



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Materno Infantili

Sezione di Ginecologia e Ostetricia

Direttore: Prof. Salvatore Dessole

**Dottorato di Ricerca in Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del
Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile**

Coordinatore: Prof. Salvatore Dessole

**ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE: VALUTAZIONE DELLA
MORFOLOGIA SECONDO LO "STRICT METHOD".**

Coordinatore e Tutor Dottorato di Ricerca:
Chiar.mo Prof. *Salvatore Dessole*

Tesi di Dottorato del

Dott. *Mario Melis*

XXI Ciclo
A.A. 2005/2006

SUMMARY

The World Health Organization in 1980 first published a *laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus* interaction in response to a growing need for the standardization of examination of human semen. As the field of andrology advanced, so the manual has been revised. The last (fourth) edition has been released in 1999 and it recommends the so called “strict criteria” to classify sperm morphology. This method allows a simplified classification of morphology that seems to correlate with clinical findings in assisted reproduction. This findings have been disputed indeed but till now we haven’t, in our opinion, a better way to define sperm morphology.

Despite this, the majority of labs are unable to follow these criteria. To define the role of morphology in male fertility could lead to a better use of assisted reproduction suggesting less invasive and expensive methods in some cases while allowing a direct passage to micromanipulation in other couples where evidence-based data show very low possibility of pregnancy passing through other ways.

The present study retrospectively compares sperm morphology with fertilization rate (FR) and pregnancy rate (PR) in two groups of couples submitted in a conventional IVF protocol. Our results seem to confirm the better FR and especially PR (31 vs. 3,6%) where normal sperm morphology was >14% using strict criteria. We hope there will be a prospective and larger cooperative study amongst many IVF centers to better define sperm characteristics involved in male fertility.



INTRODUZIONE

Il procreare umano coinvolge indiscutibilmente l'uomo in tutte le sue dimensioni: biologica, affettiva e spirituale.

L'attuale e sempre crescente "domanda terapeutica" di coppie sterili che si rivolgono ai centri per lo studio della riproduzione ha portato ad un notevole approfondimento delle conoscenze, riuscendo negli ultimi anni a dare risposte di speranza ai pazienti più difficili, come accadeva in caso di azoospermia, un tempo ritenuta irrisolvibile. È invece ormai da più di dieci anni che l'utilizzo di spermatozoi testicolari o addirittura di spermatidi (in caso di azoospermia ostruttiva, o secretiva con spermatogenesi focale o arresto maturativo) ha permesso di ottenere gravidanze con tecniche micromanipolative.

Tra i due versanti coinvolti nella procreazione, quello maschile è stato certamente il meno studiato, e perciò meno conosciuto nei suoi aspetti fisiopatologici.

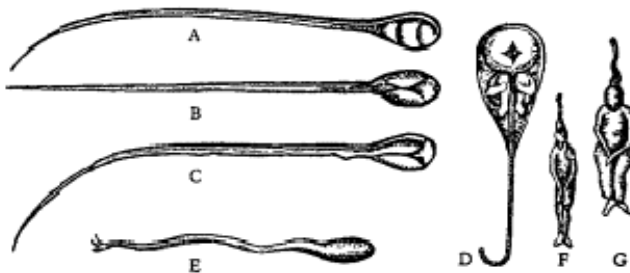
Si è infatti sempre ritenuta la donna "tradizionalmente" responsabile della sterilità, laddove è invece sempre più chiara una equa divisione delle "colpe": la sterilità è sempre un problema di coppia.

Il fatto poi che i casi di sterilità idiopatica siano la maggioranza, la dice lunga su quanto abbiamo ancora da imparare in materia.



