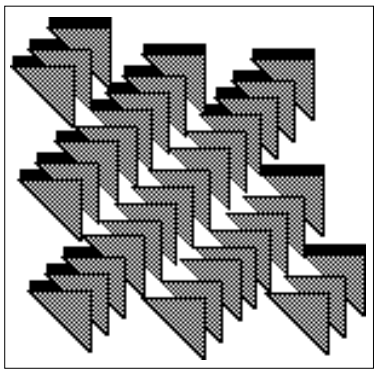
# Caleidoscopio



**Franco Dondero**
**Andrea Lenzi**

# L'infertilità immunologica

Servizio Speciale di Immunologia
della Riproduzione e Seminologia
V Clinica Medica
Policlinico "Umberto I"
Università "La Sapienza"
Roma

Direttore Responsabile
**Sergio Rassu**

62

MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 83. 401
Stampato a Genova 1991.

# Editoriale

La rilevanza del problema dell'infertilità è notevole anche se è stato ampiamente dimostrato che esistono grosse variazioni nella prevalenza di questa condizione applicando le differenti definizioni correntemente utilizzate.

Un ulteriore problema, per quel che riguarda poi l'infertilità su base immunologica, è rappresentato dal fatto che una errata diagnosi dovuta ad un sistema di dosaggio poco affidabile determina un trattamento, dell'infertilità mediata da anticorpi, poco corretto. Questa condizione risulta di estrema gravità poiché le terapie utilizzate (come ad esempio il metilprednisolone) non sono esenti da importanti effetti collaterali.

A queste considerazioni va aggiunto il fatto che una positività per gli anticorpi anti spermatozoi può essere trovata nei donatori normali e che bassi livelli di anticorpi antisperma, che danno un risultato positivo, possono essere insufficienti per creare una qualsiasi problema di fertilità.

Come si vede il campo è quanto mai interessante ed aperto a discussioni ed a numerose valutazioni ed uno degli impegni dei ricercatori è quello di poter isolare specifici antigeni spermatici che possano essere utilizzati per identificare anticorpi diretti contro antigeni critici per la funzione riproduttiva legando in questo modo la presenza di anticorpi ad un preciso deficit funzionale che potrebbe essere la base per un trattamento selettivo e mirato.

Per discutere di tutti questi problemi abbiamo invitato e siamo lieti che l'invito sia stato raccolto alcuni degli studiosi della prestigiosa V Clinica Medica dell'Università "La Sapienza" di Roma che tanti contributi ha dato in questo settore.

Il Professor Franco Dondero, specialista in Endocrinologia ed Immunologia, Professore Associato di Andrologia presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Roma "La Sapienza" è Docente Titolare di Incarico presso la Scuola di Specializzazione di Endocrinologia, Ginecologia ed Ostetricia e Patologia Clinica dell'Università di Roma "La Sapienza".

E' inoltre Primario del Servizio di Seminologia ed Immunologia della Riproduzione-Istituto V Clinica Medica, ed è Responsabile di Ricerche di Facoltà nel settore della Immunologia della Riproduzione e Fisiopatologia del gamete maschile ed ancora Responsabile di Ricerche di Ateneo nel settore della Epidemiologia della sterilità maschile e della Unità Operativa C.N.R. per studi sull'immunità antispermatozoo e capacità fecondante del gamete maschile.

E' Autore di 3 volumi in tema di Immunologia della Riproduzione, di circa 50 capitoli e di oltre 300 lavori in tema di Andrologia, Immunologia, e Fisiopatologia della Riproduzione.

Già Membro del Comitato Direttivo e del Comitato Scientifico della Società Italiana di Andrologia e già Membro dell'Editorial Board di Archives of Andrology è

ancora Membro del Comitato Direttivo del Gruppo Italo-Svizzero per la Medicina Riproduttiva e della Società Italiana di Fisiopatologia della Riproduzione, del Committee for Sperm Antibody Testing della American Society for Immunology of Reproduction.

E' Segretario della Società Italiana di Immunologia della Riproduzione e dell'International Coordination Committee for Immunology of Reproduction.

E' inoltre Councillor del Comitato Direttivo dell'International Society of Immunology of Reproduction ed è stato Segretario Scientifico del Congresso "Immunological Factors in Human Reproduction" - Roma, 1980 e del Congresso "Immunological Factors in Human Contraceptions" - Roma, 1982.

E' stato designato dall'International Society for Immunology of Reproduction quale Presidente del 5th International Congress on Reproductive Immunology, in programma a Roma per il 1992.

Il Dottor Andrea Lenzi, Suo Allievo, è specialista in Endocrinologia, Andrologia, Fisiopatologia della Riproduzione e perfezionato in Immunologia presso l'Istituto Pasteur di Parigi.

Ricercatore presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Roma "La Sapienza" è Docente con attività di Didattica Integrativa presso la Scuola di Specializzazione in Endocrinologia, Patologia Clinica, Ginecologia ed Ostetricia dell'Università di Roma "La Sapienza".

Ricopre ancora la funzione di Aiuto del "Servizio di Seminologia ed Immunologia della Riproduzione" dell'Università di Roma "La Sapienza" ed è Responsabile di Ricerche di Facoltà in tema di Immunomodulazione seminale e collaboratore di Ricerche di Facoltà in tema di Immunologia della riproduzione e Fisiopatologia del gamete maschile ed ancora Collaboratore di Ricerche di Ateneo in tema di Epidemiologia della fertilità maschile e della Unità Operativa C.N.R. per lo studio della Immunità antispermatozoo e della capacità fecondante del gamete maschile.

E' Autore di oltre 30 capitoli e di oltre 150 lavori in tema di Andrologia, Fisiopatologia ed Immnologia della Riproduzione.

Attualmente è Tesoriere della Società Italiana di Immunologia della Riproduzione e Membro di oltre 10 Società Scientifiche Nazionali ed Internazionali.

Ha fatto parte del Comitato Organizzatore del Congresso "Immunological Factors in Human Contraception" - Roma,1982 ed è stato designato dalla International Society for Immunology of Reproduction quale Segretario Scientifico del 5th International Congress on Reproductive Immnology che si terrà a Roma nel 1992.

**Sergio Rassu**

# Introduzione

Il processo riproduttivo coinvolge una serie di meccanismi immunologici che da protettivi nei confronti del gamete maschile, dalla sua produzione sino alla fusione con la cellula uovo, possono, in situazioni particolari che verranno esaminate, trasformarsi in elementi aggressivi dello spermatozoo con conseguente impossibilità della cellula germinale di esplicare la sua potenzialità fecondante.

Il sistema immunocompetente può interferire positivamente o negativamente con la funzione riproduttiva a vari livelli. In particolare ricordiamo che: 1) lo spermatozoo ed il liquido seminale costituiscono un pool di antigeni protetti da un meccanismo specifico di tolleranza immunologica; lo spermatozoo maturo, dotato come è di movimento autonomo potrebbe essere considerato a tutti gli effetti un essere unicellulare aploide distinto in maniera netta sia dall'organismo produttore che dal ricevente; 2) gli stessi antigeni vengono in contatto con il sistema immunocompetente femminile in maniera massiccia e ripetuta durante i rapporti sessuali, senza che questo induca nella stragrande maggioranza dei casi fenomeni di sensibilizzazione; 3) ad una cellula estranea quale lo spermatozoo l'organismo femminile concede il "permesso" di penetrare e risalire lungo le vie genitali, e di fecondare la cellula-uovo fondendo con essa i propri determinanti antigenici di istocompatibilità; 4) la cellula fecondata cosi formatasi è in grado di impiantarsi per lungo tempo dando vita ad un nuovo individuo immunologicamente in parte estraneo, ma tollerato nonostante nessuna barriera evidente lo difenda, o difenda la madre, da una reazione di rigetto "reciproco", creando una catena di eventi ripetibili con eventuali successive gravidanze.

Peraltro, vi sono individui nei quali questi normali eventi riproduttivi non avvengono ed in cui si instaura una infertilità o una ricorrente abortività su base sicuramente immunologica.

Come conseguenza di tali alterazioni si possono instaurare nel maschio forme di patologia autoimmune antispermatozoo spontanea o provocata e forme di infertilità femminile su base immunologica sia nel senso di isoimmunizzazione antispermatozoo che di modificazioni della "tolleranza" nei confronti del prodotto del concepimento.

Pertanto, proprio lo studio dell'immunologia sembrerebbe poter rispondere ad alcuni degli interrogativi più complessi in tema di riproduzione umana e dischiudere prospettive nuove nella terapia dell'infertilità su base immunologica.

# Infertilità immunologica maschile

## Antigeni seminali

La natura antigenica dello spermatozoo è stata riconosciuta sperimentalmente nell'animale mediante l'immunizzazione attiva eterologa ed omologa già nei classici studi di Landsteiner (1899) e Metchnikoff (1899) e Metalnikoff (1900).

Gli studi condotti in questi anni hanno permesso di definire che lo spermatozoo maturo possiede una serie di antigeni (organo e tessuto) specifici che non sono presenti nella vita fetale al momento dell'"imprinting" immunologico. Si ipotizza che durante la vita fetale l'attività dei cloni linfocitari in grado di reagire immunologicamente contro i determinanti antigenici del "self" venga soppressa e che i linfociti suppressor presenti durante l'embriogenesi svolgano un ruolo determinante nell'induzione della tolleranza verso le strutture "self". Questa serie di eventi è in grado di prevenire, nella maggioranza degli individui, lo sviluppo di un'autoimmunizzazione. Gli antigeni dello spermatozoo non sono presenti in questa fase di auto-riconoscimento, in quanto la spermatogenesi non è attivata sino al periodo puberale. Per tale motivo il processo spermatogenetico ha luogo in un milieu che limita l'esposizione nei confronti del sistema immunocompetente dell'ospite maschile agli antigeni dello spermatozoo. Numerosi sono i componenti che contribuiscono all'antigenicità del liquido seminale. In particolare per quanto riguarda lo spermatozoo possiamo definire l'esistenza di vari gruppi antigenici superficiali, profondi e di rivestimento.

Tali gruppi antigenici possono essere cosi schematizzati:

- antigeni gruppo-ematici, sia dei gruppi principali AB0 che Rh che dei sottogruppi MNS, Kell, Duffy e P; sebbene questi antigeni siano presenti nel plasma seminale dei soggetti secretori e siano adsorbiti passivamente sulla superficie nemaspermica, non sembrano svolgere un ruolo importante nell'infertilità immunologica;
- antigeni del sistema HLA; questi antigeni che potrebbero potenzialmente stimolare un'importante reazione immune in donne sessualmente attive, non sono espressi in misura significativa sulla superficie nemaspermica, anche se i dati più recenti della letteratura risultano contrastanti;
- antigene H-Y (Ohno et al., 1979); è codificato come antigene specificamente maschile da un gene presente a livello del cromosoma Y ed è fondamentale nel processo di differenziazione sessuale. La sua espressione a livello spermatico è tuttora controversa sebbene sembrerebbe logico supporre che tali antigeni, specifici del sesso maschile, abbiano una espressione limitata a livello spermatico per gli ovvi problemi che potrebbe creare durante il contatto con il tratto genitale femminile;
- antigeni specifici profondi quali gli enzimi acrosomiali (ialuronidasi, acrosina),

strutture nucleari (protamina, DNA-polimerasi), strutture del collo (isoenzimi della latticodeidrogenasi: LDH-X oggi noto come LDH-C4); in particolare questi ultimi hanno suscitato un notevole interesse per la possibile messa a punto di una contraccezione immunologica (Boettcher, 1982);

- antigeni superficiali e di rivestimento; sono quelli apparentemente più implicati nei processi di infertilità immunologica.

Gli antigeni della superficie dello spermatozoo e del plasma seminale sono stati studiati mediante l'elettroforesi in gel di poliacrilamide e la cromatografia liquida ad alta pressione (Fig 1).

Fra i vari antigeni isolati, nell'animale da esperimento, quelli che hanno dimostrato un ruolo importante nel legame dello spermatozoo alla zona pellucida sono il PH 20, l'RSA-1 e l'FA-1. L'antigene PH 20 è una proteina di 60kd di PM, isolato dagli spermatozoi di cavia. E' stato dimostrato che un anticorpo monoclonale diretto contro la PH 20 blocca il legame degli spermatozoi di cavia, che hanno subito la reazione acrosomiale, alla zona pellucida; tale blocco non avviene in caso di spermatozoi con l'acrosoma integro (Myles et al., 1987; Primakoff et al., 1985). Il rabbit sperm autoantigen I (RSA-I) è una famiglia di proteine localizzate a livello del segmento post-acrosomiale

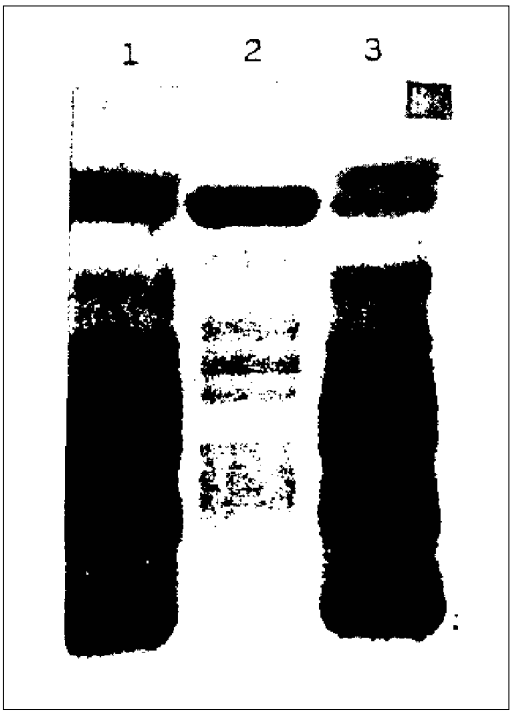



***Figura 1. Elettroforesi su gel: 1 e 3; plasma seminale diluizione 1: 4; 2: siero di sangue.***

degli spermatozoi del coniglio (O'Rand et al., 1988). Anticorpi monoclonali rivolti verso l'RSA-I sono in grado di bloccare in vitro l'interazione fra gli spermatozoi di coniglio e la zona pellucida (O'Rand et al., 1984a). Peraltro, il ruolo preciso di tali proteine è ancora incerto in quanto gli stessi anticorpi monoclonali che bloccano il legame con la zona pellucida sono in grado di inibire anche la penetrazione degli spermatozoi nelle uova di hamster zona-free (O'Rand et al., 1984b). Il fertilization antigen 1 (FA 1) è una glicoproteina spermiospecifica presente a livello delle cellule germinali dell'uomo e del topo. Questo antigene è stato identificato originariamente mediante l'anticorpo monoclonale MA24 (Na' et al., 1984). E' stato dimostrato che tale anticorpo monoclonale è in grado di inibire la penetrazione degli spermatozoi umani nelle uova di hamster zona-free (O'Rand et al., 1984b). L'identificazione di un antigene in grado di innescare la reazione anticorpale potrebbe permettere di mettere a punto dei tests basati sulla rilevazione di anticorpi diretti verso una definita molecola piuttosto che contro la cellula in toto. Sino ad oggi varie specie molecolari si sono dimostrate in grado di reagire con autoanticorpi o con anticorpi monoclonali. Tuttavia, la maggior parte degli antigeni che reagiscono con gli anticorpi antispermatozoo nei soggetti infertili e quindi correlati con uno stato di infertilità su base immunologica, sono caratterizzati ancora in maniera insufficiente.

In una recente esperienza, abbiamo immunoprecipitato, impiegando membrane nemaspermiche marcate e la metodica del western blotting, sieri di pazienti positivi alla ricerca degli anticorpi antispermatozoo, al fine di identificare le molecole coinvolte nel legame anticorpale (Crisanti et al., 1988). L'analisi elettroforetica del materiale immunoprecipitato con questi sieri ha mostrato che il legame degli anticorpi agli spermatozoi può essere associato a proteine di differente peso molecolare. I sieri che mostravano un'agglutinazione di tipo coda-coda al Tray Agglutination Test (TAT) immunoprecipitavano preferenzialmente una proteina di peso molecolare di circa 57Kd, mentre i sieri che mostravano un tipo di agglutinazione testa-testa, sempre al TAT, immunoprecipitavano una proteina di 30 Kd. (Fig 2).

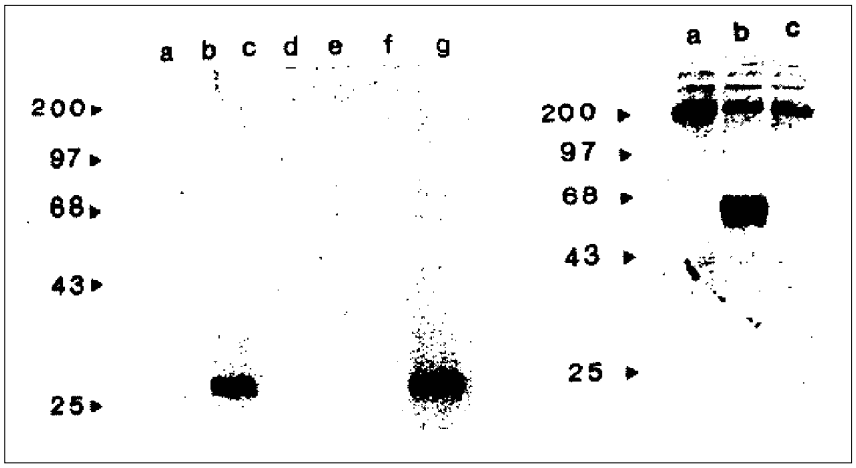



***Figura 2. Immunoprecipitazione di proteine di membrana nemaspermica di 57 e 30 Kd con anticorpi antispermatozoo.***

Questo primo passo per definire la caratterizzazione degli antigeni spermatici e per valutare l'identità della reazione da parte di differenti sieri, ha dimostrato che una reazione autoimmune antispermatozoo può essere innescata da vari antigeni rendendo ancora più complessa l'identificazione di un'antigene univoco correlato con l'infertilità immunologica (Fig 3).

