



con il patrocinio della



## **LO SPERMIOGRAMMA: *Consensus meeting*** *(Adeguamento alle linee guida O.M.S.)*

# 5 giugno 2015

# Corretta esecuzione ed interpretazione dello spermioγραμμα secondo il Manuale OMS

Alessia Nicoli

Dirigente Biologo  
Laboratorio PMA

Centro Sterilità P. Bertocchi  
SOC Ostetricia e Ginecologia  
AO Arcispedale S. Maria Nuova, IRCCS  
Reggio Emilia

 **SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA-ROMAGNA**  
Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia

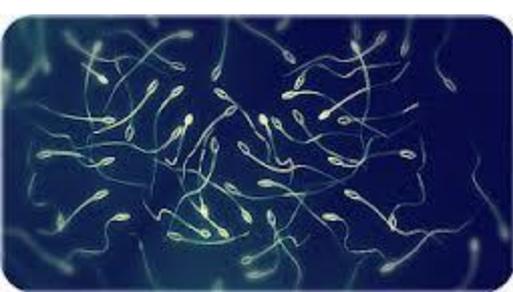
Istituto in tecnologie avanzate e modelli assistenziali in oncologia  
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

**Arcispedale S. Maria Nuova**  
Dipartimento Ostetrico Ginecologico e Pediatrico  
Ostetricia e Ginecologia

Prof. Giovanni Battista La Sala - Direttore

## L'esame del liquido seminale o **spermiogramma**:

1. fa parte del percorso diagnostico dell'uomo infertile,
2. rappresenta l'analisi di primo livello per la valutazione del potenziale di fertilità maschile,
3. aiuta ad identificare e definire la severità del fattore maschile di infertilità,
4. dovrebbe guidare il clinico alla scelta di ulteriori indagini utili per chiarire la diagnosi.



Metodologia dell'esecuzione dei test sul campione



Interpretazione degli esiti dei test eseguiti



**Il Manuale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità 2010 (OMS; *World Health Organization, WHO*)** raccomanda che lo spermogramma debba essere effettuato da un laboratorio di seminologia affidabile e sottoposto ad un controllo della qualità interno ed esterno.

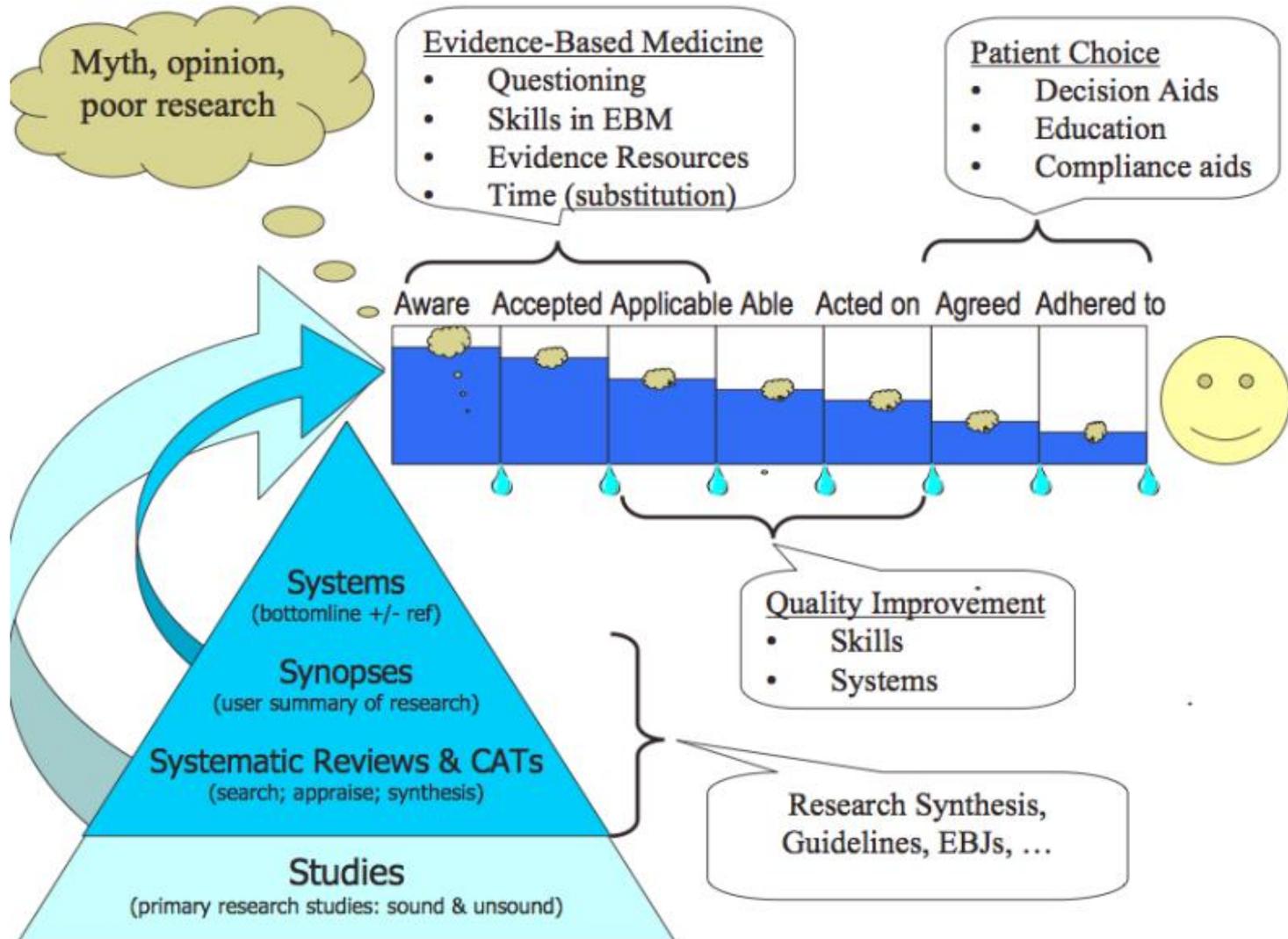


Nonostante queste premesse, l'esatta interpretazione dello spermioγραμμα spesso rimane difficoltosa rispetto ad altri test di laboratorio.

La **standardizzazione dei valori di riferimento** è cambiata negli anni parallelamente alle diverse edizioni dei manuali dell'OMS (1987, 1992, 1999 e 2010).



# Cosa caratterizza l'edizione del Manuale OMS 2010?



# Cosa caratterizza l'edizione del Manuale OMS 2010?

## Valori di riferimento "evidence-based"

### Edizioni precedenti

Popolazione non omogenea

Popolazione con caratteristiche cliniche mal definite

Popolazione che includevano anche maschi senza recente paternità

Test eseguiti presso diversi laboratori che utilizzavano diverse metodologie analitiche

### Edizione 2010

Popolazione di 1935 maschi

Popolazione arruolata in 5 studi in 8 nazioni di 3 diversi continenti

Popolazione che include solo maschi le cui *partners* avevano concepito entro 12 mesi dalla cessazione della contraccezione

Test eseguiti presso diversi laboratori che rispettavano gli standard della chimica clinica

**Table 1 - Cut-off reference values for semen characteristics as published in consecutive WHO manuals.**

Semen characteristics	WHO 1980	WHO 1987	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010 <sup>1</sup>
Volume (mL)	ND	≥ 2	≥ 2	≥ 2	1.5
Sperm count (10 <sup>6</sup> /mL)	20-200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	15
Total sperm count (10 <sup>6</sup> )	ND	≥ 40	≥ 40	≥ 40	39
Total motility (% motile)	≥ 60	≥ 50	≥ 50	≥ 50	40
Progressive motility <sup>2</sup>	≥ 2 <sup>3</sup>	≥ 25%	≥ 25% (grade a)	≥ 25% (grade a)	32% (a + b)
Vitality (% alive)	ND	≥ 50	≥ 75	≥ 75	58
Morphology (% normal forms)	80.5	≥ 50	≥ 30 <sup>4</sup>	(14) <sup>5</sup>	4 <sup>6</sup>
Leukocyte count (10 <sup>6</sup> /mL)	< 4.7	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0

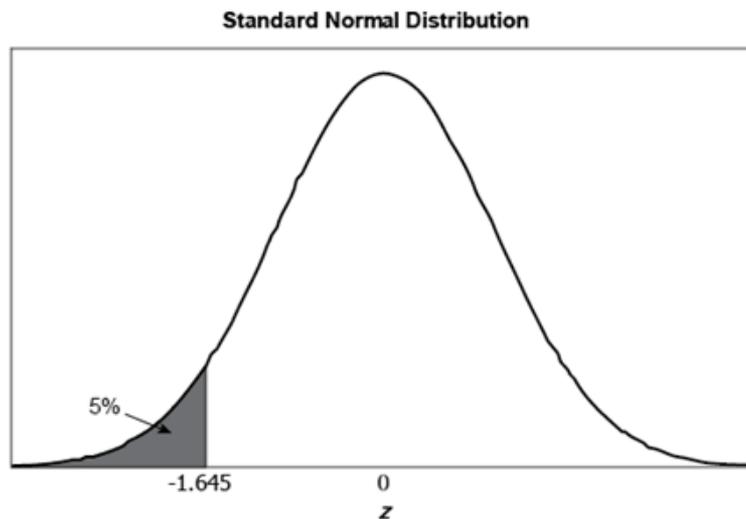
<sup>1</sup>Lower reference limits generated from the lower fifth centile value; <sup>2</sup>Grade a = rapid progressive motility (> 25µm/s); grade b = slow/sluggish progressive motility (5-25µm/s); Normal = 50% motility (grades a +b) or 25% progressive motility (grade a) within 60 min of ejaculation; <sup>3</sup>Forward progression (scale 0-3); <sup>4</sup>Arbitrary value; <sup>5</sup>Value not defined but strict criterion is suggested; <sup>6</sup>Strict (Tygerberg) criterion; ND = not defined.

Reprinted with permission from Excerpta Medica Inc.: Esteves SC et al. Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men, *Urology* 2012, volume 79, issue 1, page 17.

Per ogni parametro seminale (n°, motilità e morfologia) nel Manuale OMS

2010 è stata:

1. riportata la distribuzione dei valori
2. identificato il 5° percentile quale **limite di riferimento inferiore**
3. definito il range entro cui cade il 95% dei valori.



# Manuale dell'OMS 2010: VALORI DI RIFERIMENTO

Distribuzione dei valori per i parametri seminali relativi a uomini le cui partner hanno concepito spontaneamente entro 12 mesi (*time-to-pregnancy*)

dalla sospensione dell'uso di metodi contraccettivi.

