

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA ANIMALE "M. La Greca"

ANTONELLA LAURETTA

**ANOMALIE SPERMATOZOARIE E PROSTATITI
ASINTOMATICHE**

Tesi di laurea in Biologia dello Sviluppo

Relatrice:

CHIAR.MA PROF.SSA RENATA VISCUSO

Correlatore:

DOTT. GIOVANNI BRACCHITTA

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

I miei più sentiti ringraziamenti vanno a chi ha permesso il realizzarsi del presente lavoro di tesi.

Il Centro Aster di Diagnosi e Cura della Sterilità presso la Clinica del Mediterraneo di Ragusa nelle persone del Dott. Giovanni Bracchitta e del Dott. Nunzio Minniti per aver permesso la realizzazione di un'interessante e proficua attività di stage, per la continua disponibilità dimostrata durante la stesura del presente elaborato e per il materiale fornitomi.

La professoressa Renata Viscuso per aver contribuito con partecipazione al perfezionamento del lavoro.

Mamma e papà per il lungo e costante supporto.

Indice

Premessa	Pag. 5
Introduzione	Pag. 6
Apparato genitale maschile	Pag. 7
Ciclo vitale della cellula	Pag. 13
La riproduzione sessuata	Pag. 15
- <i>Spermatogenesi</i>	Pag. 18
- <i>Anomalie della spermatogenesi e sterilità</i>	Pag. 24
Patologie urogenitali ed infertilità	Pag. 26
Microrganismi patogeni	Pag. 33
- <i>Neisseria gonorrhoeae o gonococco</i>	Pag. 33
- <i>Chlamydia trachomatis</i>	Pag. 35
- <i>Micoplasmi</i>	Pag. 37
- <i>Gardnerella vaginalis</i>	Pag. 41
- <i>Trichomonas vaginalis</i>	Pag. 42
Specie reattive dell'ossigeno (ROS)	Pag. 43
Infezioni delle ghiandole accessorie maschili	Pag. 48
Materiali e Metodi	Pag. 49
Esame del liquido seminale	Pag. 49

Tampone uretrale	Pag. 56
Spermicoltura	Pag. 62
Massaggio prostatico e test di Meares - Stamey	Pag. 64
Risultati e discussioni	Pag. 66
Conclusioni	Pag. 73
Allegati	Pag. 77

Premessa

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) l'infertilità è definita dall'incapacità di una coppia a procreare dopo 12-24 mesi di rapporti volutamente fecondi. Le stime dell'OMS evidenziano la presenza di circa 80 milioni di coppie sterili nel mondo. Questi dati sono presumibilmente sottostimati per difetto in quanto riferiti quasi esclusivamente a Paesi in cui sono disponibili informazioni statistiche. Va osservato che nei Paesi industrializzati la prevalenza delle coppie sterili è passata dal 6-7% degli anni 60 al 15-20% attuale, il che porta a ipotizzare l'effetto di fattori socio-ambientali legati a problematiche biologiche.

I determinanti dell'infertilità di ordine socio-ambientale sono molteplici. Certamente il ritardo nel programmare la gravidanza riveste un ruolo centrale. E' indubbio che nel corso degli ultimi decenni si sta assistendo ad un progressivo aumento dell'età in cui si programma la prima gravidanza.

Le cause sono diversificate:

- Il nuovo ruolo sociale della donna con capacità lavorative e di carriera sovrapponibili al coniuge;
- Il valore diverso in senso sociale del concetto di famiglia numerosa e con esso il mutamento dell'evento gravidanza nella vita della coppia;
- La condizione talvolta prolungata dello status di single e della coppia non stabilizzata.

Non ultimo è la stessa società post-industriale che avversa un modello di donna-madre in apparente contraddizione con in concetti di riproduttività.

Introduzione

L'eziologia dell'infertilità è attribuita nel 35% circa dei casi al fattore maschile. Si ritiene oggi che le dispermie, cioè le deviazioni dei parametri seminali dagli standard WHO, sono imputabili non solo all'alterata attività testicolare, cioè alla funzione secretoria, ma anche e soprattutto alle alterazioni della ghiandola prostatica, delle vescichette seminali e dei deferenti cioè delle strutture deputate al trasporto degli spermatozoi all'esterno del corpo. Le cause di tali alterazioni sono nella maggior parte dei casi riconducibili in primis ad infezioni che possono portare ad infertilità attraverso un danno diretto provocato dai microrganismi stessi o dai loro prodotti e un danno secondario provocato dall'aumento del numero di globuli bianchi, dalla loro attivazione e quindi da un'elevata produzione locale di sostanze ad azione infiammatoria e dalla formazione di radicali liberi dell'ossigeno.

Nel presente lavoro abbiamo valutato, attraverso varie metodiche, l'eventuale presenza nel liquido seminale di microrganismi potenzialmente in grado di alterare gli spermatozoi e le relative vie escretorie di pazienti infertili con anamnesi negativa per affezioni prostatiche.

APPARATO GENITALE MASCHILE

L'apparato genitale maschile è costituito da :

- Gonadi (testicoli);
- Vie spermatiche e ghiandole annesse;
- Organi genitali esterni;

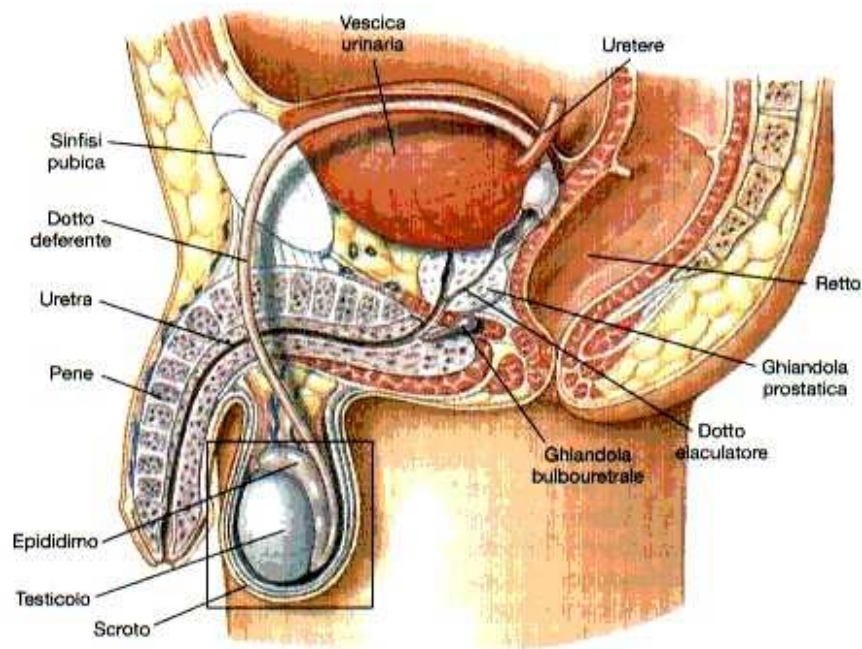


Figura 1- Sezione longitudinale del bacino maschile

Il **testicolo o didimo** costituisce la gonade maschile, sede della produzione degli spermatozoi, cellule sessuali maschili, e della secrezione degli ormoni sessuali maschili, androgeni.

Organo pari (presente in numero di due) a forma di ovoide appiattito è contenuto all'interno di una borsa cutanea costituita da sei tonache sovrapposte, detta *scroto* o *sacco scrotale* posto alla radice delle cosce, dietro il pene.

Si presenta rivestito da una spessa *tonaca albuginea* costituita da voluminosi fasci di fibre collagene, in grado di conferire la caratteristica consistenza al testicolo. Si presenta particolarmente spessa in corrispondenza del margine posteriore del testicolo dove forma il *mediastino* o *corpo di Highmore*.

Dall'albuginea prendono origine setti che convergono verso il mediastino che separano il testicolo in circa 200-300 spazi di forma piramidale con base rivolta verso l'esterno, *logge*.

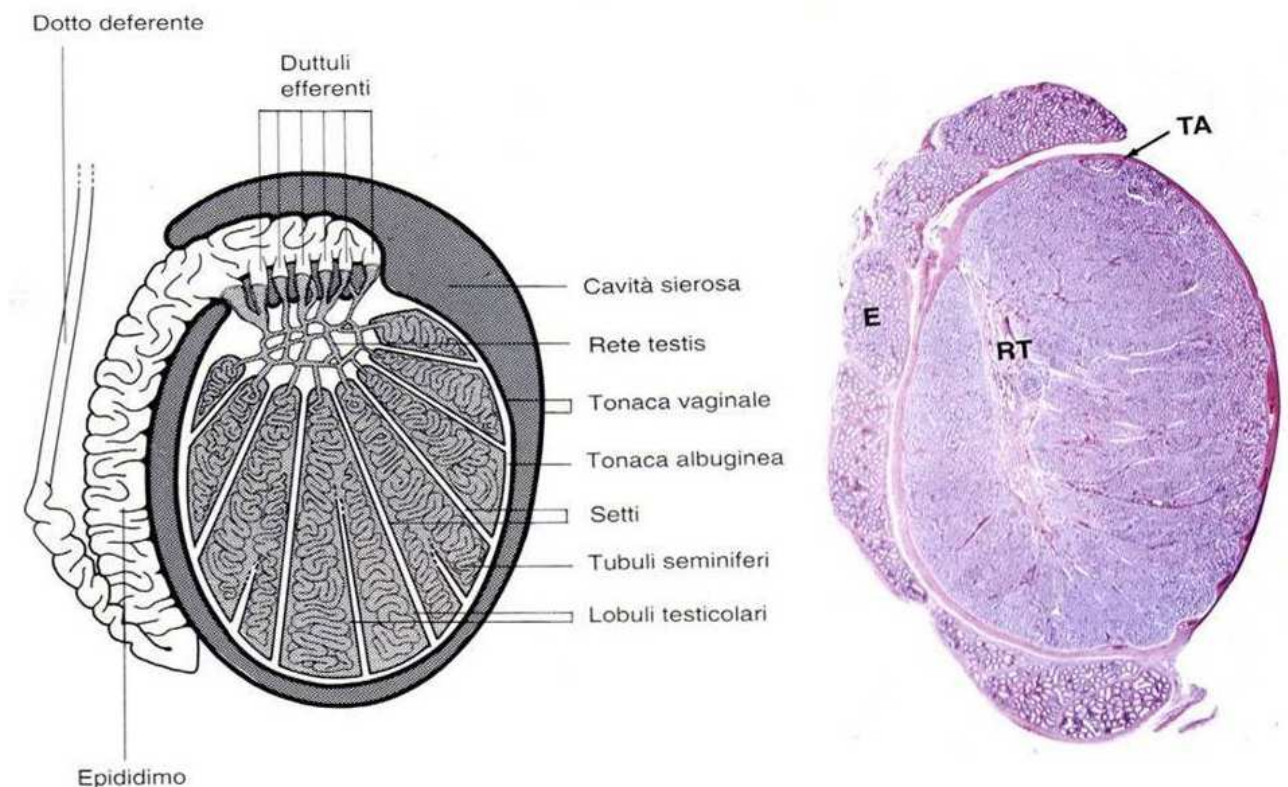


Figura – 2 Struttura testicolo ed epididimo

Il testicolo è dunque formato da uno stroma ed un parenchima.

Il primo rappresentato dalla tonaca albuginea, dal mediastino, dai setti e dal connettivo delle logge che riveste i tubuli seminiferi. Il parenchima invece è dato dai tubuli seminiferi contorti.

I **tubuli seminiferi contorti** presenti in 1-3 per loggia, iniziano a fondo cieco e si avvicinano al mediastino; i loro tratti terminali, *tubuli retti*, sboccano nella *rete testis* del mediastino e costituiscono la parte iniziale delle vie spermatiche.

La parete dei tubuli seminiferi è costituita da un un epitelio pluristratificato, detto *germinativo* e le sue cellule corrispondono ai vari stadi di sviluppo delle cellule germinali, e dalle cellule del Sertoli che ne occupano tutto lo spessore, stratificate con gradiente di maturazione che va dalla lamina basale al lume.

Le giunzioni serrate a livello della porzione inferiore della membrana laterale delle cellule del Sertoli (*barriera ematotesticolare*) individuano un compartimento basale dove sono presenti gli spermatogoni e gli spermatociti di I ordine prima della meiosi; nel compartimento luminale sono accolti invece gli spermatociti di I ordine in meiosi, gli spermatociti di II ordine e gli spermatidi che risultano isolati dal circolo sanguigno mediante la barriera ematotesticolare: questi si differenzieranno negli spermatozoi, gameti maschili veri e propri.

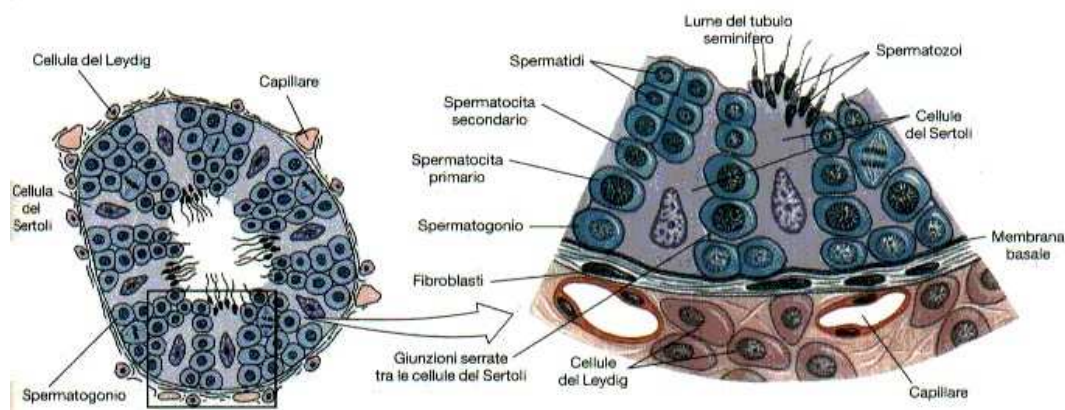


Figura – 3 sezione trasversale di un tubulo seminifero

Le cellule di sostegno producono, sotto lo stimolo dell'ormone ipofisario follicolo stimolante (FSH), la proteina ABP legante gli androgeni: lega il testosterone e lo rende disponibile per le cellule germinali, favorendo la spermatogenesi.

Nello stroma sono inoltre presenti le *cellule interstiziali del Leydig*, cellule endocrine acidofile in grado di produrre ormoni steroidei: stimulate dall'ormone ipofisario luteinizzante (LH), sintetizzano ormoni androgeni anch'essi implicati nel processo di spermatogenesi e responsabili dello sviluppo dei caratteri sessuali secondari.

La rete testis è costituita da lacune, si presenta scavata nel connettivo che costituisce il mediastino. Le lacune continuano in condotti efferenti che formano l'**epididimo**, organo pari a forma di virgola con una porzione più voluminosa detta testa che poggia sul polo superiore del didimo costituita dai condottini efferenti che drenano la rete testis; la porzione intermedia, nota con il nome di corpo, porta all'estremità inferiore ed assottigliata ovvero coda che continua col dotto deferente.

E' nell'epididimo che gli spermatozoi completano la maturazione e permangono in attesa di essere portati all'esterno attraverso l'eiaculazione.

Il **dotto deferente** fa seguito alla coda dell'epididimo e termina alla base della prostata dove si dilata a dare l'*ampolla deferenziale*, riceve il dotto delle vescichette seminali e dà origine al **condotto eiaculatore**, parte terminale delle vie spermatiche.

Le **vescichette seminali** sono organi pari cavi poste tra la base della vescica, tappezzate da mucosa formata da un epitelio batiprismatico che produce un secreto che costituisce circa il 60% del liquido seminale, con pH basico in grado di stimolare la motilità degli spermatozoi e fruttosio sfruttato per le funzioni nutritive.

La **prostata** è un organo impari e mediano, costituito da due lobi laterali. La sua funzione principale è quella di produrre ed emettere il 30% circa di liquido seminale, uno dei costituenti dello sperma, che contiene gli elementi necessari a nutrire e veicolare gli spermatozoi.