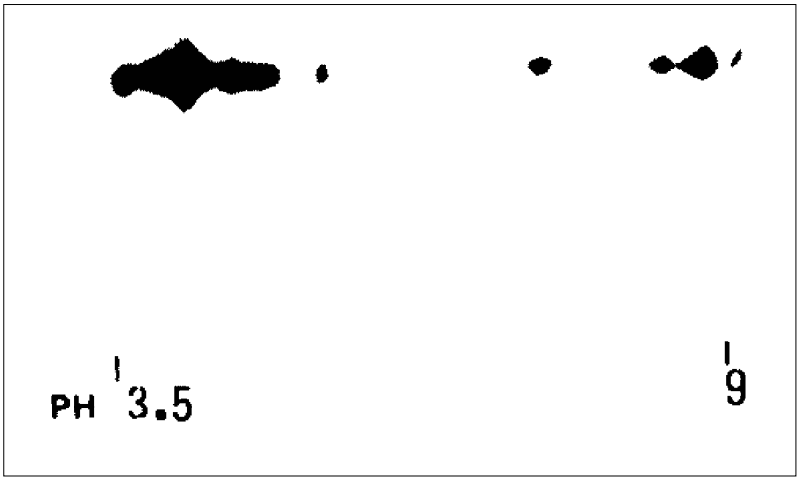



***Figura 3. Isoelettrofocusing delle proteine della membrana nemaspermica immunoprecipitate con anticorpi antispermatozoo.***

Gli antigeni presenti nel plasma seminale rappresentano talora una vera "camicia" immunologica di protezione o, in caso di patologia, un'ulteriore possibilità di innesco di una patologia autoimmune di cui lo spermatozoo diventa una "vittima innocente".

Attualmente gli antigeni spermatici umani vengono studiati principalmente mediante la tecnica degli anticorpi monoclonali e la loro caratterizzazione biochimica e funzionale consentirà di approfondire gli aspetti patogenetici dell'infertilità immunologica oltre a contribuire alla messa a punto di vaccini a scopo contraccettivo. Un ulteriore applicazione clinica degli anticorpi monoclonali diretti contro gli antigeni spermatici consiste nell'identificazione di markers nemaspermici associati con la potenzialità fecondante dello spermatozoo. Nel 1987 il WHO Monoclonal Antibody Workshop ha identificato una serie di anticorpi monoclonali antispermatoo in grado di reagire con antigeni spermatici importanti dal punto di vista funzionale. Per esempio, un anticorpo (H316) sembra in grado di legarsi all'acrosoma umano solo a capacitazione avvenuta e può, pertanto, essere utilmente impiegato nell'identificazione di spermatozoi capacitati (Anderson e Johnson, 1986). Altri anticorpi monoclonali sono stati associati a fenomeni di agglutinazione spermatica, di spermioimmobilizzazione complemento-dipendente, di inibizione della penetrazione in muco cervicale e della penetrazione delle uova di hamster. E' prevedibile in tempi brevi la messa a punto di un gruppo di tali anticorpi che possa essere applicato clinicamente nella valutazione funzionale del liquido seminale del soggetto infertile (sonde molecolari).

## Patogenesi e clinica della reazione autoimmune antispermatozoo nell'uomo.

Come abbiamo detto in precedenza, lo spermatozoo rappresenta una struttura dal punto di vista antigenico parzialmente estranea sia per l'organismo produttore sia per l'organismo che lo riceve. Per tale motivo i gameti maschili sono costantemente sottoposti ad una protezione immunologica durante la spermatogenesi ed il transito nel tratto genitale maschile e femminile.

Le basi biologiche ed anatomo-funzionali per la prevenzione di una risposta immune verso gli spermatozoi vengono poste a livello del testicolo.

La spermatogenesi può essere divisa in una fase mitotica degli spermatogoni di tipo A, in una fase meiotica di queste cellule progenitrici per produrre spermatociti con corredo cromosomico aploide ed in una fase spermiogenetica durante la quale gli spermatociti modificano la loro forma rotonda nel caratteristico fenotipo flagellato tipico dello spermatozoo. Il processo spermatogenetico richiede 74 giorni di tempo (Heller e Clermont, 1964) durante i quali solo 1/5 delle cellule derivate dalla mitosi degli spermatogoni maturano a spermatociti (Huckins, 1978). (Fig 4).

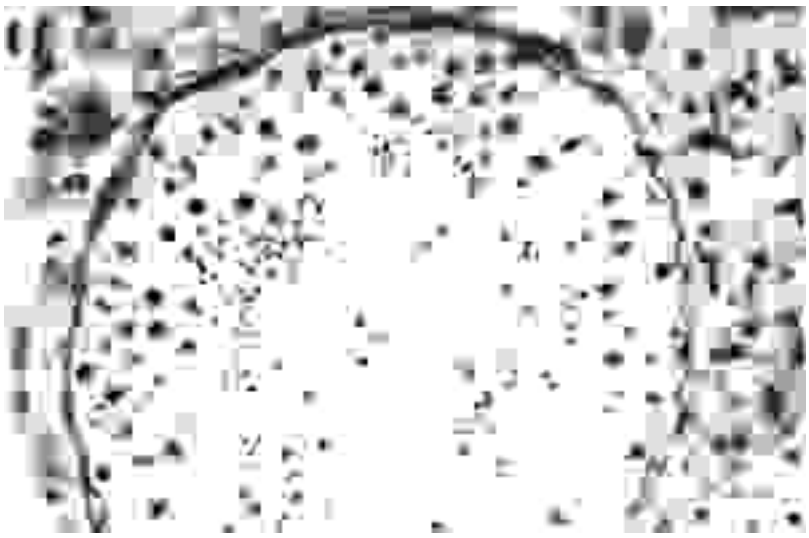


***Figura 4. Spermatogenesi (materiale iconografico cortesemente concesso dal Prof. Giovanni Spera).***

Durante i vari stadi della maturazione degli spermatogoni, vi sono continue aggiunte e perdite di antigeni di superficie delle cellule spermatogenetiche. Indagini ultrastrutturali sulla localizzazione degli antigeni di superficie degli spermatozoi hanno dimostrato che gli antigeni espressi sugli spermatozoi maturi sono differenti per oltre il 50% da quelli espressi sugli spermatogoni (Dym e Fawcett, 1970). A causa di questa sostanziale modificazione degli antigeni della superficie cellulare, anche se gli spermatogoni presenti durante l'embriogenesi fossero riconosciuti durante il processo di riconoscimento del "self", lo spermatozoo maturo non sarebbe completamente riconosciuto dall'ospite.

Disseminate tra gli spermatogoni vi sono le cellule del Sertoli. Queste cellule sono ancorate da un lato alla membrana basale del tubulo seminifero e si estendono in senso radiale dalla membrana verso il lume del tubulo. Il versante luminale delle cellule del Sertoli possiede dei prolungamenti citoplasmatici che circondano le cellule germinali. Queste cellule oltre ad avere un effetto nutritivo sul gamete maschile, sembrerebbero deputate ad isolare completamente l'ambiente intratubulare (barriera emato-testicolare) (Tung, 1980). Infatti, le 40-50 giunzioni serrate che esistono tra ogni paio di cellule di Sertoli formano quella che è stata definita la più efficiente barriera tessutale dell'organismo (Friend e Gilula, 1972). Questa barriera è in grado sia di prevenire il contatto di significative quantità di antigeni nemaspermici con le cellule immunocompetenti che di bloccare i linfociti e gli anticorpi impedendone l'ingresso a livello dei tubuli seminiferi contenenti gli spermatozoi maturi. Peraltro tale barriera formata dalle giunzioni serrate è in grado di far passare piccole quantità di antigeni spermatici solubili nell'ospite. Tali piccole dosi sarebbero in grado di stimolare i linfociti T suppressor inducendo uno stato di tolleranza immunologica (come è dimostrato per altri antigeni solubili quali la tireoglobulina).

Un altro meccanismo in grado di ridurre la possibilità dell'innesco di una reazione immune da parte degli spermatozoi a livello dell'interstizio dei tubuli seminiferi, è la ridotta presenza di linfociti T helper (El-Demiry et al., 1985; Barrat et al. 1990).

I tubuli seminiferi convergono a livello della rete testis che si prolunga nei dotti efferenti. Quindi gli spermatozoi attraversano l'epididimo, i deferenti e, dopo la diluizione nelle secrezioni prostatiche e vescicolari, l'uretra al momento dell'eiaculazione. L'iniezione endovenosa di anticorpi antispermatozoo porta al legame di anticorpi sugli spermatozoi provenienti dalla rete testis ma non su quelli testicolari (Tung et al., 1971). Questo implica che la rete testis sia più permeabile dei tubuli seminiferi alla fuoriuscita di antigeni spermatici e all'ingresso di anticorpi antispermatozoo solubili.

Tuttavia, Jones (1977) ha notato che la concentrazione di spermatozoi a livello della rete testis è circa la metà di quelli riscontrati a livello del segmento distale del tratto genitale maschile. Si ritiene quindi che la diluizione degli antigeni spermatici e la ridotta vascolarizzazione della rete testis (Kormana e Reijonen, 1976) contribuiscano alla immunoprotezione dello spermatozoo.

Dai dotti efferenti gli spermatozoi vengono convogliati nella testa, nel corpo e nella coda dell'epididimo. Si ritiene che gli spermatozoi acquisiscano la loro potenzialità fecondante durante il passaggio attraverso l'epididimo grazie al legame sulla superficie nemaspermica di sostanze presenti nel fluido epididimario (Amman e Howards, 1980).

L'acquisizione della capacità fecondante si associa quindi a modificazioni nella struttura nemaspermica nel senso della perdita di strutture presenti a livello testicolare e, soprattutto nel senso dell'acquisizione di nuove molecole (Overstreet, 1986; Singer et al., 1985; Fusi e Bronson, 1990). L'immunoprotezione a livello epididimario sarebbe garantita dalla presenza di un elevato numero di T suppressor e dalla produzione di sostanze coat immunosoppressive. A proposito dell'attività immunosoppressiva di queste sostanze, la loro azione può essere schematizzata in un effetto inibitorio sulla blastogenesi indotta dai mitogeni sui linfociti T e B, in un'alterazione della capacità dei polimorfonucleati di riconoscere gli antigeni bersaglio mediante gli anticorpi citolitici di superficie, in un'inibizione dell'attività delle cellule citolitiche NK e T verso cellule neoplastiche e verso cellule infettate da virus, ed infine in un'attività anti-macrofagica ed anti-complementare (Marcus et al., 1986)

I primi studi sulle sostanze immunomodulanti presenti a livello del plasma seminale ipotizzavano che l'effetto immunosoppressivo fosse esplicato dalle prostaglandine (p.m. 330-350 d) presenti in alta concentrazione (Stites ed Erickson, 1975). In seguito è stata segnalata la presenza nel plasma seminale di un fattore di p.m. 3000 d capace di inibire l'effetto della PHA sui linfociti (Pitout e Jordan, 1976). Mediante l'impiego della cromatografia su colonna di Sephadex G25, è stata dimostrata nel plasma seminale la presenza di 3 picchi (Lord et al., 1977). L'attività immunosoppressiva è risultata presente principalmente nel primo picco. Tale sostanza deriva probabilmente dalla prostata o dalle vescichette seminali essendo presente anche nel plasma di soggetti vasectomizzati.

Tale sostanza o, più probabilmente, tale complesso di sostanze ha dimostrato in vari esperimenti di inibire la sintesi di DNA indotta da PHA, di inibire l'attivazione linfocitaria mediante altri mitogeni quali la ConA, di sopprimere la reazione mista linfocitaria (ciò evidenzia che tale fattore, o fattori, inibiscono la stimolazione di linfociti umani indotta da alloantigeni cellulari di superficie), di inibire la produzione di linfociti citotossici ed infine di sopprimere la risposta anticorpale.

Metafora et al. (1989) hanno dimostrato che una proteina basica, la rat Sperm Binding Protein (rSBP) del pm 14.600 d, secreta dalle vescichette seminali sotto controllo androgenico e correlata immunologicamente con una proteina analoga presente nel liquido seminale di ratto, svolge un ruolo di primaria importanza nell'attività immunosoppressiva del plasma seminale. Tale proteina si è dimostrata in grado di sopprimere in vitro sia l'attivazione dei linfociti umani indotta da vari mitogeni (ConA, PHA, ecc.), sia la reazione mista linfocitaria.

Impiegando la cromatografia del plasma seminale su colonna di Sefadex G-100, si è ottenuta la separazione di 5 frazioni distinte (Marcus et al., 1986). La maggiore attività immunosoppressiva è stata evidenziata nelle frazioni 1 e 3 mentre nella frazione 2 è stata riscontrata una maggiore quota di materiale con proprietà antigeniche ed allergeniche. Tale Autore ha dimostrato che il plasma seminale e gli spermatozoi hanno la capacità di inibire, in vitro, la risposta a mitogeni, l'immunità cellulo-mediata e la formazione di rosette. Sempre lo stesso autore ha dimostrato la capacità di linfociti freschi di restaurare l'attività dei linfociti precedentemente inibiti dalla prima frazione del plasma seminale. In contrasto con i dati riportati da Lord sembrerebbe che l'effetto inibente della prima frazione si esplichi soltanto sui T-linfociti e non sui B-linfociti.

Gli effetti immunomodulanti della “Frazione 1” secondo Marcus (Marcus et al., 1986) del plasma seminale sono stati studiati mediante un modello di attività antibatterica mediata da differenti sottopopolazioni linfocitarie di soggetti residenti in aree endemiche per la salmonellosi. I risultati confermano in un “modello di attività antibatterica” che la “Frazione 1” del plasma seminale è in grado di produrre una notevole inibizione delle attività antibatteriche nei riguardi della S. tiphy e S. minnesota R345 (De Simone et al., 1988). Tali risultati hanno dimostrato l’utilità di questo modello nello studio dell’attività immunomodulante del plasma seminale, e hanno suggerito che le frazioni del plasma seminale possono giocare un ruolo nel deprimere le difese antiinfezione a livello del tratto genitale maschile (De Simone et al., 1988). Queste funzioni, dimostrate in vitro, hanno un significato fisiologico nella protezione dello spermatozoo nel tratto genitale maschile e nelle prime fasi del passaggio attraverso il tratto genitale femminile. Alterazioni patologiche di queste funzioni possono giocare un ruolo facilitante nelle malattie trasmesse sessualmente, nello sviluppo e nella crescita delle neoplasie maschili e femminili e nella riduzione dell’attività immunologica, tipica di alcune sindromi di immunodeficienza acquisita oltre che nell’innesco di una reazione autoimmune antispermatozoo.

Queste barriere anatomico-funzionali predisposte a livello testicolare e lungo le vie genitali maschili, possono venire alterate mettendo a contatto con il sistema immunocompetente le strutture dello spermatozoo e le sostanze immunogene del plasma seminale.

Varie patologie andrologiche, possono causare alterazioni di questa barriera ematotesticolare inducendo una sorta di “autovaccinazione” antispermatozoo. I fattori scatenanti possono essere molteplici: flogosi, traumi, stasi vascolare, macro e micro necrosi, torsioni testicolari, neoplasie, ostruzioni anche transitorie, incomplete e monolaterali. Una volta che gli anticorpi siano presenti a livello sistemico, essi possono avere libero accesso attraverso la barriera danneggiata, al testicolo o ad altre regioni del tratto genitale maschile, e possono interferire, una volta che hanno reagito con la superficie nemaspermica, con la potenzialità fecondante del seme. Daltra parte, esiste un’enorme variabilità nel tipo di immunizzazione, a parità di stimolo antigenico, legata alla “flessibilità” del sistema immunocompetente a fronte delle molteplici situazioni genetiche ed ambientali. A questo proposito particolarmente interessanti risultano gli studi sulla reazione antispermatozoo nei soggetti sottoposti a vasectomia volontaria a scopo anticoncezionale. In tal caso infatti è possibile studiare basalmente, durante e dopo il riassorbimento di antigeni nemaspermici, un soggetto precedentemente sano e fertile. Il follow-up dei soggetti vasectomizzatti ha documentato un graduale incremento della percentuale e del titolo degli ASA, un incremento nei primi mesi e quindi una graduale scomparsa degli immunocomplessi circolanti ed un andamento simile della immunità cellulo-mediata antispermatozoo (Dondero, 1983). (Fig 5).

Studi successivi hanno dimostrato che il fattore principale nell’induzione della risposta immune non è solo il verificarsi del riassorbimento massivo di antigene nemaspermico, come postulato in passato, quanto l’esistenza di un terreno genetico predisponente all’immunizzazione stessa, come dimostra lo studio condotto su gemelli monocoriali sottoposti in tempi diversi a vasectomia, in un caso secondo la metodica

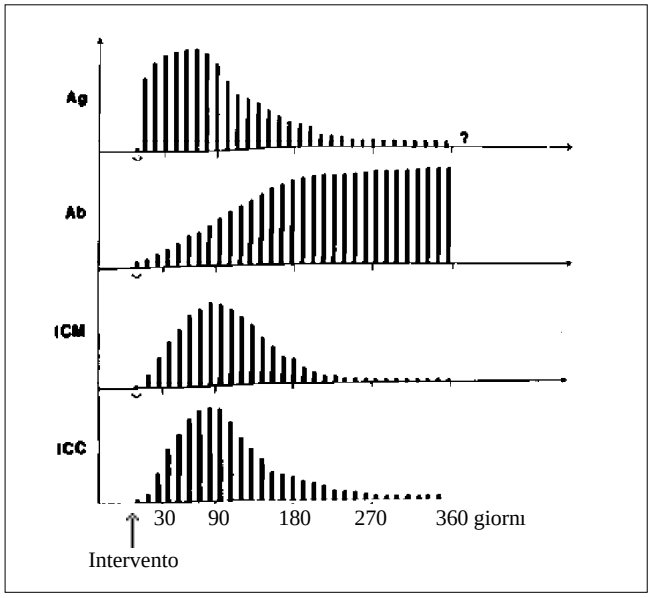



***Figura 5. Follow-up dei soggetti vasectomizzati: andamento del riassorbimento di antigene nemaspermico (Ag), della positività agli anticorpi antispermatozoo (Ab), dell'immunità cellulo-mediata antispermatozoo (ICM), e degli immunocomplessi circolanti (ICC).***

classica e nell'altro provocando precedentemente una condizione di azoospermia farmacologicamente indotta (Lenzi et al., 1987). In effetti, anche sulla base delle risultanze cliniche, dobbiamo distinguere fra:

a) soggetti affetti da una vera patologia autoimmune con tutte le caratteristiche di automantenimento legata più al terreno geneticamente predisposto che alle patologie scatenanti, e

b) soggetti affetti da una semplice disregolazione del sistema immunocompetente deputato alla tolleranza verso gli antigeni seminali; in tal caso la reazione immune, talora solo transitoria, sarebbe legata alla patologia scatenante e potrebbe essere addirittura interpretata finalisticamente come una reazione fisiologica di blocco della fertilità in un soggetto affetto da una patologia seminale.

## Diagnosi dell'autoimmunità antispermatozoo.

Data la assenza di sintomatologia specifica, la diagnostica dell'infertilità immunologica è basata sulle analisi laboratoristiche. Tali tecniche consentono di dare una valutazione qualitativa e quantitativa della immunoreazione, di studiare l'attività biologica *in vitro* degli anticorpi, di definire la classe immunoglobulinica e di individuare il sito di reazione antigene-anticorpo.

