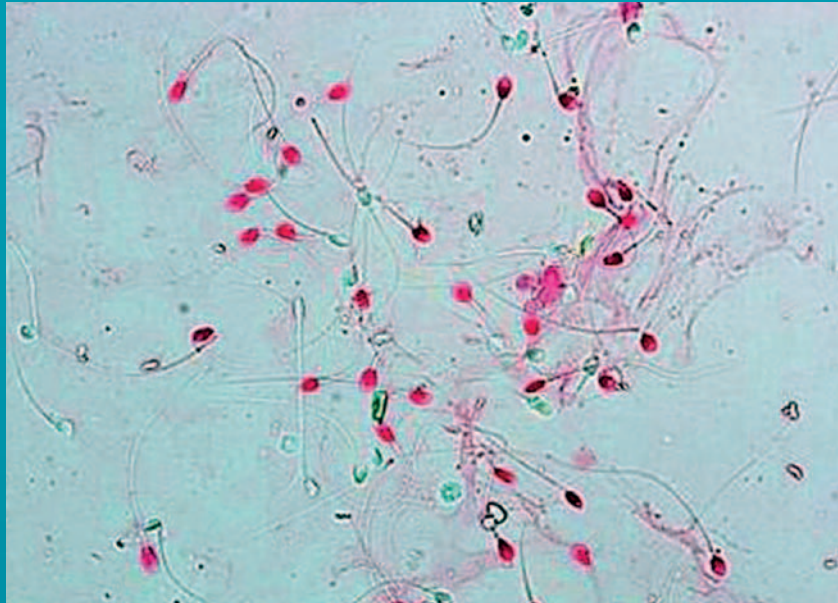


Podstawowe badanie nasienia wg standardów Światowej Organizacji Zdrowia z roku 2010



**Rekomendacje
Polskiego Towarzystwa Andrologicznego
i Krajowej Izby Diagnostów
Laboratoryjnych**

Warszawa 2016 r.

Zespół redakcyjny

Przewodnicząca:

dr hab. n. med. **Renata Walczak-Jędrzejowska**, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polskie Centrum Kształcenia Klinicznego Europejskiej Akademii Andrologii, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Łódź

Członkowie:

dr n. med. **Szymon Bakalczuk**, Specjalistyczne Centrum Medyczne „Ovum”, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Lublin

mgr **Anna Berger**, Pracownia Andrologii, Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu, Szpital Kliniczny, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej, Poznań

dr n. med. **Leszek Bergier**, Centrum Medyczne „Macierzyństwo”, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków

dr n. med. **Eliza Filipiak**, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polskie Centrum Kształcenia Klinicznego Europejskiej Akademii Andrologii, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Łódź

dr n. med. **Stanisław Frącki**, I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Warszawie, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Warszawa

prof. dr hab. n. med. **Piotr Jędrzejczak**, Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu, Szpital Kliniczny, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Poznań

prof. dr hab. n. med. **Krzysztof Kula**, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polskie Centrum Kształcenia Klinicznego Europejskiej Akademii Andrologii, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Łódź

dr n. med. **Katarzyna Marchlewska**, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polskie Centrum Kształcenia Klinicznego Europejskiej Akademii Andrologii, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Łódź

dr hab. n. med., prof. nadzw. PUM **Małgorzata Piasecka**, Katedra i Zakład Histologii i Biologii Rozwoju, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Szczecin

dr n. med. **Elżbieta Puacz**, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL), Prezes KRDL, Warszawa

prof. dr hab. n. med. **Jolanta Słowikowska-Hilczer**, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polskie Centrum Kształcenia Klinicznego Europejskiej Akademii Andrologii, Polskie Towarzystwo Andrologiczne (PTA), Przewodnicząca PTA, Łódź

dr n. med. **Grażyna Taszarek-Hauke**, Pracownia Andrologii, Szpital Kliniczny, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej, Poznań

mgr **Ewa Zagocka**, Dział Diagnostyki Laboratoryjnej, Państwowy Szpital Kliniczny nr 1, Polskie Towarzystwo Andrologiczne, Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej, Wrocław

Wydawca:

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

ul. Konopacka 4, 03-428 Warszawa, tel.: +48 22 741 21 55

www.kidl.org.pl

Skład, przygotowanie do druku i druk:

Wydawnictwo THORG

ul. Dożynkowa 21A/2, 20-223 Lublin, tel.: +48 502 362 522

www.thorgstudio.pl

ISBN: 978-83-944226-2-2

SPIS TREŚCI

Wstęp	3
Rys historyczny	3
Cel badania	3
Epidemiologia niepłodności	3
Przyczyny męskiej niepłodności	4
Wskazania do wykonania badania nasienia	5
Czynność plemnikotwórcza jądra	5
Zakres badania nasienia	7
Badanie nasienia – procedury przedlaboratoryjne	8
Informacja dla pacjenta przekazywane przez lekarza i/lub diagnostę laboratoryjnego	8
Procedura uzyskiwania próbki nasienia do badania	8
Kwalifikacje personelu wykonującego badanie nasienia	9
Dokumentacja badania nasienia	10
Zlecenie badania	10
Formułowanie i wydawanie wyników badania nasienia	10
Etapy wykonywania badania nasienia	11
Ocena makroskopowa nasienia	12
Czas upłynięcia	12
Objętość ejakulatu	13
Wygląd nasienia	14
Lepkość nasienia	15
pH nasienia	16
Zapach	16
Wstępna ocena mikroskopowa	16
Przygotowanie preparatu bezpośredniego	17
Wstępna ocena mikroskopowa preparatu przyżyciowego	17
Ocena ruchliwości plemników	18
Ocena żywotności plemników	21
Test eozyna-nigrozyna	22
Przyżyciowy test eozynowy	23
Hipoosmotyczny test pęcznienia plemnika (HOS test)	24
Ocena liczby plemników	25
Ocena koncentracji plemników z wykorzystaniem udoskonalonej komory Neubauera	27
Procedura zliczania plemników w udoskonalonej komorze Neubauera przy ich niskiej liczbie w preparacie przyżyciowym	35
Postępowanie z próbką, kiedy w preparacie przyżyciowym nie ma plemników	36
Ocena liczby komórek okrągłych w nasieniu	37
Ocena liczby leukocytów w nasieniu	45

Ocena prawidłowej budowy morfologicznej plemników.....	51
Przygotowanie rozmazów	51
Metody barwienia	52
Ocena wybarwionych preparatów wg ścisłych kryteriów Krügera.....	54
Dodatkowe wskaźniki morfologiczne.....	64
Dodatkowe zjawiska obserwowane podczas badania nasienia	66
Znaczenie wewnętrznej i zewnętrznej kontroli jakości badań w laboratorium seminologicznym.....	67
Wyposażenie laboratorium seminologicznego	69
Pomieszczenie do oddania nasienia.....	69
Pojemniki na nasienie	69
Temperatura wykonywania badania nasienia	69
Wymagane wyposażenie laboratorium.....	69
Komputerowo wspomagana analiza nasienia.....	71
Ocena koncentracji i ruchliwości plemników.....	71
Ocena morfologii plemników	73
Współpraca z laboratoriami satelitarnymi	74
Załączniki	74
Załącznik nr 1.....	74
Załącznik nr 2.....	75
Załącznik nr 3.....	76
Piśmiennictwo	77

Rys historyczny

Rola mężczyzny w poczęciu nowego życia była przez wieki niejasna i ostatecznie późno odkryta. Męskie komórki płciowe, plemniki, po raz pierwszy zaobserwował, w 1677 roku w skonstruowanym przez siebie mikroskopie Holender, Antonie Van Leeuwenhoek. Jednak dopiero 200 lat później, w 1875 roku, niemiecki uczonec, Oskar Hertwig, stwierdził, że zapłodnienie polega na wnikięciu plemnika do komórki jajowej. Od tej pory stało się jasne, że ilość, ruchliwość oraz budowa plemników mają znaczenie dla płodności mężczyzn. Jednak tworzenie procedur badania nasienia okazało się sprawą trudną, wywołującą wiele kontrowersji i wątpliwości w interpretacji wyników. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization* – WHO) podjęła się standaryzacji metod analizy nasienia i po raz pierwszy w 1980 roku opracowała podręcznik zawierający opis procedur badania nasienia, wartości referencyjne dla wartości parametrów nasienia oraz nomenklaturę zaburzeń. Od tego czasu podręcznik był nowelizowany czterokrotnie w latach 1987, 1992, 1999 i 2010 w oparciu o nowe wyniki badań podstawowych, a także badania kliniczne i epidemiologiczne. W ostatnim wydaniu podręcznika przedstawiono rekomendacje WHO odnośnie wartości referencyjnych dla parametrów nasienia, które po raz pierwszy zostały opracowane w oparciu o analizę publikacji zawierających wyniki badania nasienia prawie 2000 mężczyzn, których partnerki zaszły w ciążę w ciągu 12 miesięcy (*Cooper i wsp., 2010*). Badania przeprowadzone były według procedur zalecanych przez WHO. Piąty centyl w rozkładzie centylowym tych wyników został uznany za dolną granicę wartości referencyjnych dla parametrów nasienia płodnych mężczyzn.

W ciągu 30 lat podręczniki WHO stały się podstawą standaryzacji badań nasienia w laboratoriach na całym świecie. Chociaż nadal wzbudzają wiele dyskusji, to ujednolicona metodologia umożliwia jednoznaczną i obiektywną ocenę parametrów nasienia niezależnie od laboratorium, w którym badania zostały wykonane, a także porównanie wyników badań między mężczyznami.

Skrócona wersja rekomendacji dotyczących procedury badania nasienia w języku polskim, opracowana na podstawie ostatniej wersji podręcznika WHO przez Komisję do Spraw Konsensusu Lekarsko-Diagnostycznego Polskiego Towarzystwa Andrologicznego z udziałem przedstawicieli Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej, ukazała się w roku 2010 (*Bergier i wsp., 2010*).

Cel badania

Podstawowe badanie nasienia ma na celu ocenę ogólnej charakterystyki ejakulatu oraz ocenę jakości plemników. Interpretacja wyników służy do wstępnej oceny płodności mężczyzny i ukierunkowanie dalszej diagnostyki przyczyn jej zaburzeń.

Epidemiologia niepłodności

Na świecie ok. 2% par jest dotkniętych pierwotną, a 10% wtórną niepłodnością (*Mascarenhas i wsp., 2012*). W Europie 4–20% par (średnio ok. 15%) poszukuje pomocy medycznej z powodu niemożności uzyskania ciąży (*Bruckert, 1991; Juul i wsp., 1999; Sanocka i Kurpisz, 2003; Bablok i wsp., 2011; Mascarenhas i wsp., 2012*). Ostatecznie ok. 1-5% par nie uzyskuje ciąży pomimo starań i leczenia (*Templeton, 1992, Oakley i wsp., 2008, Mascarenhas i wsp., 2012*). Przyczyna po stronie mężczyzny znajduje się w ok. 20% niepłodnych par, a w przypadku kolejnych ok. 25% par stanowi przyczynę współwystępującą

(Nieschlag, 2010). Ok. 7% mężczyzn wykazuje obniżoną płodność w ciągu swego życia (te Velde i wsp., 2000, Nieschlag, 2010).

Przyczyny męskiej niepłodności

Według definicji WHO za „niepłodną” uznaje się parę, u której w ciągu 12 miesięcy współżycia płciowego (2-3 stosunki na tydzień), bez stosowania antykoncepcji, nie doszło do zapłodnienia (WHO, 1991; WHO, 2000). Obecnie dostępnymi metodami diagnostycznymi można rozpoznać przyczynę niepłodności u mężczyzn w ok. 56-85% (średnio ok. 70%) przypadków (Pierik i wsp., 2000; Adamopoulos i wsp., 2010; Tuttleman i Nieschlag, 2010). W pozostałych sytuacjach przyczyna niepłodności u mężczyzn nie jest rozpoznawana i definiuje się ją jako niepłodność idiopatyczną.

Przyczyny męskiej niepłodności tradycyjnie dzieli się na przedjądrowe, jądrowe i pozajądrowe (Tüttelmann i Nieschlag, 2010). Przyczyny przedjądrowe spowodowane są głównie zaburzeniami regulacji hormonalnej czynności jąder, przyczyny jądrowe, to uszkodzenia struktury i czynności kanalików plemnikotwórczych, a pozajądrowe wiążą się z zaburzeniami transportu plemników przez drogi wyprowadzające oraz brakiem zdolności plemników do zapłodnienia komórki jajowej.

Jedną z częstszych przyczyn niepłodności jest hipogonadyzm (Behre i wsp., 2010; Forti i wsp., 2010; Kula i wsp., 2010). Jest to zaburzenie czynności hormonalnej i gametotwórczej gonad. Męski hipogonadyzm to zespół objawów klinicznych spowodowanych obniżonym wydzielaniem lub działaniem androgenów. Przyczyną mogą być zaburzenia czynności podwzgórza, przysadki i jąder, ale coraz częściej zalicza się tu także niewrażliwość tkanek docelowych na androgeny. Klasycznie dzieli się hipogonadyzm na: 1) pierwotny (gonadalny, hipergonadotropowy) i 2) wtórny (podwzgórzowo-przysadkowy, hipogonadotropowy). W hipogonadyzmie pierwotnym uszkodzone są gonady, a w hipogonadyzmie wtórnym: podwzgórze lub/i przysadka. W każdym przypadku stężenie testosteronu jest obniżone (Simoni i Nieschlag, 2010), natomiast stężenia gonadotropin są wysokie w hipogonadyzmie pierwotnym lub niskie w hipogonadyzmie wtórnym. Charakterystycznym objawem nieprawidłowego funkcjonowania komórek Sertolego w kanalikach plemnikotwórczych jest obniżenie stężenia inhibiny B. Brak działania testosteronu i uszkodzenie komórek Sertolego zawsze prowadzi do zaburzenia spermatogenezy i braku (azoospermia) lub zmniejszonej liczby (oligozoospermia) plemników w nasieniu (Andersson i wsp., 2004; Jorgensen i wsp., 2010).

Coraz większą uwagę zwraca się na zanieczyszczenie naturalnego środowiska substancjami chemicznymi o działaniu estrogeno-podobnym, a jednocześnie antyandrogennym (Słowikowska-Hilczer, 2006). Wywołują one zaburzenie czynności hormonalnej jąder (zmniejszenie biosyntezy i działania testosteronu), a przez to zahamowanie rozwoju męskich narządów płciowych, zmiany nowotworowe wywodzące się z komórek płciowych oraz uszkodzenie spermatogenezy, a przez to obniżenie potencjału męskiej płodności (Skakkebaek i wsp., 2001).

Przyczyną zaburzenia rozwoju jąder i męskiego układu płciowego mogą być również zaburzenia genetyczne (Krausz i Carrell, 2014). Najczęstszą wrodzoną przyczyną niepłodności u mężczyzn, uwarunkowaną genetycznie, jest zespół Klinefeltera (0,2% męskiej populacji, 3% mężczyzn niepłodnych, 11% mężczyzn z azoospermia) (Aksglaede i wsp., 2013). Charakteryzuje go, obecność dodatkowego chromosomu X w kariotypie, jądra o małej objętości oraz hipogonadyzm hipergonadotropowy. Niepłodność u takich pacjentów związana jest z całkowitą azoospermia lub w niewielkim odsetku, z oligozoospermia znacznego stopnia.

Niemalży udział w zaburzeniu męskiej płodności przypisuje się czynnikom środowiskowym, takim jak podwyższona temperatura, promieniowanie elektromagnetyczne, palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu, przewlekły stres, otyłość i niedożywienie, sie-

dzący tryb życia (Brinkworth i Handelsman, 2010). Konsekwencją działania większości wymienionych czynników jest stres oksydacyjny (Walczak-Jędrzejowska i wsp., 2013a). Stres oksydacyjny spowodowany jest zachwianiem równowagi między wytwarzaniem tzw. reaktywnych form tlenu a działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego odpowiedzialnego za ich neutralizowanie i usuwanie. Konsekwencją jest zmniejszona liczebność plemników oraz zaburzenie ich czynności, spadek ruchliwości i nieprawidłowa morfologia, a ostatecznie utrudnienie zapłodnienia (Jędrzejczak i wsp., 2005; Aitken i wsp., 2010).

Stany zapalne w męskim układzie moczowo-płciowym są częstą przyczyną zaburzeń płodności nie tylko ze względu na stres oksydacyjny uszkadzający plemniki, ale także na powstanie niedrożności dróg wyprowadzających plemniki oraz przewodów wyprowadzających wydzieliny prostaty i pęcherzyków nasiennych tworzące plazmę nasienia. Prawidłowy skład plazmy nasienia ma wpływ nie tylko na ruchliwość i żywotność plemników, ale także na ich zdolność do połączenia się z komórką jajową. Dodatkowo podczas infekcji bakteryjnych lub wirusowych może dojść do powstania przeciwciał przeciwplemnikowych unieruchamiających plemniki i utrudniających zapłodnienie. Najczęstszymi patogenami są drobnoustroje przenoszone drogą płciową, takie jak: bakterie *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Ureaplasma urealyticum*., *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, wirusy *Herpes* i grzyby *Candida albicans* (Pellati i wsp., 2008; Weidner i wsp., 2010; Filipiak i wsp., 2014).

Jedną z bardziej kontrowersyjnych przyczyn męskiej niepłodności są żylaki powrózków nasiennych. Powstają na skutek rozszerzenia żył splotu wiciowatego powrózka. Są stwierdzane u ok. 25% mężczyzn z zaburzonymi parametrami nasienia i u ok. 11% mężczyzn z prawidłowymi parametrami (Agarwal i wsp., 2007). Mogą powodować zaburzenie krążenia w obrębie jąder i lokalne podwyższenie temperatury, nadmierną produkcję reaktywnych form tlenu, a przez to zahamowanie spermatogenezy (Baazeem i wsp., 2011). Warto również wspomnieć, że u około 10% mężczyzn z niepłodnych par przyczyną niepłodności są zaburzenia erekcji i ejakulacji (Van Ahlen i Kleisch, 2010).

Wskazania do wykonania badania nasienia

Podstawowe badanie nasienia jest pierwszym badaniem laboratoryjnym u mężczyzny z niepłodnej pary (WHO, 2004; Bjorndahl, 2010; WHO, 2010). Analiza seminologiczna ma znaczenie przesiewowe i zwykle nie może być podstawą rozpoznania całkowitej niepłodności. Wynik badania nasienia ukierunkowuje dalsze działania diagnostyczne w celu wyjaśnienia przyczyn niepłodności pary i ewentualnego podjęcia leczenia przyczynowego (WHO, 2004). Badanie powinno być wykonane przynajmniej dwukrotnie w odstępie czasu 1-3 miesiące.

Zwykle diagnostykę przyczyn niepłodności pary rozpoczyna się po 12 miesiącach bezskutecznych starań o uzyskanie ciąży. Jednak wskazane jest wcześniejsze rozpoczęcie diagnostyki, jeśli: 1) występują dodatkowe zaburzenia, które mogą obniżyć płodność kobiety i/lub mężczyzny, 2) wiek kobiety jest >30 lat, a mężczyzny >35 lat (WHO, 2000; Dohle, 2010).

Czynność plemnikotwórcza jądra

Wytwarzanie plemników zachodzi w kanalikach plemnikotwórczych jądra w procesie zwanym spermatogenezą. Polega ona na tworzeniu dojrzałych gamet męskich (plemników) ze spermatogonii (najmłodszych komórek spermatogenezy). Spermatogonie ulegają podziałom mitotycznym i przekształceniom w spermatocyty. Spermatocyty podlegają podziałowi redukcyjnemu (mejozie). W jego efekcie powstają haploidalne

spermatydy, komórki o zredukowanej liczbie chromosomów. W kolejnym etapie okrągłe spermatydy ulegają bezpodziałowemu różnicowaniu i przekształcaniu w komórki płciowe męskie zdolne do poruszania się, czyli plemniki. Ten ostatni etap nazywany jest spermiogenezą. Wyróżnia się w nim 4 fazy, w których dochodzi do formowania akrosomu, witki, kondensacji chromatyny plemnikowej oraz reorganizacji organelli i cytoplazmy. Jeden cykl spermatogenezy, a więc wytworzenie ze spermatogonii plemników, trwa u człowieka około 72-74 dni.

