SIA
Società Italiana di Andrologia
Commissione Certificazione

Modulo: infertilità

Capitolo: Seminologia

Indice

- Introduzione
- Standardizzazione delle procedure per l'analisi del liquido seminale
- Fase pre-analitica: norme per la raccolta
- Fase pre-analitica: norme per la processazione
- Fase analitica: valutazione macroscopica
- Fase analitica: valutazione microscopica
- Valutazione microscopica iniziale
- Valutazione microscopica: componente cellulare non nemaspermica
- Valutazione microscopica: concentrazione nemaspermica
- Valutazione microscopica: motilità nemaspermica
- Valutazione microscopica: morfologia nemaspermica
- Valutazione microscopica: vitalità nemaspermica
- Analisi degli antigeni di superficie degli spermatozoi
- Fase post-analitica: nomenclatura
- Fase post-analitica: refertazione

Introduzione

Principali parametri quantizzabili del liquido seminale:

- **Concentrazione e numero totale di spermatozoi**: riflettono la produzione nemaspermica dei testicoli e la pervietà dei dotti eiaculatori post-testicolari;
- **Motilità, morfologia, vitalità** degli spermatozoi: riflettono diversi aspetti fondamentali della funzione nemaspermica;
- **Volume e composizione del liquido seminale**: riflettono l'attività secretoria delle ghiandole accessorie

Possibili fattori interferenti sull'analisi del campione:

- **Errori di raccolta**: la perdita della prima parte dell'eiaculato, di derivazione prostatica e ricca di spermatozoi, altera il risultato dell'analisi;
- **Periodo di astinenza sessuale**: in assenza di eiaculazione, gli spermatozoi accumulati nell'epididimo si versano nell'uretra e vengono espulsi nelle urine; se eiaculazione recente, alcuni spermatozoi possono rimanere negli epididimi e una volta emessi influenzare negativamente la qualità complessiva del campione spermatico analizzato;
- Grande **variabilità biologica intraindividuale** dei parametri seminali.

→Standardizzare le procedure per l'esame del liquido seminale
→Eseguire almeno 2 o 3 campioni per individuo

Standardizzazione delle procedure per l'analisi del liquido seminale

SIA
Società Italiana di Andrologia
Commissione Certificazione

- **Fase pre-analitica**
  - Norme per la raccolta
  - Norme per la processazione
- **Fase analitica**
  - Valutazione macroscopica del campione
  - Valutazione microscopica del campione
- **Fase post-analitica**
  - Refertazione

Manuale di laboratorio WHO per l'esame del liquido seminale. V edizione. Pubblicato dall'OMS, 2010

Fase pre-analitica: norme per la raccolta

- **Giorni di astinenza sessuale**: tra 2-7 giorni. Se richiesti più campioni, mantenere costante il numero di giorni di astinenza.

- **Modalità di raccolta**: campione raccolto per masturbazione ponendo attenzione a non perdere nessuna frazione dell'eiaculato (in particolare la prima porzione).

- **Tipo di contenitore**: pulito, dall'apertura larga, di plastica o vetro, proveniente da un lotto certificato come non tossico per gli spermatozoi.

- **Modalità di consegna**: mantenere il campione a temperatura ambiente, tra 20°-37°C, per limitare escursioni termiche che possono influire negativamente sugli spermatozoi eiaculati. Consegnare il campione entro 1h dalla raccolta, che può avvenire a casa o in una stanza riservata vicino al laboratorio.

- **Raccolta dati anamnestici**: nome e cognome, data di nascita, giorni di astinenza, data e ora di raccolta, raccolta completa o meno del campione, eventuali dati clinici rilevanti, tempo intercorso tra la raccolta del campione e l'inizio dell'analisi del liquido seminale.

Fase pre-analitica: norme per la processazione

- Porre il contenitore in un incubatore a temperatura controllata (35°-37°C) per almeno 15 min.
- Miscelare il campione delicatamente e valutare se è completato il processo di fluidificazione.
- Trasferire il campione mediante una pipetta in una provetta conica trasparente e graduata. Tutti i materiali usati devono essere sterili.

