

Appendice V. B

Colorazione di Papanicolaou semplificata per gli spermatozoi

(modificata da Hellinga, 1976)

V.B.1 Reagenti

Soluzione 1 di Papanicolaou	} Disponibili come kits da, per esempio, Merck (rif. 9253, 6887, 9271 rispettivamente)
Soluzione 2 di Papanicolaou	
Soluzione 3 di Papanicolaou	
Xilolo	
Malinolo	
Alcool (70%, v/v): 70 ml di alcool (96%) + 25 ml di acqua distillata	
Alcool ammoniacale: 45 ml NH ₄ OH (25%, v/v) + 955 ml di etanolo (70%, v/v).	

V.B.1 Procedura

- (i) Fissare gli strisci seccati all'aria in un ugual volume di etanolo (95%) e etere per 5 minuti.
- (ii) Porre nella soluzione 1 di Papanicolaou per 45 secondi.
- (iii) Sciacquare con acqua corrente.
- (iv) Porre in alcool ammoniacale per due minuti.
- (v) Sciacquare in alcool (70%).
- (vi) Sciacquare in alcool (96%).
- (vii) Porre nella soluzione 2 di Papanicolaou per un minuto.
- (viii) Sciacquare due volte in alcool (96%).
- (ix) Porre nella soluzione 3 di Papanicolaou per un minuto.
- (x) Sciacquare in alcool (96%).
- (xi) Sciacquare in alcool assoluto.
- (xii) Porre in xilolo per cinque minuti.
- (xiii) Montare con una goccia di malinolo su un vetrino coprioggetti posto sul vetrino umido.

Appendice VI

Colorazione di Bryan-Leishman per lo studio morfologico di strisci seminali

Nota: Usare strisci appena preparati con campioni freschi, su vetrini puliti e seccati all'aria.

Formalina alcoolica 10% (v/v)	1 min	Cambiare ogni volta
Etanolo 80% (v/v)	5 min	Cambiare ogni 3 volte ^a
Etanolo 70%	5 min	Cambiare ogni 3 volte
Etanolo 50%	5 min	Cambiare ogni 3 volte
Alfa-naftolo	4 min	Cambiare ogni 3 giorni

(Aggiungere 0,4 ml di H₂O₂ al 3% (v/v) a 200 ml di alfa-naftolo appena prima dell'uso; la soluzione è attiva per tre giorni a temperatura ambiente).

Acqua corrente	5 min	Far scorrere lentamente
Pironina Y	4 min	Cambiare ogni settimana
Acqua corrente	3 immersioni ^b	Far scorrere lentamente
Tampone sodio citrato	3 min	pH 7,5; cambiare ogni volta
Acqua distillata	1 min	Cambiare ogni volta
Colorante di Bryan modificato	15 min	Cambiare ogni due volte
Acido acetico 1% (v/v)	2 immersioni	Far scorrere lentamente
Acqua corrente	1 min	Far scorrere lentamente
Tampone e colorante di Leishman	30 min	Cambiare ogni volta

(Filtrare 50 ml di soluzione stock di Leishman, aggiungere 150 ml di tampone (pH 6,8), filtrare ancora immediatamente prima dell'uso)

Acqua corrente	1-2 immersioni	Far scorrere lentamente
Asciugare all'aria (non tamponare)		

^a Cambiare dopo ogni 30 vetrini, se si usa una vaschetta per colorazioni che contiene 10 vetrini.

^b Ciascuna immersione dovrebbe essere di circa 1 secondo.

VI.1 Considerazioni speciali

- (a) La pironina Y, i coloranti di Bryan modificato e di Leishman dovrebbero essere filtrati prima dell'uso. Inoltre il tampone e la

soluzione di lavoro di Leishman dovrebbero essere filtrati prima dell'uso per rimuovere il colorante precipitato.

- (b) L'intensità della colorazione finale può essere aumentata prolungando il tempo di permanenza nel colorante di Leishman tamponato o può essere diminuita con ripetuti lavaggi. Controllare l'intensità desiderata al microscopio prima di montare il vetrino.
- (c) L'H₂O₂ si deteriora rapidamente alla luce; la soluzione stock al 3% dovrebbe essere quindi conservata in bottiglie ambrate e al buio.
- (d) Lo stock di colorante di Leishman dovrebbe essere lasciato prima dell'uso sette giorni a temperatura ambiente e al buio e quindi incubato due giorni ad una temperatura di 25-37 °C al buio. La soluzione così preparata è stabile per un mese se mantenuta al buio in un contenitore sigillato.

