

# Inhaltsverzeichnis

1	<b>Hintergrund</b>	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	<b>Standardverfahren</b>	7
2.1	Einleitung	10
2.2	Probengewinnung	13
2.2.1	Vorbereitung	13
2.2.2	Gewinnung des Ejakulates für diagnostische und Forschungszwecke	13
2.2.3	Sterile Probengewinnung im Rahmen der assistierten Reproduktion	13
2.2.4	Sterile Probengewinnung für die mikrobiologische Untersuchung	14
2.2.5	Probengewinnung zu Hause	14
2.2.6	Probengewinnung mittels Kondom	14
2.2.7	Sichere Probenhandhabung	15
2.3	Erste makroskopische Untersuchung	15
2.3.1	Liquifizierung (Verflüssigung)	15
2.3.2	Konsistenz	16
2.3.3	Aussehen des Ejakulates	16
2.3.4	Ejakulatvolumen	16
2.3.5	pH-Wert des Ejakulates	17
2.4	Erste mikroskopische Untersuchung	18
2.4.1	Gründliche Mischung und repräsentative Probenentnahme	18
2.4.2	Herstellung eines Feuchtpräparates	18
2.4.3	Spermienaggregationen	19
2.4.4	Spermienagglutinationen	19
2.4.5	Zelluläre Elemente außer Spermien	20
2.5	Spermienmotilität	22
2.5.1	Klassifizierung der Spermienmotilität	22
2.5.2	Vorbereitung der Probe und Beurteilung der Motilität	23
2.5.3	Arbeitsbeispiele	24
2.5.4	Untere Referenzgrenze	25
2.6	Spermienvitalität	25
2.6.1	Vitalitätstest mittels Eosin-Nigrosin	26
2.6.2	Vitalitätstest mittels Eosin allein	27
2.6.3	Vitalitätstest mittels hypoosmotischer Schwellung	28
2.7	Spermienzahl	30
2.7.1	Verschiedene Arten von Zählkammern	31
2.7.2	Das Neubauer-improved-Hämozytometer	31
2.7.3	Anwendung des Hämozytometer-Rasters	32
2.7.4	Pflege der Zählkammer	33
2.7.5	Diluent zur Ejakulatverdünnung	33

27.6	Die Notwendigkeit, eine ausreichende Anzahl an Spermien zu zählen .....	33
2.8	<b>Routine-Zählverfahren</b> .....	34
2.8.1	Bestimmung der erforderlichen Verdünnung .....	34
2.8.2	Vorbereitung der Verdünnungen und Beladung der Hämocytozometerkammer .....	36
2.8.3	Bestimmung der Spermienzahl in den Zählkammern .....	37
2.8.4	Berechnung der Spermienkonzentration im Ejakulat .....	38
2.8.5	Berechnungsbeispiele .....	38
2.8.6	Unterer Referenzwert für die Spermienkonzentration .....	40
2.8.7	Berechnung der Spermiengesamtzahl im Ejakulat .....	40
2.8.8	Unterer Referenzwert für die Spermiengesamtzahl .....	40
2.9	<b>Niedrige Spermienzahl: Kryptozoospermie und vermutete Azoospermie</b> .....	40
2.10	<b>Wenn eine exakte Bestimmung einer niedrigen Spermienzahl nicht notwendig ist</b> ....	41
2.10.1	Keine weiteren Maßnahmen ergreifen .....	41
2.10.2	Untersuchung von zentrifugierten Proben, um Spermien zu finden .....	41
2.10.3	Untersuchung von nicht zentrifugierten Proben, um bewegliche Spermien zu finden .....	42
2.11	<b>Wenn eine genaue Bestimmung auch bei wenigen Spermien notwendig ist</b> .....	43
2.11.1	Die Bestimmung einer niedrigen Spermienzahl im gesamten Neubauer-improved-Hämocytozometer (Phasenkontrast-Mikroskopie) .....	43
2.11.2	Erfassung einer niedrigen Spermienzahl in großvolumigen Einweg-Zählkammern (Fluoreszenzmikroskopie) .....	46
2.12	<b>Zählung von Zellen, die keine Spermien sind</b> .....	49
2.12.1	Berechnung der Konzentration von Rundzellen im Ejakulat .....	49
2.12.2	Sensitivität der Methode .....	49
2.12.3	Berechnungsbeispiele .....	49
2.13	<b>Spermienmorphologie</b> .....	50
2.13.1	Das Konzept normaler Spermien .....	50
2.13.2	Vorbereitung des Ejakulatausstriches .....	51
2.14	<b>Färbemethoden</b> .....	54
2.14.1	Traditionelle Fixierung und sequentielle Färbung .....	54
2.14.2	Papanicolaou-Färbung für die Spermienmorphologie .....	55
2.14.3	Shorr-Färbung für die Spermienmorphologie .....	56
2.14.4	Schnellfärbemethoden für die Spermienmorphologie .....	57
2.15	<b>Beurteilung der gefärbten Präparate</b> .....	58
2.15.1	Klassifizierung der normalen Spermienmorphologie .....	58
2.15.2	Klassifikation der abnormalen Spermienmorphologie .....	59
2.16	<b>Abbildungen zur Spermienmorphologie</b> .....	60
2.17	<b>Analyse eines Ejakulatausstriches</b> .....	92
2.17.1	Beurteilung der normalen Spermienmorphologie .....	92
2.17.2	Arbeitsbeispiel .....	92
2.17.3	Unterer Referenzbereich .....	93
2.17.4	Bestimmung der abnormalen Spermienmorphologie .....	93
2.17.5	Arbeitsbeispiel .....	93
2.17.6	Beurteilung spezifischer Spermiendefekte .....	93
2.18	<b>Beurteilung der Leukozyten im Ejakulat</b> .....	94
2.18.1	Zelluläre Peroxidase-Färbung mit Ortho-Toluidin .....	94
2.19	<b>Beurteilung unreifer Keimzellen im Ejakulat</b> .....	98
2.20	<b>Testung auf Spermienantikörper</b> .....	98
2.20.1	Der gemischte Antiglobulin-Reaktions-Test .....	99

