

Standardverfahren

- 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 Spermiovitalität – 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
- 2.7.6 Die Notwendigkeit, eine ausreichende Anzahl an Spermien zu zählen – 33

2.8 Routine-Zählverfahren – 34

- 2.8.1 Bestimmung der erforderlichen Verdünnung – 34
- 2.8.2 Vorbereitung der Verdünnungen und Beladung der Hämozytometerkammer – 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 Niedrige Spermienzahl: Kryptozoospermie und vermutete Azoospermie – 40

2.10 Wenn eine exakte Bestimmung einer niedrigen Spermienzahl nicht notwendig ist – 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 Wenn eine genaue Bestimmung auch bei wenigen Spermien notwendig ist – 43

- 2.11.1 Die Bestimmung einer niedrigen Spermienzahl im gesamten Neubauer-improved-Hämozytometer (Phasenkontrast-Mikroskopie) – 43
- 2.11.2 Erfassung einer niedrigen Spermienzahl in großvolumigen Einweg-Zählkammern (Fluoreszenzmikroskopie) – 46

2.12 Zählung von Zellen, die keine Spermien sind – 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 Spermienmorphologie – 50**
 - 2.13.1 Das Konzept normaler Spermien – 50
 - 2.13.2 Vorbereitung des Ejakulatausstriches – 51
- 2.14 Färbemethoden – 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 Schnelfärbemethoden für die Spermienmorphologie – 57
- 2.15 Beurteilung der gefärbten Präparate – 58**
 - 2.15.1 Klassifizierung der normalen Spermienmorphologie – 58
 - 2.15.2 Klassifikation der abnormalen Spermienmorphologie – 59
- 2.16 Abbildungen zur Spermienmorphologie – 60**
- 2.17 Analyse eines Ejakulatausstriches – 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 Beurteilung der Leukozyten im Ejakulat – 94**
 - 2.18.1 Zelluläre Peroxidase-Färbung mit Ortho-Toluidin – 94
- 2.19 Beurteilung unreifer Keimzellen im Ejakulat – 98**
- 2.20 Testung auf Spermientikörper – 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

2.1 Einleitung

Während der Ejakulation wird das Ejakulat aus einer konzentrierten Spermien suspension, die in den paarig angelegten Nebenhoden gespeichert wird, mit den Flüssigkeiten aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gemischt und verdünnt. Es wird in mehreren Portionen ejakuliert. Ein Vergleich von Sperma volumina vor und nach einer Vasektomie zeigt, dass ungefähr 90% des Ejakulatvolumens aus Sekreten den akzessorischen Geschlechtsdrüsen besteht (Weiske 1994), vorwiegend aus der Prostata und den Samenbläschen mit einem kleineren Anteil aus den bulbourethralen (Cowper'schen) Drüsen und den Nebenhoden.

Das Ejakulat hat zwei hauptsächliche und quantifizierbare Bestandteile:

- Die Gesamtzahl der Spermien, die eine Aussage über die Spermienproduktion in den Testes und die Durchgängigkeit des posttestikulären Gangsystems erlaubt.
- Das gesamte Flüssigkeitsvolumen, das aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen stammt und deren sekretorische Aktivität widerspiegelt.

Die Beschaffenheit der Spermien (ihre Vitalität, Motilität und Morphologie) und die Zusammensetzung der Seminalflüssigkeit sind für die Spermienfunktion von großer Wichtigkeit.

Während des Geschlechtsverkehrs kommt die erste, spermienreiche prostatiche Fraktion des Ejakulates in Kontakt mit Zervikalmukus in der Vagina (Sobrero u. MacLeod 1962), wobei der Rest der Flüssigkeit als ein Pool in der Vagina verbleibt. Im Gegensatz dazu wird das gesamte Ejakulat unter Laborbedingungen in einem Gefäß gesammelt, wo die Spermien in einem Koagulum eingeschlossen sind, das aus Proteinen aus den Samenbläschen besteht. Dieses Koagulum wird später durch die prostatichen Proteasen liquifiziert, während die Osmolalität ansteigt (Björndahl u. Kvist 2003; Cooper et al. 2005).