VI.2 Preparazione delle soluzioni

VI.2.1 Colorante di Bryan (modificato)

- (i) Mescolare i seguenti componenti:
1500 ml di acido acetico glaciale all'1%,
0,5 g di eosina giallastra,
0,5 g di fast green FCF,
0,5 g di naftolo giallastro S.
- (ii) Mescolare accuratamente e conservare in una bottiglia perfettamente chiusa.
- (iii) Filtrare prima dell'uso.

VI.2.2 Colorante di Leishman per il sangue: soluzione stock

- (i) Mescolare 0,5 g di blu di metilene-eosina e 300 ml di alcool metilico assoluto.
- (ii) Mescolare accuratamente e lasciare a temperatura ambiente al buio per sette giorni.
- (iii) A questo punto porre la soluzione per due giorni in un incubatore (35-37 °C).
- (iv) Dopo questo periodo la soluzione stock è pronta per l'uso e dovrebbe essere conservata in bottiglie scure, ben tappate, lontano dal calore e dalla luce. In alternativa esistono altre colorazioni per il sangue come quella di Jenner o di Wright, che possono essere ottenute da qualunque industria che fornisce standard chimici. Il tempo di incubazione con questi coloranti deve essere modificato per ottenere risultati comparabili a quelli del metodo di Leishman.

Tampone

Mescolare due compresse di tampone, pH 6,8 con 200 ml di acqua distillata. Se non viene usato subito, ricontrollare il pH prima dell'uso.

VI.2.3 Colorante di Leishman per il sangue: soluzione di lavoro

- (i) Appena prima dell'uso mescolare 50 ml della soluzione stock filtrata con 150 ml di tampone a pH 6,8.
- (ii) Formalina alcoolica: mescolare 10 ml di soluzione di formaldeide al

37% con 90 ml di etanolo al 95%; per assicurare un pH neutro di 7,0 si possono aggiungere 0,1 g di acetato di calcio per ogni 200 ml di soluzione.

- (iii) Alfa-naftolo: sciogliere 1 g di alfa-naftolo in 100 ml di etanolo al 40%. Immediatamente prima dell'uso, aggiungere 0,2 ml di soluzione di H_2O_2 al 3%.
- (iv) Pironina Y: mescolare 0,1 g di pironina, 4 ml di anilina e 96 ml di etanolo al 40%.
- (v) Tampone sodio citrato: mescolare 7 g di sodio citrato con 1 litro di NaCl allo 0,9% e aggiustare il pH a 7,5.

Appendice VIII

MAR test (mixed antiglobulin test)

Dato che la comparsa di anticorpi della classe delle IgA non si verifica mai senza una presenza contemporanea di anticorpi della classe delle IgG, la ricerca di queste ultime è sufficiente per un metodo di screening routinario. Nel MAR test la ricerca si esegue nella seguente maniera:

Tre gocce sono poste su un vetrino da microscopio:

Una goccia di liquido seminale fresco (circa 12,5 μ l o una goccia ottenuta con un ago 21G).

Una goccia di particelle di lattice rivestite di IgG (Ortho Diagnostic Products).

Una goccia di antisiero contro le IgG umane.

Dapprima vengono mescolate le gocce di liquido seminale e di particelle di lattice e quindi viene mescolata anche la goccia di antisiero, usando un grosso vetrino coprioggetti (40 mm x 24 mm) che viene poi posto sul preparato. Il preparato fresco viene osservato al microscopio, in contrasto di fase o a luce intensa, a 400 o a 600 ingrandimenti, dopo due-tre minuti e poi ancora dopo 10 minuti.

In assenza di anticorpi adesi si vedranno gli spermatozoi nuotare liberamente tra le particelle, le quali aderiranno l'un l'altra in gruppi, fornendo una prova dell'efficacia della preparazione.