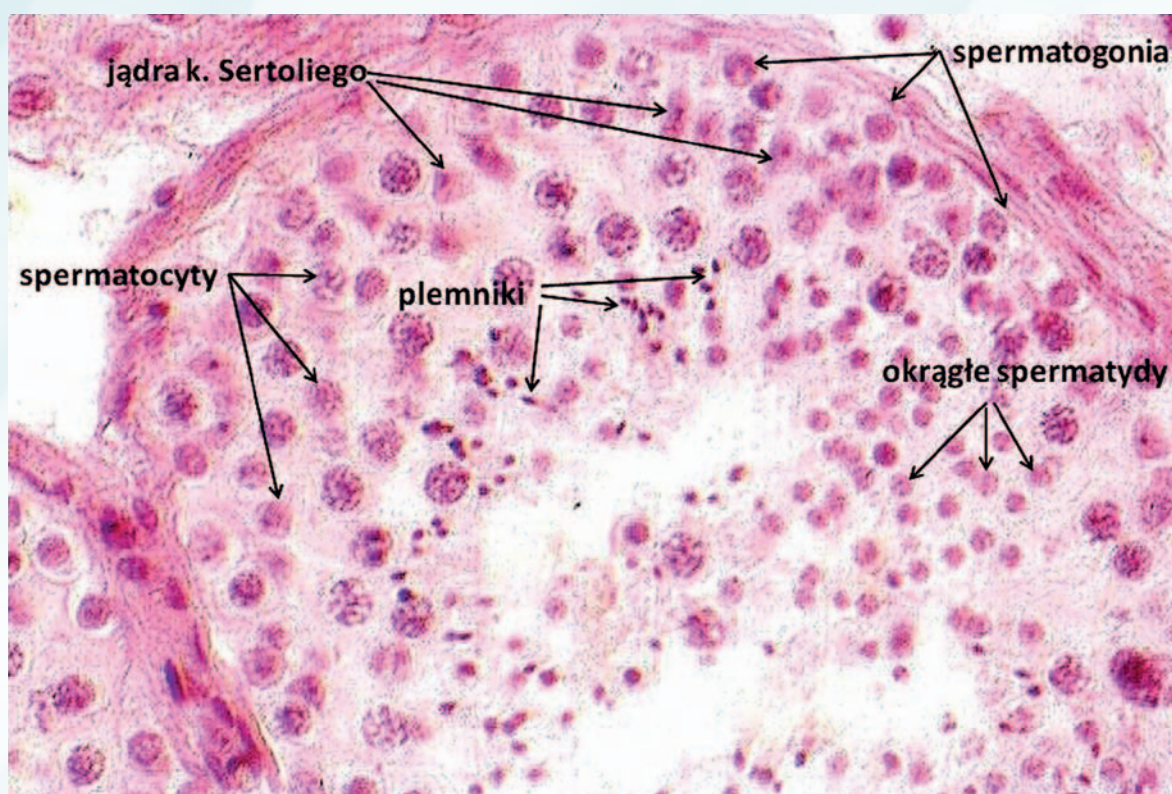
Oprócz komórek płciowych (komórek spermatogenezy) w kanalikach plemnikotwórczych jądra znajdują się także somatyczne komórki Sertolego. Komórki Sertolego: 1) wytwarzają czynniki odżywcze i regulacyjne dla komórek płciowych, przez co zapewniają im właściwe środowisko rozwoju, 2) tworzą barierę krew-jądro, izolując spermatocyty i spermatydy od środowiska organizmu w celu ich ochrony przed układem immunologicznym i ewentualnymi czynnikami mutagennymi, 3) wytwarzają hormony (hormon antymüllerowski, inhibina, aktywina, estradiol), 4) wytwarzają białka czynnościowe (np. białko wiążące androgeny), 5) są odpowiedzialne za uwalnianie plemników do światła kanalika warunkowane przez syntetyzowane substancje proteolityczne, 6) fagocytują ulegające apoptozie lub degeneracji komórki płciowe, 7) przekazują sygnały na poziomie komórkowym, 8) przekazują sygnały hormonalne za pomocą receptorów dla hormonów regulujących spermatogenezę.

Komórki płciowe oraz komórki Sertolego znajdujące się wewnątrz kanalika plemnikotwórczego tworzą tzw. nabłonek plemnikotwórczy. Ulokowanie komórek płciowych w nabłonku plemnikotwórczym nie jest przypadkowe. Blisko błony podstawnej kanalika znajdują się komórki najmniej zróżnicowane (spermatogonie), następnie ulokowane są spermatocyty, a najbliżej światła kanalika spermatydy, wśród nich plemniki. Cytoplazma komórek Sertolego rozmieszczona jest w całym nabłonku plemnikotwórczym i otacza ułożone w niej komórki płciowe (Rycina 1). W środku kanalika znajduje się przestrzeń zwana światłem kanalika plemnikotwórczego, do której uwalniane są plemniki. Plemniki przemieszczają się następnie do kanalików zbiorczych, sieci jądra i dalej do przewodu najądrza.

W jądrze pomiędzy kanalikami plemnikotwórczymi znajdują się tzw. przestrzenie międzykanalikowe, w których umiejscowione są komórki Leydiga, czyli komórki steroidogenne jądra, odpowiedzialne za produkcję androgenów (głównie testosteronu). Ich skupiska tworzą tak zwany gruczoł śródmiażdżowy jądra.

Prawidłowa produkcja plemników uzależniona jest od regulacji hormonalnej w układzie podwzgórze-przysadka-jądra. Z wyniosłości pośrodkowej podwzgórza do układu naczyń wrotnych przysadki wydzielany jest pulsacyjnie hormon gonadoliberyna (ang. *gonadotropin releasing hormone* – GnRH), która stymuluje pulsacyjne uwalnianie z przedniego płata przysadki dwóch gonadotropin: hormonu luteotropowego (lutropiny, hormonu luteinizującego, ang. *luteinizing hormone* – LH) oraz hormonu folikulotropowego (folitropiny, ang. *follicle stimulating hormone* – FSH). Komórkami docelowymi dla LH są komórki Leydiga w gruczole śródmiażdżowym jądra. LH aktywuje enzymy uczestniczące w procesie steroidogenezy jądra, dzięki czemu wytwarzany jest testosteron. FSH działa pobudzająco na komórki Sertolego w kanaliku plemnikotwórczym. Oprócz receptorów dla FSH, na komórkach Sertolego znajdują się także receptory dla androgenów. Zarówno FSH, jak i testosteron, są głównymi hormonami regulującymi prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy.

Ważnym mechanizmem w regulacji czynności osi podwzgórze-przysadka-jądra jest mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, w którym odpowiednio wysoki poziom testosteronu we krwi hamuje wydzielanie GnRH przez podwzgórze i gonadotropin, głównie LH, przez przysadkę. Dodatkowo dwa białkowe hormony komórek Sertolego zarówno hamują (inhibina), jak i pobudzają (aktywina) wydzielanie FSH przez przysadkę.



Rycina 1. Obraz histologiczny jądra dorosłego mężczyzny. Widoczny jest przekrój kanalik plemnikotwórczego z zaznaczonymi poszczególnymi typami komórek plemnikotwórczych oraz jądrami komórek Sertolego. Mikrofotografia autorstwa Prof. dr hab. n. med. Jolanty Słowikowskiej-Hilcher.

ZAKRES BADANIA NASIENIA

Badanie nasienia można podzielić na dwa etapy: ocenę makroskopową ejakulatu oraz ocenę mikroskopową preparatów nasienia.

Ocena makroskopowa ejakulatu obejmuje:

- czas upłynięcia;
- wygląd/kolor;
- objętość;
- lepkość;
- pH;
- zapach.

Ocena mikroskopowa preparatów nasienia obejmuje ocenę:

- wstępną preparatu przyżyciowego;
- ruchliwości plemników;
- żywotności plemników;
- koncentracji i całkowitej liczby plemników;
- morfologii plemników;
- komórek okrągłych (jeśli występują w nasieniu) tzn. ich zróżnicowanie na komórki spermatogenezy i leukocyty oraz określenie ich koncentracji.

BADANIE NASIENIA – PROCEDURY PRZEDLABORATORYJNE

Badanie próbki nasienia wymaga standaryzacji procedury przedlaboratoryjnej, która obejmuje:

- okres wstrzemięźliwości płciowej pacjenta (liczba dni od ostatniej ejakulacji przed badaniem);
- miejsce oddania nasienia (laboratorium lub poza laboratorium);
- sposób oddania nasienia (masturbacja lub stosunek w specjalnej prezerwatywie);
- sposób dostarczenia próbki do laboratorium (czas od ejakulacji, temperatura transportu próbki);
- czas od oddania nasienia do rozpoczęcia badania;
- dobór odpowiedniego pojemnika (naczynko plastikowe lub szklane lub specjalna prezerwatywa);
- uwagi zgłaszane przez pacjenta (ustnie lub pisemnie) po dostarczeniu nasienia (np. o utracie części próbki w czasie jej uzyskiwania).

Niestosowanie i nieprzestrzeganie wymogów standaryzacji (przed – i wewnątrzlaboratoryjnej) może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników i uniemożliwienia monitorowania leczenia, a także braku możliwości porównania wyników wykonanych w różnych laboratoriach.

Informacja dla pacjenta przekazywane przez lekarza i/lub diagnostę laboratoryjnego

Informacja dla pacjenta o sposobie przygotowania się do badania, możliwych procedurach uzyskiwania próbki nasienia oraz sposobie przeprowadzenia badania powinna być przekazana pacjentowi przez lekarza kierującego lub diagnostę laboratoryjnego, gdy pacjent zgłasza się na badanie bez skierowania. Rekomenduje się przygotowanie takiej informacji także w formie pisemnej, jako ulotki dla pacjenta, oraz zawieszenie jej w pomieszczeniu do oddawania nasienia. Dodatkowo, informacja taka może być umieszczona na stronie internetowej danej placówki. Personel powinien być odpowiednio przeszkolony, w jaki sposób powinno się udzielać informacje pacjentowi na temat procedury badania nasienia.

Procedura uzyskiwania próbki nasienia do badania

Pacjent zgłaszający się na badanie nasienia powinien zachować okres wstrzemięźliwości płciowej od minimum 48 h (2 dni) do maksimum 7 dni od ostatniej ejakulacji. W przypadku powtórnego (kolejnego) badania pacjent powinien zachować taki sam lub zbliżony okres wstrzemięźliwości płciowej. Okres wstrzemięźliwości płciowej powinien być odnotowany na wyniku badania nasienia.

Próbka nasienia powinna być oddana drogą masturbacji do pojemnika, odpowiednio przygotowanego do tego celu (czysty, nietoksyczny, szklany lub plastikowy pojemnik o szerokim otworze, opisany danymi pacjenta i uprzednio zważony, z zanotowaną wagą – patrz rozdział *Ocena objętości nasienia*) w ustronnym pomieszczeniu przewidzianym wyłącznie dla tego celu, znajdującym się w pobliżu laboratorium. Pacjent powinien poinformować o ewentualnych problemach przy zbieraniu próbki (np. o utracie części ejakulatu). Jeśli diagnosta ma wątpliwości np. co do ilości zebranego materiału, to powinien zadać dodatkowe pytanie pacjentowi w celu ich wyjaśnienia.

Wynik badania nasienia jest dokumentem medycznym i powinien zawierać dane pacjenta, dane laboratorium, dane osoby wykonującej badanie i/lub dane kierownika placówki (patrz rozdział *Załączniki – Wzór wyniku badania nasienia*).

Każdy wynik badania nasienia odbiegający od wartości referencyjnych wymaga wykonania badania drugiego, a w szczególnych przypadkach badania trzeciego. Zasada ta obowiązuje, kiedy badanie jest wykonywane po raz pierwszy (nie dotyczy to badań kontrolnych).

Niekiedy jest konieczna konsultacja lekarza zlecającego z diagnostą laboratoryjnym wykonującym badanie w celu wyjaśnienia ewentualnych wątpliwości co do wyniku badania, np. kiedy w uwagach na wyniku zostały opisane dodatkowe procedury zastosowane przy badaniu nasienia (np. zastosowanie enzymów w celu upłynnienia nasienia, co może mieć wpływ na wynik).

UWAGI:

- Oddanie nasienia w pobliżu laboratorium, w przeznaczonym do tego celu pomieszczeniu, umożliwia dokładne odnotowanie czasu od momentu ejakulacji do chwili przekazania próbki do analizy i następnie czasu rozpoczęcia badania po upłynieniu próbki, a także ogranicza wpływ zmian temperatury otoczenia na próbkę w czasie jej transportu do laboratorium.
- W szczególnych okolicznościach nasienie może być oddane poza laboratorium drogą masturbacji najlepiej do odpowiednio oznakowanego pojemnika pobrałego z laboratorium.
- Nasienie może być także oddane poza laboratorium w trakcie stosunku płciowego do specjalnej prezerwatywy nie wykazującej szkodliwego działania na plemniki.
- W opisanych wyżej sytuacjach pacjent powinien zostać poinformowany o konieczności dostarczenia próbki nasienia do laboratorium najpóźniej do godziny od momentu ejakulacji, gdyż analiza parametrów przyżyciowych, takich jak ruch, czy żywotność plemników, powinna być wykonana tuż po upłynieniu próbki do 1 h od ejakulacji.
- W czasie transportu do laboratorium nasienie nie powinno być poddawane wahanom temperatury (optymalna temperatura transportu to 20-37°C).
- Przy odbiorze próbki nasienia do analizy należy zanotować godzinę ejakulacji, a jeśli nasienie było oddane poza laboratorium, także godzinę dostarczenia jej do badania.
- Nie wykonuje się badania próbki nasienia uzyskanej w czasie tzw. stosunku przerwany, ponieważ pierwsza porcja ejakulatu, która zawiera najwięcej plemników, może zostać utracona, dodatkowo, próbka może zostać zanieczyszczona elementami komórkowymi lub bakteriami, a ponadto niskie pH pochwy może wpływać niekorzystnie na ruch plemników.
- Laboratorium mikrobiologiczne powinno przygotować oddzielną procedurę dotyczącą badań mikrobiologicznych nasienia.

KWALIFIKACJE PERSONELU WYKONUJĄCEGO BADANIE NASIENIA

Badanie nasienia wykonuje: diagnosta laboratoryjny lub technik analityki medycznej, którzy ukończyli specjalistyczny kurs badania nasienia według aktualnych rekomendacji Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL) i Polskiego Towarzystwa Andrologicznego (PTA).

Kurs jest organizowany przez KIDL oraz PTA. Składa się z części teoretycznej (5 h szkolenia) i praktycznej (15 h szkolenia). Odbycie kursu jest udokumentowane odpowiednim certyfikatem ważnym przez 5 lat. Odnowa ważności certyfikatu wymaga od-

bycia kursu praktycznego (8 godzin) co 5 lat. Celem kursu przypominającego jest sprawdzenie umiejętności personelu, wyjaśnienie problemów spotykanych w trakcie badania nasienia oraz przekazanie informacji na temat ewentualnych zmian w rekomendacjach i nowości w metodyce badania nasienia.

Dokumentacja badania nasienia

Dokumentacja medyczna w laboratorium jest prowadzona, przechowywana i przetwarzana zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej (ustawa z dnia 6 listopada 2008 roku o prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta (tj. Dz.U. z 2012 r., poz. 159 ze zm. oraz rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2010 r. w sprawie rodzajów i zakresu dokumentacji medycznej oraz sposobu jej przetwarzania (tj. Dz.U. z 2014 r., poz. 177 ze zm.))

Medyczne laboratorium diagnostyczne archiwizuje wyniki przez okres 20 lat.

Zlecenie badania

Laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedurę zlecenia badania nasienia oraz udostępnia ją zleceniodawcom, którzy potwierdzają zapoznanie się z tą procedurą. Wszyscy zleceniodawcy zlecają wykonanie badań przez medyczne laboratorium diagnostyczne zgodnie z tą procedurą.

Procedura zlecenia określa w szczególności formularz zlecenia badania laboratoryjnego. Formularz zlecenia badania laboratoryjnego zawiera w szczególności pola:

- 1) dane pacjenta
 - a) imię i nazwisko,
 - b) data urodzenia,
 - c) miejsce zamieszkania/oddział szpitalny,
 - d) numer PESEL, a w przypadku osoby nieposiadającej numeru PESEL – nazwa i numer dokumentu potwierdzającego tożsamość,
 - e) numer identyfikacyjny pacjenta (podawany przy braku innych danych);
- 2) pieczęć i podpis lekarza zlecającego badanie lub imię i nazwisko oraz nazwa i numer dokumentu potwierdzającego tożsamość innej osoby upoważnionej do zlecenia badania;
- 3) dane jednostki zlecającej badanie;
- 4) miejsce przesłania wyniku lub dane osoby upoważnionej do odbioru wyniku;
- 5) rodzaj materiału i jego pochodzenie;
- 6) zleczone badanie;
- 7) data i godzina pobrania materiału do badania;
- 8) dane osoby pobierającej materiał do badania;
- 9) data i godzina przyjęcia materiału do medycznego laboratorium diagnostycznego;
- 10) istotne kliniczne dane pacjenta, w szczególności: rozpoznanie, występujące czynniki ryzyka zakażenia, w tym wcześniejsza antybiotykoterapia, choroby towarzyszące, zabiegi chirurgiczne.

Zlecenie może być wystawione w formie elektronicznej z zachowaniem ww. wymagań.

Formułowanie i wydawanie wyników badania nasienia

Za nadzór i autoryzację wyników badania nasienia odpowiada diagnosta laboratoryjny posiadający aktualny certyfikat potwierdzający odbycie kursu badania nasienia organizowanego przez KIDL i PTA.

W formularzu wyniku badania nasienia podane są następujące informacje:

- 1) dane badanego
 - a) imię i nazwisko;

- b) numer PESEL, a w przypadku osoby nieposiadającej numeru PESEL — nazwa i numer dokumentu potwierdzającego tożsamość;
- c) numer identyfikacyjny pacjenta (podawany przy braku innych danych);
- 2) imię i nazwisko lekarza zlecającego badanie;
- 3) data i godzina oddania materiału do badania;
- 4) miejsce oddania nasienia (w domu lub w laboratorium);
- 5) nazwa badania;
- 6) metoda diagnostyczna stosowana przy wykonaniu badania (analiza manualna lub analiza wspomagana komputerowo, wg aktualnych rekomendacji);
- 7) wyniki poszczególnych parametrów badania nasienia;
- 8) aktualne wartości referencyjne dla poszczególnych parametrów badania nasienia;
- 9) ewentualne uwagi odnośnie obserwacji poczynionych podczas badania;
- 10) pieczęć i podpis diagnosty laboratoryjnego lub technika analityki medycznej wykonującego badanie;
- 11) pieczęć i podpis diagnosty laboratoryjnego autoryzującego badanie wykonane przez technika analityki medycznej.

Przykładowy wzór wyniku badania nasienia patrz *Załącznik nr 3*.

Wynik może być przekazany w formie elektronicznej z zachowaniem wymagań wskazanych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. nr 61 poz. 435 z późn. zm.).

ETAPY WYKONYWANIA BADANIA NASIENIA

W ciągu pierwszych 5 min od ejakulacji należy:

- odstawić pojemnik z próbką nasienia na mieszadło rotacyjne (temp. pok. 20-25°C) lub umieścić w cieplarni (37°C) na okres potrzebny do upłynnienia;

Zaraz po upłynnieniu nasienia (najlepiej w czasie do 30 min), ale przed upływem 60 min od ejakulacji należy:

- wpisać do protokołu badania czas upłynnienia (jeśli próbka nie upłynni się w przeciągu 30 min, odczekać z rozpoczęciem dalszych analiz kolejne 30 min);
- ocenić wygląd/kolor;
- ocenić lepkość;
- ocenić objętość;
- ocenić pH;
- przygotować preparat bezpośredni do oceny mikroskopowej próbki nasienia;
- ocenić ruchliwość plemników;
- przygotować rozcieńczenia próbki nasienia do oceny koncentracji plemników;
- ocenić żywotność plemników;
- przygotować rozmazy do oceny morfologii plemników;
- ocenić koncentrację plemników;
- ocenić koncentrację komórek okrągłych (jeśli obecne w nasieniu); zróżnicować je na komórki spermatogenezy i leukocyty z wykorzystaniem odpowiednich testów (lub w utrwalonym i wybarwionym rozmazie nasienia);
- ocenić koncentrację leukocytów (jeśli obecne w nasieniu);
- ocenić obecność innych elementów morfotycznych w nasieniu np. erytrocytów, komórek nabłonka, bakterii.

Po upływie 1 godziny od ejakulacji należy:

- utrwalić i wybarwić rozmazy nasienia do oceny morfologii plemników (ewentualnie do oceny i różnicowania komórek okrągłych – jeśli występują w nasieniu);
- ocenić morfologię plemników.

Przed upływem 3 godzin od ejakulacji należy:

- przesłać próbkę nasienia do badania mikrobiologicznego (jeśli wymagane przez lekarza).

OCENA MAKROSKOPOWA NASIENIA

Ocena makroskopowa nasienia powinna zostać przeprowadzona zaraz po upłynięciu nasienia, najlepiej w czasie do 30 min, jednak nie później niż w ciągu 60 min od ejakulacji.

Czas upłynięcia

Upłynięcie nasienia prawidłowo powinno wystąpić samoistnie w ciągu 60 min od ejakulacji (zwykle po ok. 15 min). W trakcie upłynięcia zaleca się umieszczenie pojemnika z próbką na mieszadle rotacyjnym lub kołyskowym (temp. pokojowa 20-25°C lub cieplarka 37°C). Czas upłynięcia podaje się w minutach.