Sezione frontale di uretra prostatica e membranosa, veduta anteriore: schema

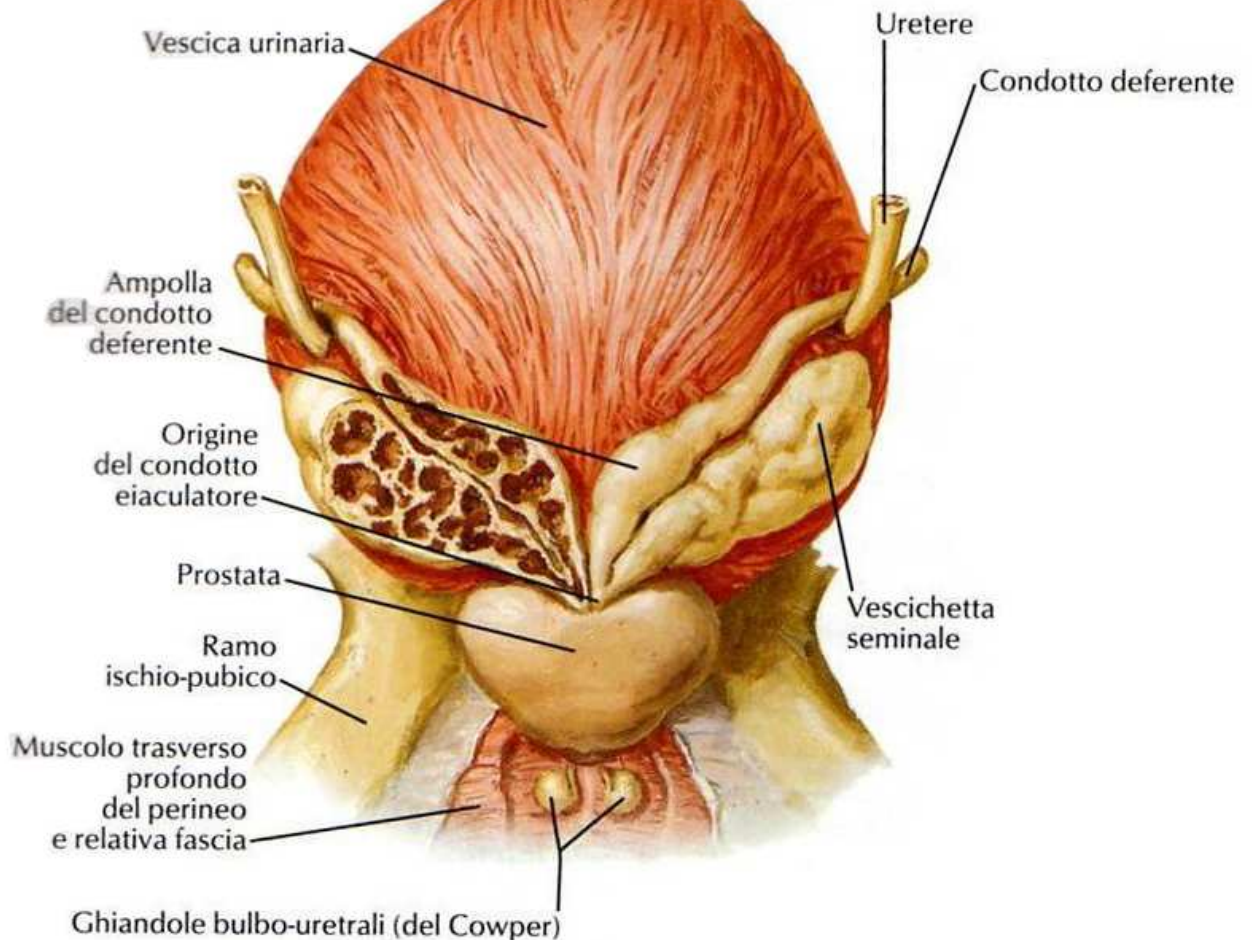


Figura 4 – Veduta posteriore di uretra prostatica e membranosa

Le **ghiandole bulbouretrali di Cowper** sono due piccoli organi posti alla radice del pene, all'altezza dell'uretra membranosa. La funzione delle ghiandole è la produzione di un muco denso e viscoso, trasparente, il *liquido di Cowper*, debolmente alcalino che ha il compito di neutralizzare l'eventuale acidità dell'uretra e di lubrificare il lume. Il secreto viene immesso nell'uretra nella fase precedente all'eiaculazione.

Il *pene* è l'organo copulatore maschile di forma cilindrica, in esso si possono individuare una parte libera, impiegata nella copula, ed una parte fissa perineale, detta anche *radice del pene*. La parte libera si distingue, a sua volta, in *corpo del pene* e *glande*.

Il corpo è essenzialmente costituito da tre colonne di tessuto erettile: due corpi cavernosi avvolti da una membrana detta *albuginea*, ed un corpo spugnoso posto in mezzo ai corpi cavernosi a rivestire l'uretra.

Il glande è la punta del pene e presenta una conformazione anatomica tale da poter facilitare l'atto sessuale.

Infine il pene è rivestito da uno strato di pelle retrattile chiamato comunemente *cute del pene* ma che in prossimità del glande si chiama *prepuzio*.

CICLO VITALE DELLA CELLULA

Nei tessuti a elevato ricambio cellulare le cellule hanno una vita limitata nel tempo, al termine della quale, generalmente, si dividono in due cellule figlie che presentano le stesse caratteristiche di quelle progenitrici.

Il periodo che intercorre tra l'origine di una cellula da una precedente divisione e il momento in cui questa, a sua volta, si divide, costituisce il *ciclo cellulare* dato dal susseguirsi di quattro fasi regolate.

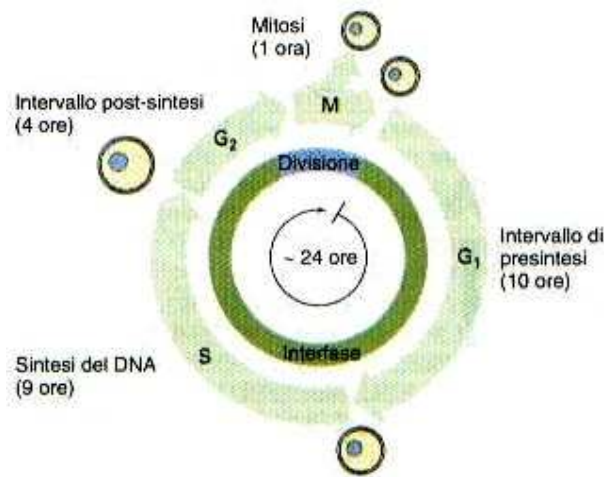


Figura 5- Ciclo vitale di una cellula eucariotica

FASE G1: il volume della cellula raddoppia, aumenta il citoplasma nella cellula e si ha la trascrizione dei tRNA mediante l'utilizzo di tre differenti polimerasi.

FASE S: si ha la duplicazione del DNA nucleare nelle modalità previste dal modello semiconservativo e riconoscimento e rimozione di eventuali errori avvenuti durante la replicazione.

FASE G2: si ha la preparazione alla divisione cellulare con sintesi di gran parte dei componenti dell'apparato mitotico, sintesi dei componenti di membrana e completamento dei processi iniziati in fasi precedenti.

FASE M: processo altamente conservativo che permette di ottenere due cellule identiche tra loro e alla cellula madre. La mitosi si compone di quattro fasi: profase, metafase, anafase, telofase.

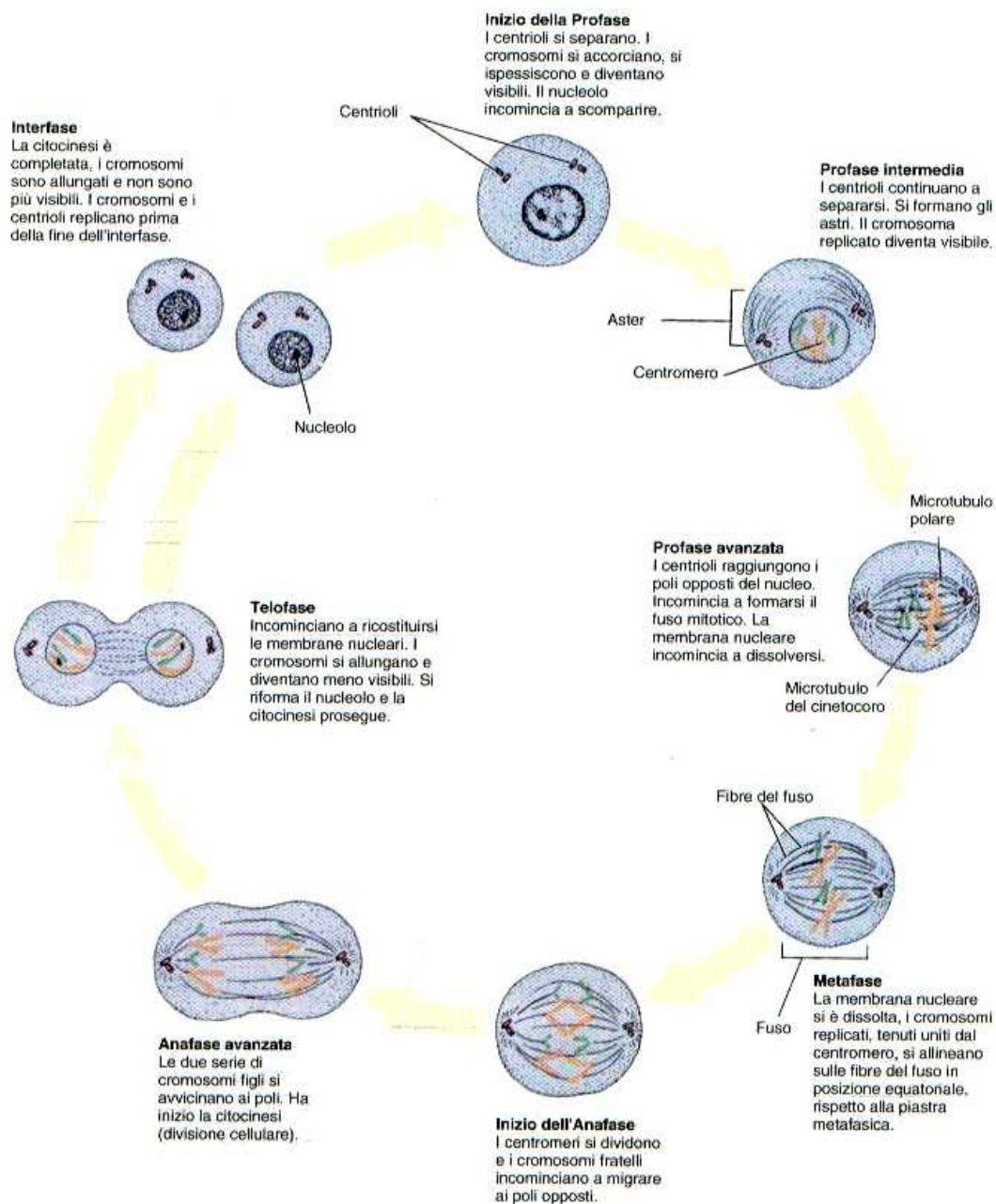


Figura 6- Mitosi in una cellula animale

LA RIPRODUZIONE SESSUATA

Nel processo riproduttivo sessuato viene superato il limite della riproduzione asexuata: non darà origine a individui geneticamente uguali tra loro e al genitore ma, essendo caratterizzato dalla fusione dei genomi dei due genitori, di sesso rispettivamente maschile e femminile, dà origine a individui diversi tra loro e dal genitore.

E' prevista la formazione nei due sessi di cellule aploidi (n), *gameti*, così che con la fecondazione si ripristini il corredo diploide ($2n$) delle cellule somatiche.

Il dimezzamento del corredo cromosomico si ottiene con la *meiosi*, modalità di divisione esclusiva delle cellule germinali. Il processo meiotico inoltre garantisce la ricombinazione genica tra i cromosomi omologhi di origine paterna e materna: da tale processo risulta pertanto che le cellule germinali fecondanti hanno corredo aploide (n) caratterizzate da cromosomi con nuovi corredi genici che rendono ciascun gamete unico.

La meiosi consiste di due successive divisioni nucleari precedute da una sola duplicazione del materiale genetico (fase S): questo permette il dimezzamento della quantità di DNA nei gameti maturi.

Le due divisioni della meiosi sono dette prima e seconda divisione meiotica. Ognuna si può suddividere in fasi corrispondenti a quelle tipiche della mitosi: profase, metafase, anafase e telofase.

La prima divisione meiotica in particolare è caratterizzata da una lunga profase che può essere distinta in sottofasi identificabili grazie a tipici cambiamenti morfologici. Durante la sottofase, nota come *pachitene*, i cromosomi sono visibili nella struttura a quattro filamenti appaiati. Qui si verifica il *crossing over* tra cromosomi non fratelli ovvero lo scambio reciproco di segmenti cromosomici localizzati nella stessa posizione nel cromosoma: è un processo di ricombinazione genica.

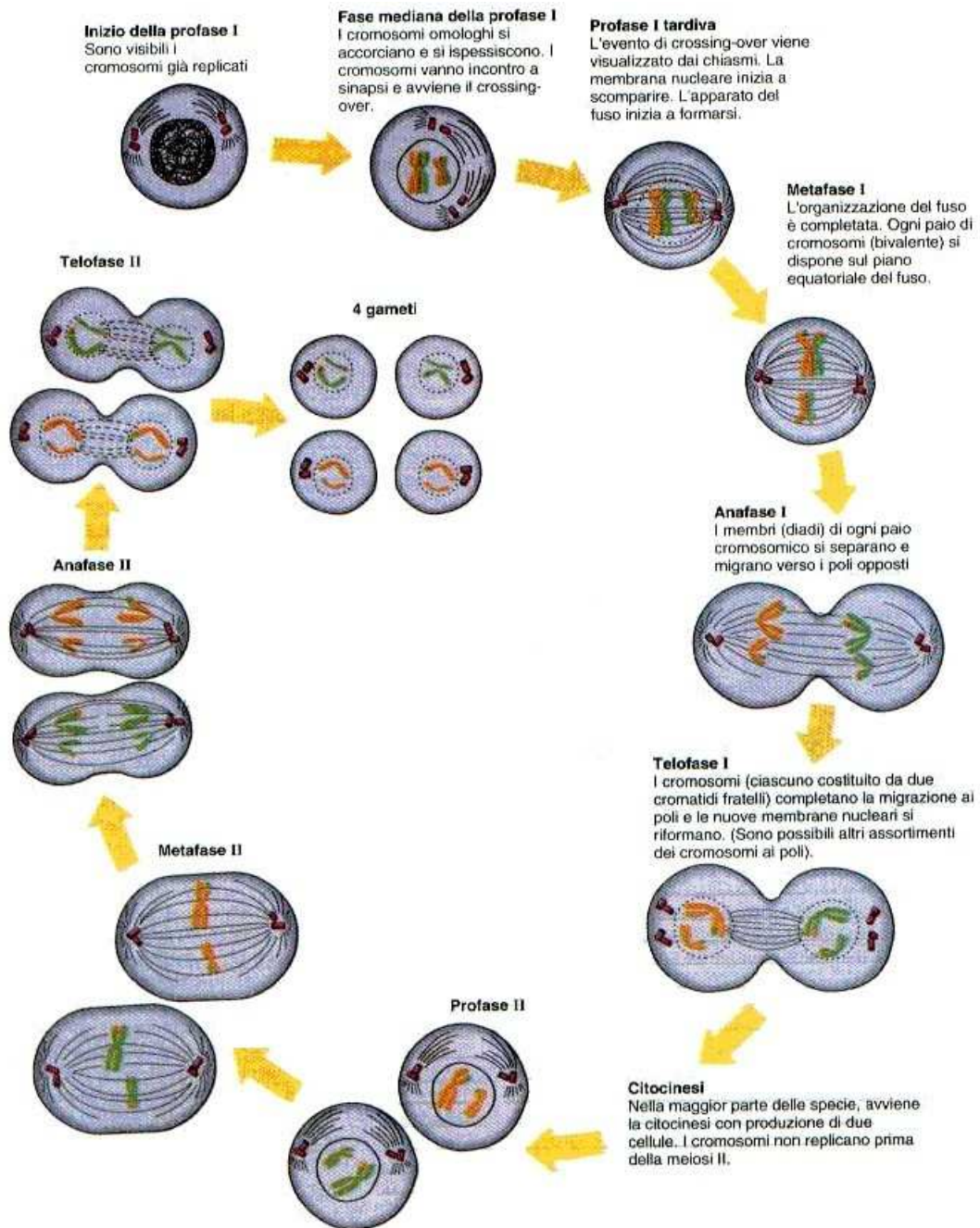


Figura 7- Stadi della meiosi di una cellula animale

Nella gametogenesi maschile i quattro nuclei vengono contenuti in quattro cellule distinte che si differenziano in spermatozoi.

Nella gametogenesi femminile invece uno solo dei nuclei diventa il nucleo dell'ovocita, gli altri vengono espulsi insieme con una piccola quantità di citoplasma in due o tre piccole cellule abortive che sono dette globuli polari e che restano addossate all'ovocito. Ciò ha il significato di non suddividere il citoplasma

dell'ovocita, la cui organizzazione è di fondamentale importanza per il successivo sviluppo dello zigote.

Una volta giunte a livello della gonade le cellule germinali primordiali, dopo un periodo di quiescenza più o meno lungo, iniziano il loro differenziamento in senso maschile o femminile.

I gameti dopo che hanno iniziato il loro differenziamento sessuale, nella donna e nell'uomo, vanno incontro a processi ben diversi, che si chiamano, rispettivamente, ovogenesi e spermatogenesi.

SPERMATOGENESI

La spermatogenesi è un processo che avviene nell'epitelio seminifero del testicolo e che porta alla formazione di cellule altamente specializzate: *gli spermatozoi*.

L'intero processo è suddiviso in due fasi: spermatocitogenesi e spermiogenesi.

Spermatocitogenesi

Nel tubulo seminifero, posti sulla lamina basale, le cellule germinali primordiali già nei primi mesi della vita embrionale-fetale si dividono mitoticamente a dare gli **spermatogoni**: stadio differenziativo che non viene superato fino alla pubertà. Sono cellule staminali germinali diploidi (2n), una popolazione mitotica rinnovabile per tutta la vita.

