Determinazione del numero di spermatozoi nel liquido seminale con citofluorimetro Sysmex UF-100

Giuseppe Previtali, Marina Amadei, Sonia Bussaconi, Mirella Donati, Claudia Fermi, Anna Rapalli, Paola Rossetti, Angela Turini
Dipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Presidio Ospedaliero Fidenza, AUSL di Parma

ABSTRACT

Determination of spermatozoa number in human seminal fluid with Sysmex UF-100 cytofluorimeter. The determination of spermatozoa number is essential for the evaluation of the man fertility state. This study compares the cytofluorimetric method performed on Sysmex UF-100 with the traditional microscopic approach. The ease and standardization of flow cytometry procedure, together with its repeatability and linearity, permit to propose this method as a good alternative for the determination of spermatozoa number in human seminal fluid.

INTRODUZIONE

Il conteggio del numero degli spermatozoi è un'analisi rilevante per la valutazione dello stato di fertilità dell'uomo. Secondo il manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale umano della WHO, il numero di spermatozoi in uomini giovani fertili, considerando il 5° e il 95° percentile, varia rispettivamente tra 15 e 213 milioni/mL (39-802 milioni/eiaculato) (1). Quando il numero degli spermatozoi è <15 milioni/mL sono definibili tre situazioni con grado crescente di severità: 1) oligozoospermia, che si manifesta con diminuzione di varia entità degli spermatozoi; 2) criptozoospermia, che è dovuta a presenza di rarissimi spermatozoi talvolta evidenti solo dopo centrifugazione del liquido seminale; 3) azoospermia, caratterizzata da assenza di spermatozoi nell'eiaculato.

Il conteggio degli spermatozoi viene effettuato attualmente leggendo un campione di liquido seminale al microscopio ottico con diverse camere di conta (Makler, Thoma, Burker, Neubauer). Questa procedura microscopica costituisce il "gold standard", nonostante una limitata accuratezza dei risultati dovuta ad una fase preanalitica che risente di errori di campionamento, pipettamento e di diluizione. La presenza di agglutinazioni del tipo testa-coda fra gli spermatozoi e di pseudoagglutinazioni fra spermatozoi e leucociti o cellule epiteliali sono ulteriori elementi di criticità. I numerosi passaggi preanalitici e la inevitabile soggettività dell'esame microscopico rendono il conteggio del numero degli spermatozoi un esame difficilmente standardizzabile e che necessita di un significativo impiego di risorse umane qualificate.

Oltre alla valutazione al microscopio ottico esiste un sistema di analisi computerizzata del liquido seminale ["computer assisted sperm analysis" (CASA)] costituito da un "software" dedicato che valuta in particolare le caratteristiche cinetiche dello spermatozoo. Il sistema CASA può consentire anche la determinazione della concentrazione spermatozoaria distinguendo gli spermatozoi da altre cellule, detriti cellulari e aggregati molecolari presenti nel liquido seminale (2). Il sistema CASA è, tuttavia, molto costoso e dedicato alla ricerca.

Anche la citofluorimetria a flusso è stata utilizzata nello studio di alcuni aspetti importanti della funzionalità spermatozoaria, quali l'assetto del DNA, l'integrità acrosomiale, la capacitazione e la fluidità di membrana (3-5). La citofluorimetria a flusso è una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione, in tempi molto rapidi, di cellule sospese in un mezzo fluido di trasporto, precedentemente marcate con sonde fluorescenti. Questa metodica rende possibile la misurazione di molteplici parametri su singole cellule, quali ad esempio volume e complessità morfologica delle cellule stesse, consentendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa. Aspetto peculiare della citofluorimetria a flusso, strettamente connesso alla possibilità di analizzare contemporaneamente più fluorescenze, è quello di raccogliere e memorizzare molti parametri per ogni singola cellula analizzata, che correlati fra di loro permettono di individuare e studiare sottopopolazioni di cellule all'interno di un campione biologico. Questo rende questa metodica ideale nello studio di popolazioni eterogenee, come ad esempio gli spermatozoi.

Il citofluorimetro Sysmex UF-100 è un analizzatore automatico dedicato al conteggio di cellule in campioni di urina (6, 7). Il presente studio ha lo scopo di valutare la possibilità di impiego di questo analizzatore nella determinazione del numero di spermatozoi su campioni di liquido seminale.

