È stata anche sollevata la problematica che nelle coppie con un fattore maschile severo, l'ART con il liquido seminale del partner può avere molto meno successo dell'ART con il liquido seminale di un donatore [397].

6.2.4 Ridurre al minimo la trasmissione delle malattie infettive

Per gli uomini con HIV sottoposti a terapia antiretrovirale, i campioni con una carica virale non rilevabile possono essere conservati per IUI, IVF o ICSI, per tentare il concepimento riducendo così il rischio di trasmissione dell'HIV alla partner femminile. Allo stesso modo, per gli uomini che vogliono crioconservare il liquido seminale mentre sono sieropositivi per l'epatite B o C, per esempio, la carica virale dovrebbe essere controllata.

6.3 Valutazione dei rischi della crioconservazione e dello stoccaggio degli spermatozoi umani

La crioconservazione e il successivo stoccaggio di spermatozoi umani è un processo altamente complesso, che pone una speciale e potenziale responsabilità sul perso-

nale di laboratorio. Nel valutare i rischi associati alla crioconservazione e allo stoccaggio del liquido seminale, si dovrebbero considerare gli aspetti riportati di seguito.

6.3.1 Risorse

- Sicurezza fisica dei recipienti, dei campioni e della stanza dello stoccaggio, per ridurre il rischio di perdita per furto o incendio, difetti nelle paillettes, nelle vials e nei devices di crioconservazione, nella fornitura di azoto liquido.
- Idoneità dell'attrezzatura preposta all'uso.
- Sistema di contenimento e rimozione dell'azoto.
- I contenitori criogenici dovrebbero avere un dispositivo di allarme per la rilevazione del livello di azoto al di sotto di una certa soglia o per la temperatura al di sopra di una certa soglia. Il livello di allarme dovrebbe essere impostato in modo tale da fornire un avvertimento prima che si verifichi una situazione critica e l'allarme dovrebbe essere collegato a un call center che avvisi il personale della banca del seme.

6.3.2 Sicurezza e protezione del personale

- I dispositivi di protezione individuale dovrebbero essere sempre disponibili nella banca. Se possibile, due persone dovrebbero essere presenti contemporaneamente nella banca, in caso contrario, prima di entrare il personale esterno dovrebbe essere avvisato.
- Si consigliano sistemi di allarme per il rilevamento di bassi livelli di ossigeno atmosferico e azioni correttive a essi associate.

6.3.3 Rischio di contaminazione incrociata

Per ridurre il rischio di contaminazione incrociata con agenti infettivi tra i campioni conservati (per esempio, la trasmissione dell'HIV o del virus dell'epatite B (HBV) o C (HCV) attraverso un contenitore per crioconservazione), occorre considerare:

- tipo di contenitore: vials o paillettes e metodo di sigillatura delle paillettes (calore o polimero) e l'uso di un contenitore secondario (*straw-in-straw*);
- natura del recipiente di conservazione: azoto liquido o vapore;
- protocollo e metodo di conservazione dei campioni ad alto rischio (campioni contenenti o che si sospetta possano contenere virus); in questi casi, si raccomanda l'uso di aree e contenitori separati per ogni positività al virus;
- la crioconservazione di ogni paziente separatamente, disinfettando tutta la superficie alla fine di ogni procedura.

Altre precauzioni che possono essere attuate per evitare o limitare la contaminazione se le precauzioni sopra indicate non possono essere garantite:

- sterilizzazione dell'azoto liquido per evitare la contaminazione, utile in caso di vitrificazione dove il campione è direttamente immerso nell'azoto liquido [398];

- riempimento periodico dei contenitori o serbatoi di conservazione Dewar con azoto liquido sterile e decontaminazione annuale dei contenitori di congelamento;
- decontaminazione dei campioni congelati prima dello scongelamento;
- esecuzione di test per i virus e le infezioni sessualmente trasmissibili su tutti i maschi al momento del prelievo come segue (o secondo i regolamenti nazionali):
 - HIV 1 e 2 (utilizzando il test dell'acido nucleico (NAT), che testa anche gli anticorpi del gruppo O);
 - Test HBV per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), anticorpi totali contro l'antigene del core dell'epatite B (anti-HBc) (IgG e IgM) e un test NAT per l'HBV o una combinazione che include l'HBV;
 - HCV utilizzando anti-HCV e un test NAT per HCV;
 - *Treponema pallidum* (sifilide);
 - *Chlamydia trachomatis* (utilizzando i test preposti per il rilevamento in popolazioni asintomatiche e a bassa prevalenza);
 - *Neisseria gonorrhoea* (utilizzando i test preposti per il rilevamento in popolazioni asintomatiche e a bassa prevalenza);
 - virus T-linfotropo umano (HTLV), tipi I e II utilizzando anti-HTLV I/II;
 - citomegalovirus (CMV) utilizzando anti-CMV (totale e IgG e IgM).



Nota: Ai donatori di liquido seminale possono essere richiesti altri test secondo la legislazione nazionale.

6.3.4 Sicurezza dei campioni crioconservati

- Dividere i campioni e conservarli in criocontenitori separati e/o in luoghi diversi per ridurre il rischio di perdita totale.
- Doppio controllo dell'identità dei campioni a ogni passaggio.
- Usare marcature evidenti e codici di identificazione.
- Seguire procedure per l'audit regolare dell'uso del materiale e dei campioni in deposito.
- Dopo un uso prolungato, i contenitori criogenici possono essere contaminati. Dovrebbero quindi essere decontaminati periodicamente con soluzioni che non reagiscono con l'alluminio o l'acciaio. Si suggerisce una decontaminazione almeno una volta all'anno.
- Tutti i contenitori dovrebbero avere sistemi di allarme con sensori per monitorare la temperatura e il livello di azoto liquido. I sensori dovrebbero essere collegati a un allarme per avvisare il personale del laboratorio di eventuali problemi.

Fonti: [364, 377, 399, 400].



Nota 1: La conservazione stessa in fase di vapore piuttosto che in azoto liquido può ridurre il rischio di contaminazione incrociata. Tuttavia, possono essere presenti elevati gradienti di temperatura nei recipienti di stoccaggio a vapore, a seconda della forma, del carico del campione e del tipo di contenitori. Se viene utilizzata per lo stoccaggio la fase di vapore, assicurarsi che sia in un contenitore progettato per tale scopo e certificato secondo gli standard internazionali dei dispositivi medici.



Nota 2: Le paillettes di sicurezza in resina ionomerica termosaldabile sono disponibili per la conservazione in azoto liquido (paillettes ad alta sicurezza); sono a perfetta tenuta stagna, a prova di batteri e virus e meccanicamente resistenti a -196°C [364, 377, 400].

6.4 Protocolli di crioconservazione degli spermatozoi

Sono disponibili diversi protocolli di congelamento e di gestione del seme [377]. Diversi crioprotettori sono disponibili in commercio. I crioprotettori sono classificati come permeanti (il glicerolo è il più usato) e penetranti o non permeanti (come le molecole di zucchero e il tuorlo d'uovo). Possono essere usati sia crioprotettori che contengono tuorlo d'uovo (come estensori di liquido seminale) sia crioprotettori che non lo contengono [377]. I dettagli di un crioprotettore comunemente usato – glicerolo-tuorlo d'uovo-citrato (GEYC) – e le procedure di congelamento automatico o in vapori di azoto sono indicati di seguito.

Considerando che gli spermatozoi crioconservati possono essere utilizzati per generare embrioni, tutte le procedure dovrebbero, se possibile, essere eseguite sotto una cappa di classe A in un ambiente classificato (almeno D) secondo le linee guida internazionali sulle buone pratiche. I metodi e l'ambiente di congelamento, se al di sotto dello standard previsto, dovrebbero essere documentati, ma se consentito dalla legge, non sono una ragione per rifiutare di eseguire la crioconservazione.

6.4.1 Procedura standard

6.4.1.1 Preparazione del crioprotettore GEYC



Nota: Anche se i crioprotettori possono essere preparati in laboratorio, occorre precisare che le prestazioni della soluzione e la sua sicurezza non possono essere controllate con precisione. **Di solito ci si aspetta che, quando disponibili, vengano utilizzati crioprotettori prodotti commercialmente, certificati e approvati per uso terapeutico.** Questo è in particolare un problema per i crioprotettori a base di tuorlo d'uovo, poiché potrebbero essere presenti contaminanti provenienti dal mangime per polli o dall'ambiente. Le procedure descritte di seguito sono molto difficili da standardizzare a un livello adeguato per l'uso terapeutico nei locali dei laboratori di ART.

Preparazione del GEYC:

1. A 65 ml di acqua sterile purificata aggiungere 1,5 g di glucosio e 1,3 g di citrato di sodio tribasico diidrato.
2. Aggiungere 15 ml di glicerolo e miscelare accuratamente.

3. Aggiungere 1,3 g di glicina. Una volta sciolta, filtrare la soluzione attraverso un filtro a pori da 0,45 µm.
4. Aggiungere 20 ml di tuorlo d'uovo fresco (preferibilmente ottenuto da uova specifiche prive di patogeni), lavare l'uovo e rimuovere il guscio. Forare la membrana che circonda il tuorlo e aspirarlo in una siringa (si otterranno circa 10 ml di tuorlo per ogni uovo).
5. Mettere l'intera sospensione a bagnomaria a 56°C per 40 minuti e agitare di tanto in tanto.
6. Controllare il pH della soluzione. Se è al di fuori dell'intervallo 6,8-7,2, scartare la soluzione e prepararne una nuova, nel caso in cui siano stati aggiunti ingredienti o quantità errate.
7. La coltura batterica per il test di sterilità può essere eseguita in questa fase.
8. I test per la tossicità sugli spermatozoi possono essere eseguiti in questa fase.
9. Distribuire la soluzione in aliquote da 2 ml sotto cappa sterile e conservare a -70°C.
10. Utilizzare entro 3 mesi.

Sono disponibili in commercio crioprotettori simili al GEYC.

6.4.1.2 Aggiunta di crioprotettore al liquido seminale

1. Scongela il crioprotettore, riscaldare a temperatura ambiente e miscelare. Il riscaldamento iniziale a 37°C può essere utile.
2. Alte concentrazioni di glicerolo sono dannose per gli spermatozoi. È quindi fondamentale fare particolare attenzione quando si aggiunge e si miscela il crioprotettore con il seme.
3. Aggiungere un volume di crioprotettore GEYC a due volumi di seme, sia goccia a goccia, agitando, sia pipettando delicatamente su e giù, sia progressivamente in cinque aggiunte miscelando delicatamente per circa 10 minuti a temperatura ambiente.
4. Dopo che tutto il crioprotettore GEYC è stato aggiunto, incubare la miscela a 30-35°C per 5 minuti.

6.4.1.3 Riempimento delle paillettes con il liquido seminale

1. Le paillettes di plastica da 0,5 ml sono molto usate per le loro proprietà di trasferimento del calore e per la loro facilità di conservazione. Le vials di plastica possono essere usate per conservare volumi maggiori.
2. Aspirare la miscela seme-GEYC nelle paillettes di plastica da 0,5 ml per liquido seminale o metterla in vials criogeniche. Alcune paillettes commerciali sono dotate di un "imbuto di riempimento" monouso che evita che le estremità siano direttamente contaminate dal seme. Le paillettes possono essere riempite con un collettore su un dispositivo a sottovuoto o con un adattatore da inserire all'estremità della paillette. Si riempiono fino a quando il liquido non

tocca il filtro di ovatta, che impedirà alla paillette di svuotarsi quando si toglie l'aspirazione.

6.4.1.4 Sigillatura delle paillettes seminali

1. Lasciare 1 cm di aria nell'estremità inferiore picchiando l'estremità aperta della paillette. Se si usa una punta di riempimento, questo avverrà automaticamente.
2. Sigillare a caldo le paillettes alle due estremità usando un termosigillatore.
3. Asciugare l'esterno del contenitore e poi sterilizzare con alcol al 70% (v/v) o un altro decontaminante microbico.
4. Assicurarsi che le paillettes siano etichettate con i dettagli corretti del paziente/donatore e che siano ben sigillate alle due estremità in questa fase o prima di essa (**Sezione 6.4.3, p. 182**).

6.4.1.5 Raffreddamento e congelamento del liquido seminale in congelatori programmabili

Sono disponibili congelatori programmabili che controllano l'iniezione di vapore di azoto liquido nella camera di congelamento.

1. Mettere le paillettes o le vials criogeniche in un congelatore programmabile e seguire le istruzioni del produttore per attivare il programma.
2. Un programma comune è quello di raffreddare le paillettes a 1,5°C al minuto da 20°C a -6°C e poi a 6°C al minuto fino a -100°C. Quest'operazione richiede circa 40 minuti. La macchina conserverà poi la camera a -100°C per 30 minuti prima del trasferimento in azoto liquido.
3. Possono essere utilizzate altre e più complesse procedure, a seconda dell'esperienza dei singoli laboratori [401].

6.4.1.6 Raffreddamento e congelamento manuale del liquido seminale

I metodi manuali sono meno controllabili e standardizzabili dei congelatori programmabili, ma possono dare buoni risultati. Ci sono molte alternative a questa procedura.

1. Posizionare le paillettes in un congelatore (-20°C) per 30 minuti, poi in ghiaccio secco (-79°C) per 30 minuti prima di metterle in azoto liquido (-196°C).
2. Le paillettes possono essere trasferite dal congelatore a -20°C in un altro congelatore a -70°C, oppure in un contenitore o calice contenente una miscela di vapori di azoto liquido e aria, nel collo di un piccolo contenitore di azoto liquido da -80°C a -100°C per 10-15 minuti, prima di essere immerse in azoto liquido. Possono anche essere messe su un rack 10-20 cm sopra l'azoto liquido in un grande contenitore e lasciate per 1 ora per sviluppare un gradiente di temperatura sopra l'azoto liquido.

6.4.1.7 Congelamento rapido in vapori

Anche il congelamento rapido manuale in vapori può dare risultati adeguati.

1. Immergere le paillettes nei vapori di azoto liquido a circa 10 cm sopra il livello di N₂ (-80°C) per 8-10 minuti per permettere un lento congelamento iniziale. Per standardizzare il processo, si possono usare scatole disponibili in commercio con rack galleggianti per paillettes o per vials criogeniche, che mantengono una distanza fissa tra paillettes e azoto.

2. Immergere le paillettes nell'azoto liquido subito dopo.

6.4.1.8 Stoccaggio del liquido seminale congelato

1. Mettere le paillettes congelate in vials criogeniche di plastica per la conservazione (per esempio, mini-goblets, tubi su stecche o cassette per paillettes) e inserirle in calici più grandi per la conservazione.

2. Conservare i contenitori con le paillettes in contenitori criogenici di azoto liquido sottovuoto (Dewar).

6.4.1.9 Trasporto del seme congelato

Gli spermatozoi congelati possono essere trasportati in contenitori da trasporto disponibili in commercio, raffreddati con azoto liquido. A seconda delle dimensioni del contenitore, le temperature possono essere mantenute adeguatamente basse da diversi giorni a diverse settimane, mentre l'azoto liquido evapora.



Nota: Assicurarsi che vengano rispettate le normative locali, nazionali e internazionali sulla spedizione di azoto liquido e di campioni biologici umani.

6.4.1.10 Scongelo del seme congelato

1. Prima dell'uso, rimuovere dall'azoto liquido o dai vapori il numero delle paillettes o delle vials criogeniche necessarie e portarle immediatamente a 37 °C (in un incubatore, o meglio ancora in un termoblock che consente il riscaldamento a contatto, che può essere facilmente decontaminato tra un utilizzo e l'altro).

2. Dopo il completo scongelamento, tagliare l'estremità della paillette con forbici sterili e caricare il dispositivo di inseminazione (per uso terapeutico) o espellere il contenuto per determinare la motilità post-scongelo (per controllare il processo di congelamento).

3. Rimuovere il crioprotettore aggiungendo il mezzo di coltura prima della centrifugazione per 10 minuti a 500 g. Rimuovere il surnatante e diluire il pellet di spermatozoi nel terreno di coltura al volume appropriato [402].

Nel caso in cui i pazienti decidano di eliminare il loro seme crioconservato, le paillettes e/o le vials criogeniche devono essere rimosse e gettate in presenza di un testimone che confermi che si tratta del materiale corretto.

6.4.2 Protocolli di congelamento modificati per campioni oligozoospermici e spermatozoi recuperati chirurgicamente

L'eiaculato che contiene solo pochi spermatozoi mobili e le sospensioni di spermatozoi ottenute dal tratto genitale o dalla biopsia testicolare possono essere conservati per successive ICSI.

- Se devono essere crioconservati pochi spermatozoi, sono necessarie specifiche strategie, a seconda del campione.
- Dispositivi speciali sono disponibili in commercio per crioconservare anche un singolo spermatozoo, tuttavia molti di questi richiedono una micromanipolazione [403]. Tali dispositivi sono poi messi in vials criogeniche e conservati in azoto liquido secondo le raccomandazioni del produttore.
- In assenza di tali dispositivi, si raccomanda una strategia di congelamento in volume minimo.
- Liquidi di aspirazione epididimaria o testicolare contenenti spermatozoi e sospensioni di spermatozoi selezionati tramite swim-up o DGC da liquido seminale intero (**Sezione 5.4, p. 165** e **Sezione 5.5, p. 166**) e risospesi in un mezzo di preparazione spermatica con tampone HEPES e HSA (4 mg/ml) possono essere crioconservati con il crioprotettore glucosio glicerolo di Tyrode (TGG) o con un crioprotettore commerciale secondo le istruzioni del produttore.
- Il congelamento del tessuto testicolare intatto, per avere spermatozoi per un uso futuro, richiede protocolli specifici.

6.4.2.1 Crioprotettore modificato (TGG)

1. A 40 ml di soluzione sterile di Tyrode aggiungere 5 ml di albumina umana sterile (100 mg/ml), 0,9 g di glucosio e 5 ml di glicerolo. Filtrare la soluzione attraverso un filtro a pori da 0,45 µm.
2. Conservare in aliquote da 2 ml a -70°C.

Vedere la nota nella **Sezione 6.4.1.1, p. 177** per la preparazione in laboratorio del crioprotettore.

6.4.2.2 Procedura

1. Se il volume del campione è superiore a 2,0 ml e se sono presenti pochi spermatozoi mobili, centrifugare a 1.500 g per 5 minuti a temperatura ambiente.
2. Decantare il surnatante per lasciare circa 1,0 ml e risospendere gli spermatozoi in esso. Determinare la percentuale di spermatozoi mobili (PR+NP); se sono presenti pochissimi spermatozoi mobili, stimare il numero di cellule mobili sotto ogni vetrino coprioggetto.
3. Scongela un'aliquota di 2 ml di TGG o di Test Yolk buffer (TYB).
4. Aggiungere un volume di TGG o TYB a un volume di preparazione finale di liquido seminale, gradualmente, mescolando.
5. Riempire le paillettes o le vials criogeniche e congelare come sopra. Se qualche paillette non è piena, tappare il mini-goblet per evitare che le paillettes galleggino quando vengono congelate.

6.4.3 Etichettatura di paillettes/vials criogeniche e registrazione

È essenziale un efficiente sistema di codifica per etichettare le paillettes o le vials. Usare il codice in tutte le schede di laboratorio e nei database del computer per mantenere l'anonimato dei donatori. Conservare la chiave del codice con l'identità del donatore separatamente e in modo sicuro. Ci sono molti potenziali sistemi di codifica; il requisito importante è avere un codice unico di stoccaggio per ogni donatore o paziente. Nel caso di clienti/pazienti, è importante identificare ogni paillette/vial criogenica con il nome, la data di nascita, il numero dell'ospedale, la data di stoccaggio e qualsiasi altro requisito secondo la legislazione nazionale. Il seguente sistema di codifica funziona in modo soddisfacente.

- A ogni nuovo donatore anonimo viene assegnato un codice di due lettere (AA, AB, AC, BA, BB ecc. fino a ZZ dopodiché è necessario un nuovo metodo).
- Un sistema di codici a tre lettere è usato per i pazienti e i donatori noti: AAA, AAB ecc.
- Ogni campione di un particolare donatore è indicato da un numero che segue il suo codice personale. Per esempio, l'ottava donazione fatta dal donatore BT è etichettata BT-8.
- Il codice a lettere e il numero del campione devono essere scritti su ogni paillette o vial usando un pennarello nero indelebile. In alternativa, usare un'etichetta stampata con il nome e la data di nascita del paziente e la data di stoccaggio. Quest'etichetta dev'essere realizzata per l'uso in azoto liquido. Bisogna considerare se l'etichetta scelta potrebbe comprometersi nel tempo.
- I mini-goblets (o alternative) in cui sono conservate le paillettes dovrebbero avere anche un adesivo chiaro con il codice e il numero del campione, e dovrebbero contenere solo campioni di quel paziente raccolti in quell'occasione.
- Può anche essere utile per una rapida identificazione la codifica a colori delle vials più grandi con più campioni all'interno e dei mini-goblets.
- Man mano che si utilizzano gli spermatozoi stoccati, il conteggio delle paillettes o delle vials viene modificato nel database.



Nota: Tutte le procedure che coinvolgono l'identità dei campioni dei donatori o dei pazienti, inclusi l'accettazione dei campioni, la preparazione e la codifica delle paillettes, il posizionamento nei contenitori e lo scongelamento delle paillettes per l'uso o l'eliminazione, devono essere sottoposte al controllo incrociato di due persone e l'evidenza di questo controllo deve essere annotata nei registri del laboratorio. Praticamente un operatore dovrebbe trattare un solo campione di liquido seminale alla volta.

Tutti i campioni devono avere un codice che ne permetta l'identificazione durante la conservazione e il trasferimento dalla banca del seme al centro ricevente.

6.5 Vitrificazione

Studi recenti sembrano indicare che la vitrificazione possa essere un metodo valido per crioconservare gli spermatozoi eiaculati [404]. Il principio del metodo è il congelamento ultra-rapido di un piccolo volume di campione con contatto diretto

con azoto liquido privo di contaminanti, che dovrebbe prevenire la formazione di ghiaccio e ridurre il danno osmotico. È possibile anche la vitrificazione all'interno della paillette (vitrificazione aseptica), che utilizza un sistema chiuso e non richiede azoto liquido sterile. La vitrificazione può essere eseguita per il seme intero o per spermatozoi selezionati utilizzando estensori permeabili e impermeabili e può essere utilizzata per crioconservare un singolo spermatozoo o un basso numero di spermatozoi [405]. Al momento, tuttavia, vi è una scarsa evidenza che i parametri post-scongelo siano migliori dopo la vitrificazione rispetto ai metodi convenzionali [406], e dunque la vitrificazione degli spermatozoi dovrebbe essere considerata una procedura sperimentale.

6.5.1 Protocollo per la vitrificazione diretta

La vitrificazione, in combinazione con i cosiddetti dispositivi "aperti", richiede l'esposizione diretta del campione all'azoto liquido, e questa esposizione comporta ulteriori rischi di contaminazione. Si raccomanda sempre l'uso di azoto liquido sterile. La procedura può anche essere pericolosa per l'operatore, che dovrebbe sempre usare un'attrezzatura di protezione adeguata.

Materiali

- Crioprotettori.
- Azoto liquido sterile.
- Una scatola per l'azoto liquido.
- Un piccolo colino per raccogliere le sfere vitrificate.
- Vials criogeniche.

Metodo (da Isachenko et al., 2017 [404])

1. Dopo la diluizione con un volume uguale di estensore¹⁰, il liquido seminale viene immerso direttamente goccia a goccia nell'azoto liquido privo di contaminanti, utilizzando un contenitore monouso.
2. Le sfere ottenute sono poi raccolte in vials criogeniche, che vengono immediatamente immerse e conservate in azoto liquido.

6.5.2 Protocollo per la vitrificazione nella paillette (*in-straw*)

I metodi di vitrificazione *in-straw* (vitrificazione aseptica) utilizzano un sistema chiuso, in doppie paillettes (una dentro l'altra), completamente sigillate, essendo aseptico senza contatto diretto con l'azoto liquido, vitrificando un volume di campione più grande (100 ul) con un alto numero di spermatozoi [404, 407, 408]. Questa procedura è meno pericolosa per l'operatore.

Materiali

- Paillettes da 0,5 ml e 0,25 ml.
- Terreno di vitrificazione.

¹⁰ Il tipo di estensore, la temperatura del crioprotettore e il tempo in cui le cellule sono esposte al crioprotettore sono fondamentali e possono influenzare l'efficacia del processo.

- Una scatola per l'azoto liquido.
- Vials coniche da 10 ml.
- Terreno di riscaldamento.

Metodo

1. Preparare 1 ml di mezzo per la vitrificazione:

- terreno di lavaggio per il liquido seminale o HTF: 0,495 ml;
- 0,5 M di saccarosio sciolto in acqua (per esempio, MP Biomedicals, Cat. 152584): 0,495 ml;
- integratore di siero di destrano (per esempio, IrvineScientific, Cat. 9301): 0,010 ml.

2. Utilizzare spermatozoi selezionati (privi di plasma seminale) mediante swim-up o centrifugazione su gradiente di densità secondo i parametri seminali e i protocolli del laboratorio locale.

3. Dopo aver recuperato gli spermatozoi selezionati, eseguire una conta degli spermatozoi, concentrarli mediante centrifugazione (8-10 minuti a 300 g), rimuovere completamente il surnatante e aggiungere la quantità appropriata di terreno di vitrificazione per risospendere il pellet (calcolato come segue):

- Volume di sospensione da vitrificare per paillette (0,25 ml): 100 μ l.
- Concentrazione di spermatozoi per paillette: 0,1–3,0 $\times 10^6$ spermatozoi.

Esempio:

Spermatozoi recuperati: 15 $\times 10^6$ spermatozoi totali

Scopo per la conservazione: 3 $\times 10^6$ spermatozoi/100 μ l (volume per paillette)

1 ml = 30 $\times 10^6$ spermatozoi

X vol = 15 $\times 10^6$ spermatozoi recuperati

Quindi, X = 0,5 ml di terreno di vitrificazione (con 0,5 ml di terreno di vitrificazione, si otterranno 5 paillette da 100 μ l, ciascuna contenente 3 $\times 10^6$ spermatozoi).

4. Miscelare il pellet di spermatozoi con il terreno di vitrificazione solo immediatamente prima della vitrificazione (temperatura ambiente). Non è consigliabile esporre le cellule al mezzo di vitrificazione per lunghi periodi di tempo.

5. Una paillette da 0,25 ml deve essere tagliata a due terzi della sua lunghezza originale. Viene poi posizionata orizzontalmente e un'aliquota di 100 μ l viene dispensata, con l'aiuto di una pipetta, nell'estremità aperta. Nelle fasi successive è imperativo mantenere la posizione orizzontale in modo che l'aliquota non venga persa.

6. La paillette viene poi introdotta in una paillette da 0,5 ml, che viene termosaldata alle due estremità. La paillette deve essere immediatamente immersa in azoto liquido per 5 secondi in posizione orizzontale con l'aiuto di una pinza e conservata in azoto liquido.

Scongelamento dopo la procedura di vitrificazione

1. Preparare il terreno di scongelamento.

2. Scongelare il contenuto delle paillette/vials criogeniche in un terreno preriscaldato a 42-43°C.

Capitolo 7:

Assicurazione di qualità e controllo di qualità



7.1	Controllo di qualità nel laboratorio di andrologia	185
7.2	La natura degli errori nell'analisi del liquido seminale	188
7.3	Il programma di QA	190
7.4	Grafici QC per valori numerici	193
7.5	Grafici QC per valori percentuali	197
7.6	Valutazione delle carte X_{bar} e S	197
7.7	Procedure statistiche di analisi e registrazione della variabilità tra operatori	199
7.8	Controllo di qualità esterno e assicurazione di qualità	204
7.9	Frequenza e priorità del controllo di qualità	205
7.10	Formazione	206

L'assicurazione della qualità (QA) è alla base di un servizio di laboratorio che fornisce prestazioni affidabili agli utenti, ovvero medici e pazienti. Il controllo di qualità (QC) è un insieme di strumenti per determinare se le valutazioni stesse forniscono risultati affidabili, mentre la QA è un concetto più ampio e non riguarda solo le analisi. La QA comprende tutte le procedure che permettono al laboratorio di fornire servizi sicuri e affidabili. Pertanto, la QA include, tra le altre cose, le procedure per la condivisione delle informazioni con i pazienti e i medici di riferimento, i criteri per l'accettazione o il rifiuto, la distribuzione dei risultati e la gestione degli errori e delle contestazioni di tutti gli aspetti del laboratorio.



L'esame del liquido seminale è complesso e difficile da standardizzare; ciò può portare a importanti discrepanze nella valutazione della conta, motilità e morfologia degli spermatozoi fra i diversi laboratori.



7.1 Controllo di qualità nel laboratorio di andrologia

L'esame del liquido seminale è complesso e difficile da standardizzare; ciò può portare a importanti discrepanze nella valutazione della conta, motilità e morfologia degli spermatozoi fra i diversi laboratori [9, 409-413]. Tali discrepanze possono essere affrontate con procedure standardizzate e misure di controllo di qualità. Queste ultime possono rilevare e correggere gli errori sistematici e ridurre la variabilità tecnica dei risultati.

Per i laboratori medici, esiste uno standard internazionale generale, ISO 15189 [357], per identificare le procedure per la gestione della qualità del laboratorio e fornire un supporto per la certificazione del laboratorio da parte di un ente di accreditamento. In aggiunta alla norma ISO 15189, è in fase di sviluppo una norma tecnica basata sugli stessi principi di questo manuale dell'OMS da parte dell'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) per l'esame di base del liquido seminale, di prossima pubblicazione.

La QA di un laboratorio comporta il monitoraggio e la valutazione sistematica dei vari aspetti dei servizi e delle strutture del laboratorio per aumentare le probabilità che il programma raggiunga gli standard di qualità stabiliti.

Alcune definizioni sono di seguito riportate.

- **Obiettivo del laboratorio (standard di performance):** livello di prestazione desiderato per un servizio specifico, di solito misurabile in termini di tempo e quantità. Dichiara cosa ci si aspetta che il servizio di laboratorio fornisca.
- **Indicatore:** variabile che misura un aspetto di un servizio che è direttamente collegato agli obiettivi del laboratorio. Indica specificamente cosa misurare per valutare se gli obiettivi sono stati raggiunti.
- **Miglioramento della qualità:** approccio strutturato per analizzare le prestazioni e applicare criteri sistematici per migliorarle.
- **Controllo di qualità interno (IQC):** misura la variabilità dei risultati di laboratorio. È utile per rilevare la variazione casuale complessiva (precisione), così come qualsiasi differenza sistematica e casuale tra diversi individui che eseguono le analisi (Sezione 7.3.2, p. 191).
- **Controllo di qualità esterno (EQC):** confronti tra diversi laboratori per una o più misure. È utile per rilevare le variazioni sistematiche e valutare la precisione. È anche conosciuto come proficiency testing (PF) o valutazione o garanzia di qualità esterna (EQA).

I benefici attesi da un programma sulla qualità del laboratorio possono essere raggiunti solo se la qualità è ottimale in ogni fase del processo diagnostico.

Le attività di QC di un laboratorio iniziano con l'implementazione di procedure accurate e controllabili per le valutazioni, come descritto in questo manuale (Capitolo 2, p. 9). Oltre agli aspetti tecnici, bisogna prestare attenzione anche alle qualifiche del personale coinvolto e al monitoraggio delle prestazioni.