Es gibt Hinweise, dass die Qualität der Samenprobe von der Art der Gewinnung abhängt. Ejakulate, die durch Masturbation in ein Gefäß in einem Raum nahe dem Labor gewonnen werden, können von minderer Qualität als solche sein, die aus

einem spermizidfreien Kondom während des Geschlechtsverkehrs zuhause gewonnen werden (Zavos u. Goodpasture 1989). Der Unterschied könnte durch die unterschiedliche sexuelle Stimulation bedingt sein, da die Zeitspanne zur Gewinnung der Probe durch Masturbation, die ein Maß für die Stimulation der akzessorischen Geschlechtsdrüsen ist, die Ejakulatqualität beeinflusst (Pound et al. 2002).

Unter den gegebenen Bedingungen der Probengewinnung hängt die Spermaqualität von normalerweise nicht zu beeinflussenden Faktoren ab wie die Spermienproduktion in den Testes, die Sekretionsaktivität der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und kürzlich durchgemachte, insbesondere febrile Erkrankungen sowie anderen Faktoren wie die Karenzzeit, die festgehalten werden muss und die für die Interpretation der Ergebnisse eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen der Spermaqualität hängen von folgenden Faktoren ab:

- Der Vollständigkeit der gewonnenen Probe: Die ersten ejakulierten Fraktionen enthalten vorwiegend spermienreiche Prostatasekrete, während die späteren Fraktionen vorwiegend aus Flüssigkeit der Samenbläschen bestehen (Björndahl u. Kvist 2003). Daher hat der Verlust der ersten, spermienreichen Fraktion des Ejakulates einen größeren Einfluss auf die Ergebnisse der Ejakulatanalyse als der Verlust der letzten Portion.
- Die Aktivität der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, deren Sekrete die konzentrierten epididymalen Spermatozoen während der Ejakulation verdünnen (Eliasson 2003): Die Spermienkonzentration ist nicht ein direktes Maß für den Spermienausstoß aus den Hoden, da das Ejakulatvolumen durch die Funktion anderer reproduktiver Organe beeinflusst wird, wohingegen die Gesamtspermienzahl im Ejakulat (Spermienkonzentration multipliziert mit dem Ejakulatvolumen) ein direktes Maß für die Spermienproduktion in den Hoden ist. So können z.B. die Spermienkonzentrationen in Ejakulaten jüngerer und älterer Männer gleich sein, die Gesamtspermienzahl kann jedoch unterschiedlich sein, da sowohl das Volumen der Samenflüssigkeit wie die Gesamt-

spermienproduktion mit dem Alter geringer werden, zumindest in einigen Populationen (Ng et al. 2004).

- Die Karenzzeit seit der letzten sexuellen Aktivität: Wenn nicht ejakuliert wird, kumulieren die Spermien in den Epididymides, treten dann in die Urethra über und werden mit dem Urin ausgespült (Cooper et al. 1993; De Jonge et al. 2004). Die Spermiovitalität und das Chromatin bleiben von der Länge der Abstinenzzeit unberührt (Tyler et al. 1982b; De Jonge et al. 2004), es sei denn, dass die Nebenhodenfunktion gestört ist (Correa-Perez et al. 2004).
- Die Zeit bis zur vorletzten Ejakulation: Da die Epididymides durch eine Ejakulation nicht vollständig geleert werden (Cooper et al. 1993), können noch einige Spermien von der vorhergehenden Ejakulation vorhanden sein. Dies beeinflusst das Altersspektrum und die Qualität der Spermien in einer Ejakulatprobe (Tyler et al. 1982a). Das Ausmaß dieser Einflussfaktoren ist schwierig zu beurteilen und wird kaum in Betracht gezogen.
- Das Hodenvolumen, das die Gesamtspermienzahl pro Ejakulat beeinflusst (Handelsman et al. 1984; WHO 1987; Behre et al. 2000; Andersen et al. 2000): Das Hodenvolumen spiegelt die spermatogenetische Aktivität wider, die wiederum die Spermienmorphologie beeinflusst (Holstein et al. 2003).

