

## Appendice I. A

### Valori normali delle variabili seminali

Come per ogni indagine, sarebbe preferibile che ciascun laboratorio stabilisse i propri ranges di normalità. Per determinare i limiti di normalità dei parametri seminali si dovrebbero valutare i campioni di uomini che abbiano ottenuto da breve tempo una gravidanza, preferibilmente entro 12 mesi dal momento in cui la partner abbia cessato di usare metodi contraccettivi.

Molto spesso risulta difficile reperire un numero ragionevole di tali soggetti (da 50 a 100) e conviene quindi riferirsi ad ampi studi condotti da altri laboratori. Sebbene molti di questi studi siano stati effettuati su numerosi soggetti, normalmente non viene comunque considerato il tempo intercorso prima di ottenere la gravidanza.

Ad oggi non si sono riscontrate differenze significative che possano indicare l'influenza di fattori razziali sui livelli minimi di normalità.

Per un campione seminale vengono comunemente usati i seguenti criteri di normalità:

Volume	2,0 ml o più
pH	7,2-7,8
Concentrazione degli spermatozoi	20 x 10 <sup>6</sup> spermatozoi/ml o più
Numero totale di spermatozoi	40 x 10 <sup>6</sup> spermatozoi o più
Motilità	50% o più con motilità progressiva (categorie (a) e (b); Sezione 2.4.2) o 25% o più con progressione rapida lineare (categoria (a)) entro 60 minuti dalla raccolta
Morfologia	50% o più con normale morfologia
Vitalità	50% vivi o più, cioè non permeabili al colorante
Leucociti	meno di 1 x 10 <sup>6</sup> /ml
Zinco (totale)	2,4 µmol o più per eiaculato
Acido citrico (totale)	52 µmol (10 mg) o più per eiaculato
Fruttosio (totale)	13 µmol o più per eiaculato
MAR test	meno del 10% di spermatozoi con particelle adese
Test con immunobeads	meno del 10% di spermatozoi con beads adese

## Appendice I. B

### *Nomenclatura di alcune variabili seminali*

Dato che risulta spesso difficile descrivere con nomi e numeri tutte le possibili alterazioni delle normali variabili seminali, è stata introdotta una nomenclatura per poter indicare il tipo di alterazione in discussione (Eliasson *et al.*, 1970). E' importante precisare che questa nomenclatura si riferisce solo ad alcune variabili seminali e non implica nessuna relazione con la causa. Tenendo presente questa precisazione, la nomenclatura può essere usata come segue:

Normozoospermia	Eiaculato normale come precedentemente definito
Oligozoospermia	Concentrazione di spermatozoi inferiore a $20 \times 10^6/\text{ml}$
Astenozoospermia	Meno del 50% di spermatozoi con motilità progressiva (categorie (a) e (b)) o meno del 25% di spermatozoi con movimenti di categoria (a) (vedi Sezione 2.4.2)
Teratozoospermia	Meno del 50% di spermatozoi con normale morfologia
Oligoastenoteratozoospermia	Indica alterazioni di tutte e tre le variabili (si possono usare anche combinazioni di due soli variabili)
Azoospermia	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato
Aspermia	Assenza di eiaculato

## Appendice II

### *Rilevazione dell'attività perossidasi con il blu di orto-toluidina*

(Nahoum e Cardozo, 1980)

#### II.1 Reagenti

- (1) Soluzione satura di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (25g/100 ml).
- (2)  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 5% (v/v) in tampone fosfato (pH 6,0).
- (3) Orto-toluidina\*, 0,025% (v/v).
- (4)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30% (v/v) in acqua distillata.

La soluzione di lavoro consiste di: 1 ml del reagente (1); 1 ml del reagente (2); 9 ml del reagente (3); e una goccia del reagente (4).

Questa soluzione può essere usata per 24 ore dopo la preparazione.

#### II.2 Procedura

- (i) Mescolare 0,1 ml di liquido seminale con la soluzione di lavoro per raggiungere un volume di 1 ml.
- (ii) Agitare per 2 minuti.
- (iii) Lasciare per 20-30 minuti a temperatura ambiente.
- (iv) Agitare ancora.
- (v) Le cellule perossidasi-positive si colorano in marrone, mentre quelle perossidasi-negative rimangono non colorate (vedi Tavola 2.2).
- (vi) Contare i leucociti in una camera emocitometrica, oppure calcolare la percentuale di cellule perossidasi positive e negative in un preparato a fresco.

\* La International Agency for Research on Cancer (IARC) ha stabilito che l'orto-toluidina "dovrebbe essere considerata, per scopi pratici, come carcinogenica per l'uomo" (*IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* (1982), vol. 27, suppl. 4, pp. 169-170).