Tutti i laboratori che eseguono l'esame del liquido seminale dovrebbero attuare un programma di QA (Sezione 7.3, p. 190), che descrive gli obiettivi nei metodi e nelle procedure per garantire che i risultati siano affidabili, cioè accurati e precisi. A causa delle diffuse procedure di accreditamento legali, i programmi QA ed EQA sono già richiesti per legge in alcuni Paesi. In altri, i sistemi di assicurazione sanitaria richiedono la standardizzazione. Anche se in alcuni casi le risorse e le capacità locali disponibili potrebbero non permettere l'implementazione dell'intera gamma di procedure, le procedure di routine di base o standard dovrebbero essere monitorate da un controllo qualità interno o, quando possibile, esterno. Le procedure di routine di base (Capitolo 2, p. 9) dovrebbero comprendere i parametri fondamentali della conta o concentrazione degli spermatozoi, della morfologia e della motilità.

Diversi testi descrivono una gestione pratica, dettagliata, e una descrizione approfondita di un processo di QC in laboratorio [414].

Tabella 7.1 Terminologia di garanzia e controllo della qualità

Accuratezza	Grado di concordanza del risultato del test con il valore reale (o quanto è corretto il risultato)
Bias	Deviazione del risultato di un test dal valore assegnato; imprecisioni riproducibili che vanno costantemente nella stessa direzione (errore sistematico)
Buona pratica di laboratorio	Insieme di principi che fornisce un quadro all'interno del quale sono pianificati, eseguiti, monitorati, registrati, riportati e archiviati gli studi di laboratorio
Campioni prodotti per QC	Campioni disponibili in commercio, prodotti e analizzati secondo le linee guida di produzione
Carta di Bland-Altman	Grafico della differenza tra una serie di osservazioni appaiate verso il loro valore medio (asse x: media; asse y: differenza)
Carta di controllo	Grafico tempo-sequenza che mostra una serie di misure singole, con una linea centrale e limiti di controllo
Carta S	Grafico di controllo delle deviazioni standard dei valori misurati rispetto al tempo. Usato per monitorare l'uniformità del processo e la precisione della misurazione
Carta $X_{\bar{bar}}$	Grafico di controllo che mostra le medie dei valori misurati rispetto al tempo. Usato per monitorare la variabilità del processo e rilevare le modifiche a partire dai valori target (valuta l'accuratezza)
Causa speciale di variazione	Fonte di variazione grande, intermittente o imprevedibile, che riguarda solo alcuni dei valori individuali del processo in corso di studio (variazione casuale)
Ciclo di Shewhart	Vedere PDCA
Controllo di qualità interno (IQC)	Test di qualità che misurano la variabilità di una procedura esistente all'interno di un laboratorio; tali test valutano la precisione delle operazioni quotidiane; utili per rilevare variazioni casuali (valutare la precisione)
Deriva	Successive piccole variazioni nei valori che determinano nel tempo un cambiamento di precisione; vedere Bias
Distribuzione binomiale	Distribuzione teorica usata per eventi campione che rientrano in due categorie, per esempio, mobile/immobile, vitale/non vitale
Distribuzione di Poisson	Distribuzione teorica usata per modelli matematici
Errore casuale	Vedere Errore di campionamento (errore di precisione)
Errore di campionamento	Errore nella conta di un numero limitato di spermatozoi (inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero ottenuto); l'errore di campionamento (%SE) è l'errore standard di una conta (\sqrt{N}) espresso come percentuale della conta ($100 \times [\sqrt{N}/N]$)
Errore sistematico	Vedere Bias
Errore statistico di campionamento	Vedere Errore di campionamento
Fuori controllo	Un processo è fuori controllo quando il valore misurato supera i limiti di controllo attesi o è entro i limiti di controllo ma mostra una tendenza significativa nei valori; un processo che è fuori controllo deve essere valutato
Grafico di Cusum	Grafico che mostra la deviazione cumulativa (aggiunta) dal risultato target; uno strumento per l'allarme precoce di <i>bias</i> e <i>deriva</i>
Grafico di Youden	Grafico utilizzato per rappresentare i valori ottenuti da due campioni
Intervallo di confidenza del 95%	Intervallo calcolato a partire dai dati osservati che comprende il valore reale nel 95% dei replicati ($X\text{-bar} \pm 1,96 \times \text{errore standard (SE)}$ o $N \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ per i conteggi)

Accuratezza	Grado di concordanza del risultato del test con il valore reale (o quanto è corretto il risultato)
ISO	Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (www.iso.org), organismo che stabilisce norme internazionali, anche per la qualità in laboratorio
Limiti di controllo	Massima variazione consentita di un processo dovuta a sole cause comuni; la variazione oltre un limite di controllo è la prova che potrebbero esserci cause speciali che stanno influenzando il processo
PDCA	Plan, Do, Check, Act (pianifica, fai, controlla, agisci) (ciclo di Shewhart)
Precisione	Scarsa variabilità tra le misurazioni ripetute; comunemente espressa come imprecisione (deviazione, intra e inter dosaggio, lotto, analisi o variazione di laboratorio); le misure di precisione non sono influenzate da bias (vedere anche Errore di campionamento)
Procedure operative standard (SOP)	Insieme di istruzioni su come i processi e i metodi devono essere eseguiti
Sotto controllo	Un processo è sotto controllo quando tutti i valori rientrano nei limiti di controllo previsti
Test di competenza	Forma di EQA in cui un organismo esterno confronta i risultati di diversi laboratori e rilascia certificati quando sono soddisfatti i livelli stabiliti di prestazione (qualità)
Valore assegnato	Stime dei valori reali (spesso derivati dalla media dei risultati di un certo numero di laboratori) (valore target, valore di consenso, valore reale convenzionale)
Valore di consenso	Vedere Valore assegnato
Valore reale convenzionale	Vedere Valore assegnato
Valore target	Vedere Valore assegnato
Valutazione di qualità esterna (EQA)	Confronti, da parte di un ente esterno, dei risultati delle procedure eseguite localmente da diversi laboratori; utile per rilevare la variazione sistematica e valutare l'accuratezza
Variatione	Differenza tra i singoli risultati di un processo; la causa della variazione (errore) può essere comune o speciale
Variatione della causa comune	Fonte di variazione naturale che influenza tutti i singoli valori del processo in fase di studio

7.2 La natura degli errori nell'analisi del liquido seminale

Questa sezione si occupa del controllo della variazione dovuta a fattori tecnici (la variabilità biologica è discussa principalmente nel **Capitolo 2, p. 9** e nel **Capitolo 3, p. 83**).

La gestione delle procedure QC richiede una comprensione delle cause e dell'entità degli errori di misurazione. Ogni misurazione ha un grado di errore, la cui entità è definita da un intervallo di confidenza con un limite superiore e uno inferiore. Lo scopo delle procedure QC è quello di ridurre al minimo queste variazioni che potrebbero comportare errori nella cura e nella gestione del paziente. L'IQC si concentra maggiormente sull'imprecisione (variabilità) delle misure; l'EQA, invece, sull'accuratezza (correttezza) delle valutazioni di laboratorio. Seguire le procedure di qualità garantisce risultati più affidabili, veri e utili per i clinici e i ricercatori e sicuri per la cura e la gestione dei pazienti.

7.2.1 Variazione ammissibile (errore casuale accettato)

Ci sarà sempre un certo livello o grado di variazione ammissibile, espresso da un range accettabile di valori (entro i limiti inferiori e superiori del range). Questo inter-

vallo è solitamente definito dal calcolo di un intervallo di confidenza (CI). Il CI è un intervallo calcolato statisticamente. Il più comunemente usato è il CI 95%, dove "95%" significa che, statisticamente, è per il 95% probabile che il reale valore sia all'interno dell'intervallo. A seconda del numero di osservazioni, il CI al 95% è spesso vicino a circa \pm due volte la deviazione standard (SD). La SD è una misura della variazione delle valutazioni ripetute intorno alla media delle valutazioni. Per confrontare la variabilità, per esempio, tra alte e basse concentrazioni, può essere utile il coefficiente di variazione (CV). Il CV si calcola dividendo la SD con la media delle valutazioni, di solito espressa in percentuale (si noti che quando la media è vicina allo zero, il CV sarà molto alto (SD diviso quasi per zero) e praticamente inutile).

Quando i limiti superiore e inferiore dell'intervallo sono vicini, la misurazione può essere classificata come precisa. Un range stretto è il risultato di una bassa variazione tra le valutazioni ripetute. Se l'analisi produce un risultato che è vicino al valore reale o vero, il risultato è accurato (o corretto). La precisione è descritta come la differenza tra il risultato osservato e il risultato vero.

Gli errori possono essere classificati come casuali o sistematici.

7.2.1.1 Errori casuali

Gli errori casuali danno risultati che si discostano dal valore vero atteso, che a volte può essere più alto, a volte più basso. Gli errori casuali sono spesso causati da differenze nella lettura o nel campionamento e possono essere valutati da misurazioni ripetute sullo stesso campione, dallo stesso osservatore e utilizzando la stessa attrezzatura, o da tutti i membri del personale che eseguono la valutazione specifica con tutte le attrezzature utilizzate nel laboratorio per quella valutazione. L'aspettativa è che i valori non dovrebbero variare molto l'uno dall'altro.

7.2.1.2 Errori sistematici

Gli errori sistematici, chiamati anche "bias", possono essere più insidiosi. Sono dovuti a fattori procedurali che prevedibilmente causano, durante le osservazioni di raccolta dei dati, lo stesso tipo di errore oppure un errore che va sempre nella stessa direzione. Pertanto, gli errori sistematici non vengono rilevati con misurazioni ripetute.

7.2.2 Errore statistico di campionamento

Anche se un eiaculato è macroscopicamente ben miscelato, gli spermatozoi possono avere ancora qualche variazione casuale nella loro distribuzione, così come in un fissativo o in un terreno di coltura. Poiché è tecnicamente e praticamente impossibile avere il conteggio di un intero eiaculato, le misurazioni manuali o computerizzate vengono eseguite su un numero limitato di spermatozoi che si presume essere rappresentativo dell'intero campione. Il problema è quanto l'aliquota (campione) dell'eiaculato (o una sospensione di liquido seminale) rappresenti l'intero eiaculato. La variazione nel campionamento generata dalla selezione di un volume fisso (per stimare la concentrazione) o di un numero fisso di spermatozoi (per classificare la motilità, la morfologia o la vitalità) è un errore casuale comunemente chiamato errore di campionamento (statistico). Alcuni termini comunemente usati in quest'ambito sono riportati nella **Tabella 7.1, p. 187**.

7.2.3 Ridurre al minimo l'errore statistico di campionamento

Non è possibile valutare l'intero campione. Un'opzione potrebbe essere quella di esaminare porzioni più piccole del campione, auspicabilmente rappresentative, in un numero elevato di replicati. Anche in questo caso, però, la valutazione sarebbe troppo lunga ed estenuante, e quindi non fattibile. Pertanto, è necessario un equilibrio tra il guadagno in precisione statistica (affidabilità del risultato) e il tempo effettivo e lo sforzo necessari per ottenerlo. Per raggiungere un equilibrio accettabile tra il carico di lavoro e l'affidabilità dei risultati, in questo manuale si suggeriscono le seguenti raccomandazioni (vedi anche **Capitolo 2, p. 9**):

- pipette a spostamento positivo per prelevare il corretto volume di eiaculato utilizzato per le diluizioni per la valutazione della concentrazione del liquido seminale;
- diluizioni (immobilizzazione degli spermatozoi) e volume della camera di conteggio (volume esatto che viene valutato) per facilitare una valutazione affidabile della concentrazione degli spermatozoi;
- confronto delle valutazioni ripetute della concentrazione e della motilità degli spermatozoi per ridurre il rischio di errori a causa di aliquote poco rappresentative;
- profondità del preparato a fresco sufficiente a garantire una motilità adeguata degli spermatozoi;
- numero sufficiente di spermatozoi valutati (400 per motilità e concentrazione; 200 per vitalità e morfologia) per ridurre l'influenza della distribuzione casuale.

Quando si determina l'errore statistico di campionamento in un laboratorio, di solito viene presentato con intervalli di confidenza, abitualmente fissati al 95% (con un intervallo superiore e uno inferiore). Questo significa che c'è un 5% di possibilità che i risultati corretti non siano all'interno del "range accettabile" a causa della sola variazione casuale. Se un risultato corretto viene rifiutato per questo motivo, la valutazione sarà ripetuta inutilmente. La logica è che la maggior parte dei risultati rifiutati sia da attribuire a errori di campionamento. In molti casi, la frequenza delle valutazioni ripetute non necessarie può essere accettabile. In alternativa, si potrebbero scegliere limiti più ampi (per esempio, $2,6\times$ o $3\times$ di deviazione standard, invece del solito livello $2\times$) per ridurre la frequenza delle valutazioni ripetute non necessarie (a circa l'1% e lo 0,2%, rispettivamente, invece del 5%), correndo il rischio di accettare più errori.

7.3 Il programma di QA

Le procedure per la gestione della qualità di un laboratorio sono definite dall'ISO 15189 [357]. Un aspetto importante per rispettare lo standard e raggiungere risultati accettabili è lo sviluppo e l'implementazione di un programma continuo di QA che consente di valutare, su base regolare, la qualità e l'adeguatezza dei dati e dei servizi che il laboratorio fornisce. Include generalmente la gestione, l'analisi statistica e le azioni preventive e correttive. Il monitoraggio continuo non solo rileva e corregge i problemi, ma è anche in grado di attuare misure che aiutano a prevenire il verificarsi di questi problemi. Il programma di QA dovrebbe essere descritto in un manuale di qualità contenente procedure operative standard (SOP) e una serie dettagliata di istruzioni per i diversi processi e metodi utilizzati nel laboratorio. Legata a tali istruzioni c'è una serie di moduli e documenti, tra cui, per esempio, le note di rinvio, i moduli di riferimento per le relazioni di laboratorio e gli opuscoli informativi

per i pazienti e i clinici di riferimento. Il manuale della qualità descrive la struttura organizzativa del laboratorio, elencando le competenze richieste (formazione) necessarie nelle diverse posizioni (mansionario), così come gli orari degli incontri tra il personale addetto ai test e i supervisori, i piani per l'educazione continua, lo sviluppo e la formazione del personale.

7.3.1 Manuale delle procedure di laboratorio

Tutte le procedure che regolano le attività di un laboratorio devono essere descritte in un manuale. Le SOP scritte, oltre a essere seguite rigorosamente da tutti gli operatori di laboratorio, sono anche utili per la formazione e per i processi di risoluzione dei problemi che non producono risultati accettabili.

Questi protocolli includono le note di riferimento, le procedure di informazione del paziente, gli orari degli appuntamenti dei pazienti, la raccolta dei campioni, l'esecuzione dei test, il reporting dei risultati analitici, le procedure per i test di qualità, la formazione dei nuovi membri del personale di laboratorio, i test, il monitoraggio e la manutenzione delle attrezzature, l'uso delle tabelle di controllo e le procedure da seguire quando i valori di queste tabelle indicano un problema (test fuori controllo) e l'interpretazione dei risultati dei test. Le SOP dovrebbero riguardare le procedure per verificare che tutta l'attrezzatura sia in condizioni operative adeguate, compresi il controllo di routine delle procedure, il calendario e il registro di taratura, la documentazione sulla manutenzione delle attrezzature scientifiche, come microscopi, centrifughe, pipette, bilance, congelatori, frigoriferi e attrezzature di emergenza (per esempio, colliri e docce). Il metodo di base è quello di tenere per ogni attrezzatura un registro in cui siano riportate tutte le regolazioni e le tarature, seguendo liste di controllo o strumenti di monitoraggio. Questi registri sono utili se una procedura di laboratorio inizia a produrre risultati fuori controllo.

7.3.2 Controllo di qualità interno

L'IQC verifica la precisione – o quanto siano riproducibili i risultati (minimizzando le variazioni casuali) – e quindi indica, attraverso i risultati al di fuori dei limiti di controllo stabiliti, quando il test può essere non attendibile o avere problemi. La procedura QC utilizzata dipende dalla valutazione da monitorare o controllare. Le valutazioni che implicano la diluizione, il pipettamento o il riutilizzo di camere, o che comunque prevedono un certo numero di passaggi, richiedono test regolari o più frequenti, mentre la valutazione di un vetrino fisso o di un video può essere testata meno spesso, poiché ci sono meno passaggi in cui possono verificarsi errori.

Un modo pratico per implementare l'IQC è quello di includere le procedure e i campioni di IQC nel carico di lavoro quotidiano del laboratorio e di monitorare i risultati di queste procedure utilizzando carte di controllo. In questo modo, l'IQC diventa parte della routine del laboratorio e viene condotto secondo gli standard locali o regionali stabiliti. È importante che i campioni del QC siano analizzati come parte del lavoro di routine del laboratorio e non trattati in modo speciale. I vari materiali per l'IQC utilizzati per monitorare la variazione intra-operatore (in relazione alla coerenza nella lettura dello stesso tipo di campione da parte di una singola persona) e tra operatori (in relazione alla coerenza tra la lettura o l'interpretazione della lettura dello stesso campione da parte di due o più persone) possono essere acquistati o realizzati in laboratorio. Per ogni approccio esistono vantaggi e svantaggi.

7.3.2.1 Campioni per il QC acquistati

I campioni IQC disponibili in commercio sono dotati di un valore medio con limiti di variazione stabiliti per ogni prodotto. Il vantaggio di questi campioni è che possono essere valutate sia l'accuratezza che la precisione. La variazione dei risultati dell'analisi del liquido seminale in laboratorio può essere confrontata con la variazione associata ai campioni provenienti da una fonte conosciuta. Con tali campioni, il laboratorio dovrebbe stabilire una propria tabella di controllo per valutare la precisione e dovrebbe utilizzare l'intervallo raccomandato dal produttore per valutare la precisione [415]. I singoli centri possono anche perseguire livelli di valori più rigorosi. Gli svantaggi di acquistare campioni IQC sono i costi elevati, il fatto che non sono universalmente disponibili, la stabilità dei campioni durante la spedizione e la conservazione. Dovrebbe essere sempre disponibile, inoltre, una nota su come sono stati ottenuti (valutazioni multiple, CASA, valori di consenso, medie arrotondate ecc.) i valori di riferimento dati dal produttore.

7.3.2.2 Campioni per il QC realizzati in laboratorio

I vantaggi dei campioni per l'IQC prodotti in laboratorio sono i costi ridotti e il fatto che i campioni possono essere preparati per le specifiche esigenze del laboratorio. Inoltre, i campioni non sarebbero diversi da quelli di routine. Molti campioni, che comprendono una vasta gamma di risultati, possono essere preparati e conservati per lunghi periodi. Il loro svantaggio è che i valori di riferimento sono sconosciuti, il che può portare a bias o errori sistematici. Si raccomanda, e a volte si richiede, che ci siano campioni di controllo per valutare un intervallo medio di valori (per esempio, concentrazione degli spermatozoi $50 \times 10^6/\text{ml}$), nonché un intervallo di valori critico (per esempio, concentrazione degli spermatozoi $< 15 \times 10^6/\text{ml}$). Misurazioni ripetute del campione possono dare una media che si avvicina al valore reale per questo materiale.

7.3.2.3 Campioni conservati (acquistati o prodotti in laboratorio)

I campioni di liquido seminale conservati possono essere utilizzati nei programmi IQC per valutare la concentrazione e la morfologia nemaspermica. Hanno il vantaggio che il valore di riferimento è noto (per i campioni acquistati), fornito (dai programmi EQC) o stimato da valutazioni multiple (per il materiale prodotto in laboratorio), in modo che gli errori sistematici possano essere rilevati con misure ripetute.

Concentrazione spermatica

I campioni di liquido seminale con diverse concentrazioni di spermatozoi possono essere diluiti e conservati. I campioni conservati possono comprendere una vasta gamma, da quelli con valori ideali o di buona qualità a quelli di bassa qualità o difficili da valutare. Vedere **Sezione 8.6.3, p. 240** per le istruzioni sulla preparazione e la conservazione delle sospensioni di liquido seminale senza agglutinazioni per il QC per valutare la concentrazione nemaspermica.

Morfologia e vitalità degli spermatozoi

Per la morfologia, possono essere utilizzati vetrini di strisci seminali fissati e asciugati all'aria o di strisci seminali fissati e colorati (**Sezione 2.4.9.1, p. 43**), mentre per la vitalità strisci di eosina-nigrosina (**Sezione 2.4.7, p. 26**). Gli strisci dovrebbero essere scelti tra i campioni di routine del laboratorio, con codici di identificazione occultati, e analizzati (tenendo presenti le considerazioni riportate nella sezione **Classificazione della morfologia nemaspermica, p. 48**). I campioni devono essere preparati da eiaculati di buona, media e bassa qualità. I vetrini possono essere riutilizzati, ma la qualità deve essere valutata di volta in volta. È meglio usare un'ampia serie di vetrini per eliminare la possibilità che gli operatori familiarizzino con certi vetrini e siano perciò meno rigorosi nella valutazione, che comporterebbe analisi errate.

Vedere **Sezione 8.6.4, p. 243** su come preparare i vetrini per il QC della valutazione morfologica. Se i vetrini sono preparati e conservati correttamente, rimangono stabili per molti mesi o addirittura anni. Diversi set di vetrini possono essere alternati o sovrapposti l'uno all'altro durante il passaggio da un set di QC all'altro.

Motilità degli spermatozoi

Per il QC possono essere utilizzati campioni videoregistrati su CD, DVD o piattaforme multimediali condivise, provenienti dalla clinica, da distribuzioni EQA o realizzati appositamente. Le registrazioni video dovrebbero avere un ingrandimento e una risoluzione simili a quelli osservati al microscopio quando si analizzano i campioni reali. L'uso di una telecamera al microscopio e di uno schermo video per tutte le valutazioni quotidiane di routine, con lo stesso ingrandimento e contrasto delle registrazioni video, aumenta la validità delle registrazioni video per il QC.

Vedere **Sezione 8.6.2, p. 235** su come effettuare registrazioni video per il QC delle misurazioni della motilità.

7.3.2.4 Campioni freschi per il QC (prodotti in laboratorio)

Un metodo semplice per l'IQC è che uno o più operatori effettuino letture o misurazioni replicate su aliquote diverse di un campione di liquido seminale. Le valutazioni dei replicati devono essere eseguite allo stesso modo delle analisi di routine del liquido seminale. Questa forma di QC può essere applicata alle valutazioni della concentrazione, della morfologia, della vitalità e, in una certa misura, della motilità degli spermatozoi (vedere capoverso successivo). La natura soggettiva delle valutazioni di agglutinazione e di aggregazione e la variabilità del test di reazione mista all'antiglobulina [416], insieme con la necessità di gameti vivi e controlli positivi, rendono il QC difficile per questi test.

L'IQC della misurazione della motilità degli spermatozoi in campioni a fresco presenta problemi particolari, poiché la motilità spesso diminuisce nel tempo e quindi deve essere valutata per prima – e più o meno nello stesso momento – da tutti gli operatori in un programma di QC. Le letture di misurazione diventerebbero così più basse nei campioni che vengono letti dopo un periodo di tempo o molto tempo dopo la raccolta del campione. I preparati di vetrini e coprioggetto per la motilità sono stabili solo per pochi minuti, quindi si possono usare anche camere a profondità fissa, che possono essere stabili per 30 minuti, purché le valutazioni non siano fatte con una differenza di tempo troppo grande dopo l'eiaculazione e a temperature diverse. L'uso di un microscopio a ponte, o di un microscopio con una telecamera collegata a uno o più schermi, permette a diversi operatori di valutare lo stesso campo dello stesso preparato allo stesso tempo. Questo è particolarmente utile durante la formazione iniziale. Una griglia di acetato può essere posizionata sopra il monitor per mimare la griglia dell'oculare utilizzata durante l'analisi a fresco della motilità (**Sezione 8.6.2, p. 235**).

I laboratori che utilizzano i sistemi CASA dovrebbero seguire le procedure dei produttori per condurre il QC. Questo spesso comporta la riproduzione di immagini memorizzate di spermatozoi in movimento che sono identificati perché dotati di determinati tipi di velocità.

7.4 Grafici QC per valori numerici

Questa sezione descrive i modi per mostrare e analizzare i valori numerici, in particolare per i "dati continui" (principalmente la conta degli spermatozoi). Per le percentuali, si devono usare metodi leggermente diversi.

La creazione e l'interpretazione dei cosiddetti diagrammi di controllo sono parte integrante della QA in laboratorio. Per ottenere una visualizzazione ben organizzata e facile da capire dei dati QC, ci sono diversi grafici o diagrammi disponibili che presentano diversi vantaggi, per cui la scelta dovrebbe essere basata sull'accuratezza, precisione o errori e sul materiale disponibile. Se il laboratorio manca di competenza nelle statistiche e nell'interpretazione dei risultati, è essenziale ricorrere a competenze esterne per garantire che gli standard di laboratorio possano essere monitorati con un sistema di QA continuo. Le teorie statistiche e i calcoli che seguono possono essere complessi, ma i grafici sono abbastanza facili da capire e interpretare.

7.4.1 Carta $X_{\bar{a}}$

Un diagramma da utilizzare è la carta $X_{\bar{a}}$, che è progettata principalmente per rilevare risultati che si discostano molto dal valore target o per rilevare un aumento complessivo della variazione. Gli errori sistematici possono essere rilevati attraverso la misurazione sequenziale degli stessi campioni. Vengono effettuate ripetute misurazioni su un campione e il valore medio viene riportato in funzione del tempo o a fine prova. È necessario utilizzare campioni conservati, poiché la procedura dipende dalla conoscenza del valore reale o target, che può essere fornito dal produttore (campioni acquistati) o da un programma EQA o stimato (con valutazioni multiple del materiale).

La carta $X_{\bar{a}}$ è un tipo di diagramma di Shewhart che viene utilizzato per monitorare i valori medi di analisi ripetute di un numero costante di campioni test. Per esempio, in 10 sospensioni IQC (tutte provenienti da una preparazione) la conta nemaspermica è fatta da tutti i membri del personale che eseguono i tipi di valutazione. Per ciascuna delle sospensioni viene calcolata la media delle misurazioni delle singole valutazioni. Poi viene fatto un grafico delle medie delle 10 sospensioni (Figura 7.1). Vengono calcolati il valore target ($X_{\bar{a}}$, media dei valori medi), i limiti di allarme e i limiti di azione (Tabella 7.2). I limiti sono basati sulla variazione delle valutazioni e sul numero di persone che fanno le valutazioni, e sono espressi come limiti superiori e inferiori alla $X_{\bar{a}}$.

Tabella 7.2 Calcoli dei valori per una carta $X_{\bar{a}}$

Concentrazione nemaspermica valutata da quattro andrologi (A-D) su 10 sospensioni QC da una preparazione IQC. I limiti di allarme (A_2) e i limiti di azione (A_3) sono visualizzati nella Tabella 7.3.

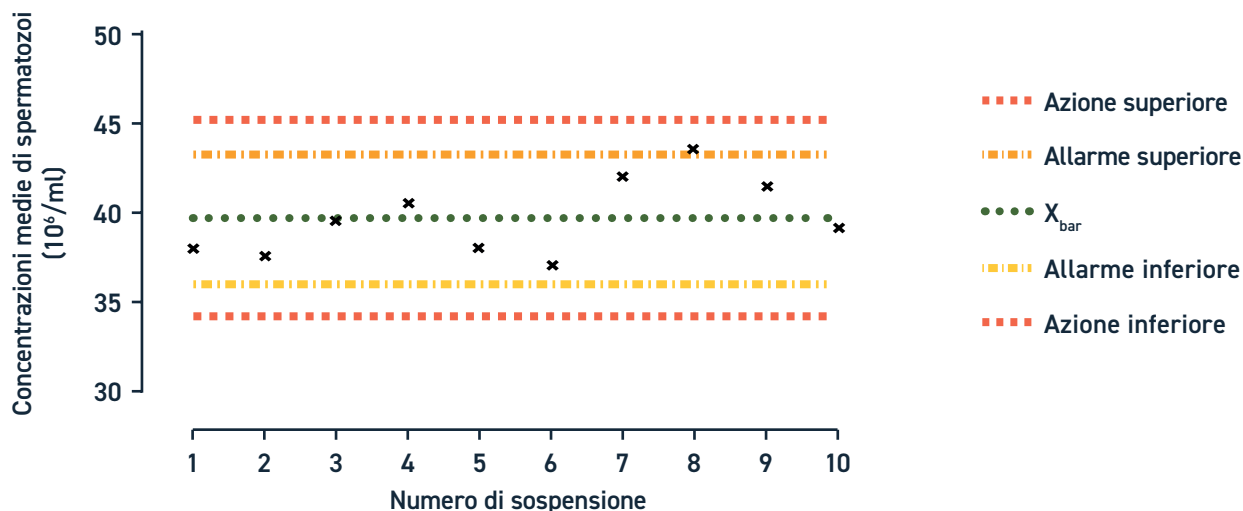
Operatore	Sospensione									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	38	35	40	34	38	36	44	43	39	43
B	42	36	42	40	40	40	43	43	46	40
C	38	43	40	51	38	33	39	45	35	39
D	34	36	36	37	36	39	42	43	46	34
media	38,0	37,5	39,5	40,5	38,0	37,0	42,0	43,5	41,5	39,0
SD	3,27	3,70	2,52	7,42	1,63	3,16	2,16	1,00	5,45	3,74
$X_{\bar{a}}$	39,7									
S	3,40									

		Sospensione									
Operatore		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Allarme						X_{bar}	A_2	S_{bar}			
	Superiore	43,3		$X_{\text{bar}} + (A_2 \times S_{\text{bar}})$		39,7	1,085	3,40			
	Inferiore	36,0		$X_{\text{bar}} - (A_2 \times S_{\text{bar}})$		39,7	1,085	3,40			
Azione						X_{bar}	A_3	S_{bar}			
	Superiore	45,2		$X_{\text{bar}} + (A_3 \times S_{\text{bar}})$		39,7	1,628	3,40			
	Inferiore	34,1		$X_{\text{bar}} - (A_3 \times S_{\text{bar}})$		39,7	1,628	3,40			

Tabella 7.3 Fattori necessari per il calcolo dei limiti di allarme e di azione per la carta X_{bar}

Numero di operatori (n)	Limite di allarme (A_2)	Limite di azione (A_3)
2	1,772	2,659
3	1,303	1,954
4	1,085	1,628
5	0,952	1,427
6	0,858	1,287
7	0,788	1,182
8	0,733	1,099
9	0,688	1,032
10	0,650	0,975

Figura 7.1 Una carta X_{bar} basata sui dati della Tabella 7.2



La carta X_{bar} è meno sensibile della carta S nel rilevare se gli operatori stanno producendo risultati con alta variabilità (Sezione 7.4.2, p. 196).

7.4.2 La carta S

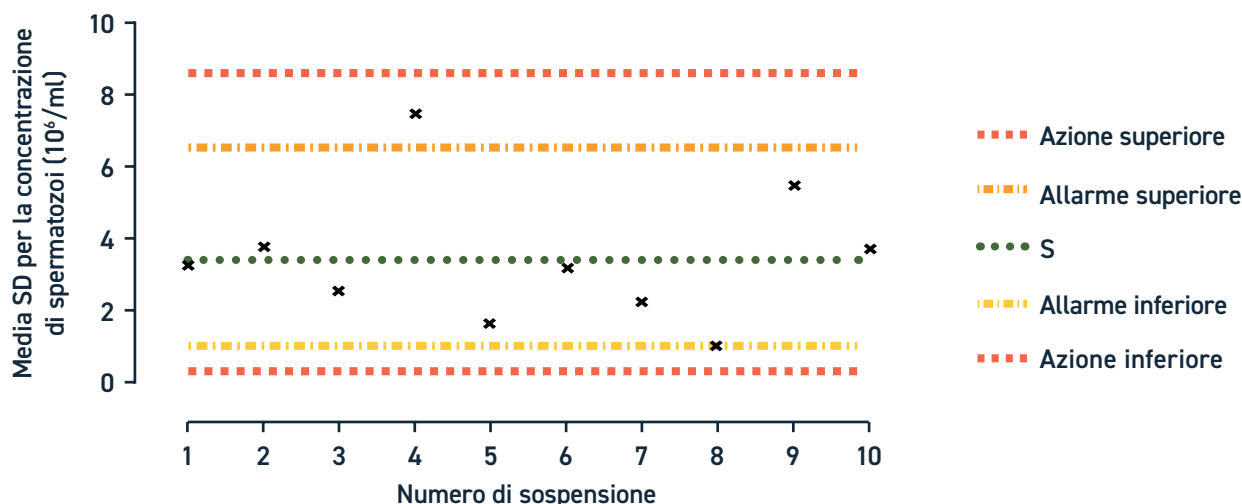
La carta S rileva se gli operatori stanno producendo risultati con alta variabilità. Vengono eseguite misurazioni ripetute e la deviazione standard viene tracciata per ogni soluzione di liquido seminale valutata. Poiché i campioni di QC provengono tutti dallo stesso pool stoccato, non si aspettano differenze tra i campioni, quindi qualsiasi differenza significativa tra gli operatori dovrebbe suggerire un errore sistematico nella valutazione da parte di uno o più operatori.