MATERIALI E METODI

Analizzatore

Il sistema automatico per analisi delle urine Sysmex UF-100 utilizza il principio della citofluorimetria a flusso per determinare i valori di diffusione frontale della luce e della fluorescenza relativi alle cellule presenti, oltre al valore dell'impedenza (8). Prima di essere analizzato, il campione viene marcato con un colorante a due componenti e iniettato nella cella di flusso. Alle due estremità

della cella vi sono due elettrodi tra i quali scorre una corrente elettrica continua e costante. Quando una cellula passa attraverso la cella, l'impedenza aumenta causando una variazione di voltaggio tra gli elettrodi proporzionale alla variazione di resistenza: il volume della cellula è proporzionale alla variazione di voltaggio. Gli elementi corpuscolati presenti nel campione fluendo nella camera di lettura deviano un fascio di luce laser e generano sia un segnale di diffusione frontale ("scattering") della luce sia un segnale di fluorescenza. I parametri prodotti da una particella vengono combinati e riportati su coordinate bidimensionali a tracciare lo "scattergram". La rilevazione e differenziazione degli elementi cellulari avviene con l'utilizzo di una sorgente luminosa ad argon centrata su una lunghezza d'onda di 488 nm (blu). Questo particolare consente una efficace misura dei parametri fisici, nonché una contemporanea eccitazione di differenti fluorocromi. Il modulo di lettura rileva l'intensità della luce: l'intensità di luce diffusa frontalmente ["forward scattered light intensity" (Fsc)] rappresenta l'area della sezione trasversale, mentre la durata dell'impulso di luce diffusa frontalmente ["forward scattered light pulse width" (Fscw)] corrisponde alla lunghezza della cellula. Combinando queste due componenti lo strumento è in grado di riconoscere e discriminare la dimensione e la forma di cellule diverse.

La luce fluorescente emessa ["fluorescent light intensity" (Fl)] riflette il grado di affinità delle cellule ai coloranti fenantridina e carbocianina dando informazioni sulla presenza delle membrane cellulari e del nucleo o comunque di acidi nucleici all'interno delle cellule. La fenantridina emette una fluorescenza arancione a 610 nm e colora il DNA inserendosi tra le basi (9); la carbocianina emette una fluorescenza verde a 505 nm e colora le membrane cellulari penetrando attraverso lo strato lipidico (10). La durata dell'impulso di luce fluorescente ["fluorescent light pulse width" (Flw)] riflette la lunghezza della porzione colorata.

Lo strumento UF-100 rappresenta i miceti e gli spermatozoi nell'area indicata come YLC,SPERM dello scattergram Fsc/Fl. La Fl dei miceti è relativamente elevata con valori di intensità variabili tra quelli di un globulo rosso e un leucocito. Gli spermatozoi sono più sensibili al colorante rispetto ai miceti. I valori di Fsc dei miceti sono comparabili a quelli dei globuli rossi e maggiori di quelli degli spermatozoi, mentre i valori di Fscw dei miceti sono inferiori a quelli degli spermatozoi, permettendo così la discriminazione tra questi due elementi.

Campioni

Con il consenso informato dei soggetti, 60 campioni di liquido seminale sono stati indagati per il numero di spermatozoi, nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki. I campioni sono stati raccolti secondo le indicazione della WHO (1) e consegnati al laboratorio in appositi contenitori entro 20 min. Dopo fluidificazione i campioni sono stati analizzati effettuando contemporaneamente il conteggio degli spermatozoi sia con microscopio ottico che con analizzatore Sysmex UF-100. Nella procedura per il conteggio microscopico il campione è stato diluito 1:20 con una soluzione al 5% di $NaHCO_3$ e formalina; quindi si è contato il numero di spermatozoi utilizzando la camera di Thoma. Nella procedura per il conteggio con Sysmex UF-100 si è proceduto diluendo il campione 1:40 con una soluzione al 5% di $NaHCO_3$ e formalina. E' stato valutato il conteggio numerico degli spermatozoi refertato dallo strumento, moltiplicato per il fattore di diluizione utilizzato in metodica.

