



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA-ROMAGNA  
Azienda Unità Sanitaria Locale di Parma

Presidio Ospedaliero di Fidenza  
Dipartimento Medico e della  
Diagnostica  
U.O. di Patologia Clinica

# Ruolo del Laboratorio nella valutazione dell'infertilità e nel percorso di Procreazione Medicalmente Assistita di 1° Livello

Dott.ssa Emanuela Marengo  
U.O. Patologia Clinica Fidenza  
AUSL di Parma

# Infertilità definizione

L'Infertilità è stata definita una patologia che genera disabilità.

(OMS 2010)

Caratterizzata dalla incapacità di generare una gravidanza dopo 12 mesi di regolari rapporti sessuali non protetti.

(OMS 2016)



**World Health  
Organization**



Legge 2004, n. 40 “Norme in materia di procreazione medicalmente assistita”,  
ART. 1

1. Al fine di favorire la soluzione dei problemi riproduttivi derivanti dalla sterilità o dalla infertilità umana è consentito il ricorso alla procreazione medicalmente assistita, alle condizioni e secondo le modalità previste dalla presente legge, che assicura i diritti di tutti i soggetti coinvolti, compreso il concepito.
2. Il ricorso alla procreazione medicalmente assistita è consentito qualora non vi siano altri metodi terapeutici efficaci per rimuovere le cause di sterilità o infertilità.

# Legge 2004, n. 40

La legge 19 febbraio 2004, n. 40 nel corso di questi anni, ha subito delle modifiche a seguito della necessità di adeguarne il testo al contenuto di alcune sentenze della Corte Costituzionale.



# Legge 2004, n. 40

L'articolo 4, comma 3, della legge n. 40 prevedeva un divieto assoluto di ricorso alla donazione di gameti sia femminili sia maschili esterni alla coppia (divieto di ricorrere a tecniche di procreazione medicalmente assistita di tipo eterologo).

La Corte Costituzionale, con la sentenza n. 162 del 2014, ha ritenuto tale divieto incostituzionale.

**Relazione al Parlamento sullo stato di attuazione della Legge 40/2004  
26 giugno 2019**



# Infertilità di coppia

- Fattore femminile
- Fattore maschile
- Entrambi

Le cause di infertilità riguardano:



L'UOMO



LA DONNA



LA COPPIA



*Ministero della Salute*

# Cause di infertilità femminile

- Tubariche/pelviche
- Endometriosi
- Ovulatorie/ormonali
- Cervicali
- Uterine
- Sconosciute





## Ruolo del laboratorio

Dosaggi ormonali: FSH, LH, Estradiolo nella prima metà del ciclo ( $2^{\wedge}-3^{\wedge}$  giorno di mestruazione); Progesterone e Prolattina nella seconda metà del ciclo; Ormone Antimulleriano (AMH); TSH.

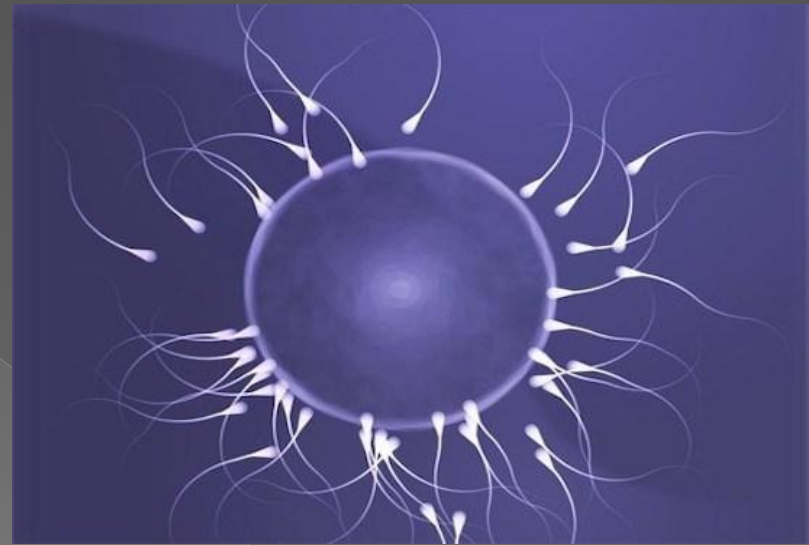
Questi esami hanno lo scopo principale di valutare lo stato ormonale e la riserva ovarica della donna e quindi il suo potenziale di fertilità.



# Cause di Infertilità maschile

L'infertilità maschile corrisponde a una ridotta capacità riproduttiva dell'uomo, per una insufficiente produzione di spermatozoi o per anomalie nella qualità degli spermatozoi prodotti.

- Cause genetiche
- Criptorchidismo
- Fonti di calore
- Epididimite
- Varicocele
- Anticorpi antispermatozoi
- Disfunzione erettile
- Malattie sessualmente trasmesse
- Chirurgia
- Traumi
- Rischi ambientali





# Ruolo del Laboratorio

## Fondamentale e attivo

Lo Spermioγραμμα è l'indagine che consente di valutare lo stato di salute di tutto l'apparato genitale maschile mediante l'analisi del Liquido Seminale

Esame complesso

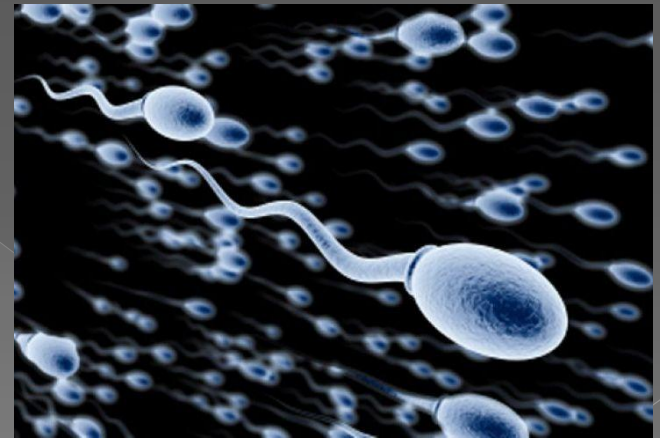
Elevata professionalità degli operatori

# Spermiogramma

Valuta la qualità del liquido seminale

PARAMETRI analizzati:

- Volume
- pH
- Concentrazione spermatozoi
- Motilità
- Morfologia
- Vitalità



# Preparazione allo Spermioγραμμα

Per la corretta esecuzione dell'esame è indispensabile rispettare una astinenza da eiaculazione compresa tra un minimo di 2 giorni e un massimo di 7 giorni.

Il campione deve essere consegnato al laboratorio nel più breve tempo possibile e comunque entro massimo un'ora dalla raccolta.

Il campione non deve subire escursioni termiche.

# Analisi macroscopica

Valutazione del volume: >1.5 ml

Aspetto: Omogeneo Grigio opalescente

Fluidificazione: Completa dopo 30 minuti dalla raccolta

Viscosità: Assente

pH: >7.2

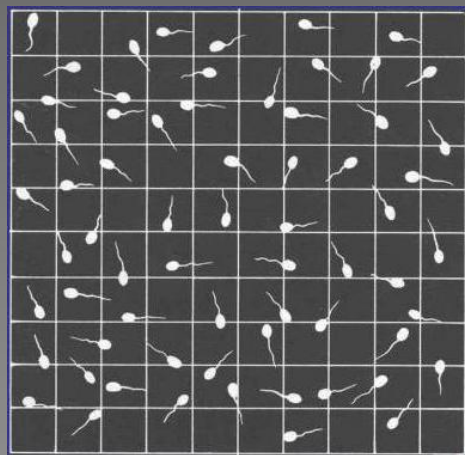
Manuale WHO 2010



# Analisi microscopica

Analisi iniziale ad ingrandimento dell'obiettivo 10X per una valutazione generale del campione (zone di spermioagglutinazione, uniformità del campione, presenza di altre tipologie di cellule).

Analisi approfondita ad ingrandimento dell'obiettivo 20X per valutare la concentrazione di spermatozoi e la motilità.





# Concentrazione



Possono essere utilizzate diverse camere di conta: Neubauer, Makler, Burker

N° spermatozoi /ml:  $\geq 15 \times 10^6$

N° spermatozoi per eiaculato:  $\geq 39 \times 10^6$

Manuale WHO 2010

# Categorie di movimento

**Motilità progressiva (PR)**: lo spermatozoo si muove attivamente, in modo lineare o in un ampio circolo, indipendentemente dalla velocità.

≥ 32%

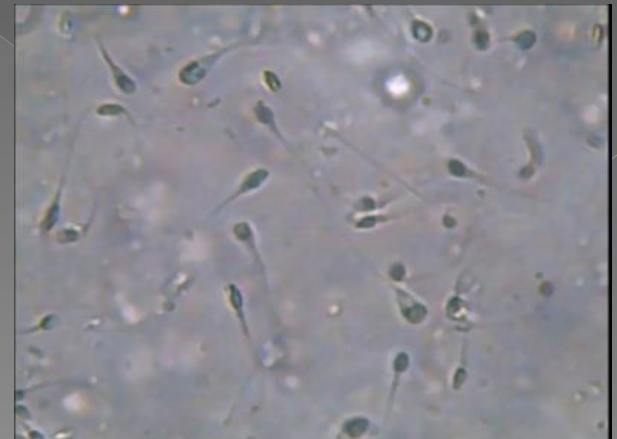
**Motilità non progressiva (NP)**: comprende tutti gli altri tipi di motilità dove non c'è progressione nello spazio.

**Motilità totale (PR+NP)**: motilità progressiva e motilità non progressiva.

≥ 40%

**Immobilità**: nessun movimento.

Manuale WHO 2010





# Vitalità

Valuta l'integrità della membrana.  
Particolarmente indicata in campioni con  
motilità totale <40%.

Colorazione eosina-nigrosina




WHO 2010

# Morfologia

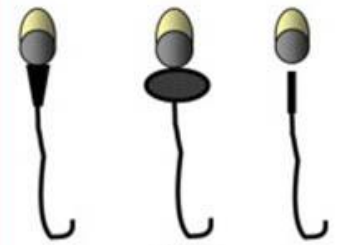
Testa ovale  
Acrosoma 40 - 70 %  
2.5 - 3.5  $\mu\text{m}$   
4 - 5  $\mu\text{m}$   
6 - 10  $\mu\text{m}$   
45  $\mu\text{m}$   
NORMALE

ANOMALIE DELL'ACROSOMA



Grande > 70 %  
Piccolo < 40 %  
Vacuolizzato

ANOMALIE DEL COLLO



Ispessito  
Residuo citoplasmatico  
Staccato

ANOMALIE DELLA TESTA



Tonda  
Allungata  
Doppia  
Piegata

ANOMALIE DELLA CODA



Doppia  
Arrotolata  
Spezzata  
Tronca

Anomalie morfologiche dello spermatozoo

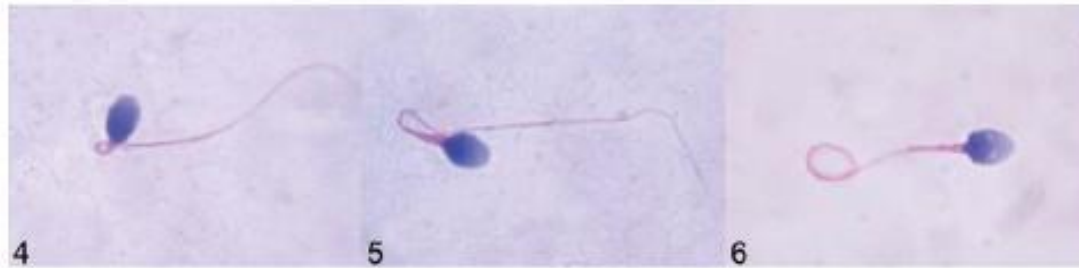
La valutazione morfologica degli spermatozoi viene eseguita mediante specifiche colorazioni e va ad analizzare lo spermatozoo nella sua completezza.

% spermatozoi normali:  $\geq 4\%$

WHO 2010

## Valutazione della morfologia nemaspermica

Sp.	Forma della testa	Altri commenti sulla testa	Commenti sul tratto intermedio	Commenti sul tratto principale	Classificazione dello spermatozoo nel complesso	Commenti
1	atipica		ERC		atipico	> un terzo
2	normale		angolato	normale	atipico	
3	atipica	acr >70%		ad anello	atipico	
4	normale		angolato	normale	atipico	
5	normale		ispessito	ad anello	atipico	
6	atipica	vac PA		arrotolato/ rigonfio	atipico	
7	normale				tipico	
8	normale			doppio	atipico	
9	atipica			arrotolato	atipico	
10	atipica		angolato, inserzione	arrotolato/ rigonfio	atipico	
11	normale		ispessito	angolato	atipico	
12	normale		angolato	normale	atipico	



*Micro fotografie gentilmente concesse da C Brazil.*

Distribuzione dei valori per i parametri seminali relativi a uomini le cui partner sono entrate in gravidanza entro 12 mesi dalla sospensione dell'uso di metodi contraccettivi

Parametri (unità)	N	Percentile								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Volume (ml)	1941	1.2	1.5	2.0	2.7	3.7	4.8	6.0	6.8	7.6
Numero spermatozoi/eiaculato (10 <sup>6</sup> /eiaculato)	1859	23	39	69	142	255	422	647	802	928
Numero spermatozoi/ml (10 <sup>6</sup> /ml)	1859	9	15	22	41	73	116	169	213	259
Motilità totale (PR + NP, %)	1781	34	40	45	53	61	69	75	78	81
Motilità progressiva (PR, %)	1780	28	32	39	47	55	62	69	72	75
Motilità non progressiva (NP, %)	1778	1	1	2	3	5	9	15	18	22
Spermatozoi immobili (IM, %)	1863	19	22	25	31	39	46	54	59	65
Vitalità (%)	428	53	58	64	72	79	84	88	91	92
Forme normali (%)	1851	3	4	5.5	9	15	24.5	36	44	48

Fonte: Cooper et al., 2010.

# Valori di riferimento

Valori di riferimento minimi delle caratteristiche seminali (5° percentile e intervallo di confidenza del 95%)

Parametri	Valori di riferimento minimi
Volume (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Numero spermatozoi/eiaculato ( $10^6$ /eiaculato)	39 (33-46)
Numero spermatozoi/ml ( $10^6$ /ml)	15 (12-16)
Motilità totale (PR + NP,%)	40 (38-42)
Motilità progressiva (PR,%)	32 (31-34)
Vitalità (spermatozoi vitali, %)	58 (55-63)
Morfologia (forme normali,%)	4 (3.0-4.0)
<i>Altri valori di riferimento</i>	
pH	$\geq 7.2$
Leucociti perossidasi-positivi ( $10^6$ /ml)	$< 1.0$

# Tecniche di inseminazione di 1° Livello

Le tecniche di Procreazione medicalmente assistita (PMA) consentono di aumentare le probabilità di concepimento.

Il **1° livello** comprende tutte le metodiche che favoriscono il concepimento naturale, ossia la cosiddetta fecondazione “in vivo”. Ne fanno parte l'induzione dell'ovulazione per rapporti mirati e l'inseminazione intrauterina.

# Inseminazione Intrauterina (IUI)

- Tecnica semplice e poco invasiva.
- Può essere supportata da una stimolazione ovarica.
- Spermatozoi preparati in laboratorio (lavati, concentrati e capacitati) vengono introdotti direttamente in utero per via transcervicale.

## Condizioni:

Pervietà tubarica e qualità del seme







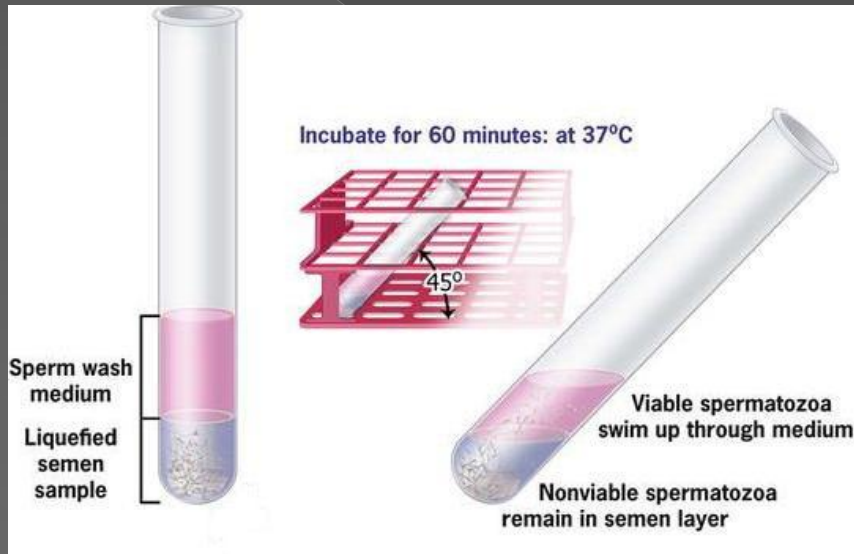
# Ruolo del Laboratorio

Ha il delicato compito di preparare il Liquido Seminale che verrà introdotto in utero.

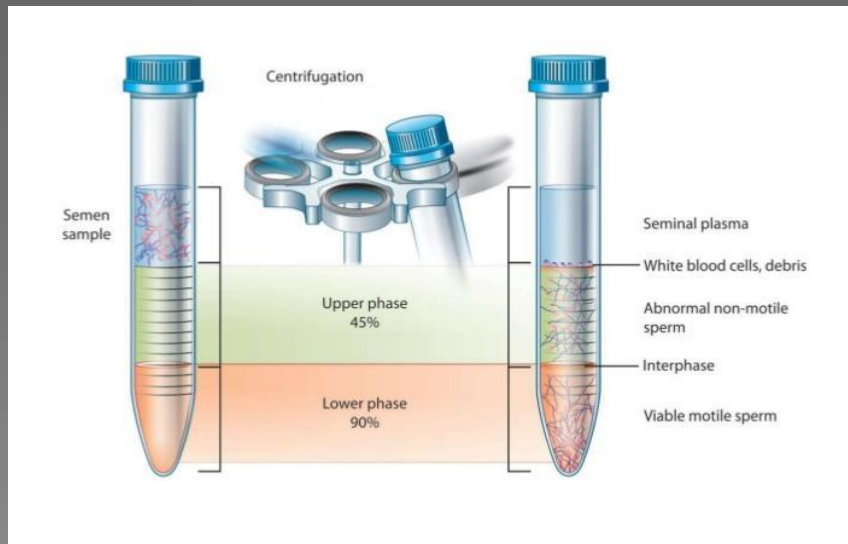
Gli spermatozoi devono essere separati dal plasma mediante tecniche di lavaggio, concentrati e capacitati.

La scelta della tecnica di preparazione è dettata dalla natura del liquido seminale.

# Tecniche maggiormente utilizzate



**Swim-up:** gli spermatozoi vengono selezionati per la loro capacità di movimento progressivo. Da utilizzare in caso di campioni normospermici. (WHO 2010)



**Gradienti di concentrazione:** permette di selezionare spermatozoi altamente mobili separandoli da detriti, leucociti e cellule germinali degenerate. Migliore separazione e recupero di spermatozoi. (WHO 2010)

# Autorizzazione regionale

REQUISITI dei CENTRI di PMA 1° Livello:

1. Requisiti strutturali
2. Requisiti tecnologici
3. Requisiti organizzativi specifici

# CLINICAL COMPETENCE E FORMAZIONE

Per i biologi/biotecnologi si richiede un'esperienza relativa alla realizzazione di almeno 100 esami del liquido seminale ed almeno 50 trattamenti di capacitazione del liquido seminale eseguiti direttamente o sotto tutoraggio, nonché una "continuing medical education" certificata dallo stesso centro.

# REQUISITI ORGANIZZATIVI

Devono essere previste:

- ◉ procedura per la gestione delle liste di attesa
- ◉ procedura per la diagnosi di sterilità e per la selezione dei pazienti (Ginecologia)
- ◉ procedure per la diagnosi pre-impianto (Ginecologia)
- ◉ procedure/istruzioni operative per ogni tecnica di PMA eseguita, basate su linee guida e protocolli validati
- ◉ procedura relativa alla gestione del rischio
- ◉ procedura per il consenso informato
- ◉ procedure per la valutazione della qualità percepita
- ◉ protocolli di integrazione con la rete assistenziale di riferimento territoriale ed ospedaliera

# Requisito organizzativo specifico

Durante le fasi critiche del processo di manipolazione del campione, nel laboratorio di PMA devono essere presenti 2 operatori.

Entrambi compileranno e firmeranno una **checklist** che descrive punto per punto le azioni degli operatori.

## CHECKLIST laboratorio

### Identificazione dell'Assistito (I.O. n°1 LAB)

Operazione	Data ora	Firma	Responsabilità
Verifica documento di riconoscimento in corso di validità			1° Operatore
Verifica validità esami sierologici			1° Operatore
Consegna nota informativa raccolta campione (Allegato E)			1° Operatore
Apposizione delle etichette relative alla coppia sull'Allegato A1/A2			1° Operatore
Apposizione delle etichette sul contenitore e sulle provette			1° Operatore
Inserimento numero cedola sull'Allegato A1/A2			1° Operatore
Verifica presenza delega dell'assistito se richiesto (Allegato B)			1° Operatore

### Capacitazione liquido seminale (I.O. n°2 LAB)

Operazione	Data ora	Firma	Responsabilità
Compilazione scheda biologica (Allegato C)			1° Operatore
Compilazione scheda materiali (Allegato D)			1° Operatore
Controllo fasi di trasferimento del liquido seminale da parte del 2°operatore			2° Operatore



**PRINCIPIO OSTETRICIALE PEDIATRIA**  
 Dipartimento di Chirurgia Generale, C. Specialistica  
 Unità Operativa Ginecologia, Di Ginecologia  
 e Direzione T.F. D. Scastina  
 scastina@uniroma3.it - www.uniroma3.it

Dipartimento Medico e della Diagnostica  
 U.O. Patologia Clinica  
 Il Direttore: L. Ippolito  
 ippolito@uniroma3.it - www.uniroma3.it

AMBULATORIO PER LO STUDIO E LA TERAPIA DELL'INFERTILITÀ DI COPPIA

**SCHEDA BIOLOGICA PER CICLO PMA OMOLOGA  
 LIQUIDO SEMINALE CONIUGE/COMPAGNO**

Etichetta  
 identificativa



Cognome	
Nome	
Data di nascita	
Cedola n°	
Validità esami sierologici	

Firma 1° operatore \_\_\_\_\_

Firma 2° operatore \_\_\_\_\_

**PARAMETRI SEMINALI DI BASE E TEST DI CAPACITAZIONE**

	SI	NO
Presenza del coagulo		
Colore normale		
Fluidificazione completa dopo 30'		
fluidificazione manuale		
coagulo persistente		
Presenza di fiocchi		
Campione ematico		



**PRINCIPIO OSTETRICIALE PEDIATRIA**  
 Dipartimento di Chirurgia Generale, C. Specialistica  
 Unità Operativa Ginecologia, Di Ginecologia  
 e Direzione T.F. D. Scastina  
 scastina@uniroma3.it - www.uniroma3.it

Dipartimento Medico e della Diagnostica  
 U.O. Patologia Clinica  
 Il Direttore: L. Ippolito  
 ippolito@uniroma3.it - www.uniroma3.it

AMBULATORIO PER LO STUDIO E LA TERAPIA DELL'INFERTILITÀ DI COPPIA

Giorni di astinenza \_\_\_\_\_

Note \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Volume mL \_\_\_\_\_

Concentrazione

- Numero spermatozoi: \_\_\_\_\_ x 10<sup>6</sup>/mL
- Spermatozoi agglutinati SI  NO

Motilità

- Spermatozoi con motilità progressiva \_\_\_\_\_ %

Morfologia

- Forme normali \_\_\_\_\_ %

Tecnica di capacitazione Swim up da pellet

Esito del test di capacitazione metaspermica:

- Numero di spermatozoi dopo capacitazione \_\_\_\_\_ x 10<sup>6</sup>/mL
- Numero di spermatozoi capacitati \_\_\_\_\_ x 10<sup>6</sup>/mL

Reagenti utilizzati per il test di capacitazione:

- Terreno codice \_\_\_\_\_ lotto \_\_\_\_\_ scadenza \_\_\_\_\_

Note

- Difficoltà alla raccolta
- Mancata consegna L.S.





AMBULATORIO PER LO STUDIO E LA TERAPIA DELL'INFERTILITA' DI COPPIA

**SCHEDA MATERIALI ( REATTIVI e MONOUSO) UTILIZZATI NEL PROCESSO DI  
CAPACITAZIONE NEMA SPERMICA**

Etichetta  
Identificativa

Cognome	
Nome	
Data di nascita	
Cedola n°	

**REATTIVI**

Ditta	Descrizione	Codice materiale	Lotto N°	Scadenza
Irvine Scientific	Terreno Sperm Washing Medium (modified HTF)	9983		

**Materiale MONOUSO**

Ditta	Descrizione	Codice materiale	Lotto N°	Scadenza
Waldeck	Vetrini precolorati Test simplets	191574		
Diamond Gilson	Puntelli sterili	F171301		
APTACA	Pipetta Pasteur sterili monouso	1502/8G/CS		
BD	Contenitore sterile per raccolta campione			
Falcon	Provetta a fondo conico sterile con tappo vol. 15 ml	352097		

Firma 1° operatore \_\_\_\_\_

# Gestione della Qualità

Il sistema di gestione qualità deve comprendere manuali e/o procedure operative, schede per la gestione della strumentazione/attrezzature. La documentazione e le procedure devono essere periodicamente aggiornate e verificate.

 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Unità Sanitaria Locale di Fidenza</p> <p>Presidio Ospedaliero di Fidenza – Dipartimento Medico e della Diagnostica – U.O. di Patologia clinica</p>	<p><b>ISTRUZIONE OPEI</b> N° 1 LAB</p> <p>IDENTIFICAZIONE ASSISTITI</p>	 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Unità Sanitaria Locale di Fidenza</p> <p>Presidio Ospedaliero di Fidenza – Dipartimento Medico e della Diagnostica – U.O. di Patologia clinica</p>	<p><b>ISTRUZIONE OPER</b> N° 2 LAB</p> <p>CAPACITAZIONE LIQUIDO</p>	 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Unità Sanitaria Locale di Fidenza</p> <p>Presidio Ospedaliero di Fidenza – Dipartimento Medico e della Diagnostica – U.O. di Patologia clinica</p>	<p><b>ISTRUZIONE OPERATIVA</b> N° 3 LAB</p> <p>GESTIONE DEL RISCHIO IN LABOR</p>
--	---	---	---	---	--

REDAZIONE	EMANUELA MARENCO – BIOLOG. PRETI SILVIA - BIOLOGA U.O. PAT
VERIFICA TECNICA	LUIGI IPPOLITO – DIRETTORE
APPROVAZIONE/AUTORIZZAZIONE	D.SCAZZINA – DIRETTORE F.F.
EMISSIONE	D.SCAZZINA – DIRETTORE F.F.

#### STATO DELLE REVISIONI

Rev. N.	SEZIONI REVISIONATE	MI
01	\	Pri

#### ELENCO ALLEGATI

ALLEGATO CODIFICA	DESCRIZIONE ALLEGATO
ALL. A1	CUSTODIA DEL LIQUIDO SEMINALE- ASSISTITO
ALL. A2	CUSTODIA DEL LIQUIDO SEMINALE- DELEGATO
ALL. B	DELEGA DELL'ASSISTITO
ALL. C	SCHEDA BIOLOGICA DEL LIQUIDO SEMINALE
ALL. E	NOTA INFORMATIVA RACCOLTA CAMPIONE
ALL. F	CHECKLIST
ALL. G	LOCALIZZAZIONE MATERIALE
PG.18.DIR.S (AN.000)	PROCEDURA PER LA CORRETTA DEFINIZIONE DEGLI UTENTI

#### VALIDITA' DEL DOCUMENTO: biennale

	Data
Pianificazione revisione	Marzo 2021

REDAZIONE	EMANUELA MARENCO – BIOLOG. PRETI SILVIA - BIOLOGA U.
VERIFICA TECNICA	LUIGI IPPOLITO – DIRETTORE
APPROVAZIONE	D.SCAZZINA – DIRETTORE OSTETRICA
AUTORIZZAZIONE	D.SCAZZINA – DIRETTORE OSTETRICA
EMISSIONE	D.SCAZZINA – DIRETTORE OSTETRICA

#### STATO DELLE REVISIONI

Rev. N.	SEZIONI REVISIONATE	MOTIVAZ
01	\	Prima ste

#### ELENCO ALLEGATI

ALLEGATO CODIFICA	DESCRIZIONE ALLEGATO
ALL. A1	CUSTODIA DEL LIQUIDO SEMINALE- ASSISTITI
ALL. A2	CUSTODIA DEL LIQUIDO SEMINALE- DELEGA
ALL. C	SCHEDA BIOLOGICA DEL LIQUIDO SEMINALE
ALL. D	SCHEDA MATERIALI (REATTIVI E MONOUSO)
ALL. F	CHECKLIST
ALL. G	LOCALIZZAZIONE MATERIALI
ALL. H	TABELLA STRUMENTAZIONE DI EMERGENZA
PG.09.DIR (SAN.000)	PROCEDURA AZIENDALE PER L'IGIENE DELL
PG.18.DIR (SAN.000)	PROCEDURA PER LA CORRETTA DEFINI MODALITA PER LA GARANZIA DEI DIRITTI DE

#### VALIDITA' DEL DOCUMENTO: biennale

	Data
Pianificazione revisione	Marzo 2021

REDAZIONE	EMANUELA MARENCO – BIOLOGA LABOR. PRETI SILVIA - BIOLOGA U.O. PATOLOGIA I
VERIFICA TECNICA	LUIGI IPPOLITO – DIRETTORE U.O. PA
APPROVAZIONE/AUTORIZZAZIONE	D.SCAZZINA – DIRETTORE F.F. U.O. G
EMISSIONE	D.SCAZZINA – DIRETTORE F.F. U.O. G

#### STATO DELLE REVISIONI

Rev. N.	SEZIONI REVISIONATE	MOTIVAZ
01	\	Prima ste

#### ELENCO ALLEGATI

ALLEGATO CODIFICA	DESCRIZIONE ALLEGATO
PG.05.DIR.S (AN.GC)	PROCEDURA AZIENDALE PER GLI EVENTI AVVERSI, GRAVI E GRAI
PG.13.DIR.S (AN.SIT)	PROCEDURA AZIENDALE PER LA PREVENZIONE E GESTIONE DEGLI PAZIENTI
I.O. 1 LAB	IDENTIFICAZIONE DELL'ASSISTITO E DEL CAMPIONE
I.O. 2 LAB	CAPACITAZIONE LIQUIDO SEMINALE
ALLEGATO F	CHECKLIST
ALLEGATO H	TABELLA STRUMENTAZIONE DI EMERGENZA
ALLEGATO R	SCHEDA SANIFICAZIONE STRUMENTAZIONE DI EMERGENZA

#### VALIDITA' DEL DOCUMENTO: biennale

	Data
Pianificazione revisione	Marzo 2021



**SERVIZIO SANITARIO REGIONALE**  
EMILIA-ROMAGNA  
Azienda Unità Sanitaria Locale di Fidenza

## Identificazione del rischio nel Laboratorio di PMA

2019

**Grazie per l'attenzione**