Il primo passo di tutte queste metodiche è la preparazione dei campioni: gli anticorpi antispermatozoo possono essere ricercati routinariamente nel siero di sangue e nel plasma seminale ottenuti, per centrifugazione, dai rispettivi fluidi biologici. Inoltre, i cosiddetti tests "diretti" sono in grado di rilevare gli anticorpi adesi alla superfice dello spermatozoo.

Per quanto riguarda le tecniche (descritte in dettaglio nell'Appendice) possiamo dividere i tests in:

a) tests per la ricerca dell'immunità mediata dagli anticorpi antispermatozoo, basati sull'attività biologica *in vitro* degli anticorpi (sono impiegati per la ricerca di anticorpi liberi nel campione biologico in esame) e

b) tests per lo studio dell'immunità antispermatozoo, che utilizzano un marker della reazione antigene-anticorpo (vengono impiegati per ricercare gli anticorpi antispermatozoo adesi alla superficie nemaspermica). Al primo gruppo appartengono le cosiddette "tecniche classiche", mentre nel secondo gruppo sono presenti alcuni dei metodi proposti più di recente.

Le tecniche classiche sono state standardizzate in vari laboratori internazionali. Alcune di queste, come il *Tube Slide Agglutination Test* (T.S.A.T.) (Franklin e Dukes, 1964), rivestono ora solo un interesse storico; altri come il *Capillary Tube Agglutination Test* (C.T.A.T) (Shulman ed Hekman, 1971) sono accettati ed impiegati, anche se solo il Gelatin Agglutination Test (G.A.T.) (Kibrick et al., 1952) ed il Tray Agglutination Test (T.A.T.) (Friberg, 1974) sono ancora oggi la base di tutti gli studi in immunologia della riproduzione.

*Gelatin Agglutination Test (G.A.T.)*

Proposto da Kibrick, Belding e Merrill nel 1952, è il primo metodo messo a punto per la determinazione macroscopica degli anticorpi spermioagglutinanti.

E' un test di flocculazione in gelatina che usa spermatozoi mobili come antigene; la positività è indicata dalla comparsa di un flocculato di dimensioni variabili, a seconda dell'intensità della reazione antigene anticorpo. I campioni negativi appaiono uniformemente torbidi. E' necessario effettuare la titolazione dei campioni positivi mediante diluizioni progressive del campione in esame.

*Tray Agglutination Test (T.A.T)*

Descritto da Friberg nel 1974 è un metodo di microagglutinazione che, con successive modifiche, rappresenta, ad oggi, per la sua sensibilità e specificità il metodo di elezione fra le tecniche microscopiche. Come antigene vengono impiegati solo spermatozoi

mobili ottenuti per mezzo della tecnica dello "swim up", cioè dopo la spontanea migrazione degli spermatozoi in un terreno di coltura stratificato sul seme.

L'esame viene effettuato con un microscopio invertito valutando il numero di spermatozoi mobili agglutinati in relazione al numero di spermatozoi mobili liberi; vengono inoltre valutati l'intensità e il tipo di agglutinazione.

Fra le tecniche classiche bisogna ricordare anche lo *Sperm Immobilizing Test* (S.I.T.) (Isojima et al., 1968) e lo *Sperm Cytotoxicity Test* (S.C.T.) (Jeffery et al., 1972) che studiano gli anticorpi antispermatozoo complemento-dipendenti e l'*Immunofluorescence Test* (I.F.) (Hjort et al., 1971) e l'*Immunoperoxidase Test* (I.P.) (Storch et al., 1976) che sono in grado di identificare il sito di reazione Ag-Ab.

Le tecniche classiche per la determinazione degli anticorpi antispermatozoo presentano il vantaggio di essere confermate da numerosi contributi epidemiologici e metodologici ottenuti, negli ultimi trent'anni, su ampie e selezionate casistiche di pazienti.

Tuttavia, tali metodiche, pur essendo alla base di tutta la ricerca nel campo dell'immunità anticorpo-mediata antispermatozoo, presentano ancora alcuni limiti; in particolare, possono essere utilizzate solo da laboratori specializzati.

La ricerca nel settore, pertanto, è ora orientata nella messa a punto di metodi semplici e rapidi ed obiettivi per lo screening dell' infertilità immunologica ed utili per superare i limiti attuali.

Fra queste nuove tecniche vi sono i cosiddetti tests diretti per la ricerca degli anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi.

Fra queste metodiche, ampiamente impiegata è il *Mixed Antiglobulin Reaction Test* (MAR TEST) (Coombs et al., 1972) basato su una modificazione del test di Coombs. La principale caratteristica dell'IgG MAR Test Diretto è la capacità di rilevare la presenza, nel seme fresco, degli anticorpi della classe IgG adesi alla superficie degli spematozoi.

La tecnica utilizza come marker eritrociti umani sensibilizzati con IgG umane anti-Rh. Una goccia di tali eritrociti viene miscelata con una goccia di seme da testare e con una goccia di antisiero anti-IgG umane da coniglio. Se gli spermatozoi presentano anticorpi sulla loro superficie, formeranno con gli eritrociti delle agglutinazioni, visibili al microscopio ottico, in presenza dell'antisiero anti-immunoglobulina. Una recente modificazione del test è stata proposta da Vermeulen e Comhaire (1983) sostituendo gli eritrociti con particelle di latex sensibilizzate con IgG (SpermMar Test). La metodica non presenta altre sostanziali modifiche rispetto al MAR Test. Come abbiamo detto questi metodi sono semplici e rapidi nello screening della valutazione degli anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi. I loro limiti sono legati al fatto che essi sono sufficientemente sensibili e attendibili solo nello screening delle IgG (l'IgA MAR TEST diretto presenta molte difficoltà) e che non possono essere applicati su campioni seminali con severa oligozoospermia o con elevata ipomotilità.

Bronson et al. (1981), Clarke et al. (1985) e Shulman et al. (1985) hanno messo a punto l'*Immunobead test* (IBT) in cui il marker della reazione, in luogo delle emazie, è rappresentato da sferule di poliacrilamide ricoperte con anticorpi anti-immunoglobuline umane delle classi G, A ed M.

Dopo l'incubazione di tali sferule con gli spermatozoi è possibile determinare, al microscopio ottico, la loro presenza ed il sito di reazione Ig-anti-Ig sulla superficie dello spermatozoo (testa, collo, coda). (Fig 6)

Tale metodica presenta il vantaggio rispetto al MAR Test di essere in grado di valutare

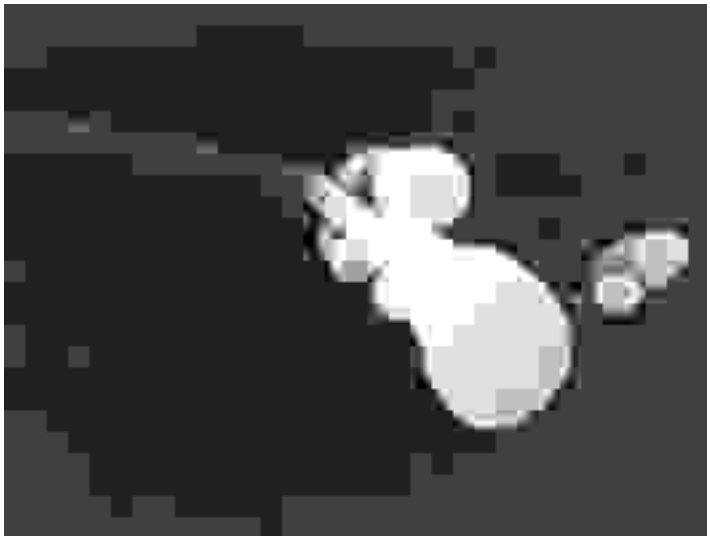


***Figura 6. Risultato dell'immunobead test visto al microscopio elettronico a scansione.***

tutte le classi immunoglobuliniche presenti sulla superficie nemaspermica. Peraltro, anche tale tecnica presenta al pari del Mar Test e dello SpermMar Test il limite di non poter essere impiegata su campioni gravemente oligozoospermici o ipomobili. L'IBT risulta strettamente correlato con i risultati del GAT e del TAT e con quelli di altri tests diretti. Anche per l'IBT è stata proposta di recente la sostituzione delle sferule di poliacrilamide con sferule di latex. L'omogeneità delle dimensioni delle sferule di latex rispetto a quelle di poliacrilamide rende più agevole la lettura del test (Mc Clure et Al., 1989).

Fra le tecniche sviluppate recentemente e caratterizzate dalla teorica obiettività dei loro risultati, svolgono un ruolo di primaria importanza il metodo radioimmunologico e quello immunoenzimatico.

Haas et Al. (1980) hanno impiegato, in patologia umana, una *applicazione radioimmunologica* del test di Coombs usando una sospensione antigenica di spermatozoi. Una revisione critica dei risultati ottenuti con tali tecniche ha dimostrato una scarsa sensibi-

lità a causa delle caratteristiche della preparazione antigenica. Infatti, parte della sospensione antigenica di spermatozoi viene persa durante la procedura di lavaggio, portando ad una difficile interpretazione dei risultati. Le difficoltà sono state parzialmente superate impiegando un antigene in fase solida rappresentato da un'aliquota di spermatozoi fissati per mezzo di glutaraldeide al fondo di provette di polietilene.

L'*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Witkin et al., 1981) è simile come procedura ed utilizza un antigene in fase solida (preparato come precedentemente descritto).

Alcune considerazioni devono essere fatte sulle tecniche RIA e ELISA per anticorpi antispermatozoo: nessuno dei metodi sopra menzionati è stato sottoposto ad un sufficiente numero di prove cliniche e di laboratorio per essere utilizzato di routine e una definitiva valutazione del loro potenziale di applicazione sarà possibile solo dopo studi su una ampia serie di correlazioni con i classici metodi di riferimento sopra menzionati. In questi ultimi anni con sempre maggiore frequenza vengono proposti kits preparati per semplificare la valutazione routinaria della presenza di anticorpi antispermatozoo. In un recente lavoro sono stati testati dei campioni di riferimento impiegando due tecniche indirette classiche quali il GAT ed il TAT ed alcuni dei sistemi commerciali attualmente disponibili sotto forma di kits ELISA e RIA. Nessuno dei kits impiegati in questo studio, ha fornito risultati coerenti per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo presenti in sieri di riferimento a titolo noto per le metodiche classiche ottenuti dalla sieroteca del Laboratorio di Immunologia della Riproduzione e Seminologia della V Clinica Medica dell'Università di Roma "La Sapienza", dalla WHO Bank for Reproductive Immunolology e dallo Antisperm Antibody Committee dell'American Society of Immunology of Reproduction (Lenzi et al., 1990). Sino ad oggi, i tentativi nostri e di altri gruppi (Clark et al., 1987; Saji et Al., 1988; Gandini et Al., 1990) di ottimizzare le suddette metodiche si sono dimostrati inapplicabili in sede di produzione commerciale; infatti, solo l'utilizzazione come antigene dell'intera cellula spermatica, e non di antigeni estrattivi (sı cui sono basati tali kits), ha consentito la riproducibilità delle metodiche per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo.

In conclusione, sono opportune alcune considerazioni riepilogative sulla diagnostica di laboratorio degli anticorpi antispermatozoo. Tali indicazioni sono indispensabili per una corretta esecuzione dei tests, al fine di poter fornire al clinico dei risultati attendibili che gli permettano di valutare e, ove possibile, curare l'infertilità su base immunologica.

Al fine di evitare risultati falsamente negativi, ogni campione deve essere analizzato con più di uno dei metodi sopra descritti, impiegando le tecniche più sperimentate. Un protocollo pratico potrebbe essere quello che prevede l'impiego del GAT e del TAT nel siero di sangue e nel plasma seminale e l'IBT diretto per lo studio degli anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi.

E' necessario impiegare la maggiore varietà di sistemi antigenici possibile; per tale motivo tutti i campioni devono essere testati impiegando come antigeni gli spermatozoi provenienti da vari donatori. Infatti, recenti ricerche impiegando la citofluorimetria, hanno dimostrato che nell'ambito dell'eiaculato esistono varie popolazioni di sperma-

tozoi con differenze antigeniche qualitative e quantitative. Si può quindi supporre che, nell'eiaculato di un singolo donatore e, in misura ancora maggiore, negli eiaculati provenienti da diversi donatori, gli spermatozoi siano coinvolti nella reazione immune in maniera differente e che queste differenze possano essere l'espressione di un diverso grado di maturità e di potenzialità fecondante. Probabilmente la variabilità nel ruolo svolto dagli anticorpi antispermatozoo sulla capacità fecondante del seme potrebbe dipendere da un'immunizzazione contro antigeni presenti su spermatozoi dotati di differenti gradi di potenzialità fecondante (Lenzi et al., 1989). E' indispensabile titolare sino alla diluizione finale i campioni positivi ai metodi indiretti. Bisogna sempre inserire in ogni analisi un controllo sicuramente positivo ed uno sicuramente negativo. Deve essere posta una particolare cura nella preparazione dell'antigene nemaspermico (come descritto nelle schede tecniche dei singoli metodi riportate in appendice); tale momento laboratoristico richiede una particolare cura ed attenzione, in quanto l'attendibilità dei tests dipende fondamentalmente da questo passaggio. Le metodiche descritte condotte con tutte le precauzioni sopra dette ed associate ad una corretta analisi seminale, rendono possibile l'identificazione certa di casi di infertilità immunologica consentendo un, sia pur complesso, approccio terapeutico.

## Terapia dell'infertilità autoimmune antispermatozoo.

Per quanto riguarda la terapia dell'infertilità immunologica maschile è opportuno distinguere casi in cui al momento dell'inquadramento diagnostico del paziente infertile la reazione autoimmune antispermatozoo rappresenta l'unico elemento patologico rilevabile e casi in cui la reazione autoimmune si accompagna ad un evento patologico attuale a carico del tratto genitale maschile, eventualmente in grado di per sè di determinare l'infertilità e comunque di indurre la risposta autoimmune.

In quest'ultimo caso, prima di impostare qualsiasi protocollo farmacologico mirato alla risoluzione della patologia immunitaria, sarà necessario risolvere dapprima la patologia scatenante di base. La risoluzione di una flogosi prostato-vescicolare può eliminare o ridurre la concomitante reazione autoimmune scatenata dalla flogosi stessa. L'eliminazione mediante orchiectomia di un testicolo ipotrofico per trauma, torsione funicolare, orchite, può portare al normalizzarsi del quadro immunologico e quindi, successivamente, di quello seminologico, grazie all'eliminazione della fonte di stimolo antigenico; lo stesso accade eliminando cisti epididimarie o correggendo ostruzioni dei dotti deferenti. Poichè le suddette patologie sono assai frequenti nei giovani e possono rappresentare la causa scatenante di un'autoimmunizzazione non sempre reversibile, sarà opportuno, ai fini preventivi, tentare di diagnosticare e curare tali patologie sin dalla pubertà. Al contrario, nei casi in cui la patologia autoimmune è, o è divenuta, il fattore etiopatogenetico principale, è necessario intervenire con protocolli terapeutici agenti direttamente sulla patologia immunologica. Gli schemi terapeutici più utilizzati in campo umano si basano sull'uso dei corticosteroidi a vari dosaggi e con varie modalità di somministrazione (Tab. 1) (Shulman, 1985b).

L'uso di immunomodulatori, quali il levamisole, sembra indurre un miglioramento più del quadro seminologico che dello stato immunologico. La percentuale di gravidanze ottenute non è peraltro valutabile, dato il numero ridotto di casi trattati. Per quanto riguarda, invece, l'eliminazione delle zone di spermioagglutinazione con tripsina all'1% , tale sostanza si è dimostrata non applicabile in campo umano in quanto prove sperimentali hanno dimostrato un incremento della teratogenesi embrionale.

I risultati poco incoraggianti di tali schemi terapeutici, il più delle volte gravati anche da importanti effetti collaterali, hanno indotto i ricercatori a spostare il bersaglio della terapia dall'organismo allo spermatozoo; da alcuni anni a questa parte sono state quindi proposte varie tecniche per il "trattamento" del seme in casi di infertilità immunologica.

Purtroppo, i dati del nostro laboratorio sono piuttosto scoraggianti indicando una inadeguatezza delle tecniche di manipolazione del seme fino ad oggi disponibili, al fine di ottenere un pool nemaspermico privo di anticorpi; questo è particolarmente vero quando il seme di base presenti un'immunizzazione ad alto titolo, sicura causa della ridotta potenzialità fecondante del seme. Altri gruppi hanno segnalato, al contrario, dati positivi utilizzando colonne o beads immunomagnetici (Lenzi et al., 1988).

Un ulteriore e più recente passo avanti è rappresentato dai tentativi di terapia in vitro degli effetti della reazione autoimmune antispermatozoo, basata sui meccanismi fisio-

logici di modificazione della membrana nemaspermica che avvengono durante il processo di capacitazione. Infatti, durante la fase di capacitazione, *in vivo* nelle vie genitali femminili ed in vitro in media capacitanti, si verifica una perdita di strutture di membrana che sono presenti sulla superficie nemaspermica al momento dell'eiaculazione, ma che vengono modificate durante le fasi della capacitazione (Hinrichsen-Kohane et al., 1984). Parte delle strutture che subiscono tali modificazioni sono quelle stesse molecole coat che, come abbiamo visto, vengono acquisite dallo spermatozoo durante il processo di maturazione epididimaria e durante l'eiaculazione. Il lavoro che vari gruppi stanno svolgendo è quindi mirato all'induzione della capacitazione *in vitro*, dello spermatozoo immunologicamente compromesso, al fine di ottenere l'eliminazione non solo dell'anticorpo ma, senza danneggiare la membrana, dell'intero immunocomplesso anticorpo-antigene. In tal modo si potrebbe ottenere lo spermatozoo privo di anticorpi, con la membrana ancora integra, in una fase di maturazione avanzata, da utilizzare per le varie forme di fecondazione in vitro (Lenzi et al., 1990).

A) Si somministrano: 96 mg/die di metimprednisolone per sette giorni, dal 21° al 28°, o dal 1° al 7° giorno del ciclo della partner per ottenere il massimo dell'effetto immunosoppressivo di questa alta dose di steroidi durante l'ovulazione successiva: percentuale massima di successi (in termini di gravidanze) 44%;

B) Si somministrano: 2-3 mg/die di desametazone per 13 settimane e dosi decrescenti per altre 7 settimane; percentuale di gravidane 25-30%;

C) Si somministrano: 15 mg/die di prednisone per 3-12 mesi: percentuale di gravidanze 25%;

D) Si induce transitoriamente una azoospermia mediante la somministrazione di 250 mg/settimana di testosterone enantato al fine di eliminare o ridurre la stimolazione antigenica seguita, alla ripresa della spermatogenesi, da un trattamento con 16 mg/die di metilprednisolone per 30 giorni ed 8 mg/die nei 30 giorni successivi: percentuale di gravidanze 25%;

E) Si somministrano: 40 mg/die di metilprednisolone dal 1° al 10° giorno del ciclo seguito da 5 mg/die l'11° ed il 12° giorno per 3 cicli: percentuale di gravidanze 20-25%.