PREMESSA

A partire dalla loro scoperta da parte di van Leeuwenhoek nel 1677 (3) e fino alla



Gli spermatozoi come furono visti nel XVII secolo: A,B,C, da Leeuwenhoek (1679), D, da Hartsoeker (1694), E, F, G, da Plantades (1699).

prima metà del '900, l'attenzione rivolta alle caratteristiche morfologiche degli spermatozoi è stata limitata. Gli studi si sono infatti focalizzati su questo aspetto della seminologia a partire dagli anni '40, con la scoperta di forme spermatozoarie patologiche (1,2). Tuttavia, a differenza di quanto ormai provato riguardo al numero ed alla motilità, l'importanza reale della morfologia spermatozoaria nel determinare la fertilità maschile, nonché il valore predittivo che essa riveste nella procedure di fecondazione assistita sono ancora lunghi dall'essere chiari (17,18,19), sebbene alcuni dati la indichino come il miglior indicatore della fertilità in vivo (*Toner et al., 1994; Ombelet et al., 1997*).



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo "strict method"*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

Nonostante alcune pubblicazioni riguardanti la fecondazione in vitro con iniezione intracitoplasmatica (ICSI) sembrano indicare che questa procedura non sia influenzata dalla morfologia degli spermatozoi (Sofokitis et al, AUA '95) e che quindi il “fattore maschile” dell’infertilità possa essere in qualche modo aggirato, nella routine della fecondazione assistita le caratteristiche del liquido seminale rimangono fondamentali.

A differenza della maggior parte del regno animale, in cui i campioni di seme rivelano una certa omogeneità morfologica, l’uomo fa parte di un ristretto numero di specie in cui gli spermatozoi presentano notevole eterogeneità morfologica. Questo ha reso pressoché fallimentari i tentativi di trovare una popolazione di riferimento definibile come biologicamente normale e tale da individuare un “gold standard” morfologico spermatozoario. A tutt’oggi non esistono chiari e standardizzati criteri di definizione dello spermatozoo “normale”.

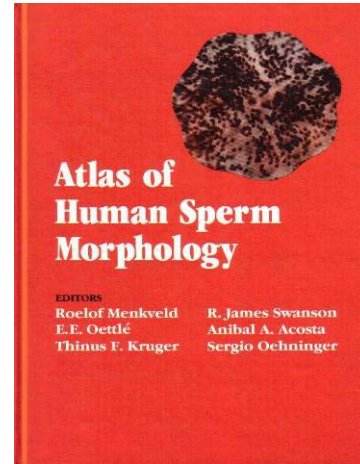
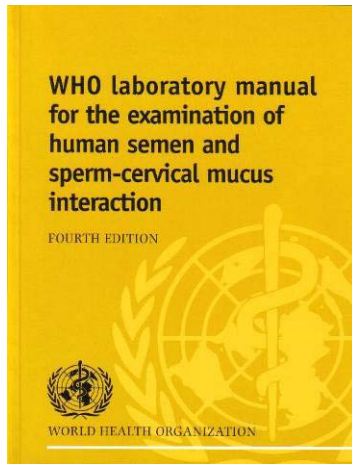
Già nel 1966 Freund riportava le notevoli divergenze nella valutazione morfologica riscontrate inter e intra laboratorio (3), e benché la valutazione dei parametri di laboratorio del liquido seminale abbia subito negli ultimi anni notevoli progressi (che hanno portato l’Organizzazione Mondiale della Sanità alla pubblicazione del manuale: “WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction”), la necessità di criteri di valutazione meglio definiti, che consentano maggiore accuratezza e riproducibilità, non è stata ancora del tutto superata. A questo proposito va sottolineato come i limiti, nelle varie edizioni del manuale WHO, siano passati dal 70 al 50 ed al 30% di morfologia normale sino a “consigliare” il nuovo limite del 15% nell’ultima pubblicazione. Infatti il limite precedente del 30%



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo “strict metod”*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

risulterebbe eccessivo rispetto ai criteri riportati da Kruger e coll (16) che ha abbassato tali limiti al 15%.



Seguendo i criteri di Kruger (“strict method”) solo nel 4,8% dei 121 liquidi da noi personalmente esaminati negli ultimi due anni le forme normali raggiungevano il 30% e siamo molto restii a considerare una incidenza di teratospermia del 95,2% nella nostra popolazione (pur trattandosi di pazienti affetti da sterilità di coppia).