Fase analitica: valutazione macroscopica

- L'analisi del liquido seminale dovrebbe iniziare subito dopo la fluidificazione e preferibilmente dopo 30 min e non oltre 1h dall'eiaculazione per prevenire disidratazione o cambiamenti di temperatura che alterano la qualità seminale.

- I principali parametri valutati macroscopicamente sono:

1) **Volume**: **valore di rif. >1.5 ml**. Volumi inferiori possono essere dovuti a raccolte incomplete, eiaculazione retrograda parziale, deficit androgenico, patologie ostruttive dei dotti eiaculatori o assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti.
2) **Fluidificazione**: normalmente avviene **in 15-60 min**. Se non avviene entro 1h, deve essere segnalato. Viene valutata facendo percolare il seme da una pipetta sulle pareti della provetta e osservando il fluido in trasparenza contro una sorgente luminosa.
3) **Viscosità**: viene valutata facendo gocciolare il liquido seminale da una pipetta. E' normale se le gocce fuoriescono piccole e separate, alterata se formano un filamento più lungo di 2 cm.
4) **Aspetto**: omogeneo, grigio-opalescente. Può essere meno opaco se la componente cellulare è scarsa, rosso-bruno se presenta emazie, bianco latte se costituito solo da secreto prostatico e giallastro in caso di ittero, infezioni o assunzioni di farmaci.

Fase analitica: valutazione microscopica

Componente cellulare nemaspermica

- Concentrazione
- Motilità
- Morfologia

Componente cellulare non nemaspermica

- Emazie, leucociti, elementi della linea germinativa, zone di spermioagglutinazione, cellule epiteliali di sfaldamento

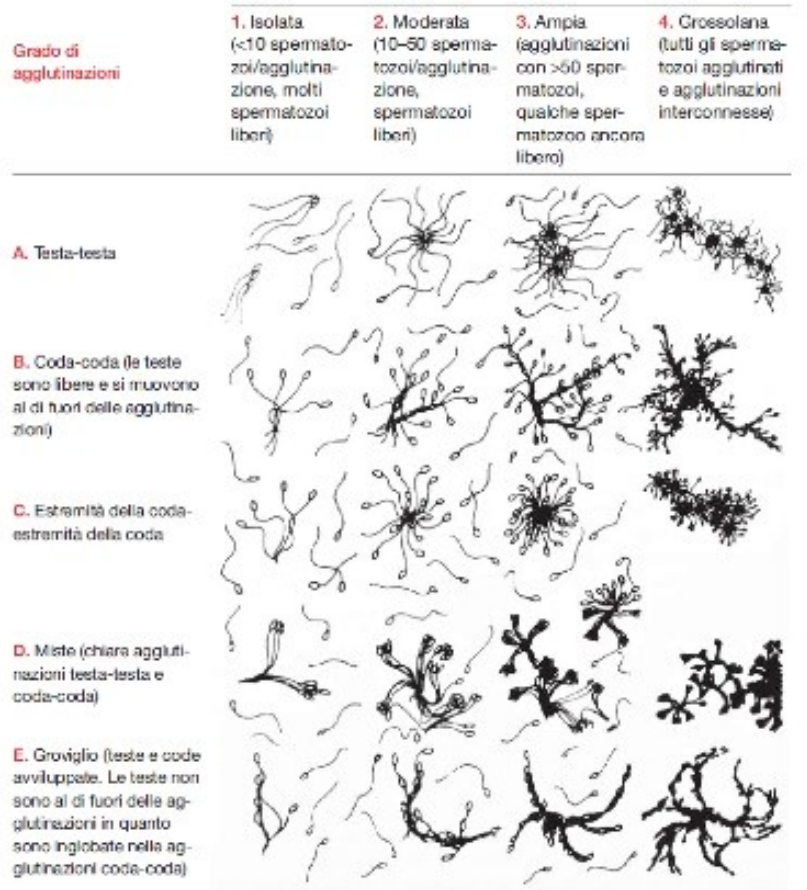
- Raccomandato l'utilizzo di un microscopio a contrasto di fase.
- Miscelare adeguatamente il campione per renderlo il più omogeneo possibile e allestire più vetrini per ogni campione.
- Raccogliere un'aliquota di circa 10 µL e disporla su di un vetrino coperta con un copri-oggetti, per ottenere un preparato di spessore omogeneo ed evitare la formazione di bolle d'aria.
- Ingrandimento 100x per visione d'insieme, analisi zone di spermioagglutinazione, aggregazione nemaspermatica e valutazione altre cellule non nemaspermiche.
- Ingrandimento 200x o 400x per valutare motilità degli spermatozoi e definire la diluizione per accurata valutazione della concentrazione.

