



## Laboratorio di andrologia



Istituto Internazionale di Medicina della Riproduzione  
International Institute for Reproductive Medicine  
Internationales Institut für Reproduktive Medizin  
Institut International de Médecine Reproductive

Nell'uomo la riduzione della capacità fecondante viene definita con il termine di **infertilità maschile** ed è una condizione patologica associata ad una o più alterazione dei parametri seminali (dispermia o sterilità).

La capacità fecondante deriva dall'integrazione della potenzialità dei due componenti della coppia, singolarmente intesi, oltre che dalla loro interazione.

Per quanto riguarda il partner maschile, il primo passo consiste nell'analisi critica del campione seminale da effettuarsi presso il **Laboratorio di Andrologia**.

L'esame di base è rappresentato dallo **spermiogramma** cui faranno eventualmente seguito ulteriori studi che saranno programmati dal medico in considerazione dei risultati dello spermiogramma stesso e della storia clinica dei pazienti.

Tali esami hanno lo scopo di verificare la normalità morfologica e strutturale delle varie parti che costituiscono lo spermatozoo .



Il laboratorio di Andrologia del centro IIRM è strutturato in forma tale da coprire tre settori:

**Laboratorio di Andrologia di base.** Consiste negli esami classici effettuati sul campione seminale:

- spermioγραμμα
- test di separazione nemaspermica
- crioconservazione
- trattamento del seme per inseminazioni intrauterine

**Laboratorio di Andrologia in sala operatoria.** Consiste nell'identificazione, separazione e crioconservazione di spermatozoi prelevati dalle vie seminali mediante tecniche di microchirurgia.

**Laboratorio di Andrologia avanzato.** Prevede esami specifici che indagano ulteriormente il campione seminale quale il test FISH.



## LABORATORIO DI ANDROLOGIA DI BASE



L'esame del campione seminale rappresenta il cardine dell'iter diagnostico nella valutazione della fertilità maschile.

È fondamentale che venga effettuato in un laboratorio con competenza specifica ed operatori adeguatamente addestrati, nel rispetto degli standard internazionali proposti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Un'insieme di esami che vengono opportunamente programmati ed eseguiti consentono di stabilire se il partner maschile sia effettivamente infertile, se il livello di infertilità sia tale da rendere consigliabile una procedura di PMA ed eventualmente a quale tecnica di PMA sia opportuno indirizzarsi.

Tutto ciò costituisce la base per il monitoraggio dell'efficacia della terapia a cui il maschio infertile viene eventualmente sottoposto.



## SPERMIOGRAMMA

L'analisi di base dei parametri del liquido seminale, Spermioγραμμα, è l'esame che serve a valutare il maschio di una coppia infertile. In tale esame vengono valutate le caratteristiche fisiche e morfologiche del campione, in particolare il numero degli spermatozoi, la loro motilità e morfologia.

**Raccolta del campione.** Prima di procedere alla raccolta del campione, al paziente viene chiesto che non sia stato soggetto a recenti eventi intercorrenti in grado di alterare i parametri spermiografici quali l'assunzione di antibiotici o anti-infiammatori, periodi recenti di febbre alta, situazioni particolari di stress fisici quali, ad esempio, un lungo viaggio.

Dal momento che una prolungata astinenza può provocare una riduzione della motilità, mentre una concentrazione ridotta può riscontrarsi nel caso di una breve astinenza, la raccolta del campione avviene dopo un periodo di adeguata astinenza sessuale (pari a 2-7 giorni).

La legge Svizzera permette l'utilizzo di seme eterologo per le metodiche di procreazione assistita nelle coppie coniugate.



**Valutazione microscopica e macroscopica del liquido seminale.** Uno spermogramma “standard” prevede un numero minimo di parametri al di sotto dei quali non è possibile scendere pena l’incorrere in sbagliate valutazioni di tipo diagnostico terapeutiche. Alla base di tali valutazioni vi sono parametri definiti dall’ OMS, raccolti in un manuale pubblicato nel 1999 e aggiornato nel 2000.

