

Sezione III: Procedure per la diagnostica

18. Test dinamici

Vito A. Giagulli

18.a. ACTH test per 17 α -OH-progesterone

Procedure per la diagnostica

Scopo e meccanismo d'azione	Stimolazione rapida della secrezione surrenalica di 17-OH-progesterone e androgeni (androstenedione, deidroepiandrosterone, testosterone) mediante ACTH di sintesi. Dosi farmacologiche di ACTH possono svelare una ridotta riserva funzionale o la presenza di blocchi nelle vie di sintesi steroidee con incremento degli steroidi a monte della tappa enzimatica coinvolta.
Indicazioni	Nelle bambine e adolescenti: diagnosi differenziale tra pubarca prematuro (<i>cf</i> cap 8) e iperplasia surrenalica non classica (<i>late-onset</i>) (<i>cf</i> cap 4). Nelle donne adulte con irsutismo (<i>cf</i> cap 12), acne ed alopecia con o senza disturbi dell'ovulazione: diagnosi differenziale tra sindrome dell'ovaio policistico (<i>cf</i> cap 11) e iperplasia surrenalica non classica.
Controindicazioni	Nessuna, eccetto riconosciuta allergia all'ACTH di sintesi.
Precauzioni	La prova va effettuata con paziente a riposo, preferibilmente in fase follicolare precoce nella donna che ha cicli.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Nessuna.
Procedure abbinabili	L'ACTH test può essere utilizzato come stimolo di altri steroidi surrenalici, come cortisolo e aldosterone, per evidenziare eventuale insufficienza surrenalica dei glucocorticoidi e dei mineralcorticoidi associata ad iperplasia surrenale congenita.
Esecuzione	Alle ore 8.00 di mattina, con la paziente a digiuno da 12 ore, dopo il prelievo basale, vengono iniettati in bolo im (o ev) 250 μ g di ACTH di sintesi, con successivi prelievi dopo 30 e 60 minuti dall'iniezione.
Possibili effetti collaterali	Nessuno.
Scheda infermieristica	<i>Cfr</i> cap 23a
Valutazione risultati	Nel soggetto normale adolescenziale e nella donna adulta mestrata (3°-5° giorno del ciclo) i livelli sierici basali di 17-OH-progesterone sono < 2 ng/mL, mentre quelli stimolati non superano 3.5 ng/mL.
Interpretazione	Livelli circolanti basali di 17-OH-progesterone > 2 ng/mL impongono l'esecuzione del test. Livelli plasmatici di 17-OH-progesterone a 60 minuti dallo stimolo: <ul style="list-style-type: none"> > 9 ng/mL pongono diagnosi di iperplasia surrenalica non classica (<i>late-onset 21-hydroxylase deficiency</i>); compresi tra 3.5 e 9 ng/mL definiscono la forma eterozigote del difetto di 21-idrossilasi.
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	L'attendibilità e la riproducibilità dipendono dalla standardizzazione del metodo per la determinazione del 17-OH-progesterone (<i>cf</i> cap 24.c).
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Tenendo conto che la prevalenza dell'iperplasia congenita non classica è dell'1-3% delle pazienti con iperandrogenismo e anovulatorietà, il test è da considerare fondamentale perché in grado di differenziare in modo facile e a basso costo le forme organiche di iperandrogenismo da quelle funzionali maggiori (sindrome dell'ovaio policistico).
Bibliografia	<ul style="list-style-type: none"> New MI, Newfield RS. Congenital adrenal hyperplasia. <i>Curr Ther Endocrinol Metab</i> 1997, 6: 179-87.

18.b. Test con GnRH o agonista (Buserelin)

Scopo e meccanismo d'azione	<p>Il GnRH ipotalamico è il fisiologico regolatore della secrezione di gonadotropine.</p> <p>Studio funzionale della risposta ipofisaria di LH e di FSH allo stimolo acuto di GnRH sintetico.</p> <p>Nello stimolo prolungato verifica della capacità sintetica ipofisaria di LH e di FSH e della risposta degli organi bersaglio (ovaio e/o testicolo).</p>
Indicazioni	<ul style="list-style-type: none"> • In entrambi i sessi: pubertà precoce (<i>cf</i> cap 8). • Nella donna: amenorrea (con MAP test, <i>cf</i> cap 18c, negativo) e grave oligomenorrea (<i>cf</i> cap 10). • Nel maschio: diagnosi differenziale tra lesioni ipotalamiche e ipofisarie e tra ipogonadismo primario e secondario (<i>cf</i> cap 16).
Controindicazioni	Nessuna, eccetto documentata allergia al farmaco da parte del paziente.
Precauzioni	<p>Escludere gravidanza.</p> <p>Il paziente deve eseguire il test a riposo disteso su lettino.</p>
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	<p>La risposta fisiologica si stabilisce alla pubertà.</p> <p>L'incremento dell'LH aumenta progressivamente in entrambi i sessi dallo stadio puberale I allo stadio IV di Tanner.</p> <p>Le dosi di GnRH da somministrare per via ev possono dipendere da peso ed età del paziente (pubertà, invecchiamento nel maschio), in quanto varia la sensibilità ipofisaria al GnRH.</p> <p>Nella donna con cicli, va eseguito in fase follicolare precoce.</p>
Procedure abbinabili	<p>La somministrazione di GnRH non induce cambiamento dei livelli sierici di altre tropine ipofisarie, pertanto, in caso di sospetto panipopituitarismo può essere abbinato alla contemporanea somministrazione di altri <i>releasing-hormones</i>, ma l'abbinamento è da evitare nei casi di macroadenoma ipofisario per la possibile induzione di apoplessia.</p>
Esecuzione	<p>Esistono 3 possibilità (da utilizzare in relazione all'esperienza del centro e alla disponibilità dei farmaci):</p> <ul style="list-style-type: none"> • somministrazione acuta a digiuno tra le ore 8.00 e 9.00 del mattino di GnRH, alle dosi di 50-100 µg ev nell'adulto e 100 µg/m² di superficie corporea nel bambino, con prelievi per i dosaggi plasmatici di LH e FSH ai tempi -15, 0, +15, +30, +60, +90, +120 (eventuale +180) minuti dopo l'iniezione; • somministrazione per infusione costante di 200 µg di GnRH (in soluzione fisiologica 250 mL, alla velocità di 83.3 mL/h, perché termini in 180 minuti) con prelievi per i dosaggi plasmatici di LH e FSH ai tempi -15, 0, +60, +120, +180 minuti dall'inizio dell'infusione; • iniezione sc di 1 fl da 0.1 mg di Buserelin, con prelievi per i dosaggi plasmatici ai tempi 0, +30, +60, +120 minuti, +24 ore.
Possibili effetti collaterali	Cefalea (rara), vampate di calore (rarissimo).
Scheda infermieristica	<i>Cfr</i> cap 23f

<p>Valutazione risultati</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nel soggetto normale prepubere il rapporto LH/FSH basale è < 0.7 nelle femmine e < 1 nei maschi (rapporto > 0.7 nelle femmine e > 1 nei maschi è indicativo di attivazione puberale); dopo il test incremento dei livelli di FSH, con scarsa o ritardata risposta di LH. • Dopo la pubertà nel soggetto normale (maschio e femmina) si ha risposta prevalente di LH rispetto ad FSH: <ul style="list-style-type: none"> o con GnRH aumento di LH (a 15-30 minuti) di almeno 5-6 volte il valore basale; aumento di FSH (a 30-60 minuti) di 1-2 volte il valore basale; o con analogo (a 120 minuti) LH aumenta di 8-10 volte rispetto al basale ed FSH di 4 volte, con un rapporto LH/FSH che si mantiene intorno a 2.5; a 24 ore LH aumenta di 5 volte rispetto al basale, FSH di 3 volte, estradiolo di circa 4 volte e testosterone di circa 1.5 volte.
<p>Interpretazione</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nella pubertà precoce la risposta di LH al test distingue la forma vera da quella gonadotropino-indipendente (in cui non si ottiene risposta), mentre la risposta di FSH non distingue le 2 categorie. • Nell'ipogonadismo primario (maschio e femmina): incremento significativo di già elevati livelli basali di LH (> 50 UI/L) e FSH. • Nell'ipogonadismo secondario maschile (s. di Kallman) e nella premenopausa: lieve incremento dei livelli di FSH con assente o scarsissima risposta di LH. • Nei tumori ipofisari o nella s. di Sheehan: scarsissima o assente risposta di LH e FSH.
<p>Attendibilità e ripetibilità dei risultati</p>	<p>I criteri di risposta possono essere dipendenti dal metodo di dosaggio delle gonadotropine.</p> <p>La normale risposta alla prova di stimolo è alterata da:</p> <ul style="list-style-type: none"> • farmaci (cortisonici, barbiturici, carbamazepina, ecc); • condizioni fisiologiche (sforzo fisico: risposta attenuata); • condizioni patologiche (insufficienza renale: risposta esagerata). <p>Questo test fallisce di attendibilità e riproducibilità, eccetto che per la diagnosi di pubertà precoce.</p>
<p>Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia</p>	<p>Non viene consigliato per l'uso routinario, tranne che per la diagnosi di pubertà precoce, perché ha un consistente costo e richiede esperienza sia nell'esecuzione che nell'interpretazione dei risultati (propri valori normali di riferimento, esclusione di patologie concomitanti, uso di farmaci, ecc.).</p>
<p>Bibliografia</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Snyder PJ, Reitano JF, Utiger RD. Serum LH and FSH response to synthetic gonadotropin-releasing hormone in normal men. J Clin Endocrinol Metab 1975, 41: 938-45. • Mortimer CH, Besser GM, Mc Neill SA, et al. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone-releasing test in patients with hypothalamic-pituitary-gonadal dysfunction. Br Med J 1973, 4: 73-7.

18.c. MAP test

Scopo e meccanismo d'azione	Nelle donne con buona impregnazione estrogenica la sospensione di un progestinico dopo somministrazione per 2-5 giorni induce un flusso simile a quello mestruale. Pertanto, questa prova valuta sia lo stato estrogenico di donne affette da amenorrea che la risposta dell'utero allo stimolo progestinico.
Indicazioni	Amenorrea (<i>cfr cap 10</i>) sia primaria che secondaria, con livelli circolanti basali di FSH normali (amenorrea tipo II OMS).
Controindicazioni	La gravidanza è la controindicazione assoluta all'esecuzione del test, per i possibili effetti tossici sull'embrione delle elevate dosi di progesterone somministrate.
Precauzioni	Escludere la gravidanza sia in caso di esecuzione del primo test, sia in caso di ripetizione della prova.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	La risposta al test può essere legata alla relazione tra la dose impiegata e il peso corporeo della paziente.
Procedure abbinabili	Nessuna.
Esecuzione	Esistono diverse possibilità di somministrazione di progesterone naturale o progestinici: <ul style="list-style-type: none"> • per os, 2-20 mg per 5 giorni; • im, 50-100 mg per 2 giorni; • per via vaginale, 100 mg per 5 giorni o 200 mg per 5 giorni.
Possibili effetti collaterali	Possibile interferenza delle alte dosi di progesterone con l'esecuzione di altri test funzionali (GnRH test, <i>cfr cap 18b</i> , test con Clomifene, <i>cfr cap 18d</i> , e persino la curva da carico di glucosio). Possibile induzione dell'ovulazione in donne amenorroiche (rara).
Scheda infermieristica	<i>Cfr cap 23h</i>
Valutazione risultati	Nel soggetto normale (livelli circolanti di estradiolo > 100 pg/mL) la somministrazione di progestinici causa un normale flusso mestruale dopo 5-10 giorni dalla sospensione, ad indicare: <ul style="list-style-type: none"> • normale attività secretoria ipotalamo-ipofisaria; • normale funzione ovarica; • presenza dell'organo effettore periferico (utero); • presenza della mucosa endometriale e della capacità di questa di rispondere al progestinico; • sufficiente impregnazione estrogenica; • assenza di anomalie anatomiche dell'utero e della vagina (se amenorrea primaria).
Interpretazione	Il mancato sanguinamento simil-mestruale entro 10 giorni può indicare un grave stato ipoestrogenico oppure una grave patologia uterina, organica (atresia o ipotrofia) o funzionale (riduzione della capacità recettoriale uterina). Nelle pazienti con MAP test negativo (in più occasioni), la diagnosi differenziale tra le cause di amenorrea da ipoestrogenismo e grave patologia organica uterina acquisita (sinechie) o congenita (ipoplasia grave o atresia) viene effettuata mediante la prova con estroprogestinici. Questa prevede la somministrazione per almeno 20 giorni di un'associazione estroprogestinica (pillola contraccettiva orale) per almeno 20 giorni, a cui deve seguire il sanguinamento entro una settimana dalla sospensione. Risulta negativa nelle gravi forme di patologia organica uterina.

<p>Attendibilità e ripetibilità dei risultati</p>	<p>Il test ha scarso valore per la prognosi a distanza: soggetti MAP-positivi possono divenire con il tempo negativi, mentre raramente i MAP-negativi diventano positivi. La negatività in almeno due occasioni, dopo aver escluso la gravidanza, indica una sicura condizione di grave ipoestrogenismo.</p>
<p>Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia</p>	<p>Nella pratica clinica è da considerare il primo test per la diagnostica delle amenorree, perchè di semplice esecuzione e poco costoso.</p>
<p>Bibliografia</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Brinsden P, et al. Reproductive Medicine: from A to Z. Reiss HE ed, Oxford University Press, 1998: 109. • Dizionario Pschyrembel di Ginecologia ed Ostetricia. Walter de Gruyter & Co, Berlin 1990: 222.

18.d. Test con clomifene

Scopo e meccanismo d'azione	Il clomifene citrato ha una blanda azione agonista estrogenica in periferia e funziona da antiestrogeno a livello ipotalamo-ipofisario. Occupando i recettori estrogenici, libera l'adenoipofisi dal <i>feed-back</i> negativo degli estrogeni, inducendo un incremento dei livelli sierici di LH e FSH.
Indicazioni	Verifica della funzione dei sistemi di <i>feed-back</i> gonade-gonadotropine (LH e FSH): <ul style="list-style-type: none"> • nella donna diagnosi differenziale di anovulatorietà (<i>cfr cap 10</i>) e valutazione della riserva ovarica prima della fecondazione assistita; • nel maschio valutazione della capacità secretoria delle gonadotropine da parte dell'ipofisi.
Controindicazioni	La gravidanza costituisce controindicazione assoluta.
Precauzioni	Prima del test escludere la gravidanza e la presenza di grosse cisti ovariche.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Nei soggetti prepuberali o peripuberali il clomifene causa una risposta paradossa, con riduzione dei livelli di LH e di FSH. Nel maschio la risposta del testosterone si riduce con l'aumentare dell'età.
Procedure abbinabili	Nessuna.
Esecuzione	<ul style="list-style-type: none"> • Nelle donne: clomifene 50-100 mg/die po a partire dal 5° giorno di un ciclo (spontaneo o indotto) x 5 giorni (ripetibile), con dosaggio plasmatico di LH e FSH nei giorni del ciclo G4 (base), G5, G6, G7, G8, G9. Nelle pazienti che si devono sottoporre a fecondazione assistita si può abbinare la valutazione del numero dei follicoli antrali e dei livelli plasmatici di inibina B. • Nell'uomo: clomifene 100 mg x 2/die po per 10 giorni, con dosaggi plasmatici di LH, FSH e testosterone nei giorni G0, G5, G10.
Possibili effetti collaterali	Vampate di calore (10%); nausea, vomito e cefalea; disturbi visivi, senso di peso addominale e cisti ovariche (rari).
Scheda infermieristica	<i>Cfr cap 23d</i>
Valutazione risultati	<ul style="list-style-type: none"> • Nella donna: il test è positivo se determina l'ovulazione con incremento dei livelli di LH (almeno del 50% rispetto a quello basale al 4° giorno) e di FSH, indicando la probabile origine ovarica dell'amenorrea; il test negativo si caratterizza per l'assenza di ovulazione e di risposta delle gonadotropine, indicando la probabile origine ipotalamo-ipofisaria dell'amenorrea. • Nell'uomo: il test è positivo se testosterone ed LH aumentano almeno del 50% rispetto ai basali.
Interpretazione	I criteri di risposta possono essere dipendenti dai metodi utilizzati per il dosaggio delle gonadotropine. A causa delle diverse sedi (ipotalamo-ipofisi-gonadi) di attacco del farmaco e della doppia attività stimolante e inibente il recettore degli estrogeni, il test non riesce a fornire un'indicazione esatta del tipo e della sede di lesione.
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Poco riproducibile.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Sebbene di facile esecuzione e di costo ridotto, lo stimolo con clomifene non costituisce un test attendibile, in particolare per la diagnostica della riserva ovarica nella donna, essendo meno attendibile dei livelli basali di FSH e della conta dei follicoli antrali. Ultimamente, nel maschio il clomifene sembra avere risultati incoraggianti per la terapia dell'oligozoospermia idiopatica (<i>cfr cap 14</i>).

<p>Bibliografia</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hendriks DJ, Broekmans FJM, Banchi LFJMM, de Jong FH, Looman CWN, De Velde ER. Repeated clomifene challenge testing in the IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. <i>Hum Reprod</i> 2005, 20: 163-9. • Ghanem H, Shaer O, El-Sagini A. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. <i>Fertil Steril</i> 2009 (in press).
----------------------------	---

18.e. Test con hCG

Scopo e meccanismo d'azione	Esplora la capacità secretoria di testosterone da parte della cellula di Leydig.
Indicazioni	Ipogonadismo (<i>cf</i> cap 16) primario (ipoplasia leydigiana, varicocele <i>cf</i> cap 7, s. di Klinefelter <i>cf</i> cap 3c, ecc). Diagnosi differenziale tra anorchia e criptorchidismo (<i>cf</i> cap 5).
Controindicazioni	<ul style="list-style-type: none"> • In tutti: documentata allergia all'ormone. • Nell'adulto: carcinoma prostatico o altra neoplasia androgeno-dipendente. • Nel bambino: pubertà precoce.
Precauzioni	Nessuna.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Dosi dipendenti da età e peso del paziente (bambino): <ul style="list-style-type: none"> • fino a 1 anno: 500 UI • da 2 a 4 anni: 1000 UI • da 5 a 12 anni: 1500 UI
Procedure abbinabili	Nessuna.
Esecuzione	Iniezione im (o ev) di β -hCG (5000 UI nell'adulto o 3 fl a di alterni nel bambino e nel pubere) con prelievi per il dosaggio di testosterone (se si vogliono valutare le tappe intermedie della sintesi steroidea leydigiana anche 17β -estradiolo e 17α -OH-progesterone) nell'adulto ai tempi 0 e ai giorni +1, +2, +3 e +5 dopo l'iniezione e nel bambino ai tempi 0 e al giorno + 2 dopo l'ultima iniezione.
Possibili effetti collaterali	Dosi ripetute di hCG possono indurre ginecomastia vera (<i>cf</i> cap 6)(sia nell'adulto che nel bambino) e virilizzazione (solo nel bambino).
Scheda infermieristica	<i>Cfr</i> cap 23h
Valutazione risultati	Nel maschio adulto normale si ha un incremento di 2-3 volte del testosterone già al 1° giorno dopo la somministrazione, con ricaduta progressiva dopo il 3° sino al 5°; il 17β -estradiolo aumenta precocemente in 1° giornata e cade in maniera progressiva già a partire dalla 2°. Nel bambino normale i livelli di testosterone si raddoppiano o triplicano.
Interpretazione	L'incremento della risposta del testosterone dipende dal metodo utilizzato e dalla sensibilità della cellula di Leydig. La risposta può ridursi se il test viene effettuato dopo stimolazione continua o con dosi ripetute di hCG.
Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Può fallire se non effettuato facendo riferimento a un proprio gruppo di controllo e ad un metodo validato per la determinazione del testosterone.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Test di facile esecuzione e di costo non eccessivo, fondamentale per la diagnosi differenziale tra anorchia e criptorchidismo.
Bibliografia	<ul style="list-style-type: none"> • De Krester DM, Burger DM, Hudson B, Keogh EJ. The HCG stimulation test in men with testicular disorders. Clin Endocrinol 1975, 4: 591-4. • Smals AG, Kloppenborg PW, Benraad TJ. The effect of short and long term human chorionic gonadotropin (HCG) administration on plasma testosterone levels in Klinefelter's syndrome. Acta Endocrinol 1974, 77: 753-64.

