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** ... 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

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 Schnellfärbemethoden 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 Spermienantikörper** ... 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

3 **Fakultative Untersuchungen** ... 105
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 α-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

4 **Forschungsrelevante Methoden** ... 129
4.1 **Reaktive Sauerstoffradikale** ... 130
4.1.1 Einleitung ... 130
4.1.2 ROS-Bestimmung in Spermiensuspensionen ... 130
4.2 **Humane Spermien-Oozyten-Interaktionstests** ... 132
4.3 **Humaner Zona-pellucida-Bindungstest** ... 132
4.4 **Beurteilung der Akrosomreaktion** ... 133
4.4.1 Fluoreszensverfahren 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

5 **Spermienpräparationstechniken** ... 143
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 Spermienseparation vom Seminalplasma und von infektiösen Organismen ... 145

5.2 **Generelle Prinzipien der Spermienpräparationstechniken** ... 145
5.3 **Einfaches Waschen** ... 145
5.3.1 Reagenzien ... 146
5.3.2 Durchführung ... 146
5.4 **Direkter Swim-up** ... 146
5.4.1 Reagenzien ... 146
5.4.2 Durchführung ... 147
5.5 **Diskontinuierlicher Dichtegradient** ... 147
5.5.1 Reagenzien ... 147
5.5.2 Durchführung ... 148
5.6 **Präparation von HIV-infizierten Spermienproben** ... 148
5.7 **Präparation testikulärer und epididymaler Spermien** ... 148
5.7.1 Enzymatische Methode ... 149
5.7.2 Mechanische Methode ... 149
5.7.3 Verarbeitung der Spermiensuspension zur intrazytoplasmatischen Spermieninjektion ... 149
5.8 **Präparation von retrograden Spermienproben** ... 149
5.9 **Präparation von mit technischer Hilfe gewonnenen Ejakulatproben** ... 150

6 **Kryokonservierung von Spermien** ... 151
6.1 **Einleitung** ... 152
6.2 **Protokolle zur Kryokonservierung des Ejakulats** ... 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 **Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle** ... 161
7.1 **Qualitätskontrolle im Andrologielabor** ... 163
7.2 **Die Art von Fehlern bei der Ejakulatanalyse** ... 163
7.3 **Minimierung des Stichprobenfehlers** ... 164
7.4 **Programm zur Qualitätskontrolle (QK)** ... 164
7.5 **Standardisierte Verfahrensanweisungen (SOPs)** ... 166
7.6 **Interne Qualitätskontrolle (IQK)** ... 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 **Statistische Verfahren zur Analyse und Dokumentation systematischer Fehler desselben Technikers oder zwischen mehreren Technikern** ... 168
7.7.1 Mittelwertkarte ... 169
7.7.2 Die S-Karte ... 169
7.8 **QK mit relativen Werten (Prozentangaben)** ... 171
7.9 **Handhabung und Kontrolle der X- und S-Karten** ... 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 **Statistische Verfahren zur Analyse der Variabilität zwischen Technikern** 173
7.10.1 Vergleich von Resultaten zwischen zwei oder mehreren Technikern 174
7.10.2 Erstellen monatlicher Mittelwerte 176
7.11 **Externe Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung** 176
7.11.1 Bestimmung der EQK-Ergebnisse 176
7.11.2 Reaktionsmaßnahmen bei nicht bestandener Bewertung 179
7.12 **Frequenz und Priorität der Qualitätskontrolle** 181
7.13 **Ausbildung** 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 **Referenzwerte und Nomenklatur der Ejakulatanalyse** 187
8.1 **Referenzwerte** 188
8.2 **Nomenklatur** 190

9 **Ausstattung und Sicherheit** 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 **Mikroskopie im Andrologielabor** 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 **Vorrats- und Arbeitslösungen** 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 **Tyrode-Lösung** ... 208
11.10 **Papanicolaou-Färbung** ... 208

12 **Zervikalmukus** ... 211
12.1 **Einführung** ... 212
12.2 **Gewinnung und Konservierung des Zervikalmukus** ... 213
12.2.1 Gewinnung ... 213
12.2.2 Lagerung und Konservierung ... 213
12.3 **Beurteilung des Zervikalmukus** ... 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 **Befundbögen für Ejakulatuntersuchungen und Untersuchungen des Zervikalmukus** ... 217
13.1 **Vorlage für einen Befundbogen für Ejakulatuntersuchungen** ... 218
13.2 **Vorlage für einen Befundbogen für Zervikalmukus-Untersuchungen** ... 220

14 **Messfehler und Qualitätskontrolle** ... 221
14.1 **Fehler bei der Messung der Spermienkonzentration** ... 223
14.1.1 Fehler bei Zählungen ... 223
14.1.2 Übereinstimmung von wiederholten Zählungen (Replikaten) ... 223
14.2 **Die Bedeutung der Kenntnis von Messfehlern** ... 223
14.3 **Fehler bei der Messung von Prozenten** ... 226
14.3.1 Fehler bei der Bestimmung von Prozentsätzen ... 226
14.3.2 Übereinstimmung zwischen Prozentsätzen von Wiederholungsmessungen ... 226
14.4 **Herstellung von Ejakulatproben für die Qualitätskontrolle** ... 227
14.5 **Vorbereitung von Videoaufnahmen für die interne Qualitätskontrolle der Analyse der Spermienmotilität** ... 229
14.5.1 Zusätzliche Geräte ... 229
14.5.2 Durchführung ... 229
14.5.3 Analyse der Videoaufnahmen ... 231
14.6 **Vorbereitung von verdünntem Ejakulat für die interne Qualitätskontrolle der Spermienkonzentrationsbestimmung** ... 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 **Herstellung von Objektträgern für die interne Qualitätskontrolle für die Bestimmung der Spermienmorphologie** ... 235
14.7.1 Allgemeine Überlegungen ... 235
14.7.2 Durchführung ... 235

14.8 **Kalibrierung der Laborausstattung** ... 236
14.8.1 Waagen ... 236
14.8.2 Pipetten ... 237
14.8.3 Tiefe der Kammern ... 237
14.8.4 Inkubatoren ... 237
14.8.5 pH-Papier ... 237
14.8.6 Andere Geräte ... 237

15 **Nationale externe Qualitätskontrollprogramme für die Ejakulatanalyse** ... 239

Literatur ... 241

http://www.springer.com/978-3-642-40211-1

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