Valutazione microscopica iniziale

SIA
Società Italiana di Andrologia
Commissione Certificazione

- **Aggregazione nemaspermica** (non-specifica): spermatozoi mobili o immobili adesi a filamento di muco ad altre cellule non nemaspermica o a detriti.

- **Agglutinazione nemaspermica** (specifica): spermatozoi mobili adesi tra loro testa-testa, coda-coda o in forma mista; motilità spesso vigorosa con movimento agitatorio frenetico oppure limitata dall'elevato grado di agglutinazione. Espressa in 4 gradi, in base al numero di spermatozoi coinvolti in ogni agglutinazione (vedi immagine). Può essere segno di presenza di anticorpi anti-spermatozoo.



Valutazione microscopica: componente cellulare non nemaspermic

SIA
Società Italiana di Andrologia
Commissione Certificazione

- Nel liquido seminale possono essere presenti altri tipi cellulari diversi dai nemaspermi, ovvero cellule epiteliali di sfaldamento, leucociti e cellule germinali immature (queste ultime 2 classi «**round cells**», **valore di rif. ≤ 1 mil/ml).**

- **Leucociti**: presenti nella maggior parte dei liquidi seminali umani, prevalentemente polimorfonucleati. Possono essere differenziati dalle cellule germinali tramite colorazione di Papanicolau, che li rende bluastri, mentre gli spermatidi diventano rosati.
- **Emazie**: normalmente assenti, possono essere sintomo di microemorragie, patologie flogistiche o molto raramente di patologie prostatiche.
- **Elementi della linea germinativa**: prevalentemente spermatociti e spermatidi, più raramente spermatogoni.
- **Cellule epiteliali di sfaldamento**: derivano dall'apparato genito-urinario, possono presentarsi isolate o in piccoli ammassi e vengono indicate come rare, presenti o numerose (in quest'ultimo caso possono essere segno di patologia infiammatoria).
- **Corpuscoli prostatici**: materiale non cellulare proveniente dalla prostata, quasi mai correlati a patologie prostatiche specifiche.

Valutazione microscopica: concentrazione nemaspermica

- **Concentrazione nemaspermica: valore di rif. ≥ 15 mil/ml**. Numero di spermatozoi per unità di volume del liquido seminale; è funzione del numero di spermatozoi emessi e del volume del fluido in cui sono diluiti. **Se < 15 mil/ml oligozoospermia.**
- **Numero totale di spermatozoi: valore di rif. ≥ 39 mil**. Numero totale di spermatozoi nell'intero eiaculato ottenuto moltiplicando la concentrazione nemaspermica per il volume del liquido seminale.

- **Concentrazione e numero totale di spermatozoi sono correlati sia al tempo di attesa sia alla percentuale di gravidanza.**

- Valutazione di un'aliquota di liquido seminale fluidificato, ben miscelato, non diluito su un vetrino preparato per determinare la diluizione e la camera idonea da utilizzare.
- Utilizzo di camere emocitometriche di 100 µm di profondità. Diverse camere disponibili, ognuna con differenti volumi e tipologie di griglie che richiedono diversi fattori per il calcolo (camera di Neubauer modificata è consigliata dal Manuale dell'OMS).
- Contare almeno 200 spermatozoi intatti per replicato.
- Se spermatozoi assenti in sospensione, centrifugare l'eiaculato (15 min a 3000 rpm), risospenderlo in 50 µL di plasma seminale e prelevare circa 10 µL della

Valutazione microscopica: motilità nemaspermica

- Tre categorie:

1. **Motilità progressiva** (PR): **valore di rif. ≥ 32%.** Lo spermatozoo si muove attivamente, in modo lineare o in un ampio circolo. **Se < 32% astenozoospermia**.
2. **Motilità non progressiva** (NP): **valore di rif. PR + NP ≥ 40%.** Comprende tutti gli altri tipi di motilità in cui non c'è progressione nello spazio (ad es. movimento in piccoli circoli, solo movimento flagellare senza progressione, solo spostamento laterale della testa).
3. **Immobilità**: nessun movimento.