19. Altre procedure diagnostiche

19.a. Monitoraggio temperatura basale

Roberto Castello & Francesca Zambotti

Scopo e meccanismo d'azione	L'innalzamento della temperatura, correlato all'aumento plasmatico di progesterone e 17OHP, serve per individuare il momento preciso dell'ovulazione, dal momento che non avviene sempre a metà ciclo, ma può avvenire alcuni giorni prima o dopo. Il giorno successivo all'ovulazione la secrezione di progesterone da parte del corpo luteo causa un innalzamento di temperatura (nell'ordine di qualche decimo di grado) che resta stabile (<i>plateau</i> termico) fino all'involutione del corpo luteo. Il giorno dell'ovulazione è quindi determinato retrospettivamente dal punto più basso della curva prima dell'innalzamento termico (anche se può essere in un periodo di 5 giorni prossimo al nadir).
Indicazioni	Rilevamento del momento dell'ovulazione a scopo contraccettivo o per la sincronizzazione dei rapporti sessuali quando si cerca una gravidanza.
Controindicazioni	È inutile eseguire il rilievo della temperatura basale in donne che hanno squilibri ormonali.
Condizioni preliminari	Occorre un termometro, preferibilmente specifico per questo uso, dato che i valori di temperatura devono essere rilevati con la precisione del decimo di grado (es. 37.5°C) ed il termometro comune ha le tacche troppo ravvicinate.
Precauzioni	<ul style="list-style-type: none"> • La temperatura può essere rilevata a livello orale, vaginale o rettale, ma deve essere presa sempre allo stesso livello per tutto il ciclo. È consigliata la via vaginale o rettale, poiché la via orale può talvolta essere troppo fredda o meno precisa. • Prendere la temperatura alla stessa ora ogni mattina prima di alzarsi dal letto, poiché qualsiasi attività può influenzare la temperatura, compreso mangiare, bere, fumare o andare in bagno. • La misura è attendibile se ci sono state almeno 3 ore di sonno. • Utilizzare sempre lo stesso termometro.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Non si applica, perché ogni donna funziona da controllo di sé stessa.
Esecuzione	Si comincia dal 1° giorno del ciclo (per praticità si può cominciare dal 3°) e si misura la temperatura ogni giorno fino al ciclo successivo. Le misurazioni vengono riportate su di una tabella con le temperature sull'asse verticale e i giorni del mese sull'asse orizzontale.
Possibili effetti collaterali	No
Scheda infermieristica	No
Valutazione risultati	La temperatura è stabile bassa (36.5°C) nella prima fase del ciclo, discende per un giorno (36.3°C) per poi risalire anche oltre alla media della prima parte del ciclo (36.8°C). L'abbassamento è lieve e non sempre si osserva. La temperatura poi rimane costante fino a qualche giorno prima delle mestruazioni, in cui ridiscende.
Interpretazione	L'abbassamento ed il successivo rialzo corrispondono all'ovulazione. La mancata ridiscesa (anzi l'innalzamento) indica che è iniziata la gravidanza.

Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Fattori che influenzano la temperatura basale: <ul style="list-style-type: none"> • raffreddore, febbre, influenza; • alcool la notte precedente; • stupefacenti; • farmaci anoressizzanti; • meno di 3 ore di sonno consecutivo; • emozione emotiva o mentale.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	È un esame a costo nullo, ma i cui risultati sono molto influenzabili da diversi fattori. Dopo 2-3 cicli si può riuscire a predire quando avverrà l'ovulazione e quindi comportarsi di conseguenza.
Bibliografia	<ul style="list-style-type: none"> • http://fertilityfriend.com • http://digilander.libero.it/fertility.it



Figura 19.a.1

Esempio di grafico della temperatura basale normale

CM = Muco Cervicale; OTest = Risultato Stick dell'Ovulazione; BD = Rapporti sessuali;
CP = aspetto della Cervice; Meds = medicinali assunti.

19.b. Cariotipo

Daniela Zuccarello & Carlo Foresta
(per la scheda infermieristica cfr cap 23d)

Introduzione

Con il termine cariotipo si indica la costituzione del patrimonio cromosomico di una specie dal punto di vista morfologico, quindi il numero e la morfologia dei suoi cromosomi.

I **cromosomi**, visibili al microscopio solo per un breve periodo del ciclo cellulare, rappresentano la forma più condensata che una molecola di DNA può assumere. Questa estrema condensazione, se da un lato impedisce qualsiasi trascrizione dei geni, consente però una segregazione corretta del DNA tra le due cellule figlie, sia durante la meiosi sia durante la mitosi. Dopo ogni divisione, le molecole di DNA decondensate non sono più visibili individualmente e costituiscono nel loro insieme la cromatina del nucleo interfase.

Durante la metafase i cromosomi appaiono costituiti da due bracci, di dimensioni variabili in funzione dei cromosomi, ma tra cui è sempre possibile riconoscere un braccio corto (p) e un braccio lungo (q), separati da una zona più stretta chiamata **centromero**, composto da sequenze di DNA ripetute un grande numero di volte, senza ruolo noto di trascrizione. Nel momento della divisione cellulare ciascuno dei bracci è costituito da due **cromatidi**, attaccati l'uno all'altro a livello del centromero, che corrispondono alle due molecole identiche che risultano dalla replicazione del DNA. Ogni estremità dei cromosomi prende il nome di **telomero** (vi sono perciò due telomeri per cromosoma), costituito da DNA ripetuto, il cui numero di ripetizioni diminuisce con l'età della cellula, che ha un ruolo di stabilizzazione e protezione delle estremità cromosomiche ed esplica un ruolo fondamentale nei processi di apoptosi cellulare.

Il numero dei cromosomi per cellula è caratteristico di ciascuna specie: nell'uomo sono presenti 46 cromosomi (23 coppie): 22 coppie sono dette autosomi e la ventitreesima coppia è quella dei cosiddetti eterosomi o cromosomi sessuali: nell'ovocita il cromosoma sessuale è sempre X, mentre negli spermatozoi può essere X o Y.

In relazione al numero di cromosomi presenti nel nucleo, le cellule umane sono definite:

- **diploidi**, quando presentano 2 copie di ogni cromosoma con numero di cromosomi pari a 46 (o 2N), come è il caso della maggior parte delle cellule somatiche;
- euploidi, quando presentano un numero di cromosomi pari a 46 o un multiplo di 46;
- nulliploidi, quando sono cellule differenziate prive di nucleo, come globuli rossi, piastrine e cheratinociti;
- poliploidi, quando presentano un numero di cromosomi pari a 3N (triploidi), 4N (tetraploidi), ecc, in seguito a fenomeni di duplicazione del DNA non seguiti da divisione cellulare (endocitosi), come i cardiomiociti (da 4N a 8N), i megacariociti (da 16N a 64N);
- **aneuploidi**, quando presentano un cromosoma in più (47) o in meno (45);
- **aploidi**, quando presentano un corredo cromosomico dimezzato (23 cromosomi) grazie al processo della meiosi, come spermatozoi e ovociti.

Dopo la fecondazione della cellula uovo da parte dello spermatozoo si forma lo zigote, cioè una cellula diploide (2N) formata da 46 cromosomi, cioè 22 coppie di autosomi + 1 coppia di cromosomi sessuali, per cui si ha un corredo cromosomico o cariotipo costituito da 46,XX nella femmina e 46,XY nel maschio.

L'analisi del cariotipo è una rappresentazione ordinata del corredo cromosomico di un individuo. Lo studio del cariotipo consta di numerosi passaggi:

1. coltura in vitro dei globuli bianchi e induzione della mitosi mediante fito-emo-agglutinina;
2. blocco del ciclo cellulare in metafase mitotica (72 ore) mediante colchicina (inibitore del fuso mitotico);
3. rottura della membrana cellulare mediante soluzione tampone, con allestimento del preparato su vetrino e visualizzazione della piastra metafasica;
4. colorazione dei cromosomi mediante bandeggio, con cui assumono una colorazione a bande, o fasce colorate, tipiche;
5. acquisizione dell'immagine microscopica e ricostruzione del cariotipo.

In genere, il **bandeggio** cromosomico avviene con la colorazione Giemsa, per cui si parla di bandeggio G, determinando lungo l'asse principale dei cromosomi una sequenza di regioni a diversa intensità di colorazione, dette bande cromosomiche, caratteristiche di ogni cromosoma, che consente la loro classificazione secondo uno schema standardizzato in modo da definire il cariotipo di un individuo. In genere, si contano 1-20 metafasi e si usano 3-5 cellule per l'analisi dei cromosomi al microscopio ottico e su fotografie digitali: l'alternanza tra le bande G-positive, scure, e le bande G-negative, chiare, riflette il diverso grado di condensazione della cromatina (fig 19.b.1).

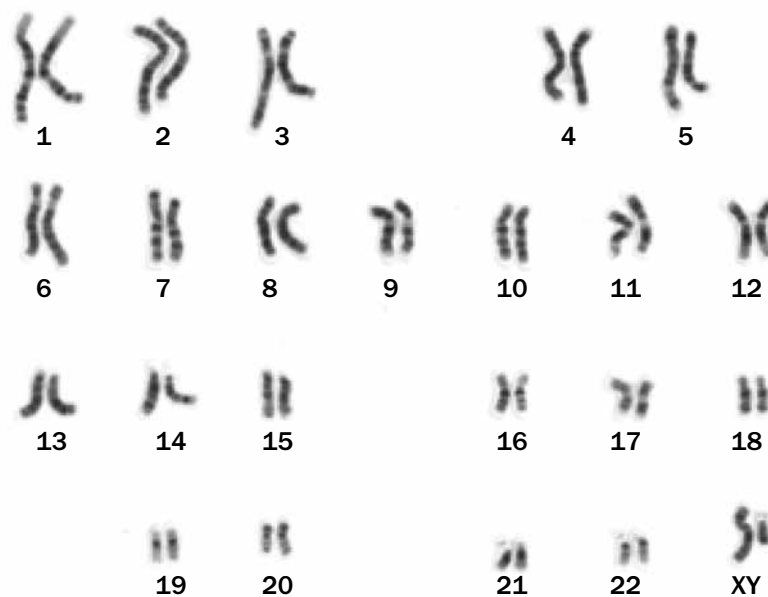


Figura 19.b.1

Cariotipo di un maschio normale ottenuto mediante bandeggio G

Esistono anche altre tecniche di bandeggio:

- bandeggio Q, con un colorante fluorescente, cioè la Quinacrina, che consente di valutare la presenza di polimorfismo cioè una variazione di grandezza del braccio lungo del cromosoma Y, che si trasmette da padre a figlio, anche se non rappresenta una condizione patologica (fig 19.b.2);

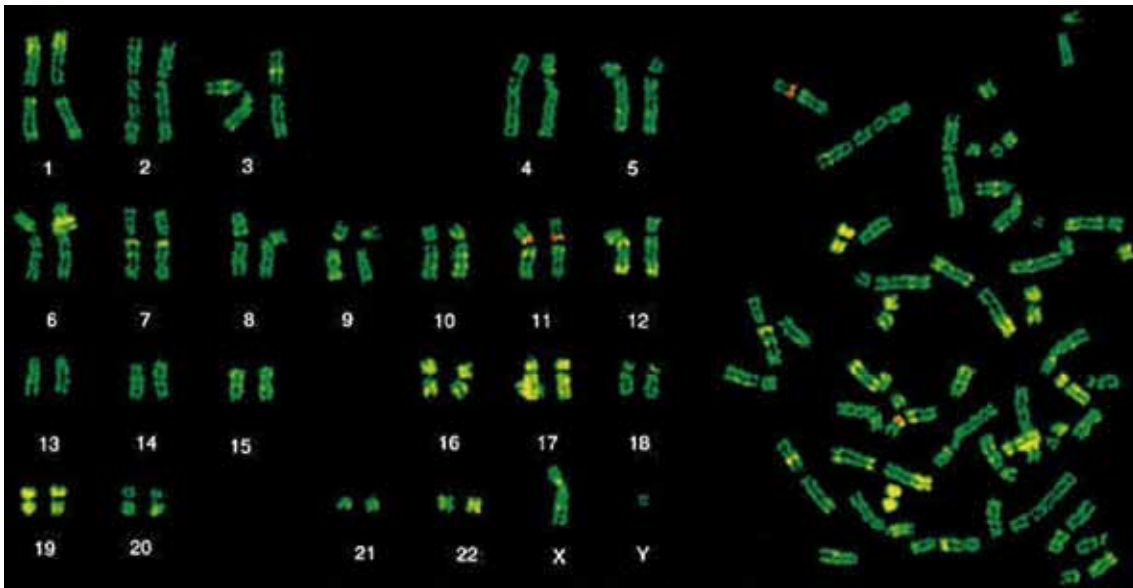


Figura 19.b.2

Cariotipo di un maschio normale ottenuto mediante bandeggio Q

- bandeggio R o “reverse”;
- bandeggio T, mette in evidenza le regioni telomeriche;
- bandeggio C, colora selettivamente l’eterocromatina, localizzata nelle regioni attorno al centromero e sul braccio lungo del cromosoma Y, con bande che corrispondono a eteromorfismi cromosomici.

Il numero delle bande cromosomiche dipende dal grado di condensazione dei cromosomi e quindi dalla fase del ciclo cellulare: durante la metafase si osservano ~ 320 bande formate da 6.000-8.000 kb (chilobasi o migliaia di basi), mentre in profase e prometafase (inizio della metafase) il numero delle bande può triplicarsi sui cromosomi meno condensati, ottenendo dei preparati cromosomici ad alta risoluzione, utili per evidenziare anomalie di struttura molto fini, non riconoscibili con le tecniche tradizionali.

Al termine del bandeggio, le piastre metafasiche acquisite vengono elaborate ed i singoli cromosomi vengono contati, analizzati e fotografati. I cromosomi vengono poi appaiati a due a due in base alle dimensioni, alla posizione del centromero e al bandeggio. Si arriva così alla determinazione del cariotipo.

L’analisi del cariotipo permette di evidenziare eventuali **anomalie cromosomiche**, sia numeriche (trisomie, monosomie), che strutturali (traslocazioni, delezioni ed inversioni), originate da rotture cromosomiche seguite da riarrangiamenti, che possono portare o meno alla perdita di materiale genetico causando diversi quadri patologici.

Tutte le anomalie cromosomiche sono identificate da un’abbreviazione che consente di descriverle nella formula cromosomica. In condizioni patologiche bisogna specificare la presenza di un difetto di numero dei cromosomi o la presenza di anomalie strutturali a carico delle braccia, regioni o bande, seguendo regole precise dettate dalla nomenclatura internazionale (ISCN 2009, *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*). Ad es. un uomo con sindrome di Down o trisomia 21 viene descritto dalla sigla 47,XY,+21 (che indica la presenza di un cromosoma 21 in soprannumero), mentre la sigla 46,XY,del(1)(q24q31) indica una delezione o perdita (del) di una parte del braccio lungo (q) del cromosoma 1 dalla regione 2, banda 4, alla regione 3, sottobanda 1, in un maschio (XY) a 46 cromosomi.

In alcuni casi patologici è necessario eseguire un’ulteriore analisi, per studiare nei dettagli

l'anomalia in questione. Questa tecnica prende il nome di ibridazione *in situ* fluorescente (**FISH**). La metodica FISH permette sia la valutazione di anomalie cromosomiche (trisomie complete o a mosaico), che la precisa caratterizzazione di riarrangiamenti strutturali (traslocazioni, inversioni, delezioni, ecc). La FISH utilizza sonde a fluorescenza che si legano in modo estremamente selettivo ad alcune specifiche regioni del cromosoma; può quindi essere utilizzata per rilevare e localizzare la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA con tecniche di microscopia a fluorescenza. La FISH è un esame molto utile per la diagnosi citogenetica di molte malattie e/o anomalie genetiche e richiede tempi d'esecuzione più brevi rispetto ad altre tecniche utilizzate per gli stessi scopi. Il suo impiego è fondamentale anche per lo studio delle alterazioni cromosomiche in cellule che non sono in grado di dividersi. Infatti, il riconoscimento di particolari sequenze di basi può avvenire sia su singoli cromosomi (identificati durante la metafase), sia su cellule non in divisione (nuclei interfascici), come gli spermatozoi (fig 19.b.3).