Kommentar

Die große biologische Bandbreite der Qualität der Ejakulate (Castilla et al. 2006) spiegelt die vielen hier aufgeführten Faktoren wider und verlangt, dass alle Messungen im Ejakulat präzise durchgeführt werden.

Diese variablen und weitgehend unkontrollierbaren Faktoren erklären die große intraindividuelle Variation in der Zusammensetzung des Ejakulates (Baker u. Kovacs 1985; Alvarez et al. 2003).

■ Abb. 2.1 zeigt die mit WHO-Methoden gemessenen Variationen über die Zeit in Ejakulatproben von 5 gesunden jungen Freiwilligen, die im Placeboarm einer Studie zur männlichen hormonellen Kontrazeption teilnahmen. Eine solche Variabilität

hat Konsequenzen für die Interpretation der Ejakulatanalyse:

- Es ist unmöglich, die Qualität des Ejakulates eines Mannes anhand der Beurteilung einer einzigen Probe zu erfassen.
- Daher sollten zwei oder drei Ejakulatproben analysiert werden, um Ausgangswerte zu erhalten (Poland et al. 1985; Berman et al. 1986; Carlsen et al. 2004; Castilla et al. 2006; Keel 2006).

Obwohl Untersuchungen der Gesamtpopulation der ejakulierten Spermien die Fertilisierungskapazität der wenigen Spermien, die bis zum Ort der Fertilisation gelangen, bestimmen können, liefert die Ejakulatanalyse dennoch essentielle Informationen über den klinischen Status eines Individuums. Alle Aspekte der Ejakulatgewinnung und -analyse müssen unter streng standardisierten Bedingungen durchgeführt werden, wenn sie valide und nützliche Informationen liefern sollen. Die in diesem Kapitel beschriebenen Methoden sind akzeptierte Verfahren, die die grundsätzlichen Schritte in der Ejakulatbewertung enthalten.

Die Ejakulatanalyse umfasst folgende Schritte (die in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben werden).

In den ersten 5 Minuten:

- Platzierung des Probenbehälters auf dem Labortisch oder in einem Inkubator (37 °C) zur Liquifizierung.

Zwischen 30 und 60 Minuten:

- Beurteilung der Liquifizierung und des Aussehens des Ejakulates.
- Messung des Ejakulatvolumens.
- Messung des pH-Wertes (falls erforderlich).
- Herstellung eines Feuchtpräparates für die mikroskopische Beurteilung, die Spermienmotilität und die für die Bestimmung der Spermienzahl notwendige Verdünnung.
- Bestimmung der Spermiovitalität (bei niedrigem Prozentsatz der motilen Spermien).
- Herstellung von Ausstrichen für die Beurteilung der Spermienmorphologie.
- Herstellung von Ejakulatverdünnungen, um die Spermienkonzentration zu bestimmen.
- Bestimmung der Spermienzahl.



■ **Abb. 2.1** Variation der Gesamtspermienzahl und der Spermienkonzentration über einen Zeitraum von 1 ½ Jahren. Ordinate links: Gesamtspermienzahl (10^6). Ordinate rechts: Konzentration (10^6 per ml). Abszisse rechts und links: Tag (mit freundlicher Genehmigung von Schering Plough und Bayer Schering Pharma AG)

- Durchführung des »Mixed-Antiglobulin-Reaction-(MAR-)Test« (wenn erforderlich).
- Bestimmung der Peroxidase-positiven Zellen (wenn Rundzellen vorhanden sind).
- Vorbereitung der Spermien für den Immunobead-Test (falls erforderlich).
- Zentrifugation des Ejakulates (falls biochemische Marker gemessen werden sollen).

Innerhalb von 3 Stunden:

- Weiterleiten von Proben an das Mikrobiologie-Labor (falls erforderlich).

Nach 4 Stunden:

- Fixieren, Färben und Beurteilung der Ausstriche für die Spermienmorphologie.

Später an demselben Tag (oder an einem der folgenden Tage, wenn die Proben eingefroren werden):

- Bestimmung der Markersubstanzen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (falls erforderlich).
- Durchführung des indirekten Immunobead-Tests (falls erforderlich).