## Appendice III

### *Tecniche di colorazione sopra-vitale*

(vedi Eliasson, 1977, 1981)

#### **III.1 Eosina**

##### *III.1.1 Reagenti*

Eosina Y; preparare una soluzione allo 0,5% (p/v) in soluzione fisiologica.

In alternativa il colorante standard può essere ottenuto da numerose ditte nei rispettivi paesi.

##### *III.1.2 Procedura*

- (i) Mescolare una goccia (da 10 a 15  $\mu$ l) di liquido seminale fresco con una goccia di eosina allo 0,5% su un vetrino e coprire poi con un coprioggetti.
- (ii) Dopo uno o due minuti osservare il preparato a 400 ingrandimenti in contrasto di fase o a luce vivace.
- (iii) Contare gli spermatozoi non colorati (vivi) e colorati (morti) come descritto nel testo.

#### **III.2 Eosina-nigrosina (una modifica della tecnica di Blom)**

##### *III.2.1 Reagenti*

- (1) Eosina Y (1% in acqua distillata).
- (2) Nigrosina (10% in acqua distillata).

##### *III.2.2 Procedura*

- (i) Mescolare una goccia di liquido seminale con due gocce di eosina Y all'1%.
- (ii) Dopo 30 secondi aggiungere tre gocce di nigrosina al 10% (p/v) alla soluzione e mescolare.
- (iii) Porre una goccia della miscela liquido seminale-eosina-nigrosina su un vetrino da microscopio e preparare uno striscio, che viene poi seccato all'aria. (Lo striscio non deve essere troppo spesso).

## *Appendice IV*

---

### *Colorazione di Giemsa per gli spermatozoi e il nucleo di altre cellule*

#### **IV.1 Reagenti**

- (1) Tampone fosfato, 0,066 M (pH 6,9).  
320 ml di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9,1 g/l.  
400 ml di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 11,9 g/l.  
Aggiustare il pH con NaOH e aggiungere acqua distillata per raggiungere 1 litro.
- (2) Soluzione di Giemsa (deve essere preparata fresca ogni volta)  
7 ml di Romanovski-Giemsa.  
160 ml di tampone fosfato.

#### **IV.2 Procedura**

- (i) Fissare in metanolo per almeno 5 minuti strisci precedentemente seccati all'aria.
- (ii) Lasciare asciugare a temperatura ambiente.
- (iii) Colorare nella soluzione di Giemsa per 30 minuti.
- (iv) Sciacquare con tampone fosfato.
- (v) Lasciare asciugare a temperatura ambiente.

## Appendice V. A

### *Colorazione con il metodo di Papanicolaou modificato per gli spermatozoi*

La colorazione di Papanicolaou permette di distinguere chiaramente le componenti cellulari basofile da quelle acidofile e consente un esame dettagliato delle caratteristiche della cromatina nucleare. Questo metodo è stato perciò ampiamente usato nella comune diagnostica citologica. Il metodo standard di Papanicolaou per la citologia vaginale fornisce risultati poco soddisfacenti quando lo si applichi agli spermatozoi. La seguente tecnica modificata si è dimostrata utile nell'analisi della morfologia degli spermatozoi e nell'esame delle cellule germinali immature.

#### V.A.1 Preparazione del campione

Lo striscio dovrebbe essere seccato all'aria e quindi fissato in ugual parti di etanolo (95%, v/v) ed etere per 5-15 minuti.

#### V.A.2 Procedura per la colorazione

Gli strisci fissati dovrebbero essere colorati secondo la seguente procedura:

Etanolo 80% <sup>a</sup>	10 immersioni <sup>b</sup>
Etanolo 70%	10 immersioni
Etanolo 50%	10 immersioni
Acqua distillata	10 immersioni
Ematossilina di Harris o di Mayer	3 minuti esatti
Acqua corrente	3-5 minuti
Etanolo acido	2 immersioni
Acqua corrente	3-5 minuti
Soluzione di Scott <sup>c</sup>	4 minuti
Acqua distillata	1 immersione
Etanolo 50%	10 immersioni
Etanolo 70%	10 immersioni
Etanolo 80%	10 immersioni
Etanolo 95%	10 immersioni
Arancio G6 <sup>d</sup>	2 minuti
Etanolo 95%	10 immersioni
Etanolo 95%	10 immersioni

EA-50 <sup>a</sup>	5 minuti
Etanolo 95%	5 immersioni
Etanolo 95%	5 immersioni
Etanolo 95%	5 immersioni
Etanolo 99,5%	2 minuti
Xilolo (tre vaschette da immersione)	Circa 1 minuto in ciascuna

Cambiare lo xilolo se diventa lattiginoso. Montare subito con Depex o con qualunque medium per il montaggio.

