

## Appendice X

### *Tecniche di coltura per batteri aerobici presenti nel liquido seminale*

I campioni seminali per l'esame colturale devono essere raccolti con particolari precauzioni per evitare possibili contaminazioni (vedi Sezione 2.6).

#### *Tecnica su vetrino*

Si pone su un vetrino una goccia di liquido seminale con un ago sterile da siringa (21G; 12,5 µl). La goccia viene poi uniformemente distesa usando l'ago per piatto. Il vetrino viene lasciato per 48-72 ore a temperatura ambiente. Il numero di batteri per millilitro viene calcolato moltiplicando per 80 il numero di colonie presenti sul vetrino.

#### *Coltura in agar sangue*

Il liquido seminale deve essere diluito 1:1 con acqua sterile o soluzione fisiologica o tampone fosfato (pH 7,4). Utilizzando una normale pipetta Pasteur, una goccia del preparato, circa 50 µl, viene posta in una piastra di agar sangue e distesa uniformemente con un'ansa di platino. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C viene contato il numero delle colonie. Questo numero viene moltiplicato per 40 (20 x il fattore di diluizione 2) per ottenere il numero di batteri per millilitro.

Se la concentrazione dei batteri supera i 1000/ml, dovrebbe essere esaminato il tipo di colonie. Se le colonie appaiono uniformi, dovrebbero essere allora ulteriormente identificate e dovrebbe essere anche eseguito un antibiogramma in laboratori di microbiologia. Se le colonie hanno aspetti diversi si può sospettare una contaminazione e si dovrebbe quindi ripetere un secondo esame colturale avendo cura di istruire il paziente con precisione per evitare contaminazioni (vedi Sezione 2.6).

Se la concentrazione dei batteri è inferiore a 1000/ml, la coltura deve essere considerata negativa per quanto riguarda i batteri aerobi. Infezioni genitali da *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, batteri anaerobi e virus richiederanno l'intervento di laboratori di microbiologia specializzati (vedi Brunner *et al.* 1983; Krieger, 1984; Weidner *et al.*, 1985)

## *Appendice XI*

---

### *Dosaggio dello zinco nel plasma seminale*

#### **XI.1 Premessa**

Questo dosaggio colorimetrico fu sviluppato per la determinazione dello zinco nel siero, plasma, fluido cerebrospinale e urine. Recentemente i valori dello zinco nel plasma seminale umano ottenuti con questo metodo si sono dimostrati correlati con quelli ottenuti con la spettroscopia d'assorbimento atomico a fiamma, suggerendo quindi che questo metodo colorimetrico può dimostrarsi utile per la determinazione dello zinco nel plasma seminale in quei laboratori in cui non sia disponibile strumentazione per l'assorbimento atomico (Johnsen e Eliasson, 1987).

#### **XI.2 Stabilità dei reagenti**

Il kit è stabile per diversi anni se conservato a temperatura inferiore a 25 °C (ottenibile da: Wako Pure Chemical Industries Ltd.).

#### **XI.3 Preparazione e stabilità della soluzione di cromogeno**

Mescolare i reagenti A e B nel rapporto di 4:1 (esempio 20 ml del reagente A e 5 ml del reagente B). Questa soluzione cromogena è stabile per una settimana tra 2 e 10 °C e per due giorni a temperatura ambiente.

#### **XI.4 Preparazione del campione**

Il campione seminale viene centrifugato per 20 minuti a 2000 g. Il plasma seminale viene poi decantato e diluito 1:200 (esempio, 10 µl di plasma seminale vengono aggiunti a 1,99 ml di acqua distillata). Questo campione dovrebbe essere conservato in freezer fino al momento del dosaggio.

##### *Note*

Non è necessaria una tappa di deproteinizzazione con acido tricloroacetico perché il campione seminale viene ampiamente diluito prima dell'aggiunta del reagente colorante.

**XI.5 Standard di Zinco**

Lo standard di zinco viene fornito dai produttori come una soluzione 30,6  $\mu\text{M}$ .