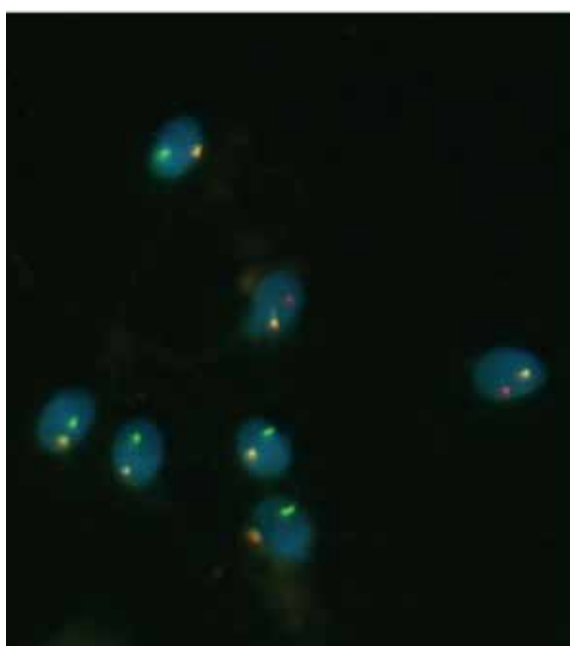


Figura 19.b.3
Analisi FISH su spermatozoi

Anomalie cromosomiche e infertilità maschile

L'analisi del cariotipo da sangue periferico è fortemente raccomandata durante l'iter diagnostico dei soggetti con azoospermia o grave oligozoospermia (1). Inoltre, lo *screening* citogenetico è obbligatorio prima di qualsiasi tecnica di fecondazione assistita, anche nel caso in cui i parametri seminali siano nella norma o solo lievemente anomali. Infine, poiché alcune anomalie cromosomiche possono causare infertilità associata a un'apparente normozoospermia, questa analisi dovrebbe essere effettuata in tutti i casi di non concepimento dopo un anno di rapporti mirati non protetti.

La prevalenza delle anomalie cromosomiche negli uomini infertili è alta, ed è inversamente correlata alla conta spermatica (tab 19.b.1).

Tabella 19.b.1
Frequenza e fenotipi associati alle più frequenti anomalie genetiche
associate a infertilità maschile

ANOMALIA GENETICA	FENOTIPO	PREVALENZA (%)
Aberrazioni cromosomiche	da Az a Norm	2-10
Sindrome di Klinefelter (<i>cf. cap 3c</i>)	Az – grave Olig	5-10 Az, 2-5 grave Olig
Altre alterazioni dei cromosomi sessuali	da Az a Norm	0.1-0.2
Traslocazioni Robertsoniane	Az – grave Olig	0.5-1
Traslocazioni reciproche	Az – grave Olig	0.5-1
Delezioni cromosoma Y	Az – grave Olig	5-10
AZFa	Az – SCOS	0.5-1
AZFb	Az – arresto spermatogenetico	0.5-1
AZFc	Az – grave Olig	3-7
AZFb-c	SCOS – arresto spermatogenetico	0.5-1
Delezioni parziali AZFc	da Az a Norm	3-5
Mutazioni geniche		
<i>CFTR</i>	Az ostruttiva	60-70 (5% negli infertili)
AR	Az - Olig	2-3
INSL3-LGR8	Criptorchidismo	4-5

Az = azoospermia; Olig = oligozoospermia; Norm = normozoospermia;
 SCOS: *Sertoli Cell Only Syndrome*

La prevalenza globale del fattore cromosomico nei maschi infertili è del 2-8% (media 5%), ma aumenta fino al 15% nei maschi azoospermici, perché comprende le aneuploidie correlate alla s. di Klinefelter (47,XXY) (fig 19.b.4) (2).

Sono predominanti le anomalie dei cromosomi sessuali, ma vengono riscontrate anche un ampio numero di anomalie strutturali degli autosomi. Il tipo più comune di anomalia cromosomica riscontrata nei soggetti infertili è la s. di Klinefelter (fino al 69% se si considerano solo i maschi con grave oligozoospermia).

Altre **aneuploidie** dei cromosomi sessuali riscontrate con alta prevalenza nei maschi infertili sono rappresentate da 47,XYY, 46,XX e aberrazioni del cromosoma Y (inversioni, isocromosomi, delezioni Yq, ecc). Inoltre, sono di frequente riscontro anche traslocazioni che coinvolgono i cromosomi sessuali (traslocazioni X- o Y-autosoma) (3).

Le **traslocazioni** robertsoniane sono le più frequenti anomalie cromosomiche strutturali (1/1000 nati) e possono influenzare negativamente la fertilità con diversi gradi di alterazioni spermatiche (4). Avvengono quando due cromosomi si fondono insieme: la ricombinazione più comune riguarda i cromosomi 13-14 e 14-21. Il risultante singolo cromosoma anomalo contiene la maggior parte delle braccia lunghe dei due cromosomi originari con perdita delle braccia corte. I portatori di queste traslocazioni hanno in genere un fenotipo normale,

ma possono essere affetti da infertilità dovuta a danno spermatogenetico. La prevalenza di traslocazioni robertsoniane nei maschi infertili è dello 0.8% (5), ovvero nove volte più elevata rispetto alla popolazione generale.

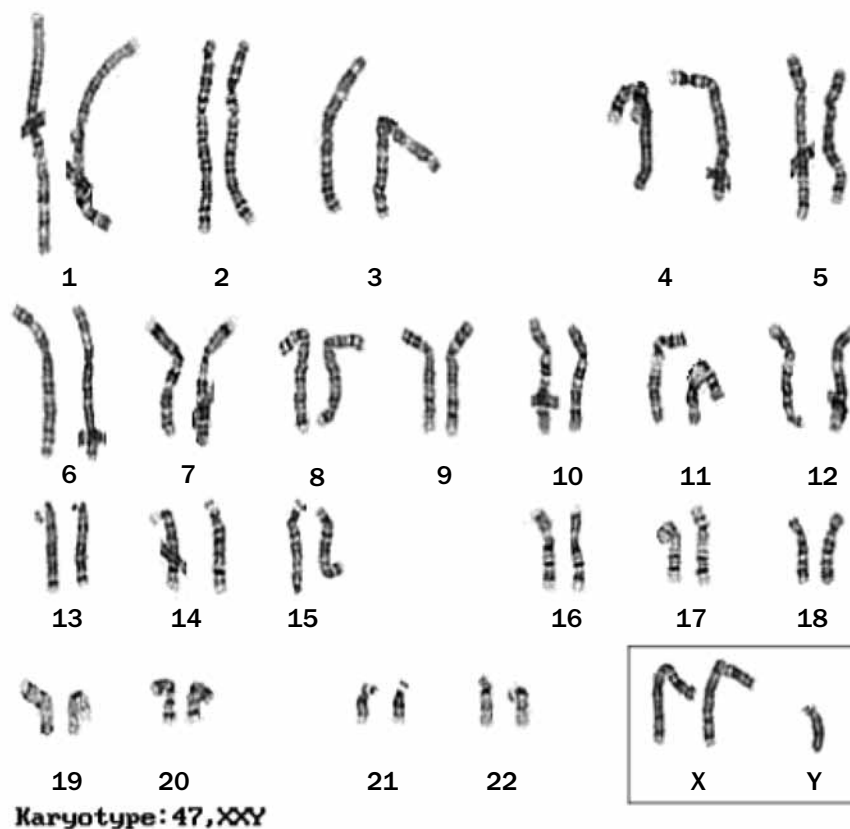


Figura 19.b.4
Cariotipo di s. di Klinefelter 47,XXY

Infine, lo scambio reciproco di segmenti cromosomici tra due cromosomi non omologhi viene definito traslocazione reciproca, riscontrata con una frequenza di 0.9/1000 nati. In generale, non danno manifestazioni fenotipiche apparenti, ma l'incidenza nelle coppie con poliabortività è più alta rispetto alle coppie normali e l'incidenza di portatori di traslocazioni reciproche tra gli infertili (maschi oligozoospermici e azoospermici) è 7 volte più elevata rispetto alla popolazione generale.

Anomalie cromosomiche e infertilità femminile

La prevalenza delle anomalie cromosomiche nell'infertilità femminile appare variabile nelle casistiche più rappresentative, con un valore medio che si attesta attorno al 5% (6). La frequenza è analoga nelle partner femminili delle coppie avviate ai programmi di ICSI, nelle quali è stata riportata una percentuale del 2.8% di aneuploidie dei cromosomi sessuali e del 2.1% di anomalie di struttura degli autosomi. Sebbene il fenotipo sia variabile, gli sbilanciamenti cromosomici si associano in genere ad ipogonadismo ipergonadotropo con amenorrea primaria o secondaria (compresa la POF, *cfr cap 15*), oppure con oligomenorrea. Quasi un

terzo delle amenorree primarie sono riconducibili ai fenotipi Turneriani (monosomia del cromosoma X). Alcune anomalie, come il complemento sessuale XXX, non sono necessariamente associate ad infertilità. Le anomalie di struttura degli autosomi sono comuni nell'infertilità correlata alla poliabortività nel primo trimestre di gravidanza.

L'analisi sistematica del cariotipo nelle donne infertili ha consentito di trarre alcune rilevanti conclusioni che devono essere tenute presenti nell'iter diagnostico della paziente.

1. La monosomia e i difetti di struttura della X, omogenei o, più spesso, in mosaico, sono la causa più comune di amenorrea primaria (circa il 30% dei casi). Il fenotipo associato a queste condizioni è più comunemente quello della disgenesia ovarica con bassa statura, piuttosto che della s. di Turner (*cf. cap 3b*). Questa, infatti, corrisponde a diverse alterazioni cromosomali, delle quali la monosomia della X è solo la più comune. Nella maggioranza dei casi (57%) viene perso un intero cromosoma X e si presenta di conseguenza un cariotipo di tipo 45,X. Esistono però numerose altre varianti, quali:
 - delezione del braccio lungo del cromosoma X con formazione di un isocromosoma, cariotipo 46,X,i(Xq);
 - delezione di porzioni del braccio lungo o corto del cromosoma X, cariotipo 46,XXq- o 46,XXp-;
 - delezioni di porzioni sia del braccio lungo che del braccio corto con formazione di un cromosoma X ad anello, cariotipo 46,X,r(X);
 - mosaici con vari assetti, come ad esempio 45,X/46,XY o 45,X/47,XXX.
2. La presenza di mosaicismi rende problematiche le correlazioni cariotipo-fenotipo. L'amenorrea è la conseguenza più comune quando, in un mosaicismo vero, coesista una linea con monosomia X in percentuale superiore al 20% delle cellule; il mosaicismo X/XY si associa spesso al fenotipo della disgenesia gonadica mista, con espressione variabile dei genitali esterni.
3. Le traslocazioni X;autosomiche con rottura del braccio lungo della X, tra le bande q21 e q26, si associano di solito ad amenorrea primaria, in assenza di altre caratteristiche fenotipiche.

Bibliografia

1. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 2002, 10: 303-12.
2. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 2007, 14: 734-45.
3. Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogen Gen Res* 2005, 111: 317-36.
4. Therman E, Susman M. *Human Chromosome: Structure, Behaviour and Effects*. Springer-Verlag, New York, 1993: pp. 273-87.
5. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991, 6: 245-50.
6. Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B; Association des Cytogeneticiens de Langue Francaise. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* 2001, 16: 82-90.

19.c. Esame del liquido seminale

Loredana Gandini

Cristiana Lupini, Francesco Lombardo

(per la scheda infermieristica cfr cap 23)

Introduzione

Lo spermioγραμμα costituisce l'indagine di laboratorio di primo livello che definisce la potenzialità fecondante del partner maschile di una coppia (cfr cap 14); inoltre, è indispensabile per la valutazione della salute del maschio, in relazione alla presenza di patologie andrologiche da prevenire o trattare. Tale indagine, inserita in un iter diagnostico appropriato, consente di impostare terapie mediche o chirurgiche o di indirizzare la coppia verso la fecondazione assistita. Infine, è l'indagine necessaria per realizzare un programma di crioconservazione del seme in caso di patologie che necessitino di terapie potenzialmente sterilizzanti.

Molto spesso, tuttavia, l'esame viene effettuato con scarsa competenza specifica, come se si trattasse di un'analisi non specialistica. Da anni sia il WHO (1) che le Società Scientifiche nazionali ed internazionali hanno proposto standard di riferimento e predisposto un protocollo condiviso di standardizzazione delle procedure per eseguire questo esame.

Come in tutte le analisi di laboratorio, anche per lo spermioγραμμα dobbiamo distinguere le fasi pre-analitica, analitica e post-analitica, che richiedono tutte uguale attenzione del laboratorista e del clinico che le interpreta.

Fase pre-analitica

Norme per la raccolta del campione

Le norme di raccolta necessitano di adeguata standardizzazione, come avviene per altri campioni biologici, e devono essere comunicate al paziente in maniera chiara.

- **Giorni di astinenza** da eiaculazioni prima della raccolta: si suggeriscono due possibilità, una più ampia di 2–7 giorni ed una più stretta di 3–5 giorni, che consente una valutazione meno soggetta a variazioni casuali. Ciò è indispensabile per poter standardizzare quantità e qualità degli spermatozoi prodotti e per potere effettuare confronti sia rispetto ai valori di riferimento che con altri esami precedenti o successivi.
- **Modalità di raccolta** del campione seminale: **deve** essere raccolto per masturbazione; solo in casi di incapacità od opposizione alla masturbazione, può essere consentita la raccolta in appositi preservativi non citotossici. È preferibile che il campione venga raccolto in laboratorio, specie se esistono motivi medico-legali (es. crioconservazione del seme, cause di disconoscimento di paternità) che impongono tale scelta. È, tuttavia, accettabile che il campione venga raccolto in altra sede (es. ambiente domestico) per motivi psicologici od organizzativi.
- **Contenitore:** il migliore per eseguire questa analisi è quello sterile per urine.
- **Modalità di consegna:** il campione deve essere consegnato entro 30-60 minuti dall'eiaculazione, se raccolto in sede diversa dal laboratorio, deve essere protetto dalle eccessive escursioni termiche e trasportato senza capovolgere il contenitore per evitarne la fuoriuscita e per provocare il minor traumatismo cellulare possibile.

Tali indicazioni possono essere disattese solo se l'analisi deve essere eseguita con urgenza per

interventi chirurgici, inizio di chemioterapia o radioterapia, grave difficoltà od impossibilità del paziente ad eiaculare.

Processazione del campione

1. Porre il contenitore in un termostato a temperatura controllata (35-37°C), per consentire il processo di fluidificazione.
2. Trasferire il campione dal contenitore sterile per urine in una provetta conica graduata. Tali norme sono essenziali per evitare artefatti ed errori nella successiva fase analitica.

Fase analitica

VALUTAZIONE MACROSCOPICA

Deve essere eseguita sempre al termine del processo di fluidificazione, entro la prima ora e non più tardi di due ore dall'eiaculazione.

Tabella 19.c.1
Valutazione macroscopica del liquido seminale

Parametro	Come si valuta	Normalità	Patologia
Volume	In mL	≥2 mL	<ul style="list-style-type: none"> • Ridotto: può essere indicativo di ostruzione delle vie seminali. • Aumentato: può essere indicativo di flogosi.
pH	Cartine al tornasole con un <i>range</i> molto stretto (fra 6 e 10)	7.2-7.8	<ul style="list-style-type: none"> • pH < 7 associato a basso volume: ostruzione delle vie seminali e/o alterazione della secrezione delle vescicole seminali. • pH > 8: talora associato a patologie flogistiche ipersecretive.
Aspetto	Porre la provetta di fronte ad una fonte luminosa	Avorio opalescente	<ul style="list-style-type: none"> • Trasparente (aspetto acquoso): componente cellulare molto scarsa. • Rosato, rosso o rosso bruno (aspetto ematico): presenza di emazie. • Bianco-latte (aspetto lattescente): costituito solo da secreto prostatico. • Bianco-giallastro (aspetto pioide): pio-spermia.
Fluidificazione	Far percolare il seme da una pipetta lungo le pareti della provetta e osservare il fluido in trasparenza contro una sorgente luminosa	10-60 minuti	In funzione dei tempi e della completezza viene definita fisiologica, o completa o normale, oppure irregolare, incompleta, finemente irregolare o ritardata se permangono coaguli o filamenti.
Viscosità	Far gocciolare il liquido seminale da una pipetta	Normale se le gocce si staccano una dopo l'altra	<ul style="list-style-type: none"> • Aumentata (le gocce sono sostituite da un unico filamento): può essere indicativa di patologie flogistiche acute o croniche. • Diminuita (le gocce si staccano più rapidamente): scarsa componente cellulare.

VALUTAZIONE MICROSCOPICA

Si allestiscono almeno due preparati per campione con una micropipetta da 10 mL e si osservano a fresco con obiettivi da 10X, 20X o 25X, 40X. Prima di effettuare la valutazione microscopica del campione, controllare l'omogeneità della distribuzione cellulare e la sovrapponibilità delle caratteristiche dei preparati allestiti.

Valutazione della componente gametica

- **Numero di spermatozoi:** deve essere valutato sia per mL che per eiaculato totale, al fine di definire l'attività spermatogenetica testicolare, strettamente correlata con il quadro ormonale. Dopo la conta a fresco viene utilizzata una camera di conta cellulare (Makler, specifica per spermatozoi, oppure Neubauer, Burker, Thoma). La concentrazione minima della norma è di 20 milioni/mL e di 40 milioni/eiaculato. In caso di assenza di spermatozoi in sospensione, è necessario centrifugare l'eiaculato e ricercare gli spermatozoi nel sedimento. Solo in assenza di spermatozoi nell'intero sedimento è possibile definire il paziente azoospermico. La diagnosi di azoospermia deve essere confortata da una ripetizione dell'analisi per due/tre volte (2).
- **Motilità nemaspermica:** viene valutata, in percentuale, utilizzando l'obiettivo a 20X o 25X a tempi fissi dall'eiaculazione (1 o 2 h). Per rendere significativa la valutazione devono essere presi in esame non meno di 100 elementi nemaspermici. Nei campioni a bassa concentrazione è necessario ripetere la valutazione su più preparati. La motilità può essere valutata anche con sistemi computerizzati, denominati *Computer Aided Sperm Analysis (CASA system)*, anche se tale analisi non può comunque sostituire la valutazione microscopica e viene usata prevalentemente per ricerca (3). La motilità deve essere sempre definita sul piano qualitativo: lineare, discinetica o non lineare, agitatoria in loco (o in *situ*) o, infine, assente. Il WHO considera come valore minimo di riferimento una percentuale complessiva di motilità $\geq 50\%$, di cui almeno $\geq 25\%$ lineare veloce e lenta. L'alterazione della motilità è correlata a quasi tutte le patologie andrologiche e non è pertanto un sintomo patognomonico. Solo nel caso di acinesia, si può sospettare una patologia genetica legata all'alterazione della costituzione microtubulare del flagello (sindrome delle cilia immobili), talora correlata con la sindrome di Kartagener.
- **Morfologia nemaspermica:** può essere valutata su un preparato a fresco, utilizzando un obiettivo 40X, e su un preparato fissato e colorato (May-Grünwald-Giemsa, Diff Quick, Papanicolau) con obiettivo 100X (fig 19.c.1). Un individuo è considerato ancora potenzialmente fertile con una quota di atipie $\leq 70\%$. Una percentuale così elevata può sembrare strana, ma va tenuto conto che la valutazione morfologica in questo caso è uno studio morfo-funzionale legato all'effetto selettivo operato dalle vie genitali femminili oltre che alla capacità dello spermatozoo di penetrare le stesse, per cui ogni piccola deviazione dalla norma viene considerata come atipia. In particolare, le atipie vengono descritte in base al distretto della struttura cellulare in cui sono localizzate: testa, collo, coda (4). Come per la motilità, l'alterazione della morfologia spermatica non è correlata a singole patologie andrologiche.

