

# Durchführung der Samenuntersuchung

Anne-Rose Günzel-Apel

## Bestimmung der Spermienkonzentration ( $10^6/\text{ml}$ )

Die Spermienkonzentration (Samendichte) wird insbesondere in der spermienreichen Ejakulatfraktion, aber auch in allen anderen Fraktionen bestimmt, in welchen aufgrund einer mehr oder weniger deutlichen Trübung Spermien zu erwarten sind. Sie ist definiert als Samenzellzahl pro Raumeinheit und wird in Millionen pro Milliliter ( $10^6/\text{ml}$ ) ausgedrückt. Die Spermienkonzentration bildet neben dem Volumen der einzelnen Ejakulatfraktionen die Grundlage für die Berechnung der Spermiesamtzahl.

Die Auszählung der Spermien erfolgt üblicherweise mit Hilfe einer Zählkammer (Hämocytometer), kann jedoch auch photometrisch (z. B. SDMI Photometer oder Spermacue<sup>®</sup>, Fa. Minitüb, Tiefenbach bei Landshut) bestimmt werden. Allerdings erlaubt nur die Anwendung des Zählkammerverfahrens die zweifelsfreie Differenzierung der Spermien von Fremdpartikeln ähnlicher Größe und stellt demzufolge das genauere Verfahren dar. Deshalb und unter Berücksichtigung ökonomischer Kriterien wird es im Folgenden ausführlich beschrieben.

## Zählkammerverfahren

### Herstellen der Spermaverdünnung

- Eine 10-ml-Vollpipette wird bis zur Ringmarke mit 10%iger Natriumchlorid-(NaCl)-Lösung gefüllt und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden (Glas oder Kunststoff, Höhe ca. 95 mm, Durchmesser ca. 16 mm) freilaufen gelassen, ohne eine Nachtropfzeit abzuwarten.
- Von den im Röhrchen befindlichen 10 ml wird die Menge an NaCl abpipettiert und verworfen, die dem für die Dichtebestimmung hinzuzufügenden Spermavolumen entspricht. Die Dichte wird anhand des Aussehens der jeweiligen Ejakulatfraktion geschätzt. Nach vorsichtigem, jedoch gründlichem Schwenken des Spermas wird das Spermavolumen mit Hilfe einer Einkanalpipette mit variabler Einstellung im Bereich 10–100  $\mu\text{l}$  in die aufgesetzte Spitze (gelb für 10–100  $\mu\text{l}$ , blau für 100–1000  $\mu\text{l}$ ) aufgezogen:
  - rahmähnlich, oder rahm- bis milchähnlich: 25  $\mu\text{l}$
  - milchähnlich, oder milch- bis molkeähnlich: 50  $\mu\text{l}$
  - molkeähnlich, oder molkeähnlich bis wässrig: 100  $\mu\text{l}$
- Der außen anhaftende Samen wird mit weichem Zellstoff abgetupft und das in der Pipettenspitze befindliche Spermavolumen in die im Zentrifugenröhrchen verbliebene NaCl-Lösung überführt. Durch dreimalige Aspiration der Probe in der NaCl-Lösung wird die Pipettenspitze vollständig entleert. Der Verdünnungsgrad beträgt entsprechend 1:400, 1:200 oder 1:100. Das Röhrchen wird dann verschlossen (Stopfen oder Schraubverschluss), beschriftet (Name des Rüden, Datum, pipettiertes Spermavolumen, Ejakulatfraktion) und der Inhalt gut durchmischt.

### Vorbereiten der Zählkammer

An einer Zählkammer Thoma »neu« mit doppelter Netzeinteilung werden die beiden äußeren Kammerstege angefeuchtet und ein optisch plan geschliffenes Hämozytometer-Deckglas wird unter leichtem Druck mit beiden Daumen so aufgeschoben, dass Newton'sche Ringe 1. und 2. Ordnung (dunkelviolett bis schwarz-braun gefärbte Streifen) sichtbar werden, die auch bei Nachlassen des Fingerdrucks bestehen bleiben. Die Kammerhöhe beträgt dann 1/10 mm.

### Beschicken der Zählkammer

Nach 10-maligem Schwenken der Sperma-verdünnung im Zentrifugenröhrchen um 180° werden ca. 10 µl mit variabler Einkanalpipette (Spitze gelb 10–100 µl) aus der Mitte Sperma des Röhrchens aspiriert und die Spitze auf den Zählkammerboden unmittelbar neben dem Deckglas aufgesetzt. Bei langsamem Ausfließen des Pipetteninhalts füllt sich die Zählkammer infolge der kapillaren Wirkung des schmalen Spaltes zwischen Deckglas und Kammerboden. Der Vorgang wird für die zweite Kammerhälfte wiederholt. Die Zählkammer bleibt nun 3–4 Minuten in waagerechter Position auf dem Tisch liegen, damit die Spermien bei Zählbeginn auf den Boden der Kammer gesunken sind.