A differenza della carta X_{bar} , sono i valori SD delle valutazioni delle 10 sospensioni a essere tracciati nella carta S (Figura 7.2). Il valore target è la media SD di tutte le sospensioni (in questo esempio, $3,40 \times 10^6/\text{ml}$). Analogamente alla carta X_{bar} , anche nella carta S vengono inseriti i limiti di controllo. Tuttavia, i limiti di allarme e di azione sono calcolati in modo diverso rispetto alla carta X_{bar} (Tabella 7.4). I risultati che rientrano al di sotto dei limiti inferiori della carta S suggeriscono una variazione inaspettatamente piccola, che può indicare un reale miglioramento del livello di accordo tra gli operatori o, nel peggiore dei casi, una manipolazione inappropriata dei dati.

Tabella 7.4 Calcolo dei limiti di allarme e di azione per la carta S

Limiti di controllo della carta S e numero di valutatori				
Numero di operatori (n)	Limite di azione inferiore ($s_{0,999}$)	Limite di allarme inferiore ($S_{0,975}$)	Limite di allarme superiore ($S_{0,025}$)	Limite di azione superiore ($S_{0,001}$)
2	0,002	0,039	2,809	4,124
3	0,036	0,18	2,167	2,966
4	0,098	0,291	1,916	2,527
5	0,160	0,370	1,776	2,286
6	0,215	0,428	1,684	2,129
7	0,263	0,473	1,618	2,017
8	0,303	0,509	1,567	1,932
9	0,338	0,539	1,527	1,864
10	0,368	0,563	1,495	1,809
Allarme	$\times 10^6/\text{ml}$			n
Superiore	6,51		$S \times S_{0,025}$	4
Inferiore	0,99		$S \times S_{0,975}$	4
Azione				
Superiore	8,59		$S \times S_{0,999}$	4
Inferiore	0,33		$S \times S_{0,999}$	4

Figura 7.2 Carta S per la concentrazione di spermatozoi



7.5 Grafici QC per valori percentuali

A differenza del QC per i dati continui o numerici, i risultati che mostrano categorie o classi devono usare misure diverse per il calcolo dei limiti di controllo. Quando gli spermatozoi sono classificati in due o più classi (come morfologia normale o anormale, le quattro classi di motilità, spermatozoi vivi o morti), l'errore standard della percentuale stimata all'interno di una classe dipende sia dalla percentuale reale, ma sconosciuta, sia dal numero di spermatozoi contati (N). La percentuale target (p) è calcolata come media di valutazioni ripetute dello stesso campione di test. L'errore standard (variabilità) della percentuale può, per una percentuale tra il 20% e l'80%, essere approssimato a $\sqrt{p(100-p)/N}$. Per i dettagli, vedere Kuster et al., 2004 [417]. Mentre la SD delle letture individuali dovrebbe essere vicina a questi valori, la SD media, S_{bar} , li supererà del 2,5% a causa della variazione aggiuntiva tra gli operatori. In questo caso l'obiettivo sarà quello di ridurre S_{bar} .

7.6 Valutazione delle carte X_{bar} e S

Avere una buona conformità con entrambe le carte X_{bar} e S è importante, poiché possono dare indicazioni significative sulla qualità del servizio fornito dal laboratorio. Inoltre, tali diagrammi forniscono spesso la base per la certificazione dei laboratori da parte di molte agenzie.

Il personale del laboratorio e il supervisore dovrebbero rivedere insieme i diagrammi di controllo. L'ideale sarebbe farlo attraverso riunioni regolari sulla qualità con il personale e il supervisore, poiché il risultato della qualità è uno sforzo di squadra basato sulla valutazione e la discussione congiunte delle prestazioni del laboratorio. Se i valori di controllo non sono accettabili, si dovrebbe condurre una valutazione sistematica dell'intera procedura per determinare le possibili cause di variazione.

7.6.1 Come riconoscere i valori fuori controllo

Ci sono linee guida di base per il controllo del QC delle procedure [414]. Si dovrebbero esaminare i grafici QC alla luce di queste linee guida e intervenire quando indicato. Ci sono varie regole per definire un metodo fuori controllo; le più importanti

sono riportate nella **Tabella 7.5**. In pratica, è generalmente accettato l'uso della prima e dell'ultima di queste regole. La prima regola (un risultato al di fuori dei limiti di controllo dell'azione) è la più semplice. Può indicare un'improvvisa variazione nel processo. L'ultima regola (otto risultati consecutivi, tutti al di sopra o al di sotto della media) è interessante perché è semplice da applicare e sensibile alle variazioni graduali o alle tendenze che si potrebbero perdere con la prima regola.

Se il campione QC è "riferuto", la sensibilità (la capacità di riportare i valori veri e corretti del test) di allarme per i diversi tipi di errore (casuale o sistematico) dovrebbe guidare l'indagine sulle possibili cause (**Tabella 7.5**). Il responsabile del laboratorio dovrebbe esaminare regolarmente i risultati del QC.

Tabella 7.5 Regole di controllo di base per le carte QC

Regola di controllo	Errore indicato
Un risultato al di fuori dei limiti di controllo dell'azione	Casuale
Due punti su tre si trovano fuori dai limiti di controllo dell'azione	Sistematico
Quattro punti su cinque si trovano fuori dai limiti di controllo di allarme	Sistematico
Due risultati consecutivi, entrambi al di sopra o entrambi al di sotto dei limiti superiore/inferiore di "allarme"	Sistematico
Due risultati consecutivi, uno al di sopra e uno al di sotto dei limiti superiore/inferiore di "allarme"	Casuale
Otto risultati consecutivi, tutti al di sopra o al di sotto della media	Sistematico

7.6.2 Cause di valori fuori controllo

I segnali della procedura QC devono essere attentamente valutati da tutto il team per identificare eventuali errori che possono aver causato i valori fuori controllo. Gli errori possibili (con esempi) includono:

- incompleto miscelamento del campione (comune con campioni viscosi e agglutinati);
- stress del tecnico (per esempio, campionamento incostante o errore di registrazione);
- tecnica inadeguata (per esempio, pipettaggio o manipolazione incauti durante la preparazione dei vetrini o delle camere) (**Sezione 7.10, p. 206**);
- percorso formativo inadeguato (per esempio, differenze sistematiche nella conta degli spermatozoi, nella classificazione della morfologia normale, nella valutazione delle teste rosa e bianche degli spermatozoi o delle code rigonfie per la vitalità degli spermatozoi e nell'individuazione di spermatozoi mobili, oppure bias dovuti a consistenti errori di calcolo) (**Sezione 7.10, p. 206**);
- variazione degli strumenti (per esempio, pipette automatiche usurate o non calibrate, che possono ridurre la riproducibilità durante il campionamento e la diluizione; microscopi non allineati, che possono ridurre la nitidezza ottica e impedire la corretta valutazione della vitalità o della morfologia; bilance o vials di misurazione imprecise) (**Sezione 8.6.5, p. 244**);

- deterioramento dei campioni QC (in base a criteri standardizzati);
- cambio della strumentazione, in particolare pipette e camere di conta;
- cambiamenti nelle procedure o nell'ambiente di laboratorio.

7.6.3 Risposte ai valori fuori controllo

Quando i risultati sono al di fuori dei limiti di controllo, dovrebbero essere registrate le probabili cause e le azioni correttive adottate. Se il problema non è evidente, potrebbe essere necessario rianalizzare i campioni del QC per verificare se il primo risultato era inusuale. Se il risultato del QC rimane al di fuori dei limiti di controllo, la causa o la fonte dell'errore deve essere trovata e corretta prima di eseguire ulteriori test.

Per fare questo:

1. Creare un diagramma di flusso dell'intero processo, passo dopo passo. Le SOP e le **Tabelle 7.14-7.17, pp. 208-210** possono aiutare questo processo.
2. Dal diagramma di flusso, identificare le aree di potenziale variazione, dedurre le possibili cause e sviluppare un piano per ridurre la variazione.
3. Raccogliere più dati, fare nuovi diagrammi di controllo e rivederli per determinare se la variabilità è accettabile per la procedura. Questa sequenza di identificazione di un problema, di sviluppo e sperimentazione di un'ipotesi e di rivalutazione di un processo è nota come ciclo PDCA (Plan, Do, Check, Act; pianifica, fai, controlla, agisci).

7.7 Procedure statistiche di analisi e registrazione della variabilità tra operatori

Le procedure di QC basate sulla valutazione dei campioni seminali freschi sono simili a quelle per i campioni conservati e permettono di valutare la variabilità tra gli operatori. Se ci sono similarità, ci sono anche differenze. Per le analisi di campioni freschi, il valore reale non è noto, quindi la carta X_{bar} non può essere utilizzata e non può essere stimato l'errore sistematico (bias dell'operatore). In questa situazione, le procedure primarie di QC sono la carta S per valutare la variabilità tra gli operatori e l'analisi della varianza a due vie (ANOVA) per valutare differenze sistematiche tra gli operatori dopo ogni 5-10 campioni di QC.

7.7.1 Comparare i risultati di due o più operatori

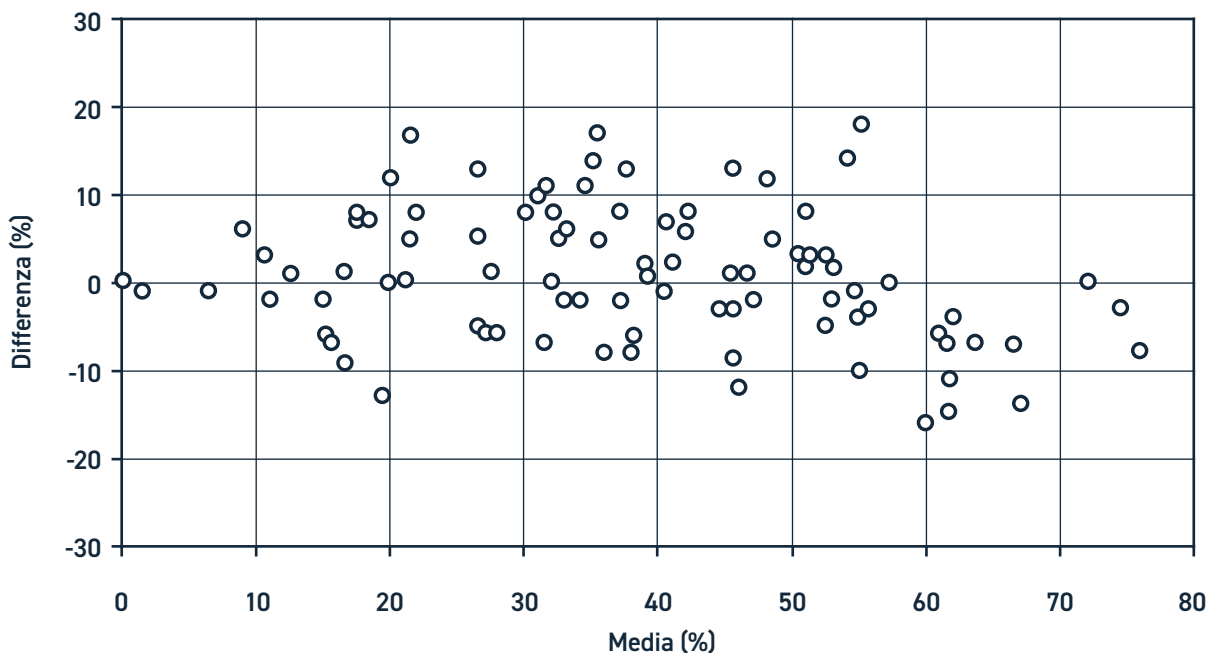
I risultati di due o più operatori possono essere confrontati in diversi modi.

- Tracciare la differenza tra due stime rispetto alla loro media [418]. Un confronto tra le stime di due operatori sulla concentrazione di spermatozoi dallo stesso campione dovrebbe produrre un modello simile a quello in **Figura 7.3**. In un grafico Bland-Altman, la media delle due valutazioni è tracciata sull'asse x e la differenza sull'asse y. Idealmente tutte le valutazioni dovrebbero essere centrate intorno allo 0 sull'asse y. Gli errori sistematici generali sono rivelati dalla deviazione dal livello di differenza 0 e dalle differenze. Nella **Figura 7.3**, la differenza media dello 0,6% indica che c'è poca distorsione; tuttavia, la variabilità (SD 7,6%) è

maggiore dell'errore di campionamento teorico (< 5%). C'è anche l'evidenza che il metodo CASA ha dato valori più alti degli operatori sopra il 60% [102].

Figura 7.3 Grafico Bland-Altman delle stime manuali e con il sistema CASA della percentuale di motilità nemaspermica progressiva

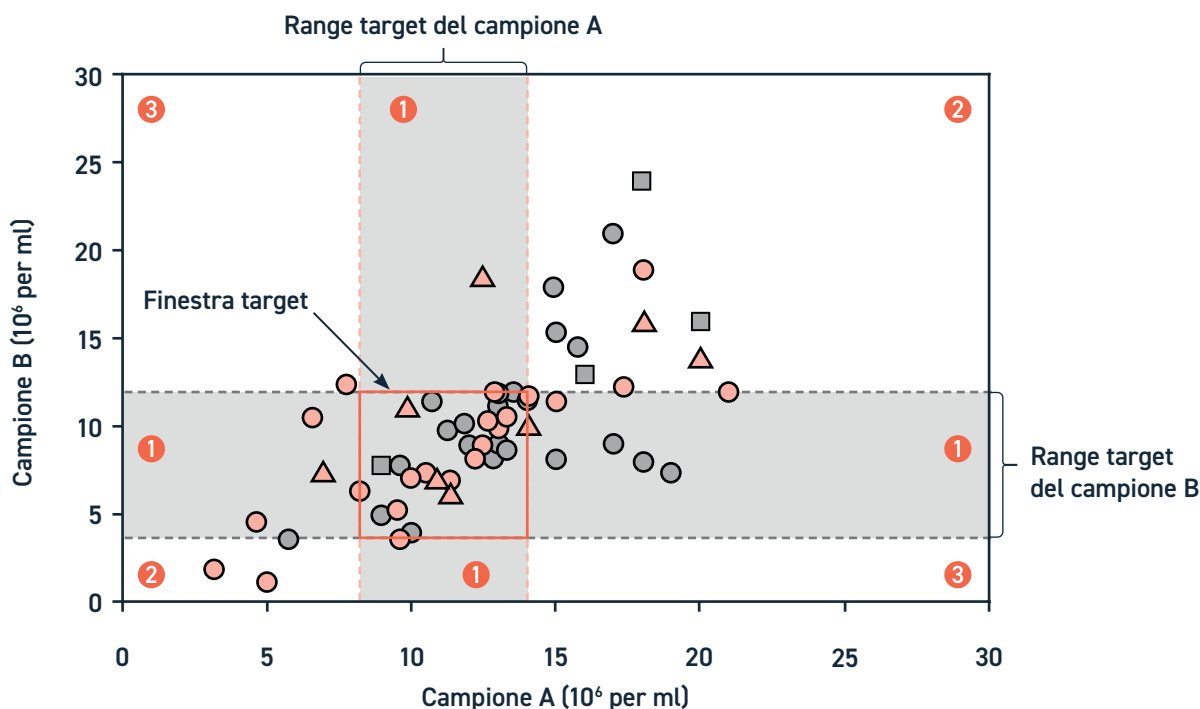
Il grafico traccia la differenza tra i risultati con i due metodi (manuale e CASA) (asse y) rispetto alla media $((\text{manuale} + \text{CASA})/2)$ (asse x).



- Calcolo della media e della SD delle differenze (confronti appaiati). Poiché lo stesso campione viene analizzato da entrambi gli operatori, la differenza tra le medie dovrebbe essere idealmente zero. Qualsiasi differenza significativa dallo zero, come valutato da un t-test accoppiato, rivela un errore (differenza sistematica) tra le due valutazioni.
- Rappresentazione grafica dei risultati di due campioni testati l'uno verso l'altro (diagramma di Youden). Un confronto tra le stime di concentrazione da parte di diversi operatori, ognuno dei quali esamina due campioni separati, dovrebbe produrre un modello simile a quello in **Figura 7.4**. Per ciascun operatore (per IQC) o centro (per EQC), i valori dei due campioni sono riportati l'uno rispetto all'altro. Le linee tratteggiate orizzontali e verticali indicano i limiti di confidenza al 95% dei risultati ottenuti dagli operatori esperti (IQC) o dai laboratori di riferimento (EQC). L'area definita dall'intersezione di queste linee è la finestra target in cui i valori dovrebbero diminuire. Questo grafico rivela sia errori casuali, quando il valore di un campione è nel range corretto ma il valore dell'altro campione non lo è (area 1; uno è corretto e l'altro no), sia errori sistematici, quando entrambe le stime dei campioni sono troppo alte (quadrante superiore destro, area 2; entrambe lette come troppo alte) o troppo basse (quadrante inferiore sinistro, area 2; entrambe lette come troppo basse). Gli errori casuali contribuiscono molto probabilmente a far sì che un campione risulti troppo basso e l'altro troppo elevato (area 3).

Figura 7.4 Diagramma di Youden per la stima della concentrazione degli spermatozoi

Un operatore (o laboratorio in EQC) può essere indicato da diversi simboli e colori. I risultati nei quadranti denominati 2 sono probabilmente dovuti a errori sistematici, mentre quelli nei quadranti designati 1 e 3 sono probabilmente dovuti a errori casuali.



- Analisi a due vie della varianza (ANOVA). Questa tecnica è descritta in molti libri di statistica [419, 420] ed è disponibile nei programmi informatici che utilizzano test statistici per la significatività delle differenze tra gli operatori. Come nel caso del confronto appaiato citato sopra, le differenze tra le stime di tutti gli operatori dovrebbero essere idealmente pari a zero. Pertanto, le differenze dal valore medio sono calcolate per ogni campione e per ogni operatore, e la media e la DS di queste differenze sono calcolate per ogni operatore. L'errore è indicato per gli operatori per i quali il valore assoluto della differenza è superiore a 3 errori standard dalla differenza media.

Un test statistico utilizzato per valutare le differenze tra i diversi operatori si basa sul test *F* di Fischer della tabella ANOVA a due vie, che può essere ottenuto direttamente dalla maggior parte dei programmi di statistica. Le differenze medie superiori a circa 2,5 errori standard difficilmente sono il risultato di una sola variazione casuale (< 1,2%), molto probabilmente sono reali o effettive. In ogni caso, che le differenze tra gli operatori siano significative o meno, è necessario rivedere le medie degli operatori o le differenze medie per identificare quali sono quelle maggiori del previsto. Non tutti i programmi informatici forniscono l'errore standard delle differenze tra gli operatori, che però possono essere calcolate separatamente. Differenze sostanziali tra gli operatori dovrebbero indurre una revisione di tutte le procedure per capire come può essere migliorata la consistenza dei dati.

L'esempio riportato nella prossima sezione illustra come calcolare direttamente l'errore standard delle differenze tra gli operatori riguardo la concentrazione degli spermatozoi e come valutare se siano maggiori di quanto ci si aspetterebbe dalla sola variazione casuale. Quando si eseguono i calcoli direttamente dalle osservazioni, è necessario mantenere un numero sufficiente di cifre decimali per evitare errori di arrotondamento.

7.7.1 Analisi delle differenze sistematiche tra gli operatori:
 esempio pratico

Tabella 7.6 Concentrazioni di spermatozoi ($\times 10^6/\text{ml}$) stimate da tre operatori su cinque campioni di QC

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

Tabella 7.7 Differenze dalla media del campione calcolate sottraendo la media del campione seminale da ogni osservazione

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

Tabella 7.8 Media, SD e media/errore standard di queste differenze calcolate per ogni operatore (n = numero di campioni)

	Media	SD	Media/errore standard	Errore standard
	$m_j = \sum d_{ij}/n$	$s_j = \sqrt{(\sum d_{ij}^2)/(n-1)}$	$(m_j/se(m_j))$	$se(m_j)$
A	1,600	1,949	1,836	0,871
B	2,200	2,775	1,773	1,241
C	-3,800	3,347	-2,539	1,497

Per C, la differenza media dalla media del campione è $-3,8 \times 10^6/\text{ml}$. Per valutare se il grado di sottostima è compatibile con la variazione casuale, bisogna fare una serie di calcoli (Tabella 7.9).

Tabella 7.9 Media, SD e media/errore standard di queste differenze calcolate per ogni operatore (n = numero di campioni)

Istruzioni passo dopo passo: calcolare una misura di variazione	Calcolo	Risultato	Unità
Prima la somma di SD^2 (SD dalla Tabella 7.8)	$1,949^2 + 2,775^2 + 3,347^2$	22,702	
Dividere la somma per 2 [3 operatori meno 1]	$22,702/(3-1)$	11,351	
Calcolare la radice per ottenere lo scarto quadratico medio	$\sqrt{11,351}$	3,369	$\times 10^6/\text{ml}$
Calcolare l'errore standard delle differenze individuali, e lo scarto quadratico medio [3 operatori, 5 campioni]	$3,369 \times \sqrt{((3-1)/5)}$	1,230	$\times 10^6/\text{ml}$
Confrontare l'errore $3 \times$ standard con il valore assoluto della differenza media di C ($3,8 \times 10^6/\text{ml}$)	$3,8 > 3 \times 1,230$ $3,8 > 3,691$		Errore!

Un test statistico formale delle differenze tra gli operatori si basa sul test F . La tabella ANOVA realizzata utilizzando le concentrazioni di spermatozoi di cui sopra è riportata nella **Tabella 7.10**. Le differenze tra i campioni di QC sono molto grandi ($P < 0,001$), poiché sono ottenute da diversi campioni di liquido seminale fresco. Il test F per le differenze tra operatori ($F = 4,81$ con 2 e 8 gradi di libertà, $P = 0,042$) è significativo al livello 0,05 e suggerisce che queste differenze sono maggiori di quanto ci si aspetterebbe dalla sola variazione casuale.

Tabella 7.10 Test F dall'ANOVA a due vie per gli operatori e i campioni QC

Fonte	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Media degli scarti	F - rapporto	P - valore
Campioni QC	9.807,6	4	2.451,90	216,03	< 0,001
Persone	109,2	2	54,60	4,81	0,042
Errore	90,8	8	11,35		
Totale	10.007,6	14			

Una sintesi delle principali procedure per le misure di IQC è riportata nella **Tabella 7.11**.

Tabella 7.11 Principali caratteristiche delle procedure di IQC

Procedura	Errori rilevati	Materiale di QC	N. degli operatori
Carta X_{bar}	Bias, variabilità complessiva, accuratezza	Conservato	Uno, diversi
Carta S	Errore/precisione	Conservato/fresco	Diversi
ANOVA a due vie	Errore/precisione	Conservato/fresco	Diversi
Bland-Altman	Errore/precisione	Conservato/fresco	Due
Test appaiati	Errore/precisione	Conservato/fresco	Due
Diagramma di Youden	Errore/precisione	Conservato/fresco	Diversi

7.7.2 Monitoraggio mensile delle medie

Mentre le procedure di IQC primarie si basano sulla valutazione delle differenze intra e inter operatore, ulteriori informazioni possono essere ottenute dal controllo continuo dei risultati dell'analisi del liquido seminale.

I valori medi di ciascuna variabile per tutti i pazienti esaminati in un certo periodo (per esempio, mensilmente) possono essere rappresentati su una carta X_{bar} , con limiti di allarme e di azione a 2 e 3 errori standard da entrambi i lati della media. L'errore standard può essere stimato dalla SD delle osservazioni originali diviso per la radice quadrata del numero di analisi seminali in ciascun intervallo, o direttamente dalla distribuzione osservata della media. I limiti di controllo dovrebbero essere determinati dopo almeno 6 mesi di osservazioni e dovrebbero essere rivisti regolarmente. Ci dovrebbero essere almeno 20 valori per ogni media; un piccolo laboratorio potrebbe ottenere tali risultati in più di un mese. Perfezionamenti a questo metodo includono il monitoraggio delle medie mensili di pazienti con valori normali e l'uso di carte a somma cumulativa (CUSUM) per l'individuazione rapida di qualsiasi scostamento dalla media sistematica [421].

Deviazioni dai valori attesi possono essere dovute a diverse caratteristiche dei pazienti (variazione tempo-dipendente nei pazienti da analizzare, un cambiamento nel numero di prove ripetute sugli stessi pazienti, modificazione nelle caratteristiche di assegnazione di pazienti con diversi tipi di infertilità) o fattori tecnici (cambiamenti nel personale di laboratorio, forniture di laboratorio, variazioni stagionali della temperatura, attrezzature, variabilità tra operatori).

7.8 Controllo di qualità esterno e assicurazione di qualità

L'EQC è parte integrante del processo completo di QC che verifica i risultati del test, mentre l'EQA controlla tutte le procedure di laboratorio relative alla raccolta e al reporting dei dati per garantire che i processi di laboratorio siano sotto controllo. L'EQC permette a un laboratorio di confrontare i suoi risultati con quelli di altri che misurano lo stesso test. Permette di valutare e confrontare su larga scala metodi diversi, altrimenti imparagonabili per un singolo laboratorio.

EQC e IQC sono entrambi importanti e dovrebbero essere messi in atto insieme, poiché sono processi complementari. L'EQC può rivelare problemi di accuratezza che potrebbero non essere colti dall'IQC se i campioni di controllo non sono adeguatamente isolati o selezionati. L'EQC ha il vantaggio di permettere a un laboratorio di controllare la precisione e la stabilità dei suoi metodi [422]. Tuttavia, poiché i campioni di EQC sono chiaramente di origine esterna o di una matrice diversa, possono essere manipolati in modo speciale; ciò dovrebbe essere evitato e dovrebbero essere trattati, per quanto possibile, nello stesso modo dei campioni di routine.

L'EQC comprende programmi di test comparativi e valutativi, nei quali i campioni che si presume siano identici vengono inviati a tutti i laboratori partecipanti per l'analisi [423]. I laboratori inviano i loro risultati a una struttura centrale, dove vengono esaminati per i dati dei valori anomali e vengono calcolate le medie e le SD per caratterizzare le prestazioni dei laboratori partecipanti.

7.8.1 Valutazione dei risultati dell'EQC

Gli schemi EQC forniscono ai laboratori informazioni sia sui loro risultati che su quelli di altri laboratori partecipanti che utilizzano lo stesso metodo o diversi metodi per misurare l'analita specificato. Si deve accertare se i valori target indicati sono stati ottenuti da una misurazione accurata, con conte multiple dell'emocitometro della concentrazione degli spermatozoi, da un'analisi computerizzata della motilità degli spermatozoi e da un gruppo di laboratori di riferimento ben controllati, oppure se sono medie ottenute da tutti i centri partecipanti. I risultati sono spesso presentati graficamente, per esempio in un diagramma a barre, che fornisce una rapida presentazione visiva dei risultati. Se lo stesso campione EQC viene utilizzato in diverse occasioni, verranno riportati anche gli errori e la variabilità dei risultati del laboratorio su questo campione.

Quando sono previsti due campioni per analisi, viene spesso costruito un diagramma di Youden in cui i valori di ogni campione sono riportati sugli assi x e y (Figura 7.4, p. 201). La misura in cui i centri differiscono nella loro valutazione è chiaramente visibile dalla dispersione e dalla distribuzione dei valori tracciati. Ulteriori dati possono essere visualizzati, per esempio, usando diversi simboli o colori per indicare l'uso di metodi diversi (camere di conta, colorazioni o criteri di valutazione) o centri diversi.

Quando vengono distribuiti più di due campioni, si possono presentare vari aspetti del bias (la differenza dal valore designato). Questi includono:

- il bias index score (BIS): bias diviso per un coefficiente di variazione scelto $\times 100$, che può essere positivo o negativo;
- il punteggio dell'indice di varianza (VIS): è simile al BIS ma è sempre positivo;
- la media dei punteggi BIS o VIS correnti (MRBIS, MRVIS), che aiutano a verificare i trend.

Un basso MRBIS e un basso MRVIS indicano che i risultati sono vicini ai valori designati; un basso MRBIS ma un alto MRVIS potrebbero indicare un errore casuale; un alto MRBIS e un alto MRVIS potrebbero indicare errori sistematici. I risultati riportati come successo/insuccesso o come grado sono utili per il controllo e la certificazione del laboratorio.

Un modo semplice per monitorare le prestazioni è quello di segnare i risultati del laboratorio (sull'asse y) rispetto al valore target (sull'asse x) per ogni parametro. Questo mostra chiaramente quanto siano vicini alla linea di identità i valori del laboratorio. In alternativa, le differenze dai valori target possono essere mostrate su una carta Bland-Altman (Figura 7.3, p. 200).

7.8.2 Risposte ai risultati fuori controllo

L'informazione essenziale derivata dai programmi EQC riguarda l'errore o la precisione dei laboratori e dei metodi di laboratorio. Il risultato desiderato è che i laboratori mantengano o migliorino l'accuratezza dei loro metodi [422]. I laboratori con risultati che sono costantemente/sistematicamente superiori o inferiori al valore assegnato o alla media dello schema EQC devono rivalutare i loro metodi. Un'ampia variazione nei risultati EQC è solitamente associata a un'ampia variazione nei risultati IQC e indica incongruenze nelle procedure di valutazione da un campione all'altro. Le procedure tecniche devono essere attentamente rivalutate per assicurarsi che siano conformi alle raccomandazioni di questo manuale.

Le azioni appropriate includono quelle discusse per l'IQC (Sezione 7.6.3, p. 199), con la riqualificazione degli operatori e il riesame dei campioni. Le Tabelle 7.14-7.17, pp. 208-210 indicano anche potenziali fonti di variazione nell'analisi del liquido seminale. Lo scambio di personale scientifico tra laboratori è spesso utile, e può essere vantaggiosa la formazione degli operatori in laboratori con buoni risultati di EQC. Un consulente di un laboratorio con buoni risultati di EQC sarà spesso in grado di valutare quali metodi potrebbero essere modificati per migliorare la riproducibilità.

7.9 Frequenza e priorità del controllo di qualità

I campioni di QC dovrebbero essere analizzati di routine. La frequenza delle analisi può essere determinata da raccomandazioni nazionali o locali o resa obbligatoria dalle leggi sulle licenze di laboratorio o dalle agenzie di accreditamento, con un numero minimo da concordare con gli enti normativi nazionali che possono essere influenzati dal numero di campioni analizzati dal laboratorio. Alcuni regolamenti richiedono che i campioni di QC siano analizzati ogni giorno che viene valutata la concentrazione di spermatozoi dei pazienti; oppure dovrebbe essere analizzato per l'IQC tra l'1% e il 5% dei campioni.

I campioni di QC si dovrebbero usare:

- per monitorare il personale appena assunto e quello già presente;
- ogni volta che vengono introdotte nuove attrezzature di laboratorio, forniture, procedure o lotti di campioni IQC;
- come possibile parte di un programma di manutenzione regolare o periodica.

