

Appendice XI

Test con immunobeads^a

XI. 1 Reagenti

- (1) Immunobeads: beads anti-IgG, IgA e IgM sono ottenibili dalla BioRad Laboratories (BioRad Chemical Division, 15111 San Pablo Avenue, Richmond, CA 94806, USA) (Catalogo Nos. 170-5100, -5114 e -5120 rispettivamente). A scopo di screening, possono essere utilizzate particelle combinate anti-Ig (170-5106), che sono in grado di identificare tutti gli isotipi. Ricostituire le immunobeads in 10 ml di tampone (come di seguito indicato) e conservare a + 4 °C dove possono essere conservate per circa 1 mese.
- (2) Tampone: possono essere utilizzate o la 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 attraverso un millipore (filtro di 22 µm) prima dell'uso.

^aBronson, R.A., Cooper, G.W., Rosenfeld, D. (1982) Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Archives of Andrology*. **9**:61; Bronson, R.A., Cooper, G.W., Rosenfeld, D. (1984) Sperm antibodies: their use in infertility. *Fertility and Sterility* **42**: 171-83; Clarke, G.N. (1990) Detection of antisperm antibodies using Immunobeads. In *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, ed B.A. Keel & B.W. Webster, pp. 177-92, CRC, Boca Raton, Florida.

- (3) Tampone I: albumina bovina serica (BSA: V frazione di Cohn) allo 0,4%, (4 g/l): pesare 0,4 g di BSA e portare a 100 ml con la soluzione tampone.
- (4) Tampone II: BSA al 5% (50 g/l): pesare 5,0 g di BSA e portare a 100 ml con la soluzione tampone.
- (5) Tutte le soluzioni devono essere passate attraverso un filtro millipore da 0,22 μm o da 0,45 μm prima dell'uso.

XI. 2 Procedura

- (i) Per ciascun tipo di immunobead aggiungere 0,2 ml di soluzione di bead a 10 ml di tampone I in tubi conici separati da centrifuga.
- (ii) Trasferire la quantità di liquido seminale richiesta in un tubo da centrifuga e portare a 10 ml con la soluzione di tampone I. La quantità di liquido seminale richiesta è calcolata in base alla concentrazione spermatica e alla motilità in base alla seguente tabella:

Concentrazione ($10^6/\text{ml}$)	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 a circa 500 g per 5-10 minuti.
- (iv) Tubo del liquido seminale: lasciare decantare e eliminare il sovrnatante. Sospendere delicatamente il pellet in 10 ml di tampone I fresco e centrifugare di nuovo a 500 g per 5-10 minuti.
- (v) Tubo dell'immunobead: lasciare decantare ed eliminare il sovrnatante. Sospendere delicatamente le beads in 0,2 ml di tampone II.
- (vi) Tubo del liquido seminale: lasciare decantare ed eliminare il sovrnatante. Sospendere delicatamente il pellet fino al suo volume originale usando il tampone II.
- (vii) Porre 5 gocce da 1 μl di ciascun tipo di immunobead su uno o più vetrini. Aggiungere 5 μl della sospensione di liquido seminale lavato a ciascuna delle gocce di immunobeads e mescolare bene usando per ciascuno la punta di una pipetta o il bordo di un coprioggetti. Porre un coprioggetti quadrato (con lato da 20 a 24 mm) su ciascuna goccia e, dopo aver lasciato il vetrino per 10 minuti in una camera umida, osservare a 400 o 500 ingrandimenti con un microscopio a contrasto di fase.
- (viii) Registrare separatamente la percentuale di spermatozoi mobili che sono adesi alle immunobeads. Contare almeno 100 spermatozoi per preparazione. Registrare la classe (IgG o IgA) e il sito di legatura dell'immunobead allo spermatozoo (testa, tratto intermedio, coda o coda-testa).

Il test è da considerarsi positivo se il 20% o più degli spermatozoi mobili sono adesi alle immunobeads e clinicamente significativo se il 50% o più sono ricoperti da immunobeads. Se il legame è limitato ai testa-coda non è da considerarsi clinicamente significativo.

XI.3 Test con immunobead indiretto

Questa modifica è usata per identificare gli anticorpi anti-spermatozoo nel siero, nel plasma seminale o nel muco cervicale solubilizzato con bromelina.

