

ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

Massimo Menegazzo

Centro di Crioconservazione dei Gameti Maschili.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova, Padova, Italia.

L'esame standard del liquido seminale, spermioγραμμα rappresenta il punto di partenza (primo livello) e l'analisi guida per l'impostazione di tutte le successive analisi di secondo livello. Per una corretta esecuzione laboratoristica dell'esame del liquido seminale è fondamentale standardizzare delle precise norme di raccolta e consegna nonché di valutazione del campione stesso: da alcuni anni viene considerato come punto di riferimento per tale scopo il manuale del WHO (Tabella 1 e 2). L'edizione del 2010 del WHO per stabilire i valori inferiori di riferimento si sono avvalsi di una coorte di uomini sani con un time-to-pregnancy inferiore ai 12 mesi.

Tab.1 Esame del liquido seminale (WHO, 2010)

PARAMETRI SEMINALI STANDARD	VALORI DI RIFERIMENTO
Volume seminale	≥ 1.5 ml
pH	≥ 7.2
Concentrazione spermatozoi (milioni/ml)	$\geq 15 \times 10^6$
Numero totale spermatozoi/eiaculato (milioni)	$\geq 39 \times 10^6$
Motilità (%)	$\geq 32\%$ motilità progressiva (PR)
Morfologia (%)	$\geq 4\%$
Vitalità (%)	$\geq 58\%$
Leucociti	$< 1 \times 10^6$ /ml
Immunobead test o MAR test	$< 50\%$ spermatozoi mobile con bead adese $< 50\%$ spermatozoi con particelle adese

Tab. 2 Terminologia utilizzata per la classificazione delle caratteristiche del liquido seminale

Normozoospermia	Normalità dei parametri seminali
Oligozoospermia	Concentrazione spermatica < 15×10^6 /ml o Numero totale di spermatozoi nell'eiaculato < 39×10^6
Astenozoospermia	< 32% di spermatozoi con motilità progressiva (PR)
Teratozoospermia	< 4% di spermatozoi con morfologia normale
Oligo-asteno-teratozoospermia	Alterazione del numero, della motilità e della morfologia degli spermatozoi
Oligo-teratozoospermia	Alterazione del numero e della morfologia degli spermatozoi
Oligo-astenozoospermia	Alterazione del numero e della motilità degli spermatozoi
Asteno-teratozoospermia	Alterazione della motilità e della morfologia degli spermatozoi
Criptozoospermia	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato, ma presenza di cellule spermatiche dopo centrifugazione
Necrozoospermia	< 58% di vitalità spermatica
Azoospermia	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato anche dopo centrifugazione
Aspermia	Assenza di eiaculato

L'esame del liquido seminale comprende la valutazione di parametri macroscopici e microscopici dell'eiaculato. Per quanto riguarda i parametri macroscopici vanno considerate le caratteristiche reologiche del liquido seminale (aspetto, viscosità, fluidificazione) e vengono valutate il volume di eiaculato ed il pH seminale. Per quanto concerne l'esame microscopico, è necessario valutare la concentrazione nemaspermica, espressa per ml, il numero totale di spermatozoi per eiaculato, la percentuale di motilità differenziata per tipo ed, infine, la morfologia nemaspermica. Si passa quindi alla valutazione della componente cellulare non nemaspermica, costituita da leucociti, cellule della linea germinativa, cellule epiteliali, emazie, zone di spermioagglutinazione, corpuscoli prostatici.