Dallo spermatogonio, attraverso il classico processo di mitosi, si ottengono ciclicamente, ogni 16 giorni, tre categorie:

- *spermatogoni A scuri*: cellule piccole con nucleo grande ed ovale, con abbondante eterocromatina. Per mitosi danno origine ad altri spermatogoni A scuri o A chiari;
- *spermatogoni A chiari*: come gli scuri ma con eucromatina. Per mitosi originano A chiari o spermatoconi B;
- *spermatogoni B*: nucleo sferico e piccolo con zolle di cromatina e nucleolo al centro. Il citoplasma presenta più organuli rispetto agli altri spermatogoni.

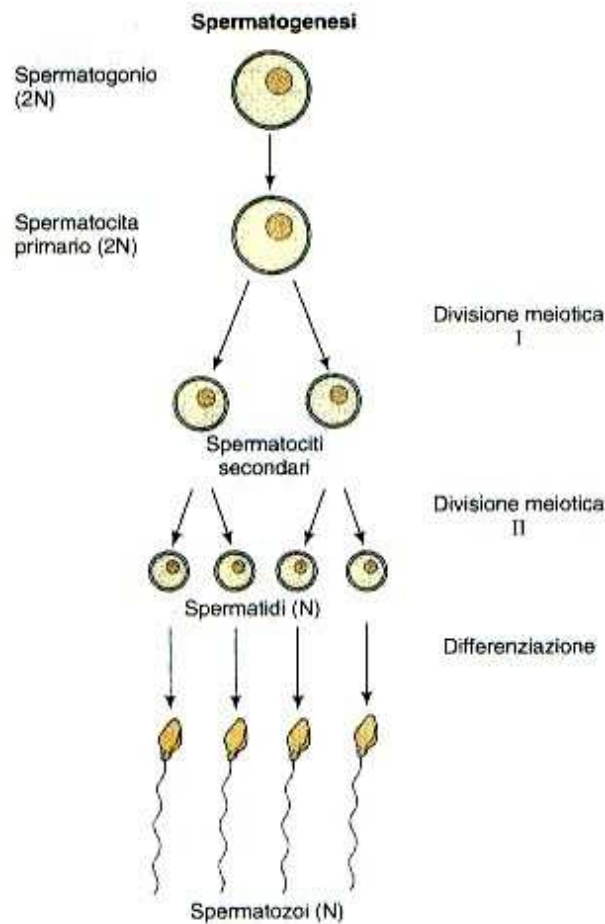


Figura 8- Spermatogenesi

Questi entrano in meiosi dando:

- *spermatociti di I ordine*: cellule grosse che duplicano il proprio corredo cromosomico ($4n$) e vanno incontro alla prima divisione meiotica, dalla quale si origineranno cellule figlie $2n$. Il processo dura circa tre settimane, al termine del quale vengono definiti spermatociti di II ordine;
- *spermatociti di II ordine*: originano dalla prima divisione meiotica e vanno incontro immediatamente alla seconda dalla quale si otterranno spermatidi: cellule figlie aploidi.

Spermiogenesi

Gli spermatidi, durante la spermatogenesi, vanno incontro ad importanti modificazioni morfologiche che fanno sì che si possano differenziare in *spermatozoi*, gameti maschili maturi rilasciati nel lume dei tubuli seminiferi.

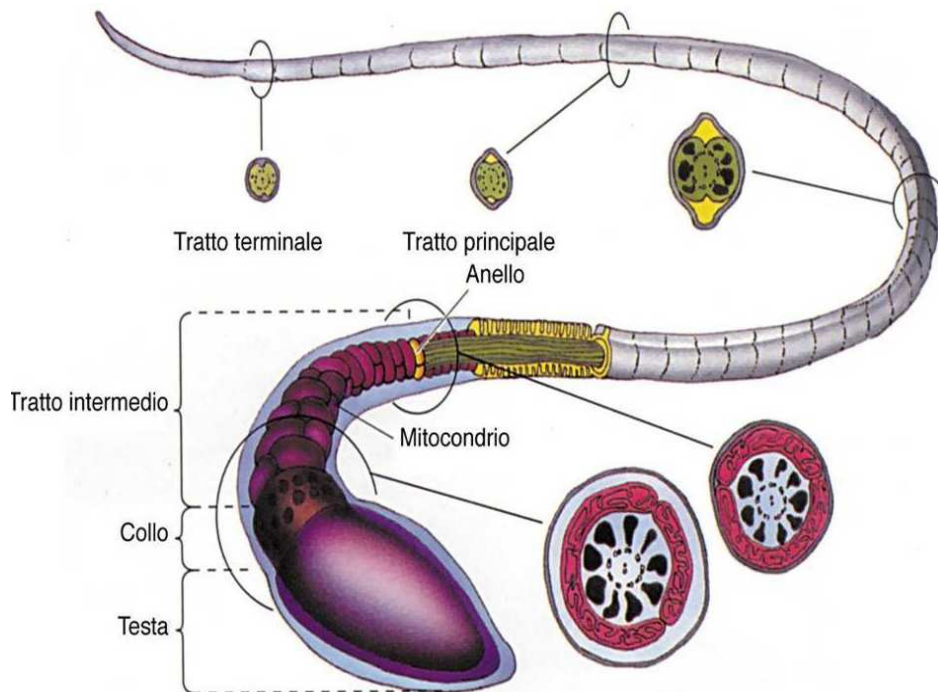


Figura 9- spermatozoo

Si distinguono quattro particolari fasi :

- ***Fase del Golgi***: l'apparato del Golgi sintetizza enzimi idrolitici, accumulati in granuli pro-acrosomici che si fondono in un unico granulo acrosomico. Contemporaneamente inizia lo sviluppo della coda in corrispondenza del polo opposto a quello in cui è presente il granulo acrosomiale.
- ***Fase del cappuccio***: il granulo acrosomiale si dispone sulla membrana nucleare dello spermatide fino ad aderirne perfettamente per 2/3 a formare il cappuccio acrosomico. Il continuo sviluppo dei filamenti della coda è

accompagnato dalla migrazione di entrambi i centrioli che dalla periferia si spostano fino al polo del nucleo in posizione opposta rispetto all'acrosoma.

- **Fase dell'acrosoma:** il nucleo si allunga spostandosi dal centro alla periferia della cellula e l'acrosoma, strettamente al nucleo, si allunga adattandosi alla nuova conformazione di quest'ultimo ed acquistano entrambi la conformazione definitiva. Il citoplasma si sposta in posizione caudale rispetto al nucleo e la cromatina si addensa. Si completa la coda.

- **Fase della maturazione:** termina il processo di condensazione della cromatina già in atto mentre il citoplasma in eccesso resta legato allo spermatide fino al termine del processo, per poi staccarsi, e dare il corpo residuale, digerito ad opera dei lisosomi delle cellule del Sertoli. Si assiste alla migrazione dei mitocondri verso la porzione prossimale del flagello che si dispongono a formare un manicotto. Si ha l'interruzione di sincizi citoplasmatici e la liberazione degli spermatozoi nel lume del tubulo.

La maturazione dello spermatozoo, successivamente, continua nelle vie genitali femminili, a livello cioè del canale cervicale, dell'utero e degli ovidotti.

Gli spermatozoi immessi nel lume dei tubuli seminiferi, non sono capaci né di muoversi né di fecondare: immersi nel liquido seminale essi vengono poi spinti nei tubuli retti. Qui, cellule a loro funzione secretoria, incrementano il quantitativo di liquido che circonda gli spermatozoi, con l'aggiunta di nuovi componenti molecolari e di potassio, necessari perché possa iniziare il processo di maturazione.

I tubuli retti confluiscono nella rete testis che rappresenta una stazione di raccolta smistamento degli spermatozoi verso i condotti efferenti che li trasportano poi nel canale dell'epididimo.

Per l'attività secretiva delle cellule epiteliali dell'epididimo gli spermatozoi completano la loro maturazione raggiungendo un alto grado di motilità e anche la capacità di fecondare.

Dall'epididimo, attraverso il canale deferente, gli spermatozoi vengono depositati nelle vescicole seminali in attesa che raggiungano le gonadi femminili con l'eiaculazione. Prima di essere espulso, lo sperma viene arricchito del secreto della prostata e del liquido prodotto dalle ghiandole bulbo-uretrali con azione lubrificante durante la copula.

Nel momento dell'eiaculazione gli spermatozoi lasciano l'ampolla deferenziale e le vescichette, e attraverso il dotto eiaculatore, giungono all'uretra prostatica che percorre tutta la lunghezza del pene fino ad aprirsi a livello del glande.

Gli spermatozoi giungono in vagina, subito dopo la deposizione del liquido seminale, si crea un coagulo gelatinoso che funzionalmente ha lo scopo di far aderire il liquido seminale alla portio uterina.

In vagina, in particolare durante l'attraversamento del muco cervicale, gli spermatozoi subiscono l'ultimo processo di maturazione: attraverso la **capacitazione** lo spermatozoo acquisisce capacità fecondante probabilmente per eliminazione di alcuni gruppi glucidici dalle proteine di membrana.

Terminata la capacitazione, si può avere la **reazione acrosomiale** che rappresenta un processo di esocitosi con fusioni localizzate tra la membrana acrosomiale esterna e la membrana plasmatica dello spermatozoo con formazione di vescicole.

Il primo spermatozoo che raggiunge l'cellula uovo trova rapidamente i recettori leganti presenti sulla membrana e fonde la sua membrana con quella dell'ovocita. La zona fusa della membrana si apre e lo spermatozoo penetra nel citoplasma dell'cellula uovo.

Un altro processo innescato dalla fusione cellula uovo-spermatozoo è la reazione corticale volta ad impedire la polispermia, cioè la fecondazione da parte di più di uno spermatozoo. Con un processo simile alla reazione acrosomiale, le vescicole corticali dell'uovo si fondono con la membrana plasmatica dell'ovocita e rilasciano per esocitosi il loro contenuto. Le sostanze chimiche rilasciate modificano dal punto di vista molecolare la membrana plasmatica e la zona pellucida circostante in modo da impedire la penetrazione o il legame di altri spermatozoi. Quando l'cellula uovo è stato fecondato e diventa uno zigote, inizia la divisione mitotica, mentre si avvicina lentamente all'utero, dove si impianta ed ivi rimane per tutto il periodo della gestazione.

ANOMALIE DELLA SPERMATOGENESI E STERILITA'

Una corretta diagnostica in campo seminologico è il presupposto più importante nella diagnostica dell'infertilità maschile. Nell'era della riproduzione assistita si è reso necessario standardizzare i criteri e le procedure utilizzate per l'esecuzione di un corretto esame del liquido seminale o spermioγραμμα. La complessità dell'esame è cresciuta a tal punto da indurre la World Health Organization, nel 1980, a promuovere alcune linee guida per lo studio di base del liquido seminale e per la descrizione ed interpretazione dei risultati ottenuti; linee guida che vengono rettificare attraverso periodici aggiornamenti.

Da questa standardizzazione, gli spermatozoi vengono analizzati nella loro concentrazione, vitalità, morfologia (valutate le anomalie di testa, collo e coda) e motilità.

Per tanto è stato possibile classificare le variabili seminali in:

- *Normospermia*: eiaculato normale con 20mln/ml di spermatozoi dei quali almeno 50% con motilità progressiva rettilinea, 30% con morfologia normale e vitalità del 75%;
- *Azoospermia*: assenza di spermatozoi nell'eiaculato;
- *Oligozoospermia*: concentrazione di spermatozoi inferiore a 20 mln/ml;
- *Teratozoospermia*: alterazione della forma degli spermatozoi (< 30% con morfologia normale);
- *Astenozoospermia*: alterazione della motilità degli spermatozoi (< 50% di progressivi veloci **a** + progressivi lenti **b**);
- *Oligoastenoteratozoospermia*: associazione dei quadri sopra descritti che denota un coinvolgimento di tutte e tre le variabili seminali.

E' interessante rilevare come da uno studio eseguito presso il Laboratorio del Servizio di Andrologia dell'Università degli studi di Pisa dal gruppo del Prof. Menchini Fabris, confrontando i valori medi riscontrati negli esami odierni con quelli eseguiti venti anni orsono, sia stato rilevato un marcato decremento sia a carico della concentrazione sia della motilità e della morfologia spermatica.

La riduzione della capacità riproduttiva è sicuramente dovuta ad un'influenza combinata di molti fattori esterni, primo tra tutti, quello ambientale, inteso anche come mutate abitudini di vita a cui la società ci costringe.

Un altro fattore è senz'altro, la ritardata età a cui le coppie giungono al matrimonio per svariate esigenze socio-economiche e, non meno importante, la recrudescenza di molte forme patologiche dell'apparato riproduttivo maschile, in primo luogo quelle flogistiche infettive legate alle diverse abitudini sessuali di oggi rispetto al passato.

PATOLOGIE UROGENITALI ED INFERTILITA'

La prostatite è un'affezione frequente, caratterizzata da un progressivo aumento dell'incidenza dai giovani all'età adulta. Spesso, in età avanzata, è associata ad un'iperplasia prostatica.

Lo studio clinico della patologia, non deve limitarsi alla ghiandola prostatica in se ma deve essere esteso a tutte quelle formazioni anatomiche che la costituiscono, insieme la “zona urogenitale maschile implicata nell'affezione” e cioè:

- Uretra posteriore;
- Otricolo prostatico;
- Dotti prostatici;
- Canali eiaculatori;
- Vescicole seminali.

Tra gli agenti etiologici, la maggiore responsabilità è attribuibile alla flora batterica Gram-negativa:

- Escherichia coli;
- Klebsiella;
- Proteus;
- Enterobacteri;
- Pseudomonas.

Meno frequenti i casi attribuibili alla flora batterica Gram-positivi:

- Stafilococchi;
- Streptococchi;
- Enterococchi;

E più raramente batteri più protozoi e miceti.

- La via di diffusione dei patogeni più frequente è quella *canalicolare uretrogena o uretrale ascendente* (germi comunemente ospiti dell'uretra o esterni). Tra le altre vie di diffusione si ricordano quella
 - *Urinogena o uretrale discendente*: infezioni dell'alta via escrettrice
 - *Ematogena*: focolai extragenitali ed extraurinaria;
 - *Canicolare spermatica*: orchiti, epididimiti;
 - *Linfatica*: flogosi pelviche e del retto.

Le prostatiti vengono comunemente classificate in: batteriche (acute e croniche) ed abatteriche (croniche, prostatosi, prostatodinee).

Le *prostatiti batteriche* sono le più frequenti, di diagnosi relativamente facile in base ai dati clinici e di laboratorio. E' da tenere presente che la loro sintomatologia si confonde con quella dell'infiammazione delle vescicole e/o uretrale e può mimetizzarsi con quadri pseudo-influenzali.

Nella maggior parte dei casi le prostatiti batteriche sono sostenute dalla flora batterica comune, in prevalenza Gram-negativa, responsabile delle forme acute e subacuta; meno frequentemente delle forme croniche, in cui è più facile l'associazione batterica e/o protozoaria (presenza di Chlamydia, Mycoplasma o la totale assenza di elementi batterici dimostrabili).

Sempre più eccezionali oggi sono, invece, le cosiddette forme batteriche "specifiche" come quella di natura luetica o tubercolare (ma che nelle popolazioni di extra comunitari stanno riemergendo).

Le *prostatiti abatteriche* sono caratterizzate dal mancato isolamento dei germi, neppure su colture da prelievo biotico e su terreni particolari per mycoplasmi. Chlamydia, miceti. Presumibilmente, sono sostenute da un processo immunitario

locale cellulo-mediato verso antigeni mis-conosciuti, oppure, come alcune ricerche di immunofluorescenza hanno evidenziato, dall'attivazione di un processo "immunitario-umorale" con reazioni anticorpali verso antigeni tissutali, fissazione del complemento e conseguente liberazione di fattori chemiocettivi locali. Da includere, tra queste forme di prostatiti, la prostatosi (dolore prostatico con aumento di volume e consistenza della ghiandola) e la prostatodinia (con disturbi minzionali, algie pelviche, psicogene ed aspecifiche).

PROSTATITI CRONICHE

Sintomatologicamente, queste forme decorrono come prostatiti croniche, in un'età compresa tra i 25 ed i 55 anni, ma non sono esenti le altre età. Tra le prostatiti croniche, oltre alla presenza di *Chlamydia tracomatis* ed *Ureaplasma urealyticus*, si sono evidenziati nel liquido prostatico:

- Anaerobi;
- Trichomonas;
- Micobatteri;
- Treponemi;
- Miceti;
- Virus.

Nelle forme acute, il polimorfismo sintomatologico, può trovare giustificazione nei diversi meccanismi patogenetici che le inducono. Tra questi la "patogenesi ematogena" si manifesta spesso con inizio pseudoinfluenzale, come malessere generale, astenia, febbre e/o sintomi urinari (pollachiuria, stranguria, ritenzione urinaria). Questa forma non è la più frequente, ma è quella che porta alla sintomatologia più subdola, in quanto i sintomi urinari spesso secondari a quelli generali sono sfumati.