- Valutazione su un preparato a fresco, fluidificato, entro 1h dall'eiaculazione, con ingrandimento 200x o 400x e utilizzando un reticolo oculare.
- Esaminare circa 200 spermatozoi intatti in ogni preparato per effettuare una percentuale per le diverse categorie di motilità.
- Confrontare i valori dei preparati replicati per verificarne la ripetibilità.
- Metodi computerizzati di supporto: **Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) System**, software di elaborazione di immagini che trasforma la visione microscopica in immagine digitalizzata, analizzabile dal programma, e **Superimposed Image Analysis System (SIAS)**, software in grado di acquisire e memorizzare fino a 21 frames/sec e sovrapporle in un'immagine finale con effetto-movimento degli spermatozoi mobili.

Valutazione microscopica: morfologia nemaspermica

- **Forme tipiche: valore di rif. ≥4%.**
- **Forme atipiche**: possono interessare testa, collo e coda. **Se >96% teratozoospermia**.

- Uno spermatozoo normale deve avere sia la testa sia la coda normali.
- Testa: ovale, liscia, con contorni regolari e una regione acrosomiale ben definita, che comprende il 40-70% della testa.
- Tratto intermedio: sottile, regolare, lungo circa come la testa e allineato con essa; il residuo citoplasmatico è anomalo se supera un terzo delle dimensioni della testa.
- Coda: più sottile rispetto al tratto intermedio, con calibro uniforme lungo tutta la sua lunghezza, pari a circa 45 µm (circa 10 volte quella della testa); può essere avvolta, ma se presenta un angolo acuto è indicativo di rottura flagellare.

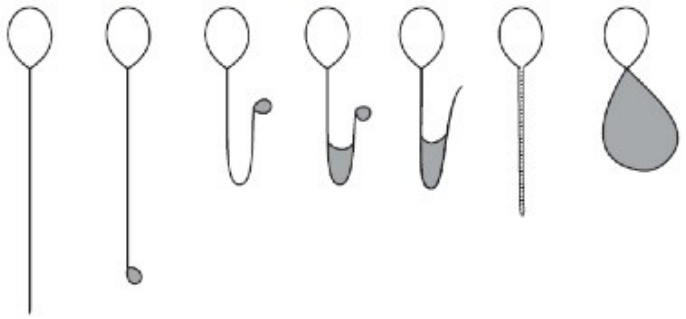
- I difetti della spermatogenesi e alcune patologie epididimarie sono associate ad aumento della percentuale di spermatozoi anomali.
- **Stretta relazione tra la percentuale di forme normali e vari endpoints di fertilità.**

- Valutazione di uno striscio di liquido seminale su vetrino, asciugato, fissato e

Valutazione microscopica: vitalità nemaspermica

- La percentuale di cellule morte non deve superare quella di cellule immobili.
- Rappresenta un **controllo della valutazione della motilità**, importante **soprattutto per i campioni con PR +NP <40%**.

- La percentuale di spermatozoi vitali viene valutata entro 30 min dalla fluidificazione identificando le cellule con membrana cellulare intatta tramite.
  - **Test all'eosina**: **valore di rif. ≥ 58%**. Le cellule con membrana danneggiata, quali quelle morte, permettono la penetrazione di coloranti, normalmente non inclusi. Si valuta miscelando su un vetrino 5 µL di liquido seminale con uguale quantità di soluzione già preparata di eosina. Successivamente si conta su 200 spermatozoi il numero di cellule colorate (in rosso o rosa scuro, cioè morte) e non colorate (vitali).
  - **Test di rigonfiamento ipo-osmotico: valore di rif. ≥ 58%**. Solo le cellule con membrana intatta possono rigonfiarsi se poste all'interno di una soluzione ipotonica. Si valuta aggiungendo 100 µL di liquido seminale ad 1 mL di soluzione ipo-osmotica (citrato di Na, fruttosio e acqua distillata), incubati per 5 e 30 min e poi essere posti su un vetrino. Successivamente si valuta su 200 cellule le variazioni di rigonfiamento del flagello (vedi immagine).