### Auszählung der Spermien und Berechnung der Spermienkonzentration

Die Auszählung erfolgt unter Verwendung eines binokularen Phasenkontrastmikroskops mit Phasenkontrastkondensator, Optovar, Okular 10× und Objektiv Ph 40×. Im Blickfeld sichtbar ist ein großes Quadrat von 1/25 mm der Zählkammer, unterteilt in 16 kleine Quadrate von je 1/200 mm<sup>2</sup>. Es werden nur die Köpfe der Samenzellen (auch schwanzlose Köpfe) innerhalb eines solchen großen Quadrats berücksichtigt. Die auf der

linken unteren Begrenzungslinie des großen Quadrats befindlichen Spermienköpfe werden mitgezählt. Im Anschluss an die Auszählung eines großen Quadrats wird das Mikroskop auf die Ebene der unteren Deckglassseite fokussiert. Die dort sichtbaren »Deckglasspermien« werden zur Anzahl der Samenzellen im betreffenden Quadrat addiert. In jeder Kammerhälfte wird die Spermienzahl in 5 – also insgesamt 10 – großen Quadraten ermittelt, was einer ausgezählten Fläche von 10/25 mm<sup>2</sup> entspricht. Ergibt die Summe der in 5 großen Quadraten ausgezählten Spermien weniger als 100, müssen alle 16 Quadrate ausgezählt werden. Beträgt die Differenz der Spermienzahl aus der ersten und zweiten Kammerhälfte mehr als 10 %, ist das Ergebnis zu verwerfen und der gesamte Vorgang ab der Beschickung einer Zählkammer zu wiederholen.

Die Berechnung der Spermienkonzentration (S) in Millionen pro Milliliter (10<sup>6</sup>/ml) bezogen auf die Auszählung von 10 großen Quadraten erfolgt nach der Formel

$$\text{Spermienkonzentration (S)} = \frac{\text{ausgezählte Spermien}}{\text{ausgezählte Fläche} \times \text{Kammerhöhe} \times \text{Verdünnungsgrad}}$$

$$\text{ausgezählte Fläche} = \frac{10 \text{ mm}^2}{25 \text{ mm}^2}$$

$$\text{Kammerhöhe} = \frac{1}{10}$$

$$\text{Verdünnungsgrad, z. B.} = \frac{1}{200}$$

Daraus folgt:

$$\begin{aligned} S &= \frac{\text{ausgezählte Spermien}}{(10 \div 25 \text{ mm}^2 \times 1 \div 10 \text{ mm} \times 1 \div 200)} \\ &= \frac{\text{ausgezählte Spermien}}{(1 \div 5000 \text{ mm}^3)} \\ &= \text{ausgezählte Spermien} \times 5000/\text{mm}^3 \\ &= \text{ausgezählte Spermien} \times 5000 \times 1000/\text{ml} \end{aligned}$$

Die Anzahl ausgezählter Spermien ist demnach unter Berücksichtigung des Verdünnungsgrads mit 10000 (bei Verdünnungsgrad 1:400), 5000 (bei Verdünnungsgrad 1:200) oder 2500 (bei Verdünnungsgrad 1:100) zu multiplizieren, um die Spermienzahl pro  $\text{mm}^3$  zu erhalten. Aus der Multiplikation mit 1000 resultiert die Spermienkonzentration pro ml ( $10^6/\text{ml}$ ).

Bei Auszählung von 32 Quadraten beträgt

$$\text{die ausgezählte Fläche} = \frac{32}{25 \text{ mm}^2}$$

Die weitere Berechnung der Spermienkonzentration erfolgt entsprechend.

### Berechnung der Spermienkonzentration im Gesamtejakulat

Von der spermienreichen Ejakulatfraktion sowie gegebenenfalls von weiteren spermienhaltigen Ejakulatanteilen werden die Werte für das Volumen und die Spermienkonzentration multipliziert und damit die Spermienzahl pro Ejakulatfraktion berechnet. Durch Addition der in den verschiedenen Ejakulatfraktionen ermittelten Spermien ergibt sich die Spermienkonzentration im Gesamtejakulat in Millionen ( $10^6$ ).