*Fluidificazione e viscosità:*

Si tratta di un’analisi macroscopica che tende a valutare se l’omogenizzazione, conseguente alla fluidificazione del campione seminale, è completa o incompleta (permanenza di coaguli più o meno grandi) e se avviene nei tempi fisiologici o è ritardata (oltre i trenta minuti).

Parametri alterati sono legati prevalentemente a fenomeni infiammatori del tratto genito-urinario, alterazioni che possono inficiare la funzionalità ed il numero degli spermatozoi e, di conseguenza, la condizione di fertilità.



### Aspetto, volume e pH:

Il colore, l'opacità/trasparenza e la presenza/assenza di striature di muco o agglomerati visibili di cellule, sono parametri che valutano l'aspetto del campione seminale. Il colore fisiologico dell'eiaculato è avorio opalescente.

Il volume viene considerato normale se maggiore o uguale a 2.0 ml. Valori inferiori (*ipo-posia*) fanno pensare ad ostruzioni delle vie seminali o ad alterazioni in senso lato del meccanismo eiaculatorio.

Il pH, valore che determina il grado di acidità, viene rilevato mediante l'utilizzo di semplici indicatori appositi per l'intervallo di valori tra 6.4 e 8.0. Il valore normale del liquido seminale è leggermente alcalino ed è compreso tra 7.2 e 8.0.

Patologie infiammatorie genito-urinarie possono dar luogo a valori di pH al di fuori di questo intervallo di normalità, spostando il pH nel campo dell'alcalinità.



### Concentrazione:

Nei soggetti fertili, normali da un punto di vista anatomico, uro-andrologico ed endocrinologico, vi è una notevole oscillazione del numero degli spermatozoi, anche fra un campione e l'altro dello stesso individuo. I valori più elevati riportati nel manuale del OMS variano tra i 200 e i 250 milioni/ml (al di sopra di tali valori si parla di *polispermia*).

Al contrario la concentrazione minima in soggetti normali è nell'ordine dei 20 milioni/ml. Al di sotto di tale valore si parla di *oligospermia*, mentre se il valore scende al di sotto dei 5 milioni/ml si parla di *oligospermia severa*.

Qualora la concentrazione di spermatozoi nel campione sia estremamente ridotta, inferiore a 400 spermatozoi/ml, è estremamente improbabile ritrovare spermatozoi all'esame microscopico diretto. In questo caso il campione viene centrifugato per concentrare le cellule; qualora nel concentrato si reperino spermatozoi si parla di *criptozoospermia*, in caso contrario di *azoospermia*.





Motilità:

Si distinguono tre tipi di motilità:

*progressiva rapida*, caratterizzata da movimento rettilineo rapido

*progressiva debole*, con movimento rettilineo lento

*in situ*, in cui gli spermatozoi si muovono sul posto, senza progressione

*assente*, con gli spermatozoi del tutto immobili

La valutazione viene effettuata a fluidificazione completa, quindi 20-30 minuti dalla produzione del campione, e viene ripetuta dopo due ore dall'eiaculazione.

Nei soggetti normali, dopo 30 minuti dall'eiaculazione la percentuale di forme dotate di motilità progressiva (rapida + debole) rappresenta il 50% rispetto al numero totale di spermatozoi, oppure gli spermatozoi dotati di motilità rapidamente progressiva corrispondono al 25%.



### Morfologia:

Esistono due criteri che regolano la valutazione della morfologia degli spermatozoi e si basano l'uno sui valori riportati nel manuale dell'OMS e l'altro sui criteri restrittivi di Krüger. I laboratori IIRM hanno adottato i criteri di Krüger, in quanto maggiormente predittivi del potenziale di fertilizzazione dello spermatozoo.