**XI.6 Procedura di dosaggio**

|                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| Lunghezza d'onda          | 560 nm                  |
| Cuvette                   | 1 cm di percorso ottico |
| Temperatura d'incubazione | 20-25 °C                |

- (i) Aggiungere in provette diverse rispettivamente 0,5 ml di acqua (bianco), 0,5 ml di standard di zinco e 0,5 ml di plasma seminale diluito.
- (ii) Aggiungere 2,5 ml della soluzione di lavoro di cromogeno a ciascun tubo.
- (iii) Mescolare bene, lasciare le soluzioni a temperatura ambiente per 5 minuti e misurare l'assorbanza entro un'ora a 560 nm usando il valore del bianco come riferimento.

La correlazione tra assorbanza ( $E$ ) e concentrazione di zinco nel plasma seminale è lineare fino a 7 mM.

**XI.7 Calcolo**

La concentrazione dello zinco nel plasma seminale viene calcolata secondo la formula:

$$[\text{Zinco}] (\text{mmol/l}) = \frac{E \text{ del campione}}{E \text{ dello standard}} \times \frac{30,6 \times 200}{1000}$$

dove 30,6 è la concentrazione dello standard di zinco e 200 è il fattore di diluizione del plasma seminale.

**XI.8 Valori normali**

2,4  $\mu\text{mol}$  o più per eiaculato.

## Appendice XII

### *Determinazione dell'acido citrico nel plasma seminale*

#### **XII.1 Reagenti**

##### **XII.1.1** *Boehringer Kit n. 139076 (metodo all'ultravioletto)*

Un kit è sufficiente per 30 determinazioni.

Il kit contiene:

- (1) *Bottiglia 1 (NADH)*: ricostituire la soluzione 1 aggiungendo 12 ml di acqua distillata; conservare a - 20 °C (stabile per quattro settimane).
- (2) *Bottiglia 2 (citrato-liasi)*: ricostituire la soluzione 2 aggiungendo 0,3 ml di acqua distillata; conservare a - 20 °C (stabile per quattro settimane).

##### **XII.1.2** *Tampone TRA (pH 7,7)*

- (i) Sciogliere 14,9 g di tri-etanolamina in 750 ml di acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,6 aggiungendo HCl concentrato.
- (ii) Sciogliere 0,027 g di  $\text{ZnCl}_2$  in 250 ml di acqua distillata. Occorre essere sicuri che lo  $\text{ZnCl}_2$  sia completamente dissolto.
- (iii) Aggiungere la soluzione di  $\text{ZnCl}_2$  a quella di tri-etanolamina.
- (iv) Aggiungere 0,5 g di sodio azide.

#### **XII.2 Procedura**

##### **XII.2.1** *Preparazione del plasma seminale*

Centrifugare l'eiaculato a 3000 g per 15 minuti o a 2000 g per 20 minuti.

##### **XII.2.2** *Estrazione*

- (i) Aggiungere 0,1 ml di plasma seminale a 4,95 ml di acido tricloroacetico 15% (v/v).
- (ii) Aggiungere 0,75 ml di NaOH 6M.  
Il pH deve essere superiore a 7, se necessario aggiungere NaOH per raggiungere l'alcalinità.  
L'estratto deve essere chiaro.

##### **XII.2.3** *Misura*

- (i) Aggiungere in una cuvetta per la misura:  
0,5 ml della soluzione 1,  
2,3 ml del tampone TRA,  
0,2 ml dell'estratto di plasma seminale.

- (ii) Mescolare e misurare l'assorbanza a 340 nm → valore d'estinzione  $E_1$ .
- (iii) Aggiungere 20  $\mu$ l della soluzione 2.
- (iv) Mescolare e aspettare esattamente 5 minuti.
- (v) Misurare l'assorbanza → valore di estinzione  $E_2$ .

### **XII.3 Calcoli**

Concentrazione dell'acido citrico (g/l) =

$$= (E_1 - E_2) \times 58 \times \frac{2,9}{6,3} = \Delta E \times \frac{26,7}{192}$$

### **XII.4 Valori normali**

52  $\mu$ mol (10 mg) o più per eiaculato.