#### Beispiel:

Ejakulatfraktion 1: Volumen 1,0 ml; keine Spermien

Ejakulatfraktion 2: Volumen 1,5 ml; Spermienkonzentration  $450 \times 10^6/\text{ml}$ ; Spermienzahl =  $675 \times 10^6$

Ejakulatfraktion 3: Volumen 5,6 ml; Spermienkonzentration  $35 \times 10^6/\text{ml}$ ; Spermienzahl =  $196 \times 10^6$

Ejakulatfraktion 4: Volumen 8,4 ml; keine Spermien

Spermienzahl Ejakulatfraktion 2 + Ejakulatfraktion 3 = Spermienkonzentration im Gesamtejakulat =  $871 \times 10^6$

### Berechnung der Spermienkonzentration im Gesamtejakulat

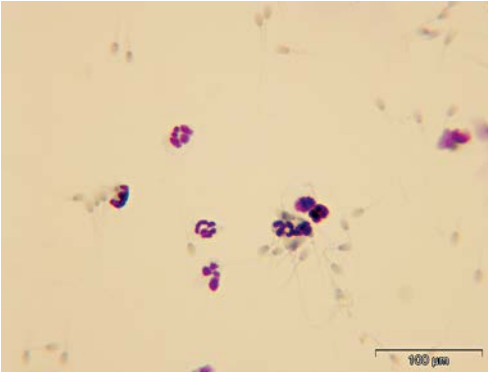
Dieser Parameter hat aufgrund der erheblichen Variabilität des Prostatasekretvolumens und damit des Gesamtejakulatvolumens keine diagnostische Aussagekraft in Bezug auf die Fruchtbarkeit. Soll er jedoch zur Vervollständigung der Ejakulatbefunde in das Spermaprotokoll aufgenommen werden, ist er unter Berücksichtigung des Gesamtejakulatvolumens und der Spermienkonzentration im Ejakulat zu berechnen. In dem oben aufgeführten Beispiel ergibt sich für das Volumen des Gesamtejakulates (= Summe der Volumina der Ejakulatfraktionen 1, 2, 3, 4) 16,5 ml.

In diesem Volumen befinden sich insgesamt  $871 \times 10^6$ .

Die Spermienkonzentration (Spermienzahl/ml) im Gesamtejakulat beträgt demnach  $871 \times 10^6$  dividiert durch 16,5 ml =  $52,8 \times 10^6/\text{ml}$ .

### Feststellung von Beimengungen

Als Beimengungen werden alle zelligen Bestandteile des Samens, außer den Spermien, bezeichnet. Dazu gehören Erythrozyten, polymorphkernige Granulozyten, Makrophagen, Epithelzellen und sogenannte Rundzellen (Entwicklungsstadien von Spermien: Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden). Zur besseren Differenzierung ist ein Spermatropfen auf einen vorgefärbten Objektträger (Testsimplet®, Boehringer Mannheim) zu verbringen, mit einem Deckglas zu versehen und mikroskopisch (Hellfeldverfahren Okular 8×, Objektiv 40× oder 100× mit Ölimmersion) zu untersuchen (► Abb. 1).



**Abb. 1** Mikroskopischer Nachweis von Beimpungen (Fremdzellen) im Spermaausstrich. Hier polymorphkernige Granulozyten als Merkmal eines entzündlichen Prozesses im Bereich der samen- und harnableitenden Wege oder der Prostata.

### Bestimmung des Anteils morphologisch abweichender Spermien

Zur Bestimmung formabweichender Spermien hat sich die phasenkontrastmikroskopische Untersuchung flüssig fixierten Spermas bewährt. Als Fixationsflüssigkeit dient Formolcitrat-Lösung (tri-natriumcitrat-dihydrat 2,9 g; in 100,0 ml Aqua bidest. lösen, 4 ml verwerfen und 4 ml 37%iges Formalin hinzugeben, gut mischen, abfüllen von 300 µl Aliquots in Eppendorf Reaktionsgefäße, Lagerung im Kühlschrank). In Abhängigkeit von der Spermienkonzentration werden 5–25 µl der frisch gewonnenen spermienreichen Ejakulatfraktion vorsichtig in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 300 µl Formolcitrat-Lösung (muss vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt werden) pipettiert und gemischt. Ein kleiner Tropfen des Gemisches wird auf einen sauberen Objektträger pipettiert und mit ei-

nem Deckglas bedeckt. Die mikroskopische Untersuchung mittels Phasenkontrastmikroskop (Okular 10×, Objektiv Ph 3 Plan 100× mit Ölimmersion) kann erst erfolgen, wenn alle Samenzellen ruhig und plan liegen. Es werden 200 Spermien ausgezählt und hinsichtlich ihrer Morphologie beurteilt.