Per una corretta valutazione dell'esame seminale è necessario ricordare che non sempre alterazioni dei parametri seminali riflettono condizioni patologiche, potendo essere anche la semplice espressione della fisiologica variabilità intraindividuale nella conta spermatica o conseguenza di errori nella modalità di raccolta, trasporto o valutazione del campione seminale. In particolare un periodo di astinenza troppo breve (<2 giorni) o eiaculazioni frequenti nel periodo precedente la raccolta seminale possono causare una riduzione del volume dell'eiaculato e del numero di spermatozoi e, a volte, possono indurre la presenza di leucociti e/o emazie. Al contrario un periodo di astinenza eccessivo (>7 giorni) può alterare la morfologia e la motilità degli spermatozoi. Analoghe alterazioni seminali possono riscontrarsi anche in campioni raccolti in una sede diversa da quella dell'analisi, a causa di possibili contaminazioni batteriche, dell'esposizione allo shock termico e dei tempi necessari al trasporto del campione. Va inoltre sempre indagata la presenza nei tre mesi precedenti l'esame seminale di febbre, di terapie farmacologiche o di eventi stressanti, in

grado di alterare transitoriamente i parametri seminali. Infine è necessario affidarsi ad operatori capaci e rigorosi, poiché l'esame seminale è un'indagine che più di altre risente di tale variabile.

Una volta escluse le variabili che possono interferire con la corretta interpretazione seminale, ci si può concentrare sui singoli parametri da analizzare e sulle loro alterazioni.

Una corretta esecuzione dell'esame del liquido seminale prevede una opportuna successione di passaggi che analizzeremo in dettaglio suddividendole in fasi:

Fase 1: Accettazione

Il paziente, proveniente da vari ambulatori, reparti o divisioni ospedaliere viene ricevuto previo appuntamento.

La fase dell'accettazione consiste nel controllo dei dati anagrafici del paziente, che fornisce un valido documento di riconoscimento all'operatore, permettendo così la corretta compilazione del modulo di lavoro. Al paziente vengono richiesti, oltre a nome e cognome, la data di nascita ed i giorni di astinenza dall'ultimo rapporto sessuale o dall'ultima eiaculazione. Quest'ultimo dato va segnato con precisione e dovrebbe, quanto più possibile, rientrare in un intervallo compreso tra 2 e 7 giorni.

I dati vengono riportati su un'etichetta che va fissata al contenitore "a bocca larga" per la raccolta, rigorosamente sterile.

La raccolta avviene per masturbazione ed il campione deve essere consegnato entro 60 minuti dall'eiaculazione e conservato a temperatura costante tra 20°C e 37° C per evitare escursioni termiche che potrebbero deteriorare la qualità del liquido seminale.

È necessario accertarsi che il paziente non abbia perso parti dell'eiaculato, che, per le sue caratteristiche intrinseche risulta suddivisibile in più frazioni, caratterizzate da secrezioni prostatiche o vescicolari. In particolare, dal momento che la maggior quantità di spermatozoi è presente nella prima frazione, è necessario segnalare l'eventuale perdita di tale componente.

Fase 2: Analisi

La fase analitica viene suddivisa in 2 momenti distinti: valutazione macroscopica e microscopica. La prima parte prevede la registrazione di parametri macroscopici, quali volume, aspetto, viscosità, Liquefazione/fluidificazione e pH.

L'analisi del **volume** offre già una prima serie di informazioni sullo status fisiologico dell'apparato uro-genitale, dal momento che permette una valutazione dell'attività testicolare complessiva (il valore inferiore di riferimento è 1.5 ml, al di sotto del quale il paziente risulta affetto da iposposia). La valutazione del volume viene effettuata tramite pesatura del contenitore con il campione in esame; la sottrazione tra il peso del contenitore con il liquido seminale e il contenitore vuoto ci darà il volume di eiaculato prodotto dal paziente (densità del liquido seminale assunta come pari a 1g/ml). La quantificazione del volume offre anche un'idea della funzionalità delle ghiandole accessorie e della pervietà delle vie genitali. Le alterazioni del volume del liquido seminale possono essere caratterizzate dalla completa assenza di liquido seminale nell'eiaculato o dall'aumento o dalla riduzione della sua quantità:

- **ASPERMIA**: con tale termine si indica genericamente l'assenza di eiaculato. Tale fenomeno può essere conseguente ad anorgasmia (aneiaculazione anorgasmica), ad eiaculazione retrograda o a mancata fase di emissione del liquido seminale in uretra (aspermia vera). Nella prima forma la causa può essere psicogena o più raramente neurogena (da lesione neurologica centrale o da neuropatia sensitiva periferica); in tali casi l'eiaculazione può essere indotta mediante vibrostimolazione del pene con un apposito strumento (Ferticare) o mediante elettrostimolazione.