Parametri	N	Percentili								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Volume (ml)	1941	1.2	1.5	2.0	2.7	3.7	4.8	6.0	6.8	7.6
n° spermatozoi/ejaculato	1859	23	39	69	142	255	422	647	802	928
n° spermatozoi/ml (mil/ml)	1859	9	15	22	41	73	116	169	213	259
Motilità totale (%)	1781	34	40	45	53	61	69	75	78	81
Motilità progressiva (%)	1780	28	32	39	47	55	62	69	72	75
Motilità non progressiva (%)	1778	1	1	2	3	5	9	15	18	22
Spermatozoi immobili (%)	1863	19	22	25	31	39	46	54	59	65
Vitalità (spermatozoi vitali,%)	468	53	58	64	72	79	84	88	91	92
Morfologia (forme normali,%)	1851	3	4	5.5	9	15	24.5	36	44	48

## Manuale dell'OMS 2010: VALORI DI RIFERIMENTO

<b>Parametri</b>	<b>Valori di riferimento minimi*</b>
Volume (ml)	<b>1.5 (1.4-1.7)</b>
n° spermatozoi/ejaculato	<b>39 (33-46)</b>
n° spermatozoi/ml (mil/ml)	<b>15 (12-16)</b>
Motilità totale (%)	<b>40 (38-2)</b>
Motilità progressiva (%)	<b>32 (31-34)</b>
Vitalità (spermatozoi vitali,%)	<b>58 (55-63)</b>
Morfologia (forme normali,%)	<b>4 (3.0-4.0)</b>
pH	<b>≥7.2</b>
Leucociti perossidasi-positivi (mil/ml)	<b>&lt;1.0</b>
MAR test (% spermatozoi mobili con particelle adese)	<b>&lt;50</b>
Immunobead test (% spermatozoi mobili con sferule adese)	<b>&lt;50</b>

\*: 5° percentile e intervallo di confidenza del 95%

La scelta del 5° percentile quale cut off di riferimento deriva dalla **necessità di rispettare gli standard della statistica convenzionale** applicati alla chimica clinica.

Il 5° percentile **NON** discrimina la popolazione fertile da quella infertile, ma vuole identificare i **VALORI MINIMI** sotto quali i maschi, con maggiore probabilità, contribuiscono alla infertilità in una coppia.



# Manuale dell'OMS 2010: NOMENCLATURA

Diagnosi	Alterazione associata
<b>Aspermia</b>	Assenza di liquido seminale (assenza o eiaculazione retrograda)
<b>Astenoteratozoospermia</b>	Percentuale di spermatozoi con motilità progressiva e morfologia normale al di sotto dei valori minimi di riferimento
<b>Astenozoospermia</b>	Percentuale di spermatozoi con motilità progressiva al di sotto dei valori minimi di riferimento
<b>Azoospermia</b>	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato
<b>Criptozoospermia</b>	Spermatozoi presenti nel preparato a fresco, ma osservati nel pellet dopo centrifugazione
<b>Emospermia (ematospermia)</b>	Presenza di eritrociti nell'eiaculato
<b>Leucospermia (leucocitospermia, piospermia)</b>	Presenza di leucociti nell'eiaculato sopra il valore limite
<b>Necrozoospermia</b>	Bassa percentuale di spermatozoi vitali ed alta percentuale di spermatozoi immobili nell'eiaculato
<b>Normozoospermia</b>	Concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml) e percentuali di motilità progressiva e di spermatozoi morfologicamente normali pari o al di sopra dei valori minimi di riferimento
<b>Oligoastenozoospermia</b>	Concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml) e percentuali di spermatozoi con motilità progressiva al di sotto dei valori minimi di riferimento
<b>Oligoastenoteratozoospermia</b>	Concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml)* e percentuali di motilità progressiva e di spermatozoi morfologicamente normali al di sotto dei valori minimi di riferimento
<b>Oligozoospermia</b>	Concentrazione/eiaculato (o concentrazione/ml)* al di sotto dei valori minimi di riferimento
<b>Teratozoospermia</b>	Percentuale di spermatozoi morfologicamente normali al di sotto dei valori minimi di riferimento

# Manuale dell'OMS 2010: CONTENUTI

## **PROCEDURE STANDARD**

Ogni laboratorio dovrebbe essere in grado di effettuarle

Procedure accettate e **validate**

Componenti essenziali della valutazione del liquido seminale

## **TEST FACOLTATIVI**

Solitamente non eseguiti nelle analisi di routine

In alcune circostanze possono avere valore clinico

## **TEST DI RICERCA**

Test usati solo a fini di ricerca

Attualmente non considerati nelle analisi di routine

# Manuale dell'OMS 2010: PROCEDURE STANDARD

## VOLUME e pH

## CONCENTRAZIONE

Conta replicata di almeno 200 spermatozoi ciascuna (n° soglia di almeno 400 per ridurre l'errore di campionamento)

Valutazione con un volume noto ben definito (emocitometro)

## MOTILITA'

Conta replicata di almeno 200 spermatozoi ciascuna (n° soglia di almeno 400 per ridurre l'errore di campionamento)

Valutazione eseguita a 37°C

Categorie di movimento nemaspermico: motilità progressiva (**PR**), motilità non progressiva (**NPR**) e immobilità (**IMM**)

## MORFOLOGIA

Conta replicata di almeno 200 spermatozoi ciascuna (n° soglia di almeno 400 per ridurre l'errore di campionamento)

Porzioni dello spermatozoo valutate: **testa**, **collo/porzione intermedia**, **coda** e **residuo citoplasmatico**

# **Manuale dell'OMS 2010: PROCEDURE STANDARD**

## **VITALITA'**

Conta replicata di almeno 200 spermatozoi ciascuna (n° soglia di almeno 400 per ridurre l'errore di campionamento)

Da eseguire quando la percentuale di spermatozoi con motilità progressiva è inferiore al 40%

## **ANALISI DEGLI ANTIGENI DI SUPERFICIE DEGLI SPERMATOZOI (ASA)**

Conta replicata di almeno 200 spermatozoi (n° soglia di almeno 400 per ridurre l'errore di campionamento)

Il risultato riporta la percentuale di spermatozoi legati ad anticorpi

E' possibile avere l'indicazione della posizione predominante degli anticorpi sullo spermatozoo

## **VALUTAZIONE DEI LEUCOCITI e DELLE CELLULE GERMINALI IMMATURE NEL LIQUIDO SEMINALE**

Valutazione eseguita solitamente con colorazione con enzima perossidasi e conta in emocitometro.

Alcune note tecniche  
che potrebbero influenzare la lettura

## **FASE PRE-ANALITICA**

- ❖ NORME PER LA RACCOLTA
- ❖ NORME PER LA PROCESSAZIONE

# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

## FASE PRE-ANALITICA

### METODI DI RACCOLTA DEL CAMPIONE

Masturbazione

*Coitus interruptus* (?)

Preservativo “speciale” dedicato alla raccolta



Possibili effetti sugli esiti dei test

Non raccomandati

### CONTENITORI

Recipienti sterili di plastica non tossici, possibilmente CE

Vetro (cambia l'adsorbimento del seme sulla superficie)



# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

## FASE PRE-ANALITICA

Tempo di astinenza: 2-7 giorni \*

Consigliato dal Manuale dell'OMS

Frequenza dell'eiaculazione

Raccolta completa (o perdita parziale del campione?)

Mantenimento del campione a temperatura ambiente fino alla consegna al laboratorio (shock da raffreddamento a + 15°C)

Intervallo di tempo intercorso tra la raccolta e l'inizio dell'esame

\* Levitas et al. 2005: **1 giorno solo** per i pazienti infertili?

# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

## FASE PRE-ANALITICA

### COMUNICAZIONE AL PAZIENTE RELATIVA:

- modalita' di raccolta
- luogo di raccolta e/o accettazione del campione
- tempi di consegna
- norme di corretto mantenimento del campione fino alla consegna  
*(non rovesciare, attenzione alla temperatura ambientale, quale contenitore usare...)*



# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

FASE PRE-ANALITICA

## COMUNICAZIONE AL PAZIENTE

LEGGIBILITA'  $\neq$  COMPRENSIBILITA'

dei documenti che forniamo ai pazienti (*Health literacy*)



# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

## FASE ANALITICA

- ❖ VALUTAZIONE MACROSCOPICA  
(volume, pH, caratteristiche reologiche [aspetto, fluidificazione, viscosità...])
- ❖ VALUTAZIONE MICROSCOPICA  
(componente gametica e cellulare non nemaspermica)



# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

FASE ANALITICA

## CAMERA DI CONTEGGIO PER LA VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE NEMASPERMICA

Quale?

**Camere emocitometriche** di 100  $\mu\text{m}$  di profondità  
(es. camera di Neubauer modificata)

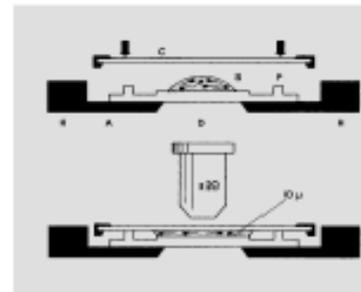
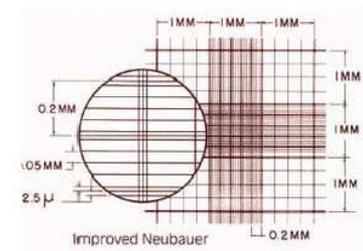
Consigliata dal Manuale dell'OMS

### Camera di Makler

volume del campione molto basso (profondità 10 $\mu\text{m}$ )

rischio di perdita del vetrino copri-camera

non idonea per le concentrazioni molto basse di spermatozoi



# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

FASE ANALITICA

## CAMERA DI CONTEGGIO PER LA VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE NEMASPERMICA

Quale?

### Camera di Bürker

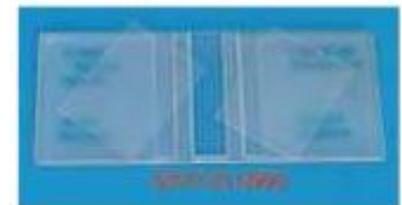
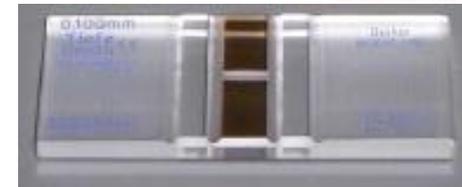
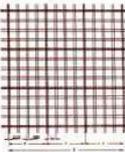
stessa precisione della camera di Neubauer modificata

### Camera di Hawksley Fertility

minore precisione della Makler

### Camera di Petroff Hausser

profonda 20  $\mu\text{m}$ , costosa, difficile da pulire



# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

FASE ANALITICA

## **RUOLO DELLA TEMPERATURA NELLA VALUTAZIONE DELLA MOTILITA' NEMASPERMICA**

Durante **il trasporto** (rischio di “cold shock”) dalla raccolta al laboratorio

Durante **la liquefazione** prima dell'inizio della valutazione

Durante **la valutazione**

es. vetrini copri e porta oggetto pre-riscaldati, piano termostato del microscopio a contrasto di fase

Un incremento della temperatura (da +22°C a + 37°C) non causa una alterazione della proporzione delle cellule mobili, ma causa un incremento della proporzione degli spermatozoi progressivi veloci e della **velocità** spermatica generale.

# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

FASE ANALITICA

## **MORFOLOGIA NEMASPERMICA** **Quale colorazione?**

Papanicolaou

Consigliata dal Manuale dell'OMS

Giemsa

Diff-Quik

# Assessment of Spermatozoa Morphology under Light Microscopy with Different Histologic Stains and Comparison of Morphometric Measurements

*Int. J. Morphol.*,  
30(4):1544-1550, 2012.

\*Emine Aksoy; \*\*Tahsin Murad Aktan; \*\*Seleuk Duman & \*\*Gokhan Cuce

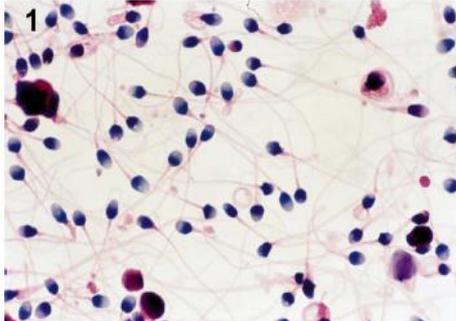


Fig. 1. Spermatozoa stained with H-E (FMBx 330).

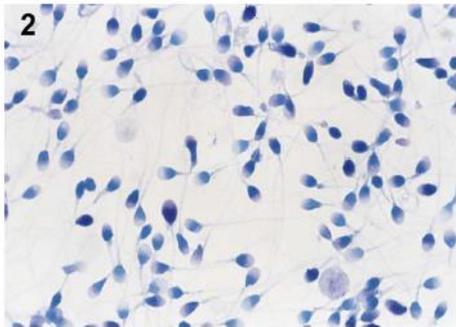


Fig. 2. Spermatozoa stained with TB.



Fig. 3. Spermatozoa stained with Weigert's ferrous Haematoxylin.



Fig. 4. Spermatozoa stained with Orange G.

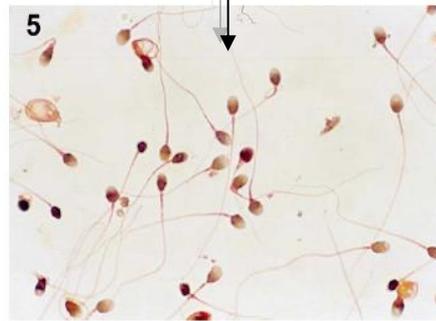


Fig. 5. Spermatozoa stained with Papanicolau.

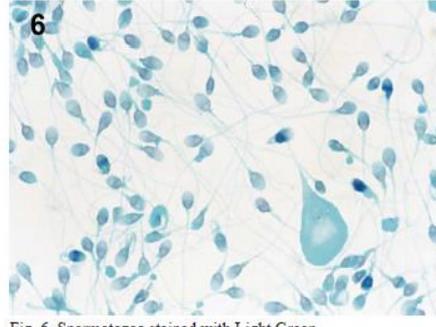


Fig. 6. Spermatozoa stained with Light Green.

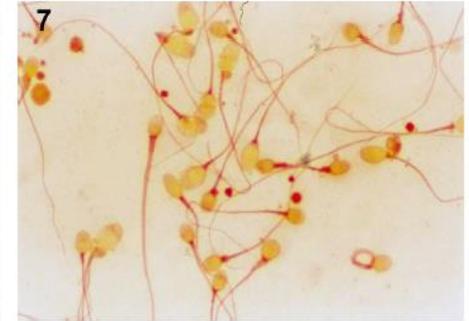


Fig. 7. Spermatozoa stained with Shorr.

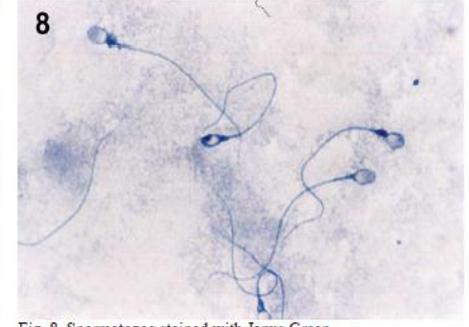


Fig. 8. Spermatozoa stained with Janus Green.

Table I. Measured values of head length and width in spermatozoa stained with HE, TB, Shorr and Papanicolau.

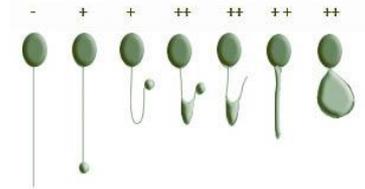
Group	Length	Width
	Mean $\pm$ SS	Mean $\pm$ SS
H-E	4.75 $\pm$ 0.15	2.6 $\pm$ 0.16
TB	4.59 $\pm$ 0.25	2.56 $\pm$ 0.04
Shorr	4.86 $\pm$ 0.15	2.63 $\pm$ 0.08
Papanicolau	4.89 $\pm$ 0.31*	2.69 $\pm$ 0.25
P	0.028	0.314

# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

FASE ANALITICA

## VITALITA' NEMASPERMICA

### Quale test?



Test di rigonfiamento iposmotico (*Hypohosmotic Swelling Test*, HOS Test)

Utilizzabile anche in associazione alla iniezione intracitoplasmatica della spermatozoo

Consigliata dal Manuale dell'OMS

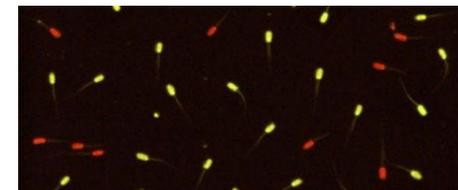
Colorazione eosina-negrosina one-step

Le preparazioni possono essere conservate per **controlli di qualità**



Colorazione con sola eosina

Test semplice e rapido, le preparazioni non possono essere conservate per controlli di qualità



# Alcune note tecniche che potrebbero influenzare la lettura

FASE ANALITICA

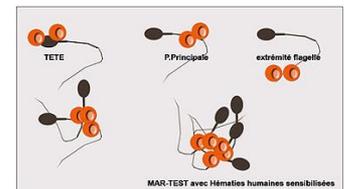
## ANTIGENI DI SUPERFICIE DEGLI SPERMATOZOI

### Quale test?

**Dirette**, che evidenziano la condizione autoimmune a livello della cellula nemespermica.

**MIXED ANTIGLOBULIN REACTION TEST (MAR TEST)**

**IMMUNOBEAD TEST (IB TEST)**



**Indirette**, che studiano la risposta immune nei fluidi biologici, quali siero, plasma seminale e muco cervicale.

**TEST DI AGGLUTINAZIONE (IB TEST INDIRETTO)**

**TECNICHE RADIOIMMUNOLOGICHE (RIA)**

**TECNICHE IMMUNOENZINATICHE (es. TEST ELISA)**

# Alcune note che potrebbero influenzare la lettura

## **FASE POST-ANALITICA**

### ❖ **REFERTAZIONE**

Data la rilevanza dell'esame seminale il referto deve essere curato nel massimo dettaglio e deve seguire procedure univoche.

#### **NOTE:**

La refertazione dell'esame seminale può prevedere

**OSSERVAZIONI :** ..... ma  
non giudizi clinici sulla fertilità del paziente.

#### **INDICI DI FERTILITÀ**

Non devono mai comparire in un referto seminale.

# Manuale dell'OMS 2010: CONTENUTI

## **PROCEDURE STANDARD**

Ogni laboratorio dovrebbe essere in grado di effettuarle

Procedure accettate

Componenti essenziali della valutazione del liquido seminale

## **TEST FACOLTATIVI**

Solitamente non eseguiti nelle analisi di routine

In alcune circostanze possono avere valore clinico

## **TEST DI RICERCA**

Test usati solo a fini di ricerca

Attualmente non considerati nelle analisi di routine

# **Manuale dell'OMS 2010: TEST FACOLTATIVI**

**INDICI DI DIFETTI MULTIPLI DEGLI SPERMATOZOI**

**COLORAZIONE IMMUNOCITOCHIMICA PER I GLOBULI BIANCHI**

**INTERAZIONE TRA SPERMATOZOI E MUCO CERVICALE**

**SAGGI BIOCHIMICI PER LA FUNZIONE DELLE ghiandole ACCESSORIE**

**ANALISI COMPUTERIZZATA DEL LIQUIDO SEMINALE (CASA)**

# Variability in the morphologic assessment of human sperm: use of the strict criteria recommended by the World Health Organization in 2010

3 operatori con esperienza > 10 anni

Valutati 5.96 spermatozoi

Yongxin Wang, M.Sc.,<sup>a</sup> Jiali Yang, B.Sc.,<sup>a</sup> Yanping Jia, B.Sc.,<sup>a</sup> Chengliang Xiong, M.D.,<sup>b</sup> Tianqing Meng, M.D.,<sup>b</sup> Huangtao Guan, M.D.,<sup>b</sup> Wei Xia, M.D.,<sup>b</sup> Mingyue Ding, Ph.D.,<sup>a,c</sup> and Ming Yuchi, Ph.D.<sup>a</sup>

Fertility and Sterility® Vol. 101, No. 4, April 2014 |

## % Spermatozoi normali

**TZI**, indice di teratozoospermia (n° medio di anomalie per spermatozoo anormale, 4 difetti al massimo [testa, segmento intermedio, segmento principale e residuo citoplasmatico])

**MAI**, indice di anomalie multiple per spermatozoo (n° medio di anomalie per spermatozoo anormale)

**SDI**, indice di “deformità” (n° di difetti diviso n° totale di spermatozoi [normali+anormali])

### Parameter

PNS  
RDH  
RDM  
RDT  
ERC  
TZI  
MAI  
SDI  
Tapered  
Pyriform  
Round  
Amorphous  
Vacuolated  
Small acrosomal  
Bent neck  
Asymmetrical  
Thick insertion  
Thin  
Short  
Bent  
Coiled  
Dubious for head  
Dubious for neck  
Dubious for tail

[1] Using the 5th manual from the WHO, evaluators can achieve relatively accurate results for evaluating normal or abnormal sperm, as well for specific parts of sperm. [2] Compared with the mid-piece, tail, and cytoplasm, the head is the most difficult part of the sperm for evaluators to assess. Stricter definitions for various head defects are more urgently required than stricter definitions for other parts. [3] Because of the low consistency of some specific defects, such as a tapered or amorphous head, a small acrosomal area head, or a thin mid-piece, stricter definitions for these specific defects are also needed.

# Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests

Christina Wang, M.D.<sup>a,b</sup> and Ronald S. Swerdloff, M.D.<sup>a</sup>

Fertility and Sterility® Vol. 102, No. 6, December 2014 |

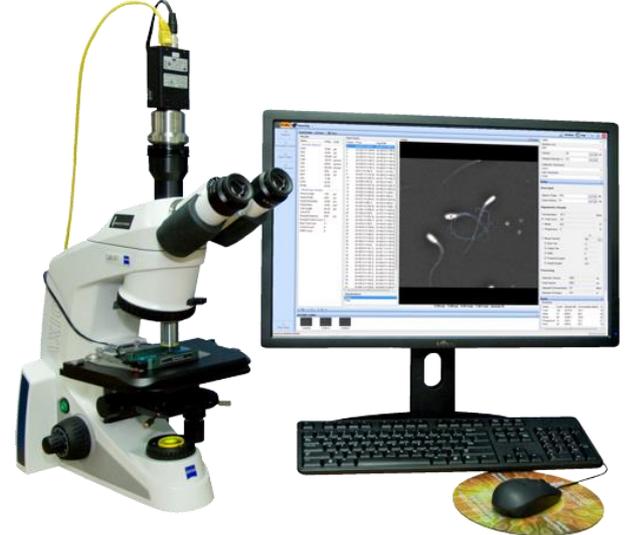
There are a number of biochemical tests to measure functions of the accessory gland including zinc and acid phosphatase (prostate), fructose (seminal vesicle), and carnitine and alpha-glucosidase (epididymis) (1). These biochemical tests are not routinely performed and are of rare clinical usefulness as biomarkers of male factor infertility.

## TEST BIOCHIMICI

“....non svolti di routine in quanto DI RARA UTILITA' IN AMBITO CLINICO  
come biomarkers dell'infertilità maschile...”



# CASA



## RISULTATI

**Affidabili**

**Ripetibili**

## SE

sono eseguiti controlli adeguati rispetto alla raccolta del campione e nell'uso dello strumento

CONTROLLI DI QUALITA' SEVERI DELLE PROCEDURE

MANUTENZIONE ADEGUATA DELLO STRUMENTO (*high standard*)

SOLO PER MONITORARE LA CONCENTRAZIONE E LA CONCENTRAZIONE DEGLI SPERMATOZOI CON MOTILITA' PROGRESSIVA

VCL: velocità curvilinea,  $\mu\text{m}/\text{sec}$

VSL: velocità in linea retta,  $\mu\text{m}/\text{sec}$

VAP: velocità media della traiettoria,  $\mu\text{m}/\text{sec}$

ALH: ampiezza dello spostamento laterale della testa,  $\mu$

LIN: linearità, VSL/VCL

WOB: oscillazione, VAP/VCL

STR, rettilineità, VSL/VAP

BCF: frequenza dei battiti, Hz

MAD: spostamento angolare medio, gradi

•Difficoltà da parte del CASA nel distinguere spermatozoi rispetto a detriti cellulari

# Manuale dell'OMS 2010: CONTENUTI

## **PROCEDURE STANDARD**

Ogni laboratorio dovrebbe essere in grado di effettuarle

Procedure accettate

Componenti essenziali della valutazione del liquido seminale

## **TEST FACOLTATIVI**

Solitamente non eseguiti nelle analisi di routine

In alcune circostanze possono avere valore clinico

## **TEST DI RICERCA**

Test usati solo a fini di ricerca

Attualmente non considerati nelle analisi di routine

# Manuale dell'OMS 2010: TEST DI RICERCA

**SPECIE REATTIVE ALL'OSSIGENO**

**TEST DI INTERAZIONE FRA SPERMATOZOO E OVOCITA**

**TEST DI LEGAME ALLA ZONA PELLUCIDA**

**VALUTAZIONE DELLA REAZIONE ACROSOMIALE**

**HAMSTER TEST**



**TEST DI INTEGRITA' E  
FUNZIONALITA'  
DELL'ACROSOMA**

**VALUTAZIONE DELLA CROMATINA NEMASPERMICA**



**TEST DI INTEGRITA'  
DELLA CROMATINA**

# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA

- Cosa analizzano i differenti metodi?
- Qual è la natura del danno e cosa comporta?
- **Qual è l'utilità clinica?**

# I TEST DIAGNOSTICI E L'ANALISI DELLA CURVA ROC

## 5 indici che esprimono il potere diagnostico di un test:

-la **sensibilità**: la proporzione di pazienti con test positivo tra tutti quelli che hanno la malattia  $[a/(a+c)]$ , cioè la proporzione di veri positivi;

-la **specificità**: la proporzione di pazienti con test negativo tra tutti quelli che sono sani  $[d/(b+d)]$ , cioè la proporzione di veri negativi;

-il **potere predittivo positivo (PPV)**: la proporzione di pazienti malati tra tutti quelli che sono positivi al test  $[a/(a+b)]$ ;

-il **potere predittivo negativo (NPV)**: la proporzione di pazienti sani tra tutti quelli che sono negativi al test  $[d/(c+d)]$ ;

- l'**accuratezza**: la proporzione di pazienti correttamente classificati  $[(a+d)/N]$ .

**TABELLA I - TABELLA 2 X 2 TRA I RISULTATI DI UN IPOTETICO TEST DIAGNOSTICO (POSITIVO/NEGATIVO) E LA PRESENZA/ASSENZA DI UNA SPECIFICA MALATTIA**

Risultato del test	Malattia		
	Presenza	Assenza	
Positivo	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>
Negativo	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c+d</i>
Totale	<i>a+c</i>	<i>b+d</i>	<i>N</i>

## I TEST DIAGNOSTICI E L'ANALISI DELLA CURVA ROC

La curva ROC è una tecnica statistica che **misura l'accuratezza di un test diagnostico** lungo tutto il range dei valori possibili.

La curva ROC permette anche di identificare il valore soglia ottimale (il cosiddetto best cut-off), cioè **il valore del test che massimizza la differenza tra i veri positivi e i falsi positivi.**

Per ottenere validi risultati attraverso l'uso delle curve ROC è indispensabile che la presenza/assenza di una specifica malattia sia accertata tramite un golden standard.

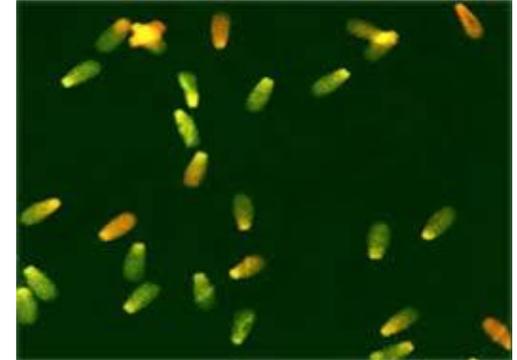
**L'area sotto la curva ROC è una misura del potere discriminante del test.**

# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA

Tecniche:

- Sperm chromatin structure assay (SCSA)
- Blu di fluidina
- Anilina blu
- Arancio di acridina
- Sperm chromatin dispersion test (SCD or Halosperm)
- TdT-mediated-dUTP nick end labeling assay (TUNEL)
- Single cell gel electrophoresis assay (COMET)
- In situ nick traslation (ISNT)
- DNA break detection-fluorescent in situ hybridization (DBD-FISH)
- Cromomicina A3 (CMA)

# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: SCSA



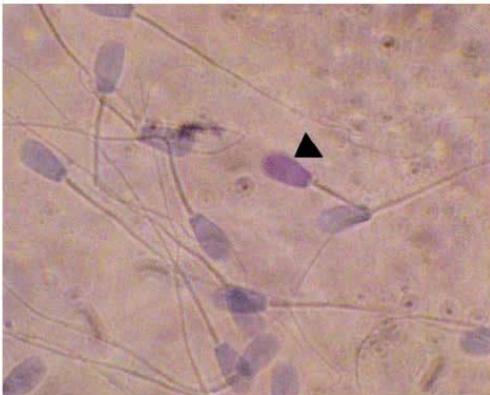
- Valutazione della suscettibilità del DNA alla denaturazione
- Citofluorimetria
- Elevata sensibilità e specificità, valutazione di numerosi spermatozoi al citofluorimetro
- Molto costoso, necessità di operatori esperti

**DNA Fragmentation Index (%DFI; % sperm cells containing measurable DNA damage)**

- a.  $\leq 15\%$  DFI = Excellent to Good Sperm DNA integrity
- b.  $> 15\%$  to  $< 25\%$  DFI = Good to Fair Sperm DNA integrity
- c.  $\geq 25\%$  DFI = Fair to Poor Sperm DNA integrity

# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: TOLUIDINE BLU

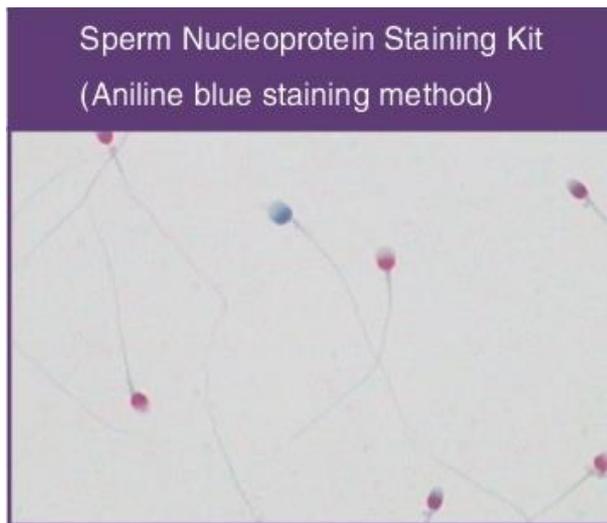
- Legame alla cromatina poco compatta o danneggiata
- Microscopia ottica in campo chiaro
- Risultati paragonabili a TUNEL assay e alla colorazione con arancio di acridina e anilina blu, di semplice esecuzione
- Rilevanza clinica? Soggettività nella valutazione, scarsa riproducibilità



**Figure 1.** Sperm stained with toluidine blue. The arrow head points to a dark violet sperm which is assumed as having damaged chromatin, while the light blue sperms preserve chromatin integrity.

# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: ANILINA BLU

- Valutazione dei residui di lisina negli istoni rimasti
- Microscopia ottica in campo chiaro
- Elevata sensibilità e specificità, economico, di semplice esecuzione
- Rilevanza clinica? Soggettività nella valutazione



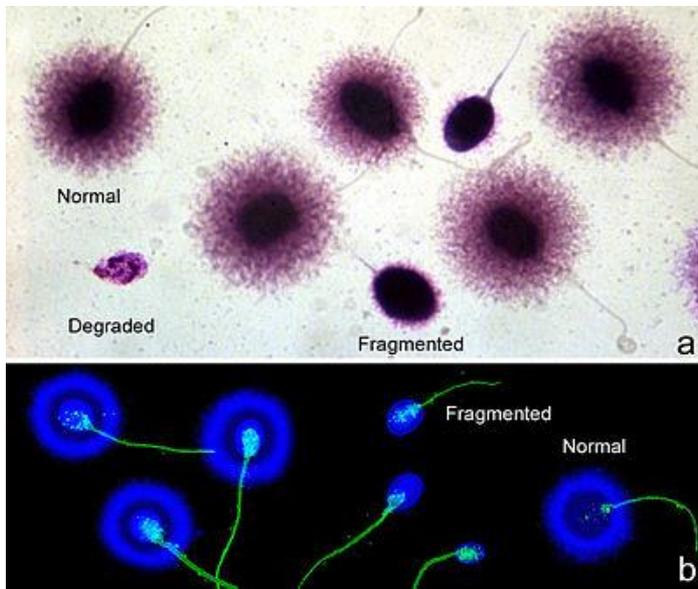
# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: ARANCIO DI ACRIDINA

- Differenzia tra rotture a singolo e doppio filamento
- Microscopio a fluorescenza
- Economico, di semplice esecuzione
- Attrezzatura speciale, soggettività nella valutazione, scarsa riproducibilità



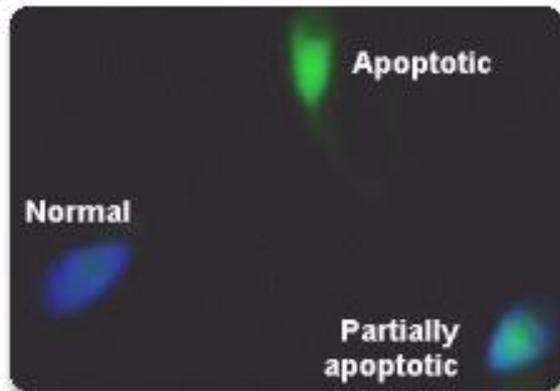
# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: SCD

- Valutazione dell'alone di decondensazione del DNA
- Microscopia ottica in campo chiaro o in fluorescenza
- Risultati paragonabili a SCSA, economico, di semplice esecuzione
- Rilevanza clinica? Variabilità inter-osservatore fino al 12%



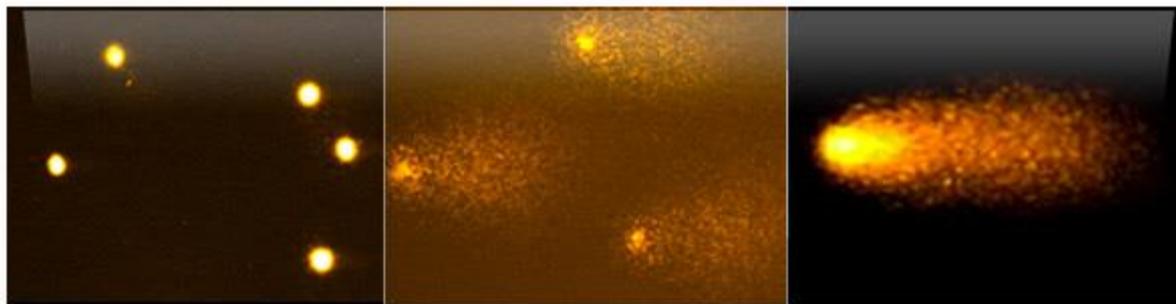
# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: TUNEL assay

- Valutazione di rotture a singolo e doppio filamento del DNA
- Microscopio a fluorescenza oppure citofluorimetro
- Elevata sensibilità e specificità, valutazione di numerosi spermatozoi al citofluorimetro
- Molto costoso, attrezzatura sofisticata



# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: COMET assay

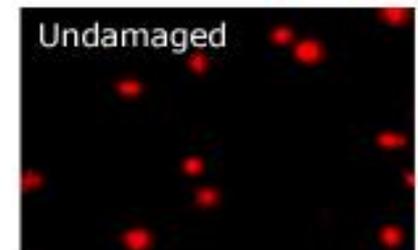
- Valutazione di rotture a singolo e doppio filamento del DNA
- Microscopio a fluorescenza
- Risultati paragonabili al TUNEL assay, economico, elevata sensibilità, quantificazione del danno al DNA nelle singole cellule, valutazione dei diversi tipi di danno al DNA
- Molto costoso, necessità di operatori esperti, tempistica di esecuzione elevata



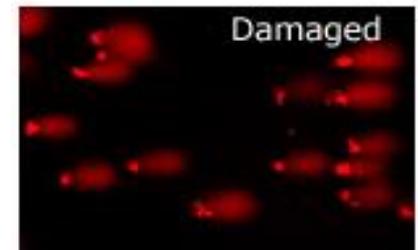
Sperm with little damage in their DNA

Sperm with damaged DNA

A single sperm with DNA damage



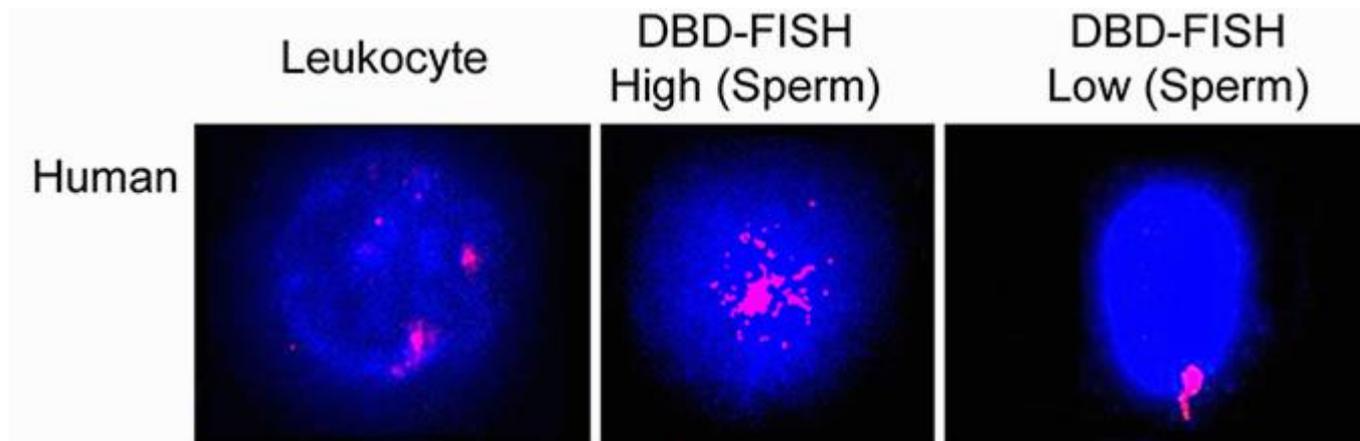
Undamaged



Damaged

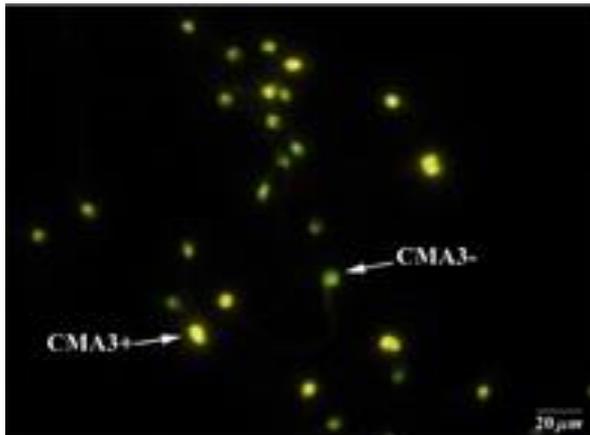
# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: DBD-FISH

- Valutazione quantitativa del DNA frammentato e difetti cromatinici strutturali
- Microscopio a fluorescenza
- Rileva difetti strutturali
- Molto costoso, attrezzatura sofisticata, tempistica di esecuzione elevata



# TEST DI INTEGRITA' DELLA CROMATINA: CMA

- Valutazione della cromatina scarsamente protamminata
- Microscopio a fluorescenza
- Clinicamente significativo?
- Attrezzatura speciale, possibili difficoltà d'interpretazione, scarsa riproducibilità



# The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine

American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama

Sperm DNA damage is more common in infertile men and may contribute to poor reproductive performance. However, current methods for assessing sperm DNA integrity do not reliably predict treatment outcomes and cannot be recommended routinely for clinical use. (Fertil Steril® 2013;99:673–7. ©2013 by American Society for Reproductive Medicine.)

Non esistono studi di livello 1.

La maggior parte degli studi sono di livello 2 o inferiore, con campioni di piccole dimensioni, reclutamento non consecutivo, popolazioni non omogenee, assenza di controllo su fattori femminili (es. età), metodologia statistica debole e uso di diversi metodi per la valutazione dell'integrità del DNA.

Level I: Evidence obtained from at least one properly designed randomized controlled trial.

Level II-1: Evidence obtained from well-designed controlled trials without randomization.

- 1 I test per la valutazione dell'integrità del DNA sono informativi rispetto alla **fertilità maschile nei concepimenti spontanei?**
- 2 I test per la valutazione dell'integrità del DNA sono informativi rispetto alla **probabilità di gravidanza con inseminazione intrauterina?**
- 3 I test per la valutazione dell'integrità del DNA sono informativi rispetto alla **probabilità di gravidanza con fertilizzazione in vitro convenzionale?**
- 4 I test per la valutazione dell'integrità del DNA sono informativi rispetto alla **probabilità di gravidanza con iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo?**
- 5 I test per la valutazione dell'integrità del DNA sono informativi rispetto alla **probabilità di aborto?**

Level C: There is insufficient evidence to support a recommendation, either for or against.

Attualmente i dati **non sono a favore una relazione consistente** tra integrità del DNA alterata ed esiti riproduttivi.

Al momento, il solo esito del test per la valutazione del DNA spermatico, **non è predittivo della probabilità di gravidanza** spontanea o con tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita.

Tuttavia, nel futuro è possibile che nuovi studi possano validare l'utilità clinica di questi test.