Gli spermatozoi vengono classificati in base ai criteri morfologici come:

- *normali*
- *con anomalie di testa*
- *con anomalie di coda*
- *amorfi* (anomalie di testa + anomalie di coda)

Il valore degli spermatozoi normoconformati nel soggetto normale è superiore o uguale al 14% secondo i criteri di Krüger; al di sotto di tale valore si ha una condizione di *teratospermia*.

L'esame morfologico consente inoltre di evidenziare le altre cellule presenti nell'eiaculato, rappresentate dai seguenti elementi: 1) elementi immaturi della linea spermatogenetica (ovvero cellule germinali), quali spermatidi, spermatociti e spermatogoni; 2) globuli bianchi; 3) globuli rossi, o eritrociti; 4) cellule epiteliali.



Di particolare importanza è la quantificazione delle cellule germinali, la cui presenza superiore al 5% è indice di alterazione della spermatogenesi.

### Zone di agglutinazione, eritrociti e leucociti:

Le zone di agglutinazione sono aree in cui gli spermatozoi convergono e, se pur mobili, non sono in grado di allontanarsene. Sono in genere indice di infiammazioni genito-urinarie. Gli eritrociti non sono normalmente presenti nel liquido seminale, sebbene una quota minima possa essere riscontrata senza che questo indichi la presenza di patologia.

La concentrazione dei leucociti viene calcolata in maniera comparativa alla concentrazione degli spermatozoi. Qualsiasi valore maggiore o uguale ad un milione/ml è indice di infiammazione.

### Test di vitalità:

Il test di vitalità permette di determinare tra gli spermatozoi immobili la percentuale di spermatozoi vitali, rispetto a quelli non vitali.

L'uso di un colorante che sia in grado di penetrare gli spermatozoi in cui si è verificato un danno di membrana (cosiddetto colorante vitale), conferisce agli spermatozoi non vitali una



colorazione intensa. La condizione di normalità è rappresentata da un valore maggiore o uguale al 60% di forme vitali.

### **Quando consigliare il test:**

Lo spermogramma viene consigliato ed effettuato come esame di base per valutare il maschio di una coppia infertile. Esistono casi di infertilità anche nelle coppie che presentano parametri seminali nella norma mentre il 30-40% dei maschi a spermogramma alterato ha figli. Pertanto il valore dello spermogramma da solo nella diagnosi d'infertilità è relativo e va comunque accoppiato ad altri esami.



## TEST DI SEPARAZIONE NEMASPERMICA

Si tratta di un'insieme di procedure biologiche finalizzate alla separazione degli spermatozoi di "buona qualità" da quelli immobili e dalle altre cellule presenti nel liquido seminale.

Esistono 2 approcci generali per effettuare il test:

- **Swim-up:** consente la separazione degli spermatozoi in base alla loro motilità
- **Gradiente di densità:** consente la separazione degli spermatozoi in base alla loro densità

Il campione ottenuto è ripulito dal plasma seminale e da tutti gli altri elementi cellulari presenti nel campione seminale .

### Il test viene consigliato per:

- guidare la scelta di un'opportuna tecnica di separazione per eventuali cicli d' inseminazione intrauterina (IAO).



## **CRIOCONSERVAZIONE DEL LIQUIDO SEMINALE**

Le cellule spermatiche vengono crioconservate in piccoli contenitori cilindrici denominati paillettes e mantenute in azoto liquido a temperature inferiori ai  $-196^{\circ}\text{C}$ . In queste condizioni le cellule spermatiche mantengono per lungo tempo inalterate le loro possibilità di sopravvivenza e la loro funzionalità. Gli spermatozoi possono derivare da una eiaculazione spontanea o da un prelievo dai testicoli o dagli epididimi. Questi spermatozoi possono essere congelati e conservati per successive terapie sia mediante inseminazione intrauterina sia con tecniche FIVET o ICSI. Ogni campione seminale viene suddiviso in varie aliquote, ognuna delle quali corrisponde a una paillette, in cui sono annotati i dati del paziente per l'identificazione del campione. Le paillettes di ogni paziente vengono conservate in apposite banche le quali vengono ciclicamente controllate dal personale tecnico.