L'eiaculazione retrograda è dovuta invece ad inefficace chiusura del collo vescicale e riconosce molteplici cause: anatomiche, congenite o più frequentemente acquisite come gli interventi chirurgici sulla prostata, sul collo vescicale o sull'uretra posteriore; cause farmacologiche (terapie con alfa-bloccanti, antidepressivi, antipsicotici); infine cause neurologiche, come nelle lesioni midollari toraco-lombari, nelle resezioni rettali o sigmoidee allargate e nel diabete mellito.

- **IPOPOSIA**: con il termine di iposposia si intende un volume di eiaculato inferiore a 1.5 ml. Tale alterazione può essere dovuta ad una ridotta astinenza da rapporti sessuali o eiaculazioni, ad una raccolta seminale incompleta (pertanto deve essere sempre indagata un'eventuale perdita di eiaculato al momento della raccolta), a flogosi prostatiche-vescicolari (associate a pH alto) che possono determinare una alterata funzionalità secretoria ghiandolare, ad un quadro di ipogonadismo, ad assenza o ostruzione delle vie escrettrici

(associata a pH basso) o a forme cosiddette idiopatiche quando non è possibile riscontrare cause ben documentabili.

L'**aspetto** viene valutato avvicinando la provetta con il liquido seminale ad una fonte luminosa. È possibile definire una scala categoriale, da trasparente a lattescente, scegliendo come valore di normalità il colore grigio-opalescente. Un liquido seminale trasparente può indicare una riduzione della componente nemaspermica, mentre liquidi giallastri o ematici indicano, rispettivamente, un'elevata concentrazione di leucociti o emazie segno di flogosi o infezione delle vie seminali. Infine, un liquido seminale lattescente indica la presenza di una forte componente prostatica (Fig. 1).

Fig. 1

Valutazione dell'aspetto				
GRIGIO OPALESCENTE	TRASPARENTE	EMATICO	LATTESCENTE	GIALLASTRO
Colore Opaco	Colore Acquoso	Colore Rosato Rosso	Colore Biancastro	Colore Giallo
Proprio	Mancata presenza componente cellulare	Presenza Emazie	Costituito solo da secreto Prostatico	Ittero, Assunzione di vitamine
				

La **viscosità** può essere sia normale che aumentata, che diminuita. Una viscosità aumentata può a sua volta avere diversa gradazione, riportata nel referto con gradazione qualitativa (----diminuita; ++++ aumentata), e può essere associata ad uno stato di flogosi. La misurazione avviene facendo gocciolare il liquido da una pipetta, osservando come le gocce dovrebbero susseguirsi in maniera ritmica una dopo l'altra. La formazione di filamenti è un segnale di aumentata viscosità.

Anche la **liquefazione/fluidificazione** va valutata attentamente, dal momento che, nei primi minuti successivi all'eiaculazione, il liquido, per effetto dell'azione di enzimi prodotti dalle vescichette seminali, forma un coagulo che arriva a sciogliersi dopo circa 15 minuti dalla consegna ad opera delle proteinasi del secreto prostatico, permettendo la scomparsa di strie di muco che potrebbero interferire con la motilità degli spermatozoi. In questa fase possono essere presenti nel liquido granuli che, vanno prontamente sottratti e quantificati. L'assenza del coagulo in condizioni basali indica una possibile agenesia delle vescichette seminali o una agenesia dei dotti eiaculatori.

Se dopo 60 minuti la liquefazione non è completa, si parla di liquefazione ritardata. La misurazione viene effettuata tramite percolamento del liquido lungo le pareti della provetta ed osservazione della qualità del liquido contro una sorgente luminosa. Tale quadro è compatibile con un disturbo prostatico.