2.2 Probengewinnung

2.2.1 Vorbereitung

- Die Ejakulatprobe sollte in einem separaten Raum nahe dem Labor gewonnen werden, um Temperaturschwankungen zu vermeiden und um die Zeit zwischen der Gewinnung und dem Beginn der Analyse zu kontrollieren (► Abschn. 2.2.5 und 2.2.6 im Hinblick auf Ausnahmen).
- Die Probe sollte nach mindestens 2 Tagen und maximal 7 Tagen sexueller Karenz gewonnen werden. Wenn weitere Proben benötigt werden, sollte die Zahl der Abstinenztage zwischen den Proben so konstant wie möglich sein.
- Der Patient/Proband sollte klare schriftliche und mündliche Anweisungen im Hinblick auf die Probengewinnung erhalten. Hierbei sollte betont werden, dass die Samenprobe komplett sein sollte und der Kandidat jeden Verlust berichten sollte.
- Die folgenden Informationen sollten im Laborprotokoll festgehalten werden (► Kap. 13, ► Abschn. 13.1): Name des Mannes, Geburtsdatum und persönliche Kodierungsnummer, die Karenzzeit, das Datum und die Zeit der Probengewinnung, die Vollständigkeit der Probe, eventuelle Schwierigkeiten beim Gewinnen der Probe und das Zeitintervall zwischen der Probengewinnung und dem Beginn der Ejakulatanalyse.

2.2.2 Gewinnung des Ejakulates für diagnostische und Forschungszwecke

- Die Probe sollte durch Masturbation gewonnen werden und in ein sauberes, weithalsiges Glas- oder Plastikgefäß ejakuliert werden, das aus einem Material hergestellt wurde, dessen Unschädlichkeit für Spermien nachgewiesen wurde (► Kasten 2.1).
- Das Probengefäß sollte bei einer Temperatur zwischen 20 und 37 °C gehalten werden, um starke Temperaturschwankungen zu vermei-

Kasten 2.1 Eignungsprüfung des Gefäßes für die Samenprobe

Mehrere Ejakulatproben mit einer hohen Spermienkonzentration und guter Motilität sollten ausgewählt werden. Die Hälfte der Probe wird in ein erwiesenermaßen nichttoxisches Gefäß eingebracht (Kontrolle) und die andere Hälfte wird in das Testgefäß eingebracht. Dann wird die Spermienmotilität (► Abschn. 2.5) bei Zimmertemperatur oder bei 37 °C in einstündigen Intervallen über 4 Stunden geprüft. Wenn sich bei keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen Kontrolle und Testprobe ergibt ($P > 0,05$ im gepaarten t-Test), kann das Gefäß als nichttoxisch für Spermatozoen betrachtet werden und erfüllt die Voraussetzungen für die Probengewinnung.

den, die die Spermien nach der Ejakulation beeinflussen könnten. Das Gefäß muss mit dem Namen des Patienten/Probanden und einer Identifikationsnummer versehen werden sowie mit dem Datum und dem Zeitpunkt der Gewinnung.

- Das Probengefäß sollte während der Liquifizierung auf dem Labortisch oder in einem Inkubator (37 °C) platziert werden.
- Auf dem Auswertungsbogen sollte vermerkt werden, wenn die Probe inkomplett ist, insbesondere wenn die erste spermienreiche Fraktion verloren gegangen ist. Wenn die Probe unvollständig ist, sollte eine zweite Probe wiederum nach einer Abstinenzzeit von 2–7 Tagen gewonnen werden.

2.2.3 Sterile Probengewinnung im Rahmen der assistierten Reproduktion

Die Probe wird wie für diagnostische Zwecke gewonnen (► Abschn. 2.2.2), aber das Probengefäß, die Pipettenspitzen und die Pipetten zum Mischen müssen steril sein.

2.2.4 Sterile Probengewinnung für die mikrobiologische Untersuchung

In diesem Fall muss eine mikrobiologische Kontamination aus anderen Quellen als dem Ejakulat vermieden werden (z.B. symbiotische Organismen auf der Haut). Das Probengefäß, die Pipettenspitzen und die Pipetten zum Mischen müssen steril sein.

