

22 DICEMBRE 2021

Nuove linee guida WHO per la Seminologia

DOTT.SSA ERICA FILIPPINI

Biologa specializzanda in
Patologia Clinica e Biochimica
Clinica presso l'Università degli
Studi di Brescia
erica.filippini93@gmail.com

Rivolgo un ringraziamento speciale alla nostra Dott.ssa Filippini, biologa di fiducia, che con grazia e competenza ha riassunto per tutti noi le principali novità apportate dall'ultimo manuale WHO sulla lettura del liquido seminale. Buono studio.

Il percorso diagnostico dell'infertilità maschile vede come elemento centrale (ma non unico) l'analisi del liquido seminale o spermioγραμμα. Questo esame fornisce utili informazioni sullo stato dell'intero tratto seminale ed indirizza verso ulteriori indagini, raccomandabili per un più completo inquadramento [1].

La corretta esecuzione di questo esame segue le indicazioni del World Health Organization contenute nel “Manuale di laboratorio per l'esame e il processamento del liquido seminale”, che tenta di rispondere alla necessità di standardizzazione delle procedure pre-analitiche ed analitiche, di crioconservazione e di controllo qualità, da parte dei laboratori clinici e di ricerca. A questo scopo, la prima edizione, pubblicata nel 1980, è stata nel tempo tradotta in diversi idiomi e rivisitata cinque volte (1987, 1992, 1999, 2010, 2021) tenendo conto delle più recenti pubblicazioni scientifiche al riguardo.

ANALISI DEL LIQUIDO SEMINALE E NOVITÀ DEL WHO2021

A differenza della maggior parte delle secrezioni corporee oggetto di indagine diagnostica, l'eiaculato è una miscela eterogenea di secrezioni che viene a formarsi solo prima dell'espulsione. È prodotto da una sospensione concentrata di spermatozoi, stoccata negli epididimi e diluita a livello uretrale con le secrezioni di prostata e vescicole seminali. Di conseguenza, le frazioni sequenziali di eiaculato non sono

ugualmente composte (il primo gettito, per esempio, è più ricco di spermatozoi e di fluido prostatico) ed occorre tenerne conto in quanto una parziale raccolta od un'inaccurata omogeneizzazione del campione, così come il non rispetto del periodo indicato di astinenza (2-7 giorni), possono alterare il risultato dell'indagine [2].

Il trattamento di base del campione inizia con l'analisi macroscopica o chimico-fisica, valutando parametri come pH, Volume, Aspetto, Viscosità, Fluidificazione, eventuale presenza di granuli gelatinosi, seguita poi dall'analisi microscopica che va a quantificare e valutare qualitativamente gli spermatozoi:

- **Conta degli spermatozoi:** il WHO suggerisce di calcolare la concentrazione di spermatozoi indicata su 1mL ma soprattutto il numero totale per eiaculato, maggiormente indicativo della capacità produttiva del testicolo [7]. Viene sottolineata l'importanza di contare un numero sufficiente di spermatozoi per ottenere un'elevata significatività statistica.
- **Motilità:** precedentemente semplificata categorizzando gli spermatozoi in progressivi, non progressivi e immobili, dato che sembra essere emersa una certa rilevanza clinica [3], l'aggiornamento reintroduce la distinzione tra progressivi lenti ($5\mu\text{m/s}$ - $25\mu\text{m/s}$) e progressivi veloci ($\geq 25\mu\text{m/s}$) come già proposto nell'edizione del 1999.
- **Morfologia:** il manuale WHO2021 riporta un numero notevole di micrografici dettagliati di spermatozoi da seme non processato considerati normali, borderline o anormali, accompagnati dalla spiegazione che conduce uno spermatozoo ad essere classificato in tal modo, con l'obiettivo di mitigare le differenze che risultano dalla forte soggettività che caratterizza gli esami morfologici.
- **Vitalità:** non subisce modifiche la metodologia ma diminuisce il valore del 5°percentile che segna il limite per la situazione di necrozoospermia.

Successivamente si svolge sul campione un'analisi estesa, talvolta in seguito a specifica richiesta medica di alcuni parametri. Questo capitolo del manuale è stato intensamente revisionato ed ora non contiene solo procedure per la rilevazione della componente microscopica non nemaspermica come leucociti, cellule della spermatogenesi, anticorpi anti-spermatozoo, saggi biochimici per la funzione delle ghiandole accessorie, ma anche metodi per la rilevazione delle aneuploidie spermatiche e della frammentazione del DNA.

Subisce un'intensa revisione anche il capitolo relativo ai metodi di analisi avanzata, ultraspecialistici, impiegati per lo più in ambito di ricerca: il test di legame alla zona pellucida umana e il test di Hamster vengono rimossi perché ritenuti obsoleti, i test di ricerca si concentrano sulla valutazione delle specie reattive dell'ossigeno e dello stress ossidativo, dei canali ionici di membrana, della reazione acrosomiale e della cromatina nemaspermica e viene ribadito l'utilizzo in tale ambito non diagnostico del sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

Infine, vengono analizzati nuovi metodi emergenti che sfruttano il movimento degli spermatozoi ed i cambiamenti di luce per la valutazione della motilità spermatica senza l'utilizzo del microscopio.