Wartość referencyjna dla czasu upłynięcia ejakulatu wynosi:
≤ 60 min

Jeśli upłynięcie nie nastąpi w ciągu 60 min, to na wyniku podaje się informację – upłynięcie >60 min.

Czasami nasienie nie ulega upłynięciu, powodując trudności w wykonaniu badania. Aby przeprowadzić dalsze analizy, należy poddać próbkę dodatkowej obróbce poprzez mechaniczne mieszanie lub trawienie enzymatyczne np. bromeliną.

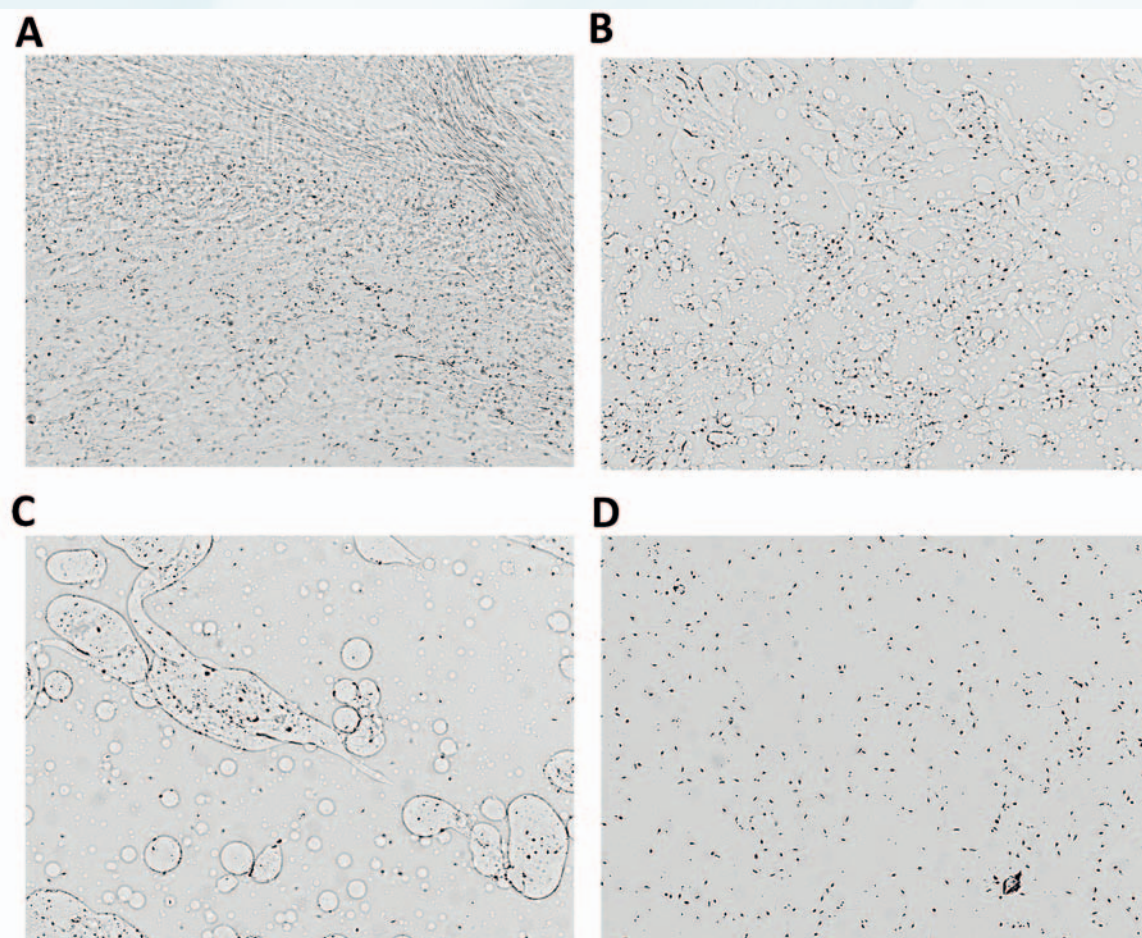
Metody zwiększające upłynięcie nasienia:

- dodanie równej objętości roztworu soli fizjologicznej w wersji Dulbecco i kilkukrotne zaaspirowanie ejakulatu do pipety Pasteura;
- kilkukrotne, delikatne zaaspirowanie (6-10 razy) ejakulatu do strzykawki z igłą o wewnętrznej średnicy od 0,69 do 0,84 mm;
- trawienie roztworem bromeliny (1 IU/ml) – zmieszanie w stosunku 1:1 próbki nasienia i roztworu bromeliny, inkubacja przez 10 min w 37°C, i wymieszanie przy użyciu pipety Pasteura przed dalszą analizą.

UWAGI:

- Zastosowanie ww. procedur musi zostać odnotowane na wyniku. W dalszych obliczeniach należy uwzględnić rozcieńczenie nasienia.
- Upłynięcie nasienia w niektórych przypadkach jest trudne do oceny, zwłaszcza jeśli preparat ma podwyższoną lepkość. W takich sytuacjach należy ocenić upłynięcie w preparacie mikroskopowym (Rycina 2). W nieupłyniętym nasieniu plemniki są unieruchomione w żelowatej części plazmy. Natomiast przy podwyższonej lepkości, ale przy upłyniętym nasieniu, plemniki mogą się poruszać.

- Jeśli w trakcie upłynniania nasienia zastosuje się delikatne mieszanie na mieszadło rotacyjnym lub kołyskowym, nasienie łatwiej uzyskuje homogenny wygląd. Umieszczenie próbki w cieplarni (37°C) przyspiesza proces upłynniania.



Rycina 2. Etapy upłynniania nasienia obserwowane w preparacie bezpośrednim w mikroskopie świetlnym, pow. 100x. Próbkę nasienia nieupłynnioną (A), częściowo upłynnioną (B, C), całkowicie upłynnioną (D). *Mikrofotografie autorstwa dr n. med. Katarzyny Marchlewskiej.*

Przyczyny nieprawidłowego upłynniania nasienia (Bjorndahl, 2010; Cooper, 2010) **to m.in.:**

- zaburzenie czynności prostaty;
- stan zapalny w układzie płciowym.

Objętość ejakulatu

Objętość wyrażana jest w ml.

Dolna wartość referencyjna dla objętości ejakulatu wynosi:

1,5 ml

(5. centyl, 95% przedział ufności: 1,4–1,7 ml)

Zalecana jest wagowa metoda pomiaru objętości (dokładność ważenia do 0,1 g). W tym celu należy:

- zważyć pojemnik, do którego ma być oddane nasienie – x [g]
- zważyć powtórnie pojemnik z nasieniem – y [g]
- obliczyć wagę nasienia – z [g]

$$z = y - x$$

Przyjmując, że gęstość nasienia wynosi 1 g/ml (dokładnie 1,014 g/ml), to wyliczona waga nasienia w [g] odpowiada objętości ejakulatu wyrażonej w [ml].

Drugą zalecaną metodą jest metoda bezpośredniej oceny objętości polegająca na pomiarze objętości ejakulatu z dokładnością do 0,1 ml w wyskalowanym cylindrze z szerokim ujściem, do którego pacjent oddał nasienie.

UWAGI:

- Pomiar objętości ejakulatu poprzez aspirowanie nasienia z pojemnika do skalowanej pipety/strzykawki lub przelewanie do skalowanego cylindra/probówki nie jest zalecany, gdyż nigdy nie udaje się przenieść całego ejakulatu i w takim wypadku wynik będzie zaniżony. Utrata części próbki, w zależności od jej lepkości, może dotyczyć od 0,3 do nawet 0,9 ml (*Brazil i wsp., 2004; Iwamoto i wsp., 2006; Cooper i wsp., 2007*).
- Precyzyjna ocena objętości jest istotna, gdyż wynik ten wykorzystuje się do wyliczenia takich parametrów jak: całkowita liczba plemników w ejakulacie, czy liczba plemników ruchomych, żywych i o prawidłowej budowie.
- Komercyjnie dostępne pojemniki mają różną masę, dlatego należy ważyć każdy pojemnik przed wydaniem go pacjentowi i zapisywać wagę na pojemniku.

Przyczyny nieprawidłowej objętości nasienia (*de la Taille i wsp., 1998; Weiske i wsp., 2000; Daudin i wsp., 2000; von Eckardstein i wsp., 2000*).

Mała objętość ejakulatu może być spowodowana:

- utratą części próbki;
- zablokowaniem dróg wyprowadzających nasienie np. gęstą wydzieliną w przebiegu zapalenia w układzie płciowym, w mukowiscydozie;
- wrodzonym obustronnym brakiem nasieniowodów;
- niedorozwojem/zaburzoną czynnością pęcherzyków nasiennych;
- niedorozwojem/zaburzoną czynnością gruczołu krokowego;
- częściowym wytryskiem wstecznym;
- niedoborem androgenów.

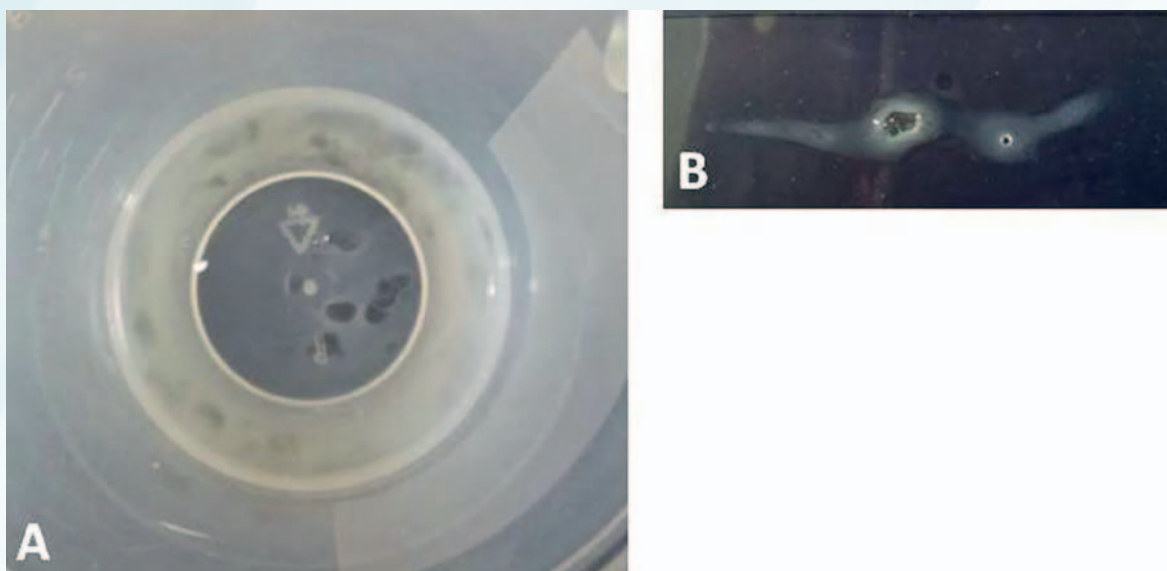
Duża objętość ejakulatu może być spowodowana:

- wysiękiem w przypadku aktywnego zapalenia gruczołów dodatkowych.

Wygląd nasienia

Wygląd nasienia określa się jako prawidłowy, gdy kolor nasienia jest szaro-opalizujący, mleczno-szary, nieprzezroczysty. W przypadku, gdy ejakulat ma nieprawidłową barwę, czyli jest przezroczysty, żółtawy lub czerwono-brunatny, informację tę umieszcza się na wyniku.

Oceniając barwę ejakulatu można w niektórych przypadkach zaobserwować przejrzyste struktury nazywane ciałkami żelatynowymi (Rycina 3). Mogą one utrudniać analizę, zwłaszcza gdy próbka wymaga odwirowania i oceny osadu. Obecność ciałek żelatynowych odnotowuje się w uwagach pod wynikiem.



Rycina 3. Pojemnik z nasieniem z widocznymi ciałkami żelatynowymi (A). Szkiełko podstawowe z kroplą nasienia i widocznym ciałkiem żelatynowym (B). Fotografie autorstwa dr n. med. Katarzyny Marchlewskiej.

Przyczyny nieprawidłowego wyglądu nasienia (Bjorndahl, 2010; Cooper, 2010) to m.in.:

- kolor żółtawy – żółtaczka, niektóre leki np. witaminy z grupy B;
- kolor czerwono-brunatny – domieszka krwi;
- ciałka żelatynowe – znaczenie kliniczne nie jest znane.

Lepkość nasienia

Lepkość nasienia określa się na podstawie długości kropli wypływającej z pipety o szerokim ujściu (jednorazowa pipeta Pasteura). W przypadku zwiększonej lepkości nasienie nie wypływa kroplami, ale tworzy nici o długości powyżej 2 cm. Inna metoda oceny polega na zanurzeniu w nasieniu szklanej pałeczki, podniesieniu jej i obserwacji, czy nie tworzy się nić o długości powyżej 2 cm.

W niektórych przypadkach nasienie jest niehomogenne i miejscami ma podwyższoną lepkość lub obecne są pasma śluzu. Należy taką obserwację uwzględnić w uwagach pod wynikiem.

W przypadku prawidłowej lepkości nasienie
wypływa kroplami lub tworzy nić o długości **<2 cm**

UWAGI:

- Podwyższona lepkość nasienia utrudnia zaaspirowanie do automatycznej pipety właściwej objętości próbki. Może to wpłynąć na dokładność wykonywania takich analiz, jak ocena koncentracji plemników (przygotowywanie rozcieńczeń), ocena ruchu plemników, analiza markerów biochemicznych, czy wykrywanie przeciwciał przeciwplemnikowych.
- W celu zmniejszenia podwyższonej lepkości stosuje się takie same metody jak przy nieprawidłowym upłynnieniu nasienia (mechaniczne, enzymatyczne – patrz rozdział *Czas upłynnienia*).

Przyczyny zwiększonej lepkości nasienia (Bjorndahl, 2010; Cooper, 2010) to m.in:

- zaburzenie czynności prostaty;
- stan zapalny w układzie płciowym;
- odwodnienie;
- mukowiscydoza.

pH nasienia

Należy je oznaczać po upłynnieniu nasienia, zawsze w jednakowym czasie, najlepiej po 30 min, lecz przed upływem 60 min od ejakulacji, przy użyciu papierków wskaźnikowych o zakresie pH 6,0 do 10,0. Zastosowanie papierków uniwersalnych w zakresie 0-14,0 nie pozwala na uzyskanie dokładności pomiaru wymaganej do oceny nasienia.

Dolna wartość referencyjna dla pH ejakulatu wynosi:

7,2

UWAGI:

- Przy zakupie nowego opakowania papierków wskaźnikowych należy sprawdzić ich dokładność przy użyciu wzorcowych roztworów buforowych o określonym pH.
- Po oddaniu nasienia jego pH wzrasta z czasem, więc wysokie wartości pH mogą nie stanowić istotnej klinicznie informacji.

Przyczyny nieprawidłowego pH nasienia (de la Taille i wsp., 1998; Weiske i wsp., 2000; Daudin i wsp., 2000; von Eckardstein i wsp., 2000; Bjorndahl, 2010; Cooper, 2010).
pH nasienia <7,0 może świadczyć m.in. o:

- niedorozwoju/zaburzeniu czynności pęcherzyków nasiennych;
- niedrożności dróg wyprowadzających wydzielinę pęcherzyków nasiennych.

pH nasienia >8,5 i mała objętość nasienia może świadczyć m.in. o:

- niedorozwoju/zaburzeniu czynności gruczołu krokowego;
- niedrożności dróg wyprowadzających wydzielinę gruczołu krokowego.

Zapach

Prawidłowa próbka nasienia ma zapach określany jako zapach kasztanów lub chloru. W przypadku, kiedy zapach znacznie różni się od prawidłowego, należy ten fakt zanotować w uwagach, gdyż może być to związane z występującymi u układu płciowym infekcjami.

WSTĘPNA OCENA MIKROSKOPOWA

Do oceny mikroskopowej zaleca się używanie mikroskopu kontrastowo-fazowego z zestawem obiektywów o powiększeniu 10x, 20x, 40x, 100x. Dopuszczalne jest wykorzystanie mikroskopu świetlnego.

Badanie mikroskopowe rozpoczyna się zaraz po upłynnieniu próbki, najlepiej w czasie do 30 min, jednak nie później niż w ciągu 60 min od ejakulacji. Jeśli upłynnienie nie nastąpiło w przeciągu 60 min, to przed przystąpieniem do analizy próbka powinna być poddana dodatkowej obróbce (mechanicznej lub enzymatycznej – patrz rozdział *Czas upłynnienia*).

Przygotowanie preparatu bezpośredniego

Przed każdorazowym pobraniem próbki do oceny mikroskopowej nasienie należy bardzo starannie, ale delikatnie wymieszać, unikając tworzenia pęcherzyków powietrza. Do mieszania polecana jest jednorazowa pipeta Pasteura o szerokim ujściu (1,5 mm, pojemność 3 ml), którą należy delikatnie zaaspirować próbkę około 10 razy. Następnie, przy użyciu pipety automatycznej należy nanieść 10 μ l nasienia na szkiełko podstawowe, przykryć szkiełkiem nakrywkowym o wymiarach 22 x 22 mm unikając tworzenia się pęcherzyków powietrza. Tak przygotowany preparat pozostawia się na ok. 1 min w temp. 20-25°C lub 37°C, a następnie poddaje ocenie mikroskopowej.

UWAGI:

- Do mieszania próbki nie zaleca się stosowania wytrząsarki (ang. *vortex*), ponieważ może to powodować uszkodzenie plemników.
- Objętość nanoszonej na szkiełko podstawowe próbki nasienia i rozmiar szkiełka nakrywkowego muszą być wystandaryzowane, aby zapewnić uzyskanie preparatu o głębokości 20 μ m, co ma istotne znaczenie przy ocenie ruchu plemników (patrz rozdział *Ocena ruchliwości plemników*). Zalecaną głębokość preparatu uzyskuje się, gdy zostanie naniesiona próbka o objętości 10 μ l i przykryje się ją szkiełkiem nakrywkowym o wymiarach 22x22 mm, lub 6,5 μ l i przykryje się szkiełkiem o wymiarach 18x18 mm, lub 11 μ l i przykryje się szkiełkiem o wymiarach 21x26 mm.

Wstępna ocena mikroskopowa preparatu przyżyciowego

Ocenę tę wykonuje się w powiększeniu 100x. Umożliwia ona zaobserwowanie:

- występowania pasm śluzu;
- nieprawidłowości w zachowaniu się plemników (agregacja, aglutynacja);
- obecności komórek okrągłych (komórek spermatogenezy, leukocytów);
- obecności samych główek lub samych witek plemników;
- obecności innych elementów morfotycznych (np. erytrocytów, komórek nabłonkowych, kryształów sperminy, ciałek resztkowych).

Agregację obserwuje się, gdy nieruchome plemniki przylegają do siebie, lub ruchome plemniki przylegają do pasm śluzu, innych komórek lub do ciałek resztkowych tworząc skupiska.

Aglutynację obserwuje się, gdy ruchome plemniki przylegają do siebie tworząc skupiska (tzw. aglutynaty). Plemniki mogą przylegać do siebie na zasadzie „główka-główka”, „witka-witka”, lub w sposób mieszany („główka-witka”). Plemniki związane w aglutynacie zwykle wykazują dość energiczny ruch, chociaż w niektórych wypadkach, kiedy aglutynacja jest bardzo duża i dotyczy wielu plemników ich ruch może być słabszy. Zjawisko aglutynacji dotyczy tylko plemników.

Aglutynacja określana jest w stopniach od 1 do 4:

- stopień 1 – gdy <10 plemników tworzy skupiska, a w preparacie obecnych jest wiele wolnych plemników;
- stopień 2 – gdy od 10 do 50 plemników tworzy skupiska, a w preparacie obecne są wolne plemniki;
- stopień 3 – gdy >50 plemników tworzy skupiska, a w preparacie obecne są tylko pojedyncze wolne plemniki;
- stopień 4 – gdy wszystkie plemniki tworzą skupiska, a poszczególne skupiska łączą się ze sobą.

Określenie stopnia aglutynacji nie zawsze daje pełną charakterystykę tego zjawiska. Wielkość skupiska aglutynacji nie zależy od częstości jej występowania w nasieniu.

Wobec tego może wystąpić sytuacja, gdy jest bardzo wiele aglutynatów skupiających tylko kilka plemników (stopień 1), ale niewiele wolnych plemników obecnych w preparacie. Można też zauważyć inną sytuację, kiedy w badanym preparacie znajduje się jedną, ale bardzo dużą aglutynację (>50 plemników, stopień 3) oraz bardzo wiele swobodnie poruszających się plemników. Powinno się wobec tego oprócz stopnia aglutynacji uwzględnić na wyniku również częstość występowania tego zjawiska. Częstość występowania aglutynacji ocenia się w powiększeniu 200x i opisuje jako ilość w polu widzenia lub w preparacie.