I parametri utilizzati nel metodo “ristretto” di valutazione della morfologia seminale derivano dalla segnalazione (8,9) del riscontro di una popolazione di riferimento biologicamente selezionata negli spermatozoi recuperati dall’apparato riproduttivo femminile (muco cervicale post-coitale). In questo materiale gli spermatozoi presentano una insolita e quasi totale



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo “strict method”.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

omogeneità morfologica, che ne consente la inequivocabile descrizione.

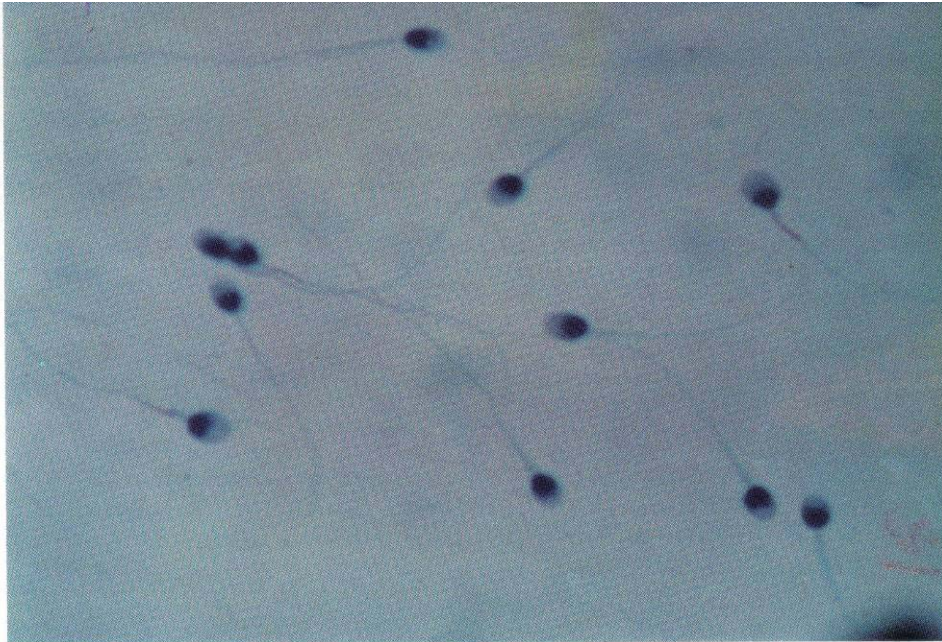


Figure 1.1 Spermatozoa as found in the upper endocervical canal mucus after intercourse, representing a morphologically normal reference population for the evaluation of sperm morphology. A few borderline (slightly amorphous) spermatozoa are also present (Papinacolaou Staining).

In uno studio (21) riguardante 52 coppie in cui era fallita la fecondazione in vitro, è emerso che dal 40% di questi fallimenti, inizialmente considerato inspiegato, si scende all'11% dopo aver effettuato un riesame morfologico secondo il metodo "ristretto". Infatti, pur essendo presenti anomalie seminali nel 40% dei partner maschili, i due eventi non si correlavano affatto, mentre le alterazioni morfologiche riscontrate dopo il riesame presentavano una correlazione coi 75% dei fallimenti.

I suddetti criteri sono stati utilizzati nel nostro studio allo scopo di valutare la presenza di correlazioni tra questa omogenea popolazione spermatozoaria di riferimento e la fertilità, con particolare riferimento alla fecondazione in vitro.



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo "strict method"*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

L'ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

Lo spermioγραμμα è l'esame di laboratorio basilare nella valutazione della fertilità maschile (13,18,19). Esso è infatti la risultante della funzione dell'apparato riproduttivo nelle sue componenti endocrina, spermiogenetica ed escretoria. Questo significa che uno spermioγραμμα nella norma consente di affermare che il soggetto in esame non presenta alterazioni di queste tre componenti.

