

Appendice VI

Colorazione Giemsa per gli spermatozoi e altre cellule nucleate

VI.1 Reagenti

- (1) Tampone fosfato, 0,066 M (pH 6,9).
320 ml di KH_2PO_4 , 9,1 g/l.
400 ml di Na_2HPO_4 , 11,9 g/l.
Aggiustare il pH con NaOH e aggiungere acqua distillata per raggiungere un litro.
- (2) Soluzione di Giemsa (deve essere preparata fresca ogni volta)
7 ml di Romanovski-Giemsa.
160 ml di tampone fosfato.

VI.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 VII

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 viene applicato agli spermatozoi. La seguente tecnica modificata si è dimostrata utile nell'analisi della morfologia degli spermatozoi e nell'esame delle cellule germinali immature.

VII.1 Preparazione del campione

Lo striscio dovrebbe essere seccato all'aria e quindi fissato in egual parti di etanolo al 95% (950 ml/l) ed etere per 5-15 minuti.

VII.2 Procedura per la colorazione

Gli strisci fissati dovrebbero essere colorati secondo la seguente procedura:

Etanolo 80% ^a (800 ml/l)	10 immersioni ^b
Etanolo 70% (700 ml/l)	10 immersioni
Etanolo 50% (500 ml/l)	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 ^c	4 minuti
Acqua distillata	1 immersione
Etanolo 50%	10 immersioni
Etanolo 70%	10 immersioni
Etanolo 80%	10 immersioni
Etanolo 90%	10 immersioni
Arancio G6 ^d	2 minuti
Etanolo 95%	10 immersioni
Etanolo 95%	10 immersioni
EA-50 ^d	5 minuti

Etanolo 95%	5 immersioni
Etanolo 95%	5 immersioni
Etanolo 95%	5 immersioni
Etanolo 99,5% (99,5 ml/l)	2 minuti
Xilolo (3 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.

- a* Controllare il pH dell'acqua prima di preparare le diverse concentrazioni di etanolo. Il pH dovrebbe essere di 7,0.
- b* Un'immersione corrisponde a circa un secondo.
- c* La soluzione di Scott (vedi sezione VII.3.4.) viene usata quando la normale acqua di rubinetto è "dura".
- d* 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.

VII.3 Preparazione dei coloranti

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

VII.3.1 Componenti del EA-36 equivalente al EA-50

Eosina Y (C.I. 45380)	10 g
Bruno Bismark Y (C.I. 21000)	10 g
Verde luce SF, giallastro (C.I. 42095)	10 g
Acqua distillata	300 ml
Etanolo 95%	2000 ml
Acido fosfotungstico	4 g
Soluzione satura di carbonati di litio (in acqua distillata)	0,5 ml

VII.3.1.1 Procedura

Soluzioni stock

- (i) Preparare le soluzioni separate al 10% (100 ml/l) 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 stabile per circa 2-3 mesi. Filtrare prima dell'uso.

VII.3.2 *Costituenti dell'arancio G6*

Arancio G cristallino (C.I. 16230)	10 g
Acqua distillata	100 ml
Etanolo 95%	1000 ml
Acido fosfotungstico	0,15 g

VII.3.2.1 *Procedura*

Soluzione stock n. 1

Preparare una soluzione acquosa al 10% (100 ml/l) 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% (5 ml/l))

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 2-3 mesi.

VII.3.3 *Costituenti dell'ematossilina di Harris senza acido acetico*

Ematossilina (cristalli scuri; C.I. 75290)	8 g
Etanolo 95%	80 ml
Alluminio ammonio solfato	160 g
Acqua distillata	1600 ml
Ossido di mercurio	6 g

VII.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% (950 ml/l).
- (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 colore 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 un'eguale parte di acqua distillata e filtrare di nuovo.

VII.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.

VII.3.5 Componenti della soluzione di etanolo acido

Etanolo	300 ml
HCl concentrato	2,0 ml
Acqua distillata	100 ml

Appendice VIII

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 alcolica 10% (100 ml/l)	1 min	Cambiare ogni volta
Etanolo 80% (800 ml/l)	5 min	Cambiare ogni 3 volte ^a
Etanolo 70% (700 ml/l)	5 min	Cambiare ogni 3 volte
Etanolo 50% (500 ml/l)	5 min	Cambiare ogni 3 volte
Alfa-naftolo	4 min	Cambiare ogni 3 giorni

(Aggiungere 0,4 ml di H₂O₂ al 3% (30 ml/l) a 200 ml di alfa-naftolo appena prima dell'uso; la soluzione è attiva per 3 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 2 volte
Acido acetico (glaciale) 1% (1 ml/l)	2 immersioni	Far scorrere lentamente
Acqua corrente	1 min	Far scorrere lentamente
Tampone e colorante di Leishman	30 min	Cambiare ogni volta

(Filtrare 80 ml di soluzione stock di Leishman, aggiungere 100 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.

VIII.1 Considerazioni speciali

- (1) 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.
- (2) L'intensità della colorazione finale può essere aumentata prolungando il tempo di permanenza del colorante di Leishman tamponato o può essere diminuita con ripetuti lavaggi. Controllare l'intensità desiderata al microscopio prima di montare il vetrino.