In seguito all'analisi del liquido seminale, gli spermatozoi possono subire diversi processi di

preparazione in base alla loro destinazione di utilizzo: metodi di analisi avanzata sopra menzionati, tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (IUI, FIVET, ICSI), crioconservazione. Anche questi capitoli vedono un notevole aggiornamento nel WHO2021, così come quello dedicato al controllo qualità, semplificato per essere più comprensibile a chi non fa della statistica la sua professione, vengono forniti suggerimenti utili per un miglioramento delle prestazioni nel caso il controllo qualità desse dei risultati non conformi agli standard.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Piuttosto che dei valori di normalità, il WHO fornisce dei range che indicano come il risultato analitico di un parametro si colloca rispetto ad una popolazione di riferimento.

Per ottenere questi range, nel WHO 2010 sono stati considerati i valori del liquido seminale di circa 1900 uomini, di varia età (17-67 anni) ed etnia, considerati fertili avendo ottenuto una gravidanza entro 12 mesi di regolari rapporti non protetti. I valori così ottenuti sono stati poi suddivisi in percentili (Tab1) secondo una distribuzione Gaussiana ed è stato considerato come limite inferiore il 5°percentile [4], ossia il valore di un determinato parametro che vede solo il 5% della popolazione collocarsi al di sotto di esso.

WHO 2010	N	Centiles									
		2,5th	5th	(95% CI)	10th	25th	50th	75th	90th	95th	97,5th
Semen volume (ml)	1941	1.2	1.5	(1.4–1.7)	2	2.7	3.7	4.8	6	6.8	7.6
Sperm concentration (106 per ml)	1859	9	15	(12–16)	22	41	73	116	169	213	259
Total sperm number (10⁶ per ejaculate)	1859	23	39	(33–46)	69	142	255	422	647	802	928
Total motility (PR + NP, %)	1781	34	40	(38–42)	45	53	61	69	75	78	81
Progressive motility (PR, %)	1780	28	32	(31–34)	39	47	55	62	68	72	75
Normal forms (%)	1851	3	4	(3.0–4.0)	5.5	9	15	24.5	36	44	48
Vitality (%)	428	45	58	(55–63)	64	72	79	84	88	91	92

Tab1: Distribuzione dei valori, limiti inferiori di riferimento e il loro intervallo di confidenza al 95% per i parametri seminali di uomini fertili le cui partner hanno avuto una gravidanza in 12 mesi o meno – Cooper TG et al. 2010 [4].

Il nuovo WHO2021 rivaluta questi dati e li complementa con altri provenienti da circa 3500 uomini da 12 diverse nazioni (Tab2). È interessante notare che nonostante l'approccio ancor più rigoroso nella selezione dei dati più affidabili da includere, la distribuzione ricalchi molto bene quella ottenuta nel 2010, con poche e lievi differenze dei valori di riferimento (Tab3).

Nonostante ancora alcune aree geografiche non siano rappresentate ed il numero di soggetti, sebbene significativo, sia ancora relativamente basso (<4000), lo studio condotto [5] fornisce informazioni aggiuntive sostanziali per stabilire dei limiti di riferimento inferiori più robusti e geograficamente rappresentativi.

WHO 2021	Centiles										
	N	2,5th	5th	(95% CI)	10th	25th	50th	75th	90th	95th	97,5th
Semen volume (ml)	3586	1.0	1.4	(1.3–1.5)	1.8	2.3	3.0	4.2	5.5	6.2	6.9
Sperm concentration (10⁶ per ml)	3587	11	16	(15–18)	22	36	66	110	166	208	254
Total sperm number (10⁶ per ejaculate)	3584	29	39	(35–40)	58	108	210	363	561	701	865
Total motility (PR + NP, %)	3488	35	42	(40–43)	47	55	64	73	83	90	92
Progressive motility (PR, %)	3389	24	30	(29–31)	36	45	55	63	71	77	81
Non-progressive motility (NP, %)	3387	1	1	(1–1)	2	4	8	15	26	32	38
Immotile spermatozoa (IM, %)	2800	15	20	(19–20)	23	30	37	45	53	58	65
Vitality (%)	1337	45	54	(50–56)	60	69	78	88	95	97	98
Normal forms (%)	3335	3	4	(3.9–4.0)	5	8	14	23	32	39	45

Tab2: Distribuzione dei parametri seminali per gli uomini fertili e gli intervalli di confidenza al 95% per il 5°percentile – Campbell et al. 2010 [5].

	Centiles			
	WHO 2010		WHO 2021	
	5th	(95% CI)	5th	(95% CI)
Semen volume (ml)	1.5	(1.4–1.7)	1.4	(1.3–1.5)
Sperm concentration (10⁶ per ml)	15	(12–16)	16	(15–18)
Total sperm number (10⁶ per ejaculate)	39	(33–46)	39	(35–40)
Total motility (PR + NP, %)	40	(38–42)	42	(40–43)
Progressive motility (PR, %)	32	(31–34)	30	(29–31)
Vitality (%)	4	(3.0–4.0)	54	(50–56)
Normal forms (%)	58	(55–63)	4	(3.9–4.0)

Tab3: valori del 5° percentile, considerato come valore inferiore per i parametri seminali, confrontati tra lo studio del 2010 [4] e del 2021 [5].