Purtroppo ciò non è sinonimo di fertilità (13) ed è da proscrivere la pratica seguita da alcuni laboratori di definire il liquido seminale in esame come dotato o meno di capacità fertilizzante (ove si eccettui il caso di una azoospermia, e comunque riferito a quello specifico esame e non al paziente).

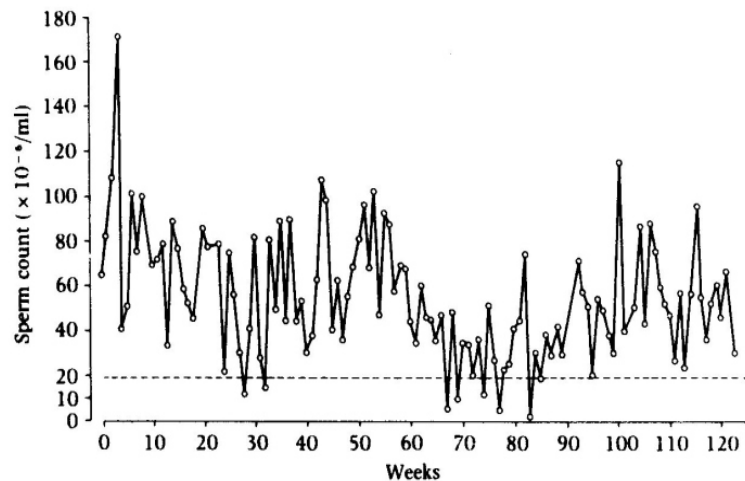
Vi sono infatti casi molto particolari, come pazienti affetti da ipogonadismo ipogonadotropo sottoposti ad opportuna terapia, che riescono ad ottenere gravidanze con un numero di spermatozoi post terapia dieci o venti volte inferiori alla norma (5). Inoltre è dimostrata una grande variabilità intraindividuale, tanto da portare, episodicamente, il numero degli spermatozoi di soggetti sicuramente fertili ben al di sotto dei limiti considerati normali (C.A. Paulsen, WHO 1987).



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo "strict method"*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

Fig. 2.1. Sperm concentrations in the semen of one man collected biweekly over 120 weeks. During this period the man received no medication and experienced no febrile illness. The dotted line indicates $20 \times 10^6/\text{ml}$ (see Appendix 1A). The data illustrate the marked variations in sperm concentration that can occur in the semen of some men. (Unpublished data from C.A. Paulsen.)



Il concetto basilare che deve sempre essere presente nell'interpretazione dello spermiogramma è che si tratta di una valutazione in vitro e che pertanto le caratteristiche che vengono rilevate possono non corrispondere alle reali condizioni in vivo nel tratto genitale femminile.

Anche riguardo ai test funzionali (14), che studiano le capacità dello spermatozoo necessarie alla fecondazione (cioè raggiungere il sito della cellula uovo, subire la capacitazione e la reazione acrosomiale, legarsi alla zona pellucida, fondersi con l'oolemma e venire incorporati nell'ooplasma, decondensarsi del nucleo ed ottenere la fecondazione in senso stretto, cioè la fusione dei due pronuclei) si può a tutt'oggi affermare che nessuno di essi si è dimostrato veramente dotato di reale capacità predittiva sulla fertilità maschile.

Ciò detto, è pur vero che nei vari laboratori bisogna parlare lo stesso linguaggio, pur suscettibile di correzioni ed evoluzione, ed è apprezzabile in questo senso lo sforzo effettuato dall'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS-WHO) nel redigere ben quattro edizioni di linee guida dal 1980 al 1999 nel *"WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction"*.



Poiché è esperienza comune la visione di spermioigrammi non affidabili (14), riteniamo che al suddetto manuale debbano fare riferimento i laboratori che si prendano l'onere di valutare il liquido seminale.