Analisi statistica

Le due metodiche, analisi strumentale con Sysmex UF-100 e lettura al microscopio ottico, sono state messe a confronto mediante regressione di Passing-Bablok e diagramma delle differenze di Bland Altman (11-13).

RISULTATI

La regressione di Passing-Bablok mostrava una retta pari a y = 1,075x - 3,5 (Figura 1). L'intervallo di confidenza al 95% (CI) per l'intercetta era compreso tra -6,15 e -1,37; il CI per il coefficiente angolare era compreso tra 0,989 e 1,121.

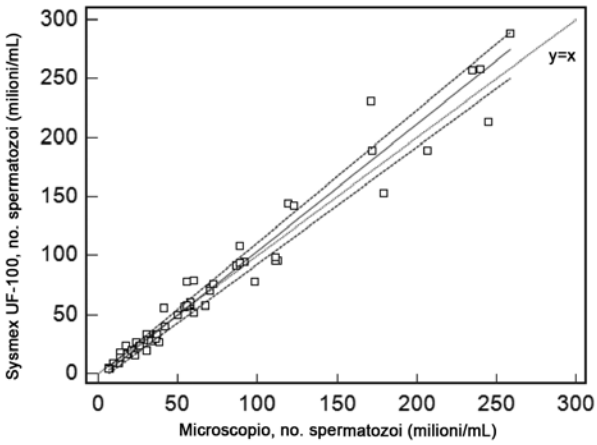


Figura 1
Relazione tra conteggio degli spermatozoi al microscopio ottico e tramite analizzatore Sysmex UF-100. Nella Figura sono indicate, oltre alla teorica retta di identità (y=x), la retta di regressione e, tratteggiati, i suoi limiti di confidenza.

Tabella 1
Imprecisione tra le serie del conteggio degli spermatozoi mediante analizzatore Sysmex UF-100 e microscopio ottico

Sysmex UF 100		Microscopio ottico	
Valore medio (milioni/mL)	CV	Valore medio (milioni/mL)	CV
24,43	2,0%	26,11	11,1%
49,48	2,8%	44,80	9,4%
205,76	2,2%	238,72	6,0%

Dall'analisi dei dati, risultava una differenza percentuale media pari a -4,6%, con un CI compreso tra –9,85% e +0,58%. I limiti inferiore e superiore delle differenze in percentuale osservate (media±1,96 DS) erano, rispettivamente, -43,2% e +33,9% (Figura 2).

L'imprecisione tra le serie analitiche è stata valutata su 3 campioni di diversa concentrazione, eseguendo cinque letture per ogni campione. Per Sysmex UF-100 il CV medio sui tre campioni era 2,3%, mentre per la lettura al microscopio ottico era 8,8% (Tabella 1).

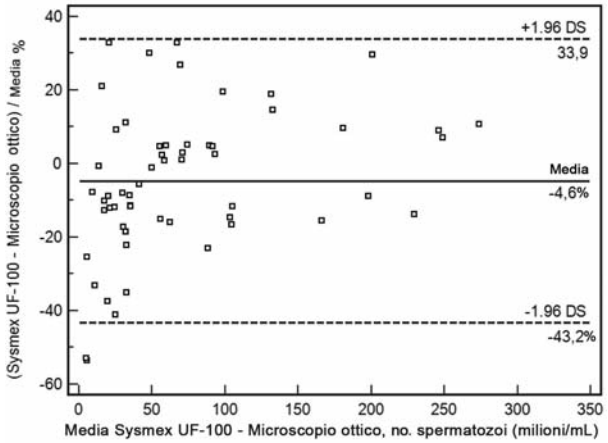


Figura 2
Grafico delle differenze tra metodi.

Per la valutazione della linearità sono state analizzate su Sysmex UF-100 diluizioni scalari di 3 campioni con diverse concentrazioni di spermatozoi: uno al limite basso della norma (26,64 milioni/mL), uno a concentrazioni fisiologiche (49,48 milioni/mL) e uno alto (107,48 milioni/mL) (Figura 3). I risultati ottenuti evidenziavano ottima linearità, con coefficienti r^2 compresi tra 0,9926 e 0,9999.