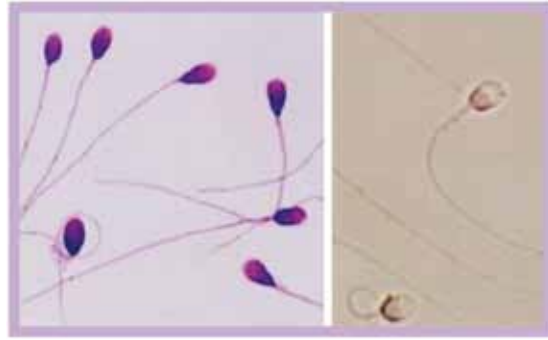


Figura 19.c.1
A sinistra spermatozoi colorati con May-Grünwald-Giemsa 1000X
A destra spermatozoi senza colorazione 1000X

Nei casi in cui il campione presenta un numero di spermatozoi $< 100.000/\text{mL}$ o spermatozoi solo nel sedimento non è possibile dare una definizione percentuale della motilità e della morfologia spermatiche, per cui è necessario descrivere tali parametri nella sezione dedicata alle osservazioni.

Valutazione della componente non gametica

- **Leucociti:** prevalentemente neutrofili, vengono valutati in milioni/mL, a concentrazioni $> 1 \times 10^6/\text{mL}$ sono considerati un importante indicatore di flogosi del tratto genitale.
- **Emazie:** non dovrebbero essere presenti nell'eiaculato. Se presenti, sono sintomo di microemorragie o patologie flogistiche, molto raramente di patologie prostatiche quali ipertrofia o neoplasie.
- **Elementi della linea germinativa:** rappresentati prevalentemente da spermatociti e spermatidi, più raramente spermatogoni.
- **Cellule epiteliali di sfaldamento:** derivano dall'apparato genito-urinario e possono presentarsi isolate o in piccoli ammassi. Vengono indicate come rare, presenti o numerose e solo in questo caso possono essere segno di esfoliazione patologica di tipo infiammatorio.
- **Zone di spermioagglutinazione:** possono essere costituite da aggregati cellulari misti (spermatozoi e leucociti o altre cellule) o da soli spermatozoi. Vengono valutate a fresco ed indicate come rare, presenti o numerose.
- **Corpuscoli prostatici:** sono rappresentati da materiale non cellulare proveniente dalla prostata, quasi mai correlati con patologie prostatiche specifiche.

Per meglio affrontare l'interpretazione critica dei dati dello spermioγραμμα è opportuno utilizzare una nomenclatura seminale condivisa (tab 19.c.2) e conoscere i valori di riferimento proposti dal WHO 1999.

Tabella 19.c.2
Parametri e nomenclatura seminale

Normozoospermia	Normale concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi nell'eiaculato
Oligozoospermia	Riduzione della concentrazione degli spermatozoi
Criptoospermia	Presenza di rarissimi spermatozoi nell'eiaculato, talora evidenti solo dopo centrifugazione del campione
Azoospermia	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato
Normocinesia	Normale percentuale di motilità e normale qualità di movimento degli spermatozoi
Astenoospermia	Alterazione quantitativa della percentuale di spermatozoi mobili
Discinesia	Alterazione qualitativa del movimento degli spermatozoi
Acinesia	Assenza di spermatozoi mobili nell'eiaculato
Teratoospermia	Elevata percentuale di spermatozoi con morfologia alterata
Dispermia	Riduzione quantitativa e qualitativa dei parametri seminali
Aspermia	Assenza di eiaculato, può associarsi o meno ad anorgasmia od a eiaculazione retrograda

Fase post-analitica

La **refertazione** dell'esame seminale deve essere la più completa possibile, anche in funzione della sua valenza medico-legale, e deve prevedere la descrizione di tutti i parametri, osservazioni, ma non giudizi clinici sulla fertilità del paziente. Non devono mai comparire, in un referto seminale corretto, i cosiddetti "indici di fertilità", da molto tempo considerati non solo privi di significato clinico ma spesso addirittura fuorvianti.

Data la complessità dell'analisi seminale, è opportuno che il Laboratorio di Seminologia sia dotato di controllo di qualità interno, che preveda un controllo intra-operatore ed un controllo inter-operatori. Se possibile, dovrebbe essere prevista, inoltre, l'adesione ad un programma di qualità esterno, che preveda la valutazione, in cieco, di campioni seminali congelati, per quanto riguarda concentrazione e morfologia nemaspermica, e la valutazione di supporti video per quanto riguarda la cinetica nemaspermica (5).

Per concludere, è necessario sottolineare che lo spermogramma, eseguito secondo le norme sopra riportate, non è un'analisi di laboratorio *routinaria* di comune esecuzione, ma presuppone un periodo di formazione dell'esecutore che dovrebbe essere certificato da un adeguato numero di analisi eseguite sotto la guida di un seminologo esperto.

Bibliografia

1. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 4th Edition, 1999.
2. Cooper TG, Hellenkemper B, Jonckheere J, Callewaert N, Grootenhuys AJ, Kersemaekers WM, Leung A, Wang C. Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *J Androl* 2006, 27: 483-90.
3. Lenzi A. Computer-aided semen analysis (CASA) 10 years after: a test-bed for the European scientific andrological community. *Int J Androl* 1997, 20: 1-2.
4. Gandini L, Lombardo F, Dondero F, Lenzi A. *Atlante di Seminologia*, Carocci Editore, 2004.
5. Gandini L, Menditto A, Chiodo F, Lenzi A. Italian pilot study for an external quality control scheme in semen analysis and antisperm antibodies detection. *Int J Androl* 2000, 23: 1-3.

19.d. Post-coital test

Vito Giagulli

Procedure per la diagnostica

Scopo e meccanismo d'azione	Fornisce una valutazione della funzione dello sperma, misurando le caratteristiche quali-quantitative del muco cervicale, l'interazione spermamuco cervicale e la presenza di anticorpi anti-spermatozoi nel muco.
Indicazioni	Fornire (senza immediata terapia) indicazione efficace e predittiva della possibilità di concepimento naturale in coppie con storia di infertilità < 3 anni, senza una causa femminile definita (<i>cf</i> cap 14).
Controindicazioni	Infertilità di coppia > 3 anni. Causa accertata di fattore femminile di infertilità (ovarico, utero-tubarico, ecc).
Precauzioni	Il test deve essere eseguito appena prima della presunta data dell'ovulazione.
Relazione con età, sesso, peso corporeo, gravidanza, ecc.	Per il maschio non è ritenuto necessario un periodo preliminare di astinenza (contrariamente all'esame del liquido seminale, <i>cf</i> cap 19c).
Procedure abbinabili	Valutazione quali-quantitativa della cristallizzazione e della viscosità del muco cervicale.
Esecuzione	Dopo 6-8 ore da un rapporto sessuale non protetto, eseguito entro 24 ore dall'ovulazione (accertata mediante ecografia ovarica, o temperatura basale <i>cf</i> cap 19a, o caratteristiche del muco cervicale, ecc), raccogliere il muco cervicale mediante l'introduzione nel canale cervicale di una siringa monouso di plastica (senza ago) lunga 10 cm. Valutare le caratteristiche del muco (chiarezza, torpidità, filanza, ecc), prima di porne su vetrini porta-oggetti una quantità sufficiente per l'osservazione (1-2 gocce). Osservare a fresco minimo 5 vetrini al microscopio ottico ad alto ingrandimento (400X), valutando numero e motilità degli spermatozoi.
Possibili effetti collaterali	Nessuno.
Scheda infermieristica	<i>Cf</i> cap 23i
Valutazione risultati	Il test è considerato positivo se al microscopio ottico si osserva almeno uno spermatozoo con motilità rapida e progressiva in almeno metà dei vetrini osservati. La positività al test indica che almeno il 50% di queste coppie può concepire nei successivi due anni mediante rapporti liberi e senza terapia.
Interpretazione	Alterazioni delle caratteristiche del muco influenzano la risposta al test: <ul style="list-style-type: none"> • muco inadeguato può essere legato ad elevati livelli circolanti di progesterone (errore di <i>timing</i>) o amputazione della cervice; • la presenza di numerosi leucociti potrebbe indicare uno stato infiammatorio, che può compromettere l'interpretazione del risultato del test. Movimenti lenti degli spermatozoi o agglutinazioni varie (testa-testa o coda-coda) indicano la presenza di anticorpi anti-sperma.

Attendibilità e ripetibilità dei risultati	Consistente variabilità intra- e inter-studio legata all'osservatore.
Giudizio complessivo costo-beneficio e costo-efficacia	Sebbene la semplicità di esecuzione e il costo non elevato incorraggino i clinici ad utilizzarlo frequentemente, tenendo conto della variabilità legata all'esecutore e data la larga diffusione dell'uso delle tecniche di fecondazione assistita nelle coppie con test negativo, il suo uso routinario non è raccomandato nella pratica clinica.
Bibliografia	<ul style="list-style-type: none">• Glazener CMA, Ford WCL, Hull MGR. The prognostic power of the post-coital test for natural conception depends on duration of fertility. Hum Reprod 2000, 15: 1953-7.• Devroy P, Fauser BCJM, Dietrich K, on behalf of Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2008. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. Human Reprod Update 2009, 15: 391-408.

19.e. Eco-color-doppler peniena dinamica

Antonio Aversa & Andrea M Isidori

(per la scheda infermieristica cfr cap 23e)

Introduzione

Il deficit erettile (DE) (cfr cap 13) vasculogenico costituisce probabilmente la forma più frequente di DE su base organica (1). Il ruolo dell'Eco-Color-Doppler (ECD) per la diagnostica del DE è riconosciuto da molto tempo (2). Più recentemente le conoscenze relative al microcircolo penieno sono state approfondite con l'impiego del *Power Doppler*. Grazie alla maggiore sensibilità di questa tecnologia nel rilevamento dei flussi nei vasi di piccolo calibro, è stato possibile dimostrare segni d'arteriopatia anche in pazienti con valori velocitometrici normali al campionamento delle cavernose; in questo modo si è resa disponibile l'informazione che mancava per un quadro completo dell'*imaging* nella DE di origine arteriosa. Il grande progresso avvenuto nel trattamento farmacologico del DE ha indotto ad un riesame critico del valore diagnostico dell'ECD peniena dinamica (ECD-PD), che consente un approccio diagnostico strumentale molto semplice e non invasivo, permettendo una simultanea valutazione delle condizioni del tessuto erettile, dello stato dei vasi e delle caratteristiche del flusso ematico all'interno di essi.

Premesse tecniche

Il **Doppler classico** fornisce una rappresentazione grafica della velocità di un fluido in funzione del tempo. Per rappresentare correttamente il flusso ematico, tenendo conto di tutte le velocità e direzioni delle singole componenti corpuscolate, si è sviluppata l'analisi spettrale. Mediante un procedimento matematico si rappresentano graficamente le diverse velocità presenti in un certo periodo di tempo, in un dato volume campione. L'**eco-color-Doppler** (ECD), basato sul valore medio del "Doppler *shift*", è un'elaborazione dell'analisi spettrale, che misura la componente direzionale della velocità del sangue all'interno di un vaso, convertendola in un colore convenzionale (rosso per il flusso in avvicinamento alla sonda e blu per il flusso in allontanamento) nella classica immagine B-Mode.

Alcuni limiti dell'ECD ne condizionano l'applicazione:

- l'angolo-dipendenza dell'immagine;
- l'elevato "rumore di fondo" (colore di origine non vascolare) nello studio dei flussi lenti;
- la tendenza alla mescolanza di colore, che rende indeterminabile la direzione per i flussi ad alta velocità;
- la pulsatilità elevata nell'esame dei vasi arteriosi.

Per superare questi limiti si è sviluppato il **Power Doppler** (PWR), la cui immagine è la risultante cromatica dell'integrale dello spettro Doppler. La tonalità e la brillantezza del segnale colore rappresentano l'energia (o ampiezza) del segnale Doppler, che dipende dal numero dei globuli rossi che producono il Doppler *shift*. L'immagine PWR dipende dunque dal numero dei globuli rossi presenti in un dato campione di flusso, piuttosto che dalla globale direzione del flusso; questa ematocrito-dipendenza del PWR tende fra l'altro a ridurre la pulsatilità nei vasi sottoposti a indagine. Con il PWR si può incrementare il guadagno

colore di 10-15 Decibel rispetto al comune ECD, senza il disturbo provocato dal rumore di fondo, ottenendo una migliore visualizzazione dei piccoli vasi (3).

Per amplificare il segnale vascolare sono stati utilizzati i **mezzi di contrasto ecografici**, ma i recenti progressi ottenuti nelle migliori apparecchiature ecografiche consentono un'analisi dettagliata delle più fini ramificazioni vascolari peniene senza far ricorso ad essi.

Metodica d'esame

Data la notevole influenza che la psiche esercita sul fenomeno erettivo (4,5), è d'obbligo che l'ECD-PD venga eseguita in ambiente riservato, preferibilmente con il solo operatore presente nella stanza d'esame, con il paziente adagiato in posizione supina, invitato a tenere il pene fermo sulla linea mediana e rovesciato sul triangolo pubico.

S'inizia con uno **studio in scala dei grigi** degli involucri penieni e del tessuto erettile **in condizioni di base** (fig 19.e.1: a-b-d: scansioni longitudinali di tessuto penieno normale; c-e: scansioni coronali), allo scopo di escludere lesioni di tali strutture.

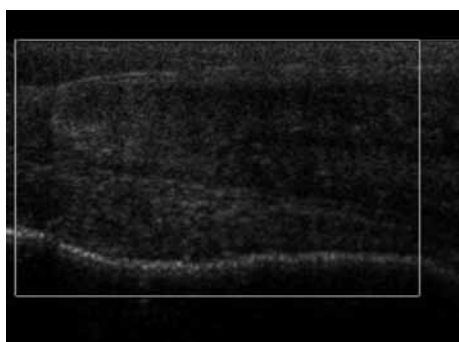


Figura 19.e.1a

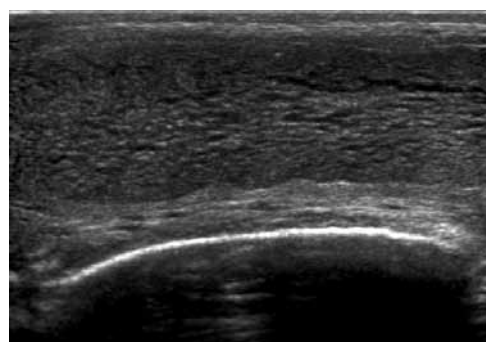


Figura 19.e.1b



Figura 19.e.1c

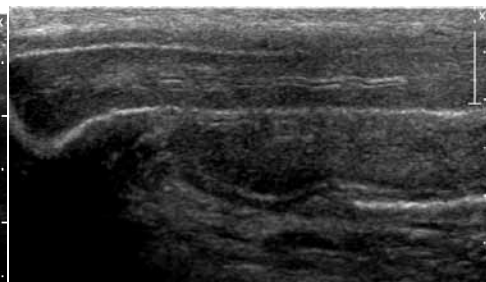


Figura 19.e.1d

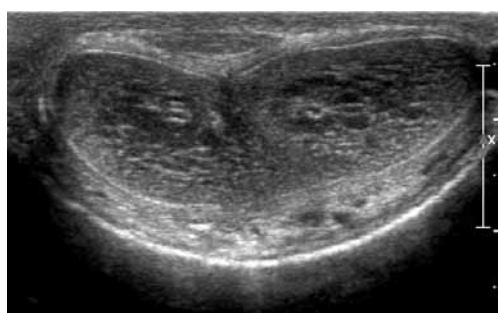


Figura 19.e.1e

Dopo questa fase preliminare, si procede alla **farmaco-stimolazione** con iniezione intracavernosa di alprostadil 10 µg (Caverject®), seguita da un breve massaggio atto a favorire la diffusione del farmaco.

Nei primi 5 minuti successivi all'iniezione, si osserva con il **color Doppler** (ECD) la progressiva dilatazione delle arterie cavernose (fig 19.e.2a-d), se ne controlla la simmetria di calibro (fig 19.e.2e-g) e di flusso e si ricercano eventuali affluenti secondari.

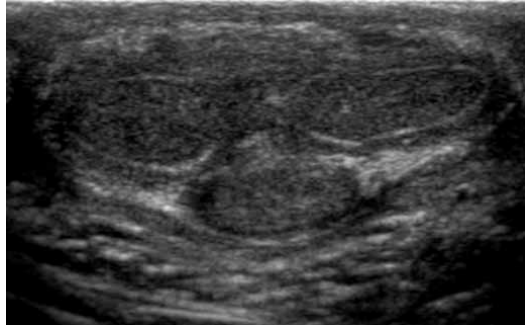


Figura 19.e.2a

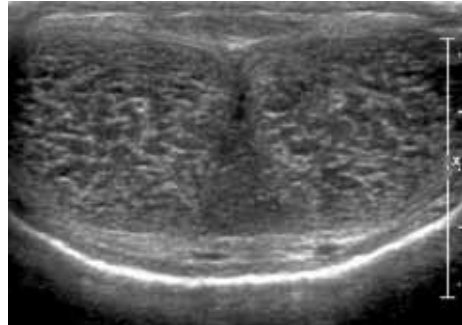


Figura 19.e.2b

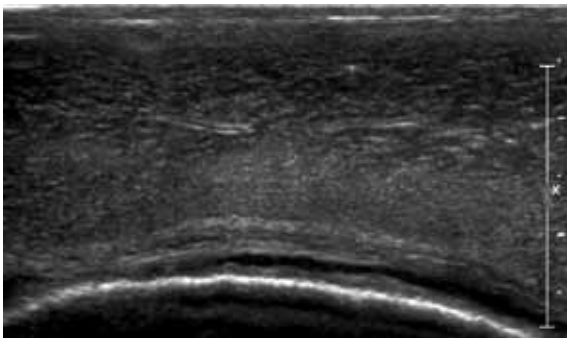


Figura 19.e.2c

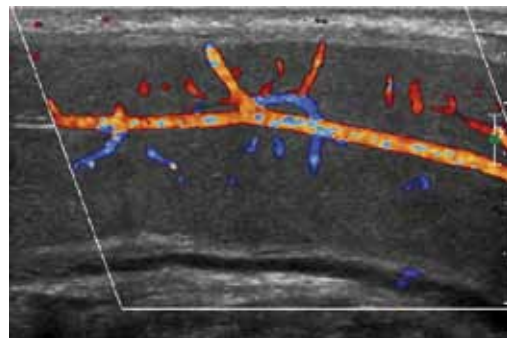


Figura 19.e.2d

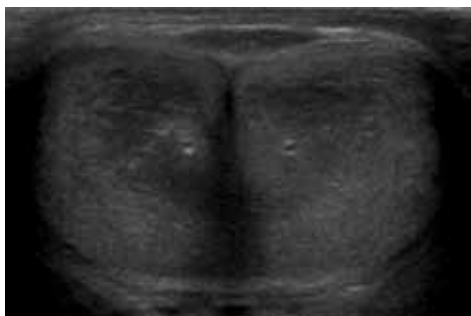


Figura 19.e.2e



Figura 19.e.2f

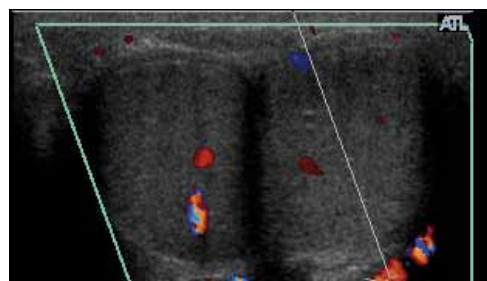


Figura 19.e.2g

Dopo questo primo controllo, si passa allo studio con CD o **PWR**, allo scopo di verificare il rilasciamento delle cavernose e dei rami emergenti, valutare la morfologia di questi vasi e l'eventuale presenza di varianti anatomiche di essi (fig 19.e.3: *shunt* cavernoso-uretrale ad alto flusso).