Per evitare che l'esame sia inficiato in partenza, occorre istruire il paziente sulla necessità di rispettare il periodo di astinenza (poiché su di esso si basano i limiti di normalità), eseguire una raccolta completa effettuando anche una *spremitura dell'uretra*, utilizzare contenitori adeguati evitando l'uso di condom o il coito interrotto, far pervenire il campione al laboratorio entro 30' evitando shock termici (temperatura corporea) riferendo inoltre eventuali terapie e malattie (in particolare con iperpiressia) intercorse negli ultimi tre mesi. Infine i risultati devono essere confermati in due esami successivi raccolti in un intervallo compreso tra una settimana e tre mesi ed un terzo campione deve essere raccolto dopo tre mesi dal primo per avere una popolazione spermatica totalmente nuova (essendo circa 75 giorni il tempo di maturazione delle cellule germinali maschili).

Nonostante tutti i problemi e le incertezze, nel 90% dei casi lo spermioigramma fornisce ragione delle infertilità maschili, mentre circa il 10% della popolazione maschile che consulta il laboratorio per infertilità ha un esame normale secondo i parametri del WHO.



MATERIALI E METODI

Da un gruppo di 157 coppie sterili inserite in un programma di fecondazione in vitro convenzionale (FIVET), abbiamo selezionato 43 pazienti di età media $36,5 \pm 3$ anni. Tutti i pazienti presentavano normali parametri seminologici secondo i criteri del WHO 1999. Nessuno dei pazienti, sottoposto a visita andrologica, ecocolordoppler scrotale, vescicale e prostato-vescicolare nonché dosaggio ormonale di LH, FSH, PRL, Testosterone libero e totale ed estradiolo presentava patologie dell'apparato genitale.

I liquidi seminali sono stati sottoposti retrospettivamente a valutazione della morfologia spermatozoaria secondo Kruger.

Le valutazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il X^2 test. Le caratteristiche morfologiche sono state osservate al MO ad immersione a 1000X utilizzando dei vetrini precolorati (Testsimplets, Boheringer Mannheim) che hanno consentito la assoluta riproducibilità e l'assenza di artefatti da striscio. Nella preparazione del vetrino è stata considerata la concentrazione spermatozoaria per evitare errori da "sovraffollamento" (più di 10 spermatozoi PCM). Sono state quindi contate almeno 200 cellule (conta ripetuta nei casi dubbi). L'indisponibilità iniziale di un oculare micrometrico ha reso necessario tralasciare la valutazione precisa delle dimensioni cellulari, ma controlli successivi hanno dimostrato sufficientemente affidabile la valutazione soggettiva delle dimensioni relative (dopo adeguato training) da parte dello stesso esaminatore (coefficiente di correlazione di Spearman intra-osservatore=0.96 – $p < 0.0001$).



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo "strict method"*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

Gli spermatozoi sono stati definiti normali quando presentavano le seguenti caratteristiche:

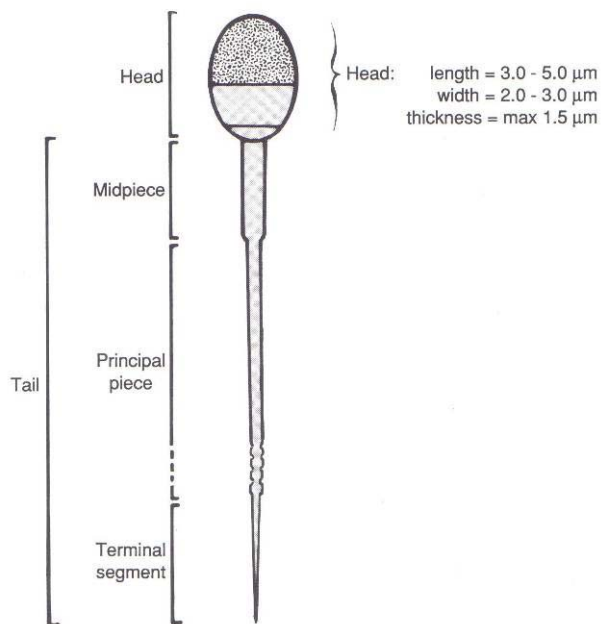


Figure A.I.I. Schematic drawing of a normal spermatozoon with Papanicolaou staining and measurements.