***Tabella 1. Schemi terapeutici basati sull'uso di corticosteroidi impiegati nella terapia dell'infertilità su base immunologica.***

# Infertilità immunologica femminile

## Patogenesi della reazione isoimmune antispermatozoo.

La ricerca di un'eventuale attività isoimmunitaria antispermatozoo, in donne di coppie infertili, è, in linea di massima, un test di secondo livello nell'iter diagnostico volto a valutare la causa di una mancata fecondazione. Ciò deriva dal fatto che l'incidenza degli isoanticorpi antispermatozoo, come fattore d'infertilità, è assai minore rispetto ad altre patologie quali l'anovulazione, le alterazioni anatomiche del tratto riproduttivo, ecc.; tale incidenza diviene invece significativa (fino al 30%) se si prendono in considerazione i casi di infertilità femminile "sine causa" o inspiegabile, quei casi in cui, cioé, non è stato possibile trovare, con le tecniche attuali, la causa dell'infertilità. Come abbiamo visto a proposito della patogenesi dell'infertilità immunologica maschile, anche nella donna, vanno considerati i casi in cui la risposta isoimmune antispermatozoo, rappresenta un semplice fattore aggravante concomitante o secondario a patologie che possono causare infertilità; tale fattore, tuttavia, mantenendosi nel tempo può non permettere il ripristino della fertilità anche dopo la risoluzione della patologia primitiva.

Lo screening per la valutazione di un'eventuale infertilità femminile su base immunologica deve essere preso in considerazione soprattutto nelle donne con infertilità sine causa, specie se questo tipo di infertilità si protrae da almeno 2-3 anni.

Dobbiamo inoltre considerare "come" ed a "quali" livelli del tratto riproduttivo gli anticorpi antispermatozoo possono ostacolare od impedire la fecondazione.

Ripetute inoculazioni intravaginali di milioni di spermatozoi non si associano in genere allo sviluppo di un'isoimmunizzazione antinemaspermica tale da poter alterare la fertilità. La ridotta capacità della vagina di reagire ad eventuali stimolazioni immunogene del liquido seminale è dovuta al limitato numero di plasmacellule presenti a livello dell'epitelio vaginale (Lippes et al., 1970). Sono state documentate risposte allergiche IgE mediate a livello vaginale con sintomatologia di tipo vulvovaginitico (Chang, 1976) sino a gravi reazioni anafilattiche (Ohman et al., 1990; Mike et al., 1990). I test di sensibilità cutanea hanno confermato che in questo caso non si tratta di una reazione isoimmune antispermatozoo ma di una atopia ad alcuni componenti del plasma seminale. Sebbene l'inoculazione di materiale antigenico in vagina abbia apparentemente indotto una risposta anticorpale, in alcuni casi, tuttavia è difficile discernere quanto questa reazione sia dovuta a fattori cervicali piuttosto che vaginali.

Bisogna ricordare che la vagina non possiede strutture ghiandolari (eccetto le ghiandole di Skene e di Bartolini) in grado di indurre una risposta immune locale tramite le IgA secretorie. Al contrario, tutte queste condizioni si verificano a livello del canale

cervicale che proprio per le caratteristiche di "tonsilla" genitale appare essere il sito privilegiato per lo scatenamento di una isoimmunizzazione antispermatozoo. Potrebbero agire da causa scatenante sia modificazioni del gamete maschile (aumento del potere antigenico o riduzione delle sostanze immunosoppressive presenti nel plasma seminale) sia fenomeni adiuvanti del tratto genitale femminile (flogosi, microtraumi, ecc.).

Peraltro, uno dei siti in cui maggiormente è stata dimostrata l'interferenza degli anticorpi sugli spermatozoi, è proprio il canale cervicale, ed in particolare il suo secreto, il muco cervicale (Fig. 7).

Lo studio *in vivo* dell'interazione spermatozoi-muco cervicale è comunemente effettuato tramite il post-coital test, il quale può fornire dati indiretti circa la presenza di anticorpi antispermatozoo a livello del muco cervicale stesso (Moghissi, 1977). Per poter valutare al meglio l'influenza della patologia immunitaria sull'interazione spermatozoi-muco cervicale, bisogna, ovviamente, escludere qualsiasi altro fattore, non immunitario, che possa riprodurre gli stessi effetti negativi. Pertanto questo test deve necessariamente essere programmato in periodo peri-ovulatorio data la funzione di "valvola biologica" che la cervice uterina e la sua secrezione svolgono sul trasporto e sulla sopravvivenza nemaspermica nel tratto riproduttivo femminile, permettendo il passaggio degli spermatozoi solo in epoca periovulatorio.

Quindi è necessario scegliere il momento ottimale, cioè quello di massima espressione estrogenica, utilizzando tutti i metodi diagnostici a disposizione, quali i dosaggi ormonali, il monitoraggio ecografico follicolare, la citologia vaginale, i dosaggi biochimici del muco cervicale, la valutazione della temperatura corporea basale e la valutazione delle modificazioni reologiche del muco cervicale. Di questi ultimi, i parametri più importanti da esaminare sono la quantità del muco cervicale prodotto, il diametro dell'ostio cervicale esterno, la viscosità del muco cervicale, il pH del fluido eso ed endocervicale, lo spinnbarkeit (o filanza), il ferning e la presenza di eventuali flogosi, anche silenti. Per meglio valutare questi parametri, sono state proposte varie classificazioni (scores cervicali) con punteggi massimi per aspetti corrispondenti alle condizioni ottimali del muco cervicale, e minimi per le condizioni anormali.

La valutazione del PCT, specie se indirizzato alla ricerca di eventuali segni indiretti di una patologia immunitaria, dovrebbe essere effettuata non prima delle 6-8 ore dal rapporto al fine di permettere la reazione anticorpale e l'eventuale spermioimmobilizzazione complemento-dipendente che nel muco cervicale è lenta in quanto la concentrazione di complemento è molto bassa. E', infine, necessario analizzare la porzione di muco cervicale più profonda nel canale cervicale onde escludere negative influenze dell'ambiente vaginale acido.

Un PCT effettuato in un epoca non idonea o in situazioni che alterino lo score cervicale, non ha alcun valore clinico ed esclude la possibilità di sospettare la presenza di anticorpi antispermatozoo (Moghissi, 1977).

Quando il PCT viene effettuato secondo le modalità sopra riportate i quadri più comuni, in presenza di anticorpi antispermatozoo, sono:

a) presenza di numerosi spermatozoi dotati in elevata percentuale di vorticosi movimenti non progressivi ma agitatori in loco;

b) presenza di numerosi spermatozoi immobili;

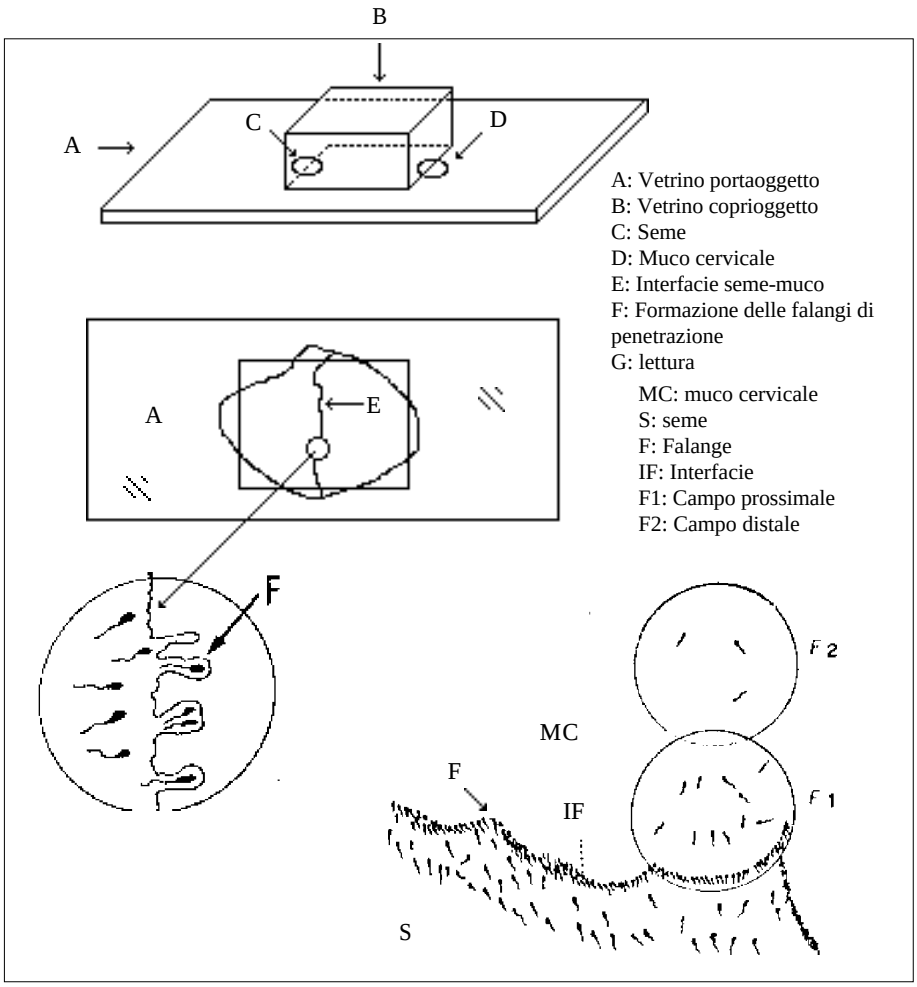



***Figura 7. Studio della interazione spermatozoi/muco cervicale in vitro utile a valutare, con prove cosiddette crociate (muco di donatrice e spermatozoi di donatori), gli eventuali fenomeni di incompatibilità che possono far sospettare patologie immunologiche.***

c) presenza di un relativamente basso numero di spermatozoi gravemente discinetici in contrasto con una ottimale concentrazione di spermatozoi mobili nell'eiaculato di base del partner.

Il primo quadro è riscontrabile anche in vitro cimentando gli spermatozoi con un muco cervicale periovulatorio contenente anticorpi antispermatozoo (Test di migrazione nemaspermica in vitro) (WHO, 1986). Pertanto, questo fenomeno è una peculiare caratteristica dell'interazione spermatozoi-muco cervicale (in presenza di anticorpi

specifici anti-nemaspermici), il che comporta un blocco di una popolazione più o meno numerosa di spermatozoi escludendola dal processo di fecondazione. La spiegazione di questo fenomeno, denominato "shaking phenomenon", ipotizza un tipo di legame per cui le immunoglobuline aderiscono da un lato alla componente gel del muco cervicale mediante il Frammento Cristallizabile (Fc), e dall'altra reagiscono con gli antigeni nemaspermici tramite il Fab. In effetti è stata dimostrata la presenza di recettori per il Fc, sicuramente delle IgG e probabilmente delle IgA, nelle molecole glicoproteiche del muco cervicale. In tal modo verrebbe spiegato lo "shaking phenomenon" presente nel muco cervicale e si giustificherebbe l'assenza di zone di spermioagglutinazione che sono invece osservabili quando la reazione è dovuta ad anticorpi antispermatozoo presenti nel liquido seminale del partner.

Gli altri quadri post-coitali sopradescritti (ipomotilità e discinesi nemaspermica) trovano la loro spiegazione nell'attivazione del complemento nel muco cervicale dopo la reazione antigene-anticorpo. Quando una molecola immunoglobulinica si lega alla superficie nemaspermica è in grado di attivare una porzione della membrana dello spermatozoo consentendo il legame del primo componente del complemento C1 sul complesso cellula-immunoglobulina. Il successivo innesco della cascata complementare può indurre alterazioni strutturali della superficie spermatica coinvolta nel legame con le immunoglobuline.

La concentrazione del complemento, benchè minima (circa l'11,5% dell'attività complementare serica), viene peraltro ritenuta idonea, una volta avvenuta l'attivazione, ad espletare tale azione citotossica sugli spermatozoi, determinando la loro immobilizzazione. Sempre a livello cervicale va segnalata una notevole attività spermiofagica da parte dei macrofagi, indotta dagli spermatozoi sensibilizzati, che potrebbe giustificare la presenza di pochi spermatozoi osservabili nei PCT, nonostante una normale concentrazione nemaspermica nell'eiaculato. La stessa attivazione macrofagica è responsabile dell'eliminazione di spermatozoi vecchi o con ridotta motilità sia a livello cervicale che uterino e tubarico, riducendo così il carico antigenico a livello del tratto genitale femminile.

Se questi quadri patologici post-coitali rappresentano una valida indicazione per la ricerca degli iso-anticorpi antispermatozoo, un PCT normale non può escluderne la presenza. In effetti la produzione di anticorpi locali, a livello cervicale, può essere un fenomeno transitorio; inoltre, gli anticorpi sierici possono per trasudazione essere presenti ad un livello più alto del tratto riproduttivo (fluido endometriale, tubarico, follicolare e peritoneale) ed esplicare comunque una azione antifertilizzante. Gli anticorpi antispermatozoo vanno pertanto ricercati sempre, anche in campo femminile, non solo a livello del muco cervicale ma anche a livello sierico e la loro eventuale presenza è sufficiente per controindicare tutte le forme di inseminazione artificiale (AIH, IPI) ed indirizza la terapia verso le varie forme di fecondazione *in vitro* (Dondero et al., 1985). Peraltro, anche per queste ultime tecniche bisogna ricordare che la presenza di anticorpi nel siero è sempre associata con una positività anticorpale a livello del fluido follicolare; questo implica che il fluido follicolare non deve essere impiegato come terreno di coltura e che gli ovociti devono essere lavati ripetutamente al fine di prevenire eventuali contaminazioni del terreno di coltura in cui saranno coincubati i gameti.

## Diagnosi dell'isoimmunizzazione anti-spermatozoo.

Una volta sospettata, sulla base dei dati clinici e laboratoristici, un'infertilità femminile su base immunologica, è necessario impostare un protocollo diagnostico per il rilievo dell'eventuale isoimmunizzazione antispermatozoo. Gli anticorpi antispermatozoo possono essere ricercati, come detto, nel siero di sangue o nei fluidi biologici genitali mediante le stesse tecniche già elencate in precedenza e riportate in dettaglio nell'Appendice. Se lo studio di questi anticorpi nel siero di sangue non pone problemi, quello a livello dei fluidi genitali comporta problemi di esecuzione. Il dover prelevare fluidi endometriali, tubarici, follicolari o peritoneali, richiede manovre invasive che limitano questa indagine a casi estremamente selezionati. Il muco cervicale è invece una secrezione genitale facilmente ottenibile senza eccessivi traumi per la donna e, quindi, idoneo allo studio immunologico.

Studi epidemiologici, effettuati simultaneamente nel siero di sangue e nel muco cervicale, su ampie popolazioni di donne di coppie infertili, hanno dimostrato la possibilità di vari quadri di risposta isoimmune antinemaspermica. E' possibile rinvenire tali anticorpi simultaneamente sia nel siero di sangue che nel muco cervicale ed in questo caso possiamo trovare dei titoli praticamente equivalenti nei due media o titoli di 2-3 volte o più nel siero rispetto al muco e viceversa; oppure la positività può essere riscontrabile solo nel siero o esclusivamente nel muco cervicale.

La presenza di anticorpi solo nel siero sarebbe suggestiva di uno stato di immunizzazione di vecchia data, in quanto la persistenza di un'immunità locale sembra essere assai più breve di quella sistemica; mentre la positività limitata alla secrezione cervicale sarebbe indicativa di una iniziale sensibilizzazione verso gli antigeni nemaspermici, o di una "intolleranza" favorita da processi infiammatori e/o da alterazioni strutturali, la cui ampiezza, almeno fino a quel momento, non comporterebbe l'interessamento del sistema immunocompetente sistemico.

Per tutti questi motivi è necessario ribadire che i tests per la ricerca degli isoanticorpi antispermatozoo vengano eseguiti contemporaneamente sia nel siero di sangue che nel muco cervicale. Dal punto di vista laboratoristico è inoltre necessario sottolineare che le modalità tecniche per una corretta esecuzione dei tests anticorpali nel muco cervicale, sono differenti da quelle utilizzate per il siero od il plasma seminale in quanto l'esecuzione del test va fatta precedere da una estrazione delle immunoglobuline presenti nel muco cervicale, che per le sue caratteristiche reologiche non è utilizzabile come tale. Il muco cervicale ovulatorio, ottenuto con gli accorgimenti indicati in precedenza per la preparazione al PCT, ma escludendo ogni rapporto, che potrebbe ridurre la quota anticorpale libera nel muco, va pre-trattato e quindi l'estratto ottenuto va studiato per valutarne la concentrazione immunoglobulinica. Solo se il risultato ottenuto risulta soddisfacente, l'estratto può essere utilizzato per i tests anticorpali.

Per quanto riguarda il problema di quali tests utilizzare nelle patologie femminili, abbiamo visto precedentemente, trattando delle patologie maschili, quanto numerose siano le metodiche a nostra disposizione per rilevare gli anticorpi antispermatozoo.

I vari workshops sull'argomento hanno sempre indicato, anche in patologie femminili, di effettuare simultaneamente almeno 2 tests e di ripeterli a distanza di tempo per studiare l'eventuale variazione spontanea del titolo anticorpale.

I tests per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo, benchè tutti rivolti allo stesso scopo, mostrano delle differenze sia riguardo la specificictà, la riproducibilità e la sensibilità, che nel fornire informazioni riguardo il tipo di classe immunoglobulinica interessata e la quantità di anticorpi coinvolta.

Dai dati della letteratura, soprattutto relativi ai lavori di comparazione dei tests, si possono estrapolare delle indicazioni che possono essere così schematizzate (Dondero et al., 1985):

1) le metodiche di spermioimmobilizzazione, benchè molto specifiche, appaiono meno sensibili rispetto alle altre metodiche, ed escludono dal test system, le immunoglobuline non fissanti il complemento;

2) le metodiche di spermioagglutinazione, che sono le più impiegate per la loro alta sensibilità pur mostrando, nei tests microscopici come il TAT, il sito di attacco delle immunoglobuline sullo spermatozoo, non rivelano il tipo di classe immunoglobulinica coinvolta;

3) le metodiche che utilizzano dei markers dell'avvenuta reazione antigene-anticorpo (RIA o ELISA) sono molto interessanti pur se necessitano ancora di sperimentazioni su più ampie popolazioni e risentono molto della mancata caratterizzazione dell'antigene responsabile della risposta anticorpale interferente con la fertilita;

4) l'Immunobead test indiretto e l'IgG MAR test indiretto risentono di problemi tecnici di esecuzione che li pongono in subordine rispetto ai classici tests di spermioagglutinazione sopra citati. In uno studio condotto in un'ampia popolazione di donne fertili, gravide, donne infertili da causa nota e donne infertili "sine causa", volto a comparare 4 metodiche (CTAT, GAT, TAT e IgG MAR test indiretto) simultaneamente sul siero di sangue e nel muco cervicale, è emerso che le metodiche elettive per il siero di sangue sono il GAT, TAT e IgG MAR test indiretto, mentre per il muco sono il CTAT, il GAT ed il TAT.

