

Inhaltsverzeichnis

1	Hintergrund	1
1.1	Einleitung	2
1.2	Die 5. Auflage	2
1.3	Zweck des und Umfang des Laborhandbuchs	3

I Untersuchung des Ejakulates

2	Standardverfahren	7
2.1	Einleitung	12
2.2	Probengewinnung	15
2.2.1	Vorbereitung	15
2.2.2	Gewinnung des Ejakulates für diagnostische und Forschungszwecke	15
2.2.3	Sterile Probengewinnung im Rahmen der assistierten Reproduktion	15
2.2.4	Sterile Probengewinnung für die mikrobiologische Untersuchung	16
2.2.5	Probengewinnung zu Hause	16
2.2.6	Probengewinnung mittels Kondom	16
2.2.7	Sichere Probenhandhabung	17
2.3	Erste makroskopische Untersuchung	17
2.3.1	Liquifizierung (Verflüssigung)	17
	Verzögerte Liquifizierung	17
2.3.2	Konsistenz	18
2.3.3	Aussehen des Ejakulates	18
2.3.4	Ejakulatvolumen	18
	Unterer Referenzwert	19
2.3.5	pH-Wert des Ejakulates	19
	Referenzwerte	20
2.4	Erste mikroskopische Untersuchung	20
2.4.1	Gründliche Mischung und repräsentative Probenentnahme	20
2.4.2	Herstellung eines Feuchtplättchens	20
2.4.3	Spermienaggregationen	21
2.4.4	Spermienagglutinationen	21
2.4.5	Zelluläre Elemente außer Spermien	22
2.5	Spermienmotilität	24
2.5.1	Klassifizierung der Spermienmotilität	24
2.5.2	Vorbereitung der Probe und Beurteilung der Motilität	25
2.5.3	Arbeitsbeispiele	26
2.5.4	Untere Referenzgrenze	27
2.6	Spermienvitalität	27
2.6.1	Vitalitätstest mittels Eosin-Nigrosin	28
	Zubereitung der Reagenzien	28
	Durchführung	28
	Auswertung	29
	Unterer Referenzwert	29
2.6.2	Vitalitätstest mittels Eosin allein	29
	Zubereitung der Reagenzien	29

Durchführung	29
Auswertung	30
Unterer Referenzwert	30
2.6.3 Vitalitätstest mittels hypoosmotischer Schwellung	30
Zubereitung der Reagenzien	30
Durchführung	30
Auswertung	31
Unterer Referenzwert	31
2.7 Spermienanzahl	32
2.7.1 Verschiedene Arten von Zählkammern	33
2.7.2 Das Neubauer-improved-Hämozytometer	33
2.7.3 Anwendung des Hämozytometer-Rasters	34
2.7.4 Pflege der Zählkammer	35
2.7.5 Diluent zur Ejakulatverdünnung	35
2.7.6 Die Notwendigkeit, eine ausreichende Anzahl an Spermien zu zählen	35
2.8 Routine-Zählverfahren	36
2.8.1 Bestimmung der erforderlichen Verdünnung	36
2.8.2 Vorbereitung der Verdünnungen und Beladung der Hämozytometerkammer	38
2.8.3 Bestimmung der Spermienzahl in den Zählkammern	39
2.8.4 Berechnung der Spermienkonzentration im Ejakulat	40
2.8.5 Berechnungsbeispiele	40
2.8.6 Unterer Referenzwert für die Spermienkonzentration	42
2.8.7 Berechnung der Spermiengesamtzahl im Ejakulat	42
2.8.8 Unterer Referenzwert für die Spermiengesamtzahl	42
2.9 Niedrige Spermienzahl: Kryptozoospermie und vermutete Azoospermie	42
2.10 Wenn eine exakte Bestimmung einer niedrigen Spermienzahl nicht notwendig ist	43
2.10.1 Keine weiteren Maßnahmen ergreifen	43
2.10.2 Untersuchung von zentrifugierten Proben, um Spermien zu finden	43
2.10.3 Untersuchung von nicht zentrifugierten Proben, um bewegliche Spermien zu finden	44
2.11 Wenn eine genaue Bestimmung auch bei wenigen Spermien notwendig ist	45
2.11.1 Die Bestimmung einer niedrigen Spermienzahl im gesamten Neubauer-improved-Hämozytometer (Phasenkontrast-Mikroskopie)	45
Durchführung	45
Berechnung niedriger Spermienkonzentrationen im Ejakulat	47
Sensitivität der Methode	47
Berechnungsbeispiele	47
Berechnung der Spermiengesamtzahl im Ejakulat	48
2.11.2 Erfassung einer niedrigen Spermienzahl in großvolumigen Einweg-Zählkammern (Fluoreszenzmikroskopie)	48
Durchführung	48
Berechnung niedriger Spermienkonzentrationen im Ejakulat	49
Sensitivität der Methode	49
Berechnungsbeispiele	50
Berechnung der Spermiengesamtzahl im Ejakulat	51
2.12 Zählung von Zellen, die keine Spermien sind	51
2.12.1 Berechnung der Konzentration von Rundzellen im Ejakulat	51
2.12.2 Sensitivität der Methode	51
2.12.3 Berechnungsbeispiele	51