- (3) L'H₂O₂ si deteriora rapidamente alla luce; la soluzione stock al 3% dovrebbe essere quindi conservata in bottiglie ambrate e al buio.
- (4) Lo stock di colorante di Leishman dovrebbe essere lasciato prima dell'uso sette giorni ad una 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.

VIII.2 Preparazione delle soluzioni

VIII.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 (C.I. 45380);
0,5 g di fast green FCF (C.I. 42053);
0,5 g di naftolo giallastro S. (C.I. 10316).
- (ii) Mescolare accuratamente e conservare in una bottiglia perfettamente chiusa.
- (iii) Filtrare prima dell'uso.

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

- (i) Mescolare 0,5 g di blu di metilene-eosina (una miscela di eosina Y e blu di metilene, C.I. 52015) 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.

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

- (i) Appena prima dell'uso mescolare 80 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 H₂O₂ 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 un litro di NaCl allo 0,9% e aggiustare il pH a 7,5.

Appendice IX

Colorazione di Shorr per lo studio morfologico di strisci seminali

IX.1 Preparazione dello striscio

- (1) Strisciare circa 20 μ l del campione (a 50-100 x 10⁶ spermatozoi/ml) su un vetrino pulito e lasciare seccare.
- (2) Fissare lo striscio in etanolo al 75% (750 ml/l) per circa 1 minuto.

IX.2 Procedura di colorazione

acqua corrente	12-15 immersioni
ematossilina	1-2 minuti
acqua corrente	12-15 immersioni
alcool ammonio	5 passaggi di 5 minuti l'uno
acqua corrente	12-15 immersioni
etanolo al 50% (500 ml/l)	5 minuti
colorante di Shorr	3-5 minuti
etanolo al 50%	5 minuti
etanolo al 75% (700 ml/l)	5 minuti
etanolo al 95% (950 ml/l)	5 minuti
etanolo puro	2 passaggi di 5 minuti l'uno
xilolo	2 passaggi di 5 minuti l'uno

IX.3 Reagenti

- (1) Ematossilina Papanicolaou n. 1 (Merck, Darmstadt, Germany, Rif. 9253).
- (2) Alcool ammonio: 95 ml di etanolo al 75% + 5 ml di idrossido di ammonio al 25% (250 ml/l).
- (3) Soluzione di Shorr (Merck, Rif. 9275)

oppure polvere BDH di Shorr	4 g
etanolo al 50%	220 ml
acido acetico glaciale	2 ml.

 Sciogliere la polvere in alcool caldo e lasciare freddare. Aggiungere l'acido acetico in una cappa di aspirazione e filtrare.

Appendice X

Esempio di scheda di registrazione dei dati dell'analisi seminale

Questo esempio di scheda di registrazione è proposto come modello che si adatti alle diverse circostanze. Esso contiene una configurazione proposta per la registrazione delle osservazioni fatte durante l'analisi seminale usando il metodo descritto in questo manuale. Quando usato con intenti clinici esso può essere utile per aggiungere alcune variabili ricavate, che sono combinazioni di risultati ottenuti dai dati. Un esempio di variabile è la conta del numero totale di spermatozoi mobili (ottenuta moltiplicando la concentrazione spermatozoaria, il volume seminale e la percentuale di spermatozoi mobili). Tali variabili calcolabili non sono state ottenute nella scheda in quanto il loro uso dipende dalle situazioni cliniche e da quanto il clinico li ritenga rilevanti. Quando vengono usati per ipotesi di ricerca, i dati ottenuti dalla scheda di registrazione possono essere inseriti direttamente in un computer con programma data-base e le variabili calcolabili possono essere facilmente (ed accuratamente) computati elettronicamente.

La scheda di registrazione dei campioni è stata stampata con colonne multiple per registrare i risultati delle analisi di liquidi seminali raccolti in date diverse. Questo è un modo comodo di presentare una serie di risultati di analisi seminali ma può non risultare pratico per i tecnici di laboratorio che compilano i moduli. Simili spazi aggiuntivi possono essere richiesti in certi posti dove eseguono la registrazione dei commenti e delle osservazioni che non possono essere codificate nel modulo.

Esempio di scheda di registrazione dei dati dell'analisi seminale

	Giorno	Mese	Anno	Giorno	Mese	Anno	Giorno	Mese	Anno
Data dell'esame									
Durata dell'astinenza (giorni)									
Intervallo tra eiaculazione e inizio dell'esame (min)									
Aspetto (1 - normale, 2 - anormale)									
Liquefazione (1 - normale, 2 - anormale)									
Densità (1 - normale, 2 - anormale)									
Volume (ml)									
pH									
Motilità (100 spermatozoi)									
(a) progressiva rapida									
(b) progressiva lenta									
(c) non progressiva									
(d) assente									
Agglutinazione (%)									
Vitalità (% vivi)									
Concentrazione (10 ⁶ /ml)									
Morfologia (%)									
- normali									
- anomalie della testa									
- anomalie del collo o del tratto intermedio									
- anomalie della coda									
- residui citoplasmatici									
Leucociti (10 ⁶ /ml)									
Cellule germinali immature (10 ⁶ /ml)									
Immunobead test (% con Ig aderenti)									
MAR test (% con particelle aderenti)									
Biochimica									
zinco (mmol/l)									
acido citrico (mmol/l)									
fosfatasi acida (kU/l)									
fruttosio (mmol/l)									
α-glucosidasi (neutrale) (U/l)									