- 1) Testa regolarmente ovale con ben definito acrosoma occupante dal 40 al 70% della superficie cefalica. Una leggerissima diminuzione del diametro retroacrosomiale è stata accettata ma, a differenza di altri metodi (4,6), abbiamo considerato i "borderline normal" del WHO come "slightly abnormal";



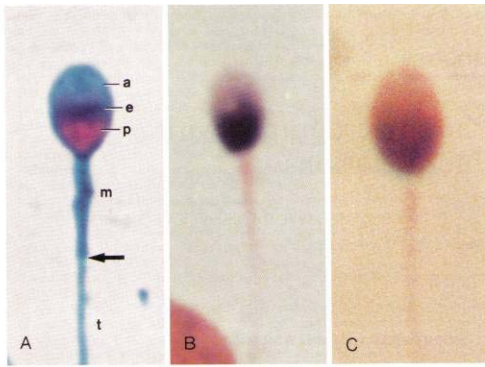


Figure 3.1. Morphologically normal spermatozoa. A. Staining characteristics with Spermac stain. The nuclear portion of the head stains red; the acrosome, midpiece, and tail stain green. In sperm in which the acrosome is intact, the only part that stains red is the postacrosomal region of the head. Note the acrosome (a), equatorial region of the acrosome (e), postacrosomal region of the head (p), midpiece (m), and tail (t). The junction between midpiece and tail is shown by the arrow. B. Staining characteristics with Papanicolaou stain: Acrosome stains light blue, postacrosomal region of the head dark blue, and midpiece and tail green or red. Morphologically normal sperm. C. Staining characteristics with Diff-Quik stain: acrosomal region exhibits a pale purple color, the postacrosomal region, midpiece, and tail a dark purple.

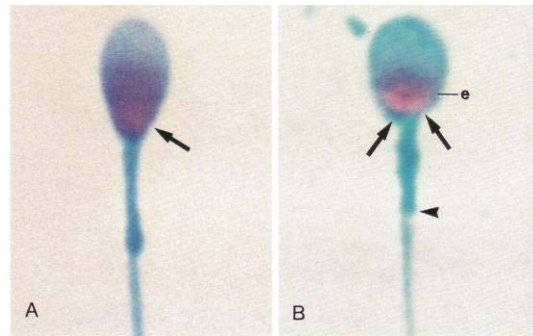


Figure 3.2. Borderline forms. A. Postacrosomal narrowing. The sperm is narrowed, especially in the postacrosomal region of the head (arrow) but not enough to be classified as pyriform. The slight irregularity in the midpiece is within normal range. Classification: Slightly amorphous. B. Slight loss of shape. The sperm shows a slight loss of oval shape, and the acrosome extends to the limits of normal, namely, two-thirds the length of the head. The distal limit of the equatorial region is shown (e). There is also a slightly abaxial implantation of the midpiece. This is accentuated by the nonsymmetrical head base; the right side is flattened, and the left side is curved (arrows). Note that the midpiece is slightly shorter than normal; the junction between the midpiece and tail is shown by the arrowhead. Classification: Slightly amorphous.

- 2) Assenza di anomalie del collo, del tratto intermedio o della coda. Il tratto intermedio doveva essere situato assialmente e della lunghezza di circa 1,5 volte quella della testa e la coda doveva essere uniforme, leggermente più sottile del tratto intermedio e non presentare angolature o avvolgimenti;
- 3) Assenza di gocce citoplasmatiche di dimensioni maggiori della metà della superficie cefalica.



RISULTATI

La valutazione delle caratteristiche morfologiche spermatiche ha consentito la suddivisione dei pazienti in due gruppi. Il primo (gruppo 1: 17 pz) presentava caratteristiche morfologiche normali in una percentuale dello 0-14%, mentre nel secondo (gruppo 2: 26 pz) la percentuale variava tra il 15 ed il 30%.

Non è stato possibile creare, perché troppo esiguo, un gruppo della morfologia normale >30% e gli unici due pazienti sono stati inclusi nel secondo gruppo.

Nessuna differenza significativa è emersa tra l'età media dei due gruppi.