Tra gli altri meccanismi patogenetici che inducono al polimorfismo sintomatologico, ricordiamo la patogenesi uretrogena o urinogena quasi sempre

con sintomi locali che precedono quelli generali anch'essi con pollichiuria, stranguria, pseudoincontinenza, secrezioni uretrali, febricole. E ancora, la patogenesi da diffusione linfatica che si manifesta con sintomi spesso confusi con quelli degli organi primitivamente colpiti, ed è caratterizzata da dolori addominali, dolori ipogastrici, crisi emorroidali, tenesmo anorettale. Nelle forme croniche la sintomatologia è quanto mai varia, in funzione del quadro anatomopatologico, della localizzazione, dei gradi di evoluzione, dello stato psico-emotivo, passando da forme asintomatiche (salvo riacutizzazioni), disuria saltuaria (crisi di congestioni pelvica), algie pelviche e perineali (conseguenza a volte di periprostatite), disuria persistente (rigidità o edema dell'uretra posteriore e/o sclerosi del collo vescicolare), turbe sessuali.

Nei casi più tipici, anamnesi ed obiettività clinica sono sufficienti per formulare una diagnosi di prostatite sia nella fase acuta che nelle forme croniche. Fondamentale nella diagnostica umana l'ispezione diretta della ghiandola mediante l'esplorazione rettale. Comunque la diagnosi di prostatite non può essere disgiunta da quelle indagini intese ad evidenziare i fattori etiologici determinanti, nonché eventuali fattori favorenti. Occorre, inoltre, tener presente che sotto una sintomatologia apparentemente di natura prostatica, vi può essere un'affezione dell'apparato urinario, una neoformazione di vescicole, una calcolosi uretrale, una stenosi uretrale. Da ciò la necessità di una diagnosi differenziale con altre patologie attraverso indagini di laboratorio, diagnostica strumentale ed eventualmente citoistologiche.

COMPLICANZE

La prostatite acuta, nelle sue forme più lievi, tende a guarire da se, grazie ad un riconosciuto potere antibatterico del secreto ghiandolare prostatico. Tuttavia, ciò non rappresenta la regola e quindi, si possono verificare delle complicazioni come:

- epididimite
- funicolite

- vescicolite
- ascessualizzazioni
- fistolizzazioni (uretra-retto-perineo)
- cronicizzazioni.

Oggi grazie ai mezzi diagnostici e terapeutici selettivi di cui disponiamo, le complicanze sono piuttosto rare, ad eccezione della epididimite, espressione tipica che si riferisce alla diffusione canalicolare deferenziali e linfatica di un'infezione, sostenuta da germi particolarmente virulenti o resistenti ai trattamenti.

Tra le complicanze della prostatite cronica, una delle più rilevanti è quella della sclerosi secondaria del collo vescicolare, dovuta al coinvolgimento, nell'evoluzione fibrosa degli elementi muscolo-elastici, dello sfintere vescicolare prossimale, dell'uretra prostatica, questa complicanza trasforma una patologia, sino ad allora medica, in una chirurgica. Altre complicanze nelle forme croniche sono:

- micro-diverticolosi
- formazioni di pseudocisti
- calcolosi secondarie ghiandolari
- periprostatiti, vescicoliti, fistolizzazioni.

Le prostatiti croniche, inoltre, in funzione dello stato psicoemotivo del soggetto, hanno ripercussioni, sia a livello delle funzioni sessuali sia di quella riproduttiva. Tra le turbe delle funzioni sessuali, un abbassamento della soglia riflessogena dovuto a fenomeni congestivi e fisico clinici locali, può provocare inizialmente l'eiaculazione precoce, cui si possono poi collegare, per meccanismo di autoinnesco psicologico, anche turbe della libido, dell'erezione e dell'orgasmo, fino ad un quadro, talvolta, di vera e propria castrazione psicologica (infertilità,..).

Tra le turbe della funzione riproduttiva, con quadri di ipo o di vera e propria infertilità, ricordiamo che le modificazioni del liquido seminale consequenziali alle prostatiti sono dovute a:

- **ALTERAZIONI MORFOFUNZIONALI:**

si vengono a creare sia nella ghiandola prostatica che nella via seminale con ostruzione dei dotti ghiandolari, ostruzioni della via seminale, ostacolata propulsione degli spermatozoi.

- **ALTERAZIONI IMMUNOLOGICHE:**

espressione di una reazione di tipo autoimmune, con presenza nel secreto prostatico di anticorpi agglutinanti ed immobilizzanti lo sperma, aumento delle IgG ed IgA.

- **ALTERAZIONI BIOCHIMICHE DEL SECRETO PROSTATICO:**

si riconducono, essenzialmente, ad una diminuzione della densità del liquido seminale per la ridotta secrezione prostatica, con conseguente diminuzione dell'acido citrico e dello zinco. Lo zinco gioca un ruolo essenziale sulla mobilità e sulla qualità dello sperma. Inoltre, in un sale di zinco, il PAF è stata riconosciuta un'azione battericida cui sono sensibili l'80% dei germi responsabili delle infezioni urogenitali. Si può avere altresì un aumento del pH mentre il fruttosio, indice della funzione secretoria delle vescicole seminali e quindi della proprietà dei dotti eiaculatori, è diminuito.

Le modificazione del liquido seminale che scaturiscono dalle suddette alterazioni sono: oligospermia, astenospermia, aumento in percentuale delle forme immature e della alterata morfologia, fenomeni di agglutinazione e morte completa dello sperma entro 5/6 ore dall'eiaculazione.

TERAPIA DELLE PROSTATITI

Per la complessità del quadro etiopatogenetico, la terapia delle prostatiti si avvale di diversi tipi di trattamento:

- stile di vita
- adiuvante
- ormonale
- locale
- antinfiammatorio
- antibatterico
- chirurgico

Il trattamento adiuvante per le prostatiti acute comprende: analgesici, antipiretici, a volte alfa-litici, fitoterapici, idratazioni, riposo, a volte purganti.

Per le prostatiti croniche: dieta, regolazione dell'alvo, igiene sessuale (1) e, in alcuni casi tranquillanti.

(1) evitare lunghe astinenze sessuali e prolungate eccitazioni.

MICROORGANISMI PATOGENI

Neisseria gonorrhoeae o gonococco

Caratteristiche morfologiche e strutturali

Cocco Gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, asporigeno, immobile, privo di capsula, solitamente si presenta riunito a coppie con le facce adiacenti appiattite.

E' responsabile di *uretriti* di tipo gonococcico (infiammazioni dell'uretra) e *gonorrea* (malattia che causa infiammazione purulenta delle mucose). Di estrema importanza nel processo patogenetico dell'infezione sono i pili, che rappresentano i primi mediatori del processo di adesione, essendo in grado di interagire, in modo altamente selettivo con i recettori presenti sulle superfici mucose.

Aspetti clinici dell'infezione

Al contatto del microrganismo con l'epitelio della cervice, la congiuntiva, l'area anorettale o l'uretra maschile, segue un periodo di incubazione di 2-8 giorni dopo il quale si presentano i sintomi dell'infezione primaria: febbre, dolore addominale, bruciore e frequente minzione. Sia nell'uomo che nella donna le uretriti gonococciche acute sono caratterizzate da abbondante essudato cremoso giallastro: nelle forme croniche l'essudato è meno tipico ed abbondante. Può verificarsi un'invasione del torrente circolatorio, instaurandosi un'infezione generalizzata accompagnata da lesioni cutanee ed artrite.

Trasmissione

La trasmissione del gonococco avviene esclusivamente per via esogena, attraverso contatto sessuale di tipo orale, genitale e anale o da madre gravida a

neonato per diretto contatto con le secrezioni dell'infezione nella cervice materna durante il parto.

Terapia

Sono le cefalosporine il trattamento terapeutico raccomandato; consigliato è anche l'impiego di tetraciclina. Lo sviluppo di vaccini per la gonorrea attualmente è reso difficile dalla mancanza di appropriati modelli di malattie gonococciche animali.

[17]

Chlamydia trachomatis

Batterio Gram negativo, parassita endocellulare obbligato. Come i vari batteri contengono RNA e DNA, ribosomi 70S, dimensioni del genoma di 500-1000 kb. Altamente adatti alla vita intracellulare sono in grado di interrompere la sintesi di cellule macromolecolari dell'ospite ed utilizzare il substrato dell'ospite per la sintesi di proteine e lipidi proprie di CT. Presentano una unica parete cellulare con proteine-cisteine invece del peptidoglicano ed una membrana lipopolisaccaride; tale parete cellulare contribuisce alla virulenza dell'organismo attraverso l'inibizione della funzione dei fagolisosomi nei lisosomi.

Aspetti clinici dell'infezione

L'infezione, spesso si presenta asintomatica. Nell'uomo possono insorgere raramente sintomi simili a quelli provocati da uretriti gonococcali con moderata disuria, chiare o gialle emissioni uretrali, sensazioni di prurito e pizzicore, emospermia e/o infiammazione dell'ano. Le infezioni croniche non trattate possono sfociare in febbre, dolore testicolare, arrossamento ed epididimiti.

Studi recenti hanno inoltre provato che l'infezione da CT può causare infertilità maschile agendo direttamente sullo sperma. In presenza di CT, si verificano una serie di fosforilazione dei residui di Tirosina presenti sulle proteine degli spermatozoi stessi che rivestono un ruolo importante nei processi di capacitazione e funzionalità dello sperma causando la diminuzione della motilità degli spermatozoi e l'aumento della percentuale di spermatozoi non vitali. Il lipopolisaccaride di CT ha attività suicida: si ha l'aumento di specie di ossigeno reattivo che inizieranno un processo di apoptosi caspasi-mediata degli spermatozoi. L'estensione del danno del DNA è relazionata alla funzionalità degli spermatozoi ed alla infertilità.

Trasmissione

CT infetta soprattutto le mucose dell'uretra, della cervice, del retto e della gola. L'organismo viene trasmesso per trasferimento di secrezioni infette e può avvenire anche senza contatto sessuale diretto. Le partners di uomini con sintomi di infezioni uretrali hanno più probabilità di essere infette rispetto a uomini con infezioni uretrali asintomatiche.

Terapia

Il trattamento consigliato è una terapia prolungata con farmaci quali macrolidi (Aritromicina) e tetraciline (Doxyciclina).
[17, 18, 19, 20]

Micoplasmi

Batteri appartenenti alla famiglia dei Mycoplasmatales caratterizzati dalle ridotte dimensioni, il più piccolo batterio isolato infatti, presenta un genoma di 580 kbp ed un diametro cellulare di 300 nm [22]. Sono le più piccole cellule capaci di vita autonoma, privi di parete cellulare, per la maggior parte delle caratteristiche sono simili ai Bacteria Gram-positivi, aerobi obbligati o aerobi/anaerobi facoltativi. I micoplasmi sono parassiti di diverse specie animali e vegetali e sono ampiamente distribuiti nel territorio. Nell'uomo causano patologie localizzate maggiormente all'apparato respiratorio o genitale, moltiplicandosi sulla superficie degli epitelii mucosi e mostrando una scarsa tendenza ad oltrepassarli. Al genere *Mycoplasma* appartengono *M. pneumoniae*, che causa una grave forma di polmonite atipica, *M. salivarium*, *M. orale*, *Mycoplasma buccale*, *M. faucium* e *M. lipophilum*, i quali non sono commensali delle prime vie aeree associati a nessuna patologia. Tra i micoplasmi "genitali", capaci cioè di colonizzare e generare infezioni a livello delle vie urinarie e genitali, si ritrovano invece con maggior frequenza *M. hominis* (**M.h**), *M. genitalium* (**M.g**), *M.spermatophilum* (**M.s**), *M. primatum* ed *Ureaplasma urealyticum* (**U.u**) [17].

Aspetti clinici dell'infezione

I micoplasmi patogeni del genere umano causano malattie urogenitali: uretriti non gonococcali e non-clamidiali, infiammazioni pelviche, endometriti ed infertilità sia maschile che femminile. **U.u** e **M.g** in particolare sono naturali abitanti dell'uretra maschile in grado di contaminare e danneggiare la qualità del seme durante l'eiaculazione. L'incubazione overnight di sperma con **U.u**, **M.h** e **M.g** ha mostrato avere effetti sulla fisiologia dello sperma, incluso l'espressione di alterata motilità, la capacità di subire reazioni acrosomiali ionoforo-indotte e la loro capacità di penetrare nella zona pellucida dell'oocita di criceto. E' stato dimostrato che **U.u** e **M.g** possono

essere causa di danneggiamento della fertilità umana attraverso una prematura decondensazione della cromatina senza un'apparente perdita di vitalità, ovvero minaccia per eventi tardivi come, la mancata fecondazione e l'alterato sviluppo embrionale. A seguito dell'incubazione con **M.g**, gli spermatozoi si ammassano immediatamente e dopo 5 minuti si determinano piccole agglutinazioni di spermi che col tempo aumentano di dimensioni causando l'immobilità. L'attacco della singola cellula di **M.g** avviene preferibilmente a livello del collo: protuberanze di cellule di **M.g** si attaccano indistintamente a tutte le parti dello spermatozoo. E' stata confermata la stretta interazione con la superficie della membrana dello spermatozoo e la cinetica di associazione ha rivelato notevole affinità verso coda e testa: il metabolismo differente tra i Micoplasmi può spiegare perché sono rispettati modelli di attacco particolari. Alla fase di adesione seguirebbe una fase di alterazione biochimica: un enzima prodotto dai micoplasmi, la neuraminidasi, modificando l'acido sialico concentrato nell'acrosoma, verrebbe a compromettere l'attività motoria dello spermatozoo per alterazione delle cariche elettriche superficiali. Alle alterazioni funzionali concorrerebbero inoltre la produzione di sostanze spermio tossiche e anticorpi specifici, presenti nelle secrezioni e soprattutto nel liquido seminale, i quali legandosi ai microrganismi adesi determinerebbero una spermioagglutinazione.

Il solfagalactoglicerolipide (SGG) è il glicopeptide solfato principale che si trova nello strato esterno della membrana plasmatica delle cellule germinali maschili di mammifero, distribuito asimmetricamente in tutto lo spermatozoo a seconda delle fasi di maturazione. La prevalenza di SGG nello sperma umano pare fornire a **M.h** un numero considerevole di molecole recettoriali attraverso cui è permessa l'adesione e l'internalizzazione. **M.h** infatti ha la capacità di penetrare nello spermatozoo con un meccanismo ancora sconosciuto ma è probabile che possano innescarsi cascate di traduzione del segnale e di riassetto del citoscheletro delle cellule bersaglio. Si può affermare che il principale meccanismo di virulenza mostrato da **M.h** potrebbe

essere il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che inducono alla cellula danni a livello della membrana: per ossidazione dei lipidi, perdita della fluidità di membrana e incapacità di sottoporsi a iperattivazione e reazione acrosomiale [24].

U.U presente sia in uomini che donne, feti e neonati. Causa uretriti non-gonococcali, epididimiti ed orchiti ma non prostatiti. Nelle donne è comune colonizzatore della vagina. Non ha alcun ruolo in patogenesi di vaginiti batteriche ma può esser coinvolto in infezioni miste delle tube di Falloppio e pelvi. Associato a sepsi pre e post parto, ad aborti spontanei, corioamnionite, infezioni del sistema nervoso centrale e polmoniti congiunte e neonatali. Altera varie caratteristiche dello sperma quali la motilità degli spermatozoi, la densità e la morfologia: lo sperma si presenta generalmente più viscoso con pH più basso, concentrazione media e numero di spermatozoi risultano significativamente inferiori mentre volume, vitalità e morfologia sono pressoché identici in individui U.U positivi e negativi. Modelli animali hanno mostrato che l'infezione di U.u potrebbe bloccare la formazione degli spermatozoi e che possa indurre l'apoptosi delle cellule germinali di topi. Tuttavia è un organismo con debole patogenicità e non è in grado di provocare oligospermia.[25]

Ureaplasma riscontrata in casi di calcoli renali probabilmente a causa della produzione di ureasi che possono iniziare la produzione di cristalli di struvite e calciofosfato. Riveste un ruolo poco rilevante nell'infertilità femminile ma ha un maggior effetto sugli aborti fetali e le malattie nel feto e nel neonato, infezioni polmonari con sviluppo di displasia bronco-polmonare. **M.s** identificato in campioni di seme con infertilità clinica e pare abbia effetti sulla motilità e la morfologia degli spermatozoi.

Trasmissione

Uu e Mh sono commensali dell'apparato genitourinario e la loro infezione è associata alla promiscuità sessuale. Possono essere trasmessi anche verticalmente da madre a feto durante la gravidanza e per diretto contatto attraverso i fluidi vaginali durante il parto. Tuttavia il percorso della colonizzazione negli adulti non è del tutto conosciuto.

L'identificazione di Mg in secrezioni orale e genitali, fa pensare che il contagio urogenitale abbia un ruolo determinante nella sua diffusione. Spesso associato anche ad infezioni di HIV a suggerirne una trasmissione di tipo sessuale.