## Appendice XIII

### *Determinazione del fruttosio nel plasma seminale umano*

(vedi Karvonen e Malm, 1955)

#### **XIII.1 Reagenti**

- (1)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 1,8% (p/v).
- (2) NaOH 0,1 M.
- (3) *Reagente-indolo*: 200 mg di acido benzoico vengono aggiunti a 100 ml di acqua distillata e sciolti agitando ripetutamente in un bagno di acqua calda (circa 60 °C). Quando tutto l'acido benzoico è sciolto, si aggiungono 25 mg di indolo. La soluzione viene poi filtrata e conservata in frigo.
- (4) *Stock dello standard di fruttosio* (2,8 mM): si sciolgono 50,4 mg di fruttosio in 100 ml di acqua distillata. La soluzione può essere conservata in frazioni congelate.
- (5) *Soluzione lavoro di fruttosio*: il giorno del dosaggio si diluisce lo stock a 0,28 e 0,14 mM, rispettivamente.

#### **XIII.2 Preparazione del plasma seminale**

- (i) Diluire il plasma seminale 1:50 aggiungendo 0,1 ml di plasma seminale a 4,9 ml di acqua distillata.
- (ii) Aggiungere 1 ml di plasma seminale diluito a un tubo da centrifuga.
- (iii) Aggiungere 0,3 ml della soluzione di zinco solfato all'1,8%; mescolare.
- (iv) Aggiungere 0,2 ml di NaOH e mescolare accuratamente.
- (v) Aspettare 15 minuti e centrifugare a 2000 g per 20 minuti.
- (vi) Utilizzare 0,5 ml del sovrantante trasparente per il dosaggio.

#### **XIII.3 Procedura del dosaggio**

- (i) Trasferire in tubi diversi di vetro con tappi di vetro, rispettivamente 0,5 del sovrantante del plasma seminale diluito e deproteinnizzato, 0,5 ml della soluzione di lavoro di standard di fruttosio (campioni in doppio per ogni concentrazione di fruttosio) e 0,5 ml di acqua distillata (bianco).
- (ii) Aggiungere a ciascun tubo 0,5 ml di reagente-indolo e 5 ml di HCl concentrato.
- (iii) Tappare i tubi di vetro e incubare per 20 minuti a 50 °C.

- (iv) Raffreddare in bagno di ghiaccio fino a temperatura ambiente e leggere l'intensità del colore a 470 nm.

#### **XIII.4 Calcolo**

La concentrazione di fruttosio (mmol/l) nel plasma seminale viene calcolata con la seguente equazione:

$$[\text{Fruttosio}] \text{ (mmol/l)} = \text{DO}_{470 \text{ nm}} \times F \times 75$$

dove  $F$  è il fattore standard medio del fruttosio, secondo la formula:

$$F = \frac{\frac{0,14}{S_1} + \frac{0,28}{S_2}}{2}$$

dove  $S_1$  e  $S_2$  sono le medie delle letture della densità ottica (dei duplicati) per gli standard di fruttosio 0,14 mM e 0,28 mM, rispettivamente; 75 è il fattore di diluizione del plasma seminale.

#### **XIII.5 Valori normali**

13  $\mu\text{mol}$  o più per eiaculato.

## Appendice XIV

### *Metodo per la determinazione dell'ATP nel liquido seminale*

#### **XIV.1 Reagenti**

##### *XIV.1.1 Tampone Tris-EDTA*

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Tris                                  | 12,10 g |
| Na <sub>2</sub> EDTA.H <sub>2</sub> O | 0,37 g  |
| Sodio azide                           | 0,50 g  |

- (i) Sciogliere in 900 ml di acqua distillata.
- (ii) Aggiustare il pH a 7,75 con acido solforico.
- (iii) Aggiungere acqua distillata per portare a 1000 ml.  
Prima dell'uso una parte del tampone viene filtrata con un filtro monouso (0,22 µm).