Zu diesem Zwecke sollte der Patient/Proband:

- Urinieren
- Die Hände und den Penis mit Seife waschen, um das Risiko der Kontamination der Ejakulatprobe mit symbiotischen Organismen von der Haut zu vermindern.
- Die Seife abwaschen.
- Die Hände und den Penis mit einem frischen Einmalhandtuch trocknen.
- In einen sterilen Behälter ejakulieren.

Anmerkung

Die Zeit zwischen der Probengewinnung und dem Beginn der mikrobiologischen Untersuchung sollte nicht mehr als 3 Stunden betragen.

2.2.5 Probengewinnung zu Hause

- Unter besonderen Umständen kann die Probe ausnahmsweise zu Hause gewonnen werden, wenn z.B. eine Unfähigkeit zur Masturbation in der Klinik oder ein Mangel an passenden Räumlichkeiten nahe dem Labor besteht.
- Der Patient/Proband sollte klare schriftliche und mündliche Instruktionen zur Gewinnung und zum Transport der Ejakulatprobe erhalten. Dabei sollte betont werden, dass die Ejakulatprobe möglichst vollständig sein sollte, d.h., dass die gesamte Probe inklusive der ersten spermienreichen Fraktion aufgefangen wurde. Der Patient/Proband sollte jeden Verlust einer Portion melden, und dies sollte in dem Auswertebogen notiert werden.
- Der Patient/Proband sollte ein Gefäß mit bekanntem Gewicht erhalten, das mit dem Namen und der Identifizierungsnummer versehen ist.

- Der Patient/Proband sollte die Zeit der Probengewinnung festhalten und die Probe innerhalb 1 Stunde im Labor abliefern.
- Während des Transportes in das Labor sollte die Probe zwischen 20 und 37 °C gehalten werden.
- Der Laborbericht sollte vermerken, dass die Probe zu Hause oder an einem anderen Ort außerhalb des Labors gewonnen wurde.

2.2.6 Probengewinnung mittels Kondom

- Nur unter außergewöhnlichen Umständen wie bei nachgewiesener Unfähigkeit, ein Ejakulat durch Masturbation zu gewinnen, sollte die Probe mittels eines Kondoms während des Geschlechtsverkehrs gewonnen werden.
- Nur speziell für die Samengewinnung hergestellte und nicht-toxische Kondome sollten benutzt werden; solche Kondome sind kommerziell erhältlich.
- Der Patient/Proband sollte vom Hersteller klare Instruktionen erhalten, wie dieses Kondom benutzt, verschlossen und zum Labor gesandt oder transportiert wird.
- Der Patient/Proband sollte die Zeit der Ejakulatgewinnung registrieren und die Probe innerhalb 1 Stunde im Labor abliefern.
- Während des Transportes sollte die Probe zwischen 20 und 37 °C gehalten werden.
- Der Laborbericht sollte vermerken, dass die Probe mittels eines speziellen Kondoms während des Geschlechtsverkehrs zu Hause oder an einem anderen Ort außerhalb des Labors gewonnen wurde.

Anmerkung

Gebräuchliche Latex-Kondome dürfen nicht für die Ejakulatgewinnung benutzt werden, da sie mit der Motilität der Spermien interferierende Substanzen enthalten (Jones et al. 1986).

Kommentar

Coitus interruptus ist keine geeignete Methode zur Ejakulatgewinnung, da die erste Portion mit der höchsten Spermienzahl verloren gehen kann. Ferner kann die Probe mit Zellen und Bakterien

kontaminiert werden, und das niedrige pH der Vaginalsekrete können die Spermienmotilität negativ beeinflussen.

Kommentar

Wenn ein Patient/Proband keine Ejakulatprobe produzieren kann, kann der Postkoital-Test (► Abschn. 3.3.1) gewisse Information über die Spermien liefern.