Terapia

Poiché mancano di parete cellulare, i mollicutes sono resistenti agli antibiotici beta-lattamici.

Uu è sensibile alle tetraciline, enteromicine e claritromicina; Mg è generalmente sensibile alle tetraciline, enteromicina, claritromicina, azitromicina, streptomina e pectomicina.

Non è ancora disponibile un vaccino in grado di prevenire le infezioni dei micobatteri genitali. [17]

Gardnerella vaginalis

Batterio Gram positivo e negativo variabile caratterizzato da piccole dimensioni da 1 a 1,5 μ n con un massimo di 2,3 μ n. Forma ad asta pleomorfica, immobile e privo di flagelli, endospore o capsule tipiche.[28] Individuato come agente eziologico di vaginosi batterica che se a trasmissione sessuale, deve essere presente con un numero sufficiente per determinare una dose infettante.[26]

Agente patogeno in donne post parto o chirurgia pelvica, batteriemia nei neonati, raramente individuata in uomini e di solito in pazienti soggetti a fattori di rischio identificati, immunodepressione, anomalie anatomiche dell'apparato genito-urinario e l'alcolismo.

L'isolamento di G.v dallo sperma solleva la problematica volta a capire se l'organismo colonizza gli uomini e prevede un serbatoio d'infezione o è transitorio, risultato della continua acquisizione passiva dal partner donna. [27]

Aspetti clinici dell'infezione

La presenza di G.v nell'uretra non dà luogo a sintomi nella maggior parte degli uomini ma i batteri possono assumere ruolo patogeno per estensione alla prostata o alla vescica soprattutto in pazienti che hanno subito procedure urologiche. Spesso associato a balanopostite. [28]

Terapia

Successo terapeutico ottenuto attraverso la somministrazione di beta lattamici, tetracicline, cefalosporine, cloranfenicolo, metronidazolo. [27]

Trichomonas vaginalis

L'infezione di T.v, protozoo flagellato, nell'uomo è meno nota. Generalmente transitoria asintomatica o presente in piccole quantità difficili da individuare, solo in pochi casi si hanno sintomi conclamati quali scarico uretrale e disuria. [29, 30] Le tricomoniasi veneree possono esser causate da due flagellati: *T. vaginalis* nell'uomo e *T. foetus* nei bovini. Infezione molto diffusa in popolazione sessualmente attiva, associata a significativi problemi di salute pubblica, compresa la trasmissione di HIV [31]. In ogni caso lo sperma è veicolo per la trasmissione da uomo a donna: dopo eiaculazione, il liquido spermatico fa parte del materiale in cui i parassiti iniziano a stabilirsi nella volta vaginale [29]. La maggior parte degli uomini affetti non mostrano sintomi anche se talvolta presentano lievi uretriti, prostatiti ed epididimiti. Spesso sembrano transitorie ed agiscono più che altro come vettori. T.v risulta essere sensibile a concentrazioni basse di zinco e solfato di zinco. [31]

Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

ROS rappresentano una vasta categoria di molecole tra cui una collezione di radicali quali ione idrossile, superossido, ossido nitrico, perossilici, ecc; non radicali come ozono, ossigeno singoletto, perossidi di lipidi e di idrogeno e derivati dell'ossigeno. Questi derivati partecipano ad una cascata di reazioni che danno origine a radicali liberi che alla fine possono danneggiare substrati organici. In bassi livelli, è stato dimostrato, svolgono un ruolo importante in molti processi fisiologici negli spermatozoi. In particolare durante il processo di capacitazione, in apparato genitale femminile, si ha aumento del livello di calcio intracellulare, ROS e tiroxina chinasi portando all'aumento di cAMP che facilita l'iperattivazione dello spermatozoo, poi sottoposti a reazione acrosomiale acquistano capacità di fecondare. Perossidasi lipidica causata da bassi livelli di ROS porta alla modificazione della membrana plasmatica facilitando così l'adesione tra spermatozoo e oocita. Tuttavia innescano processi patologici del sistema riproduttivo maschile, sono coinvolti infatti in tumori della vescica, prostata e infertilità maschile.

Tutti i componenti cellulari tra cui lipidi, proteine, acidi nucleici e zuccheri sono potenziali obiettivi del sistema operativo cellulare. Il danno dipende non solo dalla natura e dalla quantità dei ROS coinvolti, ma anche dalla durata dell'esposizione ai ROS e da fattori extracellulari quali temperatura, tensione di ossigeno, composizione ambientale circostante. E' difficile bloccare il sistema operativo indotto da lesioni cellulari o di tessuti perchè i ROS sono continuamente prodotti dal metabolismo cellulare aerobico.

Lo stress ossidativo (OS) è la conseguenza di uno squilibrio tra la produzione di ROS ed il meccanismo di difesa di antiossidazione del corpo. Gli spermatozoi sono sensibili a OS per mancanza di difese citoplasmatiche [32]. La membrana plasmatica dello spermatozoo contiene lipidi sottoforma di acidi grassi polinsaturi (PUFA) che contengono più di due doppi legami carbonio-carbonio. La maggior parte dei PUFA contengono doppi legami C-C non coniugati separati da

gruppi dimetile: questa struttura rende il carbonio metilene- legame idrogeno più debole e di conseguenza più suscettibile di astrazione al seguito della quale i PUFA si riorganizzano per formare radicale diene coniugato che successivamente verranno ossidati. Attacchi di ROS a PUFA a livello della membrana cellulare portano ad una cascata di reazioni chimiche: perossidazione lipidica. L'OS è associato con alta frequenza a tagli di singolo e doppio filamento del DNA ed ancora causare delezioni e mutazioni del gene come mutazioni puntiformi o polimorfismi con conseguente diminuzione della qualità dello sperma. Si è dimostrato che la conservazione di citoplasma residuo negli spermatozoi è positivamente correlato alla generazione di ROS attraverso meccanismi che possono essere mediati dalla glucosio6fosfato deidrogenasi (G6PD) [33]. Alcune relazioni hanno collegato l'infezione di epatite virale C-RNA a molte manifestazioni extraepatiche ma non del tutto dimostrate definitivamente. Questi dati suggeriscono che l'infezione cronica di HCV è in grado di modificare i parametri seminali, in particolare la percentuale di spermatozoi con normale motilità progressiva e la morfologia: potrebbe direttamente o indirettamente compromettere la spermatogenesi poiché è emerso che HCV può stimolare la produzione di ROS. Gli stessi pazienti presentano bassi livelli di testosterone libero e inibina B, ormone glicoproteico prodotto dalle cellule del Sertoli, considerato marker sensibile della spermatogenesi corretta ed una probabile riduzione è conseguenza di una gametogenesi alterata nei pazienti affetti da HCV. [34]

Il liquido seminale contiene diversi tipi di cellule come spermatozoi maturi e immaturi, cellule rotonde da diverse fasi della spermatogenesi, leucociti e cellule epiteliali. Di questi diversi tipi cellulare leucociti e spermatozoi hanno dimostrato di essere le due principali fonti di ROS. I *leucociti*, soprattutto neutrofili e macrofagi, sono stati associati all'eccesso di produzione di ROS che conduce alla distruzione degli spermatozoi. Gli spermatozoi producono ROS soprattutto quando si verifica un difetto durante la spermatogenesi.

Forte correlazione positiva esiste tra gli *spermatozoi maturi* e la produzione di ROS che a sua volta influisce negativamente sulla qualità dello sperma. [32]

L'aumento dei livelli di ROS è correlato alla diminuzione della motilità degli spermatozoi. Tuttavia l'esatto meccanismo non è conosciuto: un'ipotesi dimostra che il perossido di idrogeno (H_2O_2) può diffondere attraverso la membrana cellulare ed inibire l'attività di alcuni enzimi di vitale importanza quali G6PD, enzima che controlla la velocità del flusso del glucosio attraverso lo shunt degli esosi monofosfati e a sua volta controlla la concentrazione intracellulare di NADPH usato come fonte di elettroni dagli spermatozoi per la generazione di ROS da parte del sistema enzimatico noto come NADPH ossidasi. Un'altra ipotesi prevede una serie di eventi correlati con conseguente diminuzione della fosforilazione di proteine assonemali e immobilizzazione degli spermatozoi entrambi associati alla fluidità della membrana, necessarie per la fusione spermatozoo-oocita. [33]

Principali siti di produzione dei ROS sono i mitocondri e la membrana plasmatica dello spermatozoo. Il mitocondrio è il centro della respirazione cellulare quindi il sito principale di generazione dei ROS che vengono prodotti attraverso un percorso ossido-reduttasi nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) dipendente. Al contrario la membrana plasmatica attiva sistemi di ossidazione NAD-dipendenti. La xantina ossidasi, enzima chiave del catabolismo delle purine, è anche coinvolto nella produzione dei ROS nello sperma [32]. La presenza di xantina in pazienti con varicocele determina la formazione di ROS ed è stato dimostrato che la varicocelectomia aumenta la concentrazione di antiossidanti come superossidodismutasi, catalasi, glucosio perossidasi e vit C nel plasma seminale e migliora la qualità dello sperma. [33]

L'inquinamento ambientale e le radiazioni possono generare ROS vari come perossido di idrogeno (H₂O₂), anione di superossido e radicale idrossilico. Danni possono essere causati anche dal fumo che induce il sistema operativo aumentando il livello di ossidanti. Secondo studi il fumo aumenta notevolmente i livelli di leucociti e ROS ed il tabacco incide negativamente sulla qualità degli spermatozoi ovvero sulla concentrazione, motilità e morfologia. Colpisce anche il DNA dello sperma con livelli maggiori di 8oxodG (8deossiguanosina), marker di danno ossidativi al DNA. Pertanto il fumo non influenza il tasso di fecondazione di per se ma aumenterà il rischio di mutazioni ereditarie.[32]

Risoluzione dei danni da ROS

Se il danno al DNA è minimo, gli spermatozoi possono subire auto-riparazione così come anche l'oocita è in grado di riparare il DNA degli spermatozoi danneggiati. L'apoptosi è una risposta non infiammatoria al danno tissutale caratterizzata da modificazioni morfologiche e biochimiche. Nel contesto del tessuto riproduttore maschile aiuta con l'eliminazione degli spermatozoi anomali mantenendo così la capacità delle cellule del Sertoli. L'esposizione mitocondriale ai ROS provoca il rilascio di fattori che inducono l'apoptosi (AIF) che interagiscono direttamente con il DNA e portano alla frammentazione del DNA. Gli spermatozoi a causa della scarsità di enzimi citoplasmatici non sono in grado di riparare danni ossidativi. [33] Studi hanno dimostrato che un ruolo significativo di difesa contro OS è dato dagli **antiossidanti**: proteggono gli spermatozoi dai ROS ed eliminano i ROS prodotti dai leucociti, evitano la frammentazione del DNA, bloccano la maturazione in spermatozoi prematuri e la produzione di spermatozoi anomali, stimolano gli spermatozoi e migliorano il risultato delle tecniche di riproduzione assistita. Si distinguono in *a. di prevenzione*, come chelanti di metalli, e *a. di animale saprofago* rimuovono i ROS già formati.

A. alimentari costituiscono la parte essenziale del sistema di difesa antiossidante umano: frutta e verdura nonché integratori alimentari, costituiscono le potenziali fonti di antiossidanti garantendo l'apporto di vitamina C, antiossidante capace di neutralizzare i radicali liberi ed evitare l'agglutinazione dello sperma. L'azione sinergica di vitamina C e flavonoidi aumenta l'efficacia di ambo le sostanze. Anche i *carotenoidi* contribuiscono alla difesa contro OS ed in particolare licopene e beta-carotene che protegge la membrana plasmatica dalla perossidazione lipidica. L'antiossidante più abbondante nell'organismo è il *glutathione* che svolge un ruolo importante nel proteggere i lipidi, le proteine e gli acidi nucleici da danni ossidativi. Solitamente si combina con vit E e selenio a dare glutathione perossidasi: terapia di glutathione porta ad un significativo aumento della motilità degli spermatozoi.[32]

Spesso gli spermatozoi selezionati per tecniche di riproduzione assistita provengono da ambiente sperimentale soggetto a stress ossidativi ed una percentuale elevata di questi può avere DNA danneggiato. In caso di inseminazione intrauterina (IUI) o fecondazione in vitro (IVF), tale danno non è fonte di preoccupazione perché i danni collaterali della perossidasi alla membrana plasmatica dello spermatozoo assicura che la fecondazione non avvenga con il DNA dello sperma danneggiato. Quando è usata l' ICSI, questa barriera naturale di selezione è bypassata e gli spermatozoi con DNA danneggiato iniettato direttamente nell'ovocita. Tecniche di riproduzione assistita possono mostrare miglioramenti significativi in vitro con l'aggiunta di antiossidanti e chelanti metallici (rebamipide, pentoxifillina, vit E, vit C, SOD, catalasi).[33]

Tecniche di separazione dello sperma come migrazione-sedimentazione, pendenza di centrifugazione e filtrazione in vetro lana riducono significativamente il livello di ROS rimuovendo leucociti, notevole fonte di ROS. [32]

INFEZIONI DI GHIANDOLE ACCESSORIE MASCHILI

Infezioni dell'apparato riproduttore maschile (MRT) sono malattie comuni che possono peggiorare la qualità dello sperma e pregiudicare il funzionamento delle ghiandole accessorie maschili perciò si ritengono una delle cause potenziali e correggibili di infertilità maschile; ancora oggetto di dibattito invece la fisiopatologia e l'epidemiologia per quanto riguarda l'incidenza di infezioni. Le ghiandole accessorie maschili secernono diversi fattori quali alfa-glucosidasi, fruttosio, prostaglandine, capaci di agire come anti-riducenti e nella prevenzione dell'agglutinazione degli spermatozoi, acido citrico, bicarbonato ed altri cruciali per la fisiologia degli spermatozoi.

La funzione secretoria della prostata è stata ampiamente studiata ed il pH del plasma seminale, acido citrico, gamma-glutariltranspeptidasi e zinco sono state proposte come indicatori della funzione esocrina e le loro concentrazioni generalmente appaiono modificate in risposta a infezioni batteriche ed infiammazioni ma non sono riconosciuti come strumento diagnostico per individuare MRT. Un elevato pH dello sperma nei pazienti affetti da MRT potrebbero riflettere almeno in parte una disfunzione secretoria della prostata per bassi livelli di acido citrico nel liquido seminale.

In condizioni particolare l'epididimo può agire come serbatoio di batteri nell'apparato riproduttore maschile, l'azione escretoria si abbassa in uomini con MRT, in particolare per quanto riguarda l'alfa-glucosidasi.[35]

Materiali E Metodi

ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

Strumento principale per la valutazione della fertilità maschile, atto a valutare la qualità degli spermatozoi.

RACCOLTA E CONSEGNA DEL CAMPIONE

Il campione deve essere raccolto dopo un periodo di astinenza sessuale di non meno di 48 ore e non più di 7 giorni.

Sul modulo di accompagnamento di ogni analisi dovranno essere registrati il nome del paziente, il periodo di astinenza, il giorno e l'ora della raccolta, e l'intervallo intercorso tra la raccolta e l'analisi.

Il personale di laboratorio deve essere al corrente che i campioni di liquido seminale possono contenere agenti infettivi pericolosi (ad es. HIV, il virus dell'epatite e gli herpes virus), e che perciò deve essere trattato con estrema cura, come materiale a rischio biologico

Il campione dovrà essere ottenuto per masturbazione e raccolto in un contenitore sterile di vetro o di plastica dall'apertura sufficientemente larga, raccolto preferibilmente in una apposita stanza nei pressi del laboratorio. Altrimenti, dovrà essere consegnato al laboratorio entro 1 ora dalla raccolta proteggendolo dalle alte e dalle basse temperature (inferiori a 20 °C e superiori a 40 °C) durante il trasferimento al laboratorio.

ESAME MACROSCOPICO INIZIALE

Liquefazione : Un campione normale si liquefà entro 60 minuti a temperatura

ambiente, sebbene generalmente questo avvenga entro 15 minuti. In alcuni casi, la liquefazione completa non avviene entro 60 minuti e questo fatto dovrà essere registrato. Una delicata miscelazione continua o una rotazione del campione, durante la liquefazione, possono ridurre gli errori nel determinare la concentrazione degli spermatozoi.

Aspetto : Il campione viene valutato inizialmente mediante una semplice osservazione a temperatura ambiente, immediatamente dopo la liquefazione o dopo un'ora dalla eiaculazione. Il liquido seminale normale ha un aspetto grigio opalescente. Può apparire meno opaco se la concentrazione di spermatozoi è molto bassa, di colore rosso bruno se ci sono emazie o giallognolo in pazienti con ittero o che assumono vitamine.

Volume : Il volume dell'eiaculato viene considerato normale se è superiore ai 2ml e inferiore a 5 ml

Viscosità : valutata aspirando delicatamente il liquido seminale in una pipetta da 5 ml dalla imboccatura ampia, e lasciandolo gocciolare per gravità, osservando la lunghezza del filamento ottenuto: un campione normale lascia la pipetta come piccole gocce distinte. In caso di anormale viscosità la goccia formerà un filamento unico.

pH : sempre misurato ad un tempo costante dall'eiaculazione, e comunque entro un'ora. Una goccia di liquido seminale deve essere uniformemente stesa su una apposita cartina indicatrice.