Ogni campione deve essere analizzato con più di uno dei metodi sopra descritti per evitare risultati falsamente negativi, impiegando le tecniche più sperimentate. Un ultima considerazione riguarda l'antigene da usare in questi test-systems per rilevare l'attività anticorpale antinemaspermica delle donne. Comunemente vengono utilizzati come antigeni nemaspermici, spermatozoi di donatori sani, fertili, in quanto gli anticorpi antispermatozoo prodotti vengono considerati sperma-specifici e non individuo-specifici; peraltro, è stato osservato che le donne con anticorpi antispermatozoo erano più responsive verso gli antigeni nemaspermici del proprio partner che non quelli di un pool di spermatozoi di donatori (Dondero et al., 1978). Tale rilievo ha trovato successivamente numerose conferme e, pertanto, è necessario, se le caratteristiche seminali del partner lo permettono, utilizzare come antigene gli spermatozoi del partner in parallelo con quelli di donatori fertili.

## Terapia dell'infertilità immunologica da isoanticorpi anti-spermatozoo.

Per quanto riguarda le strategie terapeutiche, in caso di infertilità immunologica femminile, queste si basano sulla condom terapia, sulla terapia steroidea sistemica e/o locale e sulle tecniche di fecondazione assistita (Shulman e Dondero, 1986).

1) La condom terapia è impiegata da quasi vent'anni secondo le indicazioni di Franklin e Dukes. Il concetto base è quello di impedire, per un certo periodo di tempo, che gli spermatozoi vengano a contatto con il sistema immunocompetente della donna già impegnata nella risposta antinemaspermica e quindi evitare lo stimolo antigenico. Questo tipo di trattamento va protratto per molti mesi, minimo 6, secondo Franklin e Dukes, almeno il doppio secondo altri e va monitorizzato mensilmente con i tests anticorpali sia nel siero che nel muco cervicale. Le percentuali di successo in termini di riduzione del titolo anticorpale, con tale tipo di terapia sono estremamente discordanti e variano da risultati assolutamente negativi fino al 60% di successi.

2) L'inseminazione artificiale intrauterina, comunemente utilizzata in altri casi di infertilità maschile e femminile, sarebbe applicabile alle donne con anticorpi antispermatozoo considerando che il maggiore effetto antifertilizzante degli anticorpi antinemaspermici si esplica a livello del muco cervicale e che, quindi, teoricamente, il problema potrebbe essere risolto superando questo ostacolo deponendo direttamente entro l'utero gli spermatozoi. Peraltro gli anticorpi se presenti anche nel siero possono per trasudazione essere presenti anche a livello endometriale, tubarico, follicolare e peritoneale rendendo inutile il by-pass cervicale, salvo i rari casi di esclusiva presenza anticorpale a livello del canale cervicale.

3) La terapia corticosteroidea si basa sugli stessi principi esposti a proposito della terapia dell'infertilità immunologica maschile ed utilizza gli stessi schemi terapeutici. In particolare va ricordato lo schema di Shulman che utilizza alte dosi di metilprednisolone (96 mg/die per 7 giorni). Questa terapia, poichè richiede almeno 3 settimane per esplicare il massimo effetto, deve essere iniziata al 21-24 giorno del ciclo mestruale onde ottenere i massimi benefici nel periodo ovulatorio del ciclo successivo.

4) La terapia corticosteroidea locale prevede l'impiego di lavande vaginali con una soluzione contenente 40 mg di metilprednisolone nei 7 giorni precedenti la presunta ovulazione.

5) Di recente sono state proposte anche nell'infertilità immunologica femminile, le varie tecniche di fecondazione assistita. Alcune Scuole, tra cui alcune italiane, australiane e statunitensi hanno impiegato tali tecniche in pazienti con isoanticorpi antispermatozoo al fine di ottenere l'unione fra ovociti e spermatozoi, senza che quest'ultimi venissero a contatto con i fluidi biologici del tratto riproduttivo femminile. I risultati non sembrano peraltro, fino ad oggi, sufficientemente incoraggianti, a meno che non si sia prima ottenuta, con terapia corticosteroidea, una significativa riduzione del titolo anticorpale. Inoltre, la presenza degli ASA nel siero della donna, associata pressochè costantemente con una positività lievemente inferiore nel fluido follicolare, obbliga, proprio nei programmi di fecondazione in vitro, a non utilizzare il siero della donna nel medium di coltura dei gameti ed impone un accurato lavaggio dell'ovocita per evitare l'inquinamento del terreno in cui verranno inseminati gli ovociti o coincubati i gameti.

# Appendice

**Estrazione delle immunoglobuline dal muco cervicale**

Solubilizzazione con tampone di Baker (Shulman e Friedman, 1975).
- Pesare i campioni.
- Aggiungere a ciascun campione una quantità di tampone di Baker doppia rispetto al campione di muco; nei casi in cui il peso del muco sia inferiore a 0,2 g si aggiungono comunque 0,4 ml di tampone.
- Aggiungere alla miscela palline di vetro per defibrinizzazione in numero di 10-15.
- Chiudere il contenitore ed agitare mediante vortex per circa 1 ora.
- Trasferire la miscela così ottenuta, dopo aver tolto le palline, in una provetta da sierologia.
- Centrifugare a 5000 rpm per 30' e decantare.

Liquefazione con Bromelina (Jager et Al., 1977).
- Pesare i campioni.
- Aggiungere una pari quantità in peso di bromelina.
- Incubare a temperatura ambiente per 30' e a 37°C per 15'.
- Centrifugare il campione così liquefatto a 5000 rpm per 30' e decantare.

Ultracentrifugazione (Kremer e Jager, 1976).
- Ultracentrifugare (Beckman L2-65 con rotore 65) a 100.000 g per 1 ora o a 200.000 g per 1/2 ora e decantare.

Prima di eseguire i tests immunologici è necessario valutare la concentrazione delle immunoglobuline estratte.

**Gelatin Agglutination Test (GAT)**
(Kibrick,Belding e Merrill, 1952)

Preparazione dell'antigene

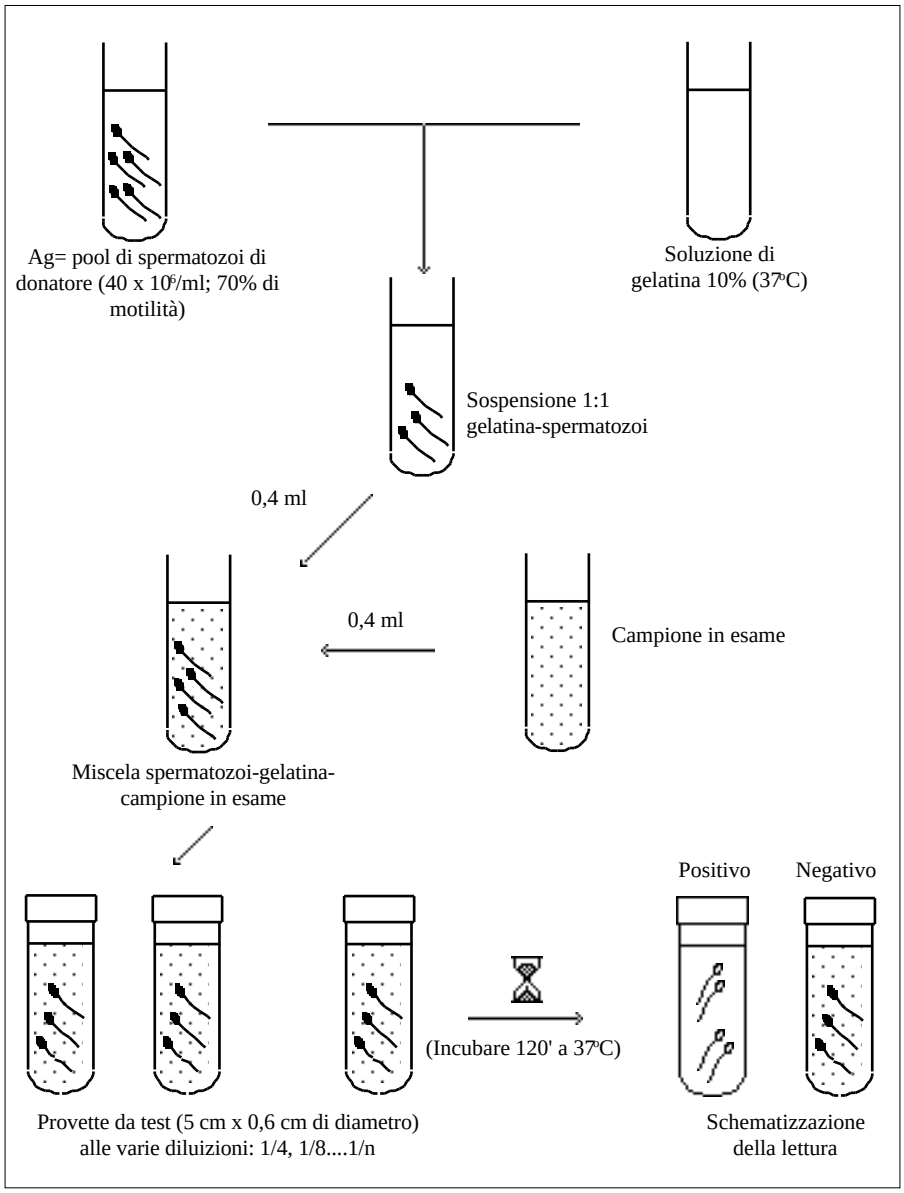
- Diluire 1 o più liquidi seminali di donatore, in toto, con tampone di Baker sino ad ottenere una concentrazione di circa 40.000.000 / ml ed una motilità progressiva superiore al 70%.

Esecuzione del test

- Preparare una soluzione di gelatina al 10% in tampone di Baker e porla in termostato a 37°C per mantenerne la fluidità.
- Miscelare la soluzione di spermatozoi con un uguale volume della soluzione di gelatina.
- Aggiungere immediatamente 0,4 ml della sospensione gelatina-spermatozoi a 0,4 ml dei campioni da testare (siero e / o plasma seminale) precedentemente diluiti.
- Miscelare delicatamente e trasferire nelle provettine di 5 cm di lunghezza per 0,6 cm di diametro.
- Incubare in termostato per 120' a 37°C.

La positività è data dalla comparsa di un flocculato uniformemente distribuito nella provetta e dalla chiarificazione della zona circostante, mentre il campione negativo appare uniformemente torbido.

La metodica risulta di notevole sensibilità ed è inoltre di esecuzione relativamente semplice. I suoi limiti sono legati alla necessità di utilizzare una elevata quantità di spermatozoi mobili.




**Gelatin Agglutination Test.**

**Tray Agglutination Test (TAT)**
(Friberg, 1974)

Preparazione dell'antigene

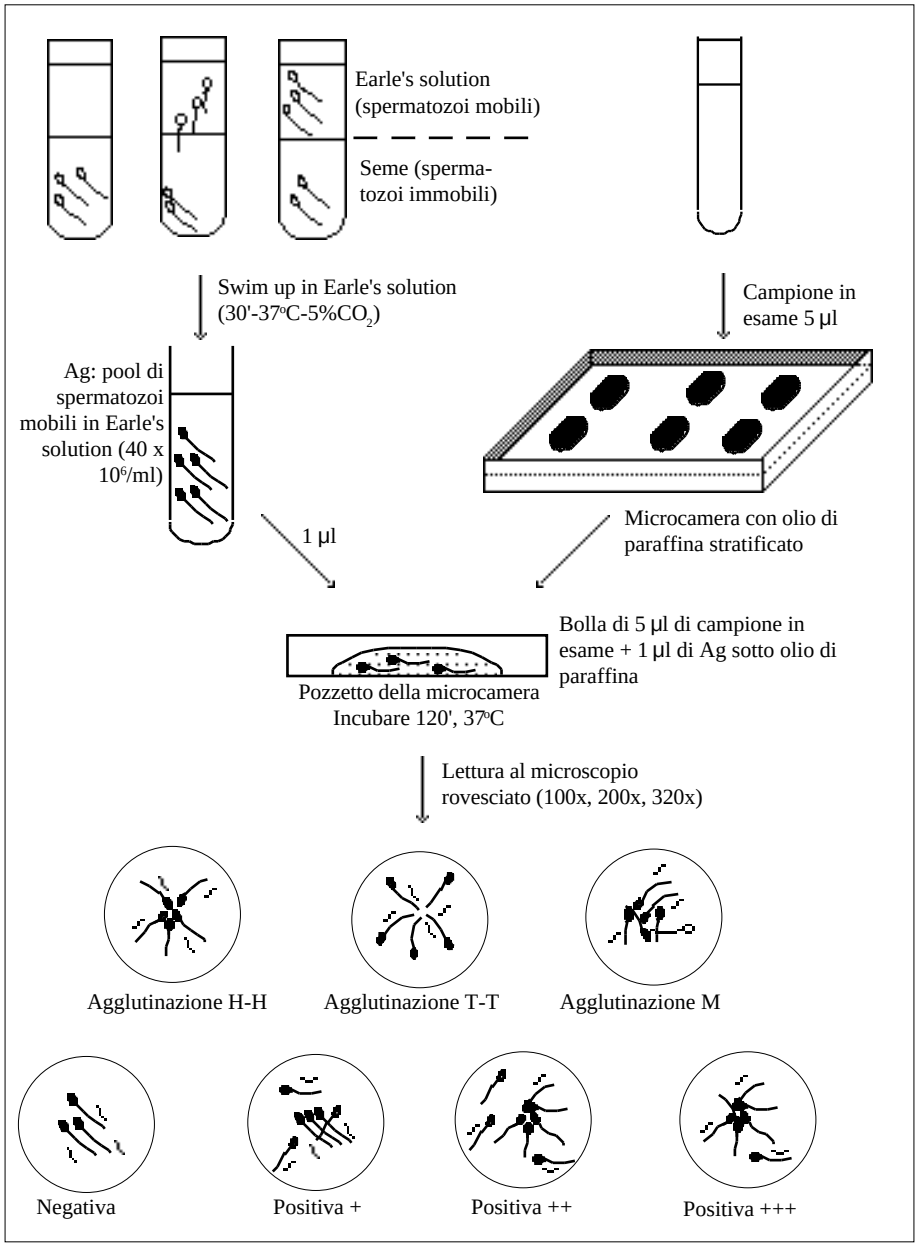
- Stratificare, in provettine di piccolo calibro 300 µl di soluzione di Earle su 300 µl di liquido seminale di donatore, in toto (swim-up)
- Incubare per 30' a 37°C in termostato a $CO_2$ al 5% .
- Aspirare, al termine dell'incubazione, la soluzione di Earle e valutare la concentrazione degli spermatozoi mobili migrati dal liquido sottostante, portandola a 40.000.000 / ml.

Esecuzione del test

- Deporre l'olio di paraffina nella microcamera (Hamax Ginst Ltd, Norvegia) contenente i pozzetti.
- Pipettare in ogni pozzetto 5 µl dei campioni (siero e / o plasma seminale) da testare.
- Aggiungere ad ogni campione seminato, 1 µl della sospensione antigenica precedentemente preparata.
- Porre la microcamera ad incubare per 120' a 37°C.
- Leggere al microscopio rovesciato esaminando i vari pozzetti ad un ingrandimento di 100x, 200x e 320x.

La lettura del test viene effettuata valutando la percentuale di spermatozoi mobili agglutinati rispetto al totale degli spermatozoi mobili, rilevando il tipo di agglutinazione (H-H = Testa-Testa; T-T = Coda-Coda; M = Miste).

Il test viene considerato:
- POSITIVO(+) se la percentuale di spermatozoi mobili agglutinati è < 10%
- POSITIVO(++) se la percentuale di spermatozoi mobili agglutinati è compresa fra il 10% ed il 90%
- POSITIVO(+++) se la percentuale di spermatozoi mobili agglutinati è > 90%
- NEGATIVO se non si rilevano spermatozoi mobili coinvolti in agglutinazioni.




***Tray Agglutination Test (TAT).***

**Sperm Immobilization Test (SIT)**
(Isojima et Al., 1968)

Preparazione dell'antigene

- Stratificare, in provettine di piccolo calibro 300 µl di soluzione di Earle su 300 µl di liquido seminale di donatore, in toto (swim-up).
- Incubare per 30' a 37°C in termostato a $CO_2$ al 5% .
- Aspirare, al termine dell'incubazione, la soluzione di Earle e valutare la concentrazione degli spermatozoi mobili migrati dal liquido sottostante, portandola a 80.000.000 / ml.