La concentrazione di spermatozoi più bassa rilevata da Sysmex UF-100 è stata ottenuta su una diluizione 1:640 di un campione contenente 49,49 milioni spermatozoi/mL, con un conteggio strumentale di 67 spermatozoi/µL, corrispondente a 2,68 milioni spermatozoi/mL.

La specificità analitica di UF-100 è stata valutata con l'esame di 3 liquidi seminali privi di spermatozoi maturi. In un campione, in particolare, vi era presenza di numerosi elementi immaturi della spermatogenesi, come spermatociti e spermatidi. Nei tre casi la risposta strumentale ha confermato l'assenza di spermatozoi. Gli spermatociti si posizionano nello "scattergram" con i globuli bianchi senza possibilità di distinguerli da questi ultimi data la stretta somiglianza fra le due popolazioni sia in termini di dimensione che di contenuto di DNA.

DISCUSSIONE

Analizzando la regressione di Passing-Bablok si evidenziava un'ottima correlazione tra i due metodi di conteggio. Anche l'analisi secondo Bland-Altman mostrava

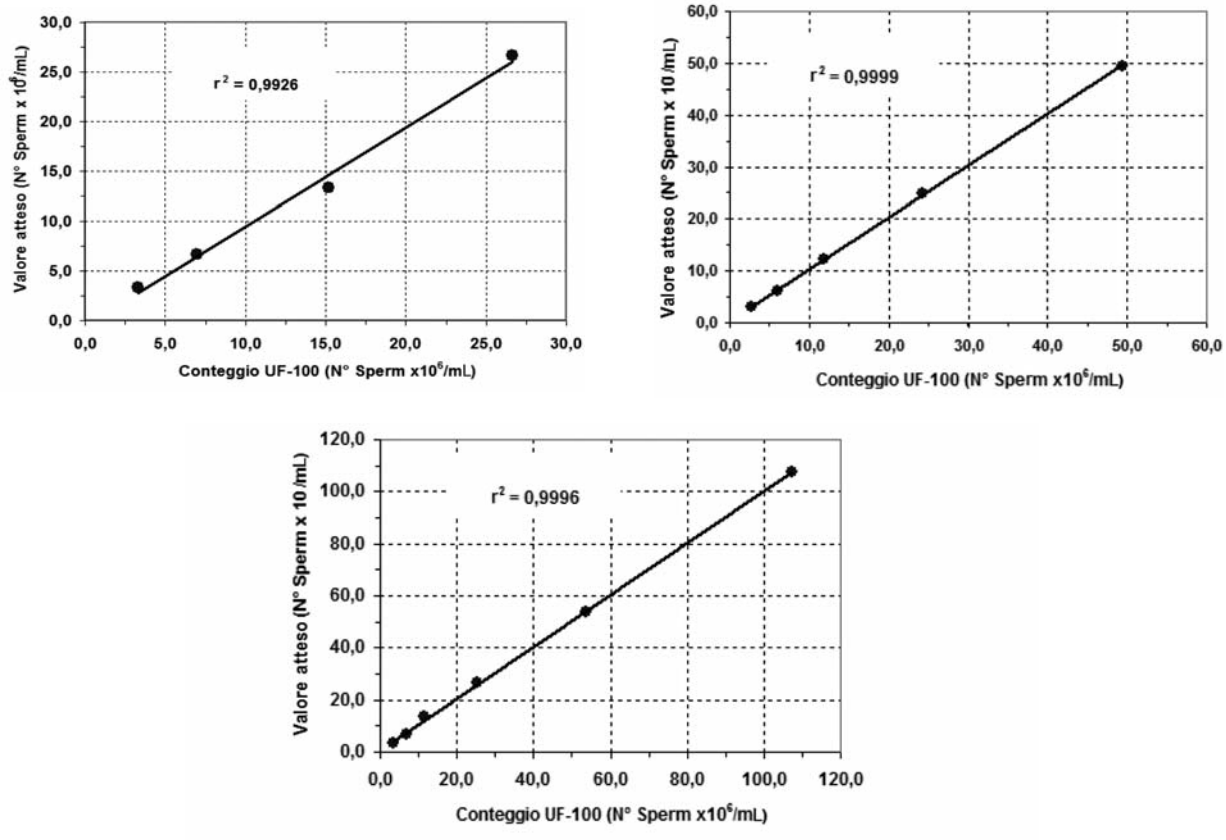


Figura 3
Linearità della misura del numero di spermatozoi con citofluorimetro Sysmex UF-100.

differenze statisticamente non significative tra i due metodi, essendo il valore di zero compreso nel CI della differenza media.