La metodica di crioconservazione standardizzata da anni, ha un ottimo livello di efficienza pur se la qualità degli spermatozoi crioconservati è soggetta a un degrado biologico connesso con l'attuale tecnica.

Il campione di liquido seminale potrà essere ritirato in qualunque momento esclusivamente dal depositante con richiesta scritta. Il depositante potrà inoltre decidere se mantenere il proprio campione crioconservato, se eliminarlo o donarlo per la ricerca. Anche in questo caso, sarà necessaria una richiesta scritta specifica da parte del depositante in cui egli stesso manifesti chiaramente la propria volontà.



Per poter effettuare la crioconservazione sono necessari i seguenti esami infettivologici:

**-Markers epatite B**

**-Anticorpi anti-epatite C**

**-Anticorpi anti-HIV**

**-VDRL/TPHA (test per la sifilide)**

**-Citomegalovirus**

**La crioconservazione è particolarmente indicata nei seguenti casi:**

- pazienti azoospermici per i quali si ricorre al prelievo degli spermatozoi direttamente dalle vie seminali mediante tecniche di microchirurgia (vedere sezione successiva);
- pazienti che devono iniziare un ciclo di chemioterapia;
- pazienti con un'oligospermia severa, cioè con un numero ridottissimo di spermatozoi nell'eiaculato e che potrebbero rischiare di arrivare a una condizione di azoospermia, cioè di totale assenza di spermatozoi;
- pazienti che affrontano un ciclo di trattamento e che prevedono di poter avere un blocco psicologico al momento della produzione del campione per l'inseminazione degli ovociti.



## TRATTAMENTO DEL SEME PER INSEMINAZIONI INTRAUTERINE

L'inseminazione intrauterina di tipo omologo è usata nelle coppie subfertili ed è spesso associata a stimolazione farmacologica per indurre la maturazione follicolare.

Il fine di tale tecnica è volto ad incrementare il numero di ovociti utili per la fertilizzazione, ad aumentare il numero di spermatozoi che raggiungono le tube superando la barriera cervicale ed a correggere disfunzioni ovulatorie che possono risultare misconosciute durante l' iter diagnostico.

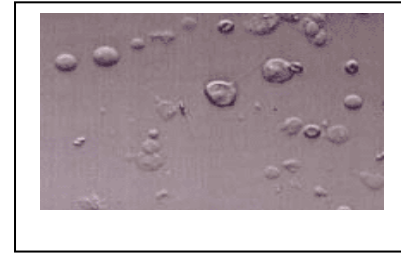
Il campione seminale viene trattato attraverso una separazione nemaspermica in modo da venir ripulito dal plasma seminale e da tutti gli altri elementi cellulari presenti nel campione seminale.(si veda il “test di separazione nemaspermica” indicato nella stessa rubrica).

Questo servizio è utilizzabile anche da medici specialisti che desiderino eseguire personalmente il trattamento presso il loro studio medico.





## IL LABORATORIO DI ANDROLOGIA IN SALA OPERATORIA



Un'indicazione al prelievo chirurgico degli spermatozoi direttamente dalle vie seminali è l'assenza totale di spermatozoi nell' eiaculato, detta azoospermia.

In relazione al tipo di azoospermia riscontrata, il prelievo può essere eseguito dall' epididimo o dal testicolo sulla base dell'indicazione dell'andrologo.

**-MESA:** definisce il prelievo di spermatozoi dall'epididimo (dall'inglese *microsurgical epididymal sperm aspiration*). Prevede l'aspirazione degli spermatozoi dai tubuli epididimari; si tratta di un' approccio particolarmente indicato nel caso di pazienti con tratto seminale incompleto dovuto ad agenesia dei dotti deferenti.