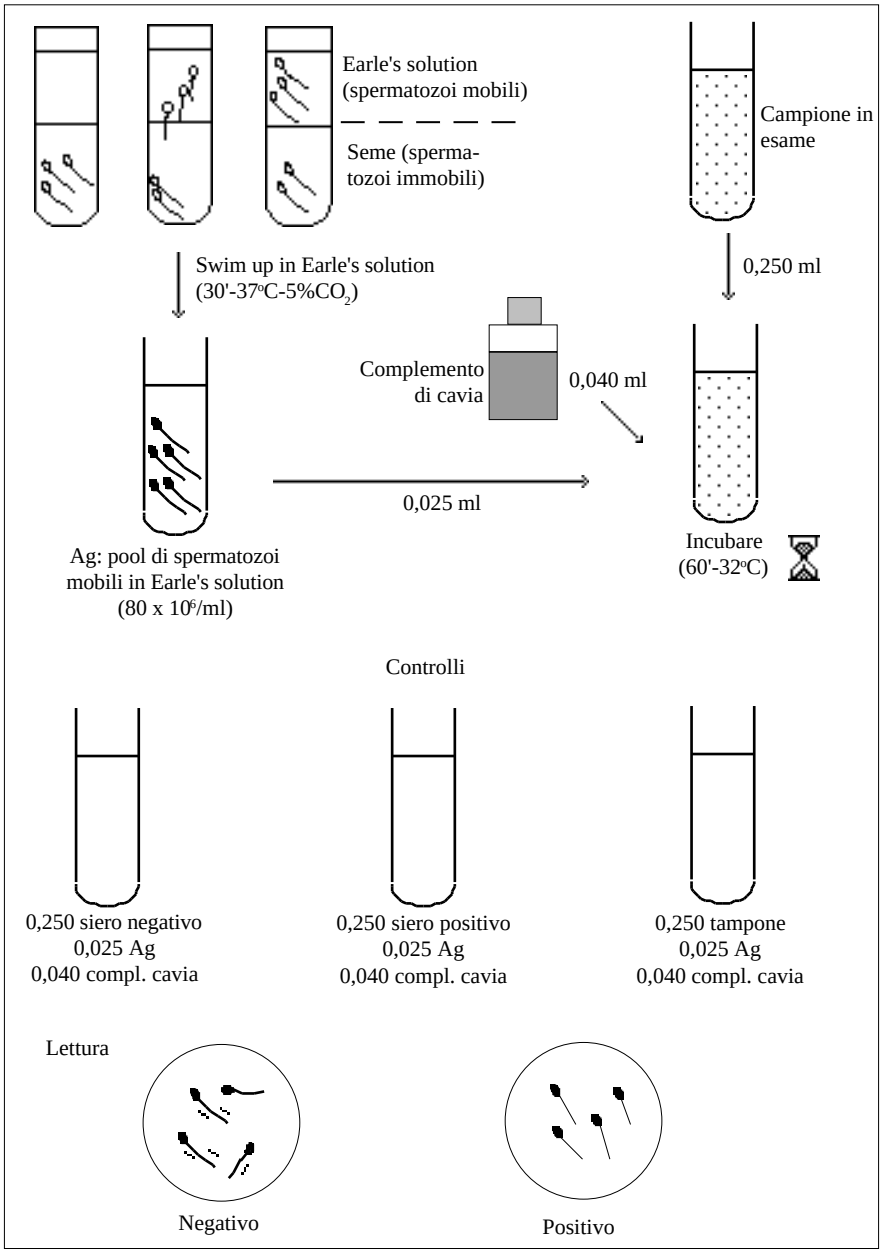
Esecuzione del test

- Mettere in una provettina 0,25 ml del campione da testare, 0,025 ml della sospensione antigenica e 0,04 ml di complemento di cavia.
- Incubare per 60' a 32°C.
- Osservare al microscopio una goccia del campione valutando la percentuale di motilità nemaspermica.

Contemporaneamente includere in ogni test, oltre ai controlli positivo e negativo, un terzo controllo per escludere un'attività spermioimmobilizzante del complemento usato.

Allestire per ogni test tre controlli:
- 0,25 ml di siero di controllo sicuramente negativo, 0,025 ml di antigene, 0,04 ml di complemento di cavia: fornisce la motilità a cui riferire i campioni da testare.
- 0,25 ml di siero di controllo sicuramente positivo, 0,025 ml di antigene, 0,04 ml di complemento di cavia: valuta l'effettiva efficacia del complemento.
- 0,25 ml di tampone di Baker, 0,025 ml di antigene, 0,04 ml di complemento di cavia: esclude un'attività spermioimmobilizzante del complemento.

Il test è considerato positivo quando il campione del paziente immobilizza più del 90% degli spermatozoi mobili del controllo negativo.




***Sperm Immobilitation Test.***

**Sperm Citotoxicity Test (SCT)**
(Jeffery et Al., 1972)

Preparazione dell'antigene

- Lavare due volte gli spermatozoi di donatore in tampone fosfato (pH 7,4) centrifugando a 1000 rpm per 10'.
- Portare la concentrazione degli spermatozoi lavati a 100.000.000 / ml in tampone fosfato.

Esecuzione del test

- Miscelare in una provettina 0,025 ml del campione da testare (siero e / o plasma seminale), 0,050 ml della soluzione di spermatozoi e 0,050 ml di complemento.
- Incubare per 30' a 37°C, quindi aggiungere 0,1 ml di complemento.
- Incubare per 60' a 37°C, quindi aggiungere 0,2 ml della soluzione colorante.
- Incubare per 30' a 37°C, quindi centrifugare a 1000 rpm per 10'.
- Strisciare il sedimento su vetrino, fissare alla fiamma e leggere al microscopio a 1000x. Contare su 200 elementi quanti spermatozoi si sono colorati (colore rosso mattone) e quanti non hanno assunto il colorante (appaiono completamente bianchi su un fondo rosso-arancione pallido).

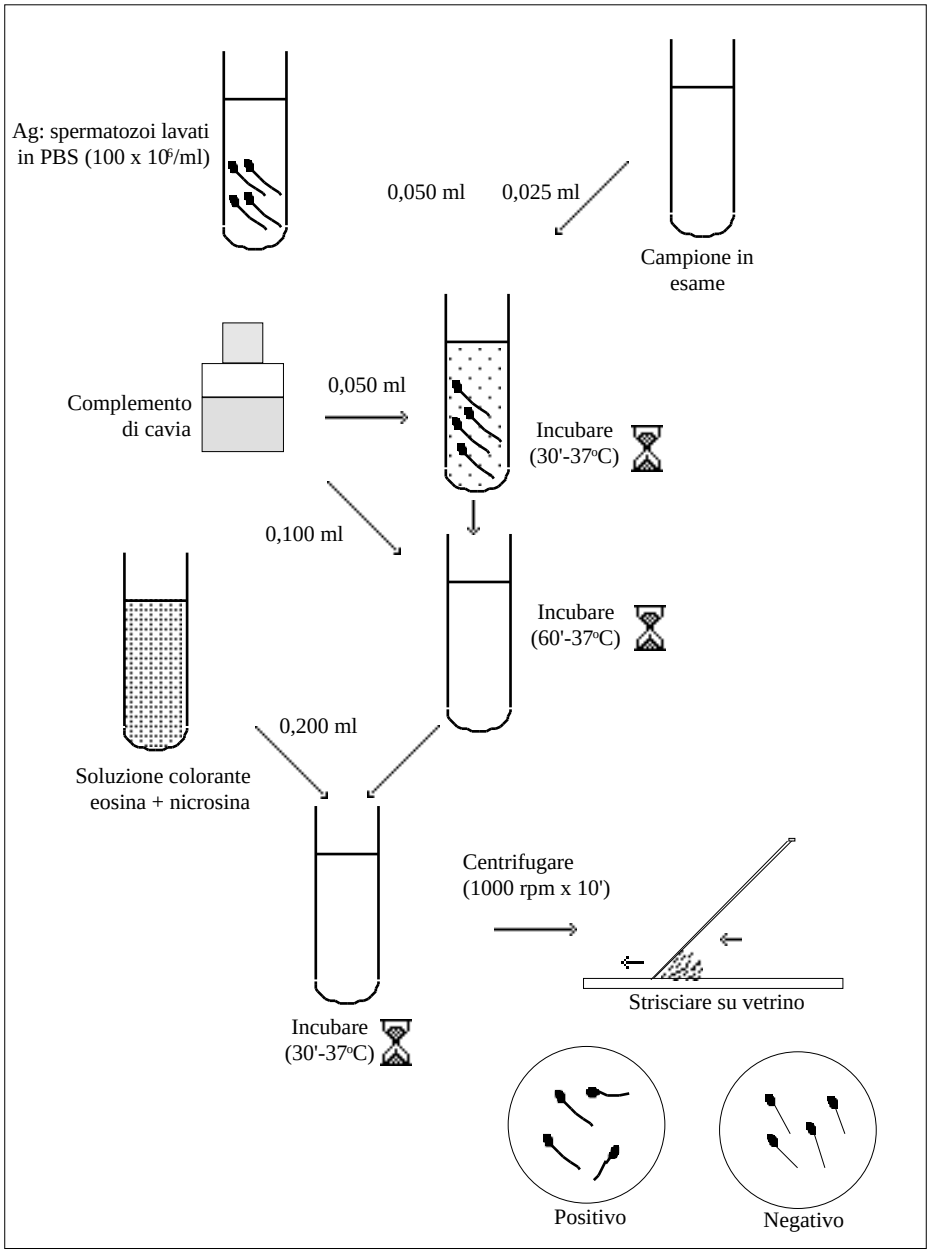
Includere anche in questa metodica oltre ai controlli positivo e negativo, un terzo controllo per escludere un'attività spermiocitotossica del complemento usato:

- 0,025 ml di soluzione fisiologica, 0,050 ml della soluzione di spermatozoi e 0,050 ml di complemento.

La fisiologica presenza di spermatozoi non vitali in un eiaculato normale spiega l'osservazione di spermatozoi colorati anche nel controllo negativo. Questo controllo permette quindi di valutare l'Indice di Spermiocitotossicità (ICT) dato dalla formula:

$$ICT = \frac{C - c}{100 - c}$$

dove C è la percentuale di spermatozoi colorati nel campione in esame e c è la percentuale di spermatozoi colorati nel controllo.
Il test è considerato positivo se l'ICT è maggiore o uguale a 50.



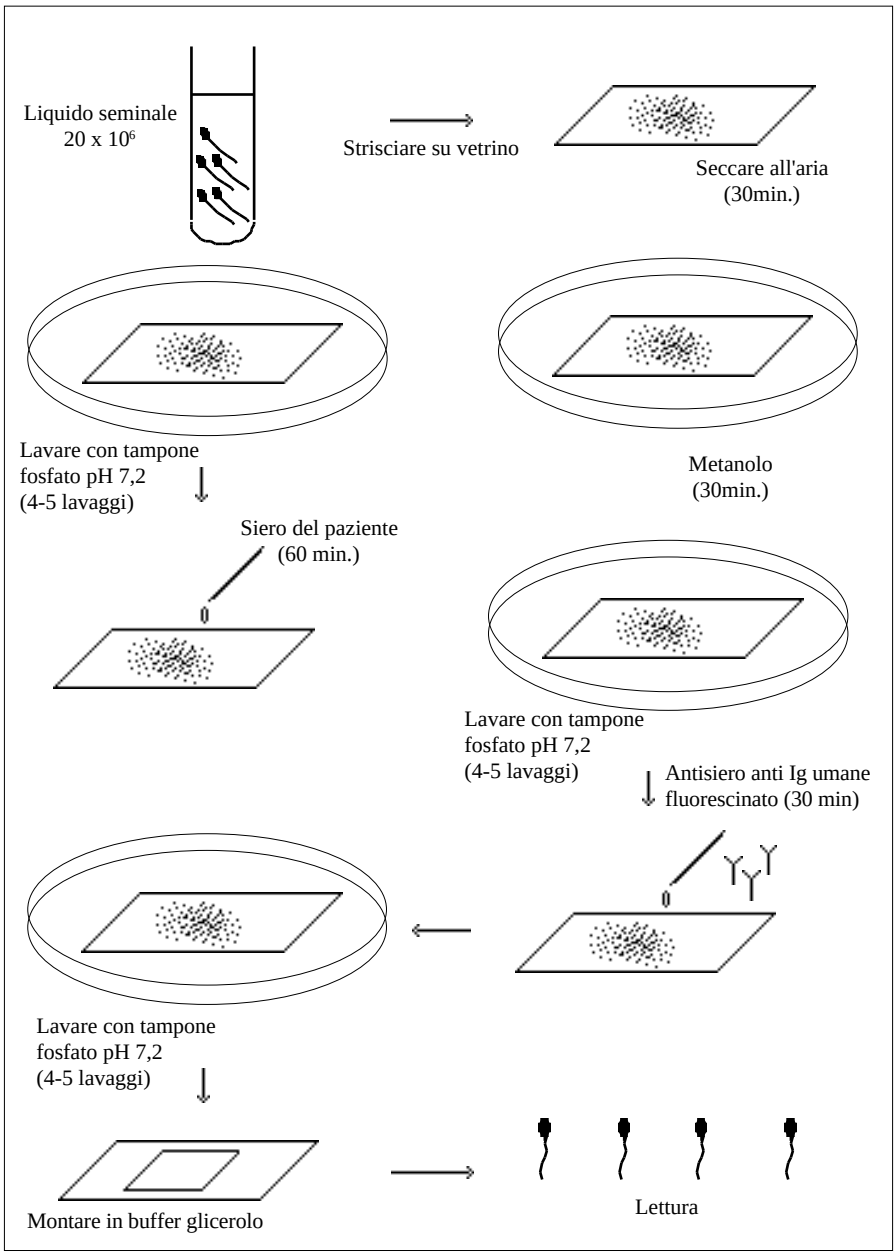

***Sperm Cytotoxicity Test.***

**Test dell'Immunofluorescenza (IF)**
(Hjort et Al., 1971)

- Per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo liberi nei campioni biologici in esame lavare il pool di spermatozoi (da donatore) utilizzati come antigene con tampone fosfato per 3 volte a 2000 rpm per 10'.
- Portare la sospensione di spermatozoi alla concentrazione di 20.000.000 / ml.
- Allestire strisci sottili su vetrini portaoggetto.
- Asciugare all'aria e fissare in metanolo.
- Eseguire 5 lavaggi di 3' ciascuno in tampone fosfato.
- Incubare per 60' a temperatura ambiente con il campione in esame.
- Eseguire 5 lavaggi in tampone fosfato.
- Incubare per 30' con l'antisiero fluorescinato.
- Eseguire 5 lavaggi in tampone fosfato.
- Montare su vetrino portaoggetto in buffer glicerolo.
- Leggere immediatamente al microscopio a fluorescenza.
- In parallelo eseguire tests con controlli positivi e negativi.

Qualora si voglia eseguire il test "direttamente" sugli spermatozoi del soggetto si prepara lo striscio con questi spermatozoi e si saltano i passaggi riferiti all'incubazione del campione in esame e successivi lavaggi.

Di recente Francavilla et Al. (1985) hanno riportato la possibilità di eseguire un test di immunofluorescenza "in sospensione" evitando così la fase di fissazione degli spermatozoi al vetrino.



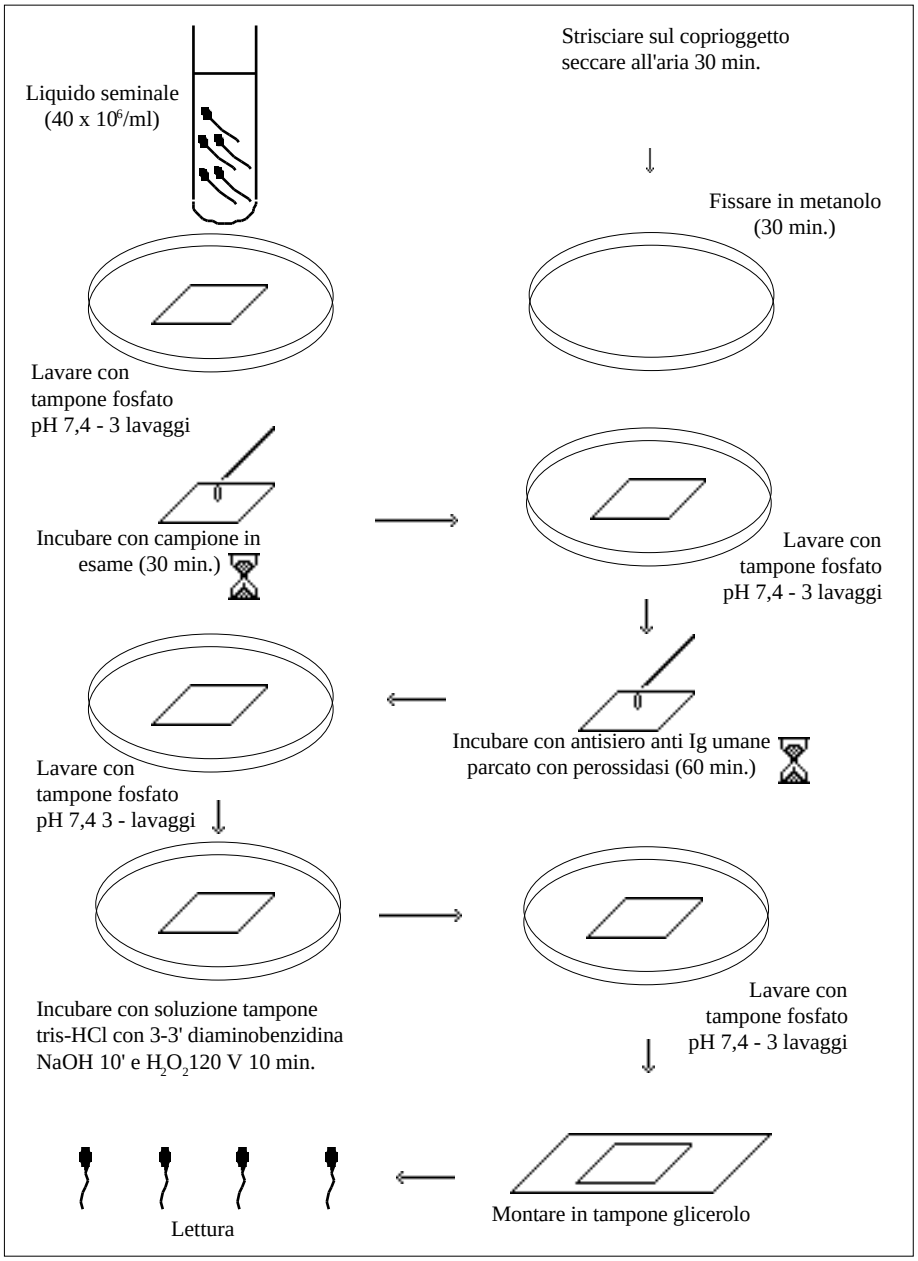

***Tecnica della immunofluorescenza.***

**Test dell'Immunoperossidasi (IP)**
(Storch et Al., 1971)

- Per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo liberi nei campioni biologici in esame lavare gli spermatozoi del donatore centrifugando per 3 volte in tampone fosfato a 1500 rpm per 10'.
- Portare la sospensione di spermatozoi alla concentrazione di 40.000.000 / ml.
- Allestire degli strisci sottili con il pool nemaspermico su vetrini coprioggetto.
- Seccare all'aria e fissare in metanolo per 30'.
- Eseguire 3 lavaggi per 5' in tampone fosfato
- Incubare con il campione in esame alla diluizione di 1:10, per 30'.
- Eseguire 3 lavaggi per 5' in tampone fosfato
- Incubare con antisiero anti-Ig coniugato con perossidasi per 60'.
- Eseguire 3 lavaggi per 5' in tampone fosfato
- Incubare i vetrini per 10' nella soluzione di colorazione istochimica specifica per la perossidasi secondo il metodo descritto da Graham e Karnovsy (1966) così costituita: 100 ml di tampone Tris-HCl 0,1M pH 7,4, in cui sono disciolti 50 mg di 3-3' diaminobenzidina, NaOH al 10% sino a pH 7,4 e 10 gtt di $H_2O_2$ a 120V.
- Eseguire 3 lavaggi per 5' in tampone fosfato
- Osservare al microscopio ottico; la positività è indicata da una colorazione bruna degli spermatozoi (acrosoma e / o zona equatoriale o spermatozoo in toto) indice della reazione tra l'anticorpo e l'anti-Ig marcata con perossidasi. Gli spermatozoi su cui la reazione non avviene restano bianchi "a stampo".
-Titolare con diluizioni scalari i campioni positivi.