UWAGI:

- Ruchliwe plemniki, które przylegają do komórek okrągłych, nieruchomych plemników, czy innych elementów morfotycznych w nasieniu (agregacje) nie powinny być brane pod uwagę przy ocenie stopnia aglutynacji.
- Obecność aglutynacji sugeruje występowanie przeciwciał przeciwplemnikowych, a w takim wypadku lekarz powinien zlecić dodatkowe badania (MAR-test, Immunobead test).
- Występowanie masywnej aglutynacji może wpływać na ocenę koncentracji i ruchu plemników.

OCENA RUCHLIWOŚCI PLEMNIKÓW

Ruchliwość plemników należy oceniać zaraz po upłynnieniu nasienia, najlepiej w ciągu 30 min ale przed upływem 60 min od ejakulacji, aby uniknąć niekorzystnego wpływu zmiany pH, temperatury oraz odwodnienia próbki.

Oceny dokonuje się w dwóch preparatach bezpośrednich pod powiększeniem 400x lub 200x. Znormalizowana objętość nasienia (10 μ l) oraz wymiary szkiełka nakrywkowego (22x22 mm) mają na celu uzyskanie stałej głębokości (około 20 μ m) ocenianych preparatów, która pozwala na swobodny ruch plemników. Procedura może być przeprowadzona w temperaturze pokojowej 20-25°C lub w temperaturze 37°C. Ruchliwość plemników zależy od temperatury i jest optymalna w 37°C. Dlatego też, temperaturą z wyboru do oceny ruchu plemników jest temperatura 37°C. Jeżeli ocenia się preparat w temp. 37°C to próbkę inkubuje się również w tej temperaturze, używa wstępnie ogrzanych szkiełek podstawowych i nakrywkowych oraz mikroskopu zaopatrzonego w podgrzewany stolik. Nadmierne wychłodzenie lub ogrzanie próbki powoduje osłabienie ruchu lub całkowite unieruchomienie plemników.

Ruch plemników klasyfikuje się według następującej skali:

- ruch postępowy (ang. *progressive motility* – PR) – plemniki poruszające się ruchem postępowym zarówno liniowym, jak i po dużym okręgu, bez względu na ich szybkość;
- ruch niepostępowy (ang. *non progressive motility* – NP) – plemniki poruszające się ruchem niepostępowym (w miejscu i po małym okręgu);
- plemniki nieruchome (ang. *immotility* – IM).

Dolna wartość referencyjna dla odsetka plemników ruchliwych
(całkowita ruchliwość plemników – PR+NP) wynosi:

40%

(5. centyl, 95% przedział ufności: 38-42%)

Dolna wartość referencyjna dla odsetka plemników z ruchem postępowym (PR)
wynosi:

32%

(5. centyl, 95% przedział ufności: 31-34%)

Z klinicznego punktu widzenia istotne jest obliczenie całkowitej liczby plemników o ruchu postępowym w ejakulacie. Uzyskuje się ją mnożąc całkowitą liczbę plemników w ejakulacie przez odsetek plemników o ruchu postępowym (przykład 1).

Przykład 1: Wyliczona całkowita liczba plemników wynosi 54 mln/ejakulat. Odsetek plemników z ruchem postępowym to 25%. Tak więc całkowita liczba plemników wykazujących ruch postępowy będzie wynosiła $54 \cdot 25 / 100 = 13,5$ mln w ejakulacie.

Dolna wartość referencyjna dla całkowitej liczby plemników
o ruchu postępowym wynosi:

12,5 mln/ejakulat*

* Wartość tę obliczamy mnożąc dolną wartość referencyjną dla całkowitej liczby plemników w ejakulacie (39 mln) przez dolną wartość referencyjną dla odsetka plemników wykazujących ruch postępowy (32%).

UWAGI:

- Głębokość preparatu mniejsza niż $20 \mu\text{m}$ ogranicza ruch obrotowy plemników (Le Lannou i wsp., 1992; Kraemer i wsp., 1998).
- Jeżeli preparat będzie zbyt głęboki (powyżej $20 \mu\text{m}$) to ruch będzie trudny do oceny ze względu na nieostry obraz.
- W przypadku, gdy liczba plemników w polach widzenia znacznie się różni, oznacza to, że próbka jest niehomogenna. Należy jeszcze raz dokładnie wymieszać próbkę nasienia i przygotować nowe preparaty. Brak homogenności może wynikać z nieprawidłowej konsystencji, nieprawidłowego upłynniania, agregacji lub aglutynacji plemników.
- Ocenę ruchu plemników powinno się wykonywać co najmniej 5 mm od krawędzi szkiełka nakrywkowego w celu uniknięcia wpływu wysuszenia preparatu na ruchliwość.
- Przy dużej ilości plemników rekomenduje się wykorzystanie okularu z siatką, co pozwala ograniczyć obszar przeglądania oraz ułatwia liczenie ruchomych i nieruchomych plemników.
- W danym polu widzenia (kwadracie siatki okularu) jako pierwsze liczy się plemniki poruszające się ruchem postępowym, a następnie w tym samym polu ocenia się plemniki o ruchu niepostępowym oraz plemniki nieruchome.
- W celu oceny i klasyfikacji ruchu obserwacji poddaje się plemniki przynajmniej w 5 polach widzenia, przy czym ocenia się nie mniej niż 200 plemników w jednym preparacie z wykorzystaniem sumatora hematologicznego.
- Przy ocenie ruchu należy pamiętać, aby w ostatnim polu widzenia ocenić ruch wszystkich plemników, nawet jeśli wcześniej przekroczona została liczba 200 ocenionych plemników.
- Ocenia się tylko nieuszkodzone plemniki (mające główkę i witek), ponieważ tylko takie uwzględnia się przy wyliczaniu liczby plemników. Nie bierze się pod uwagę pozbawionych główek witek (ang. *pinhead*).
- Ruch wyraża się jako odsetek plemników o danym typie ruchu, wynik zaokrąglając do liczby całkowitej. Wynik podaje się jako średnią z dwóch wyników uzyskanych z oceny ruchu danego typu w dwóch preparatach po zweryfikowaniu różnicy z poszczególnych zliczeń.

- W celu zweryfikowania dopuszczalnej różnicy pomiędzy wynikami uzyskanymi z obu preparatów należy porównać wyniki reprezentujące najliczniejszą kategorię ruchu (patrz przykład 2 i 3) wykorzystując do tego celu Tabelę 1.
- W przypadkach niezgodności co do różnicy wynikającej z Tabeli 1 liczenie musi być wykonane w całości od początku, poczynsz od wykonania dwóch nowych preparatów bezpośrednich.
- Podczas analizy próbek niehomogennych czasami nawet trzeci zestaw powtórzeń może wykazać niedopuszczalne różnice. W takich przypadkach należy obliczyć średnią ze wszystkich powtórzeń i odnotować to w uwagach na wyniku.

Tabela 1. Akceptowalna różnica w odsetkach ruchu plemników uzyskanych z dwóch zliczeń w zależności od ich średniej.

Średnia (%)	Akceptowalna różnica
0	1
1	2
2	3
3-4	4
5-7	5
8-11	6
12-16	7
17-23	8
24-34	9
35-65	10
66-76	9
77-83	8
84-88	7
89-92	6
93-95	5
96-97	4
98	3
99	2
100	1

Przykład 2: Podczas analizy ruchu w dwóch preparatach uzyskano wyniki: ruch postępowy – 30% i 50%; ruch niepostępowy – 5% i 15% oraz plemniki nieruchome – 65% i 35%. Najliczniejszą kategorię ruchu reprezentowały plemniki nieruchome, ich średnia to 50%, a różnica pomiędzy nimi wynosi 30%. Z Tabeli 1 wynika, że dla wartości 50% dopuszczalna różnica pomiędzy wynikami wynosi 10%. Dopuszczalna różnica dla średniej z dwóch zliczeń została przekroczona, tak więc należy wykonać ocenę ruchu jeszcze raz (od momentu przygotowania preparatów przyżyciowych).

Przykład 3: Podczas analizy ruchu w dwóch preparatach uzyskano wyniki: ruch postępowy – 37% i 28%; ruch niepostępowy – 3% i 6% oraz plemniki nieruchome – 60% i 66%. Najliczniejszą kategorię ruchu reprezentowały plemniki nieruchome, ich średnia to 65%, a różnica pomiędzy nimi wynosi 6%. Z Tabeli 1 wynika, że dla wartości średniej 63% dopuszczalna różnica pomiędzy wynikami wynosi 10%. Różnica z dwóch zli-

czeń (6%) jest mniejsza od różnicy akceptowalnej (10%) odczytanej z tabeli, tak więc wylicza się średnią dla każdego typu ruchu: PR-32%, NP-4%, IM-63%.

Przyczyną zmniejszonego odsetka plemników ruchliwych (Chemes i Rawe, 2003; Bjorndahl, 2010; Cooper, 2010; Krausz, 2014) może być m.in.:

- zaburzenie czynności prostaty;
- zwiększona lepkość nasienia;
- zwiększona aglutynacja lub agregacja plemników;
- przeciwciała przeciwplemnikowe;
- stan zapalny w układzie moczowo-płciowym;
- mucowiscydoza;
- zespół wrogiego najądrza;
- zespół Kartagenera;
- zespół 9+0;
- zespół nieruchomych rzęsek;
- żylaki powrózków nasiennych;
- czynniki toksyczne np. metale ciężkie; ksenoestrogeny;
- podwyższona temperatura;
- nadmierne spożycie alkoholu, palenie papierosów;
- pole elektromagnetyczne.

OCENA ŻYWOTNOŚCI PLEMNIKÓW

Ocena żywotności plemników odbywa się poprzez identyfikację plemników z nie-naruszoną, integralną błoną komórkową. Wymagane jest jej wykonanie w próbkach, gdzie ruch całkowity plemników jest poniżej wartości referencyjnych (<40% plemników ruchomych), jednak może ona być wykonywana rutynowo we wszystkich próbkach nasienia. Ocena żywotności plemników powinna być wykonana zaraz po upłynięciu próbki, najlepiej w czasie do 30 min, jednak nie później niż w ciągu 60 min od ejakulacji.

Dolna wartość referencyjna dla odsetka żywych plemników wynosi:

58%

(5. centyl, 95% przedział ufności: 55-63%)

Z klinicznego punktu widzenia istotne jest obliczenie całkowitej liczby plemników żywych w ejakulacie. Uzyskuje się ją mnożąc całkowitą liczbę plemników w ejakulacie przez odsetek plemników żywych (patrz przykład 1 – wyliczanie całkowitej liczby plemników o ruchu postępowym).

Dolna wartość referencyjna dla całkowitej liczby plemników żywych:

22,6 mln/ejakulat*

*Wartość tę obliczamy mnożąc dolną wartość referencyjną dla całkowitej liczby plemników w ejakulacie (39 mln) przez dolną wartość referencyjną dla odsetka plemników żywych (58%).

UWAGI:

- Klinicznie ważne jest, czy plemniki nieruchome są martwe, czy żywe. Wynik żywotności powinien być interpretowany w powiązaniu z oceną ruchliwości plemników.

- Ocena żywotności stanowi swego rodzaju sprawdzenie poprawności oceny ruchu plemników. Odsetek martwych plemników nigdy nie powinien przewyższać odsetka plemników nieruchomych (biorąc pod uwagę błąd próby), z kolei odsetek żywych plemników zwykle przewyższa odsetek plemników wykazujących ruch.

Zalecane testy oceny żywotności plemników:

- test eozyna-nigrozyna;
- przyżyciowy test eozynowy;
- hipoosmotyczny test pęcznienia plemników (HOS test, ang. *hypo-osmotic swelling test*).

Zasada działania testów do oceny żywotności

Test eozyna-nigrozyna i przyżyciowy test eozynowy opierają się na zasadzie przenikania barwnika, w tym wypadku eozyny, przez uszkodzoną błonę komórkową plemników martwych, w których główka zabarwia się na czerwono lub ciemno-różowo. Główki plemników żywych nie absorbują eozyny i pozostają niezabarwione lub lekko różowe (Rycina 4).

Z kolei test HOS opiera się na zasadzie, że tylko plemniki z integralną, nienaruszoną błoną komórkową (plemniki żywe) po umieszczeniu w roztworze hipoosmotycznym będą ulegały pęcznieniu na skutek wnikania wody do wnętrza plemnika, co skutkuje „zwijaniem” (pęcznieniem) ich witek. W plemnikach nieżywych nie obserwuje się żadnych zmian w wyglądzie witek.

Test eozyna-nigrozyna

Do testu wykorzystuje się rozmazy plemników wybarwione mieszaniną barwników eozyna-nigrozyna. Etap barwienia plemników odbywa się w probówce typu eppendorf. Test można wykonywać za pomocą dostępnych komercyjnie zestawów lub przygotowując samodzielnie odczynniki.

Przygotowanie odczynników:

- rozpuścić 0,67 g eozyny Y (C.I. 45380) i 0.9 g chlorku sodu (NaCl) w 100 ml destylowanej wody (lekko podgrzewając);
- dodać 10 g nigrozyny (C.I. 50420) do 100 ml ww. roztworu eozyny Y;
- zagotować roztwór, następnie pozostawić do wystygnięcia w temp. pokojowej;
- przefiltrować przez bibułę filtracyjną (np. 90 g/m²), przechowywać w ciemnej butelce.

Analizę wykonuje się w dwóch powtórzeniach. W celu wykonania testu pobiera się po 50 μ l upłynnionego nasienia do dwóch probówek typu eppendorf, dodaje po równej objętości przygotowanej mieszaniny barwników eozyna-nigrozyna i dokładnie miesza. Po 30 s z każdej mieszaniny wykonuje się rozmaz. Po wyschnięciu, każdy z preparatów ocenia się pod immersją przy powiększeniu 1000x. W każdym z preparatów liczy się po co najmniej 200 plemników z wykorzystaniem sumatora hematologicznego, różnicując je na żywe (niezabarwione główki) i martwe (główki czerwone lub ciemnoróżowe) (Rycina 4A);

Barwnik nigrozyna zwiększa kontrast między tłem preparatu (rozmazu) a główkami plemników, co ułatwia ich różnicowanie. Preparaty mikroskopowe wykonane tym testem po zabezpieczeniu (np. balsamem kanadyjskim) można przechowywać do ponownej oceny i do kontroli jakości (Björndahl i wsp., 2003).

UWAGI:

- Należy pamiętać, aby w ostatnim polu widzenia ocenić wszystkie znajdujące się tam plemniki, nawet jeśli wcześniej przekroczona została liczba 200 plemników.
- W wyniku podaje się odsetki plemników żywych i martwych będące średnią z dwóch wyników uzyskanych z oceny w dwóch preparatach, po zweryfikowaniu różnicy z poszczególnych zliczeń (patrz rozdział *Ruchliwość plemników*, Tabela 1); Przy ocenie żywotności plemników do weryfikacji dopuszczalnej różnicy pomiędzy wynikami uzyskanymi z obu preparatów należy porównać wyniki dla żywych plemników.
- W przypadkach niezgodności co do różnicy wynikającej z Tabeli 1 ocena musi być wykonana w całości od początku (od wykonania etapu barwienia w probówkach typu eppendorf).

Przyżyciowy test eozynowy

W tym teście próbkę ocenia się w preparacie przyżyciowym, a nie w rozmazie. Metoda jest prosta i szybka, ale preparaty nie mogą być przechowywane. Do barwienia wykorzystuje się 0,5% roztwór eozyny Y w fizjologicznym roztworze soli (0,9% NaCl).

Przygotowanie odczynników:

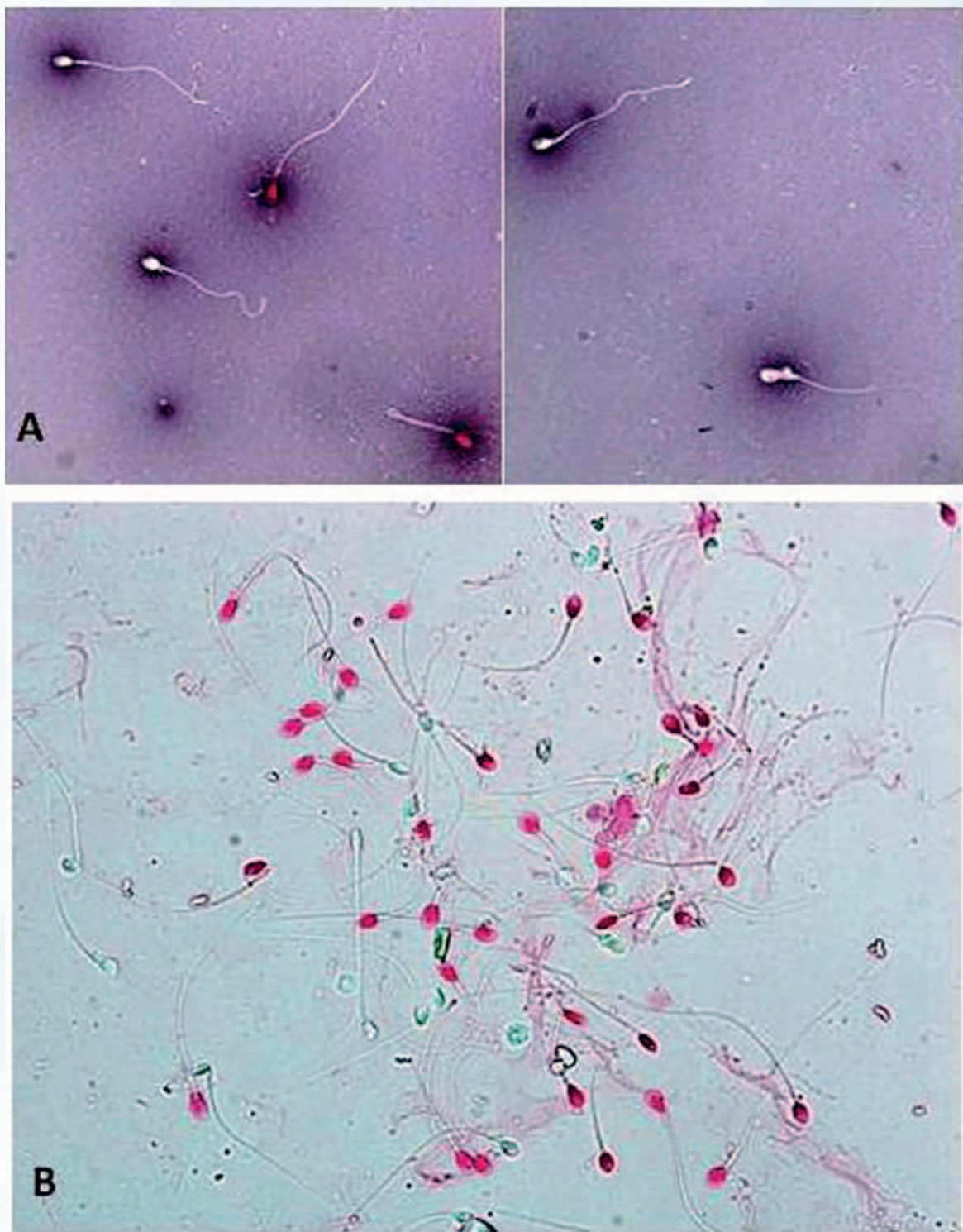
- rozpuścić 0,9 g NaCl w 100 ml destylowanej wody;
- rozpuścić 0,5 g eozyny Y (C.I 45380) w 100 ml roztworu NaCl.

Niektóre komercyjne roztwory eozyny są hipotoniczne i dają fałszywie pozytywne wyniki (*Björndahl i wsp.*, 2004). Używając takich roztworów należy dodać 0,9 g NaCl do 100 ml roztworu, aby podnieść jego osmolalność.

Analizę wykonuje się w dwóch powtórzeniach. Obydwa preparaty mogą być wykonane na jednym szkiełku podstawowym. W celu wykonania testu nakłada się dwa razy po 5 μ l upłynnionego nasienia na szkiełko podstawowe i każdą kroplę łączy z 5 μ l roztworu eozyny delikatnie mieszając (np. końcówką do pipety). Następnie obie mieszaniny nakrywa się szkiełkami nakrywkowymi (22x22 mm) i po 30 s poddaje ocenie najlepiej z wykorzystaniem ujemnego kontrastu fazowego pod powiększeniem 200x lub 400x. Dopuszcza się ocenę w mikroskopie świetlnym. W każdym z preparatów liczy się po co najmniej 200 plemników z wykorzystaniem sumatora hematologicznego, różniując je na żywe (niezabarwione główki) i martwe (główki czerwone lub ciemnoróżowe) (Rycina 4B). Zasady dotyczące wykonywania analizy są takie same jak przy teście eozyna-nigrozyna (patrz *Uwagi* powyżej).

UWAGI:

- Plemniki, w których wybarwia się tylko pewien rejon wstawki, a reszta główki pozostaje niezabarwiona, ocenia się jako żywe. Są to tzw. plemniki z nieszczelną membraną wstawki (tzw. „przeciekająca wstawka”).
- Jeżeli w przyżyciowym teście eozynowym występują trudności z oceną jasno-różowych główek, lub główek z „przeciekającą wstawką” to zaleca się wykonanie oceny z wykorzystaniem testu eozyna-nigrozyna w celu zwiększenia kontrastu pomiędzy tłem a główką.