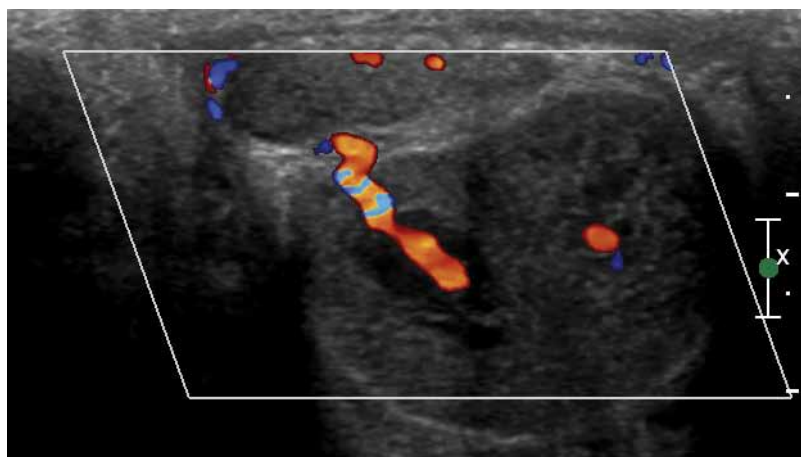


Figura 19.e.3

In caso di **ipertono adrenergico** (fig 19.e.4), le cavernose mantengono aspetto a cavaturaccioli e i rami emergenti non sono visualizzabili.

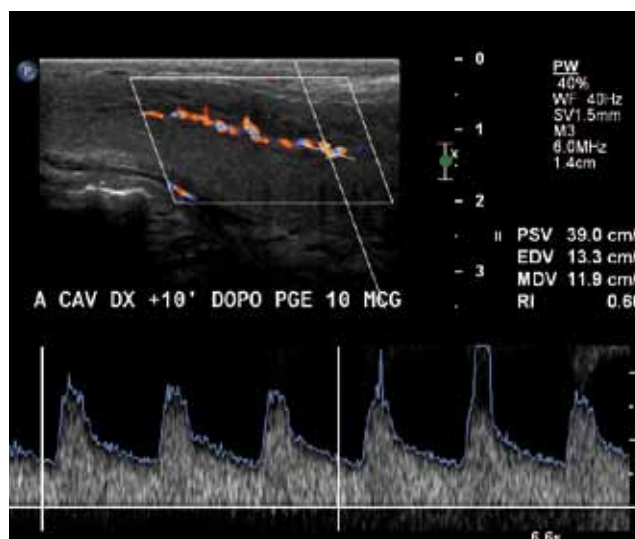


Figura 19.e.4

In tale evenienza è necessario far rilassare il paziente, lasciandolo solo per qualche minuto. Per favorire il rilasciamento trabecolare alcuni Autori (6) suggeriscono di associare alla farmacostimolazione la *Video Sexual Stimulation* (VSS), ma tale approccio potrebbe generare problemi di inibizione capaci di falsare il giudizio diagnostico. Un altro sistema, sicuramente più efficace per vincere gli stati inibitori è l'impiego della cosiddetta "tripla stimolazione", associando alprostadil, papaverina (Papaverina Houdè, fiale 40 mg) e fentolamina (Regitine®, fiale 10 mg), anche se la maggiore incidenza di effetti collaterali (dal priapismo alla crisi ipotensiva) sconsiglia anche questo approccio (7). Recentemente è stata proposta l'associazione tra sildenafil e VSS per indurre l'erezione, che però determina un significativo prolungamento del tempo d'esame.

Se dopo 10-15 minuti dall'iniezione intracavernosa di alprostadil non si è ancora superata la fase di tumescenza, basta lasciare solo il paziente per qualche minuto in autostimolazione e si riesce spesso ad avere la risoluzione dell'ipertono adrenergico, che condiziona lo sviluppo del meccanismo veno-occlusivo. Se persiste mancanza di rigidità anche dopo tale accorgimento, si procede ad una seconda somministrazione di 10 µg di alprostadil con associazione

di fentolamina (1-2 mg) o clorpromazina (2.5-5 mg), che, attraverso il blocco dei recettori α -adrenergici, determina una riduzione dei falsi positivi al test (8).

Dopo lo studio morfologico, si passa alle **rilevazioni velocitometriche con il Doppler pulsato (DP)**, alternando fra i due lati, allo scopo di assicurarsi della simmetria perfusionale: se si è certi che l'apporto ematico è simile, si potrà proseguire l'esame campionando solo una delle cavernose. Tali rilevazioni proseguiranno poi fino al raggiungimento dell'erezione. È importante che la valutazione con DP sia effettuata avendo cura di posizionare il volume campione all'origine dell'arteria cavernosa (fig 19.e.5a), perché è evidente una progressiva riduzione della velocità di flusso nelle sedi più distali delle arterie e, secondariamente, perché l'aumento della pressione intracavernosa provoca anche una progressiva compressione dei vasi, la cui entità è minore all'origine dal pavimento pelvico (fig 19.e.5b).

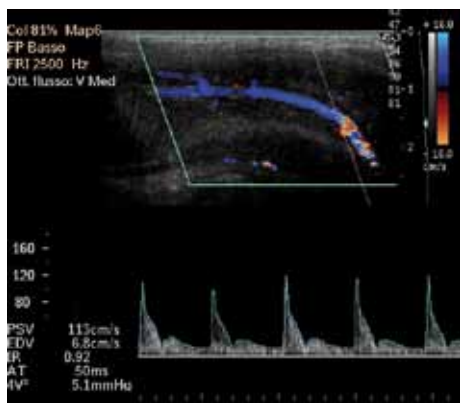


Figura 19.e.5a

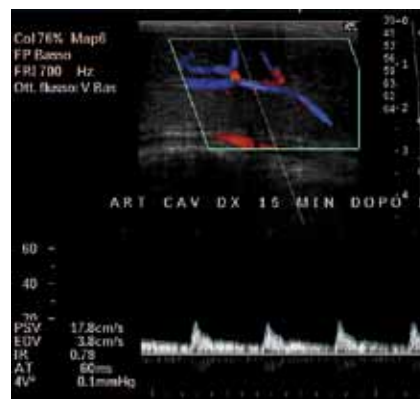


Figura 19.e.5b

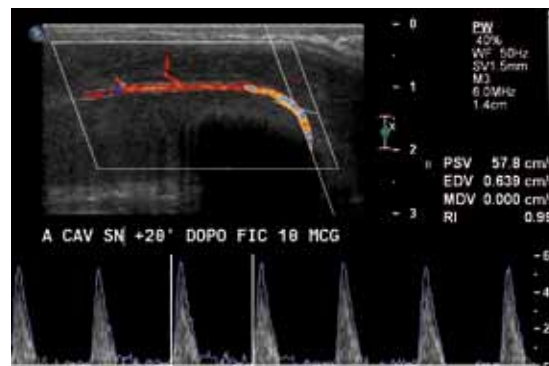


Figura 19.e.5c

Nello stato di massima erezione si completa lo studio dei rivestimenti e del tessuto erettile in scala dei grigi (alcune placche di *Induratio Penis Plastica*, fig 19.e.6, si rendono manifeste solo in questo modo).



Figura 19.e.6a



Figura 19.e.6b

Se vi sono segni di ipoafflusso arterioso (fig 19.e.7a-b), bisognerà includere nell'esame anche lo studio dell'aorta addominale, delle arterie iliache comuni (molto difficile è il rilevamento delle ipogastriche) e delle carotidi comuni, allo scopo di documentare eventuali segni di coinvolgimento prossimale della patologia arteriosa (9).

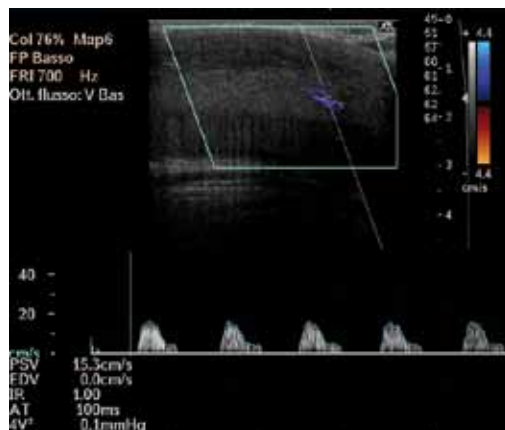


Figura 19.e.7a



Figura 19.e.7b

Al termine dell'esame, raccomandiamo di esprimere un giudizio clinico sul raggiungimento dello stato di erezione del paziente (tab 19.e.1).

Tabella 19.e.1

Modalità di valutazione clinica dell'erezione dopo test di farmaco-erezione

Erezione tipo 1	Tumescenza massima con o senza rigidità, durata insufficiente
Erezione tipo 2	Semirigidità, valida per la penetrazione
Erezione tipo 3	Massima rigidità, con o senza durata eccessiva

Analisi ragionata del velocitogramma arterioso

La curva velocitometrica di un vaso arterioso presenta alcune caratteristiche morfologiche che, insieme ai parametri quantitativi e semiquantitativi ottenibili mediante il *software* del sistema, forniscono elementi estremamente importanti, sia per la valutazione dello stato delle arterie, che del meccanismo veno-occlusivo.

Analisi qualitativa

Nella forma dell'onda Doppler si riconoscono agevolmente la componente sistolica e la componente diastolica e la forma del velocitogramma varia notevolmente a seconda del grado di resistenza periferica incontrata dal flusso ematico all'interno del vaso esaminato.

Nei tracciati **a basse resistenze periferiche** (come sono ad esempio i vasi cerebro-afferenti e quelli deputati alla perfusione degli organi parenchimosi) (fig 19.e.8) la fase sistolica inizia con una ripida ascesa, che culmina con un picco acuminato; da qui il tracciato ridiscende meno bruscamente e termina, talora con una piccola incisura, dando inizio alla fase diastolica, a sua volta caratterizzata da una deflessione dolcemente inclinata verso la linea di base, che si mantiene però costantemente positiva.

Nei tracciati ad **alte resistenze periferiche** (come ad esempio le arterie che irrorano i muscoli) (fig 19.e.9) la fase sistolica inizia, analogamente, con una ripida ascesa, culminante in un picco aguzzo, ma il tracciato discende con simile ripidezza e termina con una deflessione negativa, inizio della fase diastolica, che rapidamente riguadagna la linea di base.

Se con l'iniezione dei farmaci vaso-attivi si potesse abolire ogni controllo inibitorio funzionale del tono della muscolatura liscia trabecolare in tutti i pazienti, la semplice osservazione dello svolgimento delle fasi consentirebbe di esprimere un giudizio soddisfacente sulla qualità del meccanismo veno-occlusivo, diagnosticando con certezza le forme "venogeniche" di DE, ma questo non è possibile in tutti i casi.

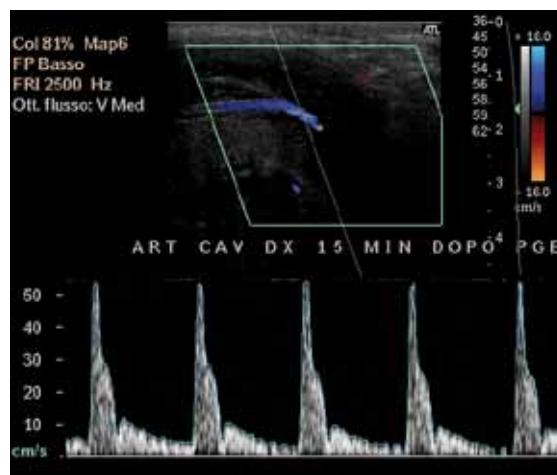


Figura 19.e.8

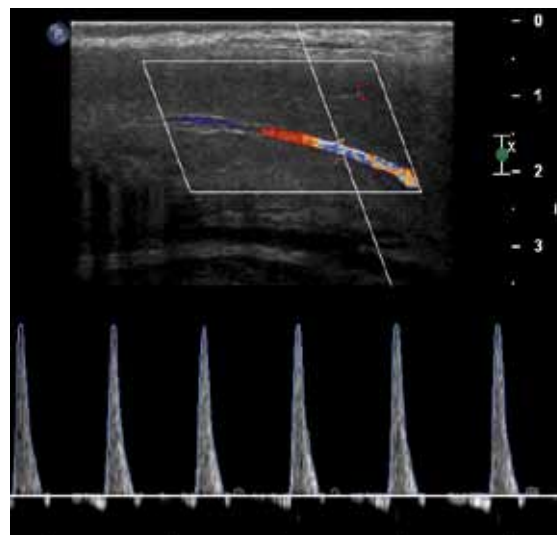


Figura 19.e.9

Analisi quantitativa

Solo tre dei parametri usati in diagnostica vascolare per la quantificazione dei flussi, rapidamente ottenibili con il *software* del sistema, si dimostrano utili nello studio del DE: la velocità di picco sistolico (VPS), il tempo di accelerazione (AT) e la velocità telediastolica (VTD). Sono invece ormai abbandonati come criteri diagnostici l'incremento di diametro delle arterie cavernose e la velocità di flusso nella vena dorsale profonda.

- La **velocità di picco sistolico (VPS)**, espressa in cm/sec, indica la massima velocità di flusso rilevabile in sistole, nei diversi campionamenti eseguiti durante l'esame. Perché la misurazione sia affidabile, è necessario:
 - o porre il volume campione all'origine della cavernosa (10) (misurazioni effettuate in sedi più distali forniscono dati diversi e risentono maggiormente del grado di replezione dei corpi cavernosi);
 - o essere certi di aver campionato l'arteria cavernosa principale (11,12) (non sono infrequenti rami arteriosi omolaterali secondari, che hanno velocità di flusso decisamente inferiore);
 - o posizionare con precisione l'angolo di correzione Doppler, secondo l'effettiva direzione del flusso, poiché è in base a questo strumento che l'apparecchiatura riesce a calcolare la velocità di flusso;
 - o proseguire la valutazione della VPS per almeno 20 minuti (anche se la massima VPS si sviluppa in genere dopo 5-6 minuti dalla farmaco-stimolazione, il 22% dei pazienti ha una maggiore latenza di risposta, con un *range* di 1-18 minuti)(13);
 - o escludere la presenza di ipertono adrenergico persistente dopo l'iniezione di alprostadil, caratteristico dei soggetti particolarmente ansiosi (14). Tale situazione, che di solito compromette il meccanismo veno-occlusivo, può perfino impedire il rilasciamento delle arterie cavernose e dei loro rami terminali. In questi casi la VPS si mantiene bassa; l'uso oculato del CD o del PWR consente di rilevare un caratteristico aspetto "a cavaturaccioli" delle cavernose e l'assenza di visualizzazione dei rami emergenti (vedi sopra e fig 19.e.4).

Se si applicano i suggerimenti sopra esposti, la misurazione della VPS costituisce un criterio fondamentale per la diagnosi del DE (15-19)(fig 19.e.10a-b: ipoafflusso arterioso con picchi sistolici inferiori a 20 cm/sec).

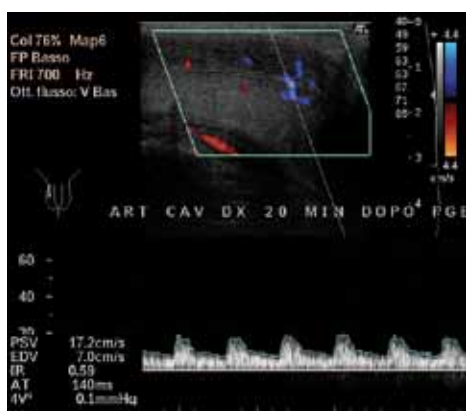


Figura 19.e.10a

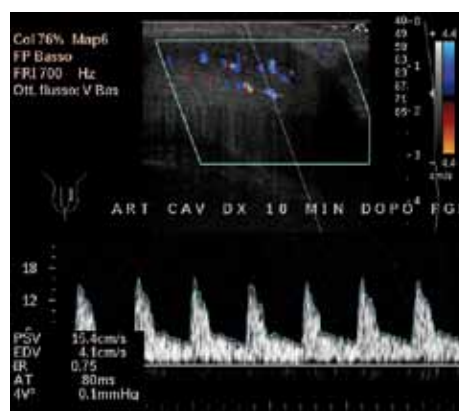


Figura 19.e.10b

- Il **tempo di accelerazione** (AT), espresso in millisecondi (msec), è il tempo misurato dalla partenza del picco sistolico fino al suo massimo valore. Il suo significato corrisponde a quello della celerità del polso. Esso solitamente rallenta nelle arteriopatie obliteranti (20): la branca ascendente si fa tarda, l'apice si arrotonda e la velocità di flusso si riduce ("polso piccolo e tardo") (fig 19.e.10a-b).
- La **velocità di fine diastole** (VTD), espressa in cm/sec, indica la quantità di flusso ancora presente in un vaso al termine della fase diastolica. L'equivalente semiquantitativo di tale parametro è l'**indice di resistenza** (RI), che risulta dalla formula $(VPS-VTD)/VPS$ ed esprime il grado di resistenza periferica al flusso (fig 19.e.10a-b).