La **Tabella 7.12** contiene una guida generale alla programmazione del QC; in pratica, la programmazione dipenderà dal carico di lavoro del laboratorio. La **Tabella 7.13** indica la priorità dei diversi protocolli di QC; alcune procedure potrebbero non essere fattibili per i laboratori con finanziamenti limitati.

Tabella 7.12 Calendario per il QC

Sempre	Sorveglianza e correlazione dei risultati all'interno dei campioni
Settimanale/mensile	Analisi delle misurazioni in replicato da parte di diversi operatori
Mensile	Analisi dei risultati medi
Trimestrale/biennale	Partecipazione all'EQC
Biennale/annuale	Calibrazione di pipette, camere di conta e altre attrezzature

Tabella 7.13 Riassunto dei test di QC

Parametro	Materiale	Valore target	Accuratezza/bias	Precisione	Priorità (1 > 2 > 3)
Concentrazione	IQC fresco	No		Carta S, ANOVA a due vie	1
	IQC conservato	Si	Carta X_{bar}	Carta S	3
	EQC	Si	Carta X_{bar}	Carta S	2
Morfologia	IQC fresco	No		Carta S, ANOVA a due vie	1
	IQC conservato	Si	Carta X_{bar}	Carta S	3
	EQC	Si	Carta X_{bar}	Carta S	2
Motilità	IQC fresco	No		Carta S, ANOVA a due vie	1
	IQC conservato	Si	Carta X_{bar}	Carta S	3
	EQC	Si	Carta X_{bar}	Carta S	2
Vitalità	IQC fresco	No		Carta S, ANOVA a due vie	1
	IQC conservato	Si	Carta X_{bar}	Carta S	3
	EQC	Si	Carta X_{bar}	Carta S	2

7.10 Formazione

Un approccio simile al QC può essere usato quando vengono formati gli operatori, quando si introducono nuovi test o si valutano modifiche alle metodologie già esistenti. La formazione degli operatori dovrebbe includere la consapevolezza dei metodi descritti di seguito.

7.10.1 Suggerimenti pratici in caso di difficoltà nella valutazione della concentrazione degli spermatozoi

- Rivedere le procedure di miscelazione e diluizione, le griglie delle camere di conta e i calcoli. Avere una lista di controllo dei passaggi delle procedure può essere utile.
- Leggere i campioni entro 10-15 minuti dal caricamento della camera, dopo di che l'evaporazione produrrà effetti notevoli sulla posizione degli spermatozoi all'interno della camera se non si usa una camera umida.
- Due operatori dovrebbero lavorare insieme, usando un microscopio a ponte o un microscopio dotato di una videocamera e uno schermo TV per confrontare le procedure di diluizione, caricamento e conta. Dovrebbero contare la stessa camera caricata, confrontando i valori per righe o griglie, per trovare la fonte delle divergenze.
- Utilizzare un microscopio a ponte in una sessione di conta e formazione, o esaminare gli spermatozoi nella griglia oculare, per decidere se gli spermatozoi devono essere considerati sulla linea e quindi inclusi nel conteggio.
- Rivedere la **Tabella 7.14**.

7.10.2 Suggerimenti pratici in caso di difficoltà nella valutazione della morfologia degli spermatozoi

- Rispettare le linee guida di questo manuale. Studiare le micrografie e i relativi commenti per ogni spermatozoo.
- Sottolineare l'importanza di esaminare sempre tutte e quattro le regioni di ogni spermatozoo, utilizzando la valutazione strutturata (**Figura 2.10, p. 50**).
- Prestare particolare attenzione agli spermatozoi con morfologia borderline. Dovrebbero essere classificati come anormali.
- Condurre una sessione di conteggio e formazione utilizzando un microscopio a ponte o un microscopio dotato di una videocamera e uno schermo TV.
- Rivedere la **Tabella 7.15**.

7.10.3 Suggerimenti pratici in caso di difficoltà nella valutazione della motilità degli spermatozoi

- Fare la preparazione immediatamente prima della valutazione. Leggere solo dopo la stabilizzazione per ridurre gli errori nella valutazione della motilità totale.
- Selezionare il campo in modo casuale e non selezionare deliberatamente i campi con un numero alto o basso di spermatozoi mobili. Un modo per farlo è evitare di guardare attraverso gli oculari fino a quando non è stato selezionato un campo.
- Non aspettare che gli spermatozoi mobili entrino nel campo prima di iniziare la conta.
- Analizzare rapidamente; analizzare solo una piccola parte della griglia alla volta, a seconda della concentrazione degli spermatozoi.

- Ridurre il tempo per l'esame di un settore della griglia, per evitare di contare spermatozoi che entrano nell'area durante l'analisi.
- Contare gli spermatozoi con motilità progressiva, non progressiva e immobili in due fasi. Se ci sono problemi con la tecnica, invertire l'ordine di analisi.
- Rivedere la **Tabella 7.16**.

7.10.4 Suggerimenti pratici in caso di difficoltà nella valutazione della vitalità degli spermatozoi

- Prestare particolare attenzione a distinguere tra teste di spermatozoi rosse (morti) e rosa (vivi); gli spermatozoi con una colorazione rosa debole della testa sono valutati come vivi. Se la colorazione è limitata a una parte della regione del collo, e il resto dell'area della testa non è colorato, questa è considerata una "membrana del collo fessurata", ma non un segno di morte cellulare e completa disintegrazione della membrana.
- Usare il metodo raccomandato eosina-nigrosina (**Sezione 2.4.7, p. 26**).
- Rivedere la **Tabella 7.17**.

Tabella 7.14 Fonti di variazione (errore) nella valutazione della concentrazione nemaspermica

Procedura	Prevenzione	Controllo
Pre-analitica (alla raccolta o manipolazione del campione)		
Miscelazione incompleta dei campioni seminali prima di fare la diluizione	Formazione, SOP	Ripetere le diluizioni
Errori di diluizione (per esempio, ipotizzando che una diluizione 1 : 20 sia 1+20 quando in realtà è 1+19)	Formazione, SOP	IQC
Il dispositivo di pipettaggio non è calibrato (per esempio, la pipetta è tarata a 100 µl ma in realtà eroga 95 µl o 110 µl)	Manutenzione delle attrezzature, SOP	Ripetere le diluizioni, IQC, EQC
Uso di una pipetta inadeguata (per esempio, una pipetta ad aria piuttosto che una a spostamento positivo)	Formazione, SOP	Ripetere le diluizioni, IQC, EQC
Uso di un volume basso per la diluizione, che comporta un alto rischio di campionamento non rappresentativo	Formazione, SOP	Ripetere le diluizioni, IQC, EQC
Mancata pulizia del residuo seminale dalla punta della pipetta prima di dispensarlo nel diluente	Formazione, SOP	IQC
Analitica (come risultato della misurazione del campione in esame)		
Camera non pulita e non asciutta	Formazione, SOP	Ripetere le misurazioni
Camera montata o caricata in modo errato (per esempio, particelle di sporco sulle colonne che alterano l'altezza della camera)	Formazione, SOP	Ripetere le misurazioni
Intervallo di tempo eccessivo tra la miscelazione del seme e la rimozione dell'aliquota per la diluizione (gli spermatozoi nel seme iniziano a sedimentare immediatamente)	Formazione, SOP	Ripetere le diluizioni e le misurazioni
Intervallo di tempo eccessivo tra la miscelazione con vortex della diluizione e il caricamento in camera (gli spermatozoi diluiti iniziano a sedimentare immediatamente)	Formazione, SOP	Ripetere le diluizioni e le misurazioni
Microscopio non adeguatamente pulito o allineato; ingrandimento errato	Formazione, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC ed EQC

Procedura	Prevenzione	Controllo
Non aspettare abbastanza a lungo dopo il caricamento in camera prima dell'analisi (tempo insufficiente per la sedimentazione)	Formazione, SOP	Ripetere le misurazioni, IQC, EQC
Camera emocitometrica non orizzontale durante la sedimentazione del seme o non tenuta in un ambiente umidificato durante la sedimentazione	Formazione, SOP	Ripetere le misurazioni, IQC, EQC
Identificazione errata degli spermatozoi (per esempio, residui valutati come spermatozoi o spermatozoi difficili da riconoscere non valutati)	Formazione, SOP	IQC, EQC
Valutare poche o troppe righe sulla griglia (cioè calcoli errati); fermarsi a metà di una riga	Formazione, SOP	IQC, EQC
Conteggio di pochi spermatozoi, con conseguente elevato errore di campionamento	Formazione, SOP	IQC, EQC
Conteggio errato degli spermatozoi sulle linee dei riquadri all'interno della camera di conta (per esempio, sovrastima della concentrazione se gli spermatozoi sono contati sui bordi superiore, inferiore, sinistro e destro)	Formazione, SOP	IQC, EQC
Malfunzionamento del contacellule multicanale	Manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Errore matematico nel calcolo o nella correzione della diluizione	Formazione, SOP	IQC, EQC
Uso della camera a riempimento capillare con capillari (distribuzione ineguale degli spermatozoi durante il riempimento)	Formazione, SOP	IQC, EQC

Tabella 7.15 Fonti di variazione (errore) nella valutazione della morfologia nemaspermica

Procedura	Prevenzione	Controllo
Microscopio non adeguatamente pulito o allineato; ingrandimento errato	Formazione, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Formazione inadeguata prima di eseguire l'analisi	Formazione	IQC, EQC
Tecniche soggettive senza linee guida chiare	Formazione, SOP	IQC, EQC
Influenze impercettibili dei colleghi sui sistemi di classificazione (possono causare cambiamenti durante l'analisi)	Formazione	IQC (carte di controllo)
Liquido seminale non adeguatamente miscelato quando si prepara lo striscio	Formazione, SOP	IQC
Inadeguata preparazione dello striscio (cioè troppo spesso o troppo sottile)	Formazione, SOP	IQC
Tecnica di colorazione inadeguata (per esempio, colorazione chiara, scura o troppo colore di fondo)	Formazione, SOP	IQC
Valutazione degli spermatozoi sul bordo del vetrino	Formazione, SOP	IQC
Tentativo di conteggiare gli spermatozoi che non sono piatti o che si sovrappongono ad altri spermatozoi	Formazione, SOP	IQC
Non contare tutti gli spermatozoi dell'area ma solo quelli selezionati	Formazione, SOP	IQC
Perdita dell'intensità del colore nel tempo (per i campioni IQC conservati)	Formazione, SOP	IQC (carta di controllo)
Post-analitica (relativa alla registrazione manuale o elettronica del risultato del test)		
Errori nel calcolo delle percentuali se non contate in multipli di 100	Formazione, SOP	IQC, EQC
Malfunzionamento del contacellule multicanale	Manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC

Tabella 7.16 Fonti di variazione (errore) nella valutazione della motilità nemaspermica

Procedura	Prevenzione	Controllo
Miscelazione impropria del campione prima della rimozione dell'aliquota	Formazione, SOP	Replicare il campionamento e la valutazione, IQC
Attesa troppo lunga tra la preparazione del vetrino e l'analisi (gli spermatozoi perdono rapidamente motilità)	Formazione, SOP	Replicare il campionamento e la valutazione, IQC
Temperatura inadeguata del piano riscaldato (una temperatura troppo alta uccide gli spermatozoi)	Formazione, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC
Microscopio non adeguatamente pulito o allineato; ingrandimento non corretto	Formazione, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Assenza della griglia oculare	Attrezzatura	IQC (carta di controllo)
Analisi eseguita intorno ai bordi del vetrino coprioggetto (gli spermatozoi muiono o diventano lenti al di fuori di 5 mm dal vetrino coprioggetto)	Formazione, SOP	Ripetere le misurazioni, IQC
Valutazione eseguita troppo lentamente (altri spermatozoi entrano nella zona definita durante il periodo di valutazione)	Formazione, SOP	IQC
Malfunzionamento del contattore multicanale	Manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Errori nel calcolo delle percentuali se non contate in multipli di 100	Formazione, SOP	IQC, EQC
Errore soggettivo (cioè una percentuale di motilità costantemente troppo alta o troppo bassa)	Formazione, SOP	IQC, EQC
Procedure preparatorie che riducono la motilità (per esempio, cambio di temperatura, miscelazione vigorosa, contaminazione con tossine)	SOP	IQC
Selezione non casuale dei campi per l'analisi; ritardo nell'analisi (per esempio, aspettare che gli spermatozoi mobili entrino nel campo o nella griglia per iniziare l'analisi)	Formazione, SOP	IQC, EQC

Tabella 7.17 Fonti di variazione (errore) nella valutazione della vitalità nemaspermica

Procedura	Prevenzione	Controllo
Microscopio non adeguatamente pulito o allineato; ingrandimento non corretto	Formazione, SOP, manutenzione delle attrezzature	IQC, EQC
Colorazione impropria: alcune procedure portano a condizioni ipo-osmotiche che uccidono gli spermatozoi	Formazione, SOP	Confronto con la motilità
Aspettare troppo a lungo per la colorazione	Formazione, SOP	Confronto con la motilità
La reidratazione dello striscio essiccato, se non montato direttamente, permetterà al colorante di penetrare in tutti gli spermatozoi	Formazione, SOP	Confronto con la motilità
Sovrastima degli spermatozoi morti (per esempio, percependo come morti spermatozoi con teste con una colorazione rosa leggera)	Formazione, SOP	IQC, EQC
Valutare come morti gli spermatozoi con colorazione rosa limitata al collo	Formazione, SOP	IQC, EQC

Capitolo 8: Appendici



8.1	Interpretazione dei risultati dell'esame del liquido seminale	211
8.2	Strumentazione e sicurezza.....	214
8.3	Microscopia per l'esame di base del liquido seminale.....	221
8.4	Soluzioni stock e terreni di coltura.....	226
8.5	Modello di refertazione per l'esame del liquido seminale.....	233
8.6	Materiale QC	235
8.7	Programmi nazionali di controllo di qualità esterno per l'esame del liquido seminale	246

8.1 Interpretazione dei risultati dell'esame del liquido seminale

Questo manuale non fornisce linee guida per decisioni cliniche come la scelta delle modalità di trattamento dell'infertilità a fattore maschile. Tuttavia, è responsabilità di ogni laboratorio fornire informazioni che possano facilitare l'interpretazione dei risultati dell'esame del liquido seminale. L'informazione più rilevante è la distinzione tra fertilità e infertilità. Nelle prime quattro edizioni di questo manuale, sono stati forniti i tradizionali limiti di riferimento. Nella quinta edizione è stata presentata la distribuzione dei valori degli uomini le cui partner hanno concepito entro 12 mesi dalla sospensione dei metodi contraccettivi; il quinto percentile inferiore di questa distribuzione è stato poi spesso interpretato come un vero limite tra uomini fertili e infertili. È quindi essenziale ampliare il concetto di interpretazione dei risultati dell'esame del liquido seminale.

8.1.1 Distribuzione dei risultati in uomini di coppie con Time-To-Pregnancy (TTP) di un anno o meno

I dati presentati nella quinta edizione [424] sono stati ulteriormente valutati e completati con i dati di circa 3.500 uomini provenienti da 12 Paesi [5] (vedere **Tabella 8.1**, **8.2** e **8.3**). È stata una grande opportunità raccogliere dati da diverse aree geografiche del mondo. È anche di notevole interesse notare come le distribuzioni non differiscano molto dalla compilazione del 2010. La nuova serie di dati è ancora più rigorosa e cerca di includere solo i dati più affidabili. Così, i dati della **Tabella 8.3** forniscono informazioni sulla distribuzione dei risultati di uomini afferenti a coppie che hanno avuto un concepimento naturale entro un anno di tentativi senza utilizzo di metodi contraccettivi (TTP < 12 mesi). Il quinto percentile inferiore rappresenta il livello sotto il quale sono stati trovati solo i risultati del 5% degli uomini nella popolazione di riferimento. Questo può essere di aiuto per interpretare i risultati di un singolo paziente.

La cautela è necessaria per evitare sovrastime nell'interpretazione. La definizione della popolazione di riferimento possiede un certo grado di incoerenza. Questi uomini rientrano nel limite oltre il quale viene definita l'infertilità: almeno un anno di rapporti sessuali non protetti senza ottenere un concepimento naturale (TTP > 12 mesi). Questo significa che la popolazione di riferimento è composta da uomini

non appartenenti a coppie con TTP oltre i 12 mesi. Tuttavia, alcune coppie fortunate hanno un concepimento naturale entro un anno nonostante le problematiche del liquido seminale. Oppure uomini con eiaculazioni perfettamente normali sono classificati come infertili a causa di fattori principalmente femminili. Questo evidenzia il problema di applicare una categorizzazione dicotomica alla fertilità, che dev'essere invece considerata come un contesto dove c'è continuità [425]. È anche noto che c'è una sostanziale sovrapposizione dei risultati dell'esame del liquido seminale tra uomini fertili e infertili [6, 8, 426, 427].

I dati utilizzati da Campbell et al. [5] sono liberamente disponibili su <https://doi.org/10.15132/10000163> e possono quindi essere esaminati, integrati e rianalizzati, come e quando si ritenga opportuno.

Tabella 8.1 Definizione di popolazione di riferimento in Campbell et al. [5]

Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
<ul style="list-style-type: none"> • Uomini la cui partner ha avuto un concepimento naturale con un TTP ≤ 12 mesi. • Range dell'astinenza sessuale da 2 a 7 giorni. • Tecniche di laboratorio: <ul style="list-style-type: none"> • Evidenza di conformità con il WHO 2010 e aderenza a Björndahl et al. [428]. • Controllo di qualità interno. • Valutazione esterna della qualità. 	<ul style="list-style-type: none"> • Uomini che si sono rivolti a una clinica per l'infertilità o si sono sottoposti a una valutazione della fertilità.

Tabella 8.2 Origine dei dati per la distribuzione dei risultati [5]

La tabella mostra il numero totale di soggetti in ogni studio e i corrispondenti criteri di inclusione ed esclusione per la compilazione dei dati.

Origine dello studio		
Paese	Continente	Numero di soggetti
Inclusi nel WHO 2010		
Australia	Oceania	206
Norvegia	Europa	82
Stati Uniti d'America	America	487
Danimarca, Finlandia, Francia, Regno Unito	Europa	826
Danimarca	Europa	199
Nuovi rispetto al WHO 2010		
Cina	Asia	1.200
Egitto	Africa	240
Grecia	Europa	76
Repubblica Islamica dell'Iran	Asia	168
Italia	Europa	105

Tabella 8.3 Distribuzione dei risultati dell'esame del liquido seminale di uomini le cui partner hanno ottenuto una gravidanza spontanea da concepimento naturale entro un anno di rapporti sessuali non protetti. Da Campbell et al. [5] (5° percentile e intervallo di confidenza del 95%)

	N	Percentili									
		2,5°	5°	(95% CI)	10°	25°	50°	75°	90°	95°	97,5°
Volume del liquido seminale (ml)	3.586	1,0	1,4	(1,3-1,5)	1,8	2,3	3,0	4,2	5,5	6,2	6,9
Concentrazione nemaspermica (106 per ml)	3.587	11	16	(15-18)	22	36	66	110	166	208	254
Numero totale di spermatozoi (106 per eiaculato)	3.584	29	39	(35-40)	58	108	210	363	561	701	865
Motilità totale (PR + NP, %)	3.488	35	42	(40-43)	47	55	64	73	83	90	92
Motilità progressiva (PR, %)	3.389	24	30	(29-31)	36	45	55	63	71	77	81
Motilità non progressiva (NP, %)	3.387	1	1	(1-1)	2	4	8	15	26	32	38
Spermatozoi immobili (IM, %)	2.800	15	20	(19-20)	23	30	37	45	53	58	65
Vitalità (%)	1.337	45	54	(50-56)	60	69	78	88	95	97	98
Forme normali (%)	3.335	3	4	(3,9-4,0)	5	8	14	23	32	39	45

8.1.2 Altri metodi per valutare i risultati dell'esame del liquido seminale

8.1.2.1 Interpretazione multiparametrica

Per una previsione generale dei nati vivi da gravidanza spontanea o in vitro, è stata suggerita un'interpretazione multiparametrica dei risultati dell'esame del liquido seminale [7-9, 427]. I limiti di riferimento combinati per tale interpretazione devono ancora essere sviluppati.

8.1.2.2 Limiti di decisione

L'infertilità maschile è dovuta a una vasta gamma di cause note e sconosciute, per cui occorre migliorare la valutazione diagnostica degli uomini nelle coppie infertili. L'esame del liquido seminale può essere utile per la diagnosi e il trattamento di tali disturbi, per esempio, per il work-up endocrino e il follow-up dei trattamenti endocrini, la selezione dei pazienti per gli screening genetici come quello per la sindrome di Klinefelter, le microdelezioni del cromosoma Y, traslocazioni, inversioni, mutazioni della fibrosi cistica e discinesia ciliare. Devono, quindi, essere sviluppati limiti decisionali clinicamente utili per tali indagini.

Un limite decisionale si basa su considerazioni cliniche e statistiche che indicano la necessità di un certo intervento diagnostico o terapeutico [429, 430].

8.1.3 Cautela per gli studi sulla fertilità maschile basati sui risultati dell'esame del liquido seminale

Il 5° percentile inferiore dei dati degli uomini nella popolazione di riferimento (Tabella 8.3) non rappresenta un limite tra uomini fertili e infertili.

8.2 Strumentazione e sicurezza

8.2.1 Forniture di base necessarie in un laboratorio di andrologia

Di seguito è riportato un elenco delle forniture e delle attrezzature necessarie a un laboratorio di andrologia per eseguire i test di base descritti in questo manuale.

Qualora occorresse assistenza nella ricerca di uno dei seguenti materiali, si può consultare la letteratura scientifica a cui si fa riferimento in questo manuale o in altre pubblicazioni.

8.2.1.1 Attrezzature e forniture generali

- Bilancia (per pesare i recipienti di liquido seminale).
- Banchi con superfici di lavoro impermeabili.
- Contenitori:
 - per lo smaltimento di oggetti taglienti;
 - per i rifiuti pericolosi.
- Copia del *Laboratory biosafety manual* [48].
- Congelatore (-20°C).
- Disinfettante o ipoclorito di sodio, 0,1% (v/v) e 1% (v/v) in acqua distillata.
- Sapone disinfettante o detergente antisettico per la pelle.
- Guanti monouso.
- Soluzione per il lavaggio oculare o collirio.
- Kit di primo soccorso.
- Cappa per lo stoccaggio e per lavorare con reagenti tossici, prodotti chimici o coloranti.
- Frigorifero.
- Doccia.

8.2.1.2 Forniture e attrezzature per l'esame di base del liquido seminale

- Centrifughe:
 - centrifuga da banco in grado di raggiungere 300-500 g (per il trattamento di routine del liquido seminale e per l'urina), 1.000 g (per i marker seminali) e 2.000 g (per i campioni viscosi). Le centrifughe dovrebbero consentire l'uso di cestelli sigillati per minimizzare i rischi di dispersione di aerosol;

- centrifughe ad alta velocità che raggiungono i 3.000 g (per la preparazione di campioni sospetti di azoospermia) o 16.000 g (per ottenere plasma seminale senza spermatozoi). Le centrifughe dovrebbero consentire l'uso di cestelli sigillati per minimizzare i rischi di dispersione di aerosol.
- Vials da diluizione.
- Carta da filtro, 90 g/m² (per filtrare i coloranti).
- Emocitometri: Neubauer modificata o, in alternativa, camera di 100 µm di profondità con vetrino coprioggetto spesso (spessore numero 4, 0,44 mm).
- Incubatore (37°C).
- Pellicola da laboratorio, autosigillante, modellabile.
- Contatore da laboratorio multichiave (sei o nove chiavi).
- Vetrini per microscopio:
 - vetrini molati o smerigliati per scrivere e coprioggetto (spessore numero 1,5, 0,16-0,19 mm);
 - vetrini lisci per strisciare la goccia di liquido seminale su un altro vetrino per fare strisci di liquido seminale.
- Penne/matite:
 - per scrivere su vetrini smerigliati, una matita con mina di morbidezza HB2 è adeguata;
 - pennarello indelebile.
- Cartine per il pH (range 6-10).
- Microscopio a contrasto di fase (per la valutazione della concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi) e i seguenti accessori (vedere **Appendice 8.3, p. 221**):
 - obiettivi a fase positiva 10x, 20x (o 25x), 40x (o 63x), obiettivo a immersione a olio 100x;
 - oculare a 10x (o 12,5x) ad ampio campo;
 - reticolo oculare (per valutare la motilità);
 - micrometro (per valutare la morfologia);
 - tavolino termostato (opzionale ma fortemente raccomandato; per la misurazione della velocità).
- Pipette e punte:
 - pipette Pasteur con contagocce in lattice o pipette monouso di plastica, o pipette automatiche per miscelare il liquido seminale;

- pipette a spostamento d'aria;
- pipette a spostamento positivo per misurare 10-100µl.
- Moduli per registrare i risultati delle analisi del liquido seminale e del muco (vedere **Appendice 8.5, p. 233**).
- Miscelatori di campioni:
 - agitatore a due dimensioni o rotante per miscelare il liquido seminale (opzionale);
 - vortex per miscelare il liquido seminale diluito e fissato.
- Contenitore per la raccolta del liquido seminale:
 - contenitori monouso a bocca larga con coperchi;
 - piastra con spot di porcellana o vetro borosilicato (per il test eosina-nigrosina).
- Carta da laboratorio.

8.2.1.3 Attrezzatura facoltativa

- Una bilancia analitica per pesare i prodotti chimici.
- Attrezzatura per la crioconservazione (opzionale).
- Preservativi, senza spermicida, non tossici (opzionale).
- Microscopio a fluorescenza e obiettivi (opzionale; per misurazioni della concentrazione nemaspermica ad alta sensibilità, test di reazione acrosomiale).
- Incubatore (37°C), con % (v/v) controllabile di CO₂ (opzionale).
- Luminometro (opzionale; per il ROS).
- Penne/matite: una matita con mina di cera (penna di delimitazione, opzionale; per delimitare l'area della soluzione di anticorpi su un vetrino).
- Piaccametro (ISFET) (opzionale; per campioni di liquido seminale viscoso).
- Attrezzatura per microscopio.
- Obiettivo a fase negativa 40x (opzionale; per test di vitalità all'eosina).
- England Finder (opzionale; vetrino con griglia per la valutazione QC).
- Fogli adesivi per piastre a 96 pozzetti (opzionale; per l'analisi del fruttosio).
- Camere per vetrini, monouso (opzionali; per la preparazione di campioni QC).
- Spettrofotometro (opzionale; per i dosaggi biochimici del liquido seminale).

- Vetrino micrometrico (opzionale; per la misurazione della morfologia dello spermatozoo).
- Timer (opzionale; per la preparazione del campione QC).
- Piastra riscaldante, da banco (opzionale; per preriscaldare i vetrini prima della valutazione della motilità).
- Sistema CASA (opzionale).

8.2.1.4 Prodotti chimici

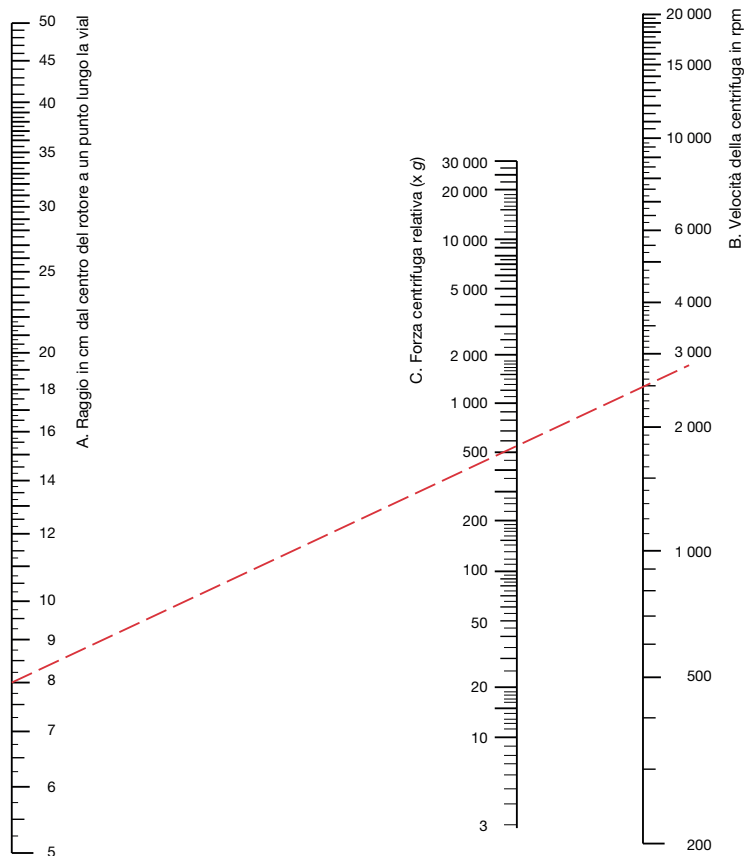
- Colorazione Papanicolaou (raccomandata).
- Anticorpi (opzionale; CD45 per i leucociti).
- Agente antischiuma (opzionale; per la preparazione del campione QC).
- Kit per la perossidasi cellulare (opzionale).
- Terreni crioprotettivi (opzionali).
- Soluzioni per il gradiente di densità (opzionali; per la preparazione del liquido seminale).
- Kit per il test del fruttosio (opzionale).
- Kit per il test dell' α -glucosidasi neutra (opzionale).
- Vaseline (opzionale).
- Kit di colorazione rapida (opzionale; per la morfologia degli spermatozoi).
- Cera (punto di fusione 48-66°C) (opzionale).
- Kit di analisi dello zinco (opzionale).

8.2.2 Calcolo delle forze centrifughe

La forza a cui sono sottoposti gli spermatozoi durante la centrifugazione (forza centrifuga relativa, RCF) dipende dalla velocità di rotazione (N giri al minuto, rpm) e dalla distanza dal centro del rotore del punto in cui la forza deve essere misurata (solitamente sul fondo della vial da centrifuga) (raggio, R , cm). RCF è calcolata dalla formula: $1.118 \times 10^{-5} \times R \times N^2$. Per esempio, con un raggio del rotore di 8,6 cm, la centrifugazione a 5.000 rpm produrrà una forza di 2.404 g; con un raggio del rotore di 13,5 cm, la centrifugazione a 3.900 rpm produrrà 2.296 g. La **Figura 8.1** è un nomogramma per determinare l'RCF dal raggio del rotore e dalla velocità di rotazione.

Figura 8.1 Nomogramma per determinare la forza centrifuga a partire dal raggio del rotore e dalla velocità di rotazione

Una linea retta che unisce il raggio del rotore (cm, *asse sinistro*) e la velocità di rotazione (rpm, *asse destro*) interseca l'*asse centrale* in RCF. Nell'esempio, un raggio di 8 cm con una velocità di rotazione di 2.500 rpm dà un RCF di circa 550 g (il valore calcolato è 559 g).

**8.2.3 Potenziali rischi biologici in un laboratorio di andrologia**

I fluidi del corpo umano, come il liquido seminale, sono potenzialmente infettivi e devono essere maneggiati e smaltiti con particolare attenzione. Per il laboratorio di andrologia, i microrganismi patogeni più importanti che si possono trovare nel liquido seminale sono l'HIV e i virus dell'epatite B e C (HBV e HCV). Il personale di laboratorio dovrebbe considerare tutti i campioni biologici come potenzialmente infettivi e usare la dovuta cautela nel loro trattamento.

8.2.4 Procedure di sicurezza per il personale di laboratorio

- Una raccomandazione generale è che il personale del laboratorio che lavora con campioni umani dovrebbe essere immunizzato contro l'epatite B.
- Nessuno deve mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o conservare cibo nel laboratorio di andrologia.
- Il pipettaggio a bocca non deve essere permesso. Per la manipolazione dei liquidi si deve ricorrere al pipettaggio meccanico.