**-TESE:** definisce il prelievo di spermatozoi direttamente dal testicolo (dall'inglese *testicular sperm extraction*). Prevede il prelievo dal testicolo di una serie di piccoli frammenti di tessuto formati dai tubuli seminiferi all'interno dei quali vengono prodotti gli spermatozoi. I frammenti, portati in laboratorio, sono finemente sminuzzati; si procede quindi alla ricerca e separazione, nella sospensione ottenuta, degli spermatozoi eventualmente presenti .



**-MICRO-TESE:** definisce il prelievo dei singoli tubuli seminiferi che formano il testicolo. L'andrologo utilizza un microscopio apposito per identificare i tubuli seminiferi che presentano un aspetto più turgido, indicativo della probabile produzione di spermatozoi. La separazione degli spermatozoi avviene come nella tecnica TESE.

### **PRELIEVO DI SPERMATOZOI DALLE VIE SEMINALI: MESA, TESE e MICRO-TESE**

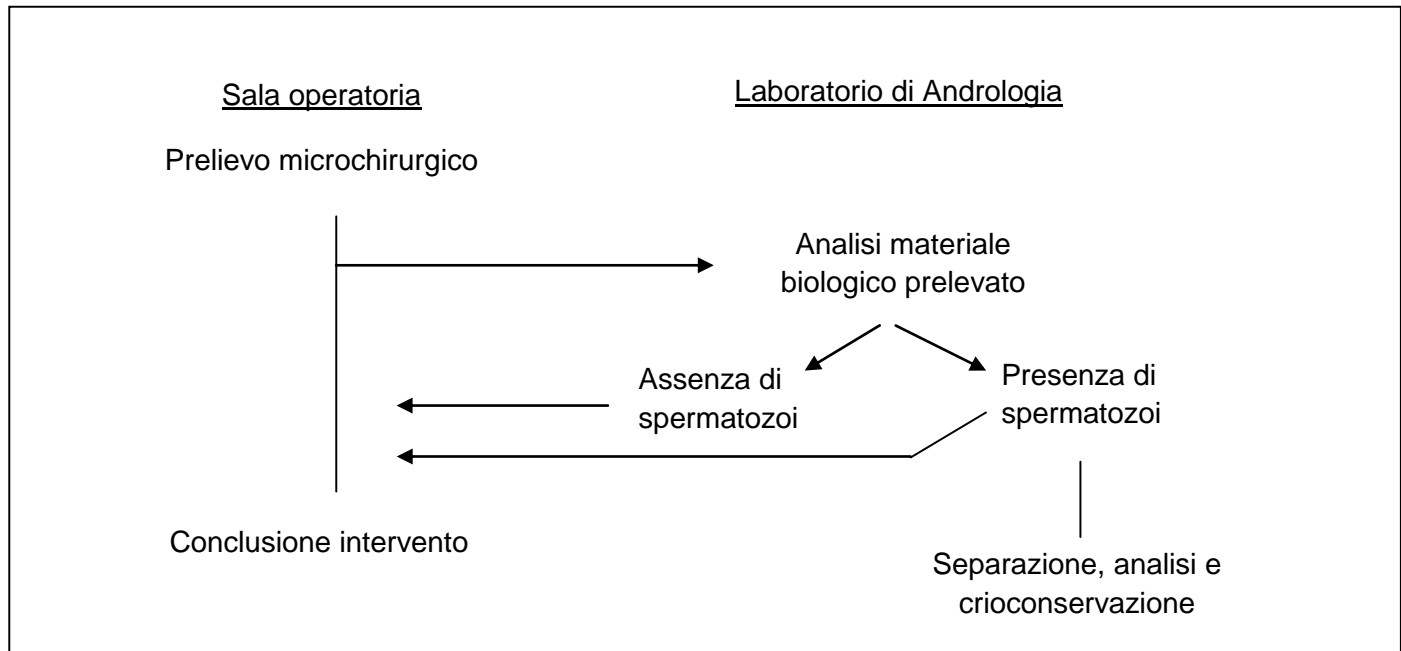
Gli interventi di MESA, TESE e MICRO-TESE sono generalmente programmati prima di iniziare il ciclo di stimolazione ovarica della partner allo scopo di avere la certezza della disponibilità di spermatozoi per l'inseminazione degli ovociti.