Il quadro normale dell'ECD peniena dinamica

Ecografia in scala dei grigi

I corpi cavernosi del pene, del glande e la spongiosa uretrale sono ben visualizzabili in ogni loro porzione (fig 19.e.1).

A **peno flaccido** la complessa stratificazione anatomica del pene è solo parzialmente risolvibile, mentre una migliore visualizzazione si ottiene durante la tumescenza:

- cute, sottocutaneo e dartos non sono sempre facilmente separabili;
- una sottilissima, e spesso non delimitabile, linea iperecogena ci segnala l'interfaccia costituita dalla fascia del pene;
- subito al di sotto di essa si trova uno strato ecogeno costituito dal connettivo vascolare esterno all'albuginea, nel quale decorrono le vene circonflesse e dorsalmente il fascio nervo-vascolare;
- lo strato successivo è l'albuginea, che appare in sezione assiale come una fascia ipoecogena ben misurabile, di spessore uniforme, disposta attorno ai corpi cavernosi;
- l'ecostruttura normale dei corpi cavernosi ha ecogenicità media, abbastanza omogeneamente distribuita, dovuta alle molteplici interfacce realizzate dai setti.

Durante l'erezione:

- l'albuginea si assottiglia progressivamente;
- nei corpi cavernosi si assiste alla dilatazione delle lacune, specialmente di quelle centrali, periarteriose, con evidenziazione delle trabecole;
- le arterie cavernose appaiono nelle scansioni sagittali come due sottili binari iperecogeni parasettali (fig 19.e.2c).

Mediante una tecnica non invasiva oramai validata (21), in questa fase è possibile studiare la capacità funzionale dell'endotelio cavernoso di rilasciare nitrossido dopo occlusione mediante cuffia. In assenza di altri parametri patologici, tale metodica è in grado di identificare con precisione la presenza di disfunzione endoteliale precoce (*cut-off* del 40% per la *flow-mediated-dilatation*) e quindi di spiegare numerose condizioni in cui i parametri emodinamici risultino nei limiti della norma dopo l'esame dinamico (22).

Color Doppler

A **peno flaccido** le arterie cavernose sono ben visualizzabili solo all'origine. Nei minuti immediatamente successivi all'iniezione del farmaco si osserva una netta, simmetrica dilatazione delle arterie, che diventano esplorabili in tutta la loro lunghezza; si rendono evidenti anche i tronchi emergenti principali. Il colore delle arterie, inizialmente rosso perché il flusso è diretto verso la sonda, tende a diventare blu (fig 19.e.5a). Ciò avviene perché nel paziente normale si sviluppa una progressiva riduzione del flusso diastolico, fino all'inversione. Poiché il tempo

di diastole è superiore al periodo sistolico, il segnale dominante risulta essere quello del reflusso diastolico, in allontanamento rispetto alla sonda e perciò codificato in blu.

Nel periodo successivo alla **stimolazione farmacologica** diventano ben evidenti gli eventuali affluenti secondari e i normali vasi comunicanti, come le arterie trans-settali e le anastomosi cavernoso-spongiose.

Power Doppler

Il PWR rende possibile una vera e propria "eco-angiografia" delle cavernose e dei rami da esse emergenti (fig 19.e.11)(23). Il quadro normale dimostra la regolarità del calibro e del decorso delle cavernose.

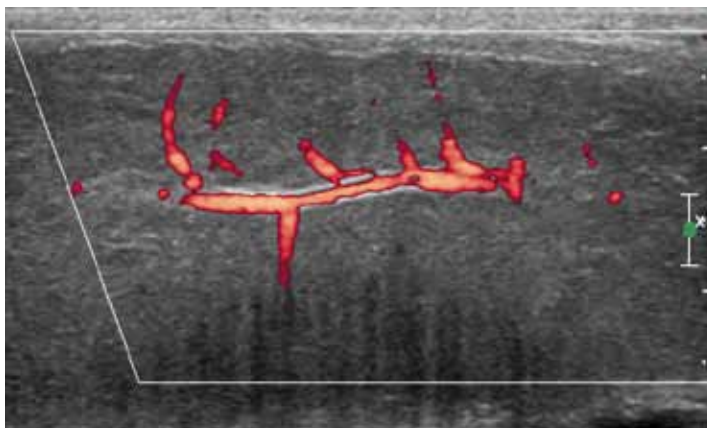


Figura 19.e.11

Doppler pulsato

In condizioni di **flaccidità** la curva velocitometrica presenta i

caratteri tipici dei flussi ad alto indice di resistenza. Il picco sistolico normale supera abbondantemente i 12 cm/sec, è acuminato ed è seguito da una brusca deflessione, che si negativizza nella protodiastole (fig 19.e.12a-b).

Nei primi minuti **dopo l'iniezione** del farmaco, il velocitogramma sale notevolmente con il picco sistolico e ha l'aspetto di un'onda continua per la presenza di un'elevata componente di flusso diastolico (fase 1). Solitamente entro 5-7 minuti si raggiunge la massima VPS e già si osserva un progressivo calo della velocità di flusso diastolico, con la comparsa di un'onda dicrota all'inizio della diastole (fase 2). Fra i 5 e i 10 minuti si ha la progressione alle fasi 3 e 4, con l'azzeramento prima ed il sottoslivellamento poi, della curva di flusso diastolico. Non sempre viene raggiunta la fase 5 (erezione piena), favorita dalla contrazione volontaria dei muscoli bulbo-cavernosi.

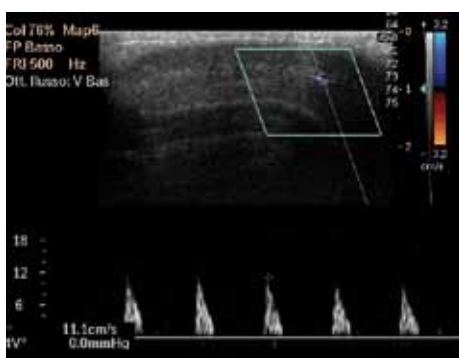


Figura 19.e.12a

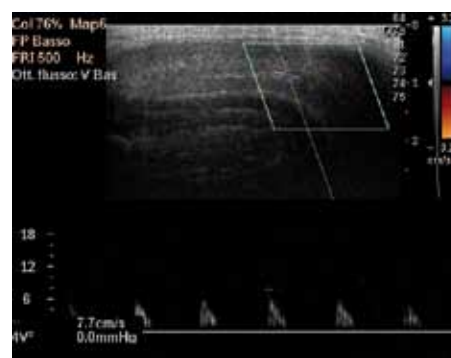


Figura 19.e.12b

Tabella 19.e.2
Parametri quantitativi dell'ECD normale

VPS	> 35 cm/sec
AT	< 110 msec
VTD	≤ 0 cm/sec
RI	> 0.90

Come interpretare i valori quantitativi patologici

VPS (24)

Sospettare alterazione arteriosa se VPS < 35 cm/sec:

- ipoafflusso arterioso lieve se VPS fra 34 e 30 cm/sec;
- ipoafflusso arterioso medio fra 25 e 29 cm/sec;
- ipoafflusso arterioso grave se VPS < 25 cm/sec (fig 19.e.10a-b).

Attenzione!!

- VPS < 25 cm/sec deve far porre il sospetto di malattia vascolare diffusa e suggerisce di estendere la valutazione ecografica alle arterie di altri distretti corporei, che in tali casi possono essere coinvolti nel 75% dei casi (25).
- Vi sono numerosi pazienti che presentano una significativa arteriopatia all'esame angiografico (26) anche se VPS > 25 cm/sec e pazienti con evidente arteriolopatia al PD delle cavernose con VPS assolutamente normali (27).
- Soggetti con arterie comunicanti valide (dorso-cavernose e cavernose accessorie con flussi comparabili con quelli dei tronchi principali) possono raggiungere un'erezione valida anche con valori di VPS più bassi di quelli ritenuti normali (28).
- Questo indice non ha validità assoluta (29) anche perché ha scarsa riproducibilità nel *follow-up* dei pazienti con DE (30). Pertanto la VPS è un parametro valido per la diagnosi morfo-funzionale del DE, ma non ha valore assoluto per quanto riguarda la malattia vascolare sistemica (31).
- La valutazione della VPS a pene flaccido recentemente proposta (32) è poco utile ai fini di uno studio vascolare accurato della dinamica erettiva.

AT

Alcuni Autori hanno trovato che AT > della soglia di 110 msec ha valore predittivo positivo molto elevato per arteriopatia (33). Tuttavia, questo parametro è molto variabile durante l'esecuzione dell'esame e deve essere valutato in maniera molto critica, al fine di esprimere un giudizio diagnostico accurato.

VTD e RI

Alcuni Autori (34-36), sulla base dei dati della cavernosometria, sostengono che VTD persistentemente ≥ 5 cm/sec dopo farmaco-stimolazione, in presenza di un normale afflusso arterioso, sarebbe indicativo di deficit veno-occlusivo (fig 19.e.10a-b).

Altri attribuiscono una notevole importanza all'indice di resistenza (37):

- RI > 0.90 indicherebbe uno stato di normalità;
- RI < 0.75 sarebbe suggestivo di "fuga venosa";
- RI tra 0.75 e 0.90 non diagnostico (sovrapposizione fra normali e deficit veno-occlusivo)(38).

L'informazione relativa al grado di veno-occlusione si ottiene, però, più semplicemente con l'analisi morfologica della curva velocitometrica, la cui forma consente di intuire addirittura l'entità della pressione endo-cavernosa. Per di più, quando la forma dell'onda inizia a riflettere una maggiore pulsatilità, l'uso dell'RI diventa assolutamente non appropriato, poiché velocitogrammi diversi, tipici di differenti gradi di resistenza, possono avere indici identici. Infine, l'uso di questi parametri non supera la difficoltà di differenziare fra deficit veno-occlusivo funzionale ed organico. Per tali motivi riteniamo che il raggiungimento stabile della fase 3 sia indicativo di un'adeguata veno-occlusione più dei valori assoluti di VTD e RI.

È stato dimostrato che un DE conseguente a disfunzione del meccanismo veno-occlusivo può derivare anche dall'alterazione delle arterie terminali (39), ma resta difficile differenziare fra patologia arteriosa e arteriolare utilizzando solo questi parametri. In arteriografia si sospetta una disfunzione arteriolare quando le branche delle elicine sono scarsamente visualizzabili negli ingrandimenti degli arteriogrammi, a dispetto di una buona visualizzazione delle arterie peniene (40). Tale criterio può essere correttamente applicato anche alla diagnostica con ECD. L'analisi morfologica del *pattern* vascolare ottenibile con il PWR ha ampiamente confermato l'esistenza del danno primitivamente arteriolare, dimostrando in alcuni pazienti il restringimento, la distorsione e la rarefazione di questi piccoli vasi.

Conclusioni

L'ECD peniena dinamica rappresenta una procedura sicura, specifica e ben tollerata nell'approccio diagnostico al DE.

Risulta utile nel discriminare la presenza di alterazioni anatomiche congenite o acquisite a carico dei corpi cavernosi (es. fibrosi, fratture, tumori) e/o dell'albuginea (morbo di La Peyronie).

Quasi il 70% dei DE è determinato dalla presenza di malattie sistemiche che alterano l'irrorazione arteriosa del pene. Il solo test di iniezione intracavernosa di alprostadil non offre indicazioni circa lo stato delle arterie. In accordo con la maggiore richiesta di esami mini-invasivi, l'ECD-PD combinata al test di farmaco-erezione rappresenta un'indagine vascolare di primo livello nello studio della funzione arteriosa e veno-occlusiva:

- bassi VPS indicano un deficit di afflusso arterioso;
- elevati VTD unitamente a bassi IR sono suggestivi di disfunzione del meccanismo veno-occlusivo.

L'iter diagnostico per il DE è cambiato in relazione alla disponibilità attuale di presidi terapeutici, che (oltre alla terapia ormonale per le endocrinopatie) vengono impiegati in progressione, dal meno al più invasivo: terapia orale, farmaco-infusione endo-cavernosa e protesi peniena. Ci si può giustamente chiedere quale valore possano avere ancora gli studi con ECD, quando la terapia di primo livello è sempre la stessa per qualunque causa di DE e con un semplice test con farmaci orali è possibile comprendere quali ulteriori mosse diagnostiche e terapeutiche è necessario intraprendere (41).

L'ECD ha un ruolo diagnostico fondamentale nel giovane paziente con DE primario ovvero secondario a trauma della pelvi, del perineo e del pene. La possibilità di restituire la normale funzione erettile con un intervento di rivascolarizzazione, liberando il paziente dal bisogno di farmaci, costituisce senz'altro un'indicazione assoluta alla diagnosi.

Il riconoscimento dell'eziologia del DE è importante anche nel soggetto anziano (42). L'ECD-PD può essere spesso predittiva di efficacia dei farmaci orali: esiste infatti una correlazione tra natura e severità del danno vascolare penieno e la risposta a farmaci orali quali il sildenafil,

con minore risposta in presenza di disfunzione veno-occlusiva severa ovvero di DE di tipo misto (43).

Infine è da sottolineare che il DE può essere il primo campanello d'allarme per i pazienti a rischio vascolare (44,45). L'esecuzione corretta di ECD-PD è in grado di riconoscere varie forme di vasospasmo, senza che il paziente abbia coscienza di questa sua somatizzazione dell'ansia. Deve pertanto essere eseguito da mani esperte (46), in quanto, se positivo per arteriopatia, dovrà comprendere quanto meno anche un esame morfologico dell'aorta, dei vasi iliaci, delle femorali e delle biforcazioni carotidee, alla ricerca di lesioni misconosciute che potrebbero mettere a rischio la vita stessa del paziente.

Bibliografia

1. Fabbri A, Caprio M, Aversa A. Pathology of erection. *J Endocrinol Invest* 2003, 26, 3 Suppl: 87-90.
2. Sarteschi LM, Aversa A. Il ruolo dell'eco-color-doppler peniena dinamica nell'approccio al paziente con deficit erettile. *Giorn Ital Med Sess Riprod* 2006, 13: 149-58.
3. Montorsi F, Sarteschi M, Maga T, Guazzoni G, Fabris GF, Rigatti P, Pizzini G, Miani A. Functional anatomy of cavernous helicine arterioles in potent subjects. *J Urol* 1998, 159: 808-10.
4. Aversa A, Isidori AM, Caprio M, Cerilli M, Frajese V, Fabbri A. Penile pharmacotesting in diagnosing male erectile dysfunction: evidence for lack of accuracy and specificity. *Int J Androl* 2002, 25: 6-10.
5. Allen RP, Engel RM, Smolev JK, Brendler CB. Comparison of duplex ultrasonography and nocturnal penile tumescence in evaluation of impotence. *J Urol* 1994, 151: 1525-9
6. Montorsi F, Guazzoni G, Barbieri L, Galli L, Rigatti P, Pizzini G, Miani A. The effect of intracorporeal injection plus genital and audiovisual sexual stimulation versus second injection on penile color Doppler sonography parameters. *J Urol* 1996, 155: 536-40.
7. Sarteschi LM, Littara A, Rossi P, Simi S, Turchi P, Sciboma M, Cilurzo P, Menchini Fabris GF. Farmaci e metodiche di esecuzione dell'eco-color-Doppler peniena dinamica. *Giorn Ital Androl* 1996, 4: 130-3.
8. Aversa A, Bonifacio V, Moretti C, Frajese G, Fabbri A. Re-dosing of prostaglandin-E1 versus prostaglandin-E1 plus phenolamine in male erectile dysfunction: a dynamic color power Doppler study. *Int J Impot Res* 2000, 12: 33-40.
9. Leriche R, Morel A. The syndrome of thrombotic obliteration of aortic bifurcation. *Ann Surg* 1948, 127: 193-200.
10. Kim SH, Paick JS, Lee SE, Choi BI, Yeon KM, Han MC. Doppler sonography of deep cavernosal artery of the penis: variation of peak systolic velocity according to sampling location. *J Ultrasound Med* 1994, 13: 591-4.
11. Jarow JB, Pugh VW, Routh WD, Dyer RB. Comparison of penile duplex ultrasonography to pudendal arteriography. Variant penile arterial anatomy affects interpretation of duplex ultrasonography. *Invest Radiol* 1993, 28: 806-10.
12. Chiou RK, Alberts GL, Pomeroy BD, Anderson JC, Carlson LK, Anderson JR, Wobig RK. Study of cavernosal arterial anatomy using color and power Doppler sonography: impact on hemodynamic parameter measurement. *J Urol* 1999, 162: 358-60.
13. Patel U, Amin Z, Friedman E, Vale J, Kirby RW, Lees WR. Colour flow and spectral Doppler imaging after papaverine-induced penile erection in 220 impotent men: study of temporal patterns and the importance of repeated sampling, velocity asymmetry and vascular anomalies. *Clin Radiol* 1993, 48: 18-24.
14. Aversa A, Rocchietti-March M, Caprio M, Giannini D, Isidori A, Fabbri A. Anxiety-induced failure in erectile response to intracorporeal prostaglandin-E1 in non-organic male impotence: a new diagnostic approach. *Int J Androl* 1996, 19: 307-13.
15. Lue TF, Hricak H, Marich KW, Tanagho EA. Vasculogenic impotence evaluated by high-resolution ultrasonography and pulsed Doppler spectrum analysis. *Radiology* 1985, 155: 777-81.
16. Krysiewicz S, Mellinger BC. The role of imaging in the diagnostic evaluation of impotence. *Am J Roentgenol* 1989, 153: 1133-9.
17. Quam JP, King BF, James EM, Lewis RW, Brakke DM, Ilstrup DM, Parulkar BG, Hattery RR. Duplex and color Doppler sonographic evaluation of vasculogenic impotence. *Am J Roentgenol* 1989, 153: 1141-7.
18. Benson CB, Vickers MA. Sexual impotence caused by vascular disease: diagnosis with duplex sonography. *Am J Roentgenol* 1989, 153: 1149-53.
19. Meuleman EJ, Bemelmans BL, van Asten WN, Doesburg WH, Skotnicki SH, Debruyne FM. Assessment of penile blood flow by duplex ultrasonography in 44 men with normal erectile potency in different phases of erection. *J Urol* 1992, 147: 51-6.
20. Bagi P, Sillesen H, Hansen HJ. Quantitative Doppler ultrasound evaluation of occlusive arterial disease in the lower limb. *Eur J Vasc Surg* 1988, 2: 409-15.