##### *XIV.1.2 Reagente per il monitoraggio dell'ATP*

- (i) Aggiungere 10 ml di acqua sterile al reagente liofilizzato (esempio, kit LKB 1243-102).
- (ii) Dividere in frazioni di 0,5 ml (usare provette da congelatore con tappo).
- (iii) Conservare a - 20 °C.

##### *XIV.1.3 Standard di ATP ( $10^{-5}$ mol/l)*

- (i) Aggiungere 10 ml di acqua sterile per ricostituire lo standard di ATP liofilizzato.
- (ii) Dividere in frazioni da 0,5 ml (usare provette da congelatore con tappo).
- (iii) Conservare a - 20 °C.

Ulteriori standard di ATP possono essere preparati sciogliendo 6,052 mg di ATP in 10 ml di tampone Tris-EDTA. Diluendo 0,1 ml di quest'ultima soluzione in 10 ml di tampone Tris-EDTA si ottiene uno standard di  $10^{-5}$  mol/l.

#### **XIV.2 Procedura**

##### *XIV.2.1 Preparazione dell'estratto di spermatozoi*

- (i) Aggiungere in una provetta da congelatore con tappo a vite:  
400 µl di tampone Tris-EDTA.  
100 µl di liquido seminale fresco liquefatto.



- (ii) Porre la provetta verticalmente in un bagno di acqua bollente per 15 minuti.
- (iii) Dosare immediatamente o conservare a - 20 °C fino al momento del dosaggio.

#### XIV.2.2 *Taratura del luminometro con ATP standard*

- (i) Aggiungere in una cuvetta mono-uso di polistirene:  
1900 µl di tampone Tris-EDTA,  
100 µl di reagente rivelatore.
- (ii) Porre la cuvetta nel luminometro e regolare il fondo dello strumento.
- (iii) Aggiungere 50 µl di standard di ATP alla cuvetta.
- (iv) Leggere la massima emissione luminosa in unità relative di luce (RLU).

La lettura dello standard di ATP dovrebbe essere approssimativamente comparabile alle letture precedenti usando lo stesso reagente per la rivelazione del segnale luminoso. Reagenti di lotti differenti possono avere una resa luminosa diversa.

La taratura del luminometro dovrebbe essere fatta prima di ogni serie di determinazioni.

#### XIV.2.3 *Misura dell'ATP nell'estratto seminale*

- (i) Lasciar raffreddare l'estratto fresco o scongelare l'estratto congelato a temperatura ambiente.
- (ii) Versare il contenuto della provetta da congelatore in una cuvetta di polistirene per la misura.
- (iii) Sciacquare il contenuto della provetta da congelatore con 1450 µl di tampone Tris-EDTA e versare nella cuvetta per la misura.
- (iv) Aggiungere 100 µl del reagente rivelatore.
- (v) Mescolare con due robuste agitazioni.
- (vi) Porre nel luminometro e leggere la massima emissione luminosa (valore A in RLU).
- (vii) Aggiungere 50 µl di standard di ATP.
- (viii) Leggere la massima emissione luminosa (valore B in RLU).

L'intera operazione deve essere compiuta in meno di 30 secondi.

### XIV.3 **Calcoli**

Valore A = ATP in 100 µl di liquido seminale.

Valore B = ATP in 100 µl di liquido seminale + ATP in 50 µl di soluzione standard ( $10^{-5}$  mol/l).

Perciò:

$$\frac{A}{2(B - A)} = \text{ATP nel liquido seminale } (10^{-5} \text{ mol/l}).$$

Per esprimere i risultati in  $\mu\text{mol/l}$ , quindi:

$$\text{ATP nel liquido seminale } (\mu\text{mol/l}) = \frac{A}{2(B - A)} \times 10.$$

Dato che l'ATP seminale deriva dagli spermatozoi, i risultati possono essere espressi come  $10^{-10} \text{ mol}/10^6$  spermatozoi.

#### **XIV.4 Valori normali**

$3,0 \mu\text{mol/l}$  o più; da  $0,5 \times 10^{-10}$  a  $1,0 \times 10^{-10} \text{ mol}/10^6$  spermatozoi.