2.2.7 Sichere Probenhandhabung

Ejakulatproben können gefährliche Krankheitserreger enthalten (z.B. human immunodeficiency virus [HIV], Hepatitis-Viren oder Herpes-simplex-Viren) und sollte deshalb als biologisches Risikomaterial gehandhabt werden. Wenn die Probe weiter verwendet wird für Bioassays, für die intrauterine Insemination (IUI), die In-vitro-Fertilisation (IVF) oder die intrazytoplasmische Spermieninjektion (ICSI) (► Abschn. 5.1) oder wenn eine Ejakultkultur angelegt werden soll (► Abschn. 2.2.4), müssen sterile Materialien und Techniken angewandt werden. Sicherheitsrichtlinien wie im Kapitel 9 dargestellt, sollten strikt eingehalten werden. Gute Laborpraxis (Good Laboratory Practice) ist eine grundsätzliche Voraussetzung für Sicherheit im Labor (WHO 2004).

2.3 Erste makroskopische Untersuchung

Die Ejakulatanalyse sollte mit einer einfachen Inspektion kurz nach der Liquifizierung beginnen, vorzugsweise nach 30 Minuten, aber nicht länger als 1 Stunde nach der Ejakulation, um Dehydrierung oder Temperaturschwankungen, die die Ejakulatqualität beeinflussen können, zu vermeiden.

2.3.1 Liquifizierung (Verflüssigung)

Das Ejakulat bildet typischerweise unmittelbar nach der Ejakulation in das Probengefäß eine halbfest koagulierte Masse. Innerhalb weniger Minuten bei Raumtemperatur beginnt das Ejakulat zu liqui-

fizieren (dünnflüssiger zu werden) und bildet in dieser Zeit eine Flüssigkeit mit unterschiedlich großen Klumpen. Mit Fortschreiten der Liquifizierung wird das Ejakulat immer homogener und flüssiger, und im Endstadium bleiben nur kleine Stellen mit Koageln übrig. Normalerweise liquifiziert das gesamte Ejakulat innerhalb von 15 Minuten bei Zimmertemperatur, gelegentlich nimmt der Vorgang auch bis zu 60 Minuten oder mehr in Anspruch. Wenn eine komplette Liquifizierung nicht innerhalb von 60 Minuten erfolgt, muss dies vermerkt werden. Zu Hause oder mittels Kondom gewonnene Ejakulatproben kommen normalerweise bereits verflüssigt im Labor an.

Eine normale liquifizierte Ejakulatprobe kann geleeartige Kügelchen enthalten, die nicht liquifizieren; diese sind offenbar ohne klinische Bedeutung. Wenn jedoch Schleimfäden auftreten, können diese mit der Ejakulatanalyse interferieren.

Anmerkung

Die Liquifizierung kann makroskopisch wie oben beschrieben und mikroskopisch festgestellt werden. Immobilisierte Spermien gewinnen während der Liquifizierung die Fähigkeit, sich zu bewegen. Wenn bei der mikroskopischen Untersuchung immobilisierte Spermien (aufgrund mangelhafter Liquifizierung) beobachtet werden, muss mehr Zeit für die komplette Verflüssigung angesetzt werden.

Anmerkung

Während der Liquifizierung kann sanftes Schütteln dazu beitragen, eine homogene Probe zu produzieren.

Anmerkung

Wenn die Ejakulatprobe nicht innerhalb von 30 Minuten liquifiziert, sollten weitere 30 Minuten abgewartet werden, bevor mit der Analyse fortgefahren wird. Wenn die Liquifizierung auch innerhalb von 60 Minuten nicht stattgefunden hat, sollte wie im nachfolgenden Abschnitt fortgefahren werden.

Verzögerte Liquifizierung

Gelegentlich liquifizieren Proben nicht, was die Untersuchung erschwert. In solchen Fällen kann eine zusätzliche mechanische oder enzymatische Behandlung notwendig sein.

1. Die Liquifizierung einiger Proben kann durch die Zugabe eines gleichen Volumens eines physiologischen Mediums (z.B. Dulbecco's Phosphatepuffer; ► Kap. 11, Abschn. 11.2) mit

Kasten 2.2 Präparation von Bromelaine

10 IU/ml Bromelaine werden in Dulbecco's phosphate buffered saline (► Kap. 11, Abschn. 11.2) angesetzt; es löst sich nur schwer auf, aber unter Mischen sollte sich der größte Anteil in 15–20 Minuten aufgelöst haben. Vermische das Ejakulat 1+1 (1:2) mit der 10 IU/ml Bromelaine-Lösung, rühre mit einer Pipettenspitze und inkubiere für 10 Minuten bei 37 °C. Durchmische die Probe gründlich vor der weiteren Analyse.

anschließendem wiederholten Pipettieren erreicht werden.