L'unico parametro che sembra aver subito una modifica più consistente rispetto al 2010 è la valutazione della motilità nemaspemica che, come già accennato, richiede nuovamente la distinzione tra gli spermatozoi progressivi lenti e progressivi veloci. Queste categorie erano state eliminate nella precedente edizione considerando la difficoltà per i seminologi di valutare e quantizzare correttamente ed in modo standardizzato ad occhio la velocità di spostamento di una cellula. A tal proposito, la Società Italiana di Andrologia e Medicina della Riproduzione (SIAMS) suggerisce di prestare maggiore attenzione alla descrizione qualitativa del movimento, ai fini della valutazione della fertilità dell'individuo [6].

COME INTERPRETARE IL REFERTO DELL'ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

Il confronto del valore ottenuto con il relativo valore di riferimento di un determinato parametro indica se ci si trova di fronte ad una situazione di “normalità” o “anormalità”. Le principali anormalità che emergono dall'analisi del liquido seminale sono riportate in Tab4.

È opportuno prestare attenzione nell'interpretazione dei valori di riferimento in quanto il WHO considera solamente il limite inferiore (5°percentile) per i parametri seminali ma sono indicative anche alcune alterazioni in eccesso degli stessi; per esempio, volume seminale e pH elevati suggeriscono una disfunzione a carico della prostata e delle vescicole seminali [1].

Volume seminale	≤1,4mL	Ipospermia
	=0	Aspermi
Concentrazione nemaspermica	≤16Milioni/mL	Oligozoospermia
	Conta presunta da centrifugato	Criptozoospermia
	=0 sia nel fresco che nel centrifugato	Azoospermia
Motilità progressiva	≤30%	Astenozoospermia
	=0	Assente
Vitalità	≤54%	Necrozoospermia
Morfologia	≤4%	Teratozoospermia

Tab4: principali alterazioni seminali definite in base al limite inferiore di riferimento individuato nel 5° percentile, aggiornato al WHO 2021.

È importante sottolineare che non è possibile definire i parametri seminali di un uomo basandosi sulla valutazione di un singolo campione seminale a causa delle differenze intraindividuali nella composizione del seme nel corso del tempo. Per questo motivo è consigliabile ripetere l'analisi su due o tre campioni a distanza di qualche mese prima di fornire una diagnosi seminologica definitiva [7].

I valori di riferimento non sono indici di “normalità” ma sono indicatori dello stato riproduttivo di un uomo; parametri rientranti nell'intervallo di confidenza del 95% non garantiscono una situazione di fertilità, così come uomini con parametri seminali sotto il 5° percentile non sono necessariamente infertili [7]. Questo implica che nel referto non dovrebbero esserci indicazioni cliniche in quanto i vari parametri potrebbero avere differenti significati clinici in base alle condizioni riproduttive della partner femminile [1].

Lo spermogramma costituisce l'indagine di laboratorio di primo livello per la valutazione della presenza di patologie andrologiche da prevenire o trattare e per delineare un'idea sulla capacità riproduttiva dell'uomo [6]. Tuttavia, questo primo esame non è necessariamente lo specchio della sua potenzialità fecondante o di quella della coppia e non rappresenta l'elemento finale per la diagnosi di infertilità maschile in quanto differenti meccanismi fisiopatologici possono sfociare nella stessa alterazione [8].

È importante, quindi, che l'inquadramento del paziente maschile con ridotta fertilità non si limiti solamente allo spermogramma ma preveda ulteriori indagini come la visita andrologica, il dosaggio plasmatico degli ormoni attivi nell'asse gonadico (LH, FSH, Testosterone) e l'ecografia testicolare, il tutto interpretato nel contesto clinico della coppia infertile [6].

BIBLIOGRAFIA

- [1] *A. Ferlin, C. Foresta - Infertility: Practical Clinical Issues for Routine Investigation of the Male Partner – J. Clin. Med. 2020.*
- [2] *WHO laboratory manual for examination and processing of human semen – Sixth edition - 2021*
- [3] *Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. Hum Reprod.*
- [4] *Cooper TG et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010.*
- [5] *Campbell MJ, Lotti F, Baldi E, Schlatt S, Festin MP, Björndahl L et al. Distribution of Semen Examination Results 2020 - a follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. Andrology. 2021.*
- [6] *Tratto da SLAMS - Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità.*
- [7] *Who manual for the examination and processing of human semen – Fifth edition – 2010.*
- [8] *Ferlin, A.; Garolla, A.; Ghezzi, M.; Selice, R.; Palego, P.; Caretta, N.; Di Mambro, A.; Valente, U.; De Rocco Ponce, M.; Dipresa, S.; et al. Sperm Count and Hypogonadism as Markers of General Male Health. Eur. Urol. Focus 2019.*