Nel corso dell'intervento chirurgico, il Laboratorio di Andrologia svolge un ruolo cruciale in stretta collaborazione con il team medico. Infatti, il biologo processa e analizza immediatamente il materiale biologico fornitogli dal chirurgo cui comunica, alla brevità possibile, l'esito della ricerca. Dalla velocità della sua risposta, dipende la decisione da parte del chirurgo sul procedere dell'intervento: in caso di ritrovamento di spermatozoi, procederà a concludere l'intervento mentre, in caso contrario, eseguirà ulteriori prelievi considerando, eventualmente, di intervenire anche sul secondo testicolo.



L'abilità e la rapidità del biologo, quindi, rivestono un ruolo cruciale nel minimizzare i tempi di esposizione del paziente all'anestesia riducendo così il discomfort che inevitabilmente è associato a un intervento di chirurgia.

Gli spermatozoi così ottenuti vengono opportunamente isolati in laboratorio e crioconservati in più aliquote che potranno così essere utilizzati in vari cicli di fecondazione assistita.



La possibilità di trovare spermatozoi nella chirurgia delle forme ostruttive è di circa il 90%, mentre nelle forme secretorie è di circa il 50%. Sono disponibili esami per distinguere nella fase pre-operatoria le forme ostruttive da quelle secretorie, ma non esiste la certezza di previsione sul ritrovamento o meno degli spermatozoi.

Le tecniche di MESA e TESE sono generalmente preferite all'aspirazione attraverso la cute mediante puntura, poiché, a parità di possibili complicanze, il prelievo chirurgico permette di prelevare spermatozoi sufficienti per più cicli di fecondazione assistita.

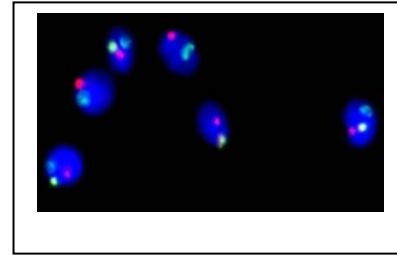
### **L' intervento è consigliato nei casi di:**

- azoospermia ostruttiva o secretoria, a discrezione dell'andrologo.

Gli spermatozoi così ottenuti possono generalmente essere sottoposti ai test sopra riportati, anche se la disponibilità numerica è solitamente scarsa.



## LABORATORIO DI ANDROLOGIA AVANZATO



Allo scopo di ottenere ulteriori informazioni sulla qualità degli spermatozoi e per avere quindi una diagnosi completa del campione seminale, si fa ricorso in determinate situazioni ad esami più approfonditi che andranno ad aggiungersi agli esami classici eseguiti nel laboratorio di andrologia di base.

### **TEST FISH**

Il test FISH (dall'inglese Fluorescence In Situ Hybridization) prevede l'utilizzo di sonde di DNA marcate con sostanze fluorescenti che si legano in forma specifica a ciascun cromosoma. Questa tecnica consente di eseguire un'indagine sul numero dei cromosomi delle cellule germinali maschili.



Nei campioni seminali con un numero di spermatozoi superiore ad un milione totale nell'intero eiaculato, il test FISH è effettuato eseguendo un'analisi statistica su di un numero relativamente alto di spermatozoi (da 1000 a 5000 cellule spermatiche). Nel caso di campioni con un numero più esiguo, vengono analizzate tutte le cellule disponibili.