Tutti i passaggi della metodica si svolgono a temperatura ambiente ed è necessario condurre parallelamente un test con un siero di controllo sicuramente negativo ed uno sicuramente positivo.

Questo consente, mediante un opportuno rapporto, di valutare la percentuale di positività dei singoli campioni testati. E' inoltre possibile differenziare le classi immunoglobuliniche responsabili della reazione antispermatozoo utilizzando antisieri anti-Ig marcati con le singole classi (IgG-IgA-IgM).



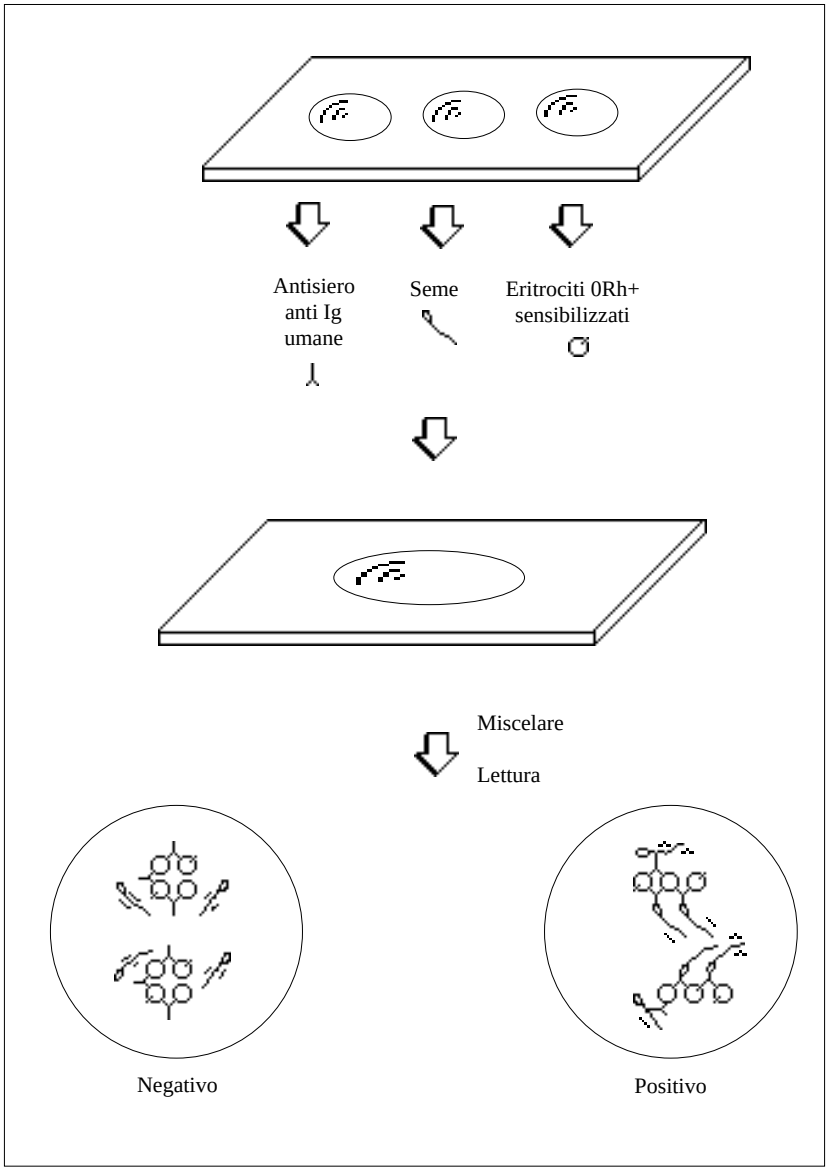

***Tecnica della immunoperossidasi.***

**Mixed Antiglobuin Reaction Test (MAR Test)**
(Coombs, Edwards e Rumke, 1973)

- Porre su di un vetrino portaoggetti, l'una vicina all'altra: 0,010 ml della sospensione di eritrociti 0 Rh+ sensibilizzati con antisiero anti-D incompleto, 0,010 ml di seme fresco, e 0,010 ml di antisiero anti-Ig umane.
- Miscelare delicatamente e coprire con un vetrino coprioggetti (24 x 32 mm).
- Valutare dopo pochi minuti (2'-5') al microscopio ottico, ingrandimento 400x, la percentuale di spermatozoi mobili adesi alle emazie ed il tipo di agglutinazione. Per una corretta interpretazione del test debbono essere contati almeno 100 spermatozoi mobili.

Si considerano positivi i campioni dotati di una percentuale di legame maggiore del 20% .

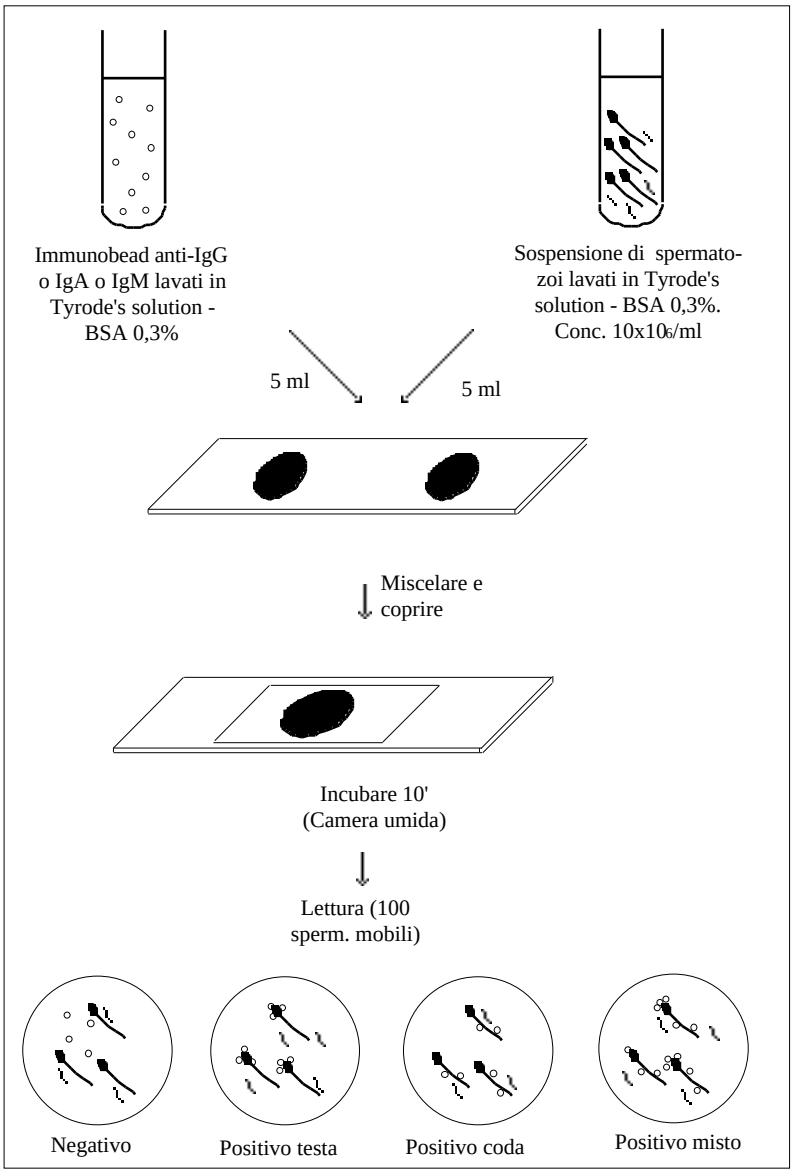
Il Mar test può essere utilizzato come test "indiretto" per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo nel siero, nel plasma seminale e nell'estratto di muco cervicale. In questo caso, ferme restando tutte le altre fasi della metodica, si procede ad una preincubazione (60' a 37°C) di pool di spermatozoi normali, da donatore, (seme in toto o spermatozoi separati per swim-up) utilizzati come antigene con il campione in esame alle varie diluizioni. Quindi si procede come per il test diretto.




***Mixed Antiglobulin Reaction Test Diretto (MAR-Test).***

**Immuno Bead Test diretto (IBT diretto)**
(Bronson et Al., 1981)

- Lavare gli immunobeads (anti-IgG,IgA,IgM) (Biorad Ltd) in Tyrode's Solution + 0,3% di BSA a 1800 rpm per 10'.
- Risospendere in Tyrode's Solution + 5% BSA.
- Porre in una provetta conica graduata un'aliquota di liquido seminale contenente 10.000.000 / ml di spermatozoi mobili.
- Portare a 5 ml con Tyrode's Solution + 0,3% BSA.
- Centrifugare per 10' a 1800 rpm.
- Risospendere il pellet nemaspermico in Tyrode's Solution + 5% BSA alla concentrazione di circa 10.000.000 di spermatozoi mobili / ml.
- Miscelare su un vetrino portaoggetti 5 µl della sospensione nemaspermica e 5 µl di immunobeads, quindi coprire con un vetrino coprioggetti (20 mm x 20 mm).
- Incubare per 10' a temperatura ambiente in camera umida.
- Leggere al microscopio ottico, a 400x; contare almeno 100 spermatozoi mobili valutando la percentuale di cellule che presentano beads adesi e la regione di reazione sulla superficie nemaspermica. Si considerano positivi i campioni dotati di una percentuale di legame maggiore del 20% .




***Immunobead test diretto.***

**Radio Immuno Binding Test Assay (RIBT)**
(Haas et Al. 1980)

Preparazione dell'antigene

- Utilizzare come Ag spermatozoi fissati in fase solida sul fondo di provette di polietilene, secondo quanto descritto da Stocker ed Heusser (1979):

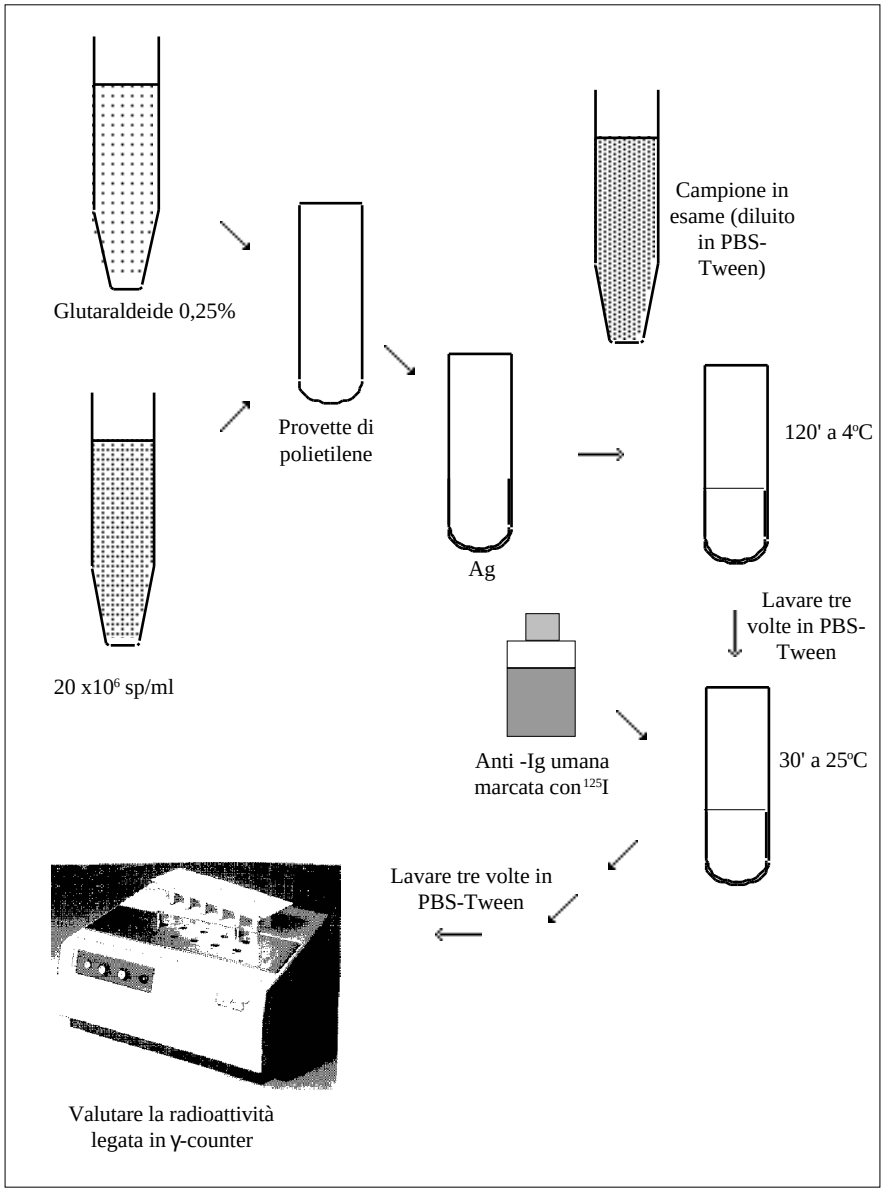
- Aliquote (300 µl di un pool di 20.000.000 di spermatozoi / ml di PBS) di 6.000.000 di spermatozoi di donatori sani fertili (gruppo sanguigno 0 Rh-) vengono fissate al fondo di provette di polietilene mediante glutaraldeide allo 0,25% in PBS; le provette vengono successivamente lavate con PBS-Tween (0,05% di Tween 20 in PBS).
- Le provette così allestite vengono lavate con PBS-Tween + 1% di siero bovino + 0,2 di $NaN_3$ + 1% di siero coniglio, per 30', al fine di eliminare il legame aspecifico delle proteine alla plastica, e quindi utilizzate immediatamente oppure conservate con questa soluzione a +4°C (possono essere conservate in questo modo anche fino a 10 giorni).

Esecuzione del test

- Incubare 100 µl del pool di spermatozoi in tubi da γ-counter con 100 µl del campione in esame (tale metodica viene applicata esclusivamente nel siero di sangue) alle varie diluizioni per 120' a 4°C.
- Eseguire 3 lavaggi con 1 ml di tampone fosfato a 2000 rpm per 10'.
- Aggiungere al sedimento dell'ultimo lavaggio 10 µl di antisiero anti-Ig umana o di coniglio marcato con $I^{125}$.
- Incubare per 30' a 25°C.
- Lavare 3 volte con 1 ml di tampone fosfato (pH 7,4).
- Aggiungere 100 µl di tampone fosfato al sedimento dell'ultimo lavaggio.
- Valutare la radioattività legata in cpm / 2'.

Tutti i tests vengono eseguiti in quadruplicato.La perdita di spermatozoi nei lavaggi deve essere inferiore al 15% per non dare differenze significative nei risultati del test. In parallelo al test eseguito sul campione in esame, vengono condotti tests di controllo con diluizioni progressive del siero iperimmune antispermatozoo di coniglio, con un siero umano sicuramente positivo e con uno sicuramente negativo. Ulteriori controlli sono effettuati incubando gli spermatozoi con soluzione fisiologica, quindi con il siero anti-Ig marcato per valutare il legame aspecifico o dovuto ad Ig legate in precedenza sugli spermatozoi del pool utilizzato come antigene .

La radioattività legata viene espressa come percentuale di cpm del campione studiato rispetto all'attività totale (cpm per 2' di 10 µl) di antisiero marcata.
Vengono considerati positivi i campione la cui radioattività legata risulta superiore a quella media + 2 DS.




***Tecnica radioimmunologica.***

**Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**
(Witkin et Al., 1981)

- Incubare con l'Ag nemaspermico (costituito da un pool di liquidi seminali di donatori alla concentrazione di 20.000.000 di spermatozoi / ml), per 120' a 25°C, progressive diluizioni del campione in esame (tale metodica viene applicata esclusivamente nel siero di sangue).
- Effettuare 3 lavaggi con PBS-Tween.
- Aggiungere 300 µl di siero anti-Ig umana di coniglio coniugata con fosfatasi alcalina ed incubare per 120' a 25°C.
- Effettuare 3 lavaggi con PBS-Tween.
- Aggiungere 300 µl di p-nitrofenilfosfato (1 mg / ml) in tampone di dietanolamina al 10% ed incubare per 60' a 25°C
- Aggiungere 75 µl di NaOH 3N per bloccare la reazione e determinare l'assorbanza della soluzione con uno spettrofotometro (400 nm).

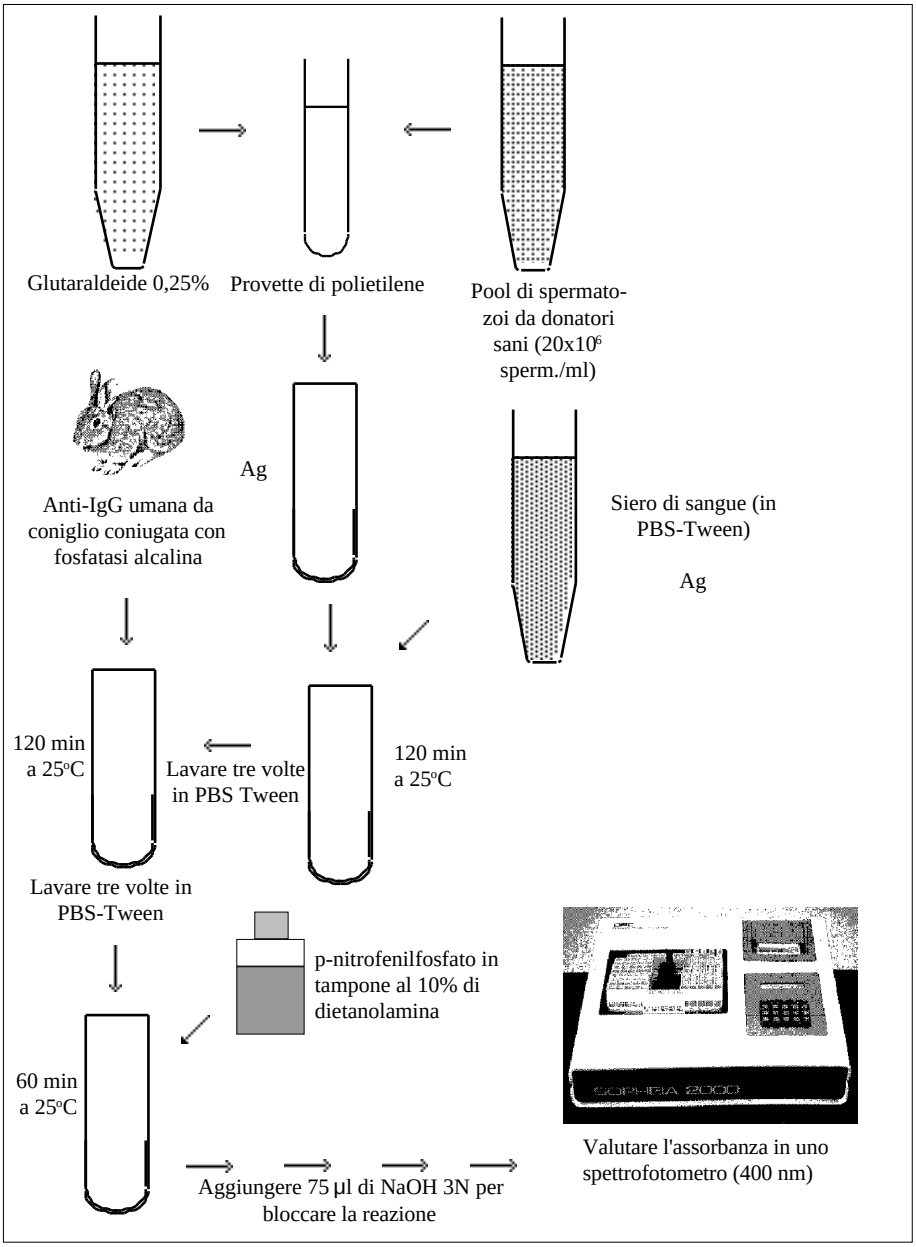
Per studiare gli anticorpi adesi sulla superficie degli spermatozoi si può utilizzare un test "diretto" usando per la preparazione dell'antigene gli spermatozoi del soggetto in esame e saltando i primi due passaggi della metodica sopradescritta.