Il **pH** del liquido seminale, misurato con apposite cartine indicatrici dopo 30 minuti dall'eiaculazione, deve essere ≥ 7.2 per poter essere definito normale, senza che vi sia compromissione a livello prostatico o vescicolare. Livelli di pH acidi (< 7.2), in associazione ad una ipospia, indicano la prevalenza della componente prostatica per compromissione delle vescichette seminali, pertanto possono essere segno di ostruzione o agenesia dei dotti eiaculatori.

La seconda parte dell'analisi consiste nella valutazione dei **parametri microscopici**.

In primo luogo l'operatore verifica la **concentrazione spermatica** attraverso una valutazione a fresco su vetrino con copri oggetto 22x22. In base al numero di spermatozoi che si rilevano (vedi Fig.1) si scelgono le due diluizioni più opportune per eseguire la valutazione con la camera di conta di Neubauer (vedi Fig.2). Il valore ottenuto con l'apposita formula (es: Diluizione 1+4 (1:5) $C = (N/n) \times 0.25$; $C =$ concentrazione sp.zoi mil/ml, $N =$ numero totale di spermatozoi contati, $n =$ numero di righe contate) viene poi moltiplicato per il volume totale, così da ottenere il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato indicando il grado di attività della spermatogenesi. L'assenza di spermatozoi viene definita **azoospermia**, concentrazioni inferiori a 1 milione/ml definiscono la **criptozoospermia**, mentre tra 1 e 15 milioni/ml di spermatozoi si parla di **oligozoospermia**. Valori superiori a 15 milioni/ml e 39 milioni/eiaculato stabiliscono la **normozoospermia**.

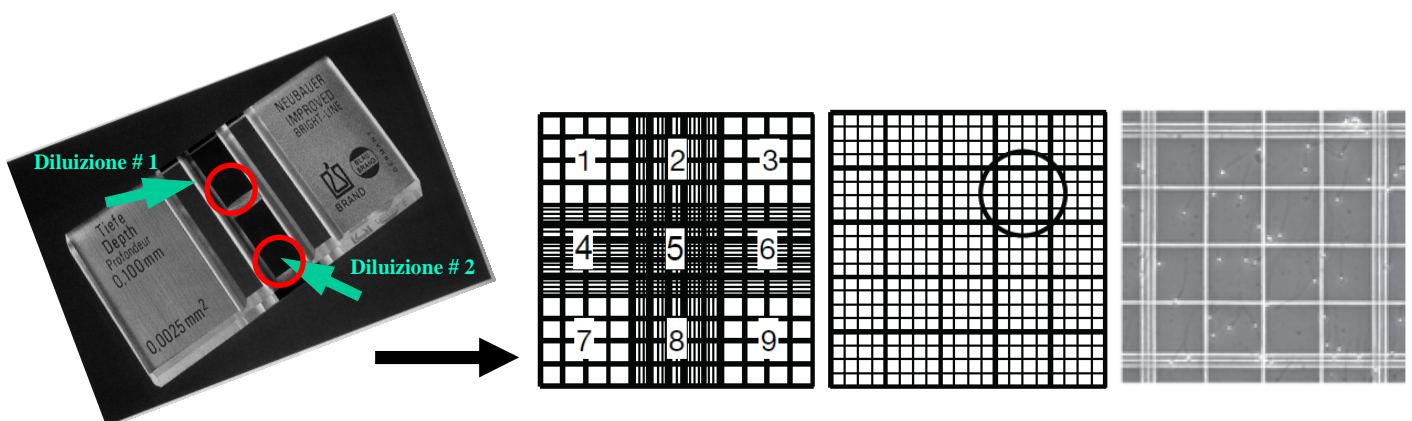
Nel caso in cui la valutazione a fresco indichi una presenza molto bassa di spermatozoi, si ricorre alla centrifugazione del campione.

Fig. 1 Diluizioni per camera di Neubauer

Table 2.3 Semen dilutions required, how to make them, chambers to use and potential areas to assess

Spermatozoa per x400 field	Spermatozoa per x200 field	Dilution required	μ l of semen	μ l of fixative	Chamber	Area to be assessed
>101	>404	1:20 (1+19)	50	950	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
16-100	64-400	1:5 (1+4)	50	200	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
2-15	8-60	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer or large volume	all 9 grids entire slide

Fig. 2 Camera di Neubauer



L'osservazione in camera di Neubauer è utilizzata inoltre per valutare la componente non gametica, rappresentata da cellule di sfaldamento, round cells, emazie, leucociti (v.n. < 1.0 milioni/ml) e spermatidi.