- Tutto il personale del laboratorio deve indossare abiti da laboratorio (camice monouso o altro abbigliamento dedicato al lavoro di laboratorio) che saranno tolti al momento dell'uscita. Deve indossare guanti monouso (in gomma, lattice o vinile, con o senza talco), specialmente quando maneggia sperma o plasma seminale fresco o congelato, o qualsiasi altro campione biologico o contenitore che vi sia venuto a contatto. I guanti devono essere rimossi e gettati quando il personale lascia il laboratorio o usa il telefono, il computer o altre attrezzature. I guanti non devono essere riutilizzati.
- Il personale dovrebbe lavarsi le mani regolarmente, soprattutto prima di lasciare il laboratorio, dopo aver manipolato i campioni e dopo aver rimosso camici e guanti.
- Il personale deve prendere precauzioni per evitare ferite accidentali causate da strumenti taglienti che possono essere contaminati con il liquido seminale ed evitare il contatto del liquido seminale con ferite aperte, tagli, abrasioni o lesioni.
- Devono essere prese misure per prevenire e, se necessario, contenere la fuoriuscita di campioni di liquido seminale, sangue o urina.
- Tutti gli oggetti taglienti (aghi, lame ecc.), dopo l'uso, devono essere messi in un apposito contenitore. Questo contenitore deve essere sigillato prima del completo riempimento e smaltito come gli altri oggetti pericolosi del laboratorio.
- Tutti gli articoli potenzialmente pericolosi (guanti, contenitori di liquido seminale) devono essere raccolti e smaltiti in modo appropriato.
- Visiere o mascherine chirurgiche dovrebbero essere indossate da tutto il personale durante le procedure che comportano il rischio di formazione di aerosol o goccioline, per esempio durante le procedure di vortex e centrifugazione di contenitori aperti. Le ultime gocce dei campioni di liquido seminale non devono essere espulse forzatamente dalle pipette, perché questo può causare la formazione di gocce o aerosol.
- Il personale deve indossare occhiali protettivi di sicurezza, guanti isolanti, un crio-grembiule e scarpe chiuse quando necessario, per esempio quando si usa l'azoto liquido (**Sezione 8.2.6, p. 220**). È importante che tutti gli articoli siano disponibili nelle taglie idonee ai membri del personale.

8.2.5 Procedure di sicurezza per le attrezzature di laboratorio

Le superfici di lavoro e i recipienti non monouso che sono entrati in contatto con il liquido seminale o con altri campioni biologici devono essere sterilizzati o disinfettati. Devono essere eseguite le seguenti procedure.

8.2.5.1 Quotidianamente, al completamento delle analisi:

- Lavare le superfici di lavoro con un disinfettante, per esempio, ipoclorito di sodio allo 0,1% (1 g/l) o un disinfettante simile, attendere almeno 1 ora (o una notte), quindi sciacquare il disinfettante con acqua.
- Immergere le camere di conta e i vetrini coprioggetto in ipoclorito di sodio allo 0,1% (1 g/l) o in un disinfettante simile per tutta la notte. Risciacquare il disinfettante con acqua.

8.2.5.2 Dopo una fuoriuscita

- Se il contenitore del campione viene contaminato esternamente, lavarlo con un disinfettante, per esempio, ipoclorito di sodio allo 0,1% (1 g/l) o un disinfettante simile, quindi risciacquarlo con acqua.
- Immediatamente dopo qualsiasi fuoriuscita, lavare il piano del banco di lavoro con un disinfettante, per esempio, ipoclorito di sodio all'1,0% (10 g/l) o un disinfettante simile, attendere almeno 4 ore, quindi risciacquare il disinfettante con acqua.

8.2.5.3 Inattivazione termica dell'HIV nei recipienti di raccolta del liquido seminale

Quando necessario, l'inattivazione termica dell'HIV nei recipienti di raccolta del liquido seminale può essere ottenuta mediante:

- sterilizzazione a calore secco per almeno 2 ore a 170°C (340°F): coprire con un foglio di alluminio prima del riscaldamento e lasciare raffreddare prima dell'uso;
- sterilizzazione a vapore (in autoclave) per almeno 20 minuti a 121°C (250°F) a 101 kPa (15 psi o 1 atmosfera) a pressione atmosferica;
- ebollizione continua per 20-30 minuti.

8.2.6 Procedure di sicurezza per la manipolazione dell'azoto liquido

- L'azoto liquido è pericoloso. Maneggiarlo sempre con cura, usare solo contenitori approvati e non cercare di sigillare i contenitori. Usare le pinze per prelevare gli oggetti immersi nell'azoto liquido.
- Proteggere gli occhi con una visiera o con occhiali di sicurezza, le mani con guanti isolanti, il corpo con un crio-grembiule e i piedi con scarpe chiuse. Queste protezioni devono essere disponibili nelle taglie idonee perché si adattino correttamente al personale che lavora nell'area.
- Quando l'azoto liquido viene versato su una superficie, tende a coprirla completamente e a raffreddare una vasta area. Gli oggetti che a temperatura ambiente sono morbidi e flessibili a contatto con l'azoto liquido di solito diventano duri e fragili.
- La temperatura estremamente bassa può causare gravi lesioni. Il contatto con la pelle può produrre un effetto simile a una bruciatura. Il gas che si origina dal liquido è estremamente freddo. Una breve esposizione al gas può non danneggiare la pelle del viso e delle mani, ma può essere dannosa per i tessuti più delicati, come quelli degli occhi.
- Mantenersi al riparo da schizzi di azoto liquido, dalla sua ebollizione e dall'emissione di gas freddo. Ebollizione e schizzi si verificano sempre quando si carica un contenitore caldo o quando si inseriscono oggetti nel liquido. Eseguire sempre queste operazioni lentamente per ridurre al minimo l'ebollizione e gli schizzi.
- Evitare di toccare vials non isolate. Non permettere mai a nessuna parte del corpo non protetta di entrare a contatto con vials o recipienti contenenti azoto liquido. Il metallo reso estremamente freddo dall'azoto può attaccarsi velocemente alla pelle e si corre il rischio di lesionare la cute quando si tenterà di staccarlo.

- Lavorare in aree ben ventilate. Una piccola quantità di azoto liquido può formare una grande quantità di gas (a temperatura ambiente, circa 700 volte il suo volume liquido). Se l'azoto evapora dal liquido in una stanza chiusa, la percentuale di ossigeno nell'aria può diminuire creando un rischio di asfissia. Sono disponibili rilevatori di ossigeno che fanno scattare un allarme quando il livello di ossigeno scende al di sotto del 17% (v/v) e dovrebbero essere usati quando si conserva l'azoto liquido.
- Usare solo visotubi e paillettes appositi per il congelamento in azoto liquido. Bisogna sempre fare attenzione, perché anche questi possono esplodere quando si scaldano.
- Tutto il personale coinvolto nelle procedure criogeniche che utilizzano l'azoto liquido dovrebbe ricevere una formazione adeguata. I responsabili dell'area dovrebbero prevedere una formazione pertinente ad opera di un ente esterno o del fornitore dell'attrezzatura per l'azoto liquido.

8.3 Microscopia per l'esame di base del liquido seminale

8.3.1 Premessa

La migliore fonte di informazioni tecniche relative a un microscopio è il manuale del produttore, che dovrebbe includere un diagramma utile a identificare tutte le parti. Qualora il manuale non dovesse essere disponibile, è possibile ottenere informazioni sull'impostazione e l'uso del microscopio da una ricerca su Internet.

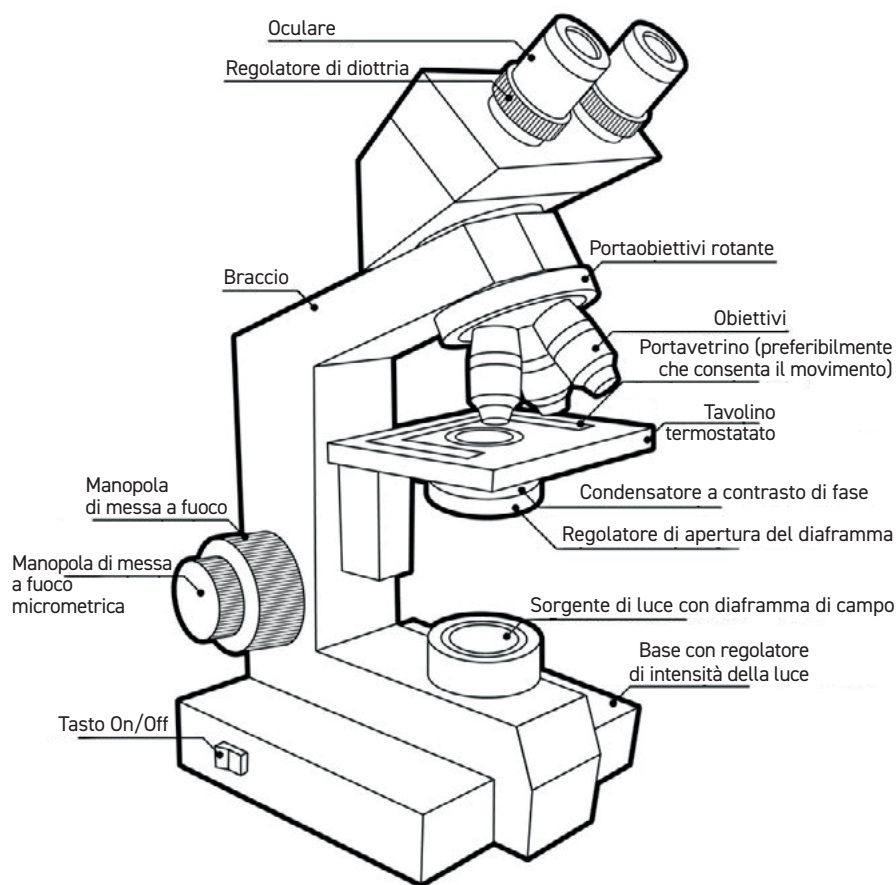
Per lo studio del liquido seminale, come descritto in questo manuale, si raccomanda l'utilizzo di un microscopio a contrasto di fase. Il microscopio dovrebbe essere preferibilmente binoculare (avere due oculari), dotato di un condensatore di fase, di una serie completa di obiettivi 10x, 20x (o 25x) e 40x (o 63x) (per la valutazione della motilità e la conta degli spermatozoi e delle cellule nemaspermiche) e di un obiettivo in campo chiaro 100x a immersione a olio (per la valutazione della morfologia e della vitalità).

- La qualità e il prezzo degli obiettivi variano considerevolmente. Gli obiettivi più costosi offrono una risoluzione di immagine migliore, ma anche obiettivi di qualità inferiore possono essere comunque adeguati. Bisogna considerare che con obiettivi di alta qualità il lavoro di laboratorio può comportare un minor affaticamento degli occhi del personale.
- I reticoli oculari (reticoli, micrometri oculari) sono dischi di vetro con scale di dimensioni note, di solito 5 mm o 10 mm, o griglie di varie forme. Alcuni oculari sono dotati di reticoli permanenti; altri invece possono essere svitati per permettere l'inserimento di un reticolo. Sono disponibili in diversi diametri e dovrebbero corrispondere esattamente al diametro dell'oculare. Possono essere calibrati con un micrometro graduato per determinare le dimensioni dello spermatozoo. Sono anche usati per delimitare l'area del campo nella valutazione della motilità degli spermatozoi. Quella mostrata in **Figura 2.4, p. 27** e **Figura 8.4, p. 239** è una griglia di 5×5 mm, che è una buona dimensione per la valutazione della motilità sia con ingrandimento 20x che 40x. Alcuni tecnici preferiscono questa dimensione rispetto a una griglia di 10×10 mm per stimare la concentrazione o valutare la morfologia.

- Il vetrino micrometrico è un vetrino da microscopio modificato sul quale è stata incisa una scala graduata, di solito lunga 1 mm e divisa in intervalli di 10 µm. Può essere usato per calibrare il micrometro dell'oculare o il reticolo della griglia e per misurare le dimensioni, per esempio, per lo studio della motilità (Figura 8.5, p. 239).

La procedura descritta di seguito garantirà la possibilità di ottenere immagini microscopiche di ottima qualità. Se la luce è allineata e regolata, l'immagine sarà chiara, nitida e difficilmente potrà causare affaticamento agli occhi. Le seguenti procedure devono essere rispettate quando si usa un nuovo microscopio o quando le immagini sono di scarsa qualità.

Figura 8.2 Sezione di un microscopio



8.3.1.1 La lente dell'obiettivo

Ogni obiettivo riporta delle informazioni, come per esempio:

UPlanFl	PlanApo	Piano Neofluor	Piano	S Fluor
20×/0,80 imm corr	40×/0,75 Ph2	100×/1,35 iride a olio	100×/1,25 olio Ph3	20×/0,75∞/0,17
160/0,17	∞/0,17	∞/-	∞/0,17 WD 1,0	

Plan: obiettivo planare che consente un campo visivo piatto, in cui tutto è a fuoco.

Apo: obiettivo apocromatico che corregge l'aberrazione cromatica.

F, Fl, FL, Neofluor, Fluo, Fluotar, UV, S-Fluor: obiettivi che trasmettono la luce UV; sono utilizzati per la microscopia a fluorescenza.

100×, 63×, 40× ecc.: ingrandimento dell'obiettivo.

0,30, 0,50, 0,80, 1,30, 1,40 ecc.: apertura numerica (NA) dell'obiettivo. È un indicatore della capacità dell'obiettivo di convogliare la luce. Insieme alla lunghezza d'onda della luce utilizzata, la NA determina la risoluzione (la più piccola distanza tra due punti che possono essere distinti come separati). Scegliere la NA più alta per la migliore risoluzione.

Ph, Ph1, Ph2, Ph3, NP, N: indicano un obiettivo con un anello di fase al suo interno. Ph indica gli anelli di fase positiva, NP o N quelli di fase negativa. Gli obiettivi Ph1, Ph2 e Ph3 richiedono ciascuno un diverso anello di fase nel condensatore. Le ottiche a contrasto di fase positiva permettono di visualizzare le strutture intracellulari (sono utilizzate per i preparati a fresco e per la motilità), mentre le ottiche a contrasto di fase negativa producono immagini chiare su uno sfondo scuro (sono utilizzate per i preparati a fresco o nei sistemi CASA).

Imm, immersione, olio, W: indicano un obiettivo progettato per lavorare con un fluido – spesso olio, acqua (W) o glicerolo – posto tra l'oggetto e la lente per fornire un'immagine più nitida (se non indicato, l'obiettivo è considerato "ad aria" e non deve essere usato con un liquido).

Iride: indica un obiettivo con un diaframma controllato da un anello zigrinato.

Corr: indica un obiettivo con un collare di correzione zigrinato che permette l'uso di mezzi di immersione con diversi indici di rifrazione.

160, ∞: indica la lunghezza della vial o la distanza tra l'oculare e l'obiettivo. Di solito è 160 mm, ma nella maggior parte degli obiettivi moderni è infinito (∞).

0,17, -: spessore del coprioggetto necessario per l'obiettivo. Un vetrino coprioggetto di numero 1,5 (spessore 0,16-0,19 mm) è utile per la maggior parte degli scopi. Gli emocitometri hanno bisogno di vetrini coprioggetto numero 4 (spessore 0,44 mm). "-" significa che lo spessore del coprioggetto non è importante o che il liquido di immersione può essere aggiunto direttamente sul vetrino.

WD: distanza di lavoro, ovvero la distanza tra la lente frontale dell'obiettivo più vicino e la superficie del coprioggetto quando il campione è a fuoco. Generalmente diminuisce all'aumentare dell'ingrandimento e dell'NA, dando origine a lenti con distanze di lavoro normali (NWD, fino a 5 mm), lunghe (LWD, 5,25-9,75 mm), extra-lunghe (ELWD, 10-14 mm) e super-lunghe (SLWD, 15-30 mm). Alcuni microscopi possono richiedere una lente LWD per l'uso con una camera di Neubauer modificata.

Indice di rifrazione: la misura del ritardo di fase della luce che passa attraverso un mezzo. L'indice di rifrazione (RI, n) del vuoto è 1,0000, dell'aria è circa 1,0 (1,0008), dell'acqua è 1,33, del glicerolo è 1,47 e quello della maggior parte degli oli di immersione è 1,515. I supporti di montaggio dopo l'essiccazione hanno un RI simile (1,488-1,55) a quello del vetro (1,50-1,58).

8.3.2 Regolazione del microscopio

8.3.2.1 Caricamento di un campione o di un micrometro per la corretta messa a fuoco

1. Mettere 10 µl di liquido seminale su un vetrino da microscopio, coprire con un vetrino coprioggetto da 22×22 mm (spessore numero 1,5, 0,17 mm) e posizionare il vetrino sul tavolino del microscopio. Si può anche usare un micrometro da tavolino, invece di un vetrino da liquido seminale, per regolare il microscopio.
2. Accendere la luce e regolarla all'intensità che dà il massimo contrasto pur essendo confortevole per gli occhi.



Nota: Se il microscopio è trioculare (cioè ha un terzo oculare al quale può essere montata una fotocamera per le fotografie o la video-registrazione), ci sarà una manopola di deviazione della luce, che si trova generalmente a destra degli oculari. Questa manopola avrà probabilmente tre impostazioni: una per permettere a tutta la luce di andare agli oculari, una per permettere a tutta la luce di andare alla telecamera e una terza per deviare metà della luce agli oculari e metà alla telecamera.

3. Selezionare l'obiettivo a fase positiva 10x. Alzare o abbassare il condensatore in modo che corrisponda alla potenza dell'obiettivo scelto.

8.3.2.2 Regolazione degli oculari

Muovendo gli oculari separatamente o insieme, regolare lo spazio tra di essi adattandolo ai propri occhi.

8.3.2.3 Messa a fuoco dell'immagine

1. Ruotare la messa a fuoco macrometrica per portare il tavolino il più vicino possibile all'obiettivo 20x o 40x. Per evitare di rompere l'obiettivo e il vetrino, guardare l'obiettivo e il tavolino dalla parte anteriore o laterale e non attraverso gli oculari. Usare la messa a fuoco macrometrica per regolare l'altezza del tavolino in modo che il vetrino sia quasi a contatto con l'obiettivo. Si noti che la messa a fuoco deve essere rivolta a ridurre la distanza del tavolino dall'obiettivo.
2. Guardando attraverso entrambi gli oculari, girare lentamente la messa a fuoco per muovere gradualmente il tavolino dall'obiettivo, fino a quando il campione è approssimativamente a fuoco. Usare poi la manopola micrometrica per ottenere la migliore messa a fuoco.



Nota: Se la messa a fuoco è difficile da trovare, provare a mettere a fuoco il bordo molato del vetrino per ottenere il giusto piano focale.

8.3.2.4 Messa a fuoco degli oculari

Con alcuni microscopi, i due oculari possono essere messi a fuoco indipendentemente. Con altri, invece, un oculare è fisso e l'altro può essere messo a fuoco.

1. Gli oculari regolabili sono di solito contrassegnati con una scala "+ / 0 / -". Regolare l'oculare su "0" prima di iniziare questo procedimento.

2. Se un oculare è fisso, guardare solo attraverso l'oculare fisso (chiudere o coprire l'altro occhio).
3. Mettere a fuoco l'immagine del campione regolando la micrometrica. È utile mettere a fuoco un oggetto che non si muove, per esempio, uno spermatozoo morto, una particella di polvere o la griglia del micrometro.
4. Mettere a fuoco l'oculare regolabile guardando attraverso la lente e chiudendo o coprendo l'occhio sull'oculare fisso. Ruotare l'anello zigrinato alla base dell'oculare su "+" o "-" fino a quando non si ottiene una messa a fuoco appropriata per il proprio occhio.

8.3.2.5 Messa a fuoco del condensatore di luce

1. Chiudere il diaframma (sopra la fonte di luce alla base del microscopio).
2. Alzare o abbassare il condensatore usando le piccole manopole poste a sinistra o a destra del condensatore fino a quando i bordi del diaframma sono a fuoco nel miglior modo possibile e il cerchio di luce è piccolo e chiaro. Questa posizione sarà generalmente raggiunta quando il condensatore è nella posizione più alta. Il bordo dell'immagine può cambiare da blu a rosso a seconda di come è focalizzato il condensatore (aberrazione cromatica), e i bordi del condensatore possono rimanere leggermente sfocati. La luce può essere centrata o meno.



Nota: Se l'apertura del campo non ha un diaframma a iride, mettere a fuoco un oggetto appuntito (per esempio, la punta di una matita) posto sulla sorgente di luce.

8.3.2.6 Centratura del condensatore

1. Centrare il diaframma di campo con le manopole di centraggio del condensatore. Queste sono generalmente due (di solito zigrinate) ed escono diagonalmente da sotto il condensatore, di fronte o di lato.
2. Una volta che l'immagine è centrata sulla luce, aprire il diaframma di campo in modo che la luce riempi solo il campo visivo. Non aprire il diaframma di campo oltre quel punto.
3. Chiudere l'apertura del condensatore fino a quando la luce scompare.

8.3.2.7 Regolazione degli anelli di fase

Viene eseguita con un telescopio di centraggio, disponibile presso il produttore del microscopio.

1. Evidenziare l'anello di fase nel condensatore per l'obiettivo utilizzato.
2. Rimuovere un oculare e sostituirlo con il telescopio di centraggio. Mettere a fuoco l'anello del telescopio di centraggio tenendo la base con una mano e ruotando la parte superiore con l'altra mentre si guarda attraverso di esso. Ruotarlo fino a quando i due anelli sono a fuoco: un anello è scuro (anello di fase) e uno chiaro (anello chiaro).

3. Allineare i due anelli in modo che siano concentrici, girando le manopole di regolazione situate sul condensatore di fase. Queste manopole sono di solito situate verso la parte posteriore del condensatore.

4. Sostituire il telescopio di centraggio con l'oculare del microscopio.

8.3.2.8 Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è usata per rilevare i nuclei degli spermatozoi nella procedura di conta con colorante Hoechst 33342 (**Sezione 3.1, p. 83**) e la reazione acrosomiale con lectina marcata con FITC (**Sezione 4.2.2, p. 144**). L'eccitazione spettrale massima del colorante Hoechst 33342 e del FITC è rispettivamente di 346 nm e 494 nm, e i corrispondenti valori massimi di emissione sono 460 nm e 520 nm. È necessario un obiettivo a fluorescenza (**Sezione 8.3.1.1, p. 222**). Ogni modello di microscopio avrà, come attrezzatura opzionale da acquistare, un set di specchi dicroici e di filtri di sbarramento necessari per esaminare questi coloranti.

8.4 Soluzioni stock e terreni di coltura

Per tutte le soluzioni, è necessario l'utilizzo di acqua purificata (distillata, bidistillata o deionizzata H₂O) per i test di funzionalità seminale in vitro (per i tessuti utilizzati per la riproduzione assistita, dovrebbe essere utilizzato terreno di coltura). In questa edizione l'uso della soluzione Ham F10 non è raccomandato, sulla base dei noti effetti negativi sugli spermatozoi, sulla funzione del liquido seminale e sulla possibile interazione con i test [431].

Quando si esaminano gli spermatozoi, il pH (di solito pH 7,4) e l'osmolarità del terreno sono fondamentali.

8.4.1 Tampone del pH del terreno

Il pH di un terreno di coltura può essere controllato attraverso l'uso di molecole tampone, più comunemente l'HEPES (acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazinil]-etan-solfonico) o un sistema tampone standard da 25 mM di bicarbonato. Il meccanismo tampone del bicarbonato è simile al meccanismo omeostatico acido-base presente nei tessuti viventi: l'anidride carbonica (CO₂) reagisce con l'acqua (H₂O) per formare acido carbonico (H₂CO₃), che a sua volta si dissocia rapidamente per formare uno ione bicarbonato (HCO₃⁻) e uno ione idrogeno (H⁺), come mostrato nella seguente reazione di equilibrio:



L'aggiunta di 25 mM di bicarbonato a un terreno, quando è equilibrato con la percentuale corretta di CO₂, permette di bloccare/tamponeare il pH del mezzo di coltura.

Va notato che la percentuale corretta di CO₂ per ottenere un pH 7,4 dipende dalla pressione parziale della CO₂ e quindi, soprattutto, varia in base all'altitudine sul livello del mare. Il 5% di CO₂ spesso citato è quindi rilevante solo al livello del mare, e la regolazione locale (compensazione) della pCO₂ (attraverso la percentuale di CO₂) dovrebbe essere fatta per ottenere il pH corretto [432].

8.4.2 Composizione dei terreni di coltura e osmolalità

L'osmolarità¹¹ o osmolalità¹² di un terreno è fondamentale per il comportamento delle cellule al suo interno. È una variabile chiave che deve essere considerata nel caso un terreno sia preparato in laboratorio piuttosto che acquistato. Dovrebbe anche essere sempre richiesta/specificata per qualsiasi terreno di coltura acquistato.

L'intervallo standard per i terreni di coltura del liquido seminale (diversi dalla soluzione di test di rigonfiamento ipo-osmotico) è 280-295 mOsm (milliosmoli). Per ottenere questo intervallo con le formulazioni descritte, solitamente viene raggiunto il volume finale aggiungendo poi lentamente l'ingrediente in eccesso, di solito il cloruro di sodio anidro, fino a raggiungere l'osmolarità corretta. Questa sarebbe l'opzione preferita quando è disponibile un osmometro per queste misurazioni. Le formulazioni fornite suggeriscono di "arrivare a 1.000 ml" in modo che sia possibile fare un'approssimazione vicina quando un osmometro non è disponibile.

Tuttavia, è essenziale tenere presente che l'osmolalità aumenta rapidamente in vitro negli eiaculati raccolti in un contenitore per campioni e lasciati liquefare. Gli spermatozoi in vitro si adattano all'aumento dell'osmolalità, e questo significa che l'esposizione di spermatozoi ai terreni con un'osmolalità di 280-290 mOsm provoca uno shock ipo-osmotico agli spermatozoi, il che potrebbe diminuire la motilità e la resa del DGC [147].

8.4.3 Specifiche dei prodotti chimici/ingredienti del terreno di coltura

I prodotti chimici sono specificati di seguito con i loro livelli di idratazione più comuni all'acquisto. Alcuni, per esempio CaCl_2 , possono essere disponibili a diversi livelli di idratazione (cioè CaCl_2 anidro; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Se viene utilizzata un'idratazione diversa, i pesi misurati devono essere regolati di conseguenza per ottenere la molarità corretta. Allo stesso modo è importante notare che molti di questi prodotti chimici sono igroscopici, quindi la loro corretta conservazione è vitale; pertanto, la durata di conservazione dovrebbe essere rispettata, o si otterranno terreni non idonei.

Ci si aspetta che i prodotti chimici utilizzati per questi test siano almeno simili a quelli utilizzati per la coltura cellulare, quando disponibili.

Molti dei terreni di coltura elencati richiedono l'aggiunta di siero. Il suggerimento usuale per terreni diagnostici è la BSA (Frazione V), di solito fornita come polvere essiccata, in quanto è un sostituto più economico, stabile e ampiamente disponibile del siero umano. Per test come la reazione acrosomiale, dove vengono valutati gli effetti funzionali, il siero dovrebbe sempre essere privo di acidi grassi/carbone-de-lipidato per aumentare la consistenza del lotto ed evitare gli effetti di contaminanti come gli ormoni. I test sui lotti dovrebbero essere eseguiti nei laboratori che fanno questi test di routine.

Se il liquido seminale deve essere usato per il trattamento, allora il siero umano screenato (normalmente fornito come liquido) dovrebbe sempre essere adottato per l'uso in vivo. Le condizioni e le limitazioni di stoccaggio pertinenti devono essere rispettate.

¹¹ Particelle osmotiche per volume di solvente.

¹² Particelle osmotiche per massa di solvente. Quando il solvente è l'acqua, l'osmolarità e l'osmolalità sono essenzialmente identiche.

L'aggiunta di rosso fenolo nei terreni di coltura è utilizzata come indicatore di pH perché aiuta il riconoscimento visivo dei principali cambiamenti di pH. Se devono essere eseguiti test con fluorescenti, si raccomanda generalmente di omettere il rosso fenolo, in quanto aumenta la fluorescenza di fondo delle cellule spermatiche e dei terreni.

8.4.4 Biggers, Whitten e Whittingham (BWW)

8.4.4.1 BWW soluzione madre [433]

1. A 1.000 ml di acqua distillata aggiungere 5,54 g di cloruro di sodio (NaCl), 0,356 g di cloruro di potassio (KCl), 0,294 g di solfato di magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,250 g di cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,162 g di diidrogenofosfato di potassio (KH_2PO_4).
2. Regolare il pH a 7,4 con 1 mol/l di idrossido di sodio (NaOH).
3. Aggiungere 1,0 ml (0,04%, 0,4 g/l) di rosso fenolo per litro.

Questa soluzione può essere conservata per diverse settimane a 4°C.

8.4.4.2 BWW soluzione di lavoro

Il giorno dell'utilizzo:

1. Integrare 100 ml di soluzione madre con 210 mg di bicarbonato di sodio (NaHCO_3), 100 mg di D-glucosio, 0,37 ml di sciroppo di lattato di sodio al 60% (v/v), 3 mg di piruvato di sodio, 350 mg di albumina sierica bovina (Frazione V), 10.000 unità di penicillina e 10 mg di solfato di streptomina.
2. Riscaldare la soluzione a 37°C prima dell'uso in atmosfera al 5% (v/v) di CO_2 e 95% (v/v) di aria.
3. Per l'incubazione in aria: aggiungere 20 mmol/l di HEPES (sale Na: 5,21 g/l) e ridurre NaHCO_3 a 10 mmol/l [28].

8.4.5 Tampone salino fosfato di Dulbecco (DPBS)

1. PBS-glucosio di Dulbecco: a 750 ml di acqua distillata aggiungere 0,2 g di cloruro di potassio (KCl), 0,2 g di diidrogenofosfato di potassio (KH_2PO_4), 0,1 g di cloruro di magnesio esaidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 8,0 g di cloruro di sodio (NaCl), 2,16 g di diidrogenofosfato di sodio eptaidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 1,00 g di D-glucosio.
2. Sciogliere 0,132 g di cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in 10 ml di acqua distillata e aggiungere lentamente la soluzione precedente miscelando.
 - Per prevenire la formazione di precipitati, aggiungere CaCl_2 separatamente, lentamente e mescolando.
3. Regolare il pH a 7,4 con 1 mol/l (pari a 1 M o 1 N) di idrossido di sodio (NaOH).
4. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

- Se necessario, prima dell'uso aggiungere 0,3 g di albumina sierica bovina (Frazione V) per 100 ml.

8.4.6 Soluzione salina bilanciata di Earle (EBSS)

1. A 750 ml di acqua distillata aggiungere 6,8 g di cloruro di sodio (NaCl), 2,2 g di bicarbonato di sodio (NaHCO₃), 0,14 g di diidrogenofosfato di sodio monoidrato (NaH₂PO₄·H₂O), 0,4 g di cloruro di potassio (KCl), 0,20 g di solfato di magnesio eptaidrato (MgSO₄·7H₂O) e 1,0 g di D-glucosio.
2. Sciogliere lentamente 0,23 g di cloruro di calcio (CaCl₂) nella soluzione precedente mescolando.
3. Regolare il pH a 7,4 con 1 mol/l di acido cloridrico (HCl) o 1 mol/l di idrossido di sodio (NaOH).
4. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.
5. Per l'incubazione in aria: aggiungere 20 mmol/l di HEPES (sale Na: 5,21 g/l) e ridurre NaHCO₃ a 10 mmol/l [432].