### **Il test è consigliato nei casi:**

- di ripetuti fallimenti riproduttivi in cicli precedenti. L'interpretazione dei risultati ottenuti può essere d'aiuto per intraprendere un eventuale futuro programma terapeutico.
- di pazienti portatori di traslocazioni cromosomiche. In questo caso, le sonde utilizzate sono specifiche per ogni tipo di traslocazione.

E' inoltre utile per discriminare l'origine di percentuali elevate d'anomalie cromosomiche negli embrioni generati in vitro.



## Riferimenti bibliografici

Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli MC, Cavani S, Gaggero G, Tindiglia C, Ragni N, Venturini PL (2000) Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. Hum Reprod 15, 2165-2172.

Burr RW, Sieberg R, Flaherty SP, Wang XJ, Matthews CD (1996). The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. Fertil Steril 65, 1-127.

Colpi GM, Colpi EM, Piediferro G, Giacchetta D, Gazzano G, Castiglioni FM, Magli MC, Gianaroli L (2009) Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study. Reprod Biomed Online 18, 315-319.

Downie S, Flaherty S, Matthews C. (1997) Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in situ hybridization. Molec Hum Reprod 3, 585-598.

Egozcue J, Blanco J, Anton E, Sarrate Z, Vidal F (2005) Aneuploidy in human sperm. ESHRE Pre-Congress course in Andrology. Syllabus pp. 26-30.



Gianaroli L, Magli Mc, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini Fabris Gf, Voliani S, Ferraretti Ap (2005) Frequency of aneuploidy in spermatozoa from patients with extremely severe male factor infertility. Hum Reprod 20, 2140-2152.

Gianaroli L, Magli MC, Selman HA, Colpi G, Belgrano E, Trombetta C, Vitali G, Ferraretti AP (1999) Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular tissue as an alternative to repeated surgical openings in the treatment of azoospermic men. Hum Reprod 14, 1034-1038.

Gianaroli L, Selman HA, Magli MC, Colpi G, Fortini D, Ferraretti AP (1999) Birth of a healthy infant after conception with round spermatids isolated from cryopreserved testicular tissue. Fertil Steril 72, 539-541.

Gianaroli L., Magli M.C., Collodel G., Moretti E., Ferraretti A. P., Baccetti B. (2008). Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. Fertil Steril 90, 104-112.

Hammadeh ME, Zeginiadv T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Streheler E (2001) Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. Arch Androl. 46, 99-104.

Ibérico G, Vioque J, Ariza N, Lozano JM, Roca M, Llacér J, Bernabeu R (2004) Analysis of factor influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. Fertil Steril 81, 1308-1313.





Erempreiss, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J (2001) Comparative study of cytochemical tests pure sperm chromatin integrity. J Androl 22, 45 – 53.

Krüger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veek LL, Morshedi M, Brugo S (1987) New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. Urology 30, 248-251

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta A, Kearns WG (1999) Detection of aneuploidy for chromosomes 4,6,7,8,9,10,11,12,13,17,18,21,X and Y by fluorescence in situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 14, 1266-1273.

Templado C, Marquez C, Munné S, Colls P, Martorell MR, Cieply K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J, Estop AM (1996) An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. Cytogenetics and Cell Genetics 74, 194-200.

World Health Organization (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition. Cambridge University Press, Cambridge UK.



## **Contatto**

**I nostri centralini sono aperti:**

**Lunedì-Venerdì**

dalle ore 8:30 alle 16:30

## **Per appuntamenti siete pregati di contattare:**

**Tel: + 41 91 980 90 70**

**Fax: + 41 91 980 08 73**

[info@iirm.ch](mailto:info@iirm.ch)

[www.iirm.ch](http://www.iirm.ch)

## **Importante**

Per richieste o appuntamenti al di fuori di questi orari potete lasciare un messaggio sulla segreteria telefonica, con le istruzioni necessarie per contattarvi.