La **motilità**, viene valutata entro 1 ora dall'ejaculazione, preferibilmente dopo mezzora dalla raccolta. Si valuta generalmente a fresco generalmente su un vetrino con coprioggetto da 22x22. Il preparato così ottenuto viene esaminato con ottica in contrasto di fase a 200x o 400x ingrandimenti e si contano 200 spermatozoi intatti (non contare code mobili senza la testa)

Le classi di motilità sono:

PROGRESSIVA (PR) – spermatozoi che si muovono rapidamente sia con moto rettilineo che in grossi cerchi senza tener presente della velocità, ma valutando la loro progressione.

NON PROGRESSIVA (NP) – spermatozoi che si muovono senza progressione, movimento in situ.

ASSENTE (IM) – spermatozoi immobili.

Una motilità normale è definita da una percentuale di spermatozoi con motilità progressiva (PR) superiore al 32%. Per valori inferiori si parla di astenozoospermia.

In caso di astenozoospermia è importante valutare la modalità della raccolta del liquido seminale, la sua conservazione/trasporto al laboratorio analisi, il pH, la viscosità seminale e la eventuale presenza di spermioagglutinazioni ed anticorpi antispermatozoo. Il dosaggio di alcuni indicatori biochimici di funzionalità prostatica, vescicolare, epididimaria quali la fosfatasi acida, zinco, fruttosio, alfa-glucosidasi, anche se poco indicativi e poco utilizzati, possono in taluni casi indirizzare verso un'alterazione delle ghiandole accessorie quale possibile causa dell'astenozoospermia. E' necessario pertanto eseguire accertamenti di approfondimento con una spermicoltura e/o urinocoltura del primo mitto, per escludere la presenza di infezioni del tratto riproduttivo e delle vie urogenitali, responsabili di un danno sugli spermatozoi diretto o indiretto tramite la produzione di citochine o altri prodotti da parte delle cellule della risposta infiammatoria. In caso di infezione batterica la terapia antibiotica mirata dovrà essere seguita da una spermicoltura di controllo almeno 2-3 settimane dopo la fine del trattamento e da nuova analisi del liquido seminale da eseguire almeno tre mesi dopo l'eradicazione dell'infezione.

Un altro importante test a cui sottoporre gli spermatozoi è il test della **vitalità**, che valuta l'integrità cellulare dello spermatozoo, ovvero la sua capacità di non accettare sostanze dall'esterno. La valutazione va eseguita preferibilmente entro 30 minuti. La sostanza usata per questo test è l'eosina Y 5% che va mescolata con un uguale volume di campione seminale. Sarà necessario distinguere le forme vive da quelle morte (200 spermatozoi contati), osservando, in un campo, quanti spermatozoi risultano colorati di rosso (spermatozoi morti) e quanti di bianco (spermatozoi vivi). Si parla di necrozoospermia quando la percentuale di forme vitali è inferiore al 58% (Fig. 3). Associato al test dell'eosina c'è il test di rigonfiamento osmotico (Swelling test), un ulteriore test di vitalità nemaspermica, che stabilisce la capacità osmoregolatrice degli spermatozoi in funzione dell'integrità funzionale di membrana. Si attua mescolando 0.1 ml di liquido seminale con 1 ml di soluzione di swelling ed incubando per almeno 30 minuti a 37° C (non più di 45 minuti). La lettura si effettua contando 200 spermatozoi, individuando la percentuale di spermatozoi rigonfi (vivi) sugli spermatozoi non rigonfi (morti) (Fig. 4).