- (i) Spermatozoi di donatori normali vengono lavati due volte con soluzione tampone I come descritto nel paragrafo XI.2, ai punti (ii), (iii), (iv) e (vi).
- (ii) La sospensione di spermatozoi lavati è in seguito portata a una concentrazione di $50 \times 10^6/\text{ml}$ in soluzione tampone II.
- (iii) Diluire $10 \mu\text{l}$ del plasma seminale da analizzare con $40 \mu\text{l}$ di soluzione tampone II e quindi mescolare con $50 \mu\text{l}$ della sospensione di spermatozoi lavati. Incubare a 37°C per 1 ora.
- (iv) Gli spermatozoi sono in seguito lavati nuovamente 2 volte come nel paragrafo XI.2 ai punti (iii), (iv), e (vi) e gli esami effettuati come descritto ai punti (vii) e (viii).

XI.4 Controlli

Un controllo positivo e uno negativo devono essere inclusi in ciascun test effettuato. Un controllo positivo può essere preparato usando siero di donatore (per esempio di un uomo vasectomizzato) con alti titoli di anticorpi antispermatozoo sierici come dimostrato con test con immunobead indiretto. Questo siero deve essere preparato come descritto nel paragrafo XI.3 e eseguito in parallelo con ogni test effettuato.

Appendice XII

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 (kit della Ortho SpermaMAR da Fertility Technologies Inc. Natick, MA, USA), la ricerca si esegue nella seguente maniera.

10 µl di liquido seminale fresco non lavato, 10 µl di particelle di lattice con adese IgG (da Fertility Technologies Inc.) o eritrociti di pecora con adese IgG e 10 µl di antisiero contro le IgG umane (da Hoechst-Behring ORCM-04/05, o Dakopatts A089, Denmark) vengono posti su di un vetrino da microscopio.

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 2-3 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.

Andranno contati almeno 100 spermatozoi. Viene calcolata la percentuale di spermatozoi mobili ai quali aderiscono le particelle.

Appendice XIII

Dosaggio dello zinco nel plasma seminale

XIII.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^a.

XIII.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).

XIII.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 fra 2 e 10 °C e per 2 giorni a temperatura ambiente).

XIII.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 dell'analisi.

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

XIII.5 Standard di zinco

Lo standard di zinco viene fornito dai produttori come una soluzione 30,6 µmol/l.

^a Johansen, Ø & Eliasson, R. (1987) Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *International Journal of Andrology*, **10**: 435-40.

XIII.6 Procedura di dosaggio

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

- (1) 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.
- (2) Aggiungere 2,5 ml della soluzione di lavoro di cromogeno a ciascun tubo.
- (3) 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 (*A*) e concentrazione di zinco nel plasma seminale è lineare fino a 7 mM (mmol/l).

XIII.7 Calcolo

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

$$\text{concentrazione dello zinco (mmol/l)} = \frac{A \text{ del campione}}{A \text{ dello standard}} \times \frac{30,6 \times 200}{1000}$$

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

XIII.8 Valori normali

2,4 µmol o più per eiaculato.

Appendice XIV

Dosaggio dell'acido citrico nel plasma seminale

XIV.1 Reagenti

XIV.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 4 settimane).
- (2) *Bottiglia 2 (citrato-liasi)*: ricostituire la soluzione 2 aggiungendo 0,3 ml di acqua distillata; conservare a -20 °C (stabile per 4 settimane).

XIV.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 ZnCl_2 in 250 ml di acqua distillata. Occorre essere sicuri che lo ZnCl_2 sia completamente dissolto.
- (iii) Aggiungere la soluzione di ZnCl_2 a quella di tri-etanolamina.
- (iv) Aggiungere 0,5 g di sodio azide.

XIV.2 Procedura

XIV.2.1 *Preparazione del plasma seminale*

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

XIV.2.2 *Estrazione*

- (i) Aggiungere 0,1 ml di plasma seminale a 4,95 ml di acido tricloroacetico (TCA) 15% (150 ml/l).
- (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.

XIV.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 di assorbanza A_1 .
- (iii) Aggiungere 20 μ l della soluzione 2.
- (iv) Mescolare e aspettare esattamente 5 minuti.
- (v) Misurare l'assorbanza. Valore di assorbanza A_2 .

XIV.3 Calcoli

Concentrazione di acido citrico in mM (mmol/l)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{(A_1 - A_2)}{\text{Coefficiente di estinzione} \times \text{diluizione di assorbanza}} \times \text{Diluizione di estrazione} \\
 &= \frac{(A_1 - A_2)}{6,3} \times 58 \times \frac{3,02 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}} \\
 &= (A_1 - A_2) \times 139
 \end{aligned}$$

XIV.4 Valori normali

52 μ mol o più per eiaculato.