21. Virag R, Floresco J, Richard C. Impairment of shear-stress-mediated vasodilation of cavernous arteries in erectile dysfunction. *Int J Impotence Res* 2004, 16: 39-42.
22. Aversa A, Greco E, Bruzzichesi R, Pili M, Rosano G, Spera G. Relationship between chronic tadalafil administration and improvement of endothelial function in men with erectile dysfunction: a pilot study. *Int J Impot Res* 2007, 19: 200-7.
23. Montorsi F, Sarteschi M, Maga T, Guazzoni G, Menchini Fabris GF, Rigatti P, Pizzini G, Miani A. Functional anatomy of cavernous helicine arterioles in potent subjects. *J Urol* 1998, 159: 808-10.
24. Benson CB, Aruny JE, Vickers MA Jr. Correlation of duplex sonography with arteriography in patients with erectile dysfunction. *Am J Roentgenol* 1993, 160: 71-3.
25. Vicari E, Arcidiacono G, Di Pino L, Signorelli S, Arancio A, Sorrentino F, Battiato C, D'Agata R, Calogero AE. Incidence of extragenital vascular disease in patients with erectile dysfunction of arterial origin. *Int J Impotence Res* 2005, 17: 277-82.
26. Valji K, Bookstein JJ. Diagnosis of arteriogenic impotence: efficacy of duplex sonography as a screening tool. *Am J Roentgenol* 1993, 160: 65-9.
27. Sarteschi LM, Montorsi F, Fabris FM, Guazzoni G, Lencioni R, Rigatti P. Cavernous arterial and arteriolar circulation in patients with erectile dysfunction: a power Doppler study. *J Urol* 1998, 159: 428-32.
28. Mancini M, Bartolini M, Maggi M, Innocenti P, Forti G. The presence of arterial anatomical variations can affect the results of duplex sonographic evaluation of penile vessels in impotent patients. *J Urol* 1996, 155: 1919-23.
29. Rajifer J, Canan V, Dorey FJ, Mehringer MC. Correlation between penile angiography and duplex scanning of cavernous arteries in impotent men. *J Urol* 1990, 143: 1128-30.
30. Millis RD, Sethia KK. Reproducibility of penile arterial colour duplex ultrasonography. *Br J Urol* 1996, 78: 109-12.
31. Bocchio M, Scarpelli P, Necozone S, Pelliccione F, Spartera C, Francavilla F, Francavilla S. Penile duplex pharmaco-ultrasonography of cavernous arteries in men with erectile dysfunction and generalized atherosclerosis. *Int J Androl* 2006, 29: 496-501.
32. Roy C, Saussine C, Tuchmann C, Castel E, Lang H, Jacqmin D. Duplex Doppler sonography of the flaccid penis: potential role in the evaluation of impotence. *J Clin Ultrasound* 2000, 28: 290-4.
33. Speel TGW, Van Langen H, Wijkstra H, Meuleman EJH. Penile duplex pharmaco-ultrasonography revisited: revalidation of the parameters of the cavernous arterial response. *J Urol* 2003, 169: 216-20.
34. Fitzgerald SW, Erickson SJ, Foley WD, Lipchik EO, Lawson TL. Color Doppler sonography in the evaluation of erectile dysfunction: patterns of temporal response to papaverine. *Am J Roentgenol* 1991, 157: 331-6.
35. Wilkins CJ, Sriprasas S, Sidhu PS. Colour Doppler Ultrasound of the Penis. *Clin Radiol* 2003, 58: 514-23.
36. Cornud F, Boisrond L, Bonnel D, Dadoun D, Casanova JM, Lepage T, Meuriot N, Pruneau JC, Souissi M. Color doppler echography in the exploration of vasculogenic impotence. *Progr Urol* 1992, 2: 420-6.
37. Merckx LA, De Bruyne RM, Goes E, Derde MP, Keuppens F. The value of dynamic color duplex scanning in the diagnosis of venogenic impotence. *J Urol* 1992, 148: 318-20.
38. Altinkilic B, Hauck EW, Weidner W. Evaluation of penile perfusion by color-coded duplex sonography in the management of erectile dysfunction. *World J Urol* 2004, 22: 361-4.
39. Wespes E, Raviv G, Vanegas JP, Decaestecker C, Petein M, Danguy A, Schulman CC, Kiss R. Corporeal veno-occlusive dysfunction: a distal arterial pathology? *J Urol* 1998, 160: 2054-7.
40. Bookstein JJ, Valji K. The arteriolar component of impotence: a possible paradigm shift. *Am J Roentgenol* 1991, 157: 932-4.
41. Foresta C, Caretta N, Aversa A, Bettocchi C, Corona G, Mariani S, Rossato M. Erectile dysfunction: symptom or disease? *J Endocrinol Invest* 2004, 27: 80-95.
42. Aversa A, Bruzzichesi R, Spera G. Diagnosing erectile dysfunction: the penile dynamic colour duplex ultrasound revisited. *Int J Androl* 2005, 28 Suppl 2: 61-63.
43. Mulhall J, Barnas J, Aviv N, Anderson M, Parker M. Sildenafil citrate response correlates with the nature and the severity of penile vascular insufficiency. *J Sex Med* 2005, 2: 104-8.
44. Kirby M, Jackson G, Betteridge J, Friedli K. Is erectile dysfunction a marker for cardiovascular disease? *Int J Clin Pract* 2001, 55: 614-8.
45. Aversa A, Bruzzichesi R, Pili M, Spera G. Phosphodiesterases type 5 inhibitor drugs in the treatment of erectile dysfunction. *Curr Pharm Des* 2006, 12: 3467-84.
46. Aversa A, Sarteschi LM. The role of penile color-Duplex ultrasound for the evaluation of erectile dysfunction. *J Sex Med* 2007, 4: 1437-47.

19.f. Agoaspirato testicolare ed esame citologico

Andrea Garolla & Carlo Foresta
(per la scheda infermieristica cfr cap 23b)

Introduzione

La spermatogenesi

È un processo complesso, che richiede un'ordinata progressione attraverso replicazioni cellulari, mitotiche e meiotiche.

Affinchè essa abbia inizio, è necessario che durante lo sviluppo embrionale e fetale una parte delle cellule si differenzino in direzione della linea germinale e che migrino a livello della futura gonade, dove rimarranno quiescenti fino alla pubertà. In questa fase, a seguito della stimolazione ormonale da parte delle gonadotropine sulle cellule di Leydig e del Sertoli, si attiva la spermatogenesi.

Dopo le divisioni mitotiche spermatogoniali, gli spermatociti primari vanno incontro alla prima divisione meiotica con formazione di spermatociti secondari (cellule aploidi con doppi cromatidi). Questi ultimi, al termine della seconda meiosi, si trasformano dapprima in spermatidi rotondi (cellule aploidi con singoli cromatidi), poi in spermatidi allungati attraverso successive modificazioni morfologiche (processo denominato spermiogenesi), ed infine in spermatozoi.

L'agoaspirazione testicolare mediante ago sottile

Proposta per la prima volta nel 1992, è attualmente considerata una tecnica di rapida esecuzione, minimamente invasiva e facilmente riproducibile, utilizzata per lo studio dell'epitelio seminifero e del processo spermatogenetico in soggetti infertili affetti da azoospermia o severa oligozoospermia.

In questi soggetti tale metodica ricopre una grande importanza per almeno tre **fini**:

- **diagnostici**, per la comprensione dello stato tubulare;
- **prognostici**, per prevedere i risultati di una terapia o di una biopsia testicolare;
- **terapeutici**, per recuperare spermatozoi da utilizzare per tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA).

Tabella 19.f.1

Indicazioni e significato per l'esecuzione della citologia testicolare

Quadro clinico	Significato
Azoospermia ostruttiva	diagnostico/terapeutico
Azoospermia non ostruttiva	diagnostico/prognostico
Criptoospermia	diagnostico/prognostico
Severa oligozoospermia	diagnostico/prognostico
Necrozoospermia del 100%	diagnostico/prognostico/terapeutico

Esecuzione

L'agoaspirazione viene eseguita bilateralmente in ogni paziente, utilizzando un sottile ago "butterfly" di calibro 23 Gauge, precedentemente raccordato ad una siringa sterile da 50 mL. A paziente disteso e dopo accurata disinfezione della cute scrotale, si pratica anestesia superficiale con cloruro di etile, si ferma il testicolo manualmente subito al di sotto della superficie scrotale e con manovra rapida e decisa si inserisce l'ago tra il III medio ed il III superiore dell'organo, aspirando ripetutamente fino ad osservare fuoriuscita di fluido tubulare. Estratto l'ago, si pratica emostasi con garza sterile; il materiale prelevato viene depositato e strisciato delicatamente su due o più vetrini porta-oggetto, precedentemente contrassegnati con il nome del paziente e il lato del prelievo. Per maggiore prudenza, il paziente viene lasciato disteso per altri 10 minuti ed a riposo da sforzi fisici intensi per l'intera giornata. Seppur molto raramente, sono stati riportati casi di ematomi, ematoceli e/o segni flogistici locali, pertanto è consigliabile un tempestivo controllo ecografico nei pazienti sintomatici.

Una volta strisciato, il materiale viene lasciato essiccare all'aria a temperatura ambiente per almeno 24 ore e poi colorato con colorazione May-Grünwald-Giemsa. In caso sia necessario l'esito dell'indagine in breve tempo, è possibile effettuare una fissazione rapida del preparato in acetone per 4-5 minuti e successiva immediata colorazione.

La lettura viene eseguita al microscopio ottico, inizialmente a piccolo ingrandimento (125X), per individuare le zone con più omogenea distribuzione e miglior preservazione cellulare, successivamente a medio ingrandimento (500X) ed infine a maggior ingrandimento (1250X) con obiettivo ad immersione per il riconoscimento dei vari elementi cellulari.

L'individuazione dei vari tipi cellulari viene effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche, sia nucleari che citoplasmatiche, osservate a massimo ingrandimento. Per ogni preparato devono essere contate almeno 200 cellule consecutive della serie spermatogenetica, che vanno distinte in spermatogoni, spermatociti primari, spermatociti secondari, spermatidi rotondi, spermatidi allungati e spermatozoi, e tutte le cellule del Sertoli osservate negli stessi campi microscopici, calcolando le relative percentuali.

La percentuale ottenuta dal rapporto tra il numero di spermatozoi rispetto al totale delle cellule spermatogenetiche viene espressa come **indice spermatico (SI)**, mentre la percentuale ottenuta dal rapporto tra il numero delle cellule del Sertoli rispetto al numero totale di cellule spermatogenetiche è definita come **indice sertoliano (SEI)**.

Letture

Valutazione qualitativa

All'analisi microscopica dei preparati ottenuti mediante agoaspirazione testicolare è possibile distinguere in maniera precisa i singoli elementi della spermatogenesi e le cellule del Sertoli. Il riconoscimento dei singoli elementi cellulari si basa sulle peculiari caratteristiche morfologiche e tintoriali tipiche di ciascuna cellula ottenute con la suddetta colorazione.

Spermatogoni. Presentano diametro medio di 15-18 μm , citoplasma basofilo rotondeggiante, non chiaramente delineato, nucleo voluminoso e più largo di quello delle cellule del Sertoli, con caratteristiche cromatiniche diverse a seconda del tipo. Nell'uomo sono stati identificati tre diversi tipi di spermatogoni:

- A *dark* (Ad), con cromatina intensamente colorata (violetto scuro in Giemsa) con un'area semilunare periferica, ancora più densa e colorata, rappresentano le cellule staminali che,

in seguito a divisione mitotica, possono dare origine a nuove cellule staminali Ad oppure agli spermatogoni Ap;

- A *pale* (Ap), con cromatina pallidamente colorata, con un'area più intensamente colorata in periferia lungo il contorno nucleare, sono spermatogoni più differenziati;
- B, con cromatina ancora ben colorata alla periferia del nucleo ma a zolle diffusamente colorate in regione centrale, derivano dalla divisione mitotica degli Ap, che, attraverso una successiva mitosi, danno luogo agli spermatociti primari.

Spermatociti primari. Presentano un diametro nucleare simile a quello spermatogoniale, citoplasma intensamente basofilo, nucleo di forma lievemente ovalare con un unico nucleolo in posizione eccentrica, cromatina intensamente colorata, di aspetto filamentoso o a zolle a seconda dei diversi stadi della profase meiotica.

Spermatociti secondari. Hanno diametro medio di 13-14 μm , citoplasma debolmente basofilo, nucleo centrale più piccolo di quello degli spermatociti primari, cromatina finemente e uniformemente granulare.

Spermatidi: classicamente se ne distinguono due tipi:

- spermatidi rotondi (Sab), hanno nucleo centrale, solo in parte condensato, di forma rotondeggiante o irregolarmente triangolare, con cromatina finemente ed omogeneamente granulare, debolmente colorata e citoplasma debolmente basofilo;
- spermatidi allungati (Scd), con cromatina omogeneamente condensata ed intensamente colorata, nucleo eccentrico, allungato e triangolare, citoplasma più scuro, una parte del quale si stacca nel corso del processo maturativo e va a localizzarsi a livello del *middle-piece*, mentre inizia ad evidenziarsi la coda.

Spermatozoi. Si caratterizzano per la completa formazione della coda e dell'acrosoma, che appare come un'areola pallidamente colorata disposta a cappuccio sulla testa dello spermatozoo, ormai dalla chiara forma allungata e con cromatina omogenea e ben colorata. Talora possono presentare piccoli residui citoplasmatici a livello del *middle-piece* od essere privi della coda come conseguenza dello striscio su vetrino, o essere immersi nel citoplasma di cellule del Sertoli prima del rilascio nel lume tubulare.

Cellule del Sertoli. Hanno una membrana citoplasmatica molto delicata, che viene facilmente danneggiata durante lo striscio, per cui possono apparire sprovviste di citoplasma. Nelle cellule ben conservate il nucleo appare rotondo o appena ovalare, di aspetto finemente granulare per la presenza di cromatina disposta a zolle discretamente colorate, con un unico nucleolo eccentrico; il citoplasma è voluminoso, di forma triangolare o poligonale, spesso vacuolato e a contorni sfumati.

Valutazione quantitativa

Per ogni preparato devono essere contate almeno 200 cellule consecutive della serie spermatogenetica, che vanno distinte in spermatogoni, spermatociti primari e secondari, spermatidi rotondi ed allungati e spermatozoi, calcolando le relative percentuali, l'indice sertoliano (SEI) e l'indice spermatico (SI).

Interpretazione clinica

Quadri citologici nelle normozoospermie

Si caratterizzano per la presenza di tutte le cellule spermatogenetiche, con prevalenza delle forme più mature rispetto a quelle immature e alle cellule del Sertoli (fig 19.f.1).

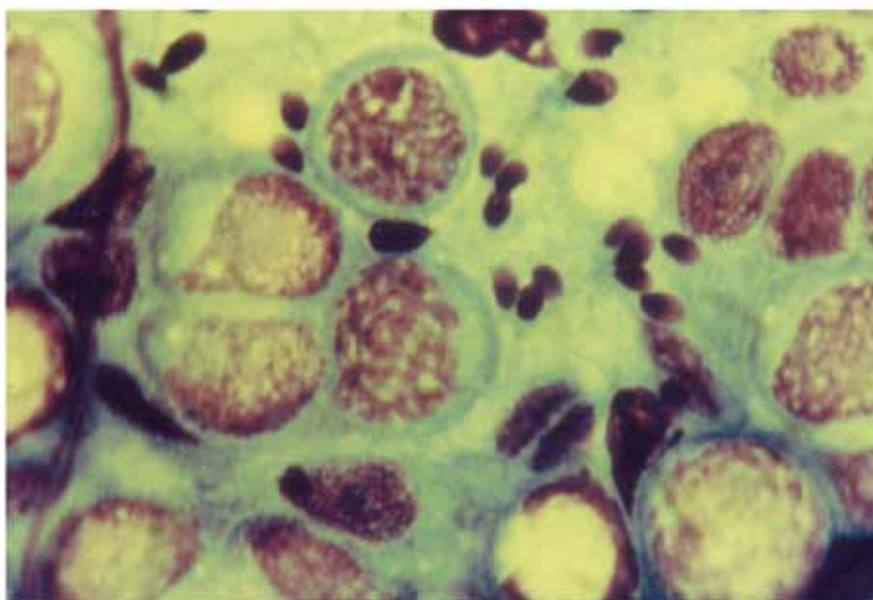


Figura 19.f.1

In particolare le forme più rappresentate sono gli spermatidi Sab e Scd, in accordo con la progressione geometrica cui vanno incontro le cellule a partire dallo stadio di spermatogonio fino a quello di spermatoide. Una simile progressione numerica non si verifica a carico degli spermatociti primari e secondari, che presentano percentuali analoghe, a causa del breve tempo di maturazione degli spermatociti secondari (circa 24 ore). La percentuale di spermatozoi non risulta superiore a quella degli spermatidi, in conseguenza della mancanza di un'ulteriore divisione cellulare e della rapida esfoliazione degli spermatozoi nel lume tubulare e nelle vie escrettrici. In questi preparati, le cellule del Sertoli rappresentano circa un terzo di tutte le cellule testicolari visualizzabili e la loro percentuale è del 30-50% rispetto al totale delle cellule della spermatogenesi.

Tabella 19.f.2

Valutazione citologica quantitativa (%) nel soggetto normale

Tipo di cellula	Media \pm DS
Spermatogoni	2.5 \pm 2.2
Spermatociti primari	6.0 \pm 3.6
Spermatociti secondari	3.9 \pm 2.3
Spermatidi Sab	15.2 \pm 5.8
Spermatidi Scd	37.9 \pm 12.9
Indice spermatico (SI)	34.8 \pm 13.3
Indice sertoliano (SEI)	30 \pm 19.5

Quadri citologici nelle azoospermie

L'esame citologico testicolare permette di distinguere in maniera certa le azoospermie di natura secretiva da quelle di natura escretoria, conseguenti ad ostruzione delle vie seminali.

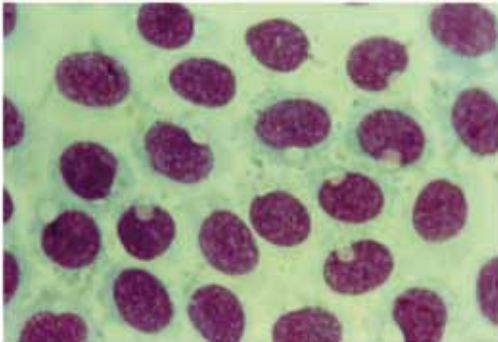


Figura 19.f.2
S. a sole cellule di Sertoli

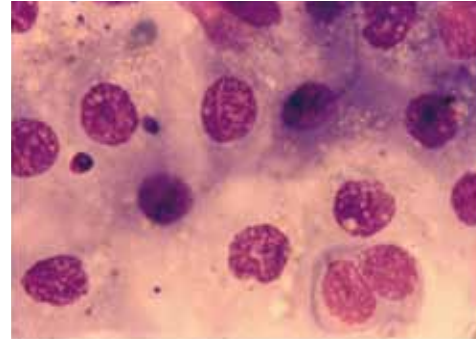


Figura 19.f.3
Grave ipospermatogenesi

Nei quadri di **s. a sole cellule di Sertoli** (fig 19.f.2) mancano completamente gli elementi della linea germinale.