In 21 coppie del secondo gruppo (80,7%)* è stato individuato un fattore femminile di sterilità, mentre ciò è stato possibile solo in 6 delle 17 coppie del primo (35,3%)*.

Con il liquido seminale preparato appartenente ai pazienti del gruppo 1 sono state ottenute 56 fecondazioni su 136 ovociti utilizzati, con una Fertilization Rate (FR) del 41% ed una Pregnancy Rate (PR) del 3,6%.

Con il liquido seminale preparato appartenente ai pazienti del gruppo 2 sono stati fecondati 160 ovociti su 189 recuperati (FR=84,6%), con una PR del 31%.

	OVOCITI TOTALI	FECONDAZIONI	FR	PR
Gruppo 1 (0-14%)	136	56	41%*	3,6%*
Gruppo 2 (>15%)	189	160	84,6%*	31%*

* p<0,0001



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo "strict metod"*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

DISCUSSIONE

Sebbene vi siano dati contrastanti riguardo l'importanza dei parametri morfologici ristretti nella fecondazione naturale, nella intrauterina e nel confronto tra FIVET con o senza ICSI (17), i nostri risultati sembrano comunque confermare la possibile utilità predittiva di questi parametri nelle procedure di fecondazione in vitro, laddove, cioè siano stati rimossi la maggior parte degli ostacoli posti dalla natura allo spermatozoo nel suo percorso verso la cellula uovo ed il suo materiale genetico.

D'altronde, neanche il metodo classico di valutazione della morfologia sembrerebbe essere di particolare significato nella fecondazione naturale (17).

Peraltro vi sono dei riscontri di laboratorio ottenuti utilizzando la SPA (Sperm Penetration Assay) e la HZA (Hemyzona Assay) che sembrano indicare una buona correlazione col Kruger strict metod (16, 7, 9).

Riteniamo degna di nota la notevole incidenza del fattore femminile (ormonale, cervicale e soprattutto tubarico) nel secondo gruppo di coppie (80% contro IL 35% de3l gruppo 1). Il suo significato è di difficile interpretazione, ma se da un lato potrebbe essere considerato un fattore di disturbo dei risultati (poiché è ben noto che la FIVET è molto più efficiente nei casi in cui sia presente un fattore femminile rispetto a quelli in cui prevalga quello maschile), dall'altro potrebbe essere invece interpretato come una conseguenza della selezione da noi effettuata.

Infatti, suddividendo i due gruppi, laddove il fattore maschile fosse meno importante, emergerebbe, ovviamente, quello femminile. Ma ciò confermerebbe la significatività della



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo "strict metod".*

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

divergenze morfologiche riscontrate secondo lo “strict metod”, essendo l’unica differenza tra i due gruppi.

Riteniamo pertanto opportuno ampliare l’applicazione dei criteri “ristretti”, se non addirittura applicarlo alla routine seminologica, almeno nei centri che si occupano attivamente di fecondazione assistita.

È comunque da notare la necessità di studi prospettici che diano una risposta più attendibile al quesito morfologico, poiché da essa possono emergere linee guida riguardo l’utilizzo o meno di diverse tecniche di fecondazione assistita a seconda del quadro morfologico spermatozoario, magari limitando l’indiscriminato utilizzo di tecniche micromanipolative comportanti maggior lavoro per i tecnici addetti e maggiori spese per le coppie sterili ed il sistema sanitario.