Rycina 4. Obrazy mikroskopowe preparatów nasienia wybarwionych w teście eozyna-nigrozyna (A) i w przyżyciowym teście eozynowym (B). Plemniki, których główki wybarwione są na kolor czerwony lub ciemno różowy są plemnikami nieżywymi, a plemniki, których główki są nie-zabarwione lub lekko różowe są plemnikami żywymi. Mikrofotografie autorstwa dr n. med. Katarzyny Marchlewskiej.

Hipoosmotyczny test pęcznienia plemnika (HOS test)

Test ten jest metodą alternatywną do przedstawionych testów barwnych (Jeyendran i wsp., 1984). Wykonywany jest w sytuacjach, gdy chce się uniknąć barwienia plemników np. przy selekcji żywych plemników do metod wspomaganego rozrodu (docyto-

plazmatyczne wstrzyknięcie plemnika do komórki jajowej, ang. *intracytoplasmic sperm injection* – ICSI). W plemnikach żywych, z integralną błoną komórkową, już po 5 min w środowisku hipoosmotycznym dochodzi do zmian w wyglądzie witki, a zmiany te stabilizują się w przeciągu 30 min (Hossain i wsp., 1998). Ocena dla celów terapeutycznych wykonywana jest po 5 min inkubacji, a do badań rutynowych stosuje się 30 min inkubację (Hossain i wsp., 1998). Test ten można wykonywać za pomocą dostępnych komercyjnie zestawów lub przygotowując samodzielnie roztwór hipoosmotyczny.

Przygotowanie odczynników:

- roztwór hipoosmotyczny dla celów diagnostycznych: rozpuścić 0,735 g cytrynianu sodu ($2 \times H_2O$) i 1,351 g D-fruktozy w 100 ml destylowanej wody; rozpipetować przygotowany roztwór po 1 ml i zamrozić w $-20^{\circ}C$;
- roztwór hipoosmotyczny wykorzystywany w celach terapeutycznych: rozcieńczone sterylną wodą medium w stosunku 1:2 (1+1).

Analizę wykonuje się w dwóch powtórzeniach. W celu wykonania testu pobiera się po 100 μl upłynnionego nasienia i dodaje do dwóch probówek typu eppendorf, w których znajduje się 1 ml hipoosmotycznego roztworu, i dokładnie miesza. Następnie mieszaniny inkubuje się w $37^{\circ}C$ przez 30 min (lub 5 min). Po tym czasie 10 μl mieszaniny nakrapla się na szkiełko podstawowe, nakrywa szkiełkiem nakrywkowym 22x22 mm i ocenia, najlepiej w mikroskopie kontrastowo-fazowym, pod powiększeniem 200x lub 400x, różnicując plemniki z na te witką niezmienioną (plemniki martwe) oraz te z napęczniałą witką (plemniki żywe). Zasady dotyczące wykonywania analizy są takie same jak przy teście eozyna-nigrozyna (patrz Uwagi powyżej).

Przyczyny dużego odsetka martwych i zarazem nieruchomych plemników (Wilton i wsp., 1988; Correa-Perez i wsp., 2004; Bjorndahl, 2010; Cooper, 2010) to m.in.:

- stan zapalny w układzie płciowym;
- czynniki toksyczne np. metale ciężkie, ksenoestrogeny, niektóre chemioterapeutyki;
- żylaki powrózków nasiennych;
- podwyższona temperatura;
- nadmierne spożycie alkoholu;
- palenie dużych ilości papierosów.

OCENA LICZBY PLEMNIKÓW

Liczba plemników opisywana jest przez dwa parametry: koncentrację plemników oraz całkowitą liczbę plemników w ejakulacie. Pierwszy z nich odnosi się do liczby plemników w jednostce objętości nasienia (mln/ml), podczas gdy drugi odnosi się do liczby plemników w całej objętości ejakulatu (mln/ejakulat) i wylicza się go mnożąc koncentrację plemników przez objętość ejakulatu. Wyniki dla obu parametrów powinny znaleźć się na wyniku badania nasienia.

Termin „gęstość plemników” oznacza masę plemników w jednostce objętości. Nie powinien być mylony z terminem „koncentracja plemników”, który przedstawia liczbę plemników w jednostce objętości.

Dolna wartość referencyjna dla koncentracji plemników wynosi:

15x10⁶ plemników / ml

(5. centyl, 95% przedział ufności: 12-16 x 10⁶ plemników / ml)

Dolna wartość referencyjna dla całkowitej liczby plemników wynosi:

39x10⁶ plemników / ejakulat

(5. centyl, 95% przedział ufności: 33-46 x 10⁶ plemników / ejakulat)

Zarówno całkowita liczba plemników w ejakulacie, jak i koncentracja plemników, są ściśle związane z czasem do uzyskania ciąży (Slama i wsp., 2002) oraz częstością uzyskanych ciąż u partnerek (WHO 1996, Zinaman i wsp., 2000). Stanowią one parametry pozwalające na prognozowanie możliwości uzyskania ciąży (Bonde i wsp., 1998, Larsen i wsp., 2000).

Wstępna ocena liczby plemników w preparacie przyżyciowym i przygotowanie rozcieńczeń próbki do oceny w komorze zliczeniowej

W celu ustalenia odpowiedniego rozcieńczenia próbki nasienia do oceny koncentracji plemników wykonuje się ocenę liczby plemników w polu widzenia w preparacie przyżyciowym (ten sam preparat, który jest wykorzystywany do wstępnej oceny mikroskopowej nasienia i oceny ruchliwości plemników). Zlicza się plemniki co najmniej z 5 pól widzenia pod powiększeniem 200x lub 400x i oblicza średnią liczbę plemników w polu widzenia.

UWAGI:

- Jeśli liczba plemników w kolejnych polach widzenia znacznie się różni, to próbka jest niehomogenna. W takim przypadku próbka nasienia powinna być jeszcze raz dokładnie wymieszana i powinno się przygotować nowy preparat do oceny.
- Brak homogenności próbki może wynikać z nieprawidłowej konsystencji nasienia (zwiększona lepkość), nieprawidłowego upłynnienia, występowania agregacji lub aglutynacji plemników. W takich przypadkach ocena koncentracji plemników będzie utrudniona.
- Jeśli w preparacie przyżyciowym nie znajduje się plemników to przygotowuje się kolejny preparat i ocenia go jeszcze raz. Jeśli i w drugim preparacie nie znajduje się plemników, to postępuje się z próbką wg opisu w rozdziale *Postępowanie z próbką, kiedy w preparacie przyżyciowym nie ma plemników*.

Następnie korzystając z Tabeli 2 wykonuje się odpowiednie rozcieńczenia w dwóch probówkach typu eppendorf (2 powtórzenia) do oceny w komorze zliczeniowej. Zalecanym rozcieńczalnikiem do przygotowanie rozcieńczeń próbki jest roztwór wodorowęglanu sodu NaHCO₃ w formalinie.

Przygotowanie odczynnika:

- rozpuścić 50 g NaHCO₃ w 10 ml 35% formaliny (v/v);
- ww. roztwór należy dobrze wymieszać i uzupełnić wodą destylowaną do 1000 ml; trwałość roztworu w temp. 4°C – 12 miesięcy.

Do wykonania rozcieńczeń zalecane jest używanie automatycznych pipet tłokowych (ang. *positive-displacement pipette*) oraz aspirowanie próbki nasienia o objętości nie mniejszej niż 50 µl w celu zminimalizowania błędów związanego z pobieraniem małych objętości (Tabela 2).

Tabela 2. Zalecane rozcieńczenia w zależności od uśrednionej liczby plemników w polu widzenia przy powiększeniu 400x lub 200x.

Liczba plemników w polu widzenia (pow. 400x)	Liczba plemników w polu widzenia (pow. 200x)	Rozcieńczenie	Objętość nasienia w μl	Objętość rozcieńczalnika w μl
< 2	< 8	1:2 (1 + 1)	50	50
2-15	8-60	1:2 (1 + 1)	50	50
16-100	64-400	1:5 (1 + 4)	50	200
> 101	> 404	1:20 (1 + 19)	50	950

W wyjątkowych wypadkach, kiedy rozcieńczenie 1:20 jest niewystarczające (w komorze dużo plemników zachodzi na siebie) należy przygotować większe rozcieńczenie (1:50 tj. 50 μl nasienia i 2450 μl rozcieńczalnika).

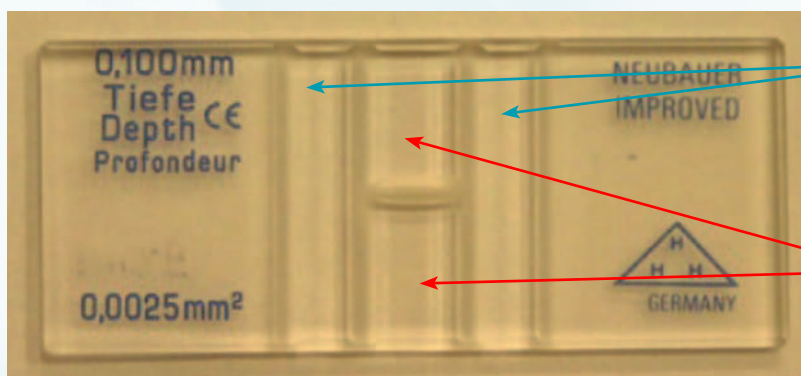
UWAGI:

- Wykonanie rozcieńczeń powinno nastąpić w czasie do 60 min od ejakulacji.
- Najpierw do opisanych probówek typu eppendorf przenosi się odpowiednią objętość rozcieńczalnika.
- Tuż przed pobraniem odpowiedniej objętości nasienia (nie mniej niż 50 μl) dokładnie i delikatnie miesza się próbkę (patrz *Przygotowanie preparatu bezpośredniego*).
- Po pobraniu nasienia należy wytrzeć końcówkę pipety z nadmiaru nasienia (nie dotykać ujścia końcówki).
- Dodaje się nasienie do rozcieńczalnika i przepłukuje końcówkę pipety przez kilkukrotne aspirowanie i wypuszczanie roztworu.
- Uzyskany roztwór miesza się przy użyciu wytrząsarki i pozostawia na 10 min w celu unieruchomienia plemników.

Ocena koncentracji plemników z wykorzystaniem udoskonalonej komory Neubauera

Do oceny koncentracji plemników zalecane jest używanie komór o głębokości 100 μm . WHO w swoim podręczniku (*WHO 2010*) przedstawia procedurę oceny koncentracji plemników z wykorzystaniem udoskonalonej komory Neubauera (ang. *improved Neubauer haemocytometer*). Nie zaleca się stosowania płytkich komór zliczeniowych (głębokość 10-20 μm), w szczególności napełnianych na zasadzie zjawiska kapilarnego, co prowadzi do nierównomiernego rozmieszczenia plemników w komorze i może generować różnice w uzyskanych wynikach (*Marchlewska i wsp., 2010, Christensen i wsp., 2005*).

Udoskonalona komora Neubauera jest wykonana ze specjalnego szkła optycznego, na którym wygrawerowane są dwa jednakowe pola zliczeniowe o rozmiarach 3x3 mm oddzielone od siebie systemem rowków przypominających literę H, przy których znajdują się (po obu stronach) tzw. słupy boczne, czyli powierzchnie komory, na które nasuwa się szkiełko (Rycina 5).

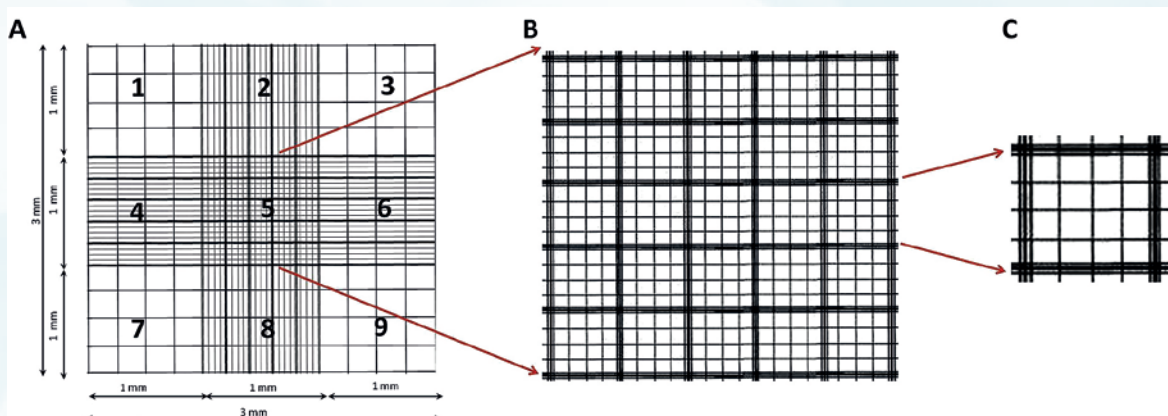


powierzchnie komory (tzw. boczne słupy), na które nasuwa się szkło nakrywkowe

pola zliczeniowe komory

Rycina 5. Udoskonalona komora Neubauera z zaznaczonymi dwoma wygrawerowanymi polami zliczeniowymi i dwoma powierzchniami (tzw. słupami bocznymi), na które nakłada się szkło nakrywkowe. Fotografia autorstwa dr hab. n. med. Renaty Walczak-Jedrzejowskiej.

Każde pole zliczeniowe tworzy 9 siatek, każda o powierzchni 1x1 mm (Rycina 6 A). Siatki te różnią się od siebie wygrawerowanym układem linii tworzących kwadraty i rzędy. Cztery siatki, oznaczone na rycinie numerami 1, 3, 7, 9, zawierają 4 rzędy po 4 duże kwadraty. Dwie kolejne, nr 2 i 8, zawierają 4 rzędy po 5 dużych kwadratów. Siatki oznaczone numerami 4 i 6 zawierają 5 rzędów po 4 duże kwadraty. Siatka centralna, numer 5, zawiera 5 rzędów, każdy po 5 dużych kwadratów (Rycina 6 B). Dodatkowo, każdy duży kwadrat siatki nr 5 został podzielony liniami pomocniczymi, tworząc w jego wnętrzu 16 mniejszych kwadratów, które są pomocne przy zliczaniu plemników w dużych kwadratach (Rycina 6 C).



Rycina 6. Schemat jednego z pól zliczeniowych wygrawerowanych w udoskonalonej komorze Neubauera z wszystkimi 9-cio siatkami (A), siatka środkowa nr 5 (B) oraz jeden z 25 dużych kwadratów siatki nr 5 (C). Rycina autorstwa dr hab. n. med. Renaty Walczak-Jedrzejowskiej.

Przy głębokości 100 μm nad każdą z 9 siatek znajduje się 100 nl rozcieńczonej próbki nasienia. Tak więc, w zależności od numeru siatki, objętość rozcieńczonej próbki nasienia nad jej dużym kwadratem lub całym rzędem będzie różna. Objętość próbki nasienia znajdująca się nad jednym dużym kwadratem oraz jednym rzędem w poszczególnych siatkach komory przedstawiona jest w Tabeli 3.

Tabela 3. Objętość rozcieńczonej próbki nasienia nad jednym kwadratem oraz jednym rzędem w poszczególnych siatkach udoskonalonej komory Neubauera przy głębokości równej 100 μm .

Numer siatki	Charakterystyka siatki	Objętość rozcieńczonej próbki nasienia nad jednym kwadratem (nl)	Objętość rozcieńczonej próbki nasienia nad jednym rzędem (nl)
1,3,7,9	zawiera 4 rzędy po 4 duże kwadraty	6.25	25
2,8	zawiera 4 rzędy po 5 dużych kwadratów	5	25
4,6	zawiera 5 rzędów po 4 duże kwadraty	5	20
5	zawiera 5 rzędów po 5 dużych kwadratów	4	20

Jednostką zliczeniową nazywa się określony obszar siatki, nad którym zlicza się plemniki. Rodzaj jednostki zliczeniowej uzależniony jest od liczby plemników oraz od tego, w których siatkach są one zliczane. Gdy procedura liczenia ogranicza się do siatek nr 5, 4, 6 to jednostką zliczeniową jest rząd. Chociaż siatki te mają inny układ kwadratów, to przy głębokości 100 μm , nad każdym rzędem w tych siatkach znajduje się taka sama objętość rozcieńczonej próbki nasienia, czyli 20 nl (Tabela 3, 4). Przy niskiej liczbie plemników, kiedy nie udaje się zliczyć odpowiedniej liczby plemników ww. siatkach (nr 5, 4, 6), procedurę liczenia należy rozszerzyć na całe pole zliczeniowe komory (wszystkie 9 siatek). Wtedy jednostką zliczeniową jest siatka. Nad każdą z 9 siatek pola zliczeniowego komory, przy głębokości 100 μm , znajduje się 100 nl rozcieńczonej próbki nasienia (patrz rozdział *Procedura zliczania plemników w udoskonalonej komorze Neubauera przy ich niskiej liczbie w preparacie przyżyciowym*).

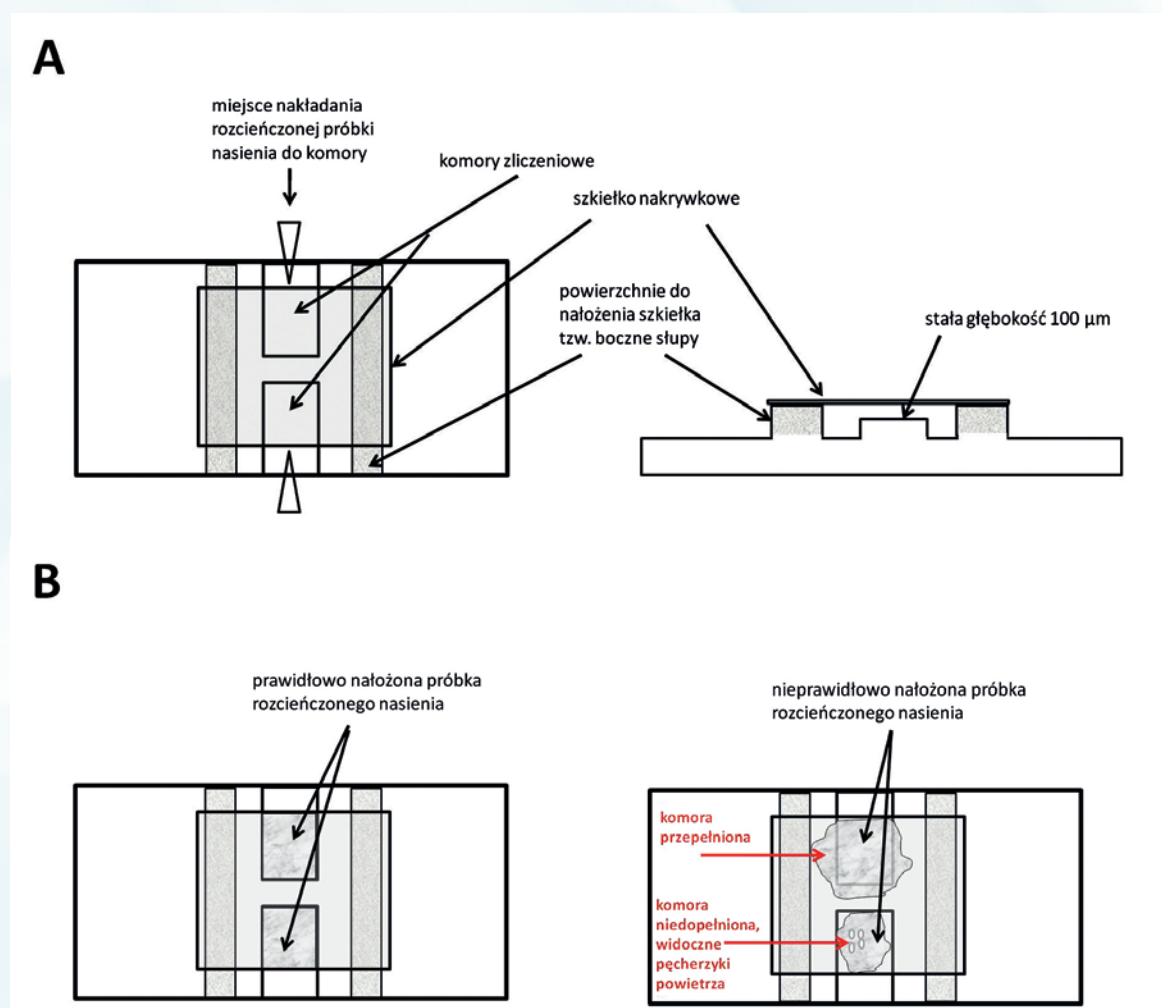
Tabela 4. Liczba plemników w polu widzenia w preparacie przyżyciowym, zalecane rozcieńczenia, powierzchnia oceny w polach zliczeniowych komory i wykorzystywana jednostka zliczeniowa.