Analisi degli antigeni di superficie degli spermatozoi

- La presenza di agglutinazioni può essere segno di anticorpi anti-spermatozoo nel liquido seminale, solitamente delle classi IgG e IgA, solo queste ultime di importanza clinica.
- La sola presenza di tali anticorpi non è sufficiente per fare diagnosi di autoimmunità anti-spermatozoo, che va studiata con test di II livello (vedi test di penetrazione del muco). Tuttavia, tali anticorpi possono interferire oltre che con la funzione spermatica, anche con il legame alla zona pellucida e con la reazione acrosomiale.

- Test di screening:
  - **Test diretto per la ricerca di anticorpi adesi alla superficie dello spermatozoo**: **Mixed Antiglobulin Reaction (MAR) test** e **Immunobead test (IBT)**. Il primo si esegue sul campione in toto, mentre IBT utilizza spermatozoi lavati. Si utilizzano «beads» ricoperti di anticorpi "ponte", anti-IgA o anti-IgG, che aderiscono agli spermatozoi mobili con eventuali anticorpi adesi alla superficie. Il test è positivo se su almeno 200 spermatozoi analizzati si ha >50% di spermatozoi adesi ai beads.
  - **Test indiretto per la ricerca di anticorpi in fluidi privi di spermatozoi** (plasma seminale, siero ematico, muco cervicale solubilizzato): il fluido, inattivato al calore e diluito, viene incubato con spermatozoi di donatore privi di

Fase post-analitica: nomenclatura

- **Aspermia**: assenza di liquido seminale (assenza o eiaculazione retrograda).
- **Normozoospermia**: concentrazione/ml e % di PR e di spermatozoi morfologicamente normali ≥ valori min rif.
- **Oligozoospermia**: concentrazione/ml < valori min rif.
- **Azoospermia**: assenza di spermatozoi nell'eiaculato.
- **Criptozoospermia**: spermatozoi presenti nel preparato a fresco, ma osservati nel pellet dopo centrifugazione.
- **Emospermia**: presenza di eritrociti nell'eiaculato.
- **Leucospermia**: presenza di leucociti nell'eiaculato > valore di rif.
- **Astenozoospermia**: % spermatozoi con PR < valori min rif.
- **Oligoastenozoospermia**: concetrazione/ml e % spermatozoi con PR < valori min rif.
- **Teratozoospermi**a: % spermatozoi morfologicamente normali < valori min rif.
- **Astenoteratozoospermia**: % spermatozoi con PR e morfologia normale < valori min rif.
- **Oligoastenoteratozoospermia**: concentrazione/ml e % spermatozoi con PR e morfologia normale < valori min rif.
- **Necrozoospermia**: bassa % di spermatozoi vitali ed alta % di spermatozoi

Fase post-analitica: refertazione

COGNOME …….
…….
Data ……. raccolta……..

NOME ……..

astinenza giorni …….. ora

		Valori di riferimento
Volume		≥ 1.5 ml
Spermatozoi		≥ 15 mil/ml
Spermatozoi totali		≥ 39 milioni
Viscosità		Regolare
Fluidificazione completa entro		Entro 60 min
pH		≥ 7.2
Round cells		≤ 1 mil/ml
Emazie		assenti
Motilità		
PR – progressiva		≥ 32%
NP – non progressiva		
PR + NP		≥ 40%
Immobili		
Eosina test (spermatozoi vitali)		≥ 58%

		Valori di riferimento
Morfologia		≥ 1.5 ml
Forme tipiche		≥ 4%
Forme atipiche		
Anomalie testa		
Anomalie collo		
Anomalie coda		
Agglutinazioni		

Test di qualità degli spermatozoi	
Immunologia	
Markers biochimici	

Osservazioni	

Materiale didattico a cura della Commissione Certificazione Andrologica SIA

AREA CHIRURGICA

. Carlo Ceruti

. Danilo Di Trapani

AREA MEDICA

. Giorgio Piubello

. Paolo Turchi

Collaboratori:

. Luca Boeri

. Chiara Sabbadin

. Mirko Preto

. Mattia Barbot

Supervisor:

.Vincenzo Gentile

.