2.20.2	Der direkte Immunobead-Test .....	100
2.20.3	Der indirekte Immunobead-Test .....	102
<b>3</b>	<b>Fakultative Untersuchungen .....</b>	<b>105</b>
3.1	Index für multiple Spermiendefekte .....	106
3.1.1	Errechnen der Indizes für multiple morphologische Defekte .....	106
3.1.2	Beispiel .....	106
3.2	Panleukozyten-Marker CD45 .....	107
3.2.1	Prinzip .....	107
3.2.2	Reagenzien .....	108
3.2.3	Durchführung .....	109
3.3	Interaktionen zwischen Zervikalschleim und Spermien .....	111
3.3.1	In-vivo-Test (postkoital) .....	111
3.3.2	In-vitro-Tests .....	113
3.3.3	Vereinfachter In-vitro-Test .....	114
3.3.4	Kapillar-Test .....	115
3.4	Biochemische Marker zur Testung der Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen .....	117
3.4.1	Die Bestimmung von Zink im Seminalplasma .....	118
3.4.2	Bestimmung der Fruktose aus dem Seminalplasma .....	119
3.4.3	Bestimmung der neutralen $\alpha$ -Glukosidase im Seminalplasma .....	121
3.5	Computerassistierte Spermienanalyse .....	123
3.5.1	Einführung .....	123
3.5.2	Verwendung der CASA zur Bestimmung der Spermienmotilität .....	123
3.5.3	CASA zur Bestimmung der Spermienkonzentration .....	125
3.5.4	Computergestützte Untersuchung der Spermienmorphologie (CASMA) .....	126
<b>4</b>	<b>Forschungsrelevante Methoden .....</b>	<b>129</b>
4.1	Reaktive Sauerstoffradikale .....	130
4.1.1	Einleitung .....	130
4.1.2	ROS-Bestimmung in Spermien suspensionen .....	130
4.2	Humane Spermien-Oozyten-Interaktionstests .....	132
4.3	Humaner Zona-pellucida-Bindungstest .....	132
4.4	Beurteilung der Akrosomreaktion .....	133
4.4.1	Fluoreszenzverfahren zur Bestimmung der Akrosomreaktion .....	133
4.4.2	Induzierter Akrosomreaktionstest .....	135
4.5	Hamster-Oozyten-Penetrationstest .....	136
4.5.1	Protokolle .....	136
4.6	Spermien-Chromatin-Test .....	139

## **II Spermienpräparationen**

<b>5</b>	<b>Spermienpräparationstechniken .....</b>	<b>143</b>
5.1	Einleitung .....	144
5.1.1	Wann ist das Abtrennen der Spermien vom Seminalplasma sinnvoll .....	144
5.1.2	Methodenwahl .....	144
5.1.3	Effizienz der Spermien separation vom Seminalplasma und von infektiösen Organismen ...	145