Liczba plemników w polu widzenia (pow. 400x)	Rozcieńczenie	Powierzchnia oceny	Jednostka zliczeniowa (objętość nad jednostką)
< 2	1:2 (1 + 1)	wszystkie 9 siatek	siatka (100 nl)
2-15	1:2 (1 + 1)	siatki nr 4, 5, 6	rząd (20 nl)
16-100	1:5 (1 + 4)	siatki nr 4, 5, 6	rząd (20 nl)
> 101	1:20 (1 + 19)	siatki nr 4, 5, 6	rząd (20 nl)

Przygotowanie komory i jej napełnianie:

- komorę przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym o określonej grubości (zalecane szkiełko nr 4, o grubości 0.44 mm). Szkiełko najlepiej przymocowuje się do lekko wilgotnej powierzchni tzw. bocznych słupów (Rycina 5);

- przy prawidłowo umieszczonym szkiełku nakrywkowym na powierzchniach bocznych słupów komory pojawiają się opalizujące linie tzw. pierścienie Newtona. Im więcej linii, tym lepiej przymocowane jest szkiełko nakrywkowe i tym dokładniejsza, stała głębokość komory. Kiedy widoczna jest tylko jedna lub dwie linie, to może to powodować różnice w głębokości komory;
- rozcieńczoną próbkę nasienia, tuż przed wprowadzeniem do komory, należy dokładnie wymieszać przez ok. 10 s z wykorzystaniem wytrząsarki (maksymalne obroty), następnie natychmiast pobrać 6-10 μ l zwykłą pipetą automatyczną i nałożyć nad jedno z dwóch pól zliczeniowych;
- miejsce nakładania próbki przedstawione jest na rycinie 7A. Rozcieńczoną próbkę wypuszcza się z pipety bardzo powoli tuż przed szkiełkiem nakrywkowym (nie dotykać szkiełka) i obserwuje się, jak próbka jest aspirowana pod szkiełko. Należy się starać, aby nie doprowadzić do tworzenia pęcherzyków powietrza i tym samym niedopełnienia komory, czy też jej przepełnienia (Rycina 7B). Tak samo postępuje się z drugą rozcieńczoną próbką, którą po wymieszaniu wprowadza się nad drugie z dwóch pól zliczeniowych komory;
- tak przygotowaną komorę wstawia się do komory wilgotnej (np. przykryta szalka Petriego wypełniona wilgotną bibułą) i pozostawia na co najmniej 4 min (zwykle ok. 10 min) w temperaturze pokojowej, aby wszystkie plemniki opadły na dno komory.



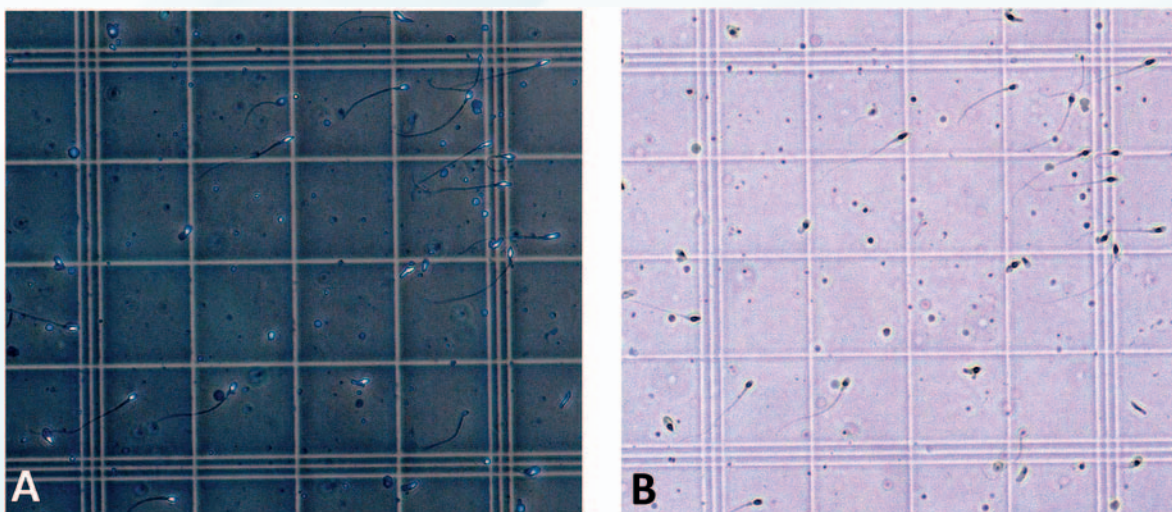
Rycina 7. Schemat udoskonalonej komory Neubauera; miejsca nakładania rozcieńczonej próbki nasienia (A) oraz prawidłowe i nieprawidłowe nałożenie próbki rozcieńczonego nasienia (B). Rycina autorstwa dr hab. n. med. Renaty Walczak-Jędrzejowskiej.

UWAGI:

- W niektórych komorach powierzchnie, na których umocowuje się szkiełko nakrywkowe (tzw. boczne słupy), wykonane są ze zmatowionego szkła. Przy nakładaniu szkiełka nakrywkowego na tego rodzaju powierzchniach nie pojawiają się pierścienie Newtona (*Brazil i wsp., 2004*). W takim wypadku należy delikatnie zwilżyć obie powierzchnie, nakładając na nie ok. 1-2 μ l wody i następnie nałożyć szkiełko.
- Dostępne komercyjnie są też komory ze specjalnymi klamrami do umocowania szkiełka nakrywkowego, które zapewniają stałą głębokość (*Christensen i wsp., 2005*).

Procedura liczenia plemników w komorze zliczeniowej

Zliczanie plemników powinno być przeprowadzone w obu polach zliczeniowych komory. Zaleca się wykonywanie oceny w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Dopuszcza się wykorzystanie zwykłego mikroskopu świetlnego (Rycina 8). Wykorzystywane powiększenie, w zależności od wielkości pola widzenia mikroskopu, to 200x lub 400x. Należy dostosować je tak, aby był dobrze widoczny jeden duży kwadrat siatki zliczeniowej (zwykle powiększenie 400x).



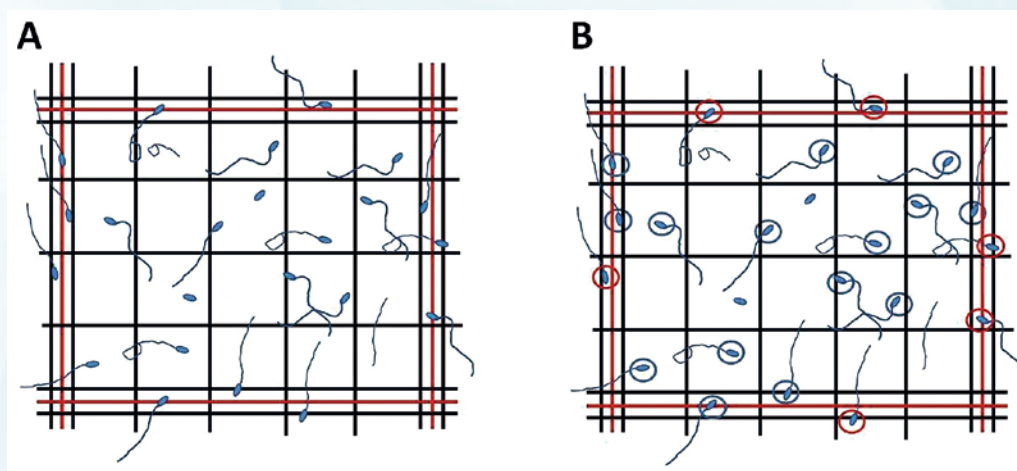
Rycina 8. Obraz mikroskopowy tego samego dużego kwadratu siatki w udoskonalonej komorze Neubauera z nałożoną rozcieńczoną próbką nasienia; (A) mikroskop kontrastowo-fazowy, (B) mikroskop świetlny. Mikrofotografie autorstwa dr hab. n. med. Renaty Walczak-Jędrzejowskiej.

W celu zminimalizowania błędów próby należy zliczyć w komorze co najmniej 400 plemników (po ok. 200 w dwóch powtórzeniach w każdym z pól zliczeniowych). Wtedy błąd próby wynosi 5% (Tabela 5).

Tabela 5. Odsetek błędu próby dla danej sumy zliczonych plemników.

Suma plemników	Błąd próby (%)	Suma plemników	Błąd próby (%)	Suma plemników	Błąd próby (%)
1	100	25	20	85	10,8
2	70,7	30	18,3	90	10,5
3	57,7	35	16,9	95	10,3
4	50	40	15,8	100	10
5	44,7	45	14,9	150	8,2
6	40,8	50	14,1	200	7,1
7	37,8	55	13,5	250	6,3
8	35,4	60	12,9	300	5,8
9	33,3	65	12,4	350	5,3
10	31,6	70	12	400	5,0
15	25,8	75	11,5	450	4,7
20	22,4	80	11,2	500	4,5

- Liczy się tylko całe plemniki tzn. takie, które mają główkę i wijkę. Nie zlicza się osobnych główek lub osobnych witek.
- To, który plemnik będzie zliczany w siatce, uzależnione jest od pozycji jego główki. Ułożenie witeki nie ma znaczenia. Plemniki zliczamy wtedy, gdy ich główka znajduje się wewnątrz analizowanego kwadratu siatki lub na odpowiedniej linii granicznej tego kwadratu (Rycina 9)
- W siatkach komory, wszędzie tam gdzie granice przyległych kwadratów stanowią linie potrójne, obszar zliczania z pojedynczego dużego kwadratu ograniczony jest przez środkową z trzech linii (Rycina 9 A).
- Aby uniknąć zliczania tych samych plemników w przyległych kwadratach (plemniki leżące na granicy), należy zachować zasadę dwóch boków Bürkera tzn. plemniki powinny być zliczane tylko wtedy, gdy ich główka znajduje się na linii granicznej z lewej strony lub na dole kwadratu (Rycina 9 B).



Rycina 9. Przykład zliczania plemników w dużym kwadracie siatki nr 5, przy zachowaniu reguły dwóch boków Bürkera; duży kwadrat siatki ograniczony potrójną linią graniczną; na czerwono zaznaczona linia ograniczająca zliczanie plemników w danym dużym kwadracie siatki (A); w niebieskim kole zaznaczono plemniki zliczane w danym kwadracie; na czerwono zaznaczono plemniki nie zliczane (B). *Rycina autorstwa dr hab. n. med. Renaty Walczak-Jędrzejowskiej.*

- Zliczanie zawsze zaczyna się od siatki nr 5 (patrz: *Jednostki zliczeniowe w komorze*). Plemniki liczy się rzędami i liczenie kontynuuje aż do zliczenia co najmniej 200 plemników.
- Jeśli nie zliczy się 200 plemników w pierwszym rzędzie siatki nr 5 (5 dużych kwadratów), to przechodzi się do rzędu drugiego itd. Jeśli osiągnie się liczbę 200 plemników w połowie rzędu, należy kontynuować zliczanie plemników do końca danego rzędu. Zawsze należy zliczyć plemniki z całego rzędu!
- Jeśli nie zliczy się 200 plemników we wszystkich 5 rzędach siatki nr 5 to kontynuuje się zliczanie w rzędach siatki nr 4, a gdy zajdzie potrzeba także siatki nr 6. Objętość rozcieńczonej próbki nasienia nad rzędami siatek nr 4, 5 i 6, pomimo różnicy w ilości dużych kwadratów, jest taka sama i wynosi 20 nl.
- Zliczanie plemników można ułatwić sobie korzystając z sumatora hematologicznego.
- Po zliczeniu co najmniej 200 plemników w danej ilości rzędów w jednym polu zliczeniowym przechodzi się do drugiego pola zliczeniowego.
- Zliczanie plemników w drugim polu zliczeniowym wykonuje się tylko w takich samych rzędach poszczególnych siatek co w pierwszym polu zliczeniowym, nawet jeśli nie zliczy się 200 plemników.
- Wylicza się sumę plemników zliczonych w obu polach oraz różnicę pomiędzy wartościami obu zliczeń. Sprawdza się akceptowalną różnicę dla danej sumy plemników z Tabeli 6 (przykład 4, 5).

Tabela 6. Akceptowalna różnica pomiędzy wartościami zliczeń plemników w dwóch polach zliczeniowych komory w zależności od sumy zliczonych plemników.

Suma zliczonych plemników	Akceptowalna różnica	Suma zliczonych plemników	Akceptowalna różnica	Suma zliczonych plemników	Akceptowalna różnica
35-40	12	144-156	24	329-346	36
41-47	13	157-169	25	347-366	37
48-54	14	170-182	26	367-385	38
55-62	15	183-196	27	386-406	39
63-70	16	197-211	28	407-426	40
71-79	17	212-226	29	427-448	41
80-89	18	227-242	30	449-470	42
90-98	19	243-258	31	471-492	43
99-109	20	259-274	32	493-515	44
110-120	21	275-292	33	516-538	45
121-131	22	293-309	34	539-562	46
132-143	23	310-328	35	563-587	47

Jeśli różnica pomiędzy wartościami zliczeń plemników w dwóch polach zliczeniowych jest niższa lub równa różnicy akceptowalnej, to wylicza się koncentrację plemników według wzoru:

$$C = (N/n) \times (1/\text{objętość nad jednostką zliczeniową}) \times R$$

C – koncentracja plemników

N – suma wszystkich zliczonych plemników,

n – suma jednostek zliczeniowych (rzędów lub siatek), nad którymi zliczane były plemniki w obu powtórzeniach,

R – współczynnik rozcieńczenia np. rozcieńczenie 1:2, to $R = 2$, itd.

Nad jednostką zliczeniową, jaką jest rząd w siatkach 4, 5 i 6, znajduje się 20 nl rozcieńczonej próbki nasienia, dlatego wzór przyjmuje tutaj postać:

$$C = (N/n) \times (1/20) \times R$$

Wynik uzyskuje się jako liczbę plemników / nl, a podaje w równoznacznej wartości mln plemników / ml po zaokrągleniu do pierwszego miejsca po przecinku.

Oprócz koncentracji plemników na wyniku badania nasienia musi znaleźć się także wyliczona całkowita liczba plemników w ejakulacie, którą uzyskuje się poprzez pomnożenie koncentracji przez objętość nasienia.

Jeśli różnica z dwóch zliczeń jest wyższa niż różnica akceptowalna, należy wykonać kolejne dwa rozcieńczenia i powtórzyć całą procedurę liczenia.

Przykład 4: Przy rozcieńczeniu 1+19 (1:20), w pierwszym zliczeniu uzyskano 201 plemników w 7 rzędach (5 rzędów siatki nr 5 i 2 rzędy siatki nr 4), podczas gdy w drugim zliczeniu w tych samych siedmiu rzędach uzyskano 245 plemników. Suma dla wyników uzyskanych z obu zliczeń w 14 rzędach (2x po 7 rzędów) wynosi 446 (201+245), a różnica 22 (245-201). Z Tabeli 6 wynika, że akceptowalna różnica dla uzyskanej sumy (446) wynosi 41, tak więc należy wykonać powtórnie całą procedurę oceny koncentracji zaczynając od wykonania dwóch rozcieńczeń próbki.

Przykład 5: Przy rozcieńczeniu 1+19 (1:20), w pierwszym zliczeniu uzyskano 220 plemników w 4 rzędach (4 rzędy siatki nr 5), podczas gdy w drugim zliczeniu w tych samych czterech rzędach uzyskano 218 plemników. Suma dla wyników uzyskanych z obu zliczeń w 8 rzędach (2x po 4 rzędy) wynosi 438 (220+218) a różnica 2 (220-218). Z Tabeli 6 wynika, że akceptowalna różnica dla uzyskanej sumy (438) wynosi 41, tak więc można wyliczyć koncentrację plemników z odpowiedniego wzoru (patrz powyżej).

UWAGI:

- Jeśli znajdzie się mniej niż 200 plemników w kolejnych siatkach nr 5, 4 i 6, oznacza to, że zastosowano zbyt duże rozcieńczenie próbki. W takim wypadku całą procedurę należy powtórzyć uwzględniając mniejsze rozcieńczenie (Tabela 2) i jeszcze raz wykonać zliczenie plemników.
- Jeśli nie można wykonać niższego rozcieńczenia, to wykonuje się zliczenie tak jak opisano w podrozdziale *Procedura zliczania plemników w udoskonalonej komorze Neubauera przy ich niskiej liczbie w preparacie przyżyciowym*.
- Błędem jest zliczenie plemników dwa razy w tym samym polu zliczeniowym lub wykorzystanie tylko jednej rozcieńczonej próbki do napełnienia dwóch pól komory. Takie postępowanie nie oznacza „zliczania w dwóch powtórzeniach”.
- Brak akceptowalnej różnicy może wynikać z pomyłki przy zliczaniu plemników (w szczególności, gdy nie używa się sumatora, lub gdy zliczone zostały plemni-

ki dwa razy z danego obszaru lub pominięto jakiś obszar zliczania) także błędu pipetowania lub niedokładnego wymieszania rozcieńczonej próbki nasienia tuż przed nałożeniem do komory.

- W wyjątkowych sytuacjach, przy braku homogenności próbki, nawet po wykonaniu trzech powtórzeń, nie uzyskuje się akceptowalnej różnicy. W takiej sytuacji wylicza się średnią ze wszystkich powtórzeń i odnotowuje ten fakt na wyniku; przykładowa formuła: „Z powodu braku homogenności próbki koncentracja plemników wyliczona została jako średnia z trzech powtórzeń bez uzyskania akceptowalnej różnicy”.
- Jeśli w nasieniu znajduje się wiele osobnych główek lub osobnych witek plemników zawsze ich obecność powinna być odnotowana na wyniku. W takiej sytuacji należy rozważyć potrzebę dokładnej oceny ich ilości. Można ocenić ich koncentrację w komorze zliczeniowej stosując te same zasady jak przy ocenie koncentracji plemników lub ocenić ich odsetek w stosunku do plemników w wybarwionym rozmazie do oceny morfologii plemników (procedura taka jak przy ocenie koncentracji komórek okrągłych – patrz rozdział *Ocena liczby komórek okrągłych w nasieniu*).

Procedura zliczania plemników w udoskonalonej komorze Neubauera przy ich niskiej liczbie w preparacie przyżyciowym

Kiedy ilość plemników przy ocenie wstępnej w polu widzenia w preparacie bezpośrednim jest mała (0-4 plemniki przy powiększeniu 400x lub 0-16 plemników przy powiększeniu 200x), procedurę liczenia należy rozszerzyć zmieniając jednostkę zliczeniową z rzędu na siatkę (patrz rozdział *Jednostki zliczeniowe komory*). Nad każdą z 9 siatek pola zliczeniowego przy głębokości 100 μm , pomimo różnic w ich wyglądzie, znajduje się taka sama ilość rozcieńczonej próbki nasienia, czyli 100 nl.

- Przygotowuje się rozcieńczenie 1:2, napełnia komorę (patrz *Przygotowanie rozcieńczeń próbki* oraz *Przygotowanie komory i jej napełnianie*);
- Zlicza się co najmniej po 200 plemników w dwóch powtórzeniach (razem co najmniej 400 plemników). Zliczanie odbywa się siatkami (jednostka zliczeniowa). Jeśli zliczy się 200 plemników w połowie siatki, należy kontynuować zliczanie plemników do jej końca. Zawsze należy zliczyć plemniki z całej siatki! Zliczanie plemników można ułatwić sobie korzystając z sumatora hematologicznego.
- Po zliczeniu co najmniej 200 plemników w danej ilości siatek w pierwszym polu zliczeniowym komory przechodzi się do drugiego pola zliczeniowego.
- Zliczenie plemników w drugim polu zliczeniowym wykonuje się tylko w tych samych siatkach co w pierwszym zliczaniu, nawet jeśli nie zliczy się 200 plemników.
- Wylicza się sumę plemników zliczonych w dwóch powtórzeniach oraz różnicę tych dwóch zliczeń; sprawdza się akceptowalną różnicę dla danej sumy plemników w Tabeli 6 (patrz przykład 4, 5);
- Jeśli różnica z dwóch zliczeń jest niższa lub równa akceptowalnej różnicy, to koncentrację plemników wylicza się z odpowiedniego wzoru.

Nad jednostką zliczeniową jaką jest siatka znajduje się 100 nl rozcieńczonej próbki nasienia, dlatego wzór przyjmuje tutaj postać:

$$C = (N/n) \times (1/100) \times R$$

C – koncentracja plemników

N – suma wszystkich zliczonych plemników

n – suma siatek, nad którymi zliczane były plemniki w obu powtórzeniach

R – współczynnik rozcieńczenia; rozcieńczenie przy niskiej liczbie plemników będzie zawsze 1:2, więc współczynnik będzie stały i będzie wynosił 2.

Wynik uzyskuje się jako liczbę plemników / nl, a podaje w równoznacznej wartości mln plemników / ml po zaokrągleniu do pierwszego miejsca po przecinku (patrz rozdział *Procedura liczenia plemników w komorze zliczeniowej*).

Oprócz koncentracji plemników na wyniku badania nasienia musi znaleźć się także wyliczona całkowita liczba plemników w ejakulacie, którą uzyskuje się poprzez pomnożenie koncentracji przez objętość nasienia.