2.13	Spermienmorphologie	52
2.13.1	Das Konzept normaler Spermien	52
2.13.2	Vorbereitung des Ejakulatausstriches	53
	Normale Ejakulatproben	54
	Proben mit geringen Spermienkonzentrationen	55
	Visköse Ejakulatproben	55
	Waschen von zellreichen oder viskösen Ejakulaten und Reduzieren von Hintergrundartefakten für die computerunterstützte Spermienmorphometrie	56
2.14	Färbemethoden	56
2.14.1	Traditionelle Fixierung und sequentielle Färbung	56
2.14.2	Papanicolaou-Färbung für die Spermienmorphologie	57
	Reagenzien	57
	Fixierung der luftgetrockneten Ejakulatausstriche	57
	Färbung der fixierten Ejakulatausstriche	58
	Behandlung der gefärbten Ausstriche vor dem Einbetten	58
	Einbetten der gefärbten Ejakulatausstriche	58
2.14.3	Shorr-Färbung für die Spermienmorphologie	58
	Reagenzien	59
	Fixierung der luftgetrockneten Ejakulatausstriche	59
	Färbung der fixierten Ejakulatausstriche	59
	Einbetten der gefärbten Ejakulatausstriche	59
2.14.4	Schnellfärbemethoden für die Spermienmorphologie	59
	Reagenzien	59
	Fixierung der luftgetrockneten Ejakulatausstriche	59
	Färbung der fixierten Ejakulatausstriche	59
	Einbetten der gefärbten Ejakulatausstriche	60
2.15	Beurteilung der gefärbten Präparate	60
2.15.1	Klassifizierung der normalen Spermienmorphologie	60
2.15.2	Klassifizierung der abnormalen Spermienmorphologie	61
2.16	Abbildungen zur Spermienmorphologie	62
2.17	Analyse eines Ejakulatausstriches	94
2.17.1	Beurteilung der normalen Spermienmorphologie	94
2.17.2	Arbeitsbeispiel	94
2.17.3	Unterer Referenzbereich	95
2.17.4	Bestimmung der abnormalen Spermienmorphologie	95
2.17.5	Arbeitsbeispiel	95
2.17.6	Beurteilung spezifischer Spermiedefekte	95
2.18	Beurteilung der Leukozyten im Ejakulat	96
2.18.1	Zelluläre Peroxidase-Färbung mit Ortho-Toluidin	96
	Prinzip	96
	Reagenzien	97
	Durchführung	97
	Bestimmung der Peroxidase-positiven Zellzahl im Hämozytometer	97
	Kalkulation der Konzentration der peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat	98
	Sensitivität der Methode	98
	Arbeitsbeispiele	98
	Referenzwerte	99

2.19	Beurteilung unreifer Keimzellen im Ejakulat	100
2.20	Testung auf Spermienantikörper	100
2.20.1	Der gemischte Antiglobulin-Reaktions-Test	101
	Durchführung	101
	Beurteilung	102
	Referenzwerte	102
2.20.2	Der direkte Immunobead-Test	102
	Reagenzien	103
	Vorbereitung der Immunobeads	103
	Vorbereitung der Spermien	103
	Durchführung	103
	Referenzwerte	104
2.20.3	Der indirekte Immunobead-Test	104
	Reagenzien	104
	Vorbereitung der Immunobeads	104
	Vorbereitung der Spenderspermien	104
	Vorbereitung der zu testenden Flüssigkeiten	104
	Inkubation der Spenderspermien mit den zu testenden Flüssigkeiten	105
	Immunobead-Test	105
3	Fakultative Untersuchungen	107
3.1	Index für multiple Spermiedefekte	109
3.1.1	Errechnen der Indizes für multiple morphologische Defekte	109
3.1.2	Beispiel	109
3.2	Panleukozyten-Marker CD45	110
3.2.1	Prinzip	110
3.2.2	Reagenzien	111
3.2.3	Durchführung	112
	Vorbereitung des Samens	112
	Anfertigen der Spermienausstriche	112
	Antikörper-Inkubation	112
	Färbung und Einbettung	112
	Beurteilung der CD45-positiven Zellen	112
	Errechnen der CD45-Zell-Konzentration im Ejakulat	113
	Sensitivität der Methode	113
	Beispiele	113
	Referenzbereiche	113
3.3	Interaktionen zwischen Zervikalschleim und Spermien	114
3.3.1	In-vivo-Test (postkoital)	114
	Ziel	114
	Timing	114
	Instruktionen für die Patienten	114
	Durchführung	114
	Die Untersuchung des Vaginalsekretes	115
	Die Untersuchung der Mukusprobe	115
	Interpretation	115
3.3.2	In-vitro-Tests	116