5.2	<b>Generelle Prinzipien der Spermienpräparationstechniken</b>	145
5.3	<b>Einfaches Waschen</b>	145
5.3.1	Reagenzien	146
5.3.2	Durchführung	146
5.4	<b>Direkter Swim-up</b>	146
5.4.1	Reagenzien	146
5.4.2	Durchführung	147
5.5	<b>Diskontinuierlicher Dichtegradient</b>	147
5.5.1	Reagenzien	147
5.5.2	Durchführung	148
5.6	<b>Präparation von HIV-infizierten Spermienproben</b>	148
5.7	<b>Präparation testikulärer und epididymaler Spermien</b>	148
5.7.1	Enzymatische Methode	149
5.7.2	Mechanische Methode	149
5.7.3	Verarbeitung der Spermiesuspension zur intrazytoplasmatischen Spermieninjektion	149
5.8	<b>Präparation von retrograden Spermienproben</b>	149
5.9	<b>Präparation von mit technischer Hilfe gewonnenen Ejakulatproben</b>	150
6	<b>Kryokonservierung von Spermien</b>	151
6.1	Einleitung	152
6.2	<b>Protokolle zur Kryokonservierung des Ejakulats</b>	154
6.2.1	Standarddurchführung	154
6.2.2	Modifizierte Einfrierprotokolle für oligozoosperme Proben und operativ gewonnene Spermien	156
6.2.3	Beschriftung der Kryostraws und Kassetten	157

### **III Qualitätssicherung**

7	<b>Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle</b>	161
7.1	<b>Qualitätskontrolle im Andrologielabor</b>	163
7.2	<b>Die Art von Fehlern bei der Ejakulatanalyse</b>	163
7.3	<b>Minimierung des Stichprobenfehlers</b>	164
7.4	<b>Programm zur Qualitätskontrolle (QK)</b>	164
7.5	<b>Standardisierte Verfahrensanweisungen (SOPs)</b>	166
7.6	<b>Interne Qualitätskontrolle (IQK)</b>	167
7.6.1	Käuflich erhältliche QK-Proben	167
7.6.2	Selbst hergestellte QK-Proben	167
7.6.3	Gelagerte QK-Proben (gekauft oder selbst hergestellt)	167
7.6.4	Frische QK-Proben (selbst hergestellt)	168
7.7	<b>Statistische Verfahren zur Analyse und Dokumentation systematischer Fehler desselben Technikers oder zwischen mehreren Technikern</b>	168
7.7.1	Mittelwertkarte	169
7.7.2	Die S-Karte	169
7.8	<b>QK mit relativen Werten (Prozentangaben)</b>	171
7.9	<b>Handhabung und Kontrolle der X- und S-Karten</b>	172
7.9.1	Wie kann man fehlerhafte Verfahren erkennen?	172
7.9.2	Ursachen für »nichtbestandene« Verfahrenswerte	172
7.9.3	Reaktion nach Erhalt unbestandener QK-Probenwerte	173

7.10	<b>Statistische Verfahren zur Analyse der Variabilität zwischen Technikern</b>	173
7.10.1	Vergleich von Resultaten zwischen zwei oder mehreren Technikern	174
7.10.2	Erstellen monatlicher Mittelwerte	176
7.11	<b>Externe Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung</b>	176
7.11.1	Bestimmung der EQK-Ergebnisse	176
7.11.2	Reaktionsmaßnahmen bei nicht bestandener Bewertung	179
7.12	<b>Frequenz und Priorität der Qualitätskontrolle</b>	181
7.13	<b>Ausbildung</b>	181
7.13.1	Praktische Hinweise für die Bestimmung der Spermienkonzentration	182
7.13.2	Praktische Hinweise für die Bestimmung der Spermienmorphologie	183
7.13.3	Praktische Hinweise für die Beurteilung der Spermienmotilität	183
7.13.4	Praktische Hinweise für die Bestimmung der Spermienvitalität	183