UWAGI:

- Kiedy ocenia się liczbę plemników we wszystkich 9 siatkach każdego z dwóch pól zliczeniowych komory, to analizowana objętość rozcieńczonej próbki wynosi 1,8 μ l (18 siatek x 100 nl).
- Jeśli zliczy się mniej niż po 200 plemników w dwóch powtórzeniach (np. 100 plemników), przy rozcieńczeniu 1:2 to na wyniku powinno się podać odpowiedni błąd próby z Tabeli 5. W uwagach na wyniku należy wtedy napisać np.: „Koncentracja plemników wyliczona ze zliczenia 100 plemników w komorze zliczeniowej. Błąd próby wynosi w przybliżeniu 10%”.

W wielu polskich laboratoriach wykorzystuje się do oceny koncentracji plemników inne typy komór o głębokości 100 μ m (np. komory Bürkera lub Thoma) (Walczak-Jędrzejowska i wsp., 2013b). Chociaż WHO nie zabrania wykorzystywania innych komór o głębokości 100 μ m, to zaznacza, że ze względu na różnice w całkowitej objętości komory oraz wyglądzie siatek konieczne jest opracowanie dla każdej z nich oddzielnej procedury zliczania z zachowaniem odpowiednich reguł. Procedura taka powinna uwzględniać: 1) rozcieńczenia, jakim poddawana jest próbka, aby uzyskać w komorze taką ilość plemników, która zagwarantuje zliczenie co najmniej 400 z nich w dwóch powtórzeniach, 2) dostosowanie jednostki zliczeniowej (kwadrat, rząd, siatka), nad którą zliczane są plemniki, i w konsekwencji 3) objętości rozcieńczonej próbki, która znajduje się nad daną jednostką zliczeniową oraz 4) opracowanie odpowiednich wzorów do wyliczenia koncentracji plemników. Niedopuszczalna jest ocena koncentracji plemników w komorze bez ich unieruchomienia.

Postępowanie z próbką, kiedy w preparacie przyżyciowym nie ma plemników

Jeśli przy wstępnej ocenie w preparacie przyżyciowym w dwóch powtórzeniach nie znaleziono plemników, próbkę nasienia należy odwirować (przez 15 min przy 3000 g). Usuwa się supernatant, a powstały osad rozprowadza na szkiełku podstawowym, przykrywa szkiełkiem nakrywkowym i ogląda cały preparat w powiększeniu 200x w poszukiwaniu plemników. Jeśli nie znaleziono żadnego plemnika na wyniku w uwagach należy napisać: „W osadzie po odwirowaniu próbki nie znaleziono plemników”. Brak plemników w odwirowanym osadzie sugeruje azoospermie.

Jeśli w osadzie znaleziono plemniki, na wyniku w uwagach należy napisać: „W osadzie po odwirowaniu próbki znaleziono pojedyncze plemniki”. Istotne jest, aby zaznaczyć, czy znalezione plemniki są ruchome, czy nie. Obecność plemników w odwirowanym osadzie wskazuje na kryptozoospermie.

UWAGI:

- To, czy plemniki znajdują się w osadzie, czy też nie, zależy od szybkości i czasu wirowania (Lindsay i wsp., 1995, Jaffe i wsp., 1998) oraz od ilości ocenianego osadu.
- Przy wirowaniu przy 3000 g przez 15 min większość obecnych w nasieniu plemników znajdzie się w osadzie (Corea i wsp., 2005).

- Wirowanie może powodować utratę ruchu plemników (Mortimer, 1994a), a ilość zliczonych plemników będzie zaniżona (Cooper i wsp., 2006).

Przyczyny braku plemników w nasieniu (Krausz, 2014; Tüttelmann i Nieschlag, 2010) **to m.in.:**

- dysgeneza jąder z powodu np. aberracji chromosomów płciowych (najczęściej zespół Klinefeltera), mutacji genu SRY;
- zanik jąder np. po zapaleniu, niedokrwieniu;
- kastracja;
- mutacje genów odcinka AZF chromosomu Y;
- uszkodzenie nabłonka plemnikotwórczego substancjami toksycznymi np. niektórymi chemioterapeutykami przeciwnowotworowymi, ksenoestrogenami;
- zahamowanie spermatogenezy w wyniku stanu zapalnego;
- promieniowanie jonizujące;
- niewrażliwość na androgeny;
- hipogonadyzm hipogonadotropowy (niedoczynność podwzgórza lub/i przysadki);
- niewrażliwość na gonadotropiny;
- niedrożność przewodów wyprowadzających plemniki np. spowodowana stanem zapalnym w układzie płciowym, obustronnym brakiem nasieniowodów, mukowiscydozą.

Przyczyny zmniejszonej liczebności plemników w nasieniu (Krausz, 2014; Tüttelmann i Nieschlag, 2010) **to m.in.:**

- mutacje genów odcinka AZF chromosomu Y;
- stan zapalny w układzie płciowym;
- żylaki powrózków nasiennych;
- obniżenie stężenia testosteronu;
- stres;
- podwyższona temperatura,
- siedzący tryb życia,
- niedożywienie, otyłość,
- niedobór witamin i mikroelementów,
- czynniki toksyczne np. ksenoestrogeny,
- nadmierne spożycie alkoholu, palenie papierosów.

OCENA LICZBY KOMÓREK OKRĄGLYCH W NASIENIU

W nasieniu, oprócz plemników, mogą znajdować się leukocyty oraz komórki plemnikotwórcze wcześniejszych etapów spermatogenezy (głównie spermatydy okrągłe, rzadziej spermatocyty, czy spermatogonie) określane wspólnie jako „komórki okrągłe”.

Wartość referencyjna dla koncentracji komórek okrągłych:
< 5 x10⁶ komórek okrągłych / ml*

*Podana wartość referencyjna pochodzi z wcześniejszej wersji podręcznika WHO (1999), gdyż w podręczniku WHO z roku 2010 nie podano nowej wartości dla koncentracji komórek okrągłych.

W ocenie morfologicznej komórek okrągłych bardzo istotne jest odróżnienie komórek niedojrzałych pochodzących z linii spermatogenicznej (Rycina 10 A-D, 11) od tych

nie wywodzących się ze spermatogenezy: komórek zapalnych – granulocytów, limfocytów, monocytów (Rycina 12 A-C) oraz komórek nabłonkowych. Liczba komórek okrągłych zdecydowanie zmienia się w zależności od przyczyny wywołującej pojawienie się ich w ejakulacie (np. stan zapalny układu moczowo-płciowego, zaburzenia spermatogenezy skutkujące nadmiernym złuszczeniem poszczególnych generacji komórek nabłonka plemnikotwórczego prowadzące do oligozoospermii lub azoospermii bądź uwolnienia dużej liczby niedojrzałych form plemników). Ponadto, komórki okrągłe korelują negatywnie z liczbą i ruchliwością plemników, co w konsekwencji może prowadzić do obniżonej zdolności plemników do zapłodnienia. Dlatego też, wiarygodna – oparta o odpowiednie barwienie i/lub testy niemorfologiczne – identyfikacja komórek okrągłych ma istotne znaczenie w prawidłowym dalszym postępowaniu diagnostycznym i terapeutycznym (Amer i wsp., 2001; Cooper i wsp., 2010; Frączek i wsp., 2013; Johannisson i wsp., 2000; Milazzo i wsp., 2006; Patil i wsp., 2013).

Najczęściej pojawiającymi się w ejakulacie komórkami linii spermatogenicznej są spermatocyty I rzędu, które identyfikuje się na podstawie wielkości, bowiem są największe wśród komórek germinalnych. Ponadto charakteryzują się dużym, sferycznym jądrem komórkowym zawierającym równomiernie ułożone ziarnistości chromatyny (Rycina 10A, B). Komórki te zawierają diploidalną liczbę chromosomów ($2n$; 44,XY), ale ilość DNA dla $4n$, gdyż to one wchodzi w proces mejozy składający się z dwóch podziałów komórkowych: pierwszy redukcyjny mający na celu zredukowanie liczby chromosomów do haploidalnej ($1n$) i kończący się powstaniem spermatocytów II rzędu ($1n$; 22, X lub Y; ilość DNA dla $2n$), które bardzo szybko wchodzi w drugi podział będący mitozą (brak replikacji materiału genetycznego) prowadzącą do powstania wczesnych okrągłych spermatyd ($1n$; 22, X lub Y). Następnie okrągłe spermatydy podczas spermiogenezy (ostatniego etapu spermatogenezy) podlegają precyzyjnym, uwarunkowanym genetycznie morfologiczno-fizjologicznym zmianom, w efekcie których powstają spermatydy na różnym etapie różnicowania: wydłużające się (owalne) i wydłużone (późne) (Rycina 11). Te ostatnie, zwykle w nasieniu weryfikowane jako niedojrzałe formy męskich gamet, będą różnicowały się w plemniki uwalniane z nabłonka plemnikotwórczego (Wenda-Rózewicka i Piasecka, 2013), nie mające jednak zdolności do ruchu postępowego, a nabywający go podczas dojrzewania w najądrzu (Kolasa i wsp., 2013).

Spermatydy są następną generacją komórek plemnikotwórczych, które po spermatocytach I rzędu najczęściej identyfikowane są w ludzkim ejakulacie. Wyraźnie są mniejsze, mogą być okrągłe lub owalne z ciemno barwliwym, ze względu na silną kondensację chromatyny, ułożonym peryferycznie jądrem komórkowym. Często wykazują cechy degeneracji: pyknotyczne jądro, niekiedy zlokalizowane centralnie i różowa kwasochłonna cytoplazma. W wielu przypadkach degenerujące spermatydy są komórkami wielojądrzastymi (wcześniejsze zaburzenia cytokinezy) zawierającymi jądra ułożone peryferycznie i/lub centralnie (Rycina 10 B, C, D), co może stwarzać trudności w odróżnieniu ich od granulocytów obojętnochłonnych zawierających segmentowane jądro (Rycina 12 A-C). W zależności od stopnia zróżnicowania i dojrzewania (wydłużenia) spermatydy cechy degeneracji mogą dotyczyć nieprawidłowości kształtu i wielkości akrosomu, główki oraz witki (Johannisson i wsp., 2000; Patil i wsp., 2013).

Koncentrację komórek okrągłych można ocenić z wykorzystaniem:

- udoskonalonej komory Neubauera (procedura tak jak przy ocenie koncentracji plemników; patrz rozdział *Ocena liczby plemników*);
- zabarwionego rozmazu próbki nasienia (wykorzystywanego do oceny morfologii plemników) gdzie koncentracja komórek okrągłych jest oceniana względem ilości plemników. Preparat ocenia się w mikroskopie świetlnym pod immersją. Zlicza się komórki okrągłe w takiej samej ilości pól, w której zliczono co najmniej

400 plemników w dwóch powtórzeniach (co najmniej 200 plemników w jednym powtórzeniu). Następnie po sprawdzeniu akceptowalności różnicy w dwóch zliczeniach w Tabeli 6 wylicza się koncentrację komórek okrągłych według wzoru:

$$C = S \times (N/400)$$

C – koncentracja komórek okrągłych

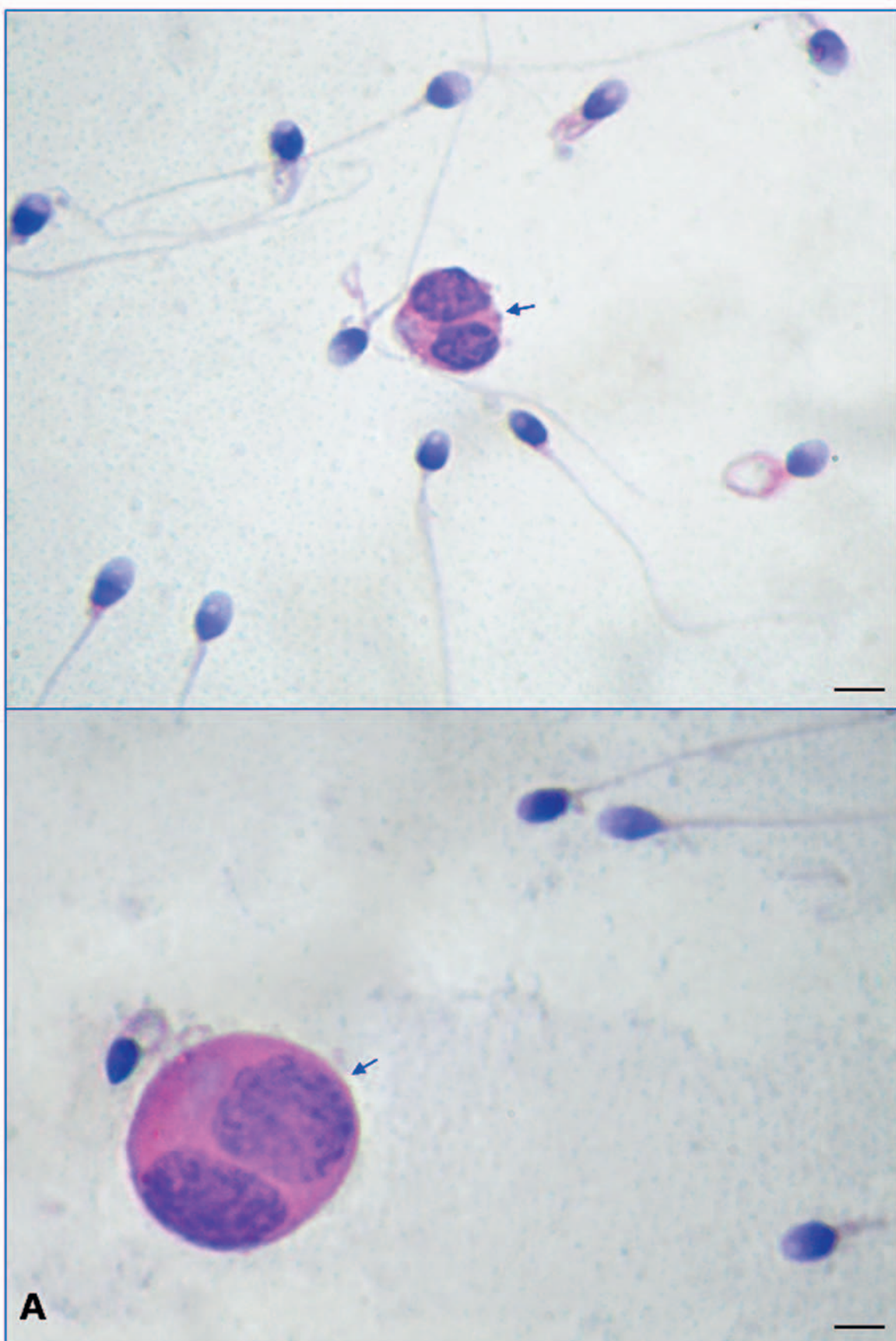
N – liczba zliczonych komórek okrągłych

S – koncentracja plemników

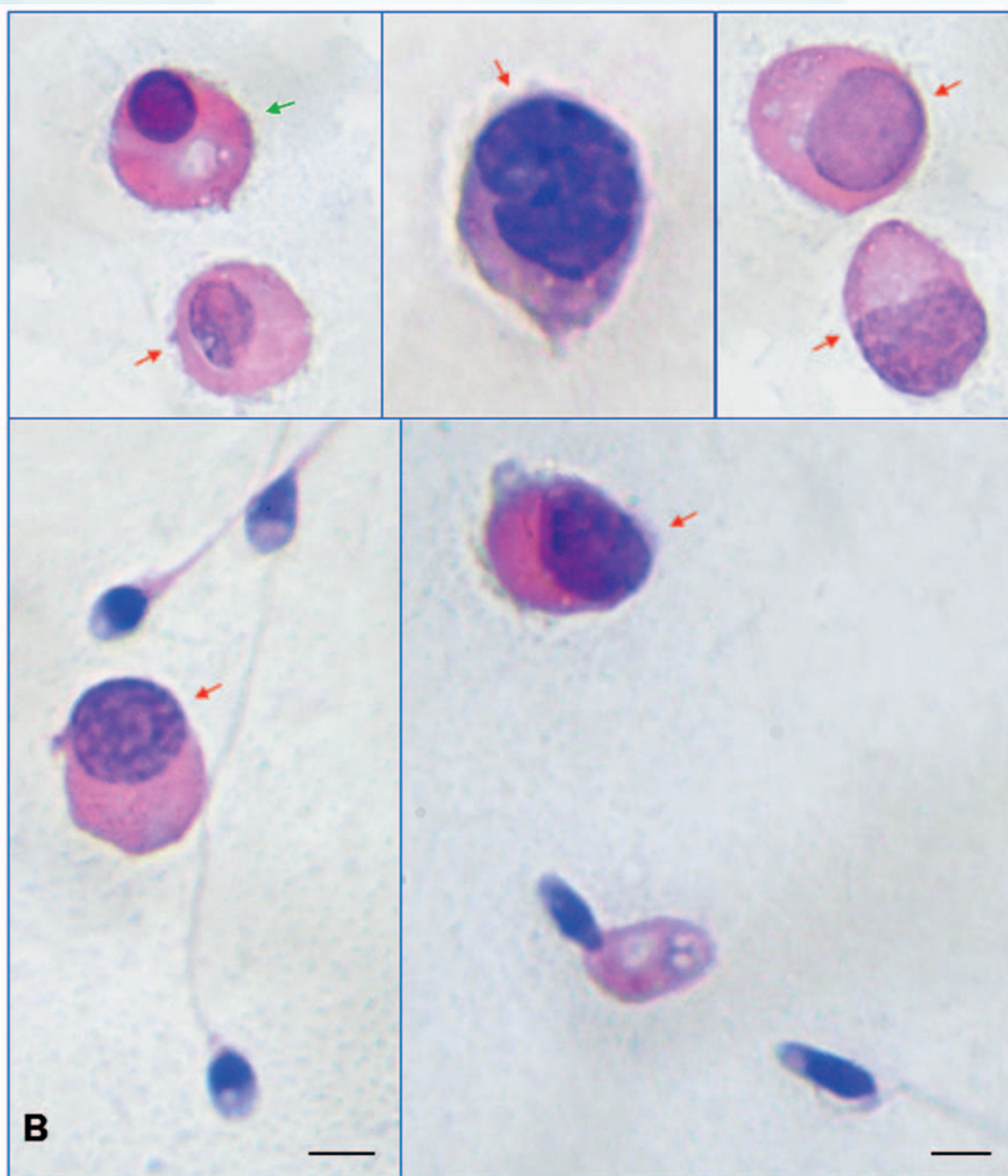
Otrzymuje się wartość w mln/ml, którą podaje się na wyniku.

UWAGI:

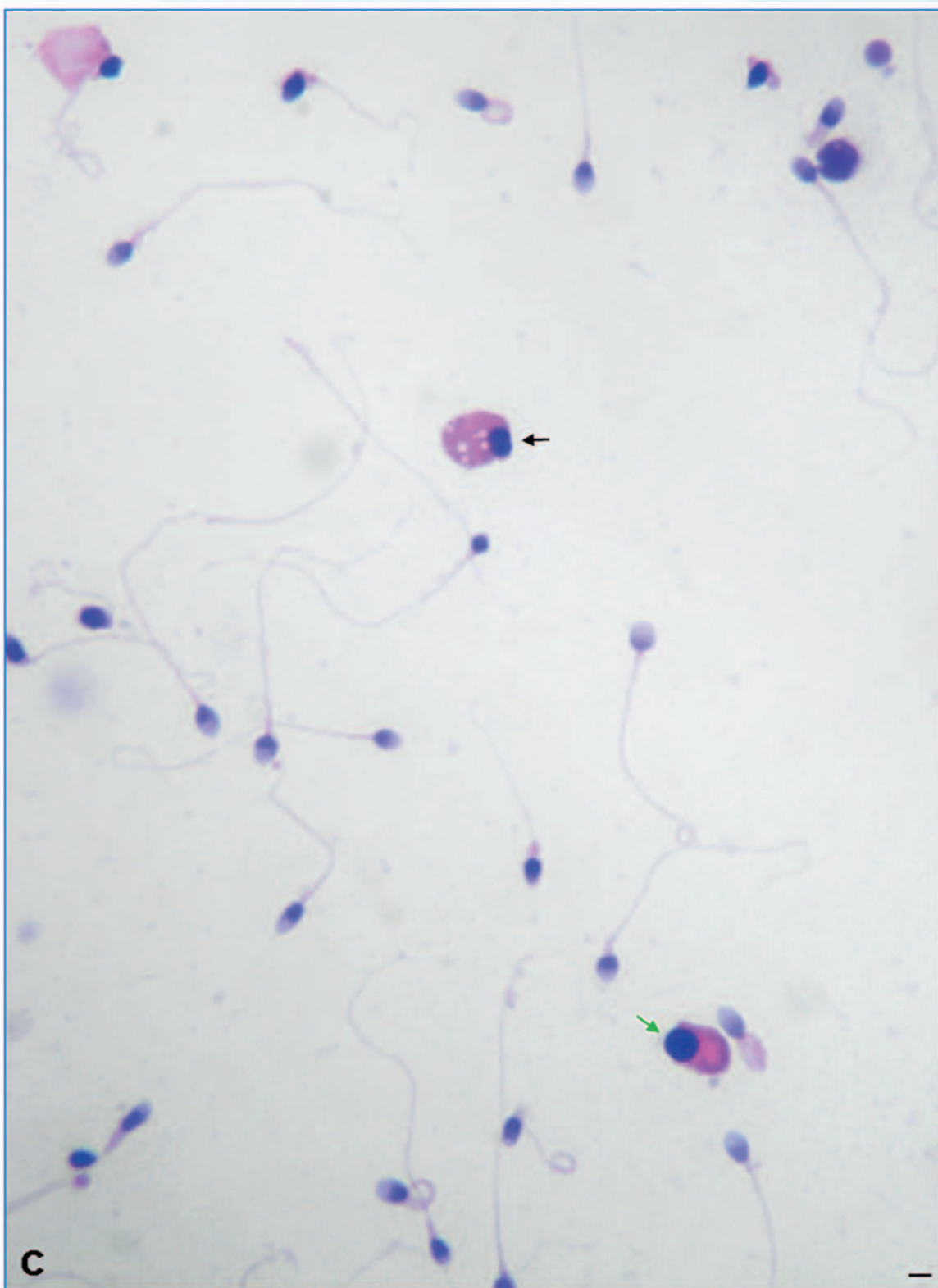
- Zwykle rozcieńczenie przygotowane dla oceny koncentracji plemników w komorze zliczeniowej jest zbyt wysokie, aby zliczyć w tej samej komorze co najmniej 400 komórek okrągłych (po co najmniej 200 w dwóch powtórzeniach). W takiej sytuacji należy przygotować dwa kolejne mniejsze rozcieńczenia próbki nasienia (najczęściej 1:2) w celu dokładnej oceny koncentracji komórek okrągłych.
- Jeżeli zliczy się mniej komórek okrągłych niż 400 (zarówno w komorze zliczeniowej, jak i w preparacie barwionym), to na wyniku powinno podać się odpowiedni błąd próby (Tabela 5).