3.3.3	Vereinfachter In-vitro-Test	117
	Durchführung	117
	Beobachtungen	117
	Beurteilung	118
3.3.4	Kapillar-Test	118
	Materialien	118
	Durchführung	118
	Untersuchung der Flachkapillare	119
	Interpretation	120
3.4	Biochemische Marker zur Testung der Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen	120
3.4.1	Die Bestimmung von Zink im Seminalplasma	121
	Hintergrund	121
	Prinzip	121
	Reagenzien	121
	Durchführung	121
	Berechnung	122
	Unterer Referenzbereich	122
3.4.2	Bestimmung der Fruktose aus dem Seminalplasma	122
	Hintergrund	122
	Prinzip	122
	Reagenzien	122
	Durchführung	123
	Berechnung	123
	Unterer Referenzbereich	124
3.4.3	Bestimmung der neutralen α -Glukosidase im Seminalplasma	124
	Hintergrund	124
	Prinzip	124
	Reagenzien	124
	Durchführung	125
	Berechnung	125
	Unterer Referenzbereich	126
3.5	Computerassistierte Spermienanalyse	126
3.5.1	Einführung	126
3.5.2	Verwendung der CASA zur Bestimmung der Spermienmotilität	126
	Durchführung	127
	Probenvorbereitung	127
	CASA-Terminologie	127
3.5.3	CASA zur Bestimmung der Spermienkonzentration	128
3.5.4	Computergestützte Untersuchung der Spermienmorphologie (CASMA)	129
4	Forschungsrelevante Methoden	131
4.1	Reaktive Sauerstoffradikale	133
4.1.1	Einleitung	133
4.1.2	ROS-Bestimmung in Spermensuspensionen	133
	Prinzip	133
	Reagenzien	134
	Opsonisierung des Zymosan	134

Bestimmung spontaner ROS-Produktion	134
FMLP-Provokationstest in Leukozyten	135
Zymosan-Provokationstest in Leukozyten	135
PMA-Provokationstest für Bestimmung der ROS-Produktion von Leukozyten und Spermien	135
Ergebnisse	135
4.2 Humane Spermien-Oozyten-Interaktionstests	135
4.3 Humaner Zona-pellucida-Bindungstest	135
4.4 Beurteilung der Akrosomreaktion	136
4.4.1 Fluoreszenzverfahren zur Bestimmung der Akrosomreaktion	136
Reagenzien	136
Einfaches Waschen der Spermien	137
Behandlung der gereinigten Spermienpräparation	137
Abstrichpräparation	137
PSA-FITC-Färbung	137
Bewertung	137
Quantitative Bestimmung der Akrosomreaktion	137
4.4.2 Induzierter Akrosomreaktionstest	138
Reagenzien	138
Verfahren	138
Bewertung	138
Qualitätskontrolle	139
4.5 Hamster-Oozyten-Penetrationstest	139
4.5.1 Protokolle	139
Reagenzien	139
Standardprotokoll ohne Ionophor-Stimulation	139
Alternative Protokolle mit Kalzium-Ionophor (Ca^{2+})	140
Gewinnung der Ovarien	140
Gewinnung der Kumulusmassen	141
Aufbereitung der Hamsteroozyten	141
Ko-Inkubation der Gameten	141
Analyse der Oozyten	141
Qualitätskontrolle	142
4.6 Spermien-Chromatin-Test	142

II Spermienpräparationen

5 Spermienpräparationstechniken	145
5.1 Einleitung	146
5.1.1 Wann ist das Abtrennen der Spermien vom Seminalplasma sinnvoll	146
5.1.2 Methodenwahl	146
5.1.3 Effizienz der Spermienseparation vom Seminalplasma und von infektiösen Organismen ..	147
5.2 Generelle Prinzipien der Spermienpräparationstechniken	147
5.3 Einfaches Waschen	147
5.3.1 Reagenzien	148
5.3.2 Durchführung	148
5.4 Direkter Swim-up	148
5.4.1 Reagenzien	148