- 
- <sup>a</sup> Controllare il pH dell'acqua prima di preparare le diverse concentrazioni di etanolo. Il pH dovrebbe essere 7,0.
- <sup>b</sup> Un'immersione corrisponde a circa un secondo.
- <sup>c</sup> La soluzione di Scott (vedi Sezione V.A.3.4) viene usata quando la normale acqua di rubinetto è "dura".
- <sup>d</sup> Coloranti e soluzioni: la colorazione di Papanicolaou (EA-50 e arancio G6) è disponibile in commercio. Le stesse ditte normalmente possono fornire la preparazione di ematossilina.

### V.A.3 Preparazione dei coloranti

I coloranti disponibili in commercio sono normalmente molto soddisfacenti, ma possono anche essere preparati in laboratorio con un sostanziale risparmio con il seguente metodo:

#### V.A.3.1 Componenti del EA-36 equivalente al EA-50

---

Eosina Y	10 g
Bruno Bismarck Y	10 g
Verde luce SF, giallastro	10 g
Acqua distillata	300 ml
Etanolo 95%	2000 ml
Acido fosfotungstico	4 g
Soluzione satura di carbonato di litio (in acqua distillata)	0,5 ml

---

#### V.A.3.1.1 Procedura

##### Soluzioni stock

- (i) Preparare le soluzioni separate al 10% (p/v) di ciascun colorante come segue:
- 10 g di eosina Y in 100 ml di acqua distillata.
  - 10 g di bruno Bismarck Y in 100 ml di acqua distillata.
  - 10 g di verde luce SF in 100 ml di acqua distillata.
- (ii) Per preparare 2000 ml di colorante, mescolare le seguenti soluzioni come segue:
- 50 ml di eosina Y
  - 10 ml di bruno Bismarck
  - 12,5 ml di verde luce SF

- (iii) Portare a 2000 ml con etanolo al 95%; aggiungere 4 g di acido fosfotungstico e 0,5 ml di soluzione satura di carbonato di litio.
- (iv) Mescolare bene e conservare la soluzione a temperatura ambiente in bottiglie scure ben tappate. La soluzione è così stabile per circa due-tre mesi. Filtrare prima dell'uso.

#### V.A.3.2 *Componenti dell'arancio G6*

Arancio G cristallino	10 g
Acqua distillata	100 ml
Etanolo 95%	1000 ml
Acido fosfotungstico	0,15 g

##### V.A.3.2.1 *Procedura*

###### *Soluzione stock n. 1*

Preparare una soluzione acquosa al 10% (p/v) come segue:

- (i) 10 g di arancio G cristallino in 100 ml di acqua distillata.
- (ii) Agitare bene e lasciare in una bottiglia scura a temperatura ambiente per una settimana prima dell'uso.

###### *Soluzione stock n. 2 (arancio G6, soluzione allo 0,5% (v/v))*

Preparare come segue:

- (i) Soluzione stock n. 1, 50 ml.
- (ii) Portare a 1000 ml con etanolo al 95%.

Per preparare 1000 ml di soluzione finale di colorante:

- (i) Aggiungere 0,15 g di acido fosfotungstico a 1000 ml della soluzione stock n. 2.
- (ii) Mescolare bene e conservare in bottiglie scure tappate a temperatura ambiente.
- (iii) Filtrare prima dell'uso.  
La soluzione è stabile per due-tre mesi.

#### V.A.3.3 *Componenti dell'ematossilina di Harris senza acido acetico*

Ematossilina (cristalli scuri)	8 g
Etanolo 95%	80 ml
Alluminio ammonio solfato	160 g
Acqua distillata	1600 ml
Ossido di mercurio	6 g

##### V.A.3.3.1 *Procedura per la preparazione della miscela colorante*

- (i) Dissolvere per riscaldamento il solfato di alluminio in acqua distillata.
- (ii) Dissolvere i cristalli di ematossilina in etanolo al 95% (v/v).
- (iii) Aggiungere la soluzione di ematossilina a quella di ammonio solfato.
- (iv) Scaldare la miscela a 95 °C.
- (v) Togliere la miscela dal calore e aggiungere lentamente l'ossido di mercurio agitando continuamente. La soluzione acquisterà un color porpora scuro.

- (vi) Immergere immediatamente il contenitore in un bagno di acqua fredda e, quando la soluzione è fredda, filtrare.
- (vii) Conservare in bottiglie scure a temperatura ambiente e aspettare 48 ore.
- (viii) Diluire la quantità necessaria con una ugual parte di acqua distillata e filtrare di nuovo.

V.A.3.4 *Componenti della soluzione di Scott*

Bicarbonato di sodio	3,5 g
Solfato di magnesio	20,0 g
Acqua distillata	1000 ml

La soluzione di Scott deve essere utilizzata solo quando la normale acqua del rubinetto è "dura" e dovrebbe essere cambiata frequentemente, cioè dopo aver sciacquato 20-25 vetrini.

V.A.3.5 *Componenti della soluzione di etanolo acido*

Etanolo 99,5%	300 ml
HCl concentrato	2,0 ml
Acqua distillata	100 ml