Appendice XV

Determinazione della fosfatasi acida nel plasma seminale^a

XV.1 Reagenti

- (1) Tampone citrato, 0,09 M (mol/l) con pH 4,8.
Sciogliere 1,73 g di acido citrico anidro libero in acqua distillata, portare il pH a 4,8 con 1M di NaOH e arrivare fino a 100 ml con acqua. Conservare a 4 °C.
- (2) 0,1 M NaOH.
- (3) Soluzione di *p*-Nitrofenolo fosfato (substrato).
La soluzione va preparata fresca ogni giorno. Calcolare il volume del substrato necessario e sciogliere la quantità richiesta di sale di *p*-nitrofenolo fosfato disodico in tampone citrato fino a una concentrazione di 4 mg/ml (100 µl di substrato per misura, ad esempio 8 mg in 2 ml per duplicare le misure di 8 campioni e due bianchi) oppure usare compresse Sigma da 5 mg qualora non sia possibile effettuare un'accurata misurazione del peso di piccole quantità di substrato.
- (4) *p*-Nitrofenolo (PNP), 5 mM (mmol/l), soluzione pronta per la curva standard. Sciogliere 0,0695 g di PNP in acqua distillata, scaldare la soluzione se necessario e portare a 100 ml in una beuta graduata. Conservare a 4 °C.
- (5) Sodio bisolfato ($\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 12 g/l di acqua).

XV.2 Metodo

- (i) Non più di 30 minuti dopo la liquefazione, centrifugare l'eiaculato a 3000 g per 10 minuti per separare gli spermatozoi. Se il campione non è saggiato immediatamente, pipettare 20 µl di plasma seminale in 20 µl di soluzione di sodio bisolfato in un tubo di Eppendorf (il pH del composto dovrebbe essere tra 5 e 6) per stabilizzare la fosfatasi acida durante la conservazione a temperatura ambiente per alcune ore, a 4 °C per pochi giorni, o a -20 °C per diversi mesi.
- (ii) Diluire il plasma seminale 10 000 volte per il dosaggio, cioè ad esempio, per un campione stabilizzato (già diluito 1:1), diluire 10 µl in 0,5 ml di tampone citrato e diluire ulteriormente 10 µl di questo in 1 ml di tampone.

^aModificato da Heite, H.-J. & Wetterauer, W. (1979) Acid phosphatase in seminal fluid: method of estimation and diagnostic significance. *Andrologia*. **11**: 113-22.

- (iii) Per controllare il dosaggio, prendere due pool di plasma seminale stabilizzato, conservato a -20 °C, uno contenente alta e l'altro contenente bassa attività fosfatasi acida precedentemente testata, diluirli e dosarli in parallelo con i campioni.
- (iv) Porre 0,1 ml di soluzione substrato in ciascun tubo di dosaggio, e scaldare per 5 minuti a 37 °C. Aggiungere 10 µl di campione diluito e incubare a 37 °C esattamente per 30 minuti. I tubi senza campioni sono egualmente incubati come bianchi.
- (v) Interrompere la reazione enzimatica aggiungendo 1 ml di soluzione di NaOH e leggere l'assorbanza a 405 nm contro i bianchi.

(L'uso del tartrato per differenziare altre fosfatasi acide dagli enzimi prostatici generalmente non è necessario a causa dell'attività estremamente alta di quest'ultimo).

Preparare e leggere la curva standard PNP subito prima di leggere i campioni.

Porre 400 µl 5 mM (mmol/l) di soluzione pronta in una beuta da 20 ml e portare a 20 ml con 0,1 M (mol/l) di NaOH (questa soluzione è 100 µM, cioè µmol/l).

Diluire questi 100 µM di soluzione con 0,1 M di NaOH per dare gli standard di 0, 20, 40, 60, 80 e 100 µM e leggere l'assorbanza.

XV.3 Calcoli

1 unità di fosfatasi acida = 1 µmol di PNP prodotto per minuto a 37 °C.

Pendenza della curva standard (S) = unità d'assorbanza per µM.

Guadagno d'assorbanza del campione (A) = assorbanza misurata – assorbanza del bianco.

Fattore (F) = volume totale di incubazione ÷ volume del campione ÷ 30 minuti x il fattore diluizione del plasma seminale
 $= 1100 \div 10 \div 30 \times 10\,000$

Attività della fosfatasi acida nel plasma seminale

$$\begin{aligned}
 &= (A \div S) \times F \text{ mU/ml} \\
 &= (A \div S) \times F \div 1000 \text{ U/ml} \\
 &= (A \div S) \times 37 \text{ U/ml}
 \end{aligned}$$

Attività totale = U/ml x volume di eiaculato in ml
 $= \text{U per eiaculato}$

Valore normale: 200 U per eiaculato o più.