Se sugli spermatozoi sono presenti anticorpi, gli spermatozoi mobili presenteranno particelle di lattice adese ad essi. Inizialmente si vedranno muovere gli spermatozoi con solo poche particelle, o grappoli di esse, attaccate. Infine gli agglutinati diventano così compatti che gli spermatozoi si possono muovere solo sul posto, se sono attaccati alle particelle.

Viene calcolata la percentuale di spermatozoi *mobili* ai quali aderiscono le particelle.

Appendice IX

Test con immunobeads

(vedi Bronson *et al.*, 1982, 1984; Clarke *et al.* 1985)

IX.1 Reagenti

- (1) Immunobeads: la Bio-Rad Laboratories può fornire immunobeads anti IgG e anti IgA. Ricostituire le immunobeads in 10 ml di tampone e conservarle a 4 °C. Sono utilizzabili per circa un mese.
- (2) Tampone: soluzione di Tyrode o tampone fosfato salino (PBS) di Dulbecco.

Soluzione di Tyrode		PBS di Dulbecco	
	(g/l)		(g/l)
CaCl ₂	0,2	CaCl ₂	0,1
KCl	0,2	KCl	0,2
NaH ₂ PO ₄	0,05	KH ₂ PO ₄	0,2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1
NaCl	8,0	NaCl	8,0
NaHCO ₃	1,0	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2,16
Glucosio	1,0		

La soluzione dovrebbe essere filtrata (filtro di 22 µm) prima dell'uso.

- (3) Tampone con albumina bovina serica (BSA) (0,4%, p/v): pesare 0,4 g di BSA e portare a 100 ml con la soluzione di Tyrode.

IX.2 Procedura

- (i) Porre in due diversi tubi da centrifuga 0,2 ml di beads anti-IgG e 0,2 ml di anti-IgA e portare a 10 ml con tampone BSA 0,4%.
- (ii) In un tubo da centrifuga porre la quantità richiesta di liquido seminale e portare a 10 ml con tampone BSA 0,4%.
La quantità richiesta di liquido seminale è calcolata in base alla conta spermatica e alla motilità secondo la seguente tabella:

Concentrazione (10 ⁶ /ml)	Motilità (categorie (a) + (b), %) ^a	Liquido seminale richiesto (ml)
> 50		0,2
20-50	> 40	0,4
20-50	< 40	0,8
< 20	> 40	1,0
< 20	< 40	2,0

^aVedi sezione 2.4.2.

- (iii) Centrifugare i tre tubi a circa 500 g per cinque minuti. Decantare il sovranatante e risospendere le immunobeads in 10 ml di tampone BSA 0,4%.
- (iv) Ripetere la procedura di lavaggio del liquido seminale come al punto (iii) e risospendere il precipitato in 0,2 ml di tampone BSA 0,4%.
- (v) Porre 5 gocce di circa 1 μ l di immunobeads anti-IgG e anti-IgA a ciascuna estremità di un vetrino. Aggiungere circa 5 μ l di sospensione di spermatozoi a ciascuna delle gocce di immunobeads. Mescolare bene con un coprioggetti. Porre un coprioggetti (20 mm x 20 mm/ 24 mm x 24 mm) su ciascuna goccia e, dopo aver lasciato il vetrino per 15 minuti in una camera umida, osservare a 400 ingrandimenti con un microscopio a contrasto di fase.
- (vi) Registrare separatamente la percentuale di spermatozoi mobili che sono adesi alle immunobeads nelle miscele che contengono le anti-IgG e anti-IgA.

Il test è considerato positivo se il 10% o più degli spermatozoi mobili sono attaccati alle immunobeads.

IX.3 Modifica del test con immunobeads

Questo metodo viene usato per individuare la presenza di anticorpi anti-spermatozoo nel siero o nel plasma seminale.

- (1) Si usano spermatozoi di donatori normali lavati due volte con tampone BSA 0,4% come indicato nei punti (ii) e (iv).
- (2) Gli spermatozoi lavati vengono portati ad una concentrazione di 50×10^6 /ml con la soluzione di Tyrode.
- (3) 50 μ l di spermatozoi lavati vengono poi aggiunti a 50 μ l di siero o plasma seminale da testare e incubati a 37 °C per un'ora.
- (4) Gli spermatozoi vengono poi lavati due volte come nel punto (iv) e il test viene poi eseguito come nei punti (v) e (vi).