I tests vengono sempre eseguiti in duplicato, in parallelo con sieri di controllo positivi e negativi. Variazioni dell'assorbanza dei tubi relativi allo stesso soggetto sono accettate solo se inferiori al 5% .

Come "bianco" vengono utilizzate provette con siero ma senza spermatozoi e con spermatozoi ma senza siero: la loro massima assorbanza, indice del legame aspecifico, viene sottratta ai valori relativi ai campioni in esame.

Vengono considerati positivi i campioni il cui valore finale di assorbanza (sottratto del valore dei bianchi e media dei valori del duplicato) sia superiore a quello medio + 2DS dei sieri di un gruppo di soggetti sani, fertili.

Le curve di diluizione dei campioni devono avere aspetto sigmoidale ed il punto finale di positività corrisponde all'ultima diluizione con un'assorbanza superiore al suddetto valore di controllo.




***Tecnica immunoenzimatica.***

# Bibliografia


Amann R.P., Howards S.S.: Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. J.Urol. 124:211, 1980.

Anderson DJ, Johnson PM: The monoclonal antibody 316 which recognizes polymorphic antigens expressed on human trophoblast also reacts with human testicular germ cells and capacitated sperm (Abstr.). Reprod Immunol (Suppl) 20:31, 1986.

Barratt C.L.R., Bolton A.E., Cooke I.D.: Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. Human Reprod. 5:639, 1990.

Boettcher B.: Immunological fertility control in the male: the clinical perspectives. In "Immunological factors in human reproduction", S. Shulman, F. Dondero, M. Nicotra (Eds). Academic Press, Londra, 1982. pag. 29

Bronson R.A., Cooper G.W., Rosenfeld D.L.: Ability of antibody- bound sperm to penetrate zona-free hamster ova in vitro. Fertil. Steril. 36:778, 1981.

Chang T-W: Familial allergic seminal vulvovaginitis. Am Obstet Gynecol 126:442, 1976.

Clark J.S., Clark D.A., Hendry W.F.: Antisperm antibodies detected by ZER enzyme-linked immunosorbent assay kit are not those detected by tray agglutination test. AJRIM 13:76, 1987.

Clarke G.N., Elliott P.J., Smaila C.: Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. AJRIM 7:118, 1985.

Coombs R.R.A., Rumke Ph, Edwards R.G.: Immunoglobulin classes reactive with spermatozoa in the serum and seminal plasma of vasectomized and infertile men. In Proceedings of the Second International Symposium held in Varna, Bulgaria, September 13 to 16, 1972. Bratano K., Vulchano V.H., Dico V., Somle B. (Eds). Sofia, Bulgarian Academy of Sciences Press, 1973. Pag. 354.

Crisanti A., La Pera G., Lenzi A., Gandini L., Dondero F., Spagnoli L., Di Silverio F.: Study on autoantigens of sperm cell surface: preliminary data on biochemical analysis. EOS, 4:274, 1988.

De Simone C., Caretto G., Grassi P.P., Covelli V., Lenzi A., Antonaci S., Jirillo E. Inhibition of lymphocyte-mediated activity by human seminal plasma. AJRIM, 17:1, 1988.

Dym M., Fawcett DW: The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous ephitelium. Biol Reprod 3:308, 1970.

Dondero F., Cerasaro M., Nicotra M., Coghi I.M.: Sperm antibody testing in infertility. Lancet 2:313, 1978.

Dondero F., Immunology of vasectomy. In: Shulman S., Dondero F. (Eds), Immunological Factors in Human Contraception, Field Educational Italia, Roma (1983), p. 194.

Dondero F., Cerasaro M.: Comparison between various methods for the detection of antisperm antibodies (GAT, TAT, CTAT, IgG-indirect MAR test) in blood serum and cervical mucus in controls and infertile women. Presented at 6th International Symposium on Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, May 30 to June 2, 1985.

El-Demiry, Hargreave T.B., Busuttil A., James K., Ritchie A.W.S., Chisholm G.D.: Lymphocyte sub-populations in the male genital tract. Br.J.Urol. 57:569, 1985.
Franklin R.R., Dukes C.D.: Antispermatozoal antibody and unexplained infertility. Am. J. Obstet. Gynecol. 6:89, 1964.
Friberg J.: A simple and sensitive micromethod for demonstration of sperm agglutinating in serum from infertile men and women. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 36 (Suppl.):21, 1974.
Friend DS, Gilula NB: Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. Cell Biol 53:758, 1972.
Fusi F., Bronson R.A.: Effects of incubation time in serum and capacitation on spermatozoal reactivity with antisperm antibodies. Fertil. Steril. 54:887, 1990.
Gandini L., Lenzi A., Lombardo F., Dondero F.: Radio immuno binding test for antisperm antibody detection: analysis and critical revision of various methodological steps. Andrologia, 1990, (in press).
Haas G.G. Jr, Cines D.B., Schreiber A.D.: Immunologic infertility: identification of patients with antisperm antibody. N.E.J.M. 303:722, 1980
Halpern BN, Ky T, Robert B: Clinical and immunological study of an exceptional case of reaginic type sensitization to human seminal fluid. Immunology 12:247, 1967.
Hinrichsen-Kohane A.C., Hinrichsen M.J., Schill W.B.: Molecular events leading to fertilization A review. Andrologia, 16:321, 1984.
Heller CH, Clermont Y: Kinetics of the germinal epithelium in man. Recent Prog Horm Res 20:545, 1964.
Hjort T., Hansen K.B.: Immunofluorescent studies on human spermatozoa. I. The detection of different spermatozoal antibodies and their occurrence in normal and infertile women. Clin. Exp. Immunol. 8:9, 1971.
Huckins C: The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal ephitelium. Anat.Rec. 190:905, 1978.
Isojima S., Li T., Ashitaka Y.: Immunological analysis of sperm immobilizing factor found in serum of women with unexplained infertility. Am. J. Obst. Gynec. 101:677, 1968.
Jeffery W., Parish W.E.: Allergic infertility: laboratory techniques to detect antispermatozoal antibodies. Clinical Allergy 2:261, 1972.
Jones R.C.: The nature of the barrier to autoimmunity in the excurrent ducts of the mammalian testes. In Immunological Influences on Human Fertility. B. Boettcher (Ed.). New York, Academic Press, p. 67, 1977.
Kibrick S., Belding D.L., Merrill B.: Methods for the detection of antibodies against mammalian spermatozoa. II. A gelatin agglutination test. Fertil. Steril. 3:430, 1952.
Kiser G.C., Alexander N.J., Fuchs E.F., Fulgham D.L.: In vitro immune absorption of antisperm antibodies with immunobead-rise, immunomagnetic, and immunocolumn separation techniques. Fertil. Steril. 47:466, 1987.
Kormana M., Reijonen K.: Microvascular structure of the human epididymis. Am. J. Anat. 145:23, 1976.
Landsteiner K.: Zur Kenntnis der spezifisch auf Blutkorperchen wirkend Sera. Zbl Bakt. 25:546, 1899.

Lenzi A., Gandini L., Claroni F., Dondero F.: Post vasectomy antisperm immune reaction after testosterone-induced azoospermia, Br. J. Urol. 5π:277, 1987.

Lenzi A., Gandini L., Claroni F., Lombardo F., Morrone S., Dondero F.: Immunological usefulness of semen manipulation for artificial insemination homologous (AIH) in subjects with antisperm antibodies bound to sperm surface. Andrologia, 20:314, 1988.

Lenzi A., Gandini L., Lombardo F., Alfano P., Anticoli Borza L., Morrone S., Dondero F.: Hypothesis on antigenic heterogeneity of human spermatozoa as identified with a cytofluorimetric system. In Biochemical Aspects on the Immunopathology of Reproduction. Spera G., Mukherjee A.B., Ravagnan G., Metafora S. (Eds). Acta Medica Edizioni e Congressi, 1989, p. 59.

Lenzi A., Gandini L., Lombardo F., Dondero F.: Sperm manipulation for assisted reproduction in immunological infertility: a physiological approach. Proc. X Congress of the American Society of Immunology of Reproduction. Chicago, 1990. AJRI, 1990.

Lippes J, Ogra S, Tomasi TB Jr, Tourville DR: Immunohistologichal localization of IgG, IgA, IgM secretory piece and lactoferrin in the human female genital tract. Contraception 1:163, 1970.

Lord E.M., Sensabaugh G.F., Stites D.P.: Immunosoppressive activity of human seminal plasma. I. Inhibition of in vitro lymphocyte activation. J. Immunol. 5:1074, 1977.

Marcus, Z.H., Dondero, F., Lunenfeld, B.: Hypothesis on antisperm immunization mechanism. EOS, VI:89, 1986.

Mc Clure R.D., Tom R.A., Watkins M., Murthy S.: SpermCheck: a simplified screening assay for immunological infertility. Fertil. Steril. 52:650, 1989.

Metafora S., Peluso G., Marchese M., Ravagnan G., Bossa F., Galdiero F., Tufano M.A., Porta R.: New properties, possible biological role and clinical relevance of an immunosuppressive and anti-inflammatory protein occuring in the rat seminal vescicle secretion. In Biochemical Aspects on the Immunopathology of Reproduction. G. Spera, A.B. Mukherjee, Ravagnan, Metafora S. (Eds). Acta Medica Edizioni e Congressi, 1989, p. 83.

Metalnikoff S.: Etudes sur la spermatoxine. Ann. Inst. Pansteur 14:577, 1900.

Metchnikoff E.: Etudes sur la resorption des cellules. Ann. Inst. Pasteur 13:737, 1899.

Mike N., Bird G., Asquith P.: A new manifestation of seminal fluid hypersensitivity. Quart. J. Med. 276:371, 1990.

Moghissi K.S.: Significance and prognostic value of post-coital test. In “The Uterine Cervix in Reproduction”. Insler V. and Bettendorf G. (Eds), Stuttgart, 1977, p. 237.

Myles D.C., Hyatt H., Primakoff P.: Binding of both acrosome-intact and acrosome reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. Dev. Biol. 121:559, 1987.

Naz R.K., Alexander N.J., Isahakia M., Hamilton M.S.: Monoclonal antibody to a human germ cell membrane glycoprotein that inhibits fertilization. Science 225:342, 1984.

Ohman J.L.Jr, Malkiel S., Lewis S., Lorusso J.R.: Allergy to human seminal fluid: characterization of the allergen and experience with immunotherapy. J. Allergy Clin. Immunol. 85:103, 1990.

Ohno S., Nagai Y, Ciccarese S., Iwata H.: Testis organizing H-Y antigen and the primary sex determining mechanism of mammals. Rec. Progr. Horm. Res. 35:449, 1979.
O'Rand M.G., Irons G., Porter J.P.: Monoclonal antibodies to rabbit sperm autoantigens: I. Inhibition of in vitro fertilization and localization on the egg. Biol. Reprod. 30:721, 1984.
O'Rand M.G., Irons G., Porter J.P.: Monoclonal antibodies to rabbit sperm autoantigens: II. Inhibition of human sperm penetration of zona-free hamster eggs. Biol. Reprod. 30:731, 1984.
O'Rand M.G., Widgren E.E., Fisher S.J.: Characterization of a rabbit sperm membrane autoantigens, RSA, as a lectin-like zona binding protein. Dev. Biol. 129:231, 1988.
Overstreet JW: Human sperm function: acquisition in the male and expression in the female. In Male Reproductive Function, Edited by R Santen, R◊ Swerdloff. New York, Marcel Dekker, Inc., 1986, p 29.
Pitout M.J., Jordan J.H.: Partial purification of an antimitogenic factor from human semen. Int.J. Biochem. 7:149, 1976.
Primakoff P. Hyatt H., Myles D.C.: A role for the migrating sperm surface antigens PH-2 to guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. J. Cell. Biol. 101:2239, 1985.
Saji F., Ohashi K., Kato M., Negoro T., Tanizawa O.: Clinical evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for antisperm antibodies. Fertil. Steril. 50:644, 1988.
Shulman S., Hekman A.: Antibodies to spermatozoa. I. A new macroscopic agglutination technique for their detection, using immotile sperm. Clin. Exp. Immunol. 9:137, 1971.
Shulman S., Pretorius E., Keane T: Antibodies to spermatozoa: XI. The use of Immunobeads for the detection of sperm antibodies in serum. AJRIM, 9:62, 1985.
Shulman S.: Autoimmune aspects of human reproduction. In "Concepts in Immunopathology". Karger, Basilea, Vol. 2, 1985, p. 189.
Shulman S., Dondero F. (Eds): Current Trends in Immunolgy of Human Reproduction. EOS, Special Issue, 6, 1986.
Singer S.L., Lambert H., Cross N.L., Overstreet J.W.: Alteration of the human sperm surface during in vitro capacitation as assessed by lectin-induced agglutination. Gamete Res. 12:291, 1985.
Stites D.P., Erickson R.P.: Suppressive effect of seminal plasma on lymphocyte activation. Nature 235:727, 1975.
Storch H., Piskazeck K., Krishanan S.: Detection of sperm antibodies with peroxidase marked antibodies: a new method for the detection of immunological problems of infertility. Int. J. Fertil., 21:251, 1976.
Tung K.S.K., Unanue E.R., Dizon F.J.: Phatogenesis of experimental allergic orchitis II: the roles of antibodies. Immunol 106:1463, 1971.
Tung K.S.K.: Autoimmunity of the testis. In Immunological Aspects of Infertility and Fertility Regulation. D.S. Dhindsa and G.F.B. Schumacher (Eds), New York, Elsevier-North Holland, 1980, p. 33.
-Vermeulen L., Comhaire F.: Le test "MAR" aux particles de Latex, et le test spermotoxique selon Suominen: simplification et nouveautè dans l'arsenal du diagnostic immunologique. Contraception-Fertilité-Sexualitè 11 (Suppl.): 381, 1983.

WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen cervical Mucus Interaction, Concern press, Singapore, 1986.
Witkin S.S., Zelikovsky G., Good R.A., Day N.K.: Demonstration of 11S IgA antibody to spermatozoa in human seminal fluid. Clin. Exp. Immunol. 44:368, 1981.

# Indice


Istruzioni per gli Autori ..... pag. 2
Editoriale..... » 3
Introduzione..... » 5
Infertilità immunologica maschile ..... » 6
Antigeni seminali..... » 6
Patogenesi e clinica della reazione autoimmune antispermatozoo nell'uomo..... » 10
Diagnosi dell'autoimmunità antispermatozoo ..... » 15
Terapia dell'infertilità autoimmune anti-spermatozoo ..... » 20
Infertilità immunologica femminile..... » 22
Patogenesi della reazione isoimmune anti-spermatozoo..... » 22
Diagnosi dell'isoimmunizzazione anti-spermatozoo ..... » 26
Terapia dell'infertilità immunologica da isoanticorpi antispermatozoo..... » 28
Appendice..... » 29
Bibliografia ..... » 50
Indice ..... » 55
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio..... » 56
Caleidoscopio Letterario..... » 57
Caleidoscopio (Ed. Española)..... » 57
Tribuna Biologica e Medica ..... » 58
Migliorare Sempre!!!..... » 58

# Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La ß-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. **Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*****Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. **Guastella G., Cefalù E., Carmina M.:** ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. **Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.:** ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**
37. **Piantino P., Pecchio F.:** ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. **Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.:** ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. **Sommariva D., Branchi A.:** ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**

**40. Butturini U., Butturini A.:** ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
**41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.:** ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
**42. Palleschi G.:** ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
**43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.:** ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
**44. Fanetti G.:** ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
**45. Contu L., Arras M..:** ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
**46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.:** ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
**47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. :** ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
**48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. :** ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
**49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.:** ***L'immunologia del diabete mellito*****. Marzo '90.**
**50. Cappi F.:** ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio*****. Aprile '90.**
**51. Tortoli E., Simonetti M.T.:** ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
**52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.:** ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**
**53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.:** ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
**54. Goracci E., Goracci G.:** ***Gli allergo-acari*****. Agosto '90.**
**55. Rizzetto M.:** ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
**56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.:** ***Infezione da HIV-1:patogenesi ed allestimento di modelli animali*****. Ottobre '90.**
**57. La Vecchia C.** ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
**58. La Vecchia C.** ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbraio '91.**
**59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.:** ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
**60. Bedarida G., Lizioli A.:** ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
**61. Romano L.:** ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
**62. Dondero F. e Lenzi A.:** ***L'infertilità immunologica*****. Giugno '91.**

**Caleidoscopio**
***Rivista mensile di Medicina***
anno 9, numero 62

**Direttore Responsabile**
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. Fax e Modem (079) 270464

**Responsabile Commerciale**
Alessandra Pater

**Consulenti di Redazione**
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

**Segretaria di Direzione**
Fiorella Gaggero

**Servizio Abbonamenti**
Marisa Pasquali
Giuseppe Gambetta

**Editore**
**Medical Systems S.p.A.**
TECNOLOGIA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 802257.
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola-
Caleidoscopio letterario, Pandora, Tribuna Biologica e Medica,
The Medical Systems Voice.

**Stampa**
ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Giugno 1991
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)