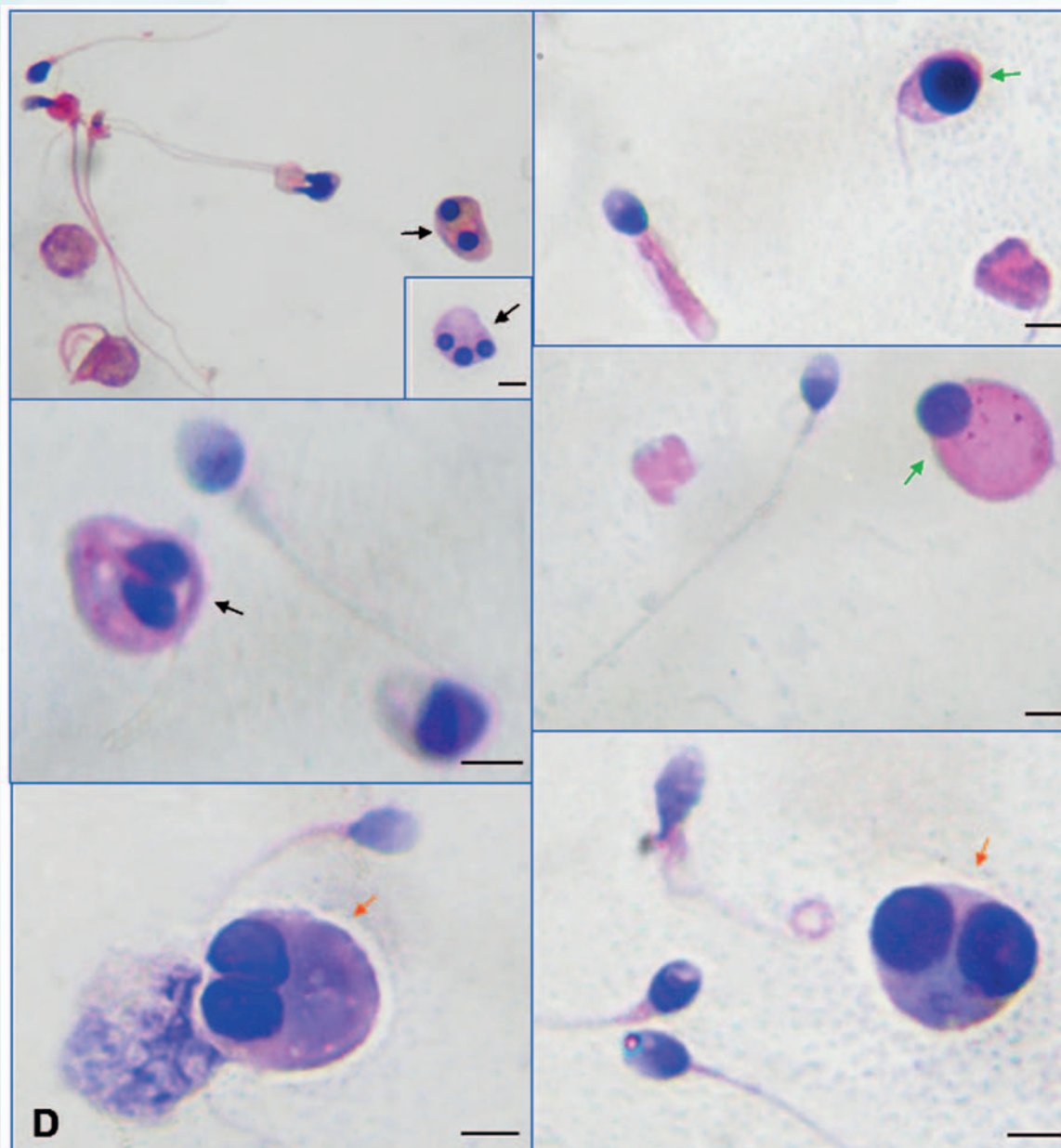
Rycina 10 A.



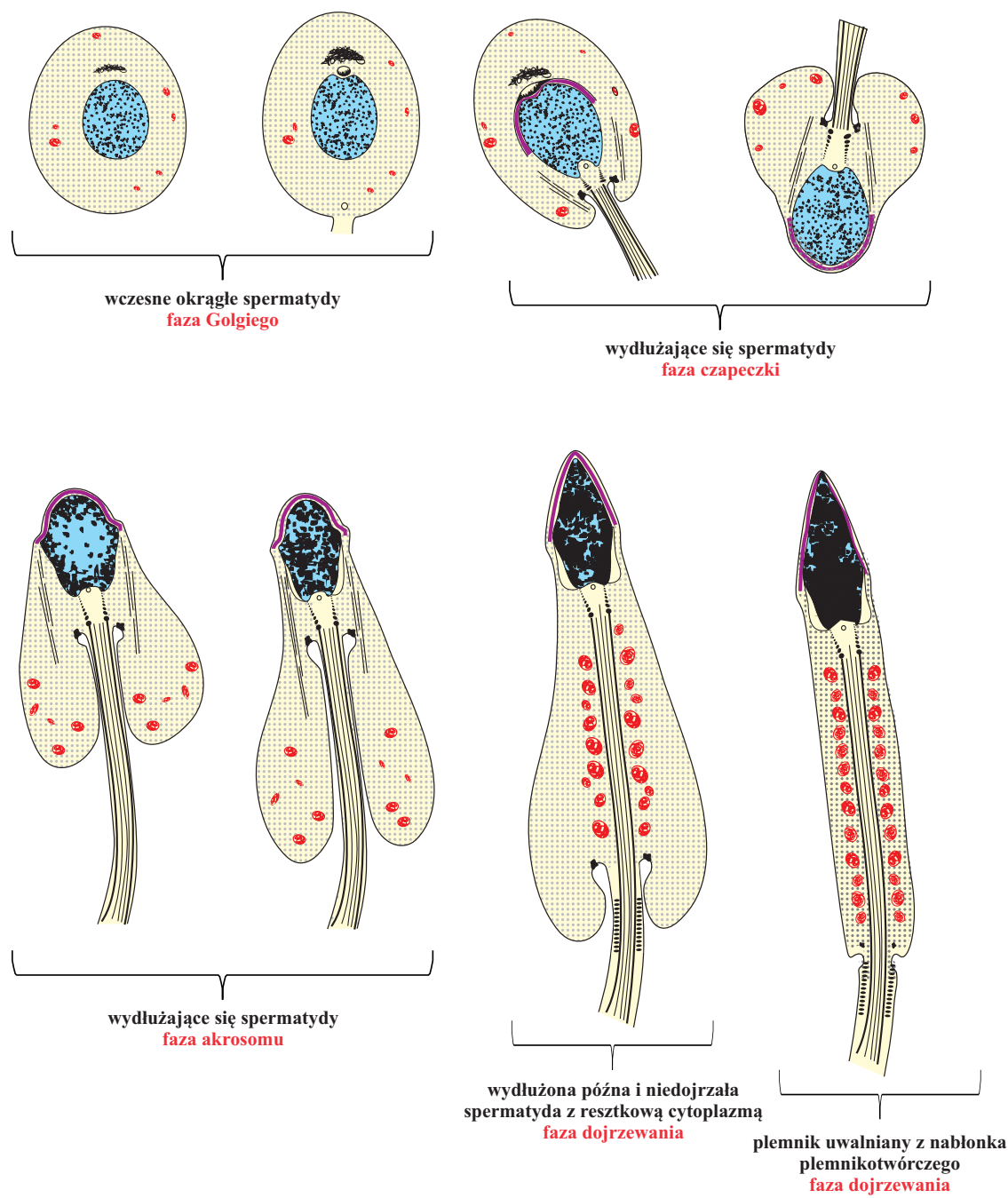
Rycina 10 B.



Rycina 10 C.



Rycina 10 D. Ryciny 10 A-D – rozmazy nasienia barwione metodą Papanicolaou (WHO, 2010). Widozowe komórki spermatogenezy: dzielący się spermatocyt (strzałki niebieskie), spermatocyty (strzałki czerwone), spermatydy (strzałki zielone), spermatyda degenerująca (strzałki czarne), spermatyda dzieląca się (strzałki pomarańczowe). Skala = 5 μ m. Mikrofotografie autorstwa dr hab. n. med., prof. nadzw. PUM Małgorzaty Piaseckiej.



Rycina 11. Spermiogeneza (faza spermatydy) – ostatni etap spermatogenezy związany z różnicowaniem okrągłych spermatyd w plemniki. Proces różnicowania polega m.in. na silnej kondensacji chromatyny, której towarzyszy: 1) zmiana kształtu (ze sferycznego w wydłużony) i wielkości (zmniejszenie) jądra, 2) formowanie się akrosomu z cysterny aparatu Golgiego oraz witki z centrioli dystalnej (proksymalna pozostaje elementem szyjki plemnika i bierze udział w tworzeniu wrzeciona podziałowego podczas zapłodnienia), 3) rekrutacja mitochondriów i tworzenie osłonki mitochondrialnej oraz 4) ostateczne dojrzewanie związane z odrzuceniem nadmiaru cytoplazmy. Ze względu na różne etapy morfogenezy proces ten został podzielony na cztery podfazy: Golgiego, czapeczki, akrosomu i dojrzewania. W zależności od zaburzeń spermiogenezy, w ejakulacie mogą pojawiać się niedojrzałe formy okrągłych, wydłużających się i wydłużonych spermatyd (patrz Rycina 10). Rycina autorstwa dr hab. n. med., prof. nadzw. PUM Małgorzaty Piaseckiej.

Przykład 6: Przy ocenie pierwszego rozmazu zliczono 21 komórek okrągłych w tych samych polach widzenia co 200 plemników, przy ocenie drugiego rozmazu zliczono 39

komórek okrągłych. Suma uzyskanych wyników wynosi 60 (21+39) a różnica – 18 (39-21). Z Tabeli 6 wynika, że dla sumy 60 akceptowalna różnica wynosi 15. Tak więc ocenę należy wykonać jeszcze raz.

Przykład 7: Przy ocenie pierwszego rozmazu zliczono 24 komórki okrągłe w tych samych polach widzenia co 200 plemników, przy ocenie drugiego rozmazu zliczono 36 komórek okrągłych. Suma uzyskanych wyników wynosi 60 (24+36) a różnica – 12 (36-24). Z Tabeli 6 wynika, że dla sumy 60 akceptowalna różnica wynosi 15. Tak więc uzyskane wyniki są akceptowalne. Dla 60 zliczonych komórek okrągłych (w tych samych polach widzenia co 400 plemników) oraz przy koncentracji plemników np. 70 mln/ml wylicza się koncentrację komórek okrągłych wg ww. wzoru $C=70\text{mln} \times (60/400)=10,5 \text{ mln/ml}$. Ponieważ zliczono tylko 60 a nie 400 komórek okrągłych, błąd próby wynosi ok. 13% (Tabela 5).

Po ocenie koncentracji komórek okrągłych wylicza się ich całkowitą liczbę w ejakulacie według wzoru:

$$T = C \times V$$

T – całkowita liczba komórek okrągłych w ejakulacie

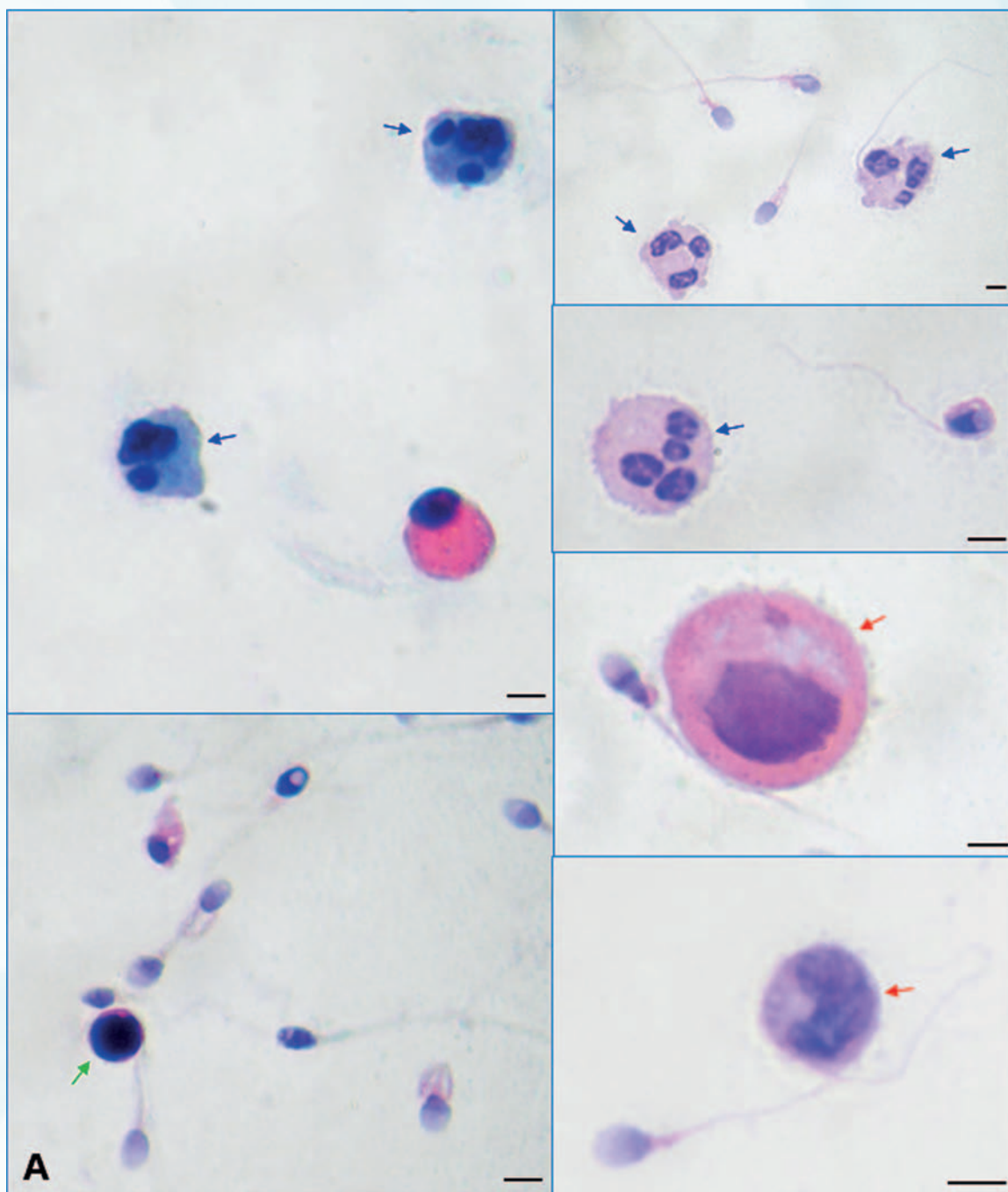
C – koncentracja komórek okrągłych

V – objętość ejakulatu

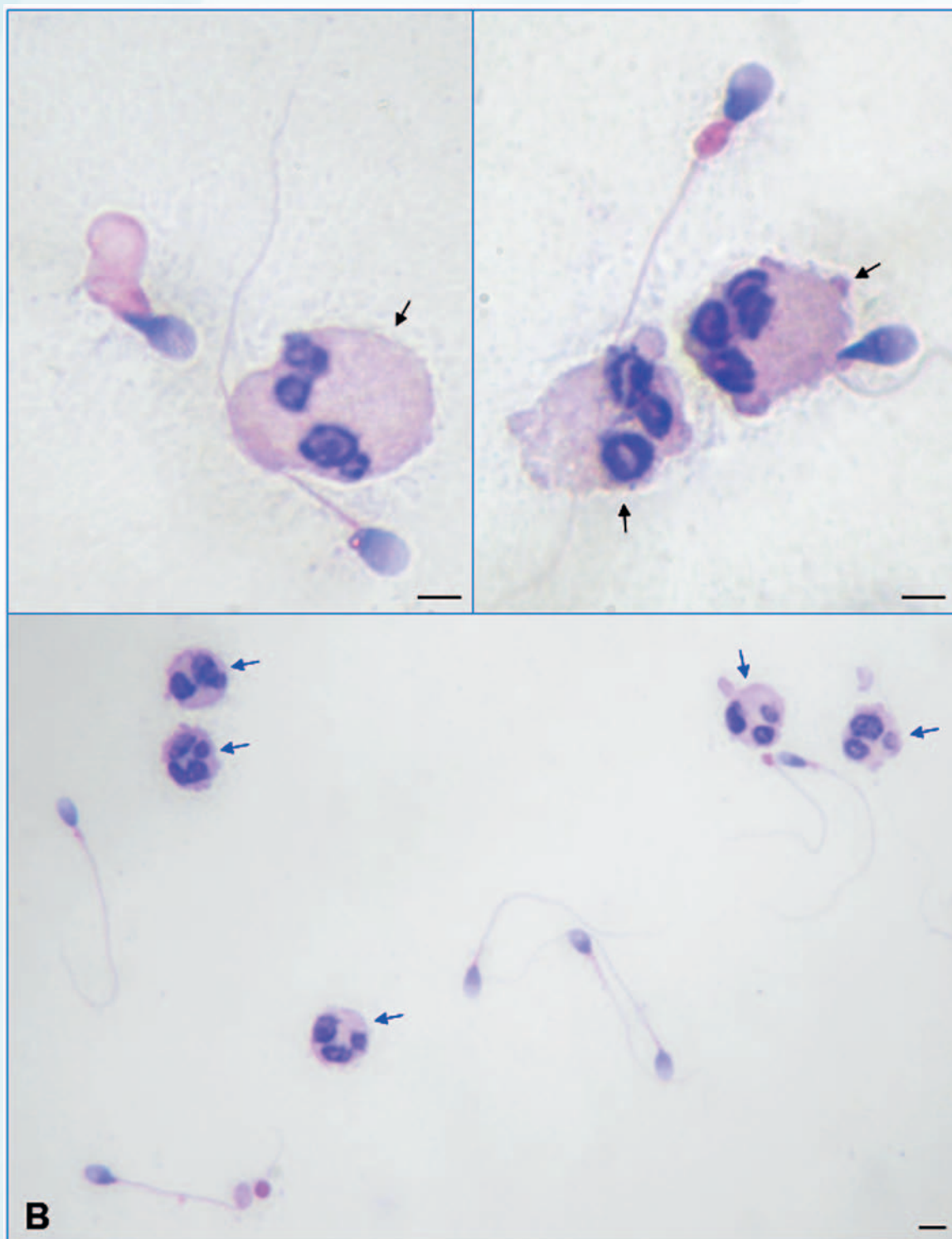
Jeśli koncentracja komórek okrągłych będzie $\geq 1 \text{ mln/ml}$ zaleca się wykonanie dodatkowych procedur w celu zróżnicowania komórek okrągłych na leukocyty i komórki spermatogenezy, oraz określenia koncentracji leukocytów peroksydazo-dodatnich (patrz rozdział *Ocena liczby leukocytów w nasieniu*).

OCENA LICZBY LEUKOCYTÓW W NASIENIU