Formabweichungen von Spermien werden als primäre Veränderungen bezeichnet, wenn ein kausaler Zusammenhang mit einer Störung der Spermatogenese besteht, während sekundäre Veränderungen ursächlich auf Funktionsstörungen oder Erkrankungen der Nebenhoden und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zurückzuführen sind. Darüber hinaus kennzeichnen sog. tertiäre Veränderungen einen fehlerhaften und schädigenden Umgang mit dem Sperma z. B. während der Samengewinnung und -aufbereitung. Die Differenzierung der Formabweichungen erfolgt an den einzelnen Spermienabschnitten: Kopfkappe (Akrosom), Kopf, Hals, Schwanz (bestehend aus dem Verbindungsstück und dem Haupt- und Endstück). Gesondert werden Spermien mit Doppel- und Mehrfachmissbildungen erfasst. Während Letztere ebenso wie Formabweichungen des Spermienkopfes stets als primäre Veränderungen anzusehen sind, muss an allen anderen Samenzellanteilen zwischen primären oder sekundären Veränderungen unterschieden werden (► Abb. 2). Befindet sich an einem Spermium mehr als eine Formabweichung, wird nur eine, und zwar die schwerwiegendere Veränderung in folgender Reihenfolge gezählt: Halsbruch, Kopfabweichungen, Kopfkappenabweichungen, Schwanzabweichungen (Schwanzformabweichungen vor Cytoplasmotropfen).

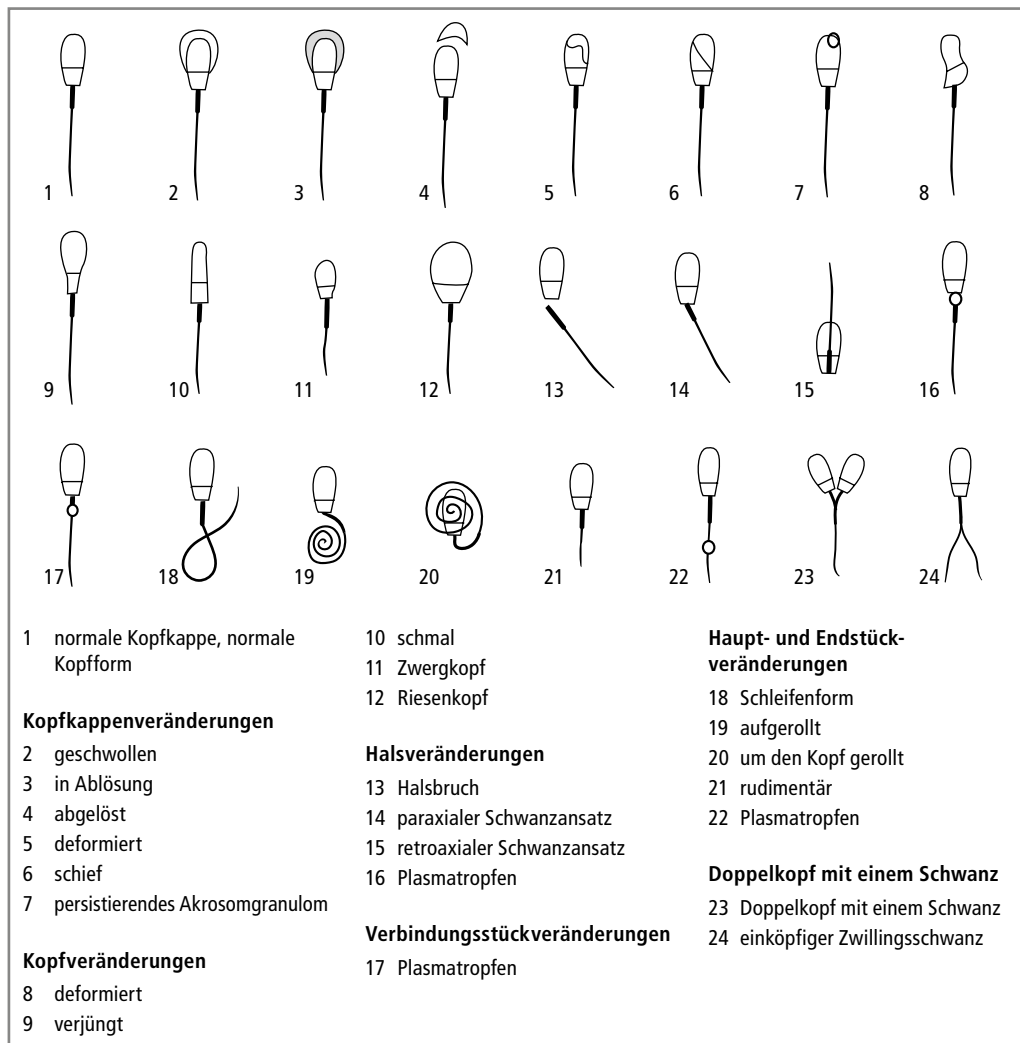


Abb. 2 Schematische Darstellung formabweichender Spermien (Zeichnung J. Biege 2004).