La determinazione degli spermatozoi nelle camere emocitometriche si presta a numerosi errori dovuti al fatto che si contano le cellule in un volume predefinito. Se gli spermatozoi sono causalmente distribuiti nella camera di conta, il loro numero in un determinato volume segue la distribuzione di Poisson, la cui varianza è pari al numero contato. Il CI per il numero di spermatozoi nel volume di sperma è, approssimativamente, $n \pm 1{,}96 \sqrt{n}$. Se vengono contate 100 cellule, l'ES del conteggio sarà 10 (10%) e il CI per il numero di spermatozoi in quel volume di sperma sarà 80-120. Per raggiungere una precisione caratterizzata da un errore percentuale del 2,5% è necessario contare 1600 spermatozoi.

Nel nostro laboratorio la conta di 25 cellule in 5 quadrati della camera di Thoma corrisponde ad una concentrazione di spermatozoi di 16 milioni/mL, con CI da 15,2 a 34,8 cellule, con una variazione di concentrazione da 10 a 22 milioni di spermatozoi/mL. Il manuale WHO per l'esame del liquido seminale umano consiglia una conta di almeno 200 spermatozoi per raggiungere un errore di conteggio accetabilmente basso (1).

La difficoltà di conteggio di un numero adeguato di cellule unito alla soggettività dell'esame microscopico sono allora un evidente limite della conta in camera emocitometrica soprattutto per campioni con concentrazioni medio/basse. Al contrario la facilità di esecuzione, la ripetibilità e la linearità dei conteggi, uniti alla standardizzazione della procedura, incoraggiano l'impiego del sistema Sysmex UF-100 per il conteggio degli spermatozoi nel liquido seminale. Il citofluorimetrio Sysmex UF-100 è in grado di evidenziare la presenza di spermatozoi ad una concentrazione di circa 3 milioni/mL per una diluizione 1:40. Per campioni negativi o per concentrazioni inferiori a 4 milioni/mL, è opportuno che l'indagine strumentale sia ancora accompagnata da quella effettuata con microscopio ottico.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: University Press, 2009.
2. Zinaman MJ, Uhler ML, Vertuno E, et al. Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA), with IDENT stain to determine sperm concentration. J Androl 1996;17:288-92.
3. Hittmair A, Rogatsch H, Mikuz G, et al. Quantification of spermatogenesis by dual-parameter flow cytometry. Fertil Steril 1994;61:746-50.
4. Hittmair A, Rogatsch H, Offner F, et al. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and semiquantitative histology of spermatogenesis: a comparative study. Fertil Steril 1992;58:1040-5.
5. Leonardi E, Reich A, Scardigli A, et al. Valutazione dell'infertilità maschile mediante analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA nella biopsia testicolare. Studio di 23 casi. Urologia 2004;71:159-62.
6. Ben-Ezra J, Bork L, McPherson RA. Evaluation of the Sysmex UF 100 automated urinalysis analyser. Clin Chem 1998;44:92-5.
7. Manoni F, Ercolin M, Bountis I, et al. Valutazione dell'analizzatore Sysmex UF-1000i per l'esame automatizzato del sedimento urinario. Biochim Clin 2009;33:550-5.
8. Yasui Y, Tatsumi N, Park K, et al. Urinary sediment analyzed by flow citometry. Cytometry 1995;22:75-9.
9. Slalinova I, Slalina J, Taborska E. Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids-novel cell permeant and red fluorescing DNA probes. Cytometry A 2007;71:700-8.
10. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology 2005;63:445-57.
11. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:709-20.
12. Dewitte K, Fierens C, Stöckl D, et al. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice. Clin Chem 2002;48:799-801.
13. Altman DG, Bland JM. Commentary on quantifying agreement between two methods of measurement. Clin Chem 2002;48:801-2.