5.4.2	Durchführung	149
5.5	Diskontinuierlicher Dichtegradient	149
5.5.1	Reagenzien	149
5.5.2	Durchführung	150
5.6	Präparation von HIV-infizierten Spermienproben	150
5.7	Präparation testikulärer und epididymaler Spermien	150
5.7.1	Enzymatische Methode	151
5.7.2	Mechanische Methode	151
5.7.3	Verarbeitung der Spermienuspension zur intrazytoplasmatischen Spermieninjektion ...	151
5.8	Präparation von retrograden Spermienproben	151
5.9	Präparation von mit technischer Hilfe gewonnenen Ejakulatproben	152
6	Kryokonservierung von Spermien	153
6.1	Einleitung	154
6.2	Protokolle zur Kryokonservierung des Ejakulats	156
6.2.1	Standarddurchführung	156
	Vorbereitung des GEYC-Kryoprotektivums	156
	Beimengung des Kryoprotektivums zum Ejakulat	157
	Befüllen der Plastikstraws (»Strohhalme«) der Kryokassetten	157
	Versiegeln der Kryostraws	157
	Kühlen und Einfrieren des Ejakulates in programmierbaren Einfriergeräten	157
	Manuelles Einfrieren und Auftauen des Ejakulates	158
	Aufbewahrung der kryokonservierten Samenproben	158
	Transport von kryokonservierten Samenproben	158
	Auftauen der kryokonservierten Samenproben	158
6.2.2	Modifizierte Einfrierprotokolle für oligozoosperme Proben und operativ gewonnene Spermien	158
	Modifizierte Kryoprotektiva (TGG)	159
	Durchführung	159
6.2.3	Beschriftung der Kryostraws und Kassetten	159
III	Qualitätssicherung	
7	Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle	163
7.1	Qualitätskontrolle im Andrologielabor	165
7.2	Die Art von Fehlern bei der Ejakulatanalyse	165
7.3	Minimierung des Stichprobenfehlers	166
7.4	Programm zur Qualitätskontrolle (QK)	166
7.5	Standardisierte Verfahrensanweisungen (SOPs)	168
7.6	Interne Qualitätskontrolle (IQK)	169
7.6.1	Käuflich erhältliche QK-Proben	169
7.6.2	Selbst hergestellte QK-Proben	169
7.6.3	Gelagerte QK-Proben (gekauft oder selbst hergestellt)	169
	Spermienkonzentration	169
	Spermienmorphologie und Vitalität	170
	Spermienmotilität	170
7.6.4	Frische QK-Proben (selbst hergestellt)	170

7.7	Statistische Verfahren zur Analyse und Dokumentation systematischer Fehler desselben Technikers oder zwischen mehreren Technikern	170
7.7.1	Mittelwertkarte	171
	Kontrollgrenze einer Mittelwertkarte berechnen	171
	Graphische Darstellung der Mittelwertkarte	171
7.7.2	Die S-Karte	171
	Bestimmung der Kontrollgrenze für die S-Karte	171
	Graphische Darstellung der S-Karte	172
7.8	QK mit relativen Werten (Prozentangaben)	173
7.9	Handhabung und Kontrolle der X- und S-Karten	174
7.9.1	Wie kann man fehlerhafte Verfahren erkennen?	174
7.9.2	Ursachen für »nichtbestandene« Verfahrenswerte	174
7.9.3	Reaktion nach Erhalt unbestandener QK-Probenwerte	175
7.10	Statistische Verfahren zur Analyse der Variabilität zwischen Technikern	175
7.10.1	Vergleich von Resultaten zwischen zwei oder mehreren Technikern	176
7.10.2	Erstellen monatlicher Mittelwerte	178
7.11	Externe Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung	178
7.11.1	Bestimmung der EQK-Ergebnisse	178
7.11.2	Reaktionsmaßnahmen bei nicht bestandener Bewertung	181
7.12	Frequenz und Priorität der Qualitätskontrolle	183
7.13	Ausbildung	183
7.13.1	Praktische Hinweise für die Bestimmung der Spermienkonzentration	184
7.13.2	Praktische Hinweise für die Bestimmung der Spermienmorphologie	185
7.13.3	Praktische Hinweise für die Beurteilung der Spermienmotilität	185
7.13.4	Praktische Hinweise für die Bestimmung der Spermienvitalität	185