BIBLIOGRAFIA

1. **Comahaire FH, Farley TMM, Rowe PJ**, *The infertile couple. Definition and standards*. In Andrology and Human Reproduction (Negro-Vilar et al, eds) Serono Symposia, vol 47, Raven Press, New York: 191-201, 1988.
2. **Beretta D, Buscaglia M**, *Riproduzione e Ambiente: Analisi dei metodi di studio e degli effetti delle sostanze chimiche sulla funzione riproduttiva*. Cofese Eds., Palermo 1990.
Foresta C, Ferlin A, Giorgino FL, Lenzi A, Mantovani A: *La riproduzione umana e le influenze ambientali*. Coop. Libreria Editrice Università di Padova, 2006.
3. **Küss R, Grégoir W**, *Storia illustrata dell'urologia dall'antichità ai giorni nostri*. Editiemme srl, Milano, 1989
4. **Huckins C, Meacham RB**, *Spermatogenesis in the adult: characteristics, kinetics and control*. In Infertility in the male (Lipshultz LI, Howards SS, eds), Mosby Year Book, St Louis: 84-102, 1991.
5. **Bashin S**, *Androgen treatment of hypogonadal men*. J Clin Endocrinol Metab, 74: 1221-1225, 1992.
6. **Baker HVG**, *Development of clinical trials in male infertility research*. In Perspectives in Andrology (Serio M ed) Raven Press, New York: 367-380, 1989.
7. **Krause W, Holland Moritz H, Schramm P**, *Treatment of Idiopathic oligozoospermia with tamoxifen: a randomized controlled study*. Intern J Androl, 15: 14-19, 1992



8. **Mc Clure RD, Hricak H**, *Scrotal ultrasound in the infertile man: detection of subclinical unilateral and bilateral varicoceles*. J Urol, 135: 711-715,1986.
9. **Winters SJ**, *Evaluation and medical management of male infertility*. In Infertility. A Comprehensive approach (Seibel MM ed) Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1990.
10. **Melis GB, Strigini F, Mais V et al**, *Critical reappraisal of the clinical effectiveness of different methods of assisted fertilization*. J Endocrinol Invest, 13: 263-274, 1990.
11. **Acosta AA, Oehninger S, Morshedi M et al**, *Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of the male factor*. Obst and Gynec Surv, 44: 1-18, 1988
12. **Seibel MM (ed)**, *infertility. A comprehensive approach*. Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1990.
13. **Silber SJ**, *The relationship of abnormal semens values to pregnancy outcome*. In infertility a comprehensive text, (Seibel MM ed) Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1990.
14. **World Health Organisation**, *Who laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, (Fourth ed), Cambridge University Pr **W.Ombelet et al.**, *Results of a questionnaire on sperm morphology assessment* Human Repr, 12:1015–1020, 1997ess, 1999
15. **Fish H and Lipshultz LI**, *Advanced sperm function testing*. Current Opinion in Urol, 1: 156-159, 1991.
16. **Kruger TF, Acosta AA**, *Predictive value of abnormal sperm morphology in In Vitro Fertilization*. Fertil Steril, 49: 112-117, 1988.



Mario Melis, *Esame del liquido seminale: valutazione della morfologia secondo lo "strict metod"*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile, Università degli Studi di Sassari;

17. **Check JH, Press M, Bollendorf A. Blue T**, *Evaluation of the Kruger Strict Method for sperm morphology in predicting infertile males*. Prog Reprod Biol Basel, (Karger ed), 15: 78-74, 1992.
- Check ML, Bollendorf A, Check JH, Katsoff D**, *Reevaluation of the clinical importance of evaluation sperm morphology using strict criteria*. Archives of andrology, 48: 1-3, 2002.
- Check et al.**, *A retrospective comparison of pregnancy outcome following conventional oocyte insemination vs intracytoplasmic sperm injection for isolated abnormalities in sperm morphology using strict criteria*. J Androl, Vol 28, No 4, 2007.
18. **Silber SJ**, *The relationship of abnormal semen parameters to male fertility*. Hum Reprod 4, 8: 947-953, 1989.
19. **Osegbe DN, Amaku EO**, *Semen features of 596 truly infertile men*. Eur Urol, 13: 169-173, 1987.
20. **Close CE, Roberts PL and Berger RE**, *Cigarettes, alcohol and marijuana are related to biospermia in infertile men*. J Urol, 144: 903, 1990.
21. **Oehninger S, Acosta AA, Kruger TF et al**, *Failure of fertilization in vitro fertilization: the "occult" male factor*. J In Vitro Fert Embryo Transfer, 5: 181, 1988.