8.4.7 Soluzione salina bilanciata di Earle integrata (sEBSS)

1. A 750 ml di acqua distillata aggiungere 6,8 g di cloruro di sodio (NaCl), 2,2 g di bicarbonato di sodio (NaHCO₃), 0,14 g di diidrogenofosfato di sodio monoidrato (NaH₂PO₄·H₂O), 0,4 g di cloruro di potassio (KCl), 0,20 g di solfato di magnesio eptaidrato (MgSO₄·7H₂O) e 1,0 g di D-glucosio.
2. Sciogliere lentamente 0,23 g di cloruro di calcio (CaCl₂) nella soluzione precedente mescolando.
3. Aggiungere 3 g di albumina sierica bovina (Frazione V).
4. Aggiungere 0,30 g di piruvato di sodio.
5. Aggiungere il lattato di sodio (di solito come sciroppo di sodio D,L-acido lattico) a una concentrazione finale di 19 mM.
6. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

8.4.8 Fluido tubarico umano (HTF)

Formulazione originale da Quinn et al. [434]:

1. A 750 ml di acqua distillata aggiungere 5,931 g di cloruro di sodio (NaCl), 0,35 g di cloruro di potassio (KCl), 0,05 g di solfato di magnesio eptaidrato (MgSO₄·7H₂O), 0,05 g di diidrogenofosfato di potassio (KH₂PO₄), 2,1 g di bicarbonato di sodio (NaHCO₃), 0,5 g di D-glucosio, 0,036 g di piruvato di sodio, 0,3 g di cloruro di calcio diidrato (CaCl₂·2H₂O) e 4,0 g di DL-lattato di sodio (sciroppo al 60% (v/v))¹³.

¹³ Alcune formulazioni pubblicate usano il lattato di calcio come fonte di lattato [29].

2. A 1 ml del terreno precedente aggiungere 10 µg di rosso fenolo, 100 U di penicillina e 50 µg di solfato di streptomicina.
3. Regolare il pH a 7,4 con 1 mol/l di acido cloridrico (HCl).
4. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.
5. Per l'incubazione in aria: aggiungere 20 mmol/l di HEPES (sale Na: 5,21 g/l) e ridurre NaHCO₃ a 10 mmol/l.

8.4.9 Tampone tris salino (TBS)

1. A 750 ml di acqua distillata aggiungere 6,055 g di tris base e 8,52 g di cloruro di sodio (NaCl).
2. Regolare il pH a 8,2 con 1 mol/l di acido cloridrico (HCl).
3. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.

8.4.10 Soluzione di Tyrode

1. A 750 ml di acqua distillata aggiungere 0,2 g di cloruro di calcio anidro (CaCl₂), 0,2 g di cloruro di potassio (KCl), 0,05 g di diidrogenofosfato di sodio (Na₂HPO₄), 0,2 g di cloruro di magnesio esaidrato (MgCl₂·6H₂O), 8,0 g di cloruro di sodio (NaCl), 1,0 g di bicarbonato di sodio (NaHCO₃) e 1,0 g di D-glucosio.
2. Regolare il pH a 7,4 con 1 mol/l di acido cloridrico (HCl) o 1 mol/l di idrossido di sodio (NaOH).
3. Portare a 1.000 ml con acqua distillata.
4. Se necessario, aggiungere 0,3 g di albumina sierica bovina (Frazione V) per 100 ml prima dell'uso.

8.4.11 Colorante Papanicolaou

I coloranti disponibili in commercio sono di solito soddisfacenti, ma possono anche essere preparati in laboratorio.



Nota: Controllare l'acidità dell'acqua distillata prima di preparare la serie di alcol. Il pH dovrebbe essere 7,0.

8.4.11.1 EA-36 (equivalente a EA-50)

Costituenti

- | | |
|--|--------|
| • Eosina Y (indice di colore 45380) | 10 g |
| • Marrone Bismarck Y (indice di colore 21000) | 10 g |
| • Verde chiaro SF, giallastro (indice di colore 42095) | 10 g |
| • Acqua distillata | 300 ml |

- Etanolo al 95% (v/v) 2.000 ml
- Acido fosfotungstico 4 g
- Carbonato di litio acquoso saturo (> 1,3 g/100 ml) 0,5 ml

Soluzioni madre

Preparare soluzioni separate al 10% (100 g/l) di ciascuno dei coloranti come segue.

1. Sciogliere 10 g di eosina Y in 100 ml di acqua distillata.
2. Sciogliere 10 g di marrone Bismarck Y in 100 ml di acqua distillata.
3. Sciogliere 10 g di verde chiaro SF in 100 ml di acqua distillata.

Preparazione

1. Per preparare 2 litri di colorante, miscelare le soluzioni madre come segue:

- 50 ml di eosina Y;
- 10 ml di marrone Bismarck Y;
- 12,5 ml di verde chiaro SF.

2. Portare a 2.000 ml con etanolo al 95% (v/v).

3. Aggiungere 4 g di acido fosfotungstico.

4. Aggiungere 0,5 ml di soluzione saturata di carbonato di litio.

5. Miscelare bene e conservare a temperatura ambiente in bottiglie marrone scuro con tappo a chiusura ermetica.



Nota 1: La soluzione è stabile per 2-3 mesi.



Nota 2: Passare attraverso un filtro da 0,45 µm prima dell'uso.

8.4.11.2 Orange G6

Costituenti

- Cristalli orange G (indice di colore 16230) 10 g
- Acqua distillata 100 ml
- Etanolo al 95% (v/v) 1.000 ml
- Acido fosfotungstico 0,15 g

Soluzione madre numero 1 (orange G6, soluzione al 10% (100 g/l))

1. Sciogliere 10 g di cristalli di orange G in 100 ml di acqua distillata.
2. Agitare bene. Lasciare riposare in una bottiglia marrone scuro o coperta da un foglio di alluminio a temperatura ambiente per 1 settimana prima dell'uso.

Soluzione madre numero 2 (orange G6, soluzione allo 0,5%)

1. A 50 ml di soluzione madre numero 1 aggiungere 950 ml di etanolo al 95% (v/v).
2. Aggiungere 0,15 g di acido fosforotungstico.
3. Miscelare bene. Conservare in bottiglie marrone scuro o rivestite di fogli di alluminio a temperatura ambiente.

**Nota 1:** Filtrare prima dell'uso.**Nota 2:** La soluzione è stabile per 2-3 mesi.*8.4.11.3 Ematossilina di Harris senza acido acetico*

Costituenti

- Ematossilina (cristalli scuri; indice di colore 75290).
- Etanolo al 95% (v/v).
- Alluminio ammonio solfato dodecaidrato ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).
- Ossido di mercurio (HgO).

Preparazione

1. Sciogliere, riscaldando, 160 g di alluminio ammonio solfato dodecaidrato in 1.600 ml di acqua distillata.
2. Sciogliere 8 g di cristalli di ematossilina in 80 ml di etanolo al 95% (v/v).
3. Aggiungere la soluzione di ematossilina alla soluzione di alluminio ammonio solfato dodecaidrato.
4. Riscaldare la miscela a 95°C.
5. Togliere la miscela dal calore e aggiungere lentamente 6 g di ossido di mercurio, miscelando.

**Nota:** La soluzione sarà di colore porpora scuro.

6. Immergere immediatamente il contenitore in acqua fredda.
7. Quando la soluzione è fredda, filtrare.
8. Conservare a temperatura ambiente in bottiglie marrone scuro o coperte da fogli di alluminio.
9. Far decantare per 48 ore prima dell'uso.
10. Diluire la quantità necessaria con una quantità uguale di acqua distillata.
11. Filtrare di nuovo.

8.4.11.4 Soluzione di Scott sostitutiva dell'acqua di rubinetto



Nota: La soluzione di Scott si usa solo quando l'acqua di rubinetto non è sufficiente a restituire il colore blu al nucleo; dovrebbe essere cambiata frequentemente, per esempio dopo aver risciacquato 20-25 vetrini.

Costituenti

- 3,5 g di bicarbonato di sodio (NaHCO_3).
- 20,0 g di solfato di magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Cristalli di timolo (se necessario come conservante).
- 1.000 ml di acqua distillata.

8.4.11.5 Soluzione di etanolo acido

Costituenti

- 300 ml di etanolo al 99,5% (v/v).
- 2,0 ml di acido cloridrico concentrato (HCl).
- 100 ml di acqua distillata.

8.5 Modello di refertazione per l'esame del liquido seminale

Qui di seguito è riportato un esempio di modulo di registrazione. Permette di registrare le osservazioni fatte durante l'esame del liquido seminale con i metodi descritti in questo manuale. Include anche variabili derivate, che sono combinazioni di risultati a partire dai dati primari. Per la tracciabilità, dovrebbero essere registrati i membri del personale che hanno eseguito le diverse parti dell'intera procedura, dall'accoglienza del paziente agli esami, fino ai calcoli post-esame e alla comunicazione dei risultati.

Il modulo di registrazione dei campioni ha più colonne per registrare i risultati degli esami del liquido seminale eseguiti in tempi diversi. Questo è un modo conveniente di presentare i risultati di una serie di campioni di liquido seminale. Può essere utile aggiungere uno spazio extra in alcune parti del modulo per permettere la registrazione di commenti e osservazioni che non possono essere codificati. I limiti di riferimento, se disponibili e applicabili, sono indicati tra parentesi quadre.

Tabella 8.4 Modello esemplificativo per la registrazione dell'esame del liquido seminale

Nome del paziente	Data			
Data di nascita, altro ID	ID campione			
Clinica/medico di riferimento/data di riferimento				
Informazioni dal paziente	Giorni di astinenza			
Raccolta	In laboratorio? Sì/No			
Raccolta completa	Sì/No; se No, cosa manca?			
Tempo di raccolta	Ora:minuto			

Consegna campione, se non raccolto in laboratorio	Ora:minuto			
Grave infezione/patologie infiammatorie negli ultimi 6 mesi? Farmaci per malattie severe o croniche?				
Volume dell'eiaculato (ml)	Peso netto dell'eiaculato			
Esame iniziato	Ora:minuto			
Tempo di esame	Ora:minuto			
Eiaculato - esame macroscopico				
Aspetto (1, normale; 2, anormale)				
Viscosità (1, normale; 2, anormale)				
Fluidificazione (1, normale; 2, anormale (minuti))				
Trattamento (per esempio, per indurre la liquefazione)				
Eiaculato - esame microscopico				
Aggregazioni (0, nessuna; 1, alcune; 2, molte)				
Agglutinazione				
pH				
Numero di spermatozoi				
Numero totale (10 ⁶ per eiaculato)				
Concentrazione (10 ⁶ per ml)				
Errore (%) se si contano meno di 400 cellule				
Motilità				
Progressiva rapida (a) (%)				
Progressiva lenta (b) (%)				
Non progressiva (c) (%)				
Immobili (d) (%)				
Motilità totale (a+b+c) (%)				
Motilità progressiva totale (a+b)				
Vitalità				
Vitalità (quando < 40% mobile) (% vivo)				
Morfologia				
Forme normali (%) (tipiche)				
Atipie testa (%)				
Atipie tratto intermedio (%)				
Atipie tratto principale (%)				
Residui citoplasmici in eccesso (%)				
Indice di teratozoospermia (TZI)				
Cellule non nemaspermiche				
Cellule perossidasi-positivo, concentrazione (10 ⁶ per ml)				
Funzione delle ghiandole accessorie				
Zinco (µmol per eiaculato) [≥ 2.4]				
Fruttosio (µmol per eiaculato) [≥ 13]				
α-glucoosidasi (neutra) (mU/eiaculato) [≥ 20]				
Commenti aggiuntivi				
Risultati degli esami approvati per il rilascio da				

8.6 Materiale QC

8.6.1 Produzione di campioni seminali per il controllo di qualità

I campioni del QC dovrebbero idealmente essere rappresentativi della gamma di campioni seminali trattati nel laboratorio. Se si deve analizzare solo un piccolo numero di campioni QC, dovrebbe essere quello più rilevante per l'attività principale del laboratorio. Per esempio, nel laboratorio di un servizio di infertilità si potrebbero scegliere intervalli clinicamente significativi (concentrazione 15×10^6 - 50×10^6 per ml, motilità progressiva 30-50%, morfologia normale inferiore al 5%).

- Aliquote di campioni seminali miscelate insieme possono essere conservate a fresco a 4°C con un conservante e analizzate per la concentrazione degli spermatozoi in tempi diversi (**Sezione 8.6.3, p. 240**).
- Gli spermatozoi potrebbero non sopravvivere sufficientemente bene alla crioconservazione per essere una fonte utile di materiali QC interni ed esterni per la valutazione di motilità e i test anticorpali.
- I video ottenuti con una risoluzione e un ingrandimento analoghi alle valutazioni quotidiane della motilità possono essere distribuiti sia su supporti come DVD, CD, memory stick, sia in streaming attraverso Internet. Per quest'ultimo caso, è importante che l'ampiezza di banda e la connessione permettano un download continuo con risoluzione e ingrandimento sufficienti.
- Fotografie e video possono essere utilizzati per la morfologia degli spermatozoi.
- Le registrazioni video sono particolarmente utili per la formazione nella valutazione della motilità e della morfologia, ma il loro uso dovrebbe integrare, non sostituire, le valutazioni in replicato dei campioni seminali.
- I vetrini di liquido seminale colorato possono essere utilizzati per il QC morfologico. Gli strisci fissati possono anch'essi essere conservati e utilizzati per monitorare la colorazione. I vetrini colorati possono deteriorarsi con il tempo, a seconda della qualità della procedura di fissaggio o della colorazione. Tuttavia, i vetrini colorati utilizzando la procedura Papanicolaou descritta in questo manuale e conservati al buio a temperatura ambiente dovrebbero durare per mesi o addirittura anni.
- Il siero positivo agli anticorpi antispermatozoo può essere utilizzato per il QC dei test IB indiretti, ma non è raccomandato per l'uso nei test IB diretti.

8.6.2 Preparazione di una video-registrazione per il controllo di qualità interno dell'analisi della motilità spermatica

Questo protocollo descrive come preparare una video-registrazione da utilizzare per il QC delle procedure di valutazione della motilità.

- Registrare almeno cinque campi per simulare i molti campi valutati per l'analisi della motilità durante l'esame seminale e per consentire la valutazione di almeno 400 spermatozoi.
- La video-registrazione dovrebbe contenere immagini di diversi campioni seminali, in modo da comprendere la motilità normalmente osservata durante l'esame seminale.

- La video-registrazione può avere semplicemente cinque campi di pochi campioni seminali; in altri casi, può essere necessaria una registrazione più complessa, per esempio, per la standardizzazione tra laboratori o in uno studio multicentrico. In questo caso, si potrebbero usare diversi campioni seminali, i quali potrebbero essere ripetuti in modo casuale durante la video-registrazione. I campioni ripetuti permettono di stimare la precisione "intra-operatore".

8.6.2.1 Attrezzatura supplementare

Oltre all'attrezzatura di routine per la stima della motilità, la preparazione delle registrazioni per il QC richiede la possibilità di guardare videoclip da una buona microscopia a contrasto di fase e di apportare modifiche con qualsiasi software che permetta campi separati e la numerazione dei campioni registrati con e senza un reticolo calibrato.

8.6.2.2 Procedura

1. Se sono disponibili diversi campioni seminali, l'intera video-registrazione può essere preparata in una sola sessione; altrimenti, i campioni possono essere registrati man mano che si rendono disponibili.
2. Se la motilità è valutata di solito come raccomandato, a 37°C, allora le registrazioni dovrebbero essere fatte alla stessa temperatura usando un tavolino termostato. Allo stesso modo, se la motilità è valutata di solito a temperatura ambiente, anche le registrazioni dovrebbero essere effettuate alla stessa temperatura.



Nota: Se la registrazione dev'essere fatta a 37°C, si dovrebbe accendere il tavolino termostato e portarlo alla temperatura stabile almeno 10 minuti prima dell'uso.

3. Preparare una registrazione di almeno 10 campi, assicurandosi che vengano registrati 400 spermatozoi da 5 diversi campioni seminali.
4. Per i campioni con bassa concentrazione di spermatozoi, possono essere necessari più di 10 campi per ottenere un numero adeguato di spermatozoi per la valutazione. La video-registrazione di 10 campi richiederà alcuni minuti.
5. La video-registrazione può essere fatta sia con un vetrino coprioggetto che con una camera fissa profonda 20 µm.



Nota 1: Quando si usano camere di conta monouso, la motilità sarà stabile per un periodo di tempo più lungo rispetto a quando si usano i vetrini portaoggetto e coprioggetto. Questo permetterà di registrare tutti i 10 (o più) campi dalla stessa preparazione.



Nota 2: Quando si usano i vetrini portaoggetto e coprioggetto, può essere necessario utilizzarne diversi durante la video-registrazione per evitare un calo notevole della motilità nel tempo.

6. Identificare diversi campioni seminali con vari tipi di motilità.
7. Ogni campione dovrebbe avere un codice unico per la video-registrazione. La codifica può variare dalla semplice marcatura di ogni campione alla marcatura di ogni campo di ogni campione. Per esempio, il primo marcatore potrebbe essere

all'inizio del primo campo, senza che appaiano altre codifiche fino al secondo campione. In alternativa, la codifica potrebbe includere marcature di ogni singolo campo, cioè il primo campo del primo campione dovrebbe essere contrassegnato 01-01, il secondo campo del primo campione 01-02 ecc. Questo sistema di marcatura più elaborato aiuta i tecnici a tenere traccia di dove si trovano durante l'analisi.



Nota 1: Quando si usano camere di conta monouso, la motilità sarà stabile per un periodo di tempo più lungo rispetto a quando si usano i vetrini portaoggetto e coprioggetto. Questo permetterà di registrare tutti i 10 (o più) campi dalla stessa preparazione.



Nota 2: Il modo più semplice per ottenere un'immagine bianca durante la registrazione è coprire la fonte di luce.

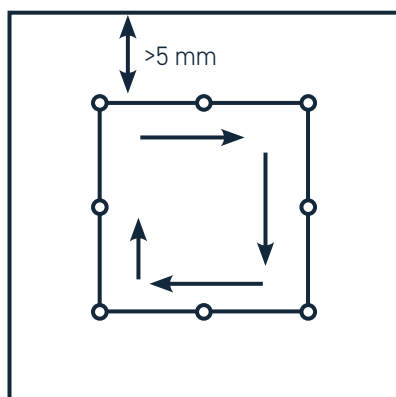


Nota 3: Questo può essere fatto anche prima di mettere in pausa la video-registrazione; dovrebbe essere sempre usato il tasto "pausa" piuttosto che il tasto "stop", poiché il tasto "stop" può disturbare la registrazione.

8. Registrare un'immagine di un vetrino micrometrico per 10 secondi all'ingrandimento che sarà usato per registrare i campioni. L'ingrandimento dovrebbe fornire un'immagine sul monitor simile a quella utilizzata per l'analisi visiva al microscopio. Quest'immagine fornisce un modello permanente dell'ingrandimento, che permette di allineare la griglia di acetato con lo schermo da usare durante l'analisi del videotape o la calibrazione di un sistema CASA.
9. Registrare l'immagine che codifica il primo campione per 5-7 secondi. Alla fine di questo tempo, bloccare la fonte di luce per 3 secondi per avere un'immagine bianca che serva da marcatore, poi mettere in pausa la registrazione.
10. Identificare il primo campione seminale da utilizzare per la registrazione. Mettere 10 μ l di liquido seminale ben miscelato su un vetrino e coprire con un vetrino coprioggetto da 22x22 mm, oppure caricare una camera fissa per vetrini con 7 μ l di liquido seminale ben miscelato. Lasciare riposare il campione per alcuni secondi (a 37°C se necessario), fino a quando non si è fermato. Registrare 10 o più campi, seguendo lo schema mostrato in **Figura 8.3**. Per il QC CASA, la concentrazione di spermatozoi non deve superare 50×10^6 per ml; campioni più concentrati potrebbero essere diluiti in plasma seminale omologo.

Figura 8.3 Supporto alla valutazione della motilità degli spermatozoi

Eseguire una scansione sistematica dei campi per la video-registrazione della motilità degli spermatozoi ad almeno 5 mm dai bordi del vetrino coprioggetto.



11. Scegliere il primo campo vicino alla sezione superiore sinistra del vetrino coprioggetto o della camera, ad almeno 5 mm dal bordo. Registrare il campo per 15 secondi, mantenendo il microscopio e il tavolino più fermi possibile. Dopo 15 secondi, registrare per 3 secondi un'immagine bianca e mettere in pausa la registrazione. Se si devono codificare campi singoli, cambiare il numero di codice e registrare un'immagine contenente solo il numero di codice per 5-7 secondi.
12. Seguendo lo schema mostrato in **Figura 8.3**, individuare un secondo campo mobile sul vetrino o sulla camera e registrare questo campo per 15 secondi. Anche in questo caso, registrare ancora per 3 secondi un'immagine bianca alla fine dei 15 secondi. Mettere in pausa la registrazione e, se lo si desidera, cambiare il numero di codice per indicare il terzo campo. Continuare a registrare in questo modo fino a quando non sono stati registrati almeno 400 spermatozoi (10 campi o più, a seconda della concentrazione). Dopo aver registrato l'ultimo campo e un'immagine bianca di 3 secondi, fermare la registrazione.
13. Preparare un secondo campione. Registrare l'immagine codificata del secondo campione per 5-7 secondi, seguita da un'immagine bianca di 3 secondi.
14. Registrare il secondo campione seguendo la procedura descritta in precedenza, registrando 10 o più campi per 15 secondi ciascuno, con un'immagine bianca tra un campo e l'altro e un'immagine bianca dopo il campo finale.
15. Ripetere questa procedura fino a quando non sia stato video-registrato il numero desiderato di campioni.



Nota 1: Se si desidera una video-registrazione più complessa per l'IQC della motilità, con campioni ripetuti in modo casuale, sono necessari sia un secondo registratore sia un computer dotato di un software di video-editing specializzato.



Nota 2: In quest'ultimo caso, ogni campione dovrebbe essere video-registrato separatamente, con solo i campi contrassegnati. Il numero del campione non dovrebbe essere registrato, poiché questo cambierà quando il campione verrà registrato di nuovo.

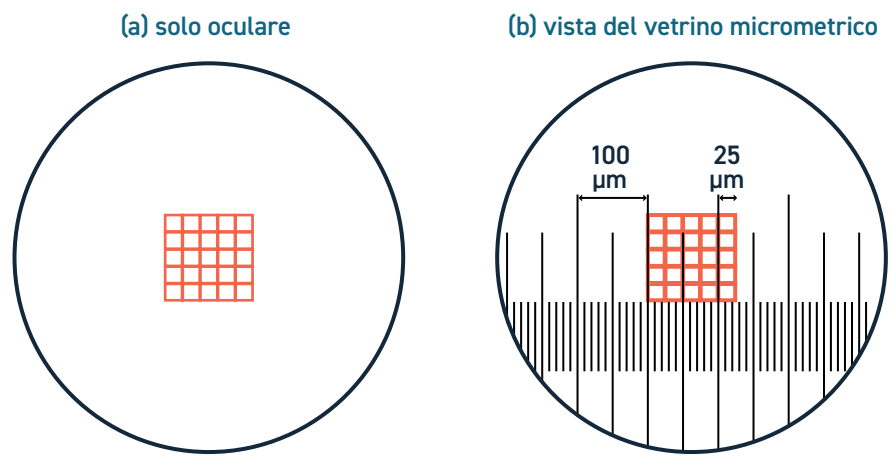


Nota 3: Se è disponibile un computer dotato di un software di video-editing, le immagini di ogni campione potranno essere digitalizzate e combinate a piacere.

8.6.2.3 Analisi della video-registrazione

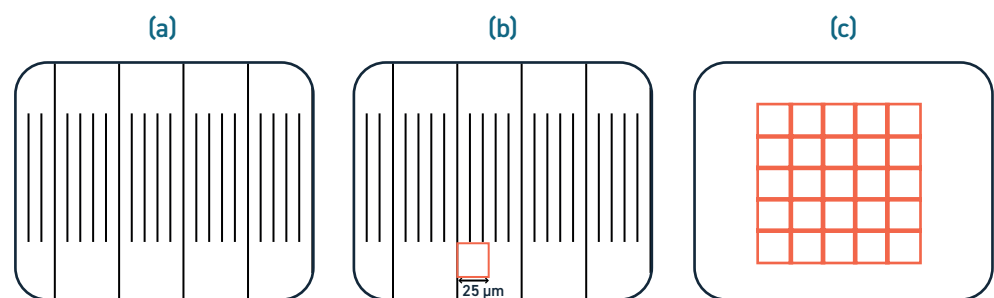
1. Disegnare una griglia di acetato e posizionarla sul monitor che verrà utilizzato per l'analisi della video-registrazione, come descritto di seguito; servirà a simulare la griglia usata per l'oculare durante l'analisi al microscopio (**Figura 8.4**).

Figura 8.4 Vista attraverso un oculare con reticolo (reticolo rosso)



2. Posizionare il vetrino micrometrico sul tavolino del microscopio all'ingrandimento utilizzato per l'analisi della motilità. Guardando attraverso l'oculare con reticolo (Figura 8.4), misurare le dimensioni delle sezioni del reticolo usando il vetrino micrometrico. In questo esempio il reticolo della griglia è $125 \times 125 \mu\text{m}$ e ogni quadrato è $25 \times 25 \mu\text{m}$. Prendere nota di queste misure.

Figura 8.5 Immagine video-registrata del vetrino micrometrico sul monitor e sovrapposizione dei tratti



3. Far partire la registrazione attraverso il monitor e mettere in pausa l'immagine del micrometro (Figura 8.5).
4. Posizionare un foglio di acetato sullo schermo e disegnare un quadrato delle dimensioni di quello della griglia del reticolo dell'oculare misurata sopra (Figura 8.5b).
5. Completare l'immagine di tutta la griglia del reticolo oculare (25 quadrati) (Figura 8.5c).
6. Per analizzare la video-registrazione, assicurarsi che la griglia di acetato sia sovrapposta al monitor. L'analisi dovrebbe essere fatta su una sezione standardizzata della griglia sovrapposta, per esempio sulle due righe superiori o le tre righe centrali.
7. Conteggiare le valutazioni replicate di 200 spermatozoi per ogni segmento registrato.

8.6.3 Preparazione del liquido seminale diluito per il controllo di qualità interno della determinazione della concentrazione nemaspermica

8.6.3.1 Considerazioni generali

- Alcune fasi della procedura per determinare la concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale possono essere monitorate utilizzando campioni seminali diluiti, preparati e conservati in laboratorio.
- I campioni IQC dovrebbero essere rappresentativi delle diverse concentrazioni normalmente osservate in laboratorio durante la valutazione di routine del liquido seminale.
- Diluire il liquido seminale con un conservante e dispensare aliquote in vials di stoccaggio. Queste possono essere congelate e utilizzate in seguito per la conta. Le vials devono essere a tenuta stagna e occorre accertarsi che il liquido seminale non aderisca alle pareti interne.
- Quando si preparano le sospensioni, fare attenzione a miscelare accuratamente il campione, per garantire che le vials preparate dallo stesso campione contengano concentrazioni identiche di spermatozoi. In questo modo, le differenze nei conteggi dei campioni IQC possono essere attribuite a problemi nella procedura di conta.
- Diluire nuovamente i campioni IQC conservati prima di valutare la concentrazione con un emocitometro. Usare la diluizione finale che viene utilizzata in laboratorio durante la conta di routine. Questo assicura che la concentrazione dei detriti di fondo e di altre cellule non spermatiche sarà simile a quella osservata durante la valutazione di routine. Per esempio, se il liquido seminale è inizialmente diluito con un volume uguale di conservante, un'ulteriore diluizione di 1+9 (1 : 10) produrrebbe una diluizione finale di 1 : 20.
- Quando si desidera un campione conservato con una bassa concentrazione di spermatozoi, è meglio iniziare con un campione a bassa concentrazione di spermatozoi piuttosto che fare una diluizione maggiore di un campione più concentrato. Questo assicurerà che l'interferenza di fondo sia simile a quella osservata durante l'analisi di routine del liquido seminale.
- Le preparazioni di spermatozoi ottenute mediante swim-up non hanno le impurità, le teste senza coda e la contaminazione di cellule frammentate che si osservano durante la valutazione di routine del liquido seminale, e andrebbero usate soltanto per monitorare la conta di sospensioni di spermatozoi selezionate.
- Il numero di sospensioni di spermatozoi IQC preparate in una sola volta dipenderà dal numero di operatori e dalla frequenza di conteggio.
- Il liquido seminale diluito conservato in frigorifero dovrebbe essere stabile per almeno 4 mesi.

8.6.3.2 Reagenti

Si può usare uno dei due conservanti seguenti. Tali soluzioni possono essere contaminate e devono essere scartate e rinnovate regolarmente.

- Formalina (10% (v/v) formaldeide): a 27 ml di acqua distillata aggiungere 10 ml di formaldeide al 37% (v/v).

- Soluzione antiagglutinazione (APSYS) [141]: a 100 ml di acqua distillata aggiungere 1,0 g di BSA, 2,0 g di polivinilpirrolidone (PVP), 0,90 g di cloruro di sodio (NaCl), 0,1 ml di detergente Triton X-100 e 0,004 ml di silicone antischiuma. Miscelare accuratamente e passare attraverso un filtro da 0,45 µm per eliminare i detriti. Conservare a 4 °C.



Nota: Il battericida azoturo di sodio può essere aggiunto ad APSIS (e 0,10 g di azoturo di sodio) per rendere la soluzione tossica. Tuttavia, a causa di considerazioni sulla sicurezza, questo non è raccomandato.

8.6.3.3 Forniture aggiuntive

Oltre all'attrezzatura di routine per la stima della concentrazione spermatica, la preparazione dei campioni QC richiede:

- vials criogeniche o altre piccole vials con coperchi sigillanti per stoccaggio;
- pennarelli indelebili per etichettare le vials.

8.6.3.4 Procedura

1. Identificare i campioni di liquido seminale con la concentrazione desiderata. Il volume di liquido seminale conservato varierà a seconda delle esigenze del laboratorio; si può utilizzare l'intero volume di liquido seminale disponibile o preparare 4 ml di sospensione di liquido seminale diluito per ogni concentrazione.
2. Appena possibile, dopo aver raccolto il liquido seminale, diluirlo con il conservante. Se si usa APSIS per la diluizione e la conservazione, più tempo passa prima della diluizione e maggiori sono le possibilità che dopo la diluizione si formino cristalli. Questi cristalli possono interferire con il caricamento della camera e la conta nemaspermica.
3. Trasferire il volume di liquido seminale necessario in una vial da centrifuga da 15 ml. Per ogni ml di liquido seminale, aggiungere 100 µl di formalina al 10% (v/v), 10 µl di azoturo 3 mol/l oppure 1 ml di APSIS.
4. Etichettare tutte le vials utilizzate per lo stoccaggio dei campioni indicando le informazioni e la data di preparazione. I coperchi o i tappi devono essere rimossi e le vials collocate in un porta-vials per permettere un riempimento facile e veloce.
5. Assicurarsi che il liquido seminale diluito sia accuratamente miscelato mentre si aliquota, per garantire che tutte le vials contengano concentrazioni simili di liquido seminale. Anche piccoli ritardi dopo la miscelazione possono permettere agli spermatozoi di cominciare a depositarsi, alterando la concentrazione nelle aliquote. Un modo per assicurare una miscelazione costante è quello di mettere la vial da centrifuga di liquido seminale diluito in un rack e poi miscelare il liquido seminale continuamente con una mano usando una pipetta di plastica, mentre si prelevano le aliquote usando una pipetta con l'altra mano.
6. A seconda delle esigenze del laboratorio, ogni vial dovrebbe contenere 0,5-1,0 ml. Conservare i campioni in aliquote da 0,5 ml permette di effettuare diversi conteggi per ogni vial.
7. Una volta che la sospensione di liquido seminale diluita è stata distribuita in tutte le vials, queste devono essere ben chiuse. A seconda del tipo di vial utilizzata, il

coperchio può essere sigillato con una striscia di pellicola da laboratorio, per garantire una buona tenuta. Questo non è necessario se si usano vials criogeniche.