Fig. 3 Eosina test

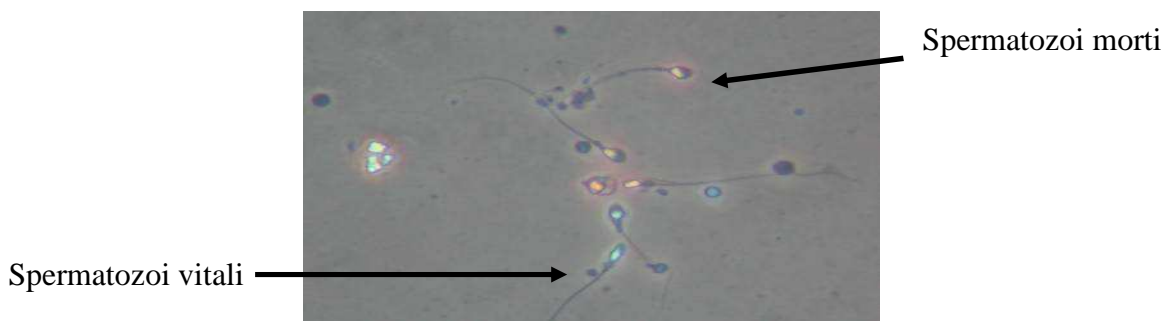
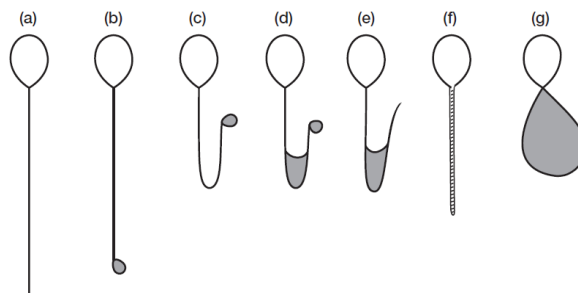


Fig 4 Swelling test

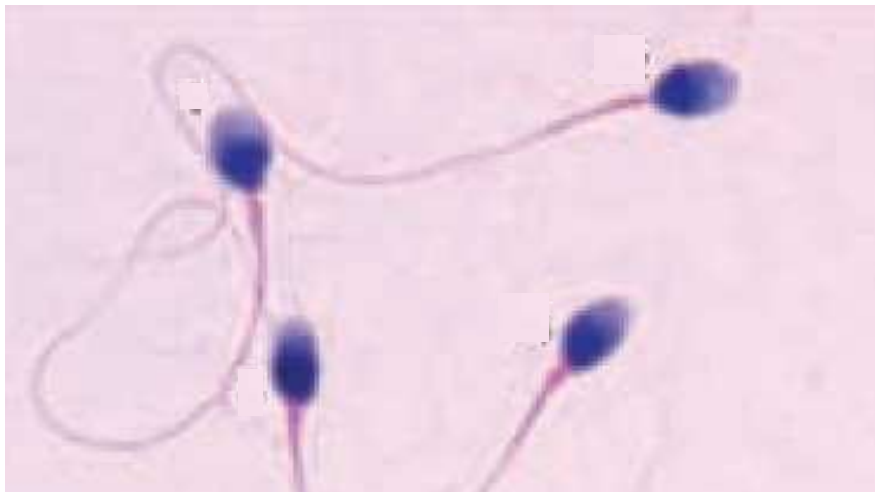
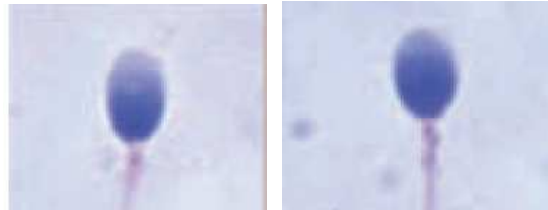
(a) no change. (b)–(g) various types of tail changes. Swelling in tail is indicated by the grey area.



Reproduced from Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. (1984) *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219–228. © Society for Reproduction and Fertility (1984). Reproduced by permission.

La **valutazione morfologica** si basa sulla distinzione tra forme tipiche (Fig. 5) (**v.n. $\geq 4\%$**) e forme atipiche (Fig. 6). La colorazione utilizzata è quella di papanicolau e la valutazione viene eseguita contando 200 spermatozoi dopo aver strisciato e colorato il preparato su vetrino.