## IV Appendices

8	<b>Referenzwerte und Nomenklatur der Ejakulatanalyse</b>	187
8.1	Referenzwerte	188
8.2	Nomenklatur	190
9	<b>Ausstattung und Sicherheit</b>	191
9.1	Grundausstattung eines Andrologielabors	192
9.1.1	Allgemeine Ausstattung für das Andrologielabor	192
9.1.2	Notwendige Ausstattung und Materialien für eine Ejakulatanalyse	192
9.1.3	Notwendige Chemikalien und Reagenzien	193
9.2	Potentielle Gefährdungen im Andrologielabor	194
9.3	Sicherheitsvorkehrungen für das Personal im Andrologielabor	194
9.4	Sicherheitsmaßnahmen in Bezug auf die Laboreinrichtung	196
9.5	Sicherheitsvorkehrungen beim Arbeiten mit flüssigem Stickstoff	196
10	<b>Mikroskopie im Andrologielabor</b>	199
10.1	Das Auflegen der Probe	200
10.2	Einstellen des Okulars	202
10.3	Fokussieren des Bildes	202
10.4	Fokussieren des Okulars	202
10.5	Fokussieren des Lichtkondensators	202
10.6	Zentrieren des Kondensors	203
10.7	Einstellen der Phasenringe	203
10.8	Fluoreszenzmikroskopie	203
11	<b>Vorrats- und Arbeitslösungen</b>	205
11.1	Biggers, Whitten und Whittingham	206
11.2	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung	206
11.3	Earle's Medium	206
11.4	Ham's-F-10-Medium	207
11.5	Hanks'-Pufferlösung	207
11.6	HTF-Medium (Human-Tubular-Fluid)	207
11.7	Krebs-Ringer-Medium	207
11.8	Tris-gepufferte Kochsalzlösung	208

11.9	<b>Tyrode-Lösung</b>	208
11.10	<b>Papanicolaou-Färbung</b>	208
12	<b>Zervikalmukus</b>	211
12.1	<b>Einführung</b>	212
12.2	<b>Gewinnung und Konservierung des Zervikalmukus</b>	213
12.2.1	Gewinnung	213
12.2.2	Lagerung und Konservierung	213
12.3	<b>Beurteilung des Zervikalmukus</b>	214
12.3.1	Volumen	214
12.3.2	Konsistenz (Viskosität)	214
12.3.3	Farnkrautbildung	214
12.3.4	Spinnbarkeit	215
12.3.5	Zelluläre Bestandteile	215
12.3.6	pH-Wert	215
13	<b>Befundbögen für Ejakulatuntersuchungen und Untersuchungen des Zervikalmukus</b>	217
13.1	<b>Vorlage für einen Befundbogen für Ejakulatuntersuchungen</b>	218
13.2	<b>Vorlage für einen Befundbogen für Zervikalmukus-Untersuchungen</b>	220
14	<b>Messfehler und Qualitätskontrolle</b>	221
14.1	<b>Fehler bei der Messung der Spermienkonzentration</b>	223
14.1.1	Fehler bei Zählungen	223
14.1.2	Übereinstimmung von wiederholten Zählungen (Replikaten)	223
14.2	<b>Die Bedeutung der Kenntnis von Messfehlern</b>	223
14.3	<b>Fehler bei der Messung von Prozentsätzen</b>	226
14.3.1	Fehler bei der Bestimmung von Prozentsätzen	226
14.3.2	Übereinstimmung zwischen Prozentsätzen von Wiederholungsmessungen	226
14.4	<b>Herstellung von Ejakulatproben für die Qualitätskontrolle</b>	227
14.5	<b>Vorbereitung von Videoaufnahmen für die interne Qualitätskontrolle der Analyse der Spermienmotilität</b>	229
14.5.1	Zusätzliche Geräte	229
14.5.2	Durchführung	229
14.5.3	Analyse der Videoaufnahmen	231
14.6	<b>Vorbereitung von verdünntem Ejakulat für die interne Qualitätskontrolle der Spermienkonzentrationsbestimmung</b>	232
14.6.1	Allgemeine Überlegungen	232
14.6.2	Reagenzien	233
14.6.3	Zusätzliche Ausrüstung	233
14.6.4	Durchführung	233
14.6.5	Nutzung der gelagerten Proben für die interne Qualitätskontrolle	234
14.7	<b>Herstellung von Objektträgern für die interne Qualitätskontrolle für die Bestimmung der Spermienmorphologie</b>	235
14.7.1	Allgemeine Überlegungen	235
14.7.2	Durchführung	235

14.8	<b>Kalibrierung der Laborausstattung .....</b>	<b>236</b>
14.8.1	<b>Waagen .....</b>	<b>236</b>
14.8.2	<b>Pipetten .....</b>	<b>237</b>
14.8.3	<b>Tiefe der Kammern .....</b>	<b>237</b>
14.8.4	<b>Inkubatoren .....</b>	<b>237</b>
14.8.5	<b>pH-Papier .....</b>	<b>237</b>
14.8.6	<b>Andere Geräte .....</b>	<b>237</b>
15	<b>Nationale externe Qualitätskontrollprogramme für die Ejakulatanalyse ...</b>	<b>239</b>
	<b>Literatur .....</b>	<b>241</b>