IV Appendices

8	Referenzwerte und Nomenklatur der Ejakulatanalyse	189
8.1	Referenzwerte	190
8.2	Nomenklatur	192
9	Ausstattung und Sicherheit	193
9.1	Grundausstattung eines Andrologielabors	194
9.1.1	Allgemeine Ausstattung für das Andrologielabor	194
9.1.2	Notwendige Ausstattung und Materialien für eine Ejakulatanalyse	194
9.1.3	Notwendige Chemikalien und Reagenzien	195
9.2	Potentielle Gefährdungen im Andrologielabor	196
9.3	Sicherheitsvorkehrungen für das Personal im Andrologielabor	196
9.4	Sicherheitsmaßnahmen in Bezug auf die Laboreinrichtung	198
9.5	Sicherheitsvorkehrungen beim Arbeiten mit flüssigem Stickstoff	198
10	Mikroskopie im Andrologielabor	201
10.1	Das Auflegen der Probe	202
10.2	Einstellen des Okulars	204
10.3	Fokussieren des Bildes	204
10.4	Fokussieren des Okulars	204

10.5	Fokussieren des Lichtkondensators	204
10.6	Zentrieren des Kondensors	205
10.7	Einstellen der Phasenringe	205
10.8	Fluoreszenzmikroskopie	205
11	Vorrats- und Arbeitslösungen	207
11.1	Biggers, Whitten und Whittingham	208
11.2	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung	208
11.3	Earle's Medium	208
11.4	Ham's-F-10-Medium	209
11.5	Hanks'-Pufferlösung	209
11.6	HTF-Medium (Human-Tubular-Fluid)	209
11.7	Krebs-Ringer-Medium	209
11.8	Tris-gepufferte Kochsalzlösung	210
11.9	Tyrode-Lösung	210
11.10	Papanicolaou-Färbung	210
12	Zervikalmukus	213
12.1	Einführung	214
12.2	Gewinnung und Konservierung des Zervikalmukus	215
12.2.1	Gewinnung	215
12.2.2	Lagerung und Konservierung	215
12.3	Beurteilung des Zervikalmukus	216
12.3.1	Volumen	216
12.3.2	Konsistenz (Viskosität)	216
12.3.3	Farnkrautbildung	216
12.3.4	Spinnbarkeit	217
12.3.5	Zelluläre Bestandteile	217
12.3.6	pH-Wert	217
13	Befundbögen für Ejakulatuntersuchungen und Untersuchungen des Zervikalmukus	219
13.1	Vorlage für einen Befundbogen für Ejakulatuntersuchungen	220
13.2	Vorlage für einen Befundbogen für Zervikalmukus-Untersuchungen	222
14	Messfehler und Qualitätskontrolle	223
14.1	Fehler bei der Messung der Spermienkonzentration	225
14.1.1	Fehler bei Zählungen	225
14.1.2	Übereinstimmung von wiederholten Zählungen (Replikaten)	225
14.2	Die Bedeutung der Kenntnis von Messfehlern	225
14.3	Fehler bei der Messung von Prozenten	228
14.3.1	Fehler bei der Bestimmung von Prozentsätzen	228
14.3.2	Übereinstimmung zwischen Prozentsätzen von Wiederholungsmessungen	228
14.4	Herstellung von Ejakulatproben für die Qualitätskontrolle	229
14.5	Vorbereitung von Videoaufnahmen für die interne Qualitätskontrolle der Analyse der Spermienmotilität	231
14.5.1	Zusätzliche Geräte	231
14.5.2	Durchführung	231

14.5.3	Analyse der Videoaufnahmen	233
14.6	Vorbereitung von verdünntem Ejakulat für die interne Qualitätskontrolle der Spermienkonzentrationsbestimmung	234
14.6.1	Allgemeine Überlegungen	234
14.6.2	Reagenzien	235
14.6.3	Zusätzliche Ausrüstung	235
14.6.4	Durchführung	235
14.6.5	Nutzung der gelagerten Proben für die interne Qualitätskontrolle	236
14.7	Herstellung von Objekträgern für die interne Qualitätskontrolle für die Bestimmung der Spermienmorphologie	237
14.7.1	Allgemeine Überlegungen	237
14.7.2	Durchführung	237
14.8	Kalibrierung der Laborausstattung	238
14.8.1	Waagen	238
14.8.2	Pipetten	239
14.8.3	Tiefe der Kammern	239
14.8.4	Inkubatoren	239
14.8.5	pH-Papier	239
14.8.6	Andere Geräte	239
15	Nationale externe Qualitätskontrollprogramme für die Ejakulatanalyse ...	241
	Literatur	243