Fig. 5 Spermatozoi con normale morfologia



Le atipie possono interessare la testa, il collo e la coda (Fig. 6) e generalmente comprendono: macrocefali, microcefali, anomalie dell'acrosoma, teste allungate, teste appuntite, teste doppie, angolazioni del collo, immaturi, code attorcigliate, code doppie, altre forme.

Fig. 6



Testa Allungate



Spermatozoo macrocefalo



Spermatozoo microcefalo



Teste doppie



Testa appuntita



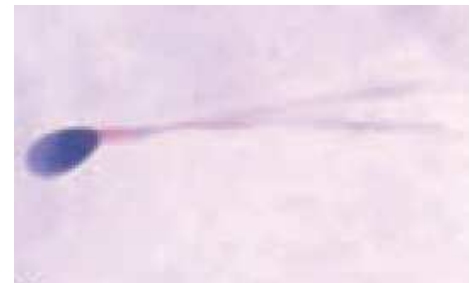
Anomalia acrosoma



Angolazioni del collo



Code attorcigliate



Code doppie

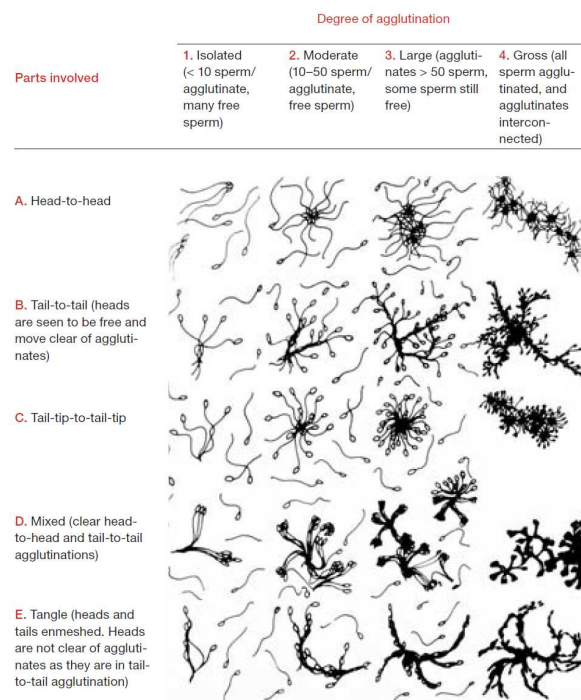


Residuo citoplasmatico

Nel caso in cui la percentuale di forme atipiche superi il 96 %, si parla di teratozoospermia. Lo studio della morfologia può essere di aiuto talvolta anche per indirizzare la diagnosi: in caso di alterazioni testicolari può essere presente un aumento delle forme allungate e anomalie della testa; in caso di alterazioni a livello epididimario, dove avviene la maturazione finale dello spermatozoo, ci sarà una prevalenza delle forme immature caratterizzate dalla presenza di residui citoplasmatici; nelle flogosi genitali possono essere incrementate le anomalie del collo (presenza di spermatozoi angolati o con deconnessione testa-flagello).

Nell'esame del liquido seminale va tenuta in considerazione anche la presenza di eventuali **agglutinazioni**, che possono coinvolgere testa, tratto intermedio e coda. Nel referto viene utilizzata una gradazione semiquantitativa che va da ---- (assenza) a ++++ (agglutinazioni massive) (fig. 7)

FIG. 7 Gradi di Agglutinazione



Reproduced from Rose et al. (1976) by permission of Wiley-Blackwell.

Inoltre, è importante valutare l'eventuale presenza di **anticorpi IgG** sulla superficie della membrana plasmatica. Il test utilizzato è il MAR test o Immunobead che risulta patologico quando più del 50% degli spermatozoi presenta le particelle adese alla testa, al collo o alla coda degli stessi.

Bibliografia

World Health Organization (2010) WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. FIFTH EDITION. Cambridge University Press, Cambridge.