I valori di pH seminale non deve essere inferiore a 7,2 né superiore a 8,0.

ESAME MICROSCOPICO INIZIALE

Determinazione della concentrazione di spermatozoi: Con l'ausilio di una micropipetta vengono posti 10 µl di liquido seminale sul portaoggetti della camera di Makler, preriscaldata e coperti con uno speciale vetrino coprioggetti dotato di ghiera metallica, che consente di creare un monostrato di 10 µm di spessore. Messa a fuoco la griglia, si procede alla conta degli spermatozoi.

Valutazione della motilità: E' necessario osservare almeno 5 campi in modo sistematico per classificare 200 spermatozoi.

La motilità di ogni spermatozoo è definita nel seguente modo:

- 'a' motilità progressiva rapida;
- 'b' motilità progressiva lenta o irregolare;
- 'c' motilità non progressiva;
- 'd' immobili.

Agglutinazioni: gli spermatozoi mobili aderiscono l'uno all'altro testa a testa, coda a coda, o in modo misto, testa a coda.

La presenza di agglutinazione suggerisce, ma non ne è segno determinante, una infertilità di natura immunologica.

Vitalità degli spermatozoi: dovrebbe essere valutata quando la percentuale degli spermatozoi immobili supera il 50%.

La percentuale di spermatozoi vivi può essere determinata attraverso tecniche di colorazione che si basano sul principio che le cellule morte, che hanno una membrana danneggiata, trattengono determinati coloranti (eosina-nigrosina). Talvolta si utilizza il test di Swelling di rigonfiamento iposmotico (con utilizzo di acqua distillata).

VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA SPERMATICA

La morfologia viene effettuata attraverso una colorazione ottenuta miscelando 70 microlitri di liquido seminale, 70microlitri di terreno e 10microlitri di colorante Giemsa, quindi si depone una piccola goccia del preparato colorato su di un vetrino e utilizzando un obiettivo in campo chiaro 100x ad immersione di olio si valuta la morfologia esaminando almeno 200 spermatozoi.

Morfologia dello spermatozoo normale

Lo spermatozoo umano, normale e maturo, osservato al microscopio ottico, appare costituito da una porzione apicale, detta "testa", di forma ovalare appiattita, le cui dimensioni standard equivalgono a:

- Lunghezza da 4,0 a 5,0 μ
- Larghezza da 2,5 a 3,5 μ
- Rapporto Larghezza/Lunghezza da 1,50 a 1,75

La testa è per gran parte occupata dal nucleo contenente DNA (con assetto cromosomico aploide). Nella parte anteriore si trova il complesso acrosomiale o “acrosoma”, una struttura a forma di cappuccio.

La coda spermatica è inserita in maniera simmetrica in una lieve depressione alla base della testa.

Morfologia degli spermatozoi anomali

Anomalie della testa:

- Testa larga (macrocefalia);
- Testa piccola (microcefalia);
- Testa amorfa;
- Testa a punta detta a sigaro;
- Testa piriforme;
- Testa vacuolata;
- Testa a palla;
- Testa doppia o multipla;
- Assenza della testa (acefalia);
- Difetti dell'acrosoma.

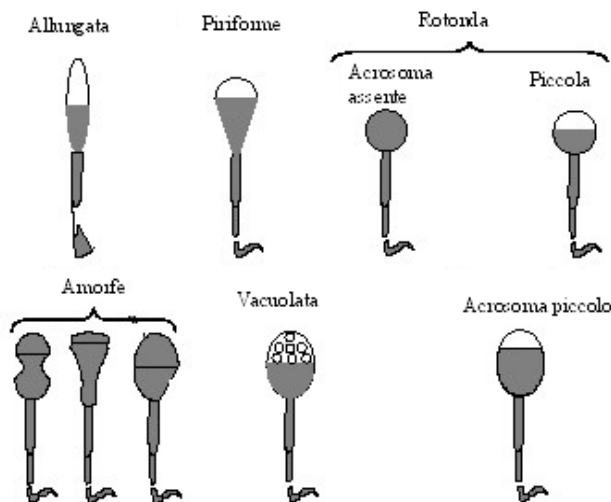


Figura 10- Disegni schematici delle anomalie della testa

Anomalia del collo e del tratto intermedio:

- Collo angolato;
- Tratto sottile (assenza della guaina mitocondriale);
- Tratto spesso e irregolare;
- Inserzione asimmetrica della coda.

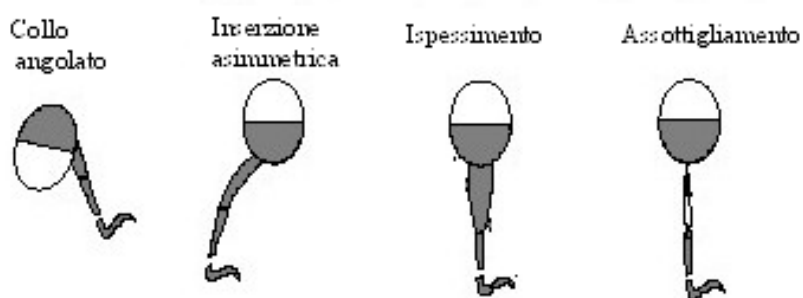


Figura 11- Disegni schematici delle anomalie del collo

Il segmento di connessione si presenta a volte particolarmente assottigliato oppure la testa risulta ripiegata ad angolo retto sul flagello. Ne consegue movimento anomalo non direzionale dello spermatozoo.

Un'anomalia generalizzata ed isolata del segmento di connessione è la separazione della testa dalla coda. Tale difetto ha una base genetica essendo presente in più componenti della stessa famiglia.

Anomalie della coda:

- Coda assente;
- Coda mozza;
- Coda rigonfia
- Coda arrotolata;
- Coda angolata;
- Coda doppia o multipla.

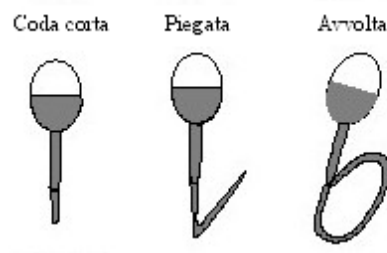


Figura 12- Disegni schematici delle anomalie della coda

Residuo citoplasmatico:

E' presente negli spermatozoi immaturi, la sua grandezza è circa metà della testa di uno spermatozoo.

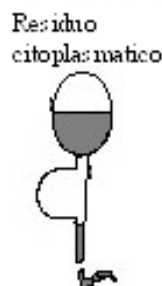


Figura 13- Disegno schematico di spermatozoo con residuo citoplasmatico

L'esame a fresco o su striscio colorato del liquido seminale permette di evidenziare, la componente cellulare non nemaspermatica, rappresentata dai seguenti elementi figurati:

- Elementi della linea spermatogenetica. Possono essere presenti spermatidi; spermatociti primari e secondari e spermatogoni; gli spermatidi e gli spermatociti primari sono gli elementi più frequentemente rappresentati;
- Globuli bianchi, costituiti prevalentemente da granulociti, linfociti e macrofagi;
- Emazie;
- Cellule di sfaldamento derivanti dalle ghiandole accessorie, dai dotti e canali dell'apparato genitourinario;
- Cristalli di spermina e corpuscoli prostatici.

Un'importanza particolare assume, nella diagnostica differenziale delle azoospermie, la ricerca delle cellule germinali; infatti, la presenza di tali cellule nell'eiaculato permette di escludere un'ostruzione bilaterale delle vie genitali e indirizza la diagnosi verso la presenza di un blocco maturativo a livello dell'epitelio seminifero.

TAMPONE URETRALE

Il tampone uretrale deve essere sempre eseguito in caso di secrezione purulenta o vischioso-filamentosa del meato uretrale con o senza sintomatologia dolorosa, in caso in cui siano isolati nella partner microrganismi tipicamente responsabili di infezioni sessualmente trasmesse e potrebbe essere utile anche nella ricerca dell'eziologia di una orchite-epididimite. Altro motivo d'indagine gli screening per infertilità, dove solitamente il soggetto è assolutamente asintomatico.

AGENTI EZIOLOGICI

- *Chlamydia trachomatis* nel caso di una sospetta uretrite
- *Ureaplasma urealyticum*
- *Mycoplasma hominis*
- *Neisseria gonorrhoeae* in diminuzione la prevalenza nei paesi occidentali.
- *Trichomonas vaginalis* risulta solo raramente causa d uretriti.

PRELIEVO

Per garantire un corretto esito dell'esame, il paziente deve rispettare alcune norme ed in particolare:

- astenersi dai rapporti sessuali nelle 24 ore precedenti l'esame,
- aver cessato qualsiasi trattamento chemio-antibiotico da almeno una settimana,
 - non aver urinato nelle ultime 3 ore,
 - Effettuare pulizia dei genitali esterni.

Il prelievo deve essere effettuato con tamponi di piccolo calibro in nylon o Dacron previa detersione con soluzione fisiologica del glande e del meato uretrale esterno. Si procede premendo alla base del pene per cercare di raccogliere eventuale

secrezione, in seguito si introduce il tampone per circa 2 cm all'interno del canale uretrale, ruotandolo per circa 10 secondi.

Devono essere utilizzati tamponi diversi per ciascun tipo di esame.

– Per la ricerca di *Chlamydia trachomatis* i campioni devono essere raccolti con i sistemi messi a disposizione con le diverse metodiche e conservati seguendo le istruzioni corrispondenti.

– Per la coltura di *Mycoplasma/Ureaplasma* il tampone con il materiale raccolto deve essere stemperato nell'apposita provetta contenente il terreno di trasporto che può essere conservata a temperatura ambiente per 8 ore o a 2-8°C per 36 ore.

– Per l'esame colturale (batteri aerobi e miceti) il tampone, introdotto nell'apposito terreno di trasporto, deve essere inviato al laboratorio o conservato a temperatura ambiente fino ad un massimo di 24 ore.

– Per la coltura di *Neisseria gonorrhoeae* è consigliabile seminare il tampone subito dopo il prelievo su piastra di Agar Thayer Martin tenuta a temperatura ambiente (o meglio preriscaldata a 37° C), ed incubata immediatamente.

– Per la ricerca di *Trichomonas vaginalis* il tampone con l'essudato raccolto deve essere stemperato al più presto nell'apposito terreno di trasporto/coltura, preriscaldato a 37°C per 15', che deve essere inviato prontamente in laboratorio.

ESAME COLTURALE

I sistemi di coltura per la ricerca di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma hominis* consistono in un terreno di trasporto/coltura in cui viene stemperato il tampone del prelievo. Tre gocce di questo terreno vengono seminate sul terreno solido A7 che sarà incubato a 37°C per 48-72 ore in anaerobiosi o in microaerofilia. Le provette contenenti il restante terreno possono essere conservate ancora qualche giorno in frigorifero o congelate a -80°C, in caso dovesse essere allestito un antibiogramma.

Un ulteriore metodo colturale prevede l'utilizzo di una galleria le cui cupole, contenenti i substrati di identificazione e gli antibiotici di profilo liofilizzati, vengono reidratate con il terreno di trasporto/coltura inoculato col campione da esaminare, ricoperte con olio di paraffina, per assicurare l'anaerobiosi, ed incubate a 37°C per 24 ore. Il passaggio in terreno liquido è giustificato dal fatto che le colture allestite in questo modo danno risultati migliori rispetto a quelle seminate direttamente su terreno solido

Per la ricerca di *Trichomonas vaginalis* l'essudato, raccolto con tampone sterile, deve essere seminato, immediatamente dopo il prelievo, in 5 ml di terreno specifico, CPLM *Trichomonas* broth con aggiunta di Streptomina (1000 µg/ml), Penicillina (1000 U/ml), Cloramfenicolo (50 µg/ml) e siero sterile di cavallo (50ml/l), preriscaldato a 37°C. L'incubazione va effettuata a 37°C per 5 giorni con un'osservazione microscopica a fresco giornaliera a partire dal secondo giorno d'incubazione.

Qualsiasi microrganismo aerobio Gram positivo o Gram negativo presente in coltura pura deve essere identificato e saggiato per la resistenza agli antibiotici.

Neisseria gonorrhoeae – Dopo 24-48 ore di incubazione cresce su Agar Thayer-Martin formando colonie piccole, traslucide, di colore grigio-bianco, citocromo-ossidasi positive. Queste caratteristiche permettono un'identificazione presuntiva di *N. gonorrhoeae*, ma sono sempre necessari test identificativi di conferma.

Gardnerella vaginalis – Cresce sui terreni addizionati di sangue umano formando piccole colonie circondate da un alone di β-emolisi ben evidente, catalasi negative. L'identificazione è basata sulle caratteristiche morfologico/tintoriali.

Miceti – Si deve procedere alla loro identificazione almeno con speciazione di *Candida albicans* attraverso il “germ-tube stest” o test di filamentazione: dopo un'incubazione di 4 ore delle colonie, si osservano dei germ-tube ovvero piccoli filamenti protendenti dalla blastospora ad accertare la presenza di *Candida*.

Per l'identificazione delle altre specie si può ricorrere all'utilizzo di terreni cromogeni, che permettono una rapida distinzione tra le specie di più comune riscontro in base al colore delle colonie o a test di assimilazione degli zuccheri e di resistenza all'acidione. Attualmente sono disponibili in commercio sistemi miniaturizzati composti da microgallerie in cui sono presenti, in forma disidratata, i substrati da saggiare.

Micoplasmi urogenitali – La loro identificazione si basa sulle proprietà metaboliche (capacità di idrolizzare l'urea o l'arginina e di fermentare il glucosio) e sulla morfologia delle colonie. Le dimensioni e l'aspetto delle colonie sul terreno solido A7 sono estremamente variabili. Sulla stessa piastra se ne possono trovare con diametro da 10 a 500 μ , con aspetto omogeneo o irregolare. Esse vanno ricercate sui bordi delle cellule ed alla periferia della goccia di inoculo. Nelle colonie di *Mycoplasma hominis* (M.h.) possiamo individuare due parti: una parte centrale otticamente più densa, che è il vero centro germinativo della colonia, dall'aspetto più o meno granuloso circondata da un anello periferico traslucido che conferisce l'aspetto tipico ad "uovo fritto".

Ureaplasma urealyticum (U.u.) forma delle colonie molto più piccole in cui questa zona chiara è rudimentale per cui è visibile solo la parte centrale più scura. Il terreno solido A7 contiene oltre all'urea anche solfato di manganese perciò in seguito alla liberazione di ammoniaca, per idrolisi dell'urea, si forma dell'ossido di manganese che conferisce un colore marrone scuro-nero alle colonie.

Il sistema di coltura in galleria utilizzato per i Micoplasmi permette la conta, l'identificazione e la determinazione della resistenza agli antibiotici. Il sistema si basa sulla capacità di U.u. e M.h. di metabolizzare rispettivamente l'urea e l'arginina. La loro crescita nel terreno liquido è visualizzata dal viraggio di un indicatore (rosso fenolo) da giallo-arancio a rosa-fucsia che esprime l'alcalinizzazione del brodo di coltura. I campioni che contengono un numero molto elevato di U.u. e M.h. possono provocare il viraggio di tutti i pozzetti della galleria.

Ricerca di *Chlamydia trachomatis* attraverso la **coltura cellulare**, tradizionalmente considerata metodo di riferimento, è attualmente eseguita solo in pochissimi centri.

Le tecniche attualmente più diffuse sono quelle in Immunofluorescenza diretta o in Immunoenzimatica, l'Ibridazione mediante sonde e le metodiche di amplificazione genomica (PCR, LCR, SDA e TMA).

a) I **metodi in immunofluorescenza** utilizzano anticorpi monoclonali, rivolti verso le proteine del MOMPS e contro LPS di *Chlamydia trachomatis*, che permettono di mettere in evidenza i corpi elementari extra-cellulari (perfettamente rotondeggianti, di 300 nm e dalla brillante fluorescenza verde mela). Il prelievo viene strisciato su un vetrino per fluorescenza e dopo fissazione con acetone, messo a contatto con l'anticorpo monoclonale.

Dopo incubazione a temperatura ambiente per 30', si procede con l'osservazione al microscopio a fluorescenza.

Questa tecnica ha il vantaggio di permettere una diagnosi rapida, anche se necessita di personale specializzato in grado di discriminare gli eventuali artefatti del preparato, ed è l'unica che permette di valutare l'idoneità del preparato. Infatti, in assenza di cellule epiteliali la negatività del reperto non deve essere presa in considerazione.