Le gravi **ipospermatogenesi** (fig 19.f.3) sono caratterizzate dalla marcata riduzione della componente germinativa, con incremento della percentuale di cellule del Sertoli (indice SEI). Spesso sono presenti importanti anomalie nella progressione maturativa spermatica e fenomeni di rallentamento maturativo, responsabili dell'aumento percentuale di spermatogoni e/o spermatociti primari e della marcata riduzione o assenza di spermatozoi (SI = 0).

Negli **arresti maturativi** viene conservato il normale rapporto tra cellule di Sertoli e cellule spermatogenetiche, ma sono presenti importanti disturbi maturativi, con aumento della percentuale di spermatogoni e spermatociti primari e corrispondente decremento delle forme più a valle, fino alla completa assenza di elementi maturi. Poiché il *feed-back* negativo sulla secrezione di FSH coinvolge solo le cellule spermatogenetiche più mature, i quadri di blocco maturativo precoce (a livello spermatogoniale-spermatocitico primario) si associano ad incremento di FSH, mentre quelli tardivi (a livello spermatocitico secondario-spermatidico) si accompagnano a normali livelli di gonadotropina.

Infine, nelle **azoospermie escretorie** la citologia testicolare evidenzia un normale andamento maturativo germinale, con presenza di tutte le cellule spermatogenetiche e frequente incremento percentuale delle forme mature, espresso dall'indice SI.

Quadri citologici nelle oligozoospermie

Analogamente a quanto detto per le azoospermie, è possibile individuare quadri citologici caratterizzati da ipospermatogenesi e/o da blocchi maturativi parziali e quadri con ostruzione parziale delle vie seminali.

Nelle **ipospermatogenesi** l'entità dell'incremento dell'indice SEI esprime il grado di alterazione e compromissione della componente spermatogenetica; è presente una difficoltosa progressione maturativa, con prevalenza di elementi immaturi ed indice spermatico (SI) ridotto ma diverso da zero.

Negli **arresti maturativi** è presente un incremento percentuale delle forme a monte del blocco, con riduzione, ma mai assenza, delle forme mature e frequente associazione con fenomeni cellulari di tipo degenerativo (elementi multinucleati o in fase di anomala divisione).

Conclusioni

La corretta comprensione dello stato tubulare responsabile dell'alterazione seminale è fondamentale, sia per la diagnosi sia per stabilire una corretta opzione terapeutica, mirata all'esigenza clinica di ciascun soggetto. Tale indagine permette di distinguere le azoospermie ed oligozoospermie di natura ostruttiva da quelle di natura secretiva e, nell'ambito di queste ultime, consente di individuare i diversi gradi di ipospermatogenesi, associati o meno a turbe maturative. Inoltre, nei soggetti con azoospermia ostruttiva permette di recuperare spermatozoi da utilizzare per tecniche di procreazione medicalmente assistita mentre in quelli con azoospermia non ostruttiva consente di prevedere la possibilità di recuperare spermatozoi mediante biopsia testicolare. Infine nei soggetti che presentano una completa e ripetuta necrozoospermia (100% di forme non vitali nel liquido seminale), qualora l'alterazione sia di natura post-testicolare essa consente il recupero e l'utilizzo di spermatozoi competenti per tecniche di fecondazione in vitro.

Bibliografia

- Foresta C, Varotto A, Scandellari C. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject. *Fertil Steril* 1992, 57: 858-65.
- Foresta C, Ferlin A, Bettella A, Rossato M, Varotto A. Diagnostic and clinical features in azoospermia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995, 43: 537-43.
- Foresta C, Varotto A. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the oligospermic subject. *Fertil Steril* 1992, 58: 1028-33.
- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in men. *Amer J Anat* 1963, 112: 35-51.
- Clermont Y. Spermatogenesis in men. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril* 1966, 17: 705-21.
- Shefi S, Kaplan K, Turek PJ. Analysis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermic and virtually azoospermic men with known testicular pathology. *Reprod Biomed Online* 2009, 18: 460-4.

19.g. Biopsia testicolare

Sandro Francavilla

Fiore Pelliccione, Giuliana Cordeschi, Anatolia D'Angeli
(per la scheda infermieristica cfr cap 23b)

Introduzione

La biopsia testicolare nasce come strumento diagnostico nel soggetto azoospermico, per differenziare l'azoospermia da cause testicolari da quella post-testicolare. L'avvento delle moderne tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) ha modificato radicalmente le finalità e l'uso clinico della biopsia testicolare. Nella valutazione del soggetto azoospermico, la biopsia testicolare rappresenta una procedura finalizzata al prelievo ed alla crioconservazione di spermatozoi testicolari da utilizzare in un programma di fecondazione assistita mediante iniezione intracitoplasmatica ovocitaria (ICSI).

Per l'approccio clinico al paziente azoospermico cfr cap 14.

Per la valutazione dell'esame seminale cfr cap 19c.

Per una *flow-chart* sull'azoospermia cfr cap 25.b.3.

Indicazioni

Sulla base del volume dell'eiaculato si deciderà come gestire il paziente azoospermico.

Normale volume dell'eiaculato (≥ 1 mL)

- **FSH elevato:** al momento, sulla base anche di opinioni di consenso internazionali, non vi è alcuna indicazione per una biopsia testicolare puramente a scopo diagnostico, pertanto si eseguirà tale procedura esclusivamente se si dispone di possibilità di isolamento e crioconservazione degli spermatozoi testicolari.
- **FSH normale e normale volume testicolare:** è indicato il ricorso a citoaspirato testicolare con ago sottile (FNAC) (cfr cap 19f), metodica certamente meno invasiva della biopsia testicolare. In caso di facile recupero di spermatozoi, l'iter diagnostico si fermerà, perché si tratterà di una condizione di spermatogenesi completa o con difetto non severo. In caso di successivo ricorso a fecondazione assistita, si procederà a nuovo citoaspirato testicolare il giorno del recupero ovocitario e gli spermatozoi freschi potranno essere utilizzati per la ICSI.

Ridotto volume dell'eiaculato (< 1 mL)

Una volta esclusa una condizione di ipogonadismo ipogonadotropo, la riduzione del volume dell'eiaculato sarà indicativa di ostruzione dei dotti eiaculatori o più raramente di disfunzione eiaculatoria, che generalmente si associa ad aspermia. La biopsia testicolare non trova indicazioni nel percorso diagnostico dell'azoospermia post-testicolare con ridotto volume dell'eiaculato, se naturalmente la condizione si associa a normale volume testicolare e normale livello di FSH. Sarà quindi opportuno ricorrere a FNAC per accertarsi della normale funzione spermatogenetica testicolare.

Esecuzione, processamento ed interpretazione

Esecuzione

Si potrà optare per una biopsia bilaterale o monolaterale in anestesia locale sul testicolo di maggiori dimensioni ed in migliore stato sulla base di un esame ecografico. In caso di biopsie multiple, sarà invece più opportuno ricorrere ad anestesia generale.

In alcuni centri si pratica anche biopsia testicolare mediante microdissezione: si tratta di una tecnica microchirurgica estremamente lunga, quindi in anestesia generale, che prevede l'evaginazione dei testicoli e la loro apertura a libro dopo incisione longitudinale dell'albuginea.

Al momento non vi è consenso sulle indicazioni specifiche ai diversi approcci di prelievo bioptico.

Processamento

La maggior parte del prelievo sarà utilizzata per il recupero di spermatozoi, ponendo pertanto il tessuto, in condizione di assoluta sterilità, in terreno di coltura ed inviandolo al laboratorio seminologico per l'isolamento e la conservazione degli spermatozoi.

Un piccolo frammento di tessuto sarà invece posto in fissativo per l'esame istologico. Il parenchima testicolare non va fissato in formalina, perché tale procedura si associa a numerosi artefatti (raggrinzimento cellulare e disorganizzazione dell'epitelio seminifero) con conseguente difficile successiva valutazione istologica. I fissativi maggiormente utilizzati sono il liquido di Bouin o similari, oppure glutaraldeide qualora si voglia procedere ad inclusione in resine epossidiche, "gold standard" per la citologia testicolare.

Interpretazione

L'analisi istologica dovrà seguire precise regole per poter fornire un'interpretazione confrontabile e riproducibile.

- **Uniformità dei caratteri istologici.** Poiché l'istopatologia testicolare è spesso eterogenea, in caso di presenza di quadri diversi nei tubuli seminiferi andrà riferita la proporzione di ciascun quadro. La valutazione andrebbe eseguita su almeno 25 sezioni trasversali di tubulo seminifero per campione.
- **Numero di spermatidi maturi.** In caso di spermatogenesi completa, andrebbe riferito il numero medio di spermatidi per tubulo seminifero in fase avanzata di maturazione, cioè con nucleo condensato e di forma allungata (fig 19.g.1.A). Quando a giudizio del patologo il numero di spermatidi in maturazione avanzata è ridotto, andrebbe evitata una terminologia qualitativa (come ipospermatogenesi "moderata" o "severa") per la sua ovvia soggettività.
- **Parete contrattile.** Va considerato lo stato della parete del tubulo seminifero, utilizzando il termine di fibrosi peritubulare in caso di accumulo di collagene. Il termine di scleroialinosi completa va riservato ai tubuli seminiferi privi di epitelio e costituiti solo da accumulo di collagene (fig 19.g.2.E).
- **Interstizio.** Si descriverà la presenza di cellule di Leydig anormali, quali accumulo di lipofuscine, assenza di cristalli di Reinke, incarceramento per accumulo di collagene pericellulare. Infine si descriverà un eventuale aumento di numero di cellule di Leydig, allorquando queste costituiscano ammassi voluminosi come si osserva in corso di sindrome di Klinefelter (fig 19.g.2.F).

Principali fenotipi testicolari

Spermatogenesi conservata (fig 19.g.1.A): tutti i tubuli seminiferi presentano spermatidi in fase avanzata di maturazione. Va indicato il numero medio di spermatidi con nucleo condensato.

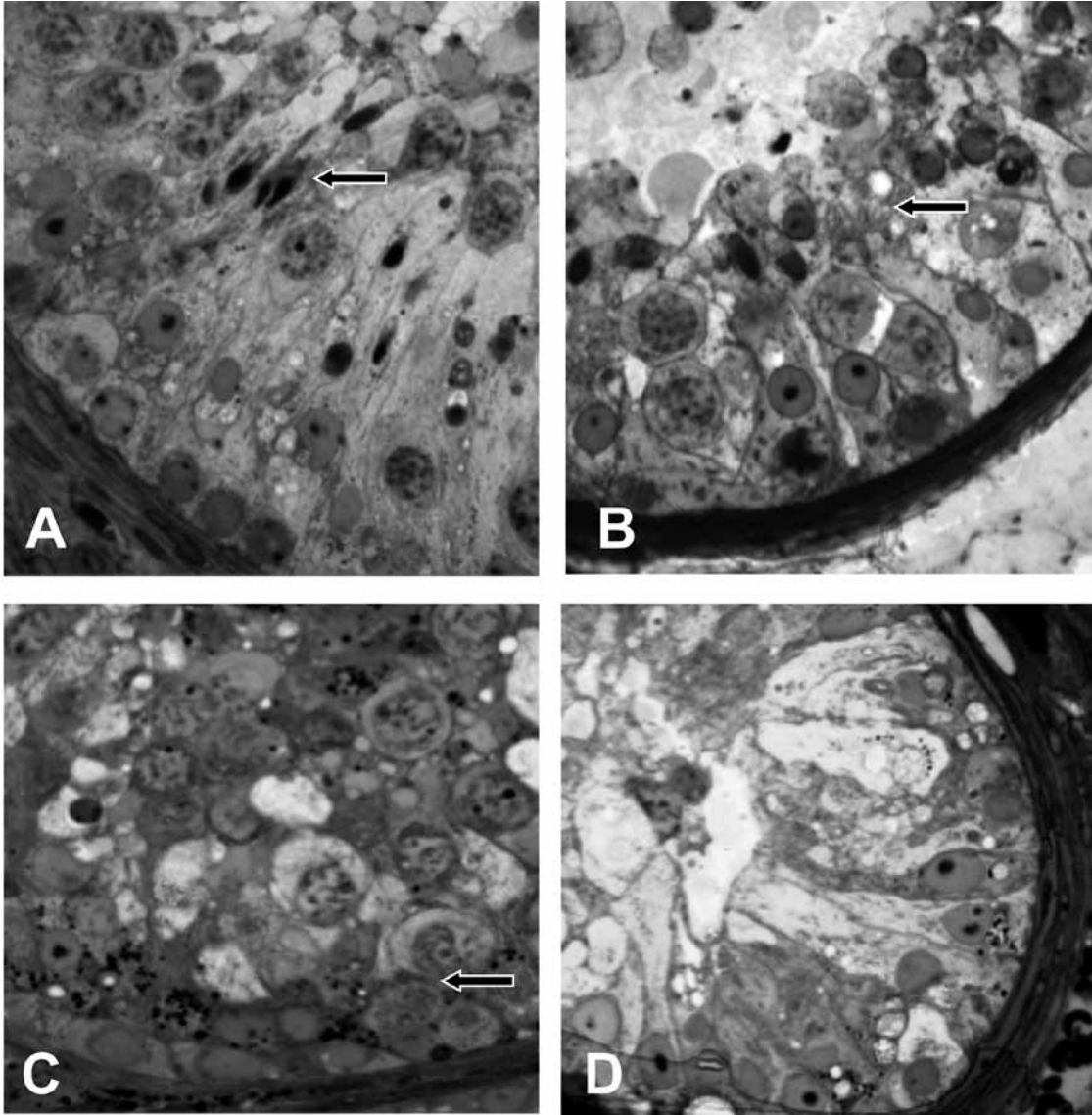


Figura 19.g.1

Prelievo bioptico fissato in glutaraldeide ed incluso in resina epossidica.

Le sezioni sono state colorate con blu di toluidina.

- A.** Spermatogenesi conservata: gli spermatozoi maturi hanno nuclei di forma affusolata e con cromatina compatta (freccia).
- B.** Alterata spermiogenesi: gli spermatozoi maturi sono rari e con nuclei incompletamente affusolati (freccia).
- C.** Arresto meiotico: le cellule germinali maturano sino allo spermatozoo di primo ordine (freccia).
- D.** Tubulo con sole cellule di Sertoli: l'epitelio seminifero è costituito solo da cellule di Sertoli.

Alterata spermiogenesi (fig 19.g.1.B): tubuli seminiferi con spermatogenesi che procede sino allo spermatide maturo, ma questi ultimi risultano scarsamente rappresentati e malformati.

Arresto meiotico (fig 19.g.1.C): le cellule germinali maturano sino allo stadio di spermatozoi di primo ordine. L'arresto a livello spermatidico, cioè con spermatidi tondi e nessuno spermatide in fase più avanzata di maturazione, non rappresenta un fenotipo specifico, in quanto l'attenta osservazione dei tubuli seminiferi rileva sempre la presenza di almeno alcuni spermatidi in fase di avanzata spermiogenesi.

Tubuli con sole cellule di Sertoli (fig 19.g.1.D): il tubulo seminifero è popolato da sole cellule di Sertoli.

Scleroialinosi (fig 19.g.2.E): i tubuli seminiferi non presentano epitelio e sono costituiti solo da collagene.

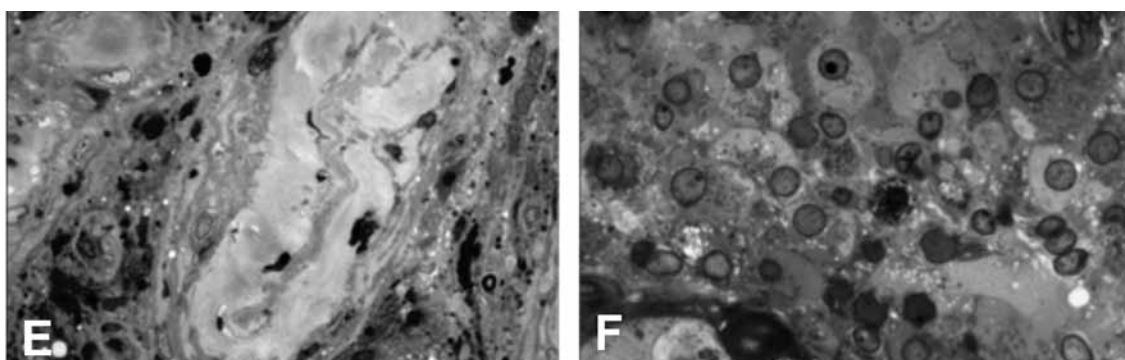


Figura 19.g.2

E. Scleroialinosi: il tubulo seminifero è sostituito da una struttura tubulare fibrotica.

F. L'interstizio intertubulare è occupato da un ammasso di cellule di Leydig in un caso di s. di Klinefelter.

Alcuni concetti da ricordare

- Spermatogenesi conservata è indicativa di una **causa post-testicolare** di azoospermia.
- Una condizione di azoospermia da causa testicolare può essere sostenuta da un fenotipo singolo o frequentemente eterogeneo di istopatologia. Peraltro **il fenotipo istopatologico testicolare non è indicativo di una specifica causa di azoospermia.**
- Vi è **scarsa correlazione tra istopatologia e livello sierico di FSH o inibina-B.** Un livello normale di tali parametri biochimici non è indicativo di normale spermatogenesi, pertanto di azoospermia post-testicolare. Livelli elevati di FSH, sebbene indicativi di danno testicolare, non sono in grado di predire un fallito recupero di spermatozoi testicolari mediante biopsia. In casi di scleroialinosi o di s. a sole cellule di Sertoli si possono osservare focolai di spermatogenesi conservata, in associazione a valori molto elevati di FSH e ridotto volume testicolare, come è il caso della s. di Klinefelter. Pertanto, la valutazione clinica e di laboratorio del soggetto azoospermico ha un modesto valore predittivo per la presenza o assenza di spermatozoi testicolari. Il ricorso alla biopsia testicolare rappresenta quindi un momento indispensabile nella gestione clinica del paziente azoospermico.
- La biopsia testicolare richiede modalità di trattamento non convenzionale per la valutazione istologica ed una specifica esperienza del patologo. Tale esame va eseguito esclusivamente ove sia possibile recuperare e crioconservare spermatozoi da utilizzare per eventuale ICSI e **mai** per sola finalità diagnostica.

Bibliografia

- Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update* 2007, 13: 539-49.
- von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, Nieschlag E. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84: 2496-501.
- McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Høei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis – approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 2007, 22: 2-16.
- Practice committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male Reproduction and Urology. Evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril* 2008, 90 Suppl 3: S74-7.