8. Ripetere l'intero processo per i rimanenti campioni di liquido seminale.

9. Conservare le vials a 4°C.



Nota: La concentrazione delle soluzioni IQC deve essere determinata dopo che le diluizioni sono state preparate e non deve essere presunta dalla concentrazione del seme in toto. Una volta che le sospensioni conservate di liquido seminale sono state preparate, se necessario una vial può essere rimossa e valutata. I risultati possono essere tracciati utilizzando la procedura descritta nella **Sezione 7.7, p. 199**. Tutte le conte dovrebbero essere fatte usando il metodo di conteggio tipicamente in uso nel laboratorio. La sezione seguente descrive la procedura utilizzando l'emocitometro.

8.6.3.5 Utilizzo dei campioni IQC conservati

- Le soluzioni conservate devono essere ulteriormente diluite prima della conta; la diluizione dipenderà dal conservante usato.
- La diluizione iniziale del liquido seminale con formalina e azoturo è minima, quindi non è necessario tenerne conto. Il liquido seminale conservato in APSIS viene inizialmente diluito due volte (cioè 1+1 (1 : 2)), e questo deve essere tenuto in considerazione nel calcolo finale della concentrazione.
- Per le sospensioni diluite con APSIS da liquido seminale con una concentrazione iniziale superiore a 25 milioni per ml, il conteggio è migliore utilizzando un'ulteriore diluizione di 1+9 (1 : 10). Questo può essere ottenuto aggiungendo 50 µl di sospensione di spermatozoi conservati in 450 µl di acqua distillata. In questo modo si ottiene una diluizione finale del liquido seminale di 1 : 20. Non usare APSIS come diluente, perché questo interferirà con il liquido seminale che si deposita sulla griglia dell'emocitometro.
- Per le fasi successive, tutte le pipette dovrebbero essere preparate per un volume appropriato e precaricate con una punta pulita per il prelevamento rapido di un'aliquota subito dopo il miscelamento.
- Una vial di diluizione deve essere preparata con il volume appropriato di acqua (cioè 450 µl se si fa una diluizione di 1 : 10 come suggerito sopra). Il contenuto della vial di conservazione deve essere ben miscelato in un mixer vortex per circa 30 secondi alla massima velocità. Un'aliquota di 50-µl dovrebbe poi essere trasferita nella vial di diluizione contenente acqua. La vial di diluizione deve poi essere agitata con vortex per 20 secondi alla massima velocità. L'emocitometro deve essere caricato con 10 µl di sospensione e gli spermatozoi contati come descritto nella **Sezione 2.4.8, p. 28**.
- Se il campione originale di liquido seminale usato per preparare il liquido seminale conservato aveva una bassa concentrazione di spermatozoi, la diluizione per la conta dovrà essere regolata di conseguenza. Per esempio, se la concentrazione originale era nell'intervallo di 4-25 milioni per ml, per fare una diluizione finale di 1 : 5 come in laboratorio, la diluizione aggiuntiva appropriata del liquido seminale conservato in APSIS sarebbe 2 : 5 (2+3, poiché il liquido seminale è già stato diluito 1+1 (1 : 2) con APSIS). Questo può essere ottenuto diluendo 50 µl di liquido seminale conservato in 75 µl di acqua distillata.

- Le sospensioni di liquido seminale conservate in frigorifero dovrebbero essere stabili per almeno 4 mesi, dopodiché si dovrebbero preparare nuove soluzioni. È auspicabile avere un periodo di sovrapposizione, durante il quale si gestiscono sia la vecchia che la nuova soluzione, per monitorare il periodo di transizione.

8.6.4 Preparazione di vetrini per il controllo di qualità interno per la valutazione della morfologia degli spermatozoi

8.6.4.1 Considerazioni generali

- Gli strisci possono essere preparati in laboratorio per l'IQC della colorazione e dell'analisi morfologica.
- Più strisci possono essere preparati da diversi campioni di liquido seminale, che rappresentano la gamma della morfologia rilevata in laboratorio.
- Gli strisci possono essere fissati e conservati per monitorare la colorazione e le procedure di analisi.
- Gli strisci colorati possono essere usati singolarmente o in replicato per il QC della procedura di analisi morfologica.
- L'uso di replicati permette di determinare la precisione "intra-operatore". Questi vetrini QC sono anche utili quando si confrontano i risultati di diversi operatori all'interno di un laboratorio, o quando si confrontano le analisi tra laboratori.
- Gli strisci colorati con Papanicolaou, chiusi con mezzo di montaggio e conservati al buio a temperatura ambiente, dovrebbero essere stabili per molti mesi o addirittura anni.
- Il liquido seminale deve essere miscelato accuratamente durante l'intero processo di preparazione dello striscio, per garantire che tutti i preparati provenienti da un particolare campione di liquido seminale siano identici. In questo modo, si può presumere che qualsiasi variazione rilevata durante l'analisi sia un risultato della metodologia (cioè la procedura di analisi morfologica) e non causata da un'adeguata miscelazione del liquido seminale durante la preparazione del vetrino.

8.6.4.2 Procedura

1. Trasferire il liquido seminale dal contenitore del campione in una vial da centrifuga da 15 ml. Questo permetterà una miscelazione più facile e accurata durante il processo di preparazione del vetrino.
2. Pulire entrambe le superfici dei vetrini smerigliati, strofinando vigorosamente con fazzoletti di carta privi di peli.
3. Etichettare i vetrini smerigliati con informazioni identificative (per esempio, numero di identificazione e data) usando una matita HB2. I segni a matita sono stabili durante la fissazione e la colorazione Papanicolaou dei vetrini; l'inchiostro delle penne e di alcuni pennarelli, invece, non è indelebile.
4. Porre una punta pulita alla pipetta e impostare il volume a 10 µl (o al volume usato abitualmente in laboratorio per la preparazione degli strisci morfologici).

5. Il liquido seminale deve essere accuratamente miscelato durante l'intero processo, per garantire che gli strisci siano il più possibile simili. Dopo la miscelazione, anche piccoli ritardi prima di prelevare l'aliquota possono permettere la sedimentazione degli spermatozoi, alterando la popolazione di spermatozoi che verrà strisciata sul vetrino.
6. Miscelare bene il campione nella vial da centrifuga, aspirandolo 10 volte con una pipetta ad apertura ampia (circa 1,5 mm di diametro) equilibrata alla temperatura del campione. Questo processo dovrebbe essere abbastanza vigoroso da miscelare il liquido seminale, ma non così tanto da creare bolle.
7. Immediatamente dopo la miscelazione, senza lasciare agli spermatozoi il tempo di sedimentare, mettere 10 µl di liquido seminale alla fine di uno dei vetrini portaoggetti puliti. È importante non lasciare che la goccia di liquido seminale rimanga sul vetrino per più di un paio di secondi prima di strisciarla.
8. Strisciare l'aliquota di liquido seminale sulla superficie del vetrino usando la tecnica dello striscio (**Sezione 2.4.9.1, p. 43**). In questa procedura, il bordo di un secondo vetrino viene utilizzato per trascinare la goccia di liquido seminale lungo la superficie del vetrino. Assicurarsi di usare il vetrino per "strisciare" il liquido seminale dalla parte posteriore. Bisogna fare attenzione a non fare strisci troppo spessi, o ci saranno spermatozoi sovrapposti o raggruppati e una maggiore interferenza di fondo del colorante. La separazione degli spermatozoi sul vetrino dipende dal volume di liquido seminale e dalla concentrazione di spermatozoi, dall'angolo del vetrino utilizzato per lo striscio (più piccolo è l'angolo, più sottile è lo striscio) [435] e dalla velocità di striscio (più rapido è il movimento, più spesso è lo striscio) [436].
9. Ripetere i punti 6-8 per i restanti vetrini, facendo solo un vetrino dopo ogni miscelazione per garantire che gli spermatozoi non sedimentino prima che l'aliquota venga prelevata. Se c'è una pausa di più di un paio di secondi dopo la miscelazione, il liquido seminale dovrebbe essere miscelato di nuovo prima che l'aliquota venga prelevata.
10. Una volta che la tecnica è stabilita e la preparazione procede senza problemi, può essere possibile fare due o tre vetrini dopo ogni miscelazione. Le aliquote dovrebbero essere tutte prelevate immediatamente dopo la miscelazione, e i due o tre strisci fatti il più rapidamente possibile, e in ogni caso entro pochi secondi.

8.6.5 Taratura dell'attrezzatura

Pipette, camere di conta e altre attrezzature dovrebbero essere calibrate ogni 6 mesi o ogni anno.

8.6.5.1 Bilance

- Le bilance dovrebbero essere controllate regolarmente con i calibratori interni e con una calibrazione esterna ad opera del servizio di manutenzione del laboratorio.
- Calibrare le bilance utilizzando pesi standard (per esempio, 1, 2, 5 e 10 g per coprire la gamma dei pesi del liquido seminale).
- Ripetere le misurazioni 10 volte e calcolare la media, la SD e il coefficiente di variazione (CV) ($= 100 \times \text{SD}/\text{media}$).
- Controllare la precisione. Il peso rientra nelle 2 SD delle misure medie?

8.6.5.2 Pipette

- Calibrare le pipette aspirando acqua distillata fino al segno di graduazione e distribuirlo in contenitori prepesati, che sono appoggiati su una bilancia analitica pre-zero.
- Calcolare il volume del peso dell'acqua pipettata, considerando la densità pari a 1 g/ml.



Nota: La densità dell'acqua diminuisce con la temperatura [437]. È 0,9982 g/ml a 20°C, 0,9956 g/ml a 30°C e 0,9922 g/ml a 40°C. Per la calibrazione, tuttavia, un valore presunto di 1,0 g/ml è adeguato.

- Ripetere le misurazioni 10 volte e calcolare la media, la SD e il CV (= $100 \times \text{SD} / \text{media}$).
- Controllare la precisione. Il volume rientra nelle 2 SD delle misure medie?

8.6.5.3 Profondità delle camere

- Misurare la profondità delle camere di conta usando la scala Vernier per la messa a fuoco del microscopio. Mettere a fuoco prima sulla griglia della camera e poi su un segno di inchiostro sul lato inferiore del vetrino coprioggetto. Misurare il numero di segni necessari per mettere a fuoco due punti.
- Ripetere la misurazione 10 volte e calcolare la media, la SD e il CV (= $100 \times \text{SD} / \text{media}$).
- Controllare la precisione. La profondità rientra nelle 2 SD delle misure medie?

8.6.5.4 Incubatori

- La temperatura degli incubatori e dei tavolini termostatici deve essere controllata con termometri che vengono, a loro volta, regolarmente calibrati.
- Le miscele di CO₂ devono essere controllate quotidianamente con la lettura del display dell'incubatore o con altri sistemi di analisi dei gas settimanalmente o mensilmente, e con il campionamento dei gas al momento della manutenzione.

8.6.5.5 Cartine pH

Queste dovrebbero essere con soluzioni standard di pH.

8.6.5.6 Altre attrezzature

Anche altre attrezzature di laboratorio e reagenti, come i misuratori di pH, dovrebbero essere controllati con gli standard ogni 3-6 mesi.

8.7 Programmi nazionali di controllo di qualità esterno per l'esame del liquido seminale

Un certo numero di società scientifiche e organizzazioni nel campo dell'andrologia in tutto il mondo forniscono supporto per costruire e mantenere un valido programma EQC per l'analisi del liquido seminale e possono essere contattate per ulteriori informazioni. Il sostegno è dato a vari livelli. Alcune organizzazioni offrono programmi in collaborazione con aziende associate. Questi programmi forniscono la formazione e il materiale necessario per soddisfare i requisiti legali esistenti nei vari Paesi. Di solito, questi corsi e programmi sono accreditati nei rispettivi Paesi o regioni. Altre organizzazioni offrono formazione su aspetti specifici dell'analisi del liquido seminale o approfondimenti pratici su procedure specifiche. L'Organizzazione Mondiale della Sanità non è associata a nessuno di questi programmi.

Capitolo 9: Bibliografia



1. Belsey M, Eliasson R, Gallegos AJ, Moghissi KS, Paulsen CA, Prasad AMN. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Singapore: Press Concern; 1980.
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interactions. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1987. 67 p.
3. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1992. 107 p.
4. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999. 128 p.
5. Campbell MJ, Lotti F, Baldi E, Schlatt S, Festin MP, Bjorndahl L et al. Distribution of Semen Examination Results 2020 - a follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. *Andrology*. 2021.
6. Björndahl L. What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Hum Fertil (Camb)*. 2011;14(3):179-86.
7. Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Duleba AJ. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. *Int J Androl*. 2008;31(5):499-507.
8. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1388-93.
9. Barratt CLR, Bjorndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017;23(6):660-80.
10. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1502-7.
11. Nieschlag E, Pock T, Hellenkemper B. External quality of semen analysis reveals low compliance with the WHO guidelines. *J Reproduktionsmed Endokrinol_Online*. 2017;14(6):306-10.

12. Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum Reprod.* 2011;26(12):3207-12.
13. Björndahl L, Kvist U. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod Biomed Online.* 2003;7(4):440-8.
14. Weiske WH. Pregnancy caused by sperm from vasa efferentia. *Fertil Steril.* 1994;62(3):642-3.
15. Sobrero AJ, Macleod J. The immediate postcoital test. *Fertil Steril.* 1962;13:184-9.
16. Cooper TG, Barfield JP, Yeung CH. Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *Int J Androl.* 2005;28(1):58-60.
17. Holmes E, Björndahl L, Kvist U. Post-ejaculatory increase in human semen osmolality in vitro. *Andrologia.* 2019:e13311.
18. Holmes E, Björndahl L, Kvist U. Possible factors influencing post-ejaculatory changes of the osmolality of human semen in vitro. *Andrologia.* 2019:e13443.
19. Zavos PM, Goodpasture JC. Clinical improvements of specific seminal deficiencies via intercourse with a seminal collection device versus masturbation. *Fertil Steril.* 1989;51(1):190-3.
20. Pound N, Javed MH, Ruberto C, Shaikh MA, Del Valle AP. Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology & behavior.* 2002;76(4-5):685-9.
21. Eliasson R. Basic semen analysis. In: Matson P, editor. *Current Topics in Andrology.* Perth: Ladybrook Publishing; 2003. p. 35-89.
22. Amann RP. Evaluating spermatogenesis using semen: the biology of emission tells why reporting total sperm per sample is important, and why reporting only number of sperm per milliliter is irrational. *J Androl.* 2009;30(6):623-5.
23. Ng KK, Donat R, Chan L, Lalak A, Di Pierro I, Handelsman DJ. Sperm output of older men. *Hum Reprod.* 2004;19(8):1811-5.
24. Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum Reprod.* 1993;8(8):1251-8.
25. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005;84(4):833-42.
26. Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics. *Clin Reprod Fertil.* 1982;1(4):273-85.
27. Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation II. Spermatozoal vitality and storage. *Clin Reprod Fertil.* 1982;1(4):287-93.

28. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril.* 2004;82(1):57-65.
29. Correa-Perez JR. Intrasubject abstinence and quality of sperm. *Fertil Steril.* 2005;83(5):1588-9; author reply 9-90.
30. Amann RP, Howards SS. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J Urol.* 1980;124(2):211-5.
31. Amann RP. Considerations in evaluating human spermatogenesis on the basis of total sperm per ejaculate. *J Androl.* 2009;30(6):626-41.
32. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl.* 1984;7(5):369-82.
33. Behre HM, Bergmann M, Simoni M, Tuttelmann F. Primary Testicular Failure. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA)2000.
34. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jorgensen N, Andersson AM, Krarup T et al. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod.* 2000;15(2):366-72.
35. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:107.
36. Santi D, Corona G. Primary and Secondary Hypogonadism. In: Simoni M, Huttaniemi I, editors. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction.* 2. London: Springer International Publishing; 2017. p. 687-747.
37. Medina P, Segarra G, Ballester R, Chuan P, Domenech C, Vila JM et al. Effects of antidepressants in adrenergic neurotransmission of human vas deferens. *Urology.* 2000;55(4):592-7.
38. Baker HW, Kovacs GT. Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean. *Int J Androl.* 1985;8(6):421-6.
39. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod.* 2003;18(10):2082-8.
40. Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM. Variation of semen measures within normal men. *Fertil Steril.* 1985;44(3):396-400.
41. Berman NG, Wang C, Paulsen CA. Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data. *J Androl.* 1996;17(1):68-73.
42. Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril.* 2004;82(2):358-66.
43. Castilla JA, Alvarez C, Aguilar J, Gonzalez-Varea C, Gonzalvo MC, Martinez L. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Hum Reprod.* 2006;21(4):847-51.

44. Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril*. 2006;85(1):128-34.
45. Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology*. Oxford: Oxford University Press; 1994. 393 p.
46. Mortimer D. Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review*. 1994;3:97-111.
47. Jones DM, Kovacs GT, Harrison L, Jennings MG, Baker HW. Immobilization of sperm by condoms and their components. *Clin Reprod Fertil*. 1986;4(6):367-72.
48. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*, 3rd edition. Geneva 2004.
49. Huggins C, Scott WW, Heinen JH. Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. *Am J Physiol*. 1942;136(3):467-73.
50. Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB et al. Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl*. 2004;25(4):635-44.
51. Cooper TG, Brazil C, Swan SH, Overstreet JW. Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *J Androl*. 2007;28(1):1-4.
52. Rose NR, Hjort T, Rümke P, Harper MJK, Vyazov O. Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa. *Clin Exp Immunol*. 1976;23(2):175-99.
53. Johansson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Hum Reprod Update*. 2000;6(4):404-12.
54. Freund M. Standards for the rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int J Fertil*. 1966;11(1):97-180.
55. Jue JS, Ramasamy R. Significance of positive semen culture in relation to male infertility and the assisted reproductive technology process. *Transl Androl Urol*. 2017;6(5):916-22.
56. Micillo A, Vassallo MR, Cordeschi G, D'Andrea S, Necozone S, Francavilla F et al. Semen leukocytes and oxidative-dependent DNA damage of spermatozoa in male partners of subfertile couples with no symptoms of genital tract infection. *Andrology*. 2016;4(5):808-15.
57. Palermo GD, Neri QV, Cozzubbo T, Cheung S, Pereira N, Rosenwaks Z. Shedding Light on the Nature of Seminal Round Cells. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151640.
58. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl*. 1988;11(5):379-94.

59. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl.* 2000;21(1):145-53.
60. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod.* 2000;15(7):1562-7.
61. Aitken RJ, Sutton M, Warner P, Richardson DW. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J Reprod Fertil.* 1985;73(2):441-9.
62. Mortimer D, Pandya IJ, Sawers RS. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil.* 1986;78(1):93-102.
63. Comhaire FH, Vermeulen L, Hinting A, Schoonjans F. Accuracy of sperm characteristics in predicting the in vitro fertilizing capacity of semen. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1988;5(6):326-31.
64. Barratt CL, McLeod ID, Dunphy BC, Cooke ID. Prognostic value of two putative sperm function tests: hypo-osmotic swelling and bovine sperm mucus penetration test (Penetrak). *Hum Reprod.* 1992;7(9):1240-4.
65. Irvine DS, Aitken RJ. Predictive value of in-vitro sperm function tests in the context of an AID service. *Hum Reprod.* 1986;1(8):539-45.
66. Bollendorf A, Check JH, Lurie D. Evaluation of the effect of the absence of sperm with rapid and linear progressive motility on subsequent pregnancy rates following intrauterine insemination or in vitro fertilization. *J Androl.* 1996;17(5):550-7.
67. Sifer C, Sasportes T, Barraud V, Poncelet C, Rudant J, Porcher R et al. World Health Organization grade 'a' motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2769-75.
68. Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, Vannin AS, Englert Y. A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3103-7.
69. Björndahl L. The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl.* 2010;12(1):33-5.
70. Eliasson R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian J Androl.* 2010;12(1):26-32.
71. Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol.* 1975;66(2):225-32.
72. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update.* 2003;9(5):405-28.

73. Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HW, de Kretser DM. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil Steril.* 1988;49(6):1052-8.
74. Correa-Perez JR, Fernandez-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospemia. *Fertil Steril.* 2004;81(4):1148-50.
75. Björndahl L, Soderlund I, Johansson S, Mohammadieh M, Pourian MR, Kvist U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *J Androl.* 2004;25(5):671-8.
76. Björndahl L, Soderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod.* 2003;18(4):813-6.
77. Mortimer D. A technical note on the assessment of human sperm vitality using eosin-nigrosin staining. *Reprod Biomed Online.* 2020;40(6):851-5.
78. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod.* 2002;17(2):503-15.
79. World Health Organization. Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility: Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril.* 1996;65(4):821-9.
80. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet.* 1998;352(9135):1172-7.
81. Behre HM, Yeung CH, Holstein AF, Weinbauer GF, Gassner C, Nieschlag E. Diagnosis of Male Infertility and Hypogonadism. In: Nieschlag E, Behre HM, editors. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction.* second ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag; 2000. p. 90-121.
82. MacLeod J, Wang Y. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertil Steril.* 1979;31(2):103-16.
83. Eliasson R. Analysis of semen. In: Behrman SJ, Kistner RW, editors. *Progress in Infertility.* Boston: Little, Brown and Co; 1975. p. 691-713.
84. Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology.* Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
85. Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human reproduction (Oxford, England).* 1986;1(5):299-303.
86. Kirkman-Brown J, Björndahl L. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis. *Fertil Steril.* 2009;91(2):627-31.

87. Cooper TG, Hellenkemper B, Jonckheere J, Callewaert N, Grootenhuis AJ, Kersemaekers WM et al. Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *J Androl.* 2006;27(4):483-90.
88. Ezeh UI, Moore HM. Redefining azoospermia and its implications. *Fertil Steril.* 2001;75(1):213-4.
89. Sharif K. Reclassification of azoospermia: the time has come? *Hum Reprod.* 2000;15(2):237-8.
90. Eliasson R. Analysis of semen. In: Burger HG, De Kretser DM, editors. *The Testis.* New York: Raven Press; 1981. p. 381-99.
91. Lindsay KS, Floyd I, Swan R. Classification of azoospermic samples. *Lancet.* 1995;345(8965):1642.
92. Jaffe TM, Kim ED, Hoekstra TH, Lipshultz LI. Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *J Urol.* 1998;159(5):1548-50.
93. Corea M, Campagnone J, Sigman M. The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. *Fertil Steril.* 2005;83(4):920-2.
94. Fredricsson B, Bjork G. Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil Steril.* 1977;28(8):841-5.
95. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod.* 1990;5(5):586-92.
96. Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 1991;30(4):346-52.
97. Liu DY, Baker HW. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil.* 1992;94(1):71-84.
98. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, Demirakca T, Tilgen W, Runnebaum B. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum Reprod.* 1996;11(1):139-46.
99. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update.* 1998;4(1):73-82.
100. Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ, Oehninger S. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia.* 1995;27(3):143-8.
101. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update.* 2001;7(5):495-500.
102. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1643-9.

103. Liu DY, Garrett C, Baker HW. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod.* 2003;18(11):2382-9.
104. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod.* 2001;16(6):1165-71.
105. van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol Obstet Invest.* 2005;59(2):86-91.
106. Mortimer D. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol Hum Reprod.* 2018;24(12):567-92.
107. Katz DF, Overstreet JW, Samuels SJ, Niswander PW, Bloom TD, Lewis EL. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J Androl.* 1986;7(4):203-10.
108. Abraham-Peskir JV, Chantler E, Uggerhoj E, Fedder J. Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Hum Reprod.* 2002;17(2):375-82.
109. Cooper TG, Yeung CH, Fetic S, Sobhani A, Nieschlag E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2283-8.
110. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988;49(1):112-7.
111. Zollner U, Schleyer M, Steck T. Evaluation of a cut-off value for normal sperm morphology using strict criteria to predict fertilization after conventional in-vitro fertilization and embryo transfer in asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 1996;11(10):2155-61.
112. Franken DR, Barendsen R, Kruger TF. A continuous quality control program for strict sperm morphology. *Fertil Steril.* 2000;74(4):721-4.
113. Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(10):432-8.
114. Kvist U, Björndahl L. *Manual on Basic Semen Analysis 2002.* Heineman MJ, editor. Oxford: Oxford Academic; 2002 2002-06-15. 24 p.
115. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1118-23.
116. Inaba K, Mizuno K. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod Med Biol.* 2016;15(2):77-94.
117. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000;15(4):830-9.

118. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod.* 1996;11(9):1942-6.
119. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia.* 1988;20(3):211-7.
120. Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod.* 2002;17(5):1292-8.
121. Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L et al. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod.* 2003;69(2):535-9.
122. Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment—historical perspectives and current opinions. *J Androl.* 2001;22(2):192-205.
123. Chantler E, Abraham-Peskir JV. Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia.* 2004;36(2):87-93.
124. Fetic S, Yeung CH, Sonntag B, Nieschlag E, Cooper TG. Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl.* 2006;27(2):294-301.
125. Pelfrey RJ, Overstreet JW, Lewis EL. Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal. *Fertil Steril.* 1982;38(1):112-4.
126. Rothmann SA, Bort AM, Quigley J, Pillow R. Sperm morphology classification: a rational method for schemes adopted by the world health organization. *Methods Mol Biol.* 2013;927:27-37.
127. Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T et al. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod.* 2006;21(3):760-5.
128. de la Taille A, Rigot JM, Mahe P, Gervais R, Dumur V, Lemaitre L et al. [Correlation of genitourinary abnormalities, spermiogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens]. *Prog Urol.* 1998;8(3):370-6.
129. Weiske WH, Salzler N, Schroeder-Printzen I, Weidner W. Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia.* 2000;32(1):13-8.
130. Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Mieusset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril.* 2000;74(6):1164-74.
131. von Eckardstein S, Cooper TG, Rutscha K, Meschede D, Horst J, Nieschlag E. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1226-31.

132. Kussler AP, Pimentel AM, Alcoba DD, Liu IP, Brum IS, Capp E et al. Mechanical processing of hyperviscous semen specimens can negatively affect sperm DNA fragmentation. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(4):737-42.
133. de la Taille A, Rigot JM, Mahe P, Vankemmel O, Gervais R, Dumur V et al. Correlation between genito-urinary anomalies, semen analysis and CFTR genotype in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Br J Urol*. 1998;81(4):614-9.
134. Haugen TB, Grotmol T. pH of human semen. *Int J Androl*. 1998;21(2):105-8.
135. Le Lannou D, Griveau JF, Le Pichon JP, Quero JC. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Hum Reprod*. 1992;7(10):1417-21.
136. Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod*. 1998;13(3):611-9.
137. Motulsky H. *Intuitive biostatistics*. New York: Oxford University Press; 1995.
138. Seaman EK, Goluboff E, BarChama N, Fisch H. Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertil Steril*. 1996;66(4):662-5.
139. Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril*. 1997;68(2):340-5.
140. Björndahl L, Magnusson K, Holmberg R. Validation of Cellvision Disposable 100 Micrometer Hemocytometer With Improved Neubauer Ruling. *Andrology*. 2018;6(S1).
141. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C et al. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl*. 2004;25(4):645-56.
142. Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J Androl*. 2005;26(1):115-22.
143. Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *J Androl*. 2005;26(1):107-14.
144. Björndahl L, Barratt CL. Semen analysis: setting standards for the measurement of sperm numbers. *J Androl*. 2005;26(1):11.
145. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984;70(1):219-28.

146. Hossain AM, Rizk B, Barik S, Huff C, Thorneycroft IH. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod.* 1998;13(6):1578-83.
147. Holmes E. On osmolality and sperm function during processing for assisted reproduction [Academic]. Stockholm, Sweden: Karolinska Institutet; 2020.
148. Meschede D, Keck C, Zander M, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *Int J Androl.* 1993;16(6):362-9.
149. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl.* 1987;18(3):275-7.
150. Coetzee K, Kruger TF, Vandendael A, de Villiers A, Lombard CJ. Comparison of two staining and evaluation methods used for computerized human sperm morphology evaluations. *Andrologia.* 1997;29(3):133-5.
151. Oral E, Yetis O, Elibol F, Senol H, Irez T, Aksu FM. Assessment of human sperm morphology by strict criteria: comparison of wet preparation versus stained with the modified Diff-Quik method. *Arch Androl.* 2002;48(4):307-14.
152. Maree L, du Plessis SS, Menkveld R, van der Horst G. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Hum Reprod.* 2010;25(6):1369-82.
153. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod.* 2001;16(12):2710-7.
154. Menkveld RK, T.F. Basic Semen Analysis. In: Acosta AA, editor. Human spermatozoa in assisted reproduction. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990. p. 68-84.
155. Aziz N, Buchan I, Taylor C, Kingsland CR, Lewis-Jones I. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 1996;66(6):1000-8.
156. Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ, Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril.* 2004;82(3):621-7.
157. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ, Jr. et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril.* 2004;81(2):349-54.
158. David G, Czyglik F, Mayaux MJ, Schwartz D. The success of A.I.D. and semen characteristics: study on 1489 cycles and 192 ejaculates. *Int J Androl.* 1980;3(6):613-9.
159. Auger JE, Eustache F, David D. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoides humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologia.* 2000;10:358-73.

160. ESHRE/NAFA. Manual on basic semen analysis (ESHRE Monographs #2). Oxford: Oxford University Press; 2002.
161. Wang WL, Tu CF, Tan YQ. Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new? *Asian J Androl.* 2020;22(3):236-45.
162. Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update.* 2015;21(4):455-85.
163. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod.* 2001;16(5):1012-9.
164. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Cambi M, Lotti F, Natali I et al. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertil Steril.* 2015;104(3):582-90 e4.
165. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Baldi E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:75-85.
166. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1027-36.
167. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012;27(10):2908-17.
168. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165125.
169. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017;19(1):80-90.
170. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(6):951-60.
171. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil.* 2014;15(1):2-14.
172. Robbins DJ, Coleman MS. Initiator role of double stranded DNA in terminal transferase catalyzed polymerization reactions. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(7):2943-57.
173. Sharma R, Masaki J, Agarwal A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. *Methods Mol Biol.* 2013;927:121-36.
174. Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C et al. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2010;31(4):336-45.

175. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Guido C, Forti G, Baldi E. Critical aspects of detection of sperm DNA fragmentation by TUNEL/flow cytometry. *Syst Biol Reprod Med*. 2010;56(4):277-85.
176. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 2008;44(3):250-4.
177. Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Ballesca JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A*. 2007;71(12):1011-8.
178. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005;20(12):3446-51.
179. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1921-7.
180. Antonucci N, Manes S, Corradetti B, Manicardi GC, Borini A, Bizzaro D. A novel in vitro sperm head decondensation protocol for rapid flow cytometric measurement of deoxyribonucleic acid content. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1857-61.
181. Mitchell LA, De luliis GN, Aitken RJ. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl*. 2011;34(1):2-13.
182. Ribeiro SC, Muratori M, De Geyter M, De Geyter C. TUNEL labeling with BrdUTP/anti-BrdUTP greatly underestimates the level of sperm DNA fragmentation in semen evaluation. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181802.
183. Muratori M, Pellegrino G, Mangone G, Azzari C, Lotti F, Tarozzi N et al. DNA Fragmentation in Viable and Non-Viable Spermatozoa Discriminates Fertile and Subfertile Subjects with Similar Accuracy. *J Clin Med*. 2020;9(5).
184. Martinez MG, Sanchez-Martin P, Dorado-Silva M, Fernandez JL, Girones E, Johnston SD et al. Magnetic-activated cell sorting is not completely effective at reducing sperm DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(12):2215-21.
185. Fernandez JL, Cajigal D, Lopez-Fernandez C, Gosalvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol*. 2011;682:291-301.
186. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24(1):59-66.
187. Gosalvez J, Rodriguez-Predreira M, Mosquera A, Lopez-Fernandez C, Esteves SC, Agarwal A et al. Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test. *Andrologia*. 2014;46(6):602-9.
188. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*. 1996;363(2):89-96.

189. McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE et al. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res.* 1997;375(2):93-104.
190. Simon L, Carrell DT. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol Biol.* 2013;927:137-46.
191. Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(1):81-98.
192. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res.* 1997;375(2):183-93.
193. Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res.* 2003;534(1-2):15-20.
194. Gonzalez JE, Romero I, Barquinero JF, Garcia O. Automatic analysis of silver-stained comets by CellProfiler software. *Mutat Res.* 2012;748(1-2):60-4.
195. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2011;23(6):724-34.
196. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology.* 2013;1(5):715-22.
197. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Corrigendum to "Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility". *Clin Exp Reprod Med.* 2019;46(4):211.
198. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med.* 2019;46(1):14-21.
199. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA(R)). *Methods Mol Biol.* 2013;927:147-64.
200. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci.* 2000;22(2-3):169-89.
201. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. *Curr Protoc Cytom.* 2001;Chapter 7:Unit 7 13.
202. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999;14(4):1039-49.
203. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl.* 2010;33(1):e221-7.

204. Godo A, Blanco J, Vidal F, Sandalinas M, Garcia-Guixe E, Anton E. Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in spermatozoa from Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(1):79-88.
205. Wang BN, B.; Tang, D.; Li, R.; Liu, X.; Song, J.; Wang, W.; Liu, Z. . Analysis of Meiotic Segregation Patterns and Interchromosomal Effects in Sperm from 13 Robertsonian Translocations. *Balkan J Med Genet* 2017;20(1):43-50.
206. Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod*. 2013;28(6):1707-15.
207. Ramasamy R, Scovell JM, Kovac JR, Cook PJ, Lamb DJ, Lipshultz LI. Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2015;103(4):906-9 e1.
208. Kohn TP, Kohn JR, Darilek S, Ramasamy R, Lipshultz L. Genetic counseling for men with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure due to abnormal sperm chromosomal aneuploidy. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(5):571-6.
209. Ramasamy R, Besada S, Lamb DJ. Fluorescent in situ hybridization of human sperm: diagnostics, indications, and therapeutic implications. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1534-9.
210. Ryu HM, Lin WW, Lamb DJ, Chuang W, Lipshultz LI, Bischoff FZ. Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology: implication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2001;76(5):879-83.
211. Ioannou D, Fortun J, Tempest HG. Meiotic nondisjunction and sperm aneuploidy in humans. *Reproduction*. 2019;157(1):R15-R31.
212. Neusser M, Rogenhofer N, Durl S, Ochsenkuhn R, Trottmann M, Jurinovic V et al. Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1130-7 e1-10.
213. Templado C, Uroz L, Estop A. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(10):634-43.
214. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril*. 1993;60(6):1069-75.
215. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 1995;63(6):1143-57.
216. Homyk M, Anderson DJ, Wolff H, Herr JC. Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. *Fertil Steril*. 1990;53(2):323-30.
217. Nahoum CR, Cardozo D. Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostrate-vesicular fluid. *Fertil Steril*. 1980;34(1):68-9.

218. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl.* 2001;22(4):575-83.
219. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 2003;35(5):271-8.
220. Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod.* 1995;10(7):1736-9.
221. Rossi AG, Aitken RJ. Interactions between leukocytes and the male reproductive system. The unanswered questions. *Adv Exp Med Biol.* 1997;424:245-52.
222. Couture M, Ulstein M, Leonard J, Paulsen CA. Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. *Andrologia.* 1976;8(1):61-6.
223. Ezeh UI, Martin M, Cooke ID, Moore HD. Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3061-5.
224. Barbonetti A, Castellini C, D'Andrea S, Cordeschi G, Santucci R, Francavilla S et al. Prevalence of anti-sperm antibodies and relationship of degree of sperm auto-immunization to semen parameters and post-coital test outcome: a retrospective analysis of over 10 000 men. *Hum Reprod.* 2019;34(5):834-41.
225. Kremer J, Jager S. Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon with special regard to immunoglobulin class and antigen-reactive sites. *Int J Androl.* 1980;3(2):143-52.
226. Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D. Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil Steril.* 1984;42(2):171-83.
227. Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D, Witkin SS. Detection of spontaneously occurring sperm-directed antibodies in infertile couples by immunobead binding and enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann N Y Acad Sci.* 1984;438:504-7.
228. Bronson RA. Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Arch Androl.* 1982;9:61.
229. Clarke GN. Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. . In: Bratanov K, editor. *Immunology of Reproduction.* Bulgarian: Bulgarian Academy of Sciences Press; 1982. p. 462-85.
230. Hellstrom WJ, Samuels SJ, Waits AB, Overstreet JW. A comparison of the usefulness of SpermMar and immunobead tests for the detection of anti-sperm antibodies. *Fertil Steril.* 1989;52(6):1027-31.
231. Scarselli G, Livi C, Chelo E, Dubini V, Pellegrini S. Approach to immunological male infertility: a comparison between MAR test and direct immunobead test. *Acta Eur Fertil.* 1987;18(1):55-7.
232. MacMillan RA, Baker HW. Comparison of latex and polyacrylamide beads for detecting sperm antibodies. *Clin Reprod Fertil.* 1987;5(4):203-9.

233. Meinertz H, Bronson R. Detection of antisperm antibodies on the surface of motile spermatozoa. Comparison of the immunobead binding technique (IBT) and the mixed antiglobulin reaction (MAR). *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1988;18(4):120-3.
234. Abshagen K, Behre HM, Cooper TG, Nieschlag E. Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertil Steril.* 1998;70(2):355-6.
235. Chiu WW, Chamley LW. Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertil Steril.* 2004;82(3):529-35.
236. Rajah SV, Parslow JM, Howell RJ, Hendry WF. Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males. *Fertil Steril.* 1992;57(6):1300-3.
237. Gould JE, Brazil CK, Overstreet JW. Sperm-immunobead binding decreases with in vitro incubation. *Fertil Steril.* 1994;62(1):167-71.
238. Barratt CL, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID. The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Hum Reprod.* 1992;7(1):95-8.
239. von der Kammer H, Scheit KH, Weidner W, Cooper TG. The evaluation of markers of prostatic function. *Urol Res.* 1991;19(6):343-7.
240. Cooper TG, Weidner W, Nieschlag E. The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl.* 1990;13(5):329-36.
241. Moellering H, Gruber W. Determination of citrate with citrate lyase. *Anal Biochem.* 1966;17(3):369-76.
242. Heite HJ, Wetterauer W. [Acid phosphatase in seminal fluid--method of estimation and diagnostic significance]. *Andrologia.* 1979;11(2):113-22.
243. Wang J, Niu Y, Zhang C, Chen Y. A micro-plate colorimetric assay for rapid determination of trace zinc in animal feed, pet food and drinking water by ion masking and statistical partitioning correction. *Food Chem.* 2018;245:337-45.
244. Johnsen O, Eliasson R. Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *Int J Androl.* 1987;10(2):435-40.
245. Cooper TG, Jockenhovel F, Nieschlag E. Variations in semen parameters from fathers. *Hum Reprod.* 1991;6(6):859-66.
246. Björndahl L. Prevalence of high zinc concentrations in 45,000 ejaculates -Unpublished data. 2021.
247. Karvonen MJ, Malm M. Colorimetric determination of fructose with indol. *Scand J Clin Lab Invest.* 1955;7(4):305-7.

248. Paquin R, Chapdelaine P, Dube JY, Tremblay RR. Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal alpha-1,4-glucosidase. *J Androl.* 1984;5(4):277-82.
249. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jockenhovel F, Nieschlag E. Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of alpha-glucosidase in seminal plasma. *Int J Androl.* 1990;13(4):297-305.
250. Björndahl L, Magnusson K, Larsson Chatziantonis M, Holmberg R, Flanagan J. When is a vasectomy successful? Laboratory aspects. *Andrology.* 2019;7, Suppl 1:96-97.
251. MacLeod J, Hotchkiss RS. The Distribution of Spermatozoa and of Certain Chemical Constituents in the Human Ejaculate. *J Urol.* 1942;48(2):225-9.
252. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril.* 1951;2(3):187-204.
253. Björndahl L, Kvist U. Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *Int J Androl.* 1990;13(3):232-7.
254. Kvist U, Kjellberg S, Björndahl L, Soufir JC, Arver S. Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *Int J Androl.* 1990;13(4):245-52.
255. Björndahl L, Kjellberg S, Kvist U. Ejaculatory sequence in men with low sperm chromatin-zinc. *Int J Androl.* 1991;14(3):174-8.
256. Lindholmer C. Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculate. *Fertil Steril.* 1973;24(7):521-6.
257. Lundquist F. Aspects of the biochemistry of human semen. . *Acta Physiol Scand.* 1949;19, Suppl 66:1-108.
258. Beiswanger JC, Deaton JL, Jarow JP. Partial ejaculatory duct obstruction causing early demise of sperm. *Urology.* 1998;51(1):125-7.
259. Eisenberg ML, Walsh TJ, Garcia MM, Shinohara K, Turek PJ. Ejaculatory duct manometry in normal men and in patients with ejaculatory duct obstruction. *J Urol.* 2008;180(1):255-60; discussion 60.
260. Fisch H, Kang YM, Johnson CW, Goluboff ET. Ejaculatory duct obstruction. *Curr Opin Urol.* 2002;12(6):509-15.
261. Lotti F, Corona G, Cocci A, Cipriani S, Baldi E, Degl'Innocenti S et al. The prevalence of midline prostatic cysts and the relationship between cyst size and semen parameters among infertile and fertile men. *Hum Reprod.* 2018;33(11):2023-34.
262. Nagler HM, Rotman M, Zoltan E, Fisch H. The natural history of partial ejaculatory duct obstruction. *J Urol.* 2002;167(1):253-4.
263. Onur MR, Orhan I, Firdolas F, Onur R, Kocakoc E. Clinical and radiological evaluation of ejaculatory duct obstruction. *Arch Androl.* 2007;53(4):179-86.

264. Smith JF, Walsh TJ, Turek PJ. Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North Am.* 2008;35(2):221-7, viii.
265. Turek PJ, Magana JO, Lipshultz LI. Semen parameters before and after transurethral surgery for ejaculatory duct obstruction. *J Urol.* 1996;155(4):1291-3.
266. Avellino GJ, Lipshultz LI, Sigman M, Hwang K. Transurethral resection of the ejaculatory ducts: etiology of obstruction and surgical treatment options. *Fertil Steril.* 2019;111(3):427-43.
267. Chan PTK, Aube M. Infertility due to ejaculatory duct obstruction can be surgically corrected—a forgotten lesson in male reproductive urology. *Fertil Steril.* 2018;110(7):1275-6.
268. El-Assmy A, El-Tholoth H, Abouelkheir RT, Abou-El-Ghar ME. Transurethral resection of ejaculatory duct in infertile men: outcome and predictors of success. *Int Urol Nephrol.* 2012;44(6):1623-30.
269. Halpern JA, Brannigan RE, Schlegel PN. Fertility-enhancing male reproductive surgery: glimpses into the past and thoughts for the future. *Fertil Steril.* 2019;112(3):426-37.
270. Kadioglu A, Cayan S, Tefekli A, Orhan I, Engin G, Turek PJ. Does response to treatment of ejaculatory duct obstruction in infertile men vary with pathology? *Fertil Steril.* 2001;76(1):138-42.
271. McQuaid JW, Tanrikut C. Ejaculatory duct obstruction: current diagnosis and treatment. *Curr Urol Rep.* 2013;14(4):291-7.
272. Fisch H, Lambert SM, Goluboff ET. Management of ejaculatory duct obstruction: etiology, diagnosis, and treatment. *World J Urol.* 2006;24(6):604-10.
273. Mortimer D, Björndahl L, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. A practical guide to basic laboratory andrology. 1st ed. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; In Press.
274. Amelar RD, Hotchkiss RS. The Split Ejaculate: Its Use in the Management of Male Infertility. *Fertil Steril.* 1965;16:46-60.
275. Eisenberg ML, Li S, Behr B, Pera RR, Cullen MR. Relationship between semen production and medical comorbidity. *Fertil Steril.* 2015;103(1):66-71.
276. Selvaraju V, Baskaran S, Agarwal A, Henkel R. Environmental contaminants and male infertility: Effects and mechanisms. *Andrologia.* 2020:e13646.
277. Levine H, Jorgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update.* 2017;23(6):646-59.
278. Muratori M, De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019;33(1):117-26.

279. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril.* 1979;31(5):531-7.
280. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.* 1987;8(5):338-48.
281. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1987;81(2):459-69.
282. Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed).* 2017;9:420-47.
283. O'Flaherty C, Matsushita-Fournier D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol Reprod.* 2017;97(4):577-85.
284. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction.* 2020;159(4):R189-R201.
285. Dias TR. Measurement of Reactive Oxygen Species in Semen Samples Using Chemiluminescence. *Methods Mol Biol.* 2021;2202:103-9.
286. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ. A new method for measuring antioxidant activity. *Biochem Soc Trans.* 1993;21(2):95S.
287. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic Res.* 1997;26(3):195-9.
288. Xu F, Guo G, Zhu W, Fan L. Human sperm acrosome function assays are predictive of fertilization rate in vitro: a retrospective cohort study and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):81.
289. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17(3):156-61.
290. Tamburrino L, Marchiani S, Muratori M, Luconi M, Baldi E. Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;516:110952.
291. Liu DY, Baker HW. Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertil Steril.* 1996;66(2):312-5.
292. Fierro R, Foliguet B, Grignon G, Daniel M, Bene MC, Faure GC et al. Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch Androl.* 1996;36(3):187-96.

293. Cross N. Methods for evaluating the acrosomal status of human sperm. In: Fenichel P, Parinaud J, editors. Human sperm acrosome reaction. Colloques INSERM. Paris: John Libbey Eurotext; 1995. p. 277-85.
294. Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG. Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J Androl.* 1993;14(2):132-41.
295. Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget.* 2017;8(2):3600-27.
296. Cross N. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research.* 1986;15 213-26.
297. Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil.* 1987;81(1):127-35.
298. Pember S, Jequier A, Yovich J. A Test of the Human Sperm Acrosome Reaction Following Ionophore Challenge Relationship to Fertility and Other Seminal Parameters. *Journal of andrology.* 1991;12:98-103.
299. Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Fuzzi B et al. Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1996;11(8):1661-7.
300. Björndahl L, Kvist U. A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Syst Biol Reprod Med.* 2011;57(1-2):86-92.
301. Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(11):1953-68.
302. Marchiani S, Tamburrino L, Benini F, Fanfani L, Dolce R, Rastrelli G et al. Chromatin Protamination and Catsper Expression in Spermatozoa Predict Clinical Outcomes after Assisted Reproduction Programs. *Sci Rep.* 2017;7(1):15122.
303. Marchiani S, Tamburrino L, Olivito B, Betti L, Azzari C, Forti G et al. Characterization and sorting of flow cytometric populations in human semen. *Andrology.* 2014;2(3):394-401.
304. Smith JF, Syritysna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y et al. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(17):6823-8.
305. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 2001;413(6856):603-9.
306. Brown SG, Publicover SJ, Barratt CLR, Martins da Silva SJ. Human sperm ion channel (dys)function: implications for fertilization. *Hum Reprod Update.* 2019;25(6):758-76.

307. Luo T, Chen HY, Zou QX, Wang T, Cheng YM, Wang HF et al. A novel copy number variation in CATSPER2 causes idiopathic male infertility with normal semen parameters. *Hum Reprod.* 2019;34(3):414-23.
308. Kelly MC, Brown SG, Costello SM, Ramalingam M, Drew E, Publicover SJ et al. Single-cell analysis of [Ca²⁺]_i signalling in sub-fertile men: characteristics and relation to fertilization outcome. *Hum Reprod.* 2018;33(6):1023-33.
309. Davis RO, Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl.* 1992;13(1):81-6.
310. Mortimer D, Mortimer S, editors. Routine application of CASA in human clinical andrology and ART laboratories. 13th International Symposium on Spermatology; 2018; Stockholm New York: Springer; 2021.
311. Mortimer D, Aitken RJ, Mortimer ST, Pacey AA. Workshop report: clinical CASA--the quest for consensus. *Reproduction, fertility, and development.* 1995;7(4):951-9.
312. ESHRE Special Interest Group in Andrology. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. 1998 Jan. Report No.: 0268-1161 (Print) Contract No.: 13.
313. Freour T, Jean M, Mirallie S, Barriere P. Computer-assisted sperm analysis parameters in young fertile sperm donors and relationship with age. *Syst Biol Reprod Med.* 2012;58(2):102-6.
314. Yuan P, Zhang Z, Luo C, Quan S, Chu Q, Zhao S. [Computer-assisted sperm analysis for assessing sperm motility parameters in in vitro fertilization]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2013;33(3):448-50.
315. Cupples G, Gallagher MT, Smith AU, Kirkman-Brown J, editors. Heads and tails. Requirements for informative and robust computational measures of sperm motility. 13th International Symposium on Spermatology; 2018; Stockholm. New York: Springer; 2021.
316. Gallagher MT, Cupples G, Ooi EH, Kirkman-Brown JC, Smith DJ. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Hum Reprod.* 2019;34(7):1173-85.
317. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update.* 1997;3(5):403-39.
318. Zhu JJ, Pacey AA, Barratt CL, Cooke ID. Computer-assisted measurement of hyperactivation in human spermatozoa: differences between European and American versions of the Hamilton-Thorn motility analyser. *Hum Reprod.* 1994;9(3):456-62.
319. Mortimer D, Mortimer ST. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods Mol Biol.* 2013;927:77-87.
320. Goodson SG, White S, Stevans AM, Bhat S, Kao CY, Jaworski S et al. CASAnova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns. *Biol Reprod.* 2017;97(5):698-708.

321. Ooi EH, Smith DJ, Gadelha H, Gaffney EA, Kirkman-Brown J. The mechanics of hyperactivation in adhered human sperm. *R Soc Open Sci.* 2014;1(2):140230.
322. Garrett C, Baker HW. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1306-17.
323. Lacquet FA, Kruger TF, Du Toit TC, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, De Villiers A et al. Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology. *Arch Androl.* 1996;36(2):133-8.
324. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, de Villiers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia.* 1997;29(1):1-7.
325. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia.* 1999;31(3):163-8.
326. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ, Shaughnessy D, Oehninger S, Ozgur K et al. Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertil Steril.* 1999;71(1):80-4.
327. Coetzee K, de Villiers A, Kruger TF, Lombard CJ. Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS). *Fertil Steril.* 1999;71(2):222-5.
328. An LM, Ma JH, Li WW, Xia XY, Huang YF, Wang WB. [Flow cytometry for evaluation of sperm plasma membrane integrity in varicocele patients]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2011;17(11):984-8.
329. Isobe T. New method to estimate the possibility of natural pregnancy using computer-assisted sperm analysis. *Syst Biol Reprod Med.* 2012;58(6):339-47.
330. Yaniz JL, Vicente-Fiel S, Soler C, Recreo P, Carretero T, Bono A et al. Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in men. *Asian J Androl.* 2016;18(6):819-23.
331. Lu JC, Huang YF, Lu NQ. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia.* 2014;46(4):329-38.
332. Vested A, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, Thulstrup AM, Kristensen SL, Toft G. A comparison of conventional and computer-assisted semen analysis (CRISMAS software) using samples from 166 young Danish men. *Asian J Androl.* 2011;13(3):453-8.
333. Hu YA, Lu JC, Shao Y, Huang YF, Lu NQ. Comparison of the semen analysis results obtained from two branded computer-aided sperm analysis systems. *Andrologia.* 2013;45(5):315-8.
334. Dearing C, Jayasena C, Lindsay K. Can the Sperm Class Analyser (SCA) CA-SA-Mot system for human sperm motility analysis reduce imprecision and operator subjectivity and improve semen analysis? *Hum Fertil (Camb).* 2019:1-11.

335. Dearing CG, Kilburn S, Lindsay KS. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Hum Fertil (Camb)*. 2014;17(1):37-44.
336. Kose M, Sokmensuer LK, Demir A, Bozdogan G, Gunalp S. Manual versus computer-automated semen analysis. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2014;41(6):662-4.
337. Lammers J, Springart C, Barriere P, Jean M, Freour T. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(1):35-43.
338. Urbano LF, Masson P, VerMilyea M, Kam M. Automatic Tracking and Motility Analysis of Human Sperm in Time-Lapse Images. *IEEE Trans Med Imaging*. 2017;36(3):792-801.
339. Wei SY, Chao HH, Huang HP, Hsu CF, Li SH, Hsu L. A collective tracking method for preliminary sperm analysis. *Biomed Eng Online*. 2019;18(1):112.
340. Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad M. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology*. 2015;84(8):1367-77.
341. Kobori Y, Pfanner P, Prins GS, Niederberger C. Novel device for male infertility screening with single-ball lens microscope and smartphone. *Fertil Steril*. 2016;106(3):574-8.
342. Holmes E, Bjorndahl L, Kvist U. Hypotonic challenge reduces human sperm motility through coiling and folding of the tail. *Andrologia*. 2020:e13859.
343. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2139-46.
344. Canale D, Giorgi PM, Gasperini M, Pucci E, Barletta D, Gasperi M et al. Inter and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different techniques: layering, swimup from pellet and percoll. *J Endocrinol Invest*. 1994;17(9):729-32.
345. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl*. 2012;14(2):260-9.
346. Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(6):765-70.
347. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:108.
348. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*. 1988;9(6):367-76.
349. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*. 1992;57(2):409-16.

350. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(4):Cd004507.
351. Simon L, Emery B, Carrell DT. Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:87-105.
352. Jayaraman V, Upadhy D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(6):557-63.
353. Aitken RJ, Finnie JM, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Kuczera L et al. Potential importance of transition metals in the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2136-47.
354. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C et al. Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques: A Possible New Male Predictive Parameter of Pregnancy? *Medicine (Baltimore).* 2016;95(20):e3624.
355. Björndahl L, Mohammadi M, Pourian M, Soderlund I, Kvist U. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *J Androl.* 2005;26(2):170-3.
356. Oseguera-Lopez I, Ruiz-Diaz S, Ramos-Ibeas P, Perez-Cerezales S. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:298.
357. International Standards Organization. ISO 15189:2012 Medical Laboratories – Requirements for Quality and Competence. Geneva 2012.
358. Lepine S, McDowell S, Searle LM, Kroon B, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;7:CD010461.
359. Bucar S, Goncalves A, Rocha E, Barros A, Sousa M, Sa R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(1):147-54.
360. Zafer M, Horvath H, Mmeje O, van der Poel S, Semprini AE, Rutherford G et al. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2016;105(3):645-55 e2.
361. Gilling-Smith C, Nicopoullou JD, Semprini AE, Frodsham LC. HIV and reproductive care--a review of current practice. *BJOG.* 2006;113(8):869-78.
362. Savasi V, Ferrazzi E, Lanzani C, Oneta M, Parrilla B, Persico T. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Hum Reprod.* 2007;22(3):772-7.
363. Fourie JM, Loskutoff N, Huyser C. Semen decontamination for the elimination of seminal HIV-1. *Reprod Biomed Online.* 2015;30(3):296-302.

364. Gilling-Smith C, Emiliani S, Almeida P, Liesnard C, Englert Y. Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1433-8.
365. Loutfy MR, Wu W, Letchumanan M, Bondy L, Antoniou T, Margolese S et al. Systematic review of HIV transmission between heterosexual serodiscordant couples where the HIV-positive partner is fully suppressed on antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2013;8(2):e55747.
366. LeMessurier J, Traversy G, Varsaneux O, Weekes M, Avey MT, Niragira O et al. Risk of sexual transmission of human immunodeficiency virus with antiretroviral therapy, suppressed viral load and condom use: a systematic review. *CMAJ.* 2018;190(46):E1350-E60.
367. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, van Lunzen J et al. Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *JAMA.* 2016;316(2):171-81.
368. Del Romero J, Rio I, Castilla J, Baza B, Paredes V, Vera M et al. Absence of transmission from HIV-infected individuals with HAART to their heterosexual serodiscordant partners. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(10):666-72.
369. Mahadevan M, Leeton JF, Trounson AO. Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation. *Fertil Steril.* 1981;36(2):243-7.
370. Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril.* 1954;5(6):520-9.
371. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature.* 1953;172(4382):767-8.
372. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949;164(4172):666.
373. Clarke GN, Bourne H, Hill P, Johnston WI, Speirs A, McBain JC et al. Artificial insemination and in-vitro fertilization using donor spermatozoa: a report on 15 years of experience. *Hum Reprod.* 1997;12(4):722-6.
374. David G, Czyglik F, Mayaux MJ, Martin-Boyce A, Schwartz D. Artificial insemination with frozen sperm: protocol, method of analysis and results for 1188 women. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87(11):1022-8.
375. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology.* 2002;57(1):303-26.
376. Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK. Conception with Human Spermatozoa Frozen by Nitrogen Vapor Technic. *Fertil Steril.* 1964;15:501-4.
377. Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(2):134-51.

378. Keel BA, Webster BW. Semen cryopreservation methodology and results. In: Barratt CLR, Cooke ID, editors. Donor insemination. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 71-96.
379. Sherman JK. Cryopreservation of human semen. In: Keel BA, Webster BW, editors. CRC handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. Boca Raton: CRC Press 1990. p. 229-59.
380. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, fertility, and development*. 1995;7(4):871-91.
381. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reproduction, fertility, and development*. 2003;15(7-8):377-81.
382. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):202-6.
383. Guan HT, Zheng Y, Wang JJ, Meng TQ, Xia W, Hu SH et al. Relationship between donor sperm parameters and pregnancy outcome after intrauterine insemination: analysis of 2821 cycles in 1355 couples. *Andrologia*. 2016;48(1):29-36.
384. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2006;86(3):721-2.
385. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril*. 2005;84(4):1017.
386. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(1):1-12.
387. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS et al. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(19):1994-2001.
388. Corona G, Minhas S, Giwercman A, Bettocchi C, Dinkelman-Smit M, Dohle G et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2019;25(6):733-57.
389. Kuczyński W, Dhont M, Grygoruk C, Grochowski D, Wołczyński S, Szamatowicz M. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa--a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2109-13.
390. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Ramsay JW. Does the cause of obstructive azoospermia affect the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *BJU Int*. 2004;93(9):1282-6.
391. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaili V et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):327-39.

392. Li K, Rodriguez D, Gabrielsen JS, Centola GM, Tanrikut C. Sperm cryopreservation of transgender individuals: trends and findings in the past decade. *Andrology*. 2018;6(6):860-4.
393. Starmer BZ, Baird A, Lucky MA. Considerations in fertility preservation in cases of testicular trauma. *BJU Int*. 2018;121(3):466-71.
394. Kamischke A, Jürgens H, Hertle L, Berdel WE, Nieschlag E. Cryopreservation of Sperm From Adolescents and Adults With Malignancies. *J Androl*. 2004;25(4):586-92.
395. Bourne H, Richings N, Liu DY, Clarke GN, Harari O, Baker HW. Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Reproduction, fertility, and development*. 1995;7(2):177-83.
396. Hawksworth DJ, Szafran AA, Jordan PW, Dobs AS, Herati AS. Infertility in Patients With Klinefelter Syndrome: Optimal Timing for Sperm and Testicular Tissue Cryopreservation. *Rev Urol*. 2018;20(2):56-62.
397. Kirkman-Brown JC, Martins MV. 'Genes versus children': if the goal is parenthood, are we using the optimal approach? *Hum Reprod*. 2020;35(1):5-11.
398. Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil Steril*. 2012;98(4):870-5.
399. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*. 1995;346(8968):137-40.
400. Tomlinson M. Managing risk associated with cryopreservation. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1751-6.
401. Perez-Sanchez F, Cooper TG, Yeung CH, al. e. Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. *Int J Androl*. 1994;17(3):115-20.
402. Machen GL, Harris SE, Bird ET, Brown ML, Ingalsbe DA, East MM et al. Utilization of cryopreserved sperm cells based on the indication for storage. *Investig Clin Urol*. 2018;59(3):177-81.
403. Liu S, Li F. Cryopreservation of single-sperm: where are we today? *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):41.
404. Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko E. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology*. 2017;5(6):1055-63.
405. Berkovitz A, Miller N, Silberman M, Belenky M, Itsykson P. A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device. *Hum Reprod*. 2018;33(11):1975-83.
406. Li YX, Zhou L, Lv MQ, Ge P, Liu YC, Zhou DX. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;233:84-92.

407. Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J. V., Isachenko, V., & Isachenko, E. Vitriified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86 °C. *Andrologia*. 2012; 44(6):433-435.
408. Schulz, M., Risopatrón, J., Uribe, P., Isachenko, E., Isachenko, V., & Sánchez, R. Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology*. 2020;8(6):1642-1650.
409. Cooper TG, Atkinson AD, Nieschlag E. Experience with external quality control in spermatology. *Hum Reprod*. 1999;14(3):765-9.
410. Cooper TG, Björndahl L, Vreeburg J, Nieschlag E. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int J Androl*. 2002;25(5):306-11.
411. Matson PL. External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Hum Reprod*. 1995;10(3):620-5.
412. Mortimer D, Björndahl L, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. A practical guide to basic laboratory andrology. 1st ed. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; In Press.
413. Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril*. 1990;54(2):308-14.
414. Mortimer ST, Mortimer D. Quality and Risk Management in the IVF Laboratory. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2015:402.
415. Westgard JO. Foreword to the second edition. In: Westgard JO, editor. Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories. Madison, WI, USA: QC Publishing; 2002.
416. Bohring C, Krause W. The intra- and inter-assay variation of the indirect mixed antiglobulin reaction test: is a quality control suitable? *Hum Reprod*. 1999;14(7):1802-5.
417. Kuster CE, Singer RS, Althouse GC. Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology*. 2004;61(4):691-703.
418. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1(8476):307-10.
419. Armitage P, Berry G, Matthews J. Statistical methods in medical research. Oxford: Blackwell Science; 2002:826
420. Motulsky H. Intuitive Biostatistics - A nonmathematical guide to statistical thinking. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2017:608
421. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo W.B. SAUNDERS COMPANY 1999:1917
422. Plaut DA, Westgard JOW. DC external quality assessment. In: Westgard JO, editor. Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories. Madison, WI, USA: QC Publishing; 2002. p. 125-63.
423. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press; 1989.

424. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.
425. Ford WC. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl*. 2010;12(1):59-63.
426. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *The Journal of urology*. 1951;66(3):436-49.
427. Boyd JC. Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian J Androl*. 2010;12(1):83-90.
428. Björndahl L, Barratt CL, Mortimer D, Jouannet P. 'How to count sperm properly': checklist for acceptability of studies based on human semen analysis. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2016;31(2):227-32.
429. Ozarda Y, Sikaris K, Streichert T, Macri J, intervals ICoR, Decision L. Distinguishing reference intervals and clinical decision limits - A review by the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55(6):420-31.
430. Ceriotti F, Henny J. "Are my Laboratory Results Normal?" Considerations to be Made Concerning Reference Intervals and Decision Limits. *EJIFCC*. 2008;19(2):106-14.
431. Gomez E, Aitken J. Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1996;65(4):880-2.
432. Mortimer D, Mortimer ST. Essential features in media development for spermatozoa, oocytes and embryos. In: Quinn P, editor. *Culture Media, Solutions and Systems in Human ART*. Cambridge: Cambridge University Press; 2014. p. 47-67.
433. Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG. The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, editor. *Methods in Mammalian Embryology*. San Francisco, CA, USA: Freeman; 1971. p. 86-116.
434. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*. 1985;44(4):493-8.
435. Hotchkiss RS. *Fertility in man*. London: William Heineman Medical Books; 1945.
436. Eliasson R. Standards for investigation of human semen. *Andrologia*. 1971;3:49-64.
437. Lentner C. *Geigy scientific tables*. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition. Basle: Ciba-Geigy Ltd; 1981:50.

ISBN 978-88-290-1039-4



9 788829 010394