L'utilizzo dei due anticorpi monoclonali riduce la possibilità di falsi positivi dovuti alla cross-reattività con la proteina A di *Staphylococcus* spp. La sua sensibilità è abbastanza elevata se si considera il cut off positivo/negativo di 2 corpi elementari.

b) I **metodi immunoenzimatici** hanno il vantaggio di consentire una diagnosi in poche ore e di avere una sensibilità paragonabile a quella delle colture cellulari, senza i rischi legati ad eventuali contaminazioni delle stesse. Questi metodi hanno dimostrato sufficiente sensibilità e buona specificità per i tamponi uretrali, tuttavia il loro impiego sulle urine è stato limitato dalla scarsa sensibilità soprattutto sulle urine di soggetti asintomatici nelle quali è spesso presente un basso numero di microrganismi.

c) Le **tecniche di biologia molecolare** utilizzano sonde di acidi nucleici per l'identificazione del microrganismo attraverso reazioni di ibridizzazione. Questi metodi altamente sensibili (85-100%) e specifici (98-100%), permettono di individuare anche un basso numero di copie di DNA batterico.

SPERMIOCOLTURA

L'esame colturale del liquido seminale riconosce una sua utilità in corso degli screening per l'infertilità e come esame di preparazione alla fecondazione assistita. Nell'ottica dello screening dell'infertilità, la ricerca deve essere estesa a tutti i microrganismi che potenzialmente possano creare alterazioni del liquido seminale.

AGENTI EZIOLOGICI

- *Chlamyda trachomatis*,
- *Mycoplasma/ Ureaplasma*,
- *Trichomonas vaginalis*,
- *Gardnerella vaginalis*
- *Enterobacteriacee*,
- Enterococchi
- Stafilococchi,
- *Pseudomonas spp*,
- *Haemophilus spp*,
- Anaerobi
- *Candida spp*

PRELIEVO

Per garantire un corretto esito dell'esame, il paziente deve rispettare alcune norme ed in particolare:

- astenersi dai rapporti sessuali nei 3-4 giorni precedenti l'esame,
- aver cessato qualsiasi trattamento chemio-antibiotico da almeno una settimana;
- accurata pulizia dei genitali esterni e delle mani prima del prelievo così da evitare la contaminazione da parte della normale flora batterica cutanea e garantire la sterilità del materiale.

La raccolta del liquido seminale deve essere successiva alla minzione e deve avvenire mediante masturbazione. Tutto l'eiaculato deve essere raccolto nell'apposito contenitore sterile ed il tempo intercorrente tra raccolta e l'inizio dell'analisi al laboratorio di microbiologia non deve superare le tre ore.

Per la ricerca di *Chlamydia trachomatis*, è necessario procedere anche alla raccolta del primo getto di urina in un apposito contenitore sterile. Si precisa che il paziente non deve aver urinato da almeno 3 ore e che il campione di urina deve essere raccolto prima di quello di liquido seminale. È opportuno eseguire le diverse ricerche microbiologiche contemporaneamente sia sul primo getto urinario sia sullo sperma al fine di poter meglio differenziare un'infezione delle vie urinarie da una delle vie seminali. Avere a disposizione il primo getto urinario permette inoltre di poter effettuare anche la ricerca di *Trichomonas vaginalis* e di *Neisseria gonorrhoeae* (previa centrifugazione) difficilmente isolabili dallo sperma data la presenza di sostanze inibenti.

ESAME COLTURALE

Per la coltura di miceti, microrganismi aerobi e *Gardnerella vaginalis* 1 ml di sperma viene diluito 1:10 con soluzione fisiologica sterile e centrifugato a 1500 giri per 15'. Dopo aver eliminato il surnatante si semina il sedimento utilizzando anse calibrate da 10 µl. Tale trattamento aumenta la sensibilità dell'esame colturale, perché concentra nel pellet cellulare i batteri ed elimina il plasma seminale che potrebbe esercitare un effetto inibitorio sulla crescita batterica. I terreni di coltura utilizzati per la ricerca di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma hominis* sono gli stessi descritti a proposito dei tamponi uretrali.

MASSAGGIO PROSTATICO E TEST DI MEARES – STAMEY

Il test di Meares and Stamey è un'accurata analisi diagnostica utilizzata per evidenziare e localizzare un'infezione delle basse vie urinarie.

Il paziente deve presentare vescica piena, non aver eiaculato da almeno 2 giorni ed aver sospeso eventuali terapie antibiotiche da almeno un mese.

La tecnica si basa sulla raccolta di tre diversi campioni:

1. raccolta dei primi 10 ml di urina (VB1) e successivamente di altri 10ml (VB2) sui quali si effettua l'urinocoltura, cioè ricerca di batteri nell'urina;
2. il massaggio prostatico (effettuato con esplorazione ano digito rettale per stimolare entrambi i lobi della prostata a produrre il liquido prostatico) e con la coltura (ricerca di batteri) della secrezione prostatica (EPS) emessa dal pene;
3. il paziente urina di nuovo (VB3), per effettuare una sorta di lavaggio dell'uretra in cui è confluito il liquido prostatico, e si esegue una seconda urinocoltura.

Una volta individuato il germe responsabile dell'infezione, bisogna avviare subito una cura a base di farmaci antibiotici specifici.

ESAME MICROSCOPICO

Una goccia di EPS viene sottoposta a colorazione di Giemsa: la presenza di oltre 10 leucociti per campo microscopico (400x) e/o la presenza di aggregati leucocitari è indicativo per diagnosi di prostatite. Una carica batterica nell' EPS e VB3 superiore almeno 10 volte quella del VB1 e VB2 fa presupporre una provenienza prostatica dei germi isolati. Una carica più elevata nel VB2 rispetto al

VB3 fa presupporre una batteriuria che dovrà essere trattata con farmaci tipo la nitrofurantoina che non penetra a livello prostatico e ripetere il test.

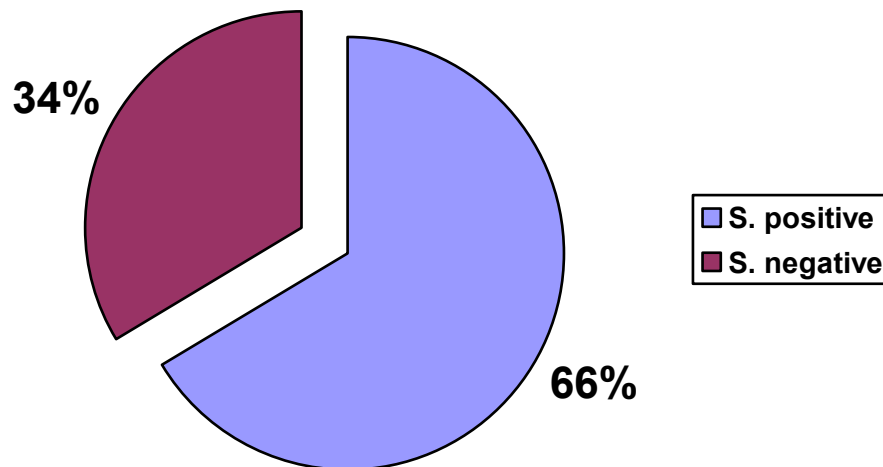
ESAME COLTURALE

I campioni raccolti devono essere seminati nel più breve tempo possibile su terreni selettivi e non, previa diluizione 1:100 in fisiologica sterile ed inoculando per spatolamento 100 µl.

Per la ricerca di miceti, microrganismi aerobi, *Gardnerella vaginalis*, Micoplasmi urogenitali e *Chlamydia trachomatis* valgono le stesse indicazioni fornite riguardo la spermicoltura.

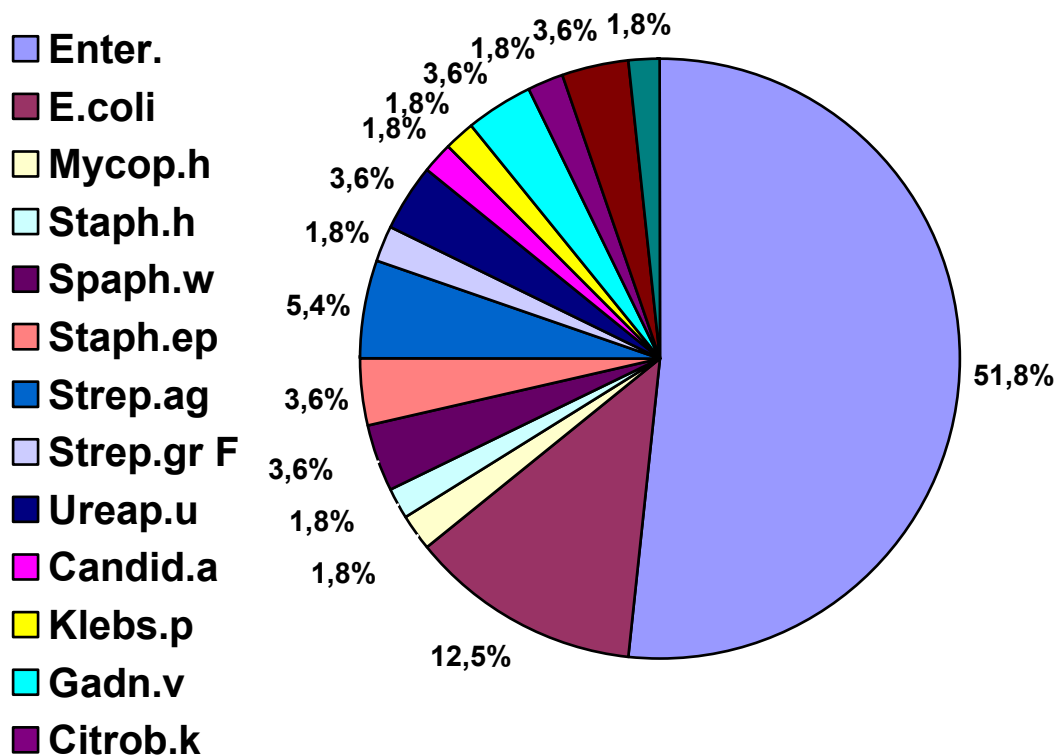
Risultati e Discussione

Nell'arco di tempo compreso tra il settembre 2009 e l'aprile 2010, presso il Centro di Diagnosi e Cura della fertilità "Clinica del Mediterraneo" di Ragusa, sono stati effettuati 142 spermocitogrammi ed altrettante spermocolture volte ad indagare la presenza di microrganismi patogeni all'interno del liquido seminale.

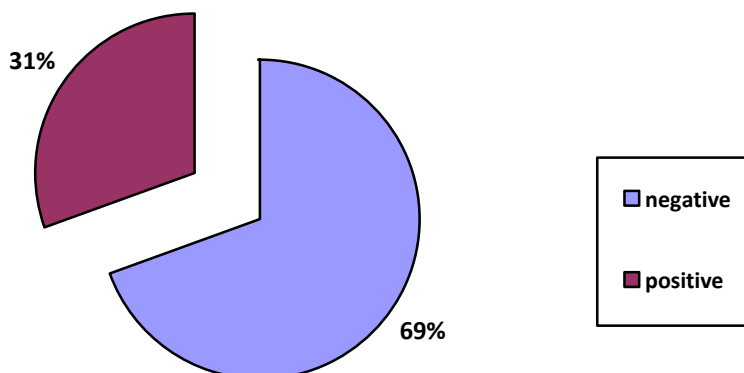


Di queste, 49 spermocolture sono risultate positive, pertanto, vi sono stati ritrovati microrganismi (34%) con particolare prevalenza di *Enterococcus* (il laboratorio non ha determinato la specie ma solamente il genere), *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* e in egual misura *Staphilococcus warneri*, *Streptococcus epidermidis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*; singola la presenza di *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis* e *Citrobacter koseri*.

MICROORGANISMO	N. PRESENZE	PERCENTUALE PRESENZE
<i>Enterococcus</i>	29	51.8 %
<i>Escherichia coli</i>	7	12.5 %
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	5.4 %
<i>Staphilococcus warneri</i>	2	3.6 %
<i>Staphilococcus epidermidis</i>	2	3.6 %
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2	3.6 %
<i>Gadnerella vaginalis</i>	2	3.6 %
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2	3.6 %
<i>Candida albicans</i>	1	1.8 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1.8 %
<i>Mycoplasma hominis</i>	1	1.8 %
<i>Staphilococcus haemolyticus</i>	1	1.8 %
<i>Streptococcus gruppo F</i>	1	1.8 %
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1.8 %
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1.8 %

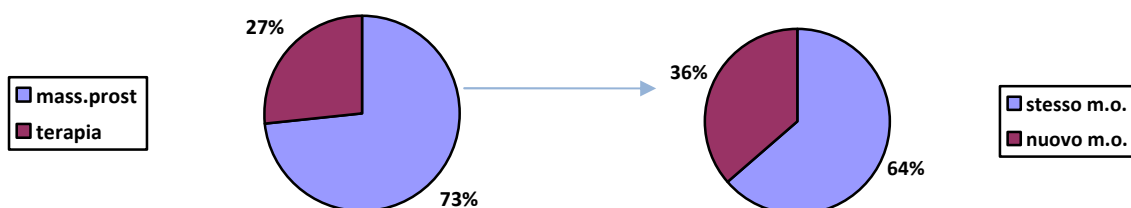


Al fine di eliminare l'infezione, i 49 pazienti sono stati sottoposti ad una adeguata terapia antibiotica per un determinato periodo di tempo, al termine del quale, si è verificata l'efficacia della terapia stessa sottoponendo i pazienti ad una nuova spermicoltura (2° spermicoltura).

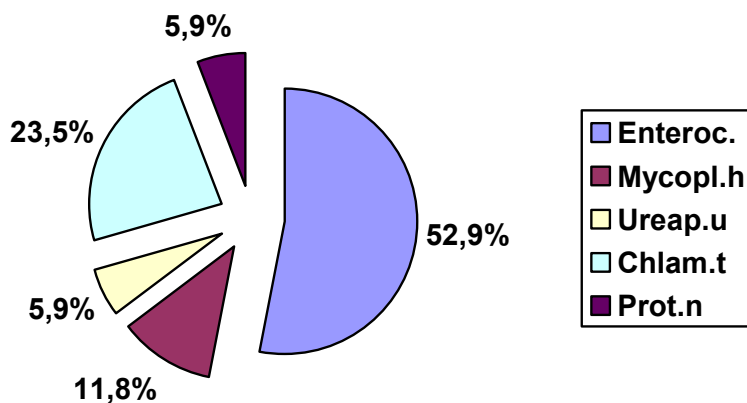


In 34 pazienti (69%) la terapia è stata in grado di eliminare i microrganismi, sono infatti 34 spermicolture che hanno dato esito negativo; al contrario nell'eiaculato di 15 pazienti (31%) persistono microrganismi.

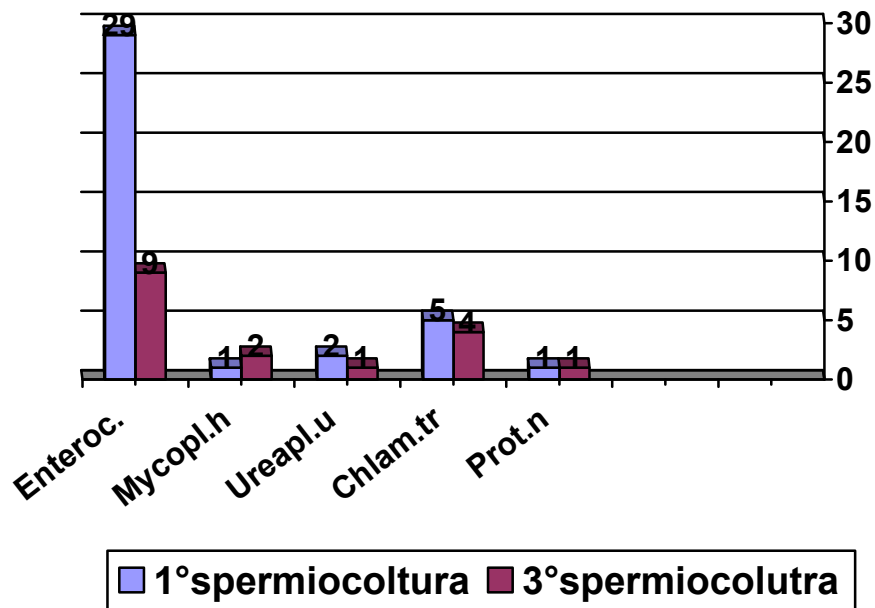
L'infezione di *Enterococcus* di 4 pazienti viene trattata con una nuova terapia antibiotica mentre 11 pazienti accettano di sottoporsi a massaggio prostatico.



Stimolata la prostata si valuta nuovamente l'eiaculato mediante nuova spermicoltura (3° spermicoltura). In 7 casi viene riconfermata la presenza dei microrganismi ritrovati nella prima spermicoltura mentre in 4 casi si ha la comparsa di nuovi microrganismi con aumento della presenza di *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis*, tipici agenti eziologici dell'infertilità maschile capaci di risalire lungo la via uretrale.



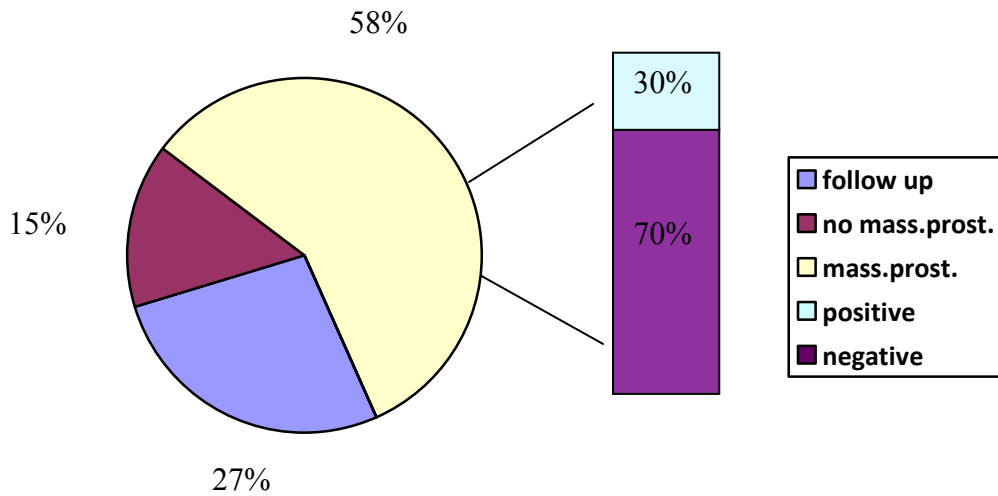
MICRORGANISMO	1°SPERMIOCOLTURA	% PRESENZE	3°SPERMIOCOLTURA.- dopo m.p.	% PRESENZE
<i>Enterococcus</i>	29	51.8 %	9	52.9%
<i>Escherichia coli</i>	7	12.5 %		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	5.4 %		
<i>Staphilococcus warneri</i>	2	3.6 %		
<i>Staphilococcus epidermidis</i>	2	3.6 %		
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2	3.6 %	1	5.9%
<i>Gadnerella vaginalis</i>	2	3.6 %		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2	3.6 %	4	23.5%
<i>Candida albicans</i>	1	1,8 %		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1,8 %		
<i>Mycoplasma hominis</i>	1	1,8 %	2	11.8%
<i>Staphilococcus haemolyticus</i>	1	1,8 %		
<i>Streptococcus gruppo F</i>	1	1,8 %		
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1,8 %		
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,8 %	1	5.9%



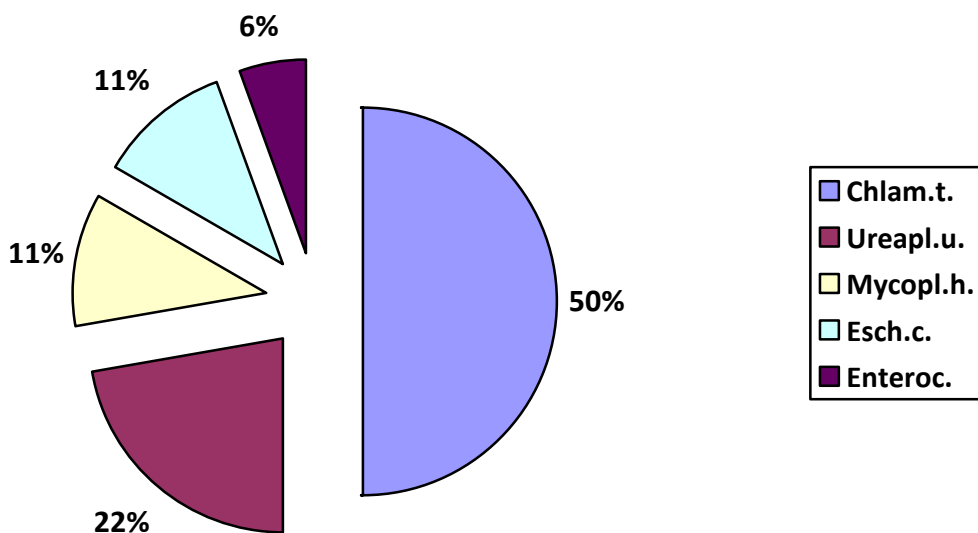
E' importante notare che nella prima serie di spermocolture (1° spermocoltura), alla percentuale di casi positivi, si contrappone il 65.49% di spermocolture negative.

L'eiaculato di 93 pazienti dei 142 presi in esame, pur non presentando microrganismi, tuttavia manifestava caratteristiche attribuibili all'eiaculato di pazienti affetti da patologie del tratto uro-genitale: si decide di effettuare massaggio prostatico su di essi.

Per 25 pazienti (26.9%) non è possibile proseguire con il programma di diagnosi: si parla di follow up. Sono 14 i pazienti (15.0%) che hanno rifiutato di sottoporsi a massaggio prostatico che invece è stato praticato su 54 pazienti (58.1%) a seguito del quale si è effettuata una nuova spermocoltura (2° spermocoltura).



La seconda serie di spermiocolture risulta essere negativa per 38 pazienti (70.4%) mentre 16 spermiocolture (29.6%) inizialmente negative, risultano essere al secondo esame positive a *Chlamydia trachomatis* nella maggior parte dei casi, ad *Ureaplasma urealyticum*, in ugual misura a *Mycoplasma hominis* e *Escherichia coli* mentre in un solo caso a *Enterococcus*.



MICROORGANISMO	2° SPERMIOCOLTURA	% PRESENZE
<i>Enterococcus</i>	1	6 %
<i>Escherichia coli</i>	2	11 %
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	4	22 %
<i>Chlamydia trachomatis</i>	9	50 %
<i>Mycoplasma hominis</i>	2	11 %
TOTALE	18	

Conclusioni

Dalla valutazione dei dati ricavati durante lo svolgimento della presente tesi emerge che in pazienti maschi studiati per infertilità, risultati positivi ad agenti infettivi sul liquido seminale e successivamente trattati farmacologicamente, anche dopo massaggio prostatico, il liquido seminale conteneva ancora microrganismi patogeni ed addirittura microrganismi diversi da quelli riscontrati al precedente esame. Dato ancora più importante è che circa l' 11% dei negativi alla prima spermicoltura, dopo esame del secreto prelevato con massaggio sia della prostata che delle vescichette seminali, sono risultati positivi. Da ciò si evince che questi pazienti si trovano in condizioni di flogosi cronica asintomatica (vista l'anamnesi negativa) a carico dei distretti interessati e che, non rimuovendo gli agenti eziologici perché misconosciuti, a nulla valgono le terapie che solitamente vengono somministrate in modo empirico per il miglioramento del liquido seminale.

L'anamnesi diventa dunque tappa fondamentale nell'iter diagnostico del maschio infertile: indagando strategicamente sulle patologie remote e prossime, sulle abitudini sessuali e stile di vita del paziente sarà possibile indirizzare l'indagine diagnostica verso esami capaci di identificare le cause e da qui studiare la terapia più opportuna per revertire lo stato di infertilità.

Una diagnosi corretta scaturisce dall'intreccio e dalla comparazione di dati ottenuti dalle diverse indagini cliniche, strumentali e laboratoristiche condotte.

Un corretto approccio al maschio infertile potrà dare quindi speranze più concrete a quelle coppie che dovranno ricorrere a tecniche di procreazione medico assistita.

Bibliografia

1. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, *Manuale di laboratorio della WHO per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale*, 2001, 4th edn., Cambridge University Press, Cambridge;
2. F. H. Netter : *Atlante di anatomia umana*, II edn, 2005, Masson, Milano
3. P. Castano, R.F. Donato: *Anatomia dell'uomo*, II edn, edi-ermes. Milano
4. P.Rosati: *Embriologia dell'Uomo*, 2004, edi-ermes, Milano
5. Wolf-Hegger: *Atlante vol.2*, 2000, edi-ermes, Milano
6. Z. Fumagalli, C. Cavallotti: *Anatomia umana normale vol. III*, 1983, Piccin, Padova;
7. P.J. Russell: *Genetica*, 2002, EdiSES s.r.l., Napoli;
8. S.F. Gilbert : *Biologia dello sviluppo*, terza edizione, 2005, Zanichelli, Firenze;
9. P. Rosati, R. Colombo : *La cellula*, 1997, edi-ermes, Milano;
10. K.Elder, D. Baker, J. Ribes : *Infections, Infertility and Assisted Reproduction*, cap.10, 2004, Cambridge University Press, Cambridge;
11. Gruppo di Lavoro Malattie Sessualmente Trasmesse non AIDS (GLAMST): *Linee guida per le indagini diagnostiche microbiologiche nello studio delle infezioni del tratto genito-urinario maschile*, nr.3 Volume 15/2000;
12. J.A. Morello, P.A. Granato, H. Eckler Mizer : *Laboratory manual and Workbook in Microbiology – Applications to Patient care*, 7th edition 2002;
13. T. Lotti, F. Iacono : *Andrologia, fisiopatologia, diagnostica e terapia*, Eli-editore, 1993, Napoli;
14. F.P. Schena, F.N. Selvaggi : *Malattie dei reni e vie urinarie*, McGraw Hill, 2003, Milano.

Sitografia

15. www.peopleunipmn.it;
16. www.pubmed.com - M. Polito, G. d'Azeo, W. Giannubilo, M. Leone, G. Muzzonigro : *Leucocytospermia: wich relationship with male infertility?*
17. www.gioviannialei.it - G. Alei : *Flogosi genitali*;
18. www.pubmed.com - K.A. Cunningham, K.W. Beagley : *Male genital tract Chlamydial infection: implications for pathology and infertility*;
19. www.pubmed.com - S. Hosseinzadeh, A. Eley, A.A. Pacey : *Semen quality of men with asymptomatic Chlamydial infection*;
20. www.pubmed.com - Satta, A. Stivala, A. Garozzo, A. Morello, A. Perdichizzi, E. Vicari, M. Salmeri, A.E. Calogero : *Experimental Chlamydial trachomatis infection causes apoptosis in human sperm*;
21. www.clicmedicina.it - V. Gentile : *Micoplasmi genitali*;
22. www.pubmed.com - H.F. Svenstrup, J. Fedder, J. Abraham-Peskir, S. Birkelund, G. Christiansen : *Mycoplasma genitalium attaches to human spermatozoa*;
23. www.pubmed.com - R. Gdoura, W. Kchaou, C. Chaari, A. Znazen, L. Keskes, T. Rebai, A. Hammami : *Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men*;
24. www.pubmed.com - F.J. Diaz-Garcia, A.P. Herrera-Mendoza, S. Giono-Cerezo, F.M. Guerra-Infante : *Mycoplasma hominis attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa*;

25. www.pubmed.com - Yan Wang, C.L Liang, J.Q WU, Chen Xu, S.X Qin, E.S Gao : *Do Ureaplasma urealyticum infections in the genital tract affect semen quality?*;
26. www.pubmed.com - C.A Ison, CSF Easmon : *Carriage of Gardnerella vaginalis and anaerobes in semen*;
27. www.pubmed.com - PRS Lagacè-wiens, B. NG, A. Reimer, T. Burdz, D. Wiebe, K. Bernard : *Gardnerella Vaginalis bacteraemia in a previously healthy man: case report and characterization of isolate*;
28. www.pubmed.com - Wesley Catlin : *Gardnerella vaginalis : Characteristics, clinical considerations and controversies*;
29. www.pubmed.com - JJ Daly, JK Sherman, L. Green, TL Mosteter : *Survival of Trichomonas vaginalis in human semen*;
30. www.pubmed.com - H. Swygard, A.C. Sena, M.M. hobbs, M.S. Cohen : *Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management*;
31. www.pubmed.com - JG. Langley, J.M. Goldsmid, N. Davies : *Venereal trichomoniasis: role of men*;
32. www.pubmed.com - Agarwa, S.A. Prabakaran, T.M. Said : *Prevention of oxidative stress injury to sperm*;
33. www.pubmed.com - K. Makker, A. Argawa, R. Sharma : *Oxidative stress & male infertility*;
34. www.pubmed.com - M. Durazzo, A. Premoli, C. Di Buccегge, A. Bertagna, E. Fagà, G. Broli, C. Manieri, S. Bo, B. Pagano : *Alteration of seminal and hormonal parameters: an extrahepatic manifestation of HCV infection?*;
35. www.pubmed.com - M. Marconi, H. Pilate, F. Wagenlehner, T. Diemer, W. Weidner : *Impact of infection on the secretory capacity of the male accessory glands*;
36. www.pagineblusanita.it;
37. www.biomedicallaboratorio.com ;
38. www.aispep.it.

Spz cultura	Germe	Terapia	Mass.prost	2°Spz cultura	Terapia	Mass.prost.	3°Spz cultura	Germe
Negativa				Negativa				
Positiva	Enterococcus	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Negativa				Negativa				
Negativa				Negativa				
Positiva	Staphylococcus haemolyticus	x		Negativa				
Positiva	Enterococcus	x		Negativa				
Positiva	Enterococcus + Mycoplasma hominis	x		Positiva		x	Positiva	Mycoplasma hominis
Negativa			x	Negativa				
Negativa			x	Positiva				Mycoplasma hominis
Negativa			x	Positiva				Chlamydia trachomatis
Negativa			x	Negativa				
Negativa			x	Positiva				Chlamydia trachomatis
Negativa				Positiva				Chlamydia trachomatis
Negativa			x	Negativa				
Negativa			x	Positiva				Chlamydia trachomatis+Ureaplasma urealitycum
Positiva	Staphylococcus warneri	x		Negativa				
Positiva	Enterococcus	x		Negativa				
Negativa			x	Positiva				Chlamydia trachomatis
Negativa				Negativa				
Positiva	Proteus mirabilis+Enterococcus	x		Positiva		x	Positiva	Proteus mirabilis
Negativa			x	Negativa				
Positiva	Enterococcus + Streptococcus agalactiae	x		Negativa				
Negativa			x	Positiva				Escherichia coli
Negativa			x	Negativa				
Negativa				Positiva				Escherichia coli
Negativa				Negativa				
Positiva	Staphylococcus	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Negativa				Negativa				
Positiva	Enterococcus	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Negativa				Negativa				
Positiva	Staphylococcus warneri	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Negativa				Negativa				
Positiva	Enterococcus	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Positiva	Enterococcus + Candida Albicans	x		Negativa				
Negativa				Negativa				
Negativa				Negativa				
Negativa				Negativa				
Positiva	Gardnerella vaginalis	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				

Spz coltura	Germe	Terapia	Mass.prost	2°Spz coltura	Terapia	Mass.prost.	3°Spz coltura	Germe
Positiva	Escherichia coli+Chlamydia trachomatis	x		Negativa		x	Positiva	Chlamydia trachomatis
Positiva	Staphylococcus epidermidis+Ureaplasma urealyticum	x		Negativa		x	Positiva	Enterococcus + Ureaplasma urealyticum
Negativa				Negativa				
Negativa			x	Positiva				Ureaplasma urealyticum
Negativa			x	Negativa				
Negativa	Enterococcus	x	x	Positiva	x		Positiva	Enterococcus urealyticum
Negativa	Enterococcus	x		Negativa				
Negativa	Enterococcus	x	x	Negativa	x		Positiva	Enterococcus
Negativa	Enterococcus	x	x	Negativa				
Negativa	Enterococcus + debole presenza E coli	x	x	Negativa				Chlamydia trachomatis
Negativa	Enterococcus	x	x	Negativa	x		Positiva	Enterococcus
Positiva	Escherichia coli	x		Negativa		x	Positiva	Enterococcus + Chlamydia trachomatis
Negativa			x	Negativa				Enterococcus
Negativa			x	Negativa				
Negativa			x	Negativa				Mycoplasma hominis+Chlamydia trachomatis
Negativa	Proteus mirabilis	x	x	Negativa				
Negativa	Enterococcus	x		Negativa				
Negativa	Enterococcus	x		Negativa	x		Positiva	Enterococcus
Negativa				Negativa				
Negativa	Streptococcus agalactiae	x	x	Negativa				
Negativa	Escherichia coli	x	x	Negativa				
Negativa	Enterococcus	x	x	Negativa				
Negativa	Streptococcus gruppo F	x		Negativa				
Negativa	Enterococcus	x	x	Negativa				
Negativa	Enterococcus	x	x	Negativa		x	Positiva	Mycoplasma hominis
Negativa	Escherichia coli	x		Negativa				
Negativa	Enterococcus	x	x	Negativa		x	Positiva	Enterococcus
Negativa	Staphylococcus epidermidis da prob contaminaz	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Positiva	Gardnerella vaginalis	x		Positiva		x	Positiva	Chlamydia trachomatis
Negativa	Enterococcus	x		Negativa		x	Positiva	Enterococcus
Negativa	Enterococcus + debole pres Escherichia coli	x	x	Negativa				
Negativa			x	Negativa				Chlamydia trachomatis
Negativa			x	Negativa				
Negativa	Ureaplasma Urealyticum	x	x	Positiva		x	Positiva	Chlamydia trachomatis
Positiva	Streptococcus agalactiae	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Negativa	Escherichia coli	x	x	Negativa				
Negativa	Citrobacter Koseri	x		Negativa				

Spz coltura	Germe	Terapia	Mass.prost	2°Spz coltura	Terapia	Mass.prost.	3°Spz coltura	Germe
Negativa			x	Negativa				
Negativa				Negativa				
Positiva	Klebsiella pneumoniae	x		Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Positiva	Enterococcus + Chlamydia trachomatis	x		Negativa				
Negativa				Negativa				
Negativa			x	Negativa				
Negativa				Negativa				
Negativa				Negativa				
Negativa				Negativa				