# Sperm functional tests

Sergio Oehninger, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> Daniel R. Franken, Ph.D.,<sup>b</sup> and Willem Ombelet, M.D., Ph.D.<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Jones Institute for Reproductive Medicine, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, Virginia; <sup>b</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, University of Free State, Bloemfontein, South Africa; <sup>c</sup> Genk Institute for Fertility Technology, ZOL Hospitals, Genk; and <sup>d</sup> Faculty of Medicine and Life Sciences, Hasselt University, Hasselt, Belgium

Several semen parameters are used to discriminate the fertile male from the subfertile male. The most widely used parameters are sperm concentration, motility, progressive motility, and sperm morphology. Semen analysis is usually applied as described in the World Health Organization manual for semen analysis. In addition to a routine semen analysis, sperm functional tests have been described for many years, which in most cases are regarded as research tools and not part of the routine semen testing in an infertility clinic. In this review we report on the value of four sperm function tests: the sperm penetration assay, the sperm–zona pellucida binding tests, the acrosome reaction, and the hyaluronan binding assay. For each test we describe the current value, the indication for performing the test, how to interpret the results, and its therapeutic implications. Our data show that sperm functional assays are highly predictive of IVF outcome results and have the potential to assist in clinical decision making, especially to avoid the current long-standing treatment with IUI and to direct the patients to intracytoplasmic sperm injection without delay when sperm functional testing fails. We believe that advances in molecular biology techniques will allow us to develop simpler sperm function assays in the near future. This will undoubtedly help clinicians in optimizing male factor infertility diagnosis and treatment. (*Fertil Steril*® 2014;102: 1528–33. ©2014 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Acrosome reaction, male infertility, sperm functional test, sperm penetration assay, sperm–zona pellucida binding tests

**Discuss:** You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertilityforum.com/oehningers-sperm-functional-tests/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.\*

\* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

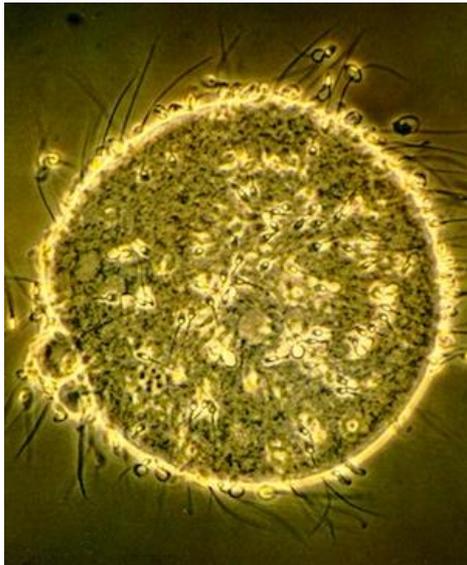
# SPERM PENETRATION ASSAY (SPA)

Sistema eterologo

Spermatozoi umani sono incubati con ovociti di criceto privati enzimaticamente della zona pellucida

Lo SPA misura la capacità dello spermatozoo di essere sottoposto a capacitazione, reazione acrosomiale, fusione e penetrazione attraverso l'oolemma, e decondensazione all'interno del citoplasma di ovociti di criceto

Lo SPA è stato utilizzato per valutare il potenziale fertilizzante dello spermatozoo

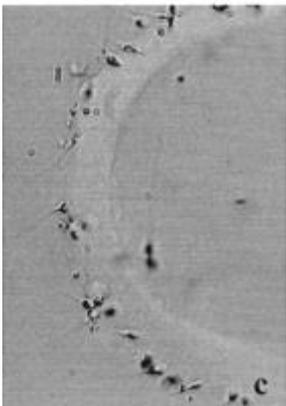
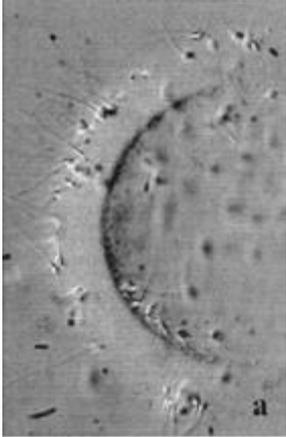


La capacità predittiva dello SPA è influenzata dai diversi tipi di versioni modificate e migliorate del test che però non sono state validate.

Fino a quando la validità e riproducibilità dello SPA non saranno confermate, questo test eterologo, *time-consuming* e relativamente costoso **non dovrebbe** essere utilizzato per valutare il potenziale fertilizzante degli spermatozoi.

# SPERM ZP BINDING TESTS

## *HemiZona Assay (HZA)*



## *Competitive intact zona sperm binding test*

Entrambi i test studiano la valutazione degli spermatozoi legati strettamente alla zona pellucida come *endpoint* primario nel confronto indipendente di un assay con controllo interno.

I test hanno mostrato un valore predittivo elevato rispetto all'outcome IVF (IUI vs ICSI).

**Area sotto la curva ROC:**

**PPV > 80% NPV >70%**

(valore basso per la percentuale di falsi negativi)

# REAZIONE ACROSOMIALE

Reazione acrosomiale: processo tale per cui il legame tra la zona pellucida e lo spermatozoo induce il rilascio di enzimi idrolitici.

La meta-analisi riporta un alto potere predittivo di questo test per la predizione della potenzialità fertilizzante.

**Area sotto la curva ROC:**

**PPV > 75% NPV >65% ,**

**80% SENSIBILITA' e 20% FALSI POSITIVI**

Oehninger 2014, Oehninger 2000



Electron micrograph (colorized) of the acrosome reaction on the surface of the egg shell (zona pellucida)

## HYALURONAN BINDING ASSAY

Hyaluronic acid binding by human spermatozoa indicates cellular maturity, viability, and spermatozoa with intact acrosomes (73, 74). Only mature, motile spermatozoa bind to hyaluronan through specific receptors. This ability to bind to hyaluronan is not present in immature spermatozoa. Furthermore, hyaluronan binding assay (HBA) represents a more convenient and reproducible laboratory test for identifying candidates for ICSI. HBA results may assist clinicians in the therapeutic approach, that it, in assigning patients for either IVF or ICSI treatment (75).

Huszar et al. (75) described a second sperm maturation marker, identified as a testis-expressed protein HspA2. The HspA2 acts as a hyaluronic acid (HA) receptor during normal fertilization (75, 79). It has been shown that HA-bound spermatozoa have increased developmental maturity, including enhanced chromatin integrity, normal morphology, and increased functional potential (80). Furthermore HA-bound sperm showed decreased aneuploidy and decreased active caspase-3 (73, 77).



Oehninger 2014, Keel 1987

# The efficiency of conventional microscopic selection is comparable to the hyaluronic acid binding method in selecting spermatozoa for male infertility patients


[Get rights and content](#)

Meng-Ting Huang, Robert Kuo-Kuang Lee, Chung-Hao Lu, Ying-Jie Chen, Sheng-Hsiang Li and Yuh-Ming Hwu

In this investigation, both microscopic sperm selection in PVP and HA-binding selection displayed significant improvements in the percentage of sperm with intact DNA compared to Pure-sperm. Moreover, the lack of statistical difference between these two sperm selection methods is demonstrated. A well-trained embryologist will have the same ability to choose sperm with intact DNA by conventional microscopic selection as with HA-binding sperm selection. However, the HA binding assay may help the personnel of the IVF laboratory who may not have enough experience and skill in micromanipulation techniques to choose DNA intact spermatozoa for ICSI

	Number of patients	Green fluorescence sperm (%)		
		Pure-sperm	PVP-sperm	HA-sperm
All semen samples	34	66.8 ± 24.0 <sup>a</sup>	82.1 ± 24.0 <sup>b</sup>	83.9 ± 21.1 <sup>c</sup>
		(5.0–93.0)	(8.0–100.0)	(10.0–100.0)
Subgroup A:	12	87.6 ± 4.4 <sup>a</sup>	97.2 ± 4.2 <sup>b</sup>	98.4 ± 3.2 <sup>c</sup>
Pure-sperm with green sperm ≥ 80%		(80.0–93.0)	(90.0–100.0)	(90.0–100.0)
Subgroup B:	9	74.6 ± 3.2 <sup>a</sup>	96.1 ± 4.6 <sup>b</sup>	95.4 ± 4.8 <sup>c</sup>
Pure-sperm with green sperm 68–79%		(70.0–79.0)	(90.0–100.0)	(90.0–100.0)
Subgroup C:	13	42.3 ± 20.8 <sup>a</sup>	58.5 ± 23.9 <sup>b</sup>	62.5 ± 19.8 <sup>c</sup>
Pure-sperm with green sperm ≤ 67%		(5.0–67.0)	(8.0–86.0)	(10.0–82.0)

AO fluorescence, which is based on the principle that damaged DNA denatures much faster than undamaged DNA when subjected to stresses, distinguishes sperm with intact double-stranded DNA (green fluorescence) or single-stranded DNA (red fluorescence).

Data are expressed as mean ± SD (range).

a,b  $p < 0.0001$ ,  $0.0003$ ,  $< 0.0001$ , and  $0.0014$ , PVP-sperm versus Pure-sperm in each group.

a,c  $p < 0.0001$ ,  $< 0.0001$ ,  $< 0.0001$ , and  $0.0008$ , HA-sperm versus Pure-sperm in each group.

b,c  $p = 0.568$ ,  $0.867$ ,  $1.0$ , and  $0.555$ , HA-sperm versus PVP-sperm in each group.

AO = acridine orange; HA = hyaluronic acid; PVP = polyvinylpyrrolidone; SD = standard deviation.

# Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests

Christina Wang, M.D.<sup>a,b</sup> and Ronald S. Swerdloff, M.D.<sup>a</sup>

Fertility and Sterility® Vol. 102, No. 6, December 2014 |

There are many sperm function tests including the sperm oocyte penetration test, hemizona assay, stimulation of acrosome reaction (AR), hyperactivated motility assessment using computer-assisted semen analysis, and in vitro capacitation tests that may assess each step that spermatozoa must undergo before fertilization occurs. These sperm function tests have been shown to be associated with fertilization in vitro but none of these in vitro tests have consistently predicted the time-to-pregnancy better than sperm concentration and morphology.

“...nessuno di questi test ha predetto in modo sistematico il *time-to pregnancy* meglio della concentrazione e morfologia nemespermiche...”

# Interpretazione degli esiti dei test eseguiti

**Qual è il ruolo dei range di riferimento del Manuale dell'OMS 2010?**

**1. Fornire una prognosi di fertilità**

**2. Stimare la probabilità di concepimento spontaneo**

**in un periodo di tempo definito**

**3. Aiutare il clinico nel decidere se quella coppia**

**può tentare ancora di concepire spontaneamente**

# Standardizzazione delle procedure per l'esame del liquido seminale: linee guida metodologiche\*

Società Italiana di Medicina di Laboratorio (SIMeL)

Di fatto lo spermioγραμμα viene considerato un fastidio ed un'analisi di scarsissimo interesse. Questo ha provocato una vera giungla con analisi eseguite senza nessun controllo, al di fuori di qualunque standard e prive di ogni utilità clinica quale indicatore diagnostico e prognostico ai fini della fertilità dell'individuo.

.....

Queste e molte altre sono le condizioni per cui uno spermioγραμμα eseguito correttamente è un'indagine fondamentale.

La situazione sopra descritta permane invariata da anni pur in presenza di standard internazionali proposti sia dal WHO che dalle Società scientifiche nazionali le quali organizzano costantemente Corsi teorici e pratici, anzi la problematica tende ad amplificarsi in conseguenza dell'importanza del problema sociale della infertilità.

# Interpretazione dello spermogramma



Il medico deve interpretare i risultati dello spermogramma per rispondere a **specifici quesiti**:

È possibile stimare la probabilità di gravidanza naturale o da tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA)?

Sono indicati ulteriori esami sul liquido seminale (es. test opzionali o di ricerca)?

Se è indicato un trattamento, qual è il trattamento indicato?

Quali conclusioni si devono trarre dallo spermogramma per il *management* della partner della coppia infertile?

# Interpretazione dello spermogramma: PROCEDURE STANDARD

## Volume seminale e pH

### **Volume seminale ridotto (<1.5 ml):**

riduzione del contributo del fluido escretato dalle vescicole seminali al plasma seminale  
ostruzione delle vie seminali se in associazione ad azoospermia o severa oligozoospermia

### **Volume seminale ridotto e pH < 7.2:**

assenza del contributo del fluido escretato dalle vescicole seminali al plasma seminale  
assenza congenita dei vasi deferenti

### **Volume seminale ridotto e concentrazione normale degli spermatozoi\*:**

errori nella raccolta del campione, es. perdita di una porzione dell'eiaculato  
ejaculazione retrograda parziale

\*: è consigliata la ripetizione dell'esame per la conferma dell'esito

# Interpretazione dello spermogramma: PROCEDURE STANDARD

## Concentrazione nemaspermica

La **conta totale degli spermatozoi nell'ejaculato** è più indicato per esprimere la conta nemaspermica in quanto fornisce informazioni sulla capacità testicolare di produrre spermatozoi.

### **Oligozoospermia (<39 mil o <15 mil/ml):**

in associazione all'analisi della storia clinica, ad un esame fisico con eventuale ecografia testicolare e Color Doppler dei vasi spermatici e ad una valutazione ormonale è possibile identificare fattori modificabili di infertilità quali **disendocrinopatie, infezioni o infiammazioni del tratto urogenitale, varicocele e stili di vita sbagliati.**

### **Oligozoospermia severa (<5 mil/ml?), criptozoospermia, azoospermia:**

in assenza di evidenza di patologia ostruttiva duttale, in associazione ad una accurata diagnostica strumentale ed ormonale, è indicata la ricerca di **anomalie del cariotipo e microdelezioni del cromosoma Y.**

# Interpretazione dello spermioγραμμα: PROCEDURE STANDARD

## Motilità e vitalità nemaspermiche

### **Astenozoospermia (40% o <32% motilità progressiva):**

alterazione che potrebbe essere associata a varicocele, infezioni/inflammazioni del tratto urogenitale, stress ossidativo, presenza di anticorpi-antispermatozoo, eccessiva esposizione al calore e/o sostanze tossiche.

### **Astenozoospermia severa o acinesia e vitalità normale:**

alterazioni che potrebbero essere associate a difetti funzionali ultrastrutturali del flagello dello spermatozoo (anche di origine genetica).

# Interpretazione dello spermogramma: PROCEDURE STANDARD

## Morfologia nemaspermica

La morfologia è il **parametro più impegnativo per l'interpretazione** in quanto è un valore che fortemente dipende dalla soggettività dell'esaminatore e dalla colorazione utilizzata.

### **Teratozoospermia (<4%):**

condizione generalmente associata ad una funzionalità testicolare alterata.

E' un parametro **FORTEMENTE** correlato con la potenzialità fertilizzante *in vivo ed in vitro* degli spermatozoi umani.

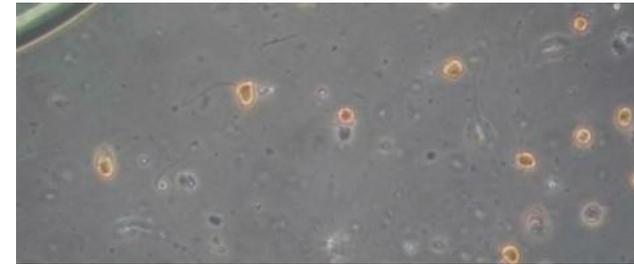
# Interpretazione dello spermioγραμμα: TEST OPZIONALI

## Leucociti seminali e cellule germinali immature

### **Leucocitospermia (>1 mil/ml):**

alterazione il cui significato clinico rimane ancora controverso, soprattutto in assenza di segni o sintomi di infezioni/flogosi del tratto urogenitale.

*Cut off non evidence –based.*



## ASA

### **ASA positivo (>50%):**

alterazione il cui significato clinico rimane ancora controverso (distruzione della barriera emato-testicolare per trauma, infezioni del tratto urogenitale o vasectomia?)



**Variability of human semen quality:**

**caution in interpreting semen analysis data**



Lo spermogramma è uno strumento fondamentale per la valutazione del potenziale di fertilità maschile.

**È fondamentale che il clinico sia consapevole dei limiti dei test e che l'interpretazione dei risultati e le decisioni cliniche devono essere assunte all'interno di un contesto che comprende tali limiti.**



## Variability of human semen quality:

caution in interpreting semen analysis data



Dal momento che molti dei parametri sono valutati tramite tecniche manuali, sono presenti alcuni margini di errore associati con ogni risultato.

**RANDOM**

**ERRORI**

**SISTEMATICI**

Casuali, dovuti alla probabilità statistica.

Possono essere rilevati facilmente ripetendo la rilevazione sullo stesso campione da parte dello stesso tecnico.

Bias, 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*.

Possono essere rilevati con difficoltà e difficilmente controllabili.

# QUALITY ASSURANCE (QA) PROGRAM

QUALITY CONTROL  
(QC)

INTERNAL QC

EXTERNAL QC

**Minimizzare gli errori sistematici**

**Ridurre al minimo la variabilità inter- e intra- operatore**

**Assicurare l'accuratezza e la precisione per l'analisi dei parametri**

# Standardizzazione delle procedure per l'esame del liquido seminale: linee guida metodologiche\*

Società Italiana di Medicina di Laboratorio (SIMeL)

## Interno

Ogni laboratorio deve realizzare un programma interno di qualità che preveda un controllo intra-operatore e/o un controllo inter-operatori.

- Intra-operatore

Almeno una volta la settimana deve essere eseguita la valutazione in cieco di uno stesso campione da parte di uno stesso seminologo.

- Inter-operatori

Se esistono più operatori il controllo deve prevedere la lettura in cieco dello stesso campione da parte dei diversi seminologi.



# Standardizzazione delle procedure per l'esame del liquido seminale: linee guida metodologiche\*

Società Italiana di Medicina di Laboratorio (SIMeL)

## Esterno

Ogni laboratorio, se possibile, dovrebbe aderire ad un programma di qualità esterno che preveda la valutazione, in cieco, di campioni seminali congelati o liofilizzati per quanto riguarda la concentrazione e la morfologia nemaspermica, e la valutazione di videocassette per quanto riguarda la cinetica nemaspermica.



**UK NEQAS**  
International Quality Expertise



## UK NEQAS Reproductive Science

- Reproductive Science
- Chemistry
- Genetics
- Haematology
- Histopathology
- Immunology
- Microbiology
- Schemes by Investigation

All Reproductive Science Schemes  
Reproductive Science

Investigations. These can be listed by using the Search page. If you cannot find a test, send us a Feedback enquiry. The following schemes are in this domain:

- Andrology: Semen Analysis - Sperm Motility (MOT)
- Andrology: Semen Analysis - Online Sperm Morphology
- Andrology: Semen Analysis - Online Sperm Motility
- Andrology: Semen Analysis - Sperm Concentration (CDN)
- Andrology: Semen Analysis - Sperm Morphology (MDR)
- Embryology: Embryo Morphology

Search  GO

- reproductive science
- Chemistry
- Genetics
- Haematology
- Histopathology
- Immunology
- Microbiology
- Schemes by Investigation

Search  GO  
 Schemes  
 Pages

## Andrology: Semen Analysis - Sperm Motility (MOT)

**Scheme Details** | Contact Details | Further Info

**Analytes or Clinical Applications Covered**  
Sperm Motility (MOT)

**Material Distributed**  
DVD

Distributions per annum	Samples per Distribution
4	4

Scheme Started	Accreditation Status
1994	Accredited to CPA Standards for EQA schemes in laboratory medicine, centre No. 092

**Available to laboratories in the following categories**

- UK Clinical
- UK Non Clinical
- Non UK

# Standardizzazione?

## The importance of semen analysis in the context of azoospermia

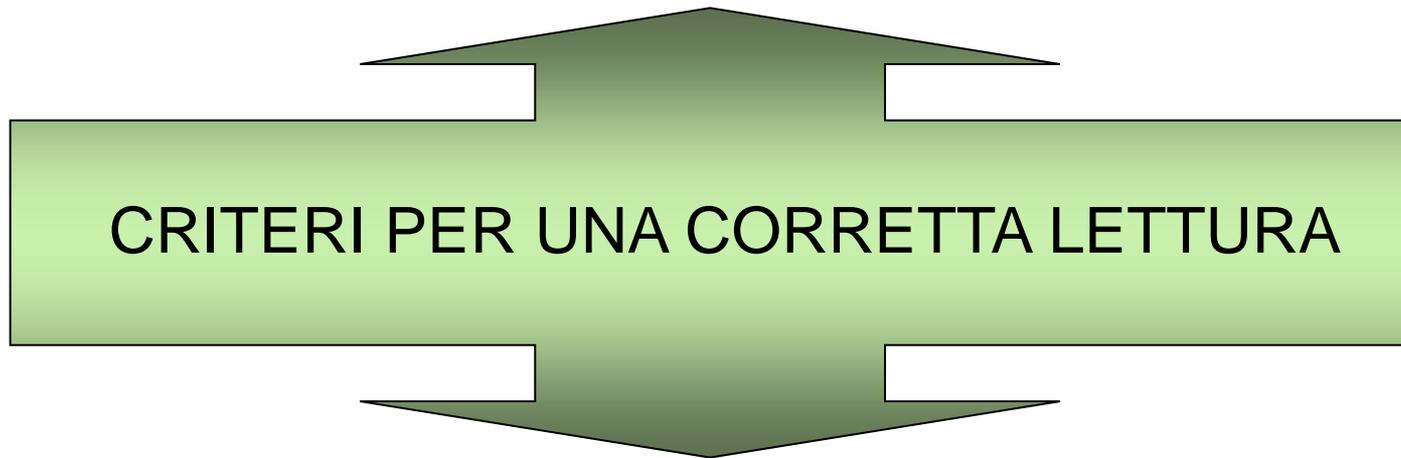
Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. Clinics. 2013;68(S1):35-38.

**Table 1** - Different centrifugation speeds have been recommended to examine azoospermic ejaculates. Some of these recommendations appeared indecisive when terms such as 'at least' and 'less than' are used (*italics* are used to highlight such terms).

Reference	Recommended centrifugation
Mortimer (1994) (23)	1000 x g for 15 minutes
the Nordic Association for Andrology (24)	<i>At least</i> 1000 x g for 15 minutes
WHO manual (1999) (25)	600 x g for 15 minutes to concentrate samples with low sperm counts (less than 2 sperm per 400x field) <i>Less than</i> 3000 x g for 15 minutes for all samples in which spermatozoa are not detected
Corea et al. (2005) (20)	<i>A minimum</i> of 1000 x g for 15 minutes was adequate for the detection of azoospermia
WHO manual (2010) (2)	3000 x g for 15 minutes for all samples in which no spermatozoa are detected

# Conclusioni

Metodologia dell'esecuzione dei test sul campione



Interpretazione degli esiti dei test eseguiti

# Conclusioni

Lo spermogramma è uno strumento utile di primo livello indicato per valutare il potenziale di fertilità del maschio.

Però, anche quando lo spermogramma è eseguito in Centri specializzati e sottoposto a controlli della qualità, può rimanere un significativo margine di incertezza sulla relazione tra profilo seminale e probabilità di concepimento.



Il valore prognostico dello spermogramma è limitato, in quanto esiste un'ampia variabilità intra-individuale dei valori ed una sostanziale sovrapposizione tra soggetti fertili ed infertili rispetto a concentrazione, motilità e morfologia nemaspermica.

# Conclusioni

È possibile stimare la probabilità di gravidanza naturale o da tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) tramite la lettura dell'esito dello spermioγραμμα?

E' possibile affermare che:

- 1) si esclude una infertilità assoluta se nel campione seminale vengono riscontrati spermatozoi mobili con una morfologia normale;
- 2) una riduzione della qualità del campione seminale è associata ad un tendenziale aumento del rischio di infertilità involontaria di coppia;
- 3) i limiti inferiori di riferimento raccomandati dall'OMS 2010 non costituiscono il cut off tra uomini fertili ed infertili.



# Conclusioni

È possibile stimare la probabilità di gravidanza naturale o da tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) tramite la lettura dell'esito dello spermioγραμμα?

La concentrazione minima di spermatozoi che riflette la condizione di subfertilità maschile NON E' NOTA.



# Conclusioni

Sono indicati ulteriori esami sul liquido seminale?

L'esito dei test di funzionalità ed integrità dello spermatozoo RARAMENTE è dirimente sotto il profilo diagnostico, ma, se interpretato nel contesto del caso, può aiutare il clinico nel *counseling*.

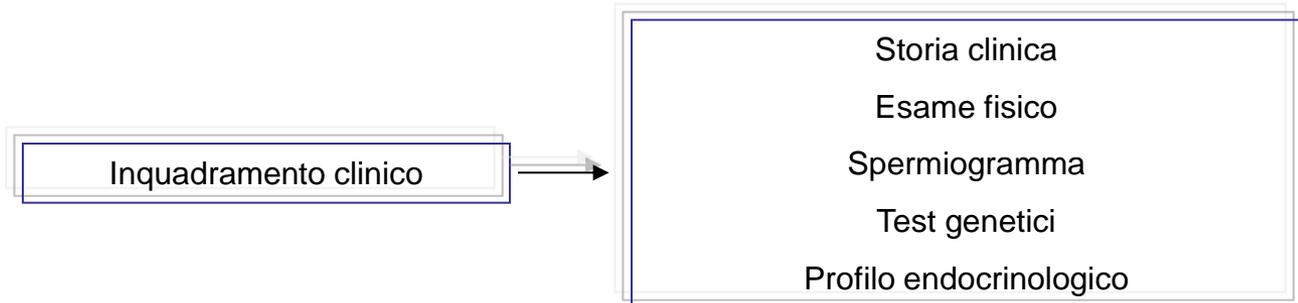


# Conclusioni

Se è indicato un trattamento, qual è il trattamento indicato?

L'andrologo è la figura clinica con le competenze necessarie per valutare il miglior trattamento per il paziente, inserendo l'esito dello spermioγραμμα in un contesto più ampio di inquadramento clinico.

Il profilo creato dai risultati dei test permette una valutazione sistematica del partner maschile.



# Conclusioni

**Quali conclusioni si devono trarre dallo spermogramma per il management della partner in una coppia infertile?**

Alla luce dell'esito dello spermogramma e dell'età della partner, è meglio ricorrere subito alle tecniche di PMA o prevedere un periodo di trattamento del paziente posticipando la PMA? !!!!

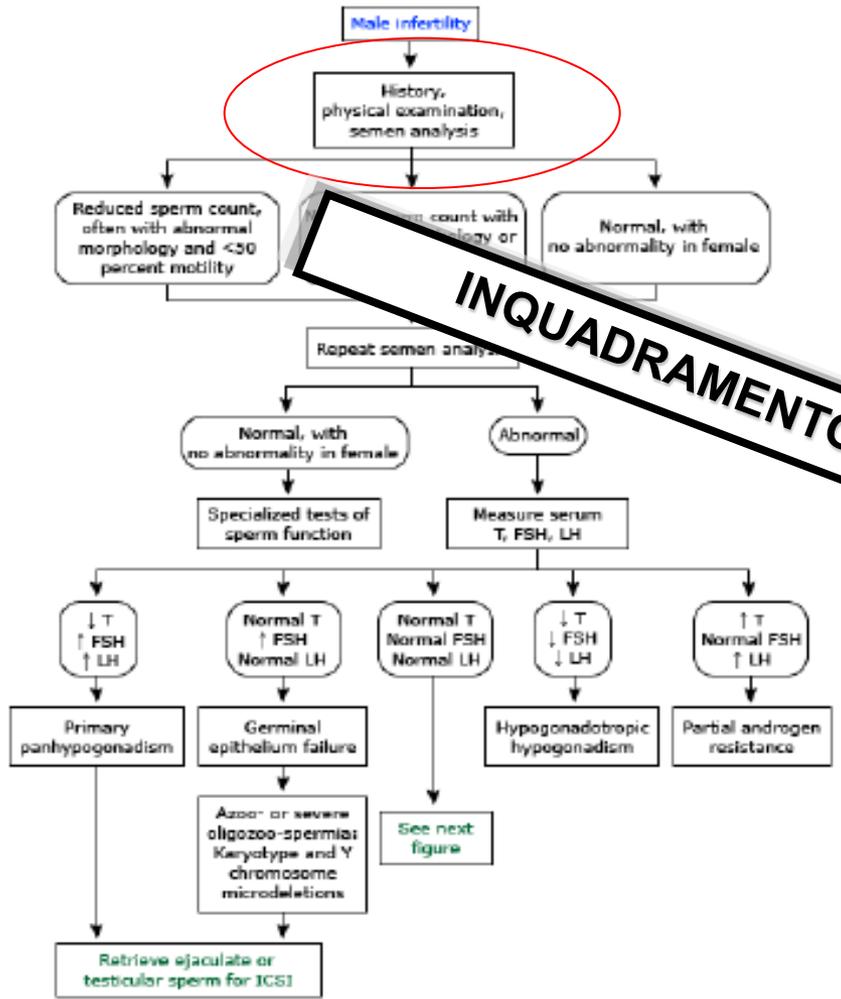
Alla luce dell'esito dello spermogramma una terapia medica o chirurgica ha probabilità di ottenere un miglioramento seminale?

Alla luce dell'esito dello spermogramma e dell'età della partner, il miglioramento sarebbe tale da garantire tassi di successo accettabili per l'ottenimento di un concepimento spontaneo o di un concepimento da PMA? Da tecniche di PMA di I livello o di II livello?

Quale rapporto costo/beneficio?



**Approach to diagnosis of male infertility**



T: testosterone; FSH: follicle-stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; ICSI: intracytoplasmic sperm injection.

**Approach to diagnosis of male infertility in patients with normal serum hormone concentrations**



T: testosterone; FSH: follicle-stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; ICSI: intracytoplasmic sperm injection.

**INQUADRAMENTO CLINICO COMPLESSIVO**

# Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests

Christina Wang, M.D.<sup>a,b</sup> and Ronald S. Swerdloff, M.D.<sup>a</sup>

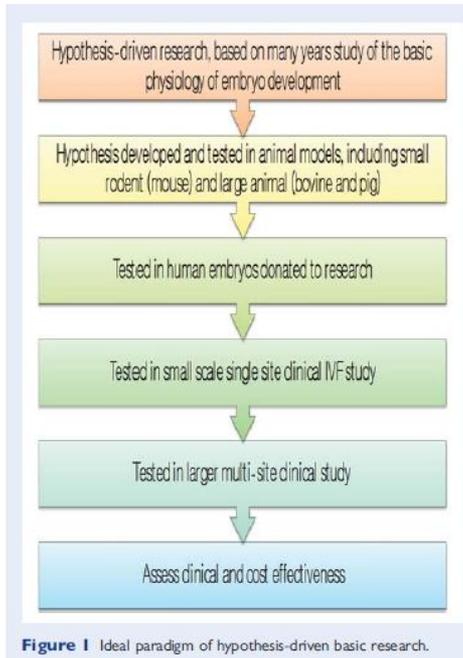
Fertility and Sterility® Vol. 102, No. 6, December 2014 |

## WHAT MAY BE THE REQUIREMENT FOR THE NEXT GENERATION OF BIOMARKERS/TESTS OF MALE FERTILITY?

For a clinician who treats infertile couples, the questions are [1] Is there a problem with the male partner? [2] How significant is the abnormality? [3] Is there a cause of this abnormality? [4] Can the abnormality be treated? [5] Should the couple be referred for ICSI or IVF? [6] Can sperm biomarkers predict the success of ICSI and IVF? and [7] Will the defect in the male factor affect the progeny?

# When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory?

Joyce Harper<sup>1,\*</sup>, M. Cristina Magli<sup>2</sup>, Kersti Lundin<sup>3</sup>,  
Christopher L.R. Barratt<sup>4</sup>, and Daniel Brison<sup>5</sup>  
*Human Reproduction, Vol.27, No.2 pp. 303–313, 2012*



Of course, we all want the field of IVF to advance and to be able to offer the best possible treatment to our patients but most of all we must perform good medicine and do the necessary studies before bringing new techniques into routine clinical practice.

Efficacia

Sicurezza

Costo-beneficio

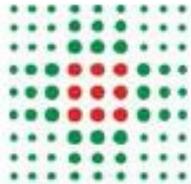
## Evidence-based medicine and the role of the National Health Service in assisted reproduction

Simon Fishel

*Reproductive BioMedicine Online* (2013) 27, 568–569

Evidence-based medicine (EBM) is the gold-standard approach to clinical practice: some would argue it is the only approach to use when adopting a new procedure, drug or technology. †

# Grazie per la cortese attenzione



**SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA-ROMAGNA**  
Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia

**Arcispedale S. Maria Nuova**

Dipartimento Ostetrico Ginecologico e Pediatrico  
Ostetricia e Ginecologia

**Istituto in tecnologie avanzate e modelli assistenziali in oncologia**  
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

**Prof. Giovanni Battista La Sala - Direttore**



**50 ANNI DI STORIE  
IN COMUNE**