2. Inhomogenitäten können durch das wiederholte (6–10-mal) vorsichtige Aufziehen durch eine stumpfe Nadel mit Kaliber 18 (innerer Durchmesser 0,84 mm) oder Kaliber 19 (innerer Durchmesser 0,69 mm) in eine Spritze beseitigt werden.
3. Eine Inkubation mit Bromelaine, einem unspezifischen proteolytischen Enzym (EC 3.4.22.32), kann die Liquifizierung vorantreiben (► Kasten 2.2).

Kommentar

Diese Behandlungen können die Biochemie des Seminalplasmas, die Spermienmotilität und die Spermienmorphologie beeinflussen und daher muss ihre Anwendung vermerkt werden. Die 1+1 (1:2) Verdünnung des Ejakulates mit Bromelaine muss bei der Berechnung der Spermienkonzentration berücksichtigt werden.

2.3.2 Konsistenz

Nach der Liquifizierung kann die Konsistenz (oft als »Viskosität« bezeichnet) der Probe durch sanfte Aspiration in eine weitlumige (etwa 1,5 mm Durchmesser) Einmal-Plastikpipette beurteilt werden, indem das Ejakulat durch Schwerkraft aus der Pipette tropft und die Fadenlänge beobachtet wird. Eine normale Probe tropft in kleinen einzelnen Tropfen von der Pipette ab, wohingegen der Tropfen ab-

normer Konsistenz einen Faden von mehr als 2 cm Länge bildet.

Alternativ kann die Konsistenz durch Einführen eines Glasstabes und durch Beobachtung der Fadenlänge beurteilt werden, die sich bei Herausnehmen des Stabes bildet. Die Viskosität sollte als abnormal eingestuft werden, wenn der Faden länger als 2 cm wird.

Im Gegensatz zu einer nur teilweise liquifizierte Probe zeigt ein visköses Ejakulat eine homogene Klebrigkeit und seine Konsistenz wird sich mit der Zeit nicht ändern. Eine hohe Viskosität kann durch die plastischen Eigenschaften der Probe festgestellt werden, die fest zusammenhält, wenn man versucht, sie zu pipettieren. Zur Verminderung der Viskosität werden dieselben Methoden angewandt wie bei der verzögerten Liquifizierung (► Abschn. 2.3.1, »Verzögerte Liquifizierung«).

Anmerkung

Eine hohe Viskosität kann die Bestimmung der Spermienmotilität, der Spermienkonzentration, der Messung von Spermienantikörpern und der Bestimmung von biochemischen Markern beeinflussen.

2.3.3 Aussehen des Ejakulates

Eine normal liquifizierte Ejakulatprobe hat ein homogenes, grau-opales Aussehen. Sie mag weniger opak erscheinen, wenn die Spermienkonzentration sehr niedrig ist; die Farbe kann auch davon abweichen z.B. zu rot-braun, wenn rote Blutkörperchen anwesend sind oder zum Gelben hin bei Gelbsucht oder der Einnahme bestimmter Vitamine und Medikamente.

2.3.4 Ejakulatvolumen

Das Volumen des Ejakulates setzt sich vorwiegend aus Sekreten der Samenbläschen und der Prostata sowie einem kleinen Anteil aus den bulbourethralen Drüsen und den Epididymides zusammen. Die exakte Messung des Volumens ist für jede weitere Berechnung essentiell, da mittels des Volumens die Gesamtzahl der Spermien und anderer Zellen im Ejakulat berechnet werden.

WHO Laborhandbuch
zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen
Ejakulates
(Hrsg.)
2012, XVI, 250 S. 53 Abb., 19 Abb. in Farbe., Softcover
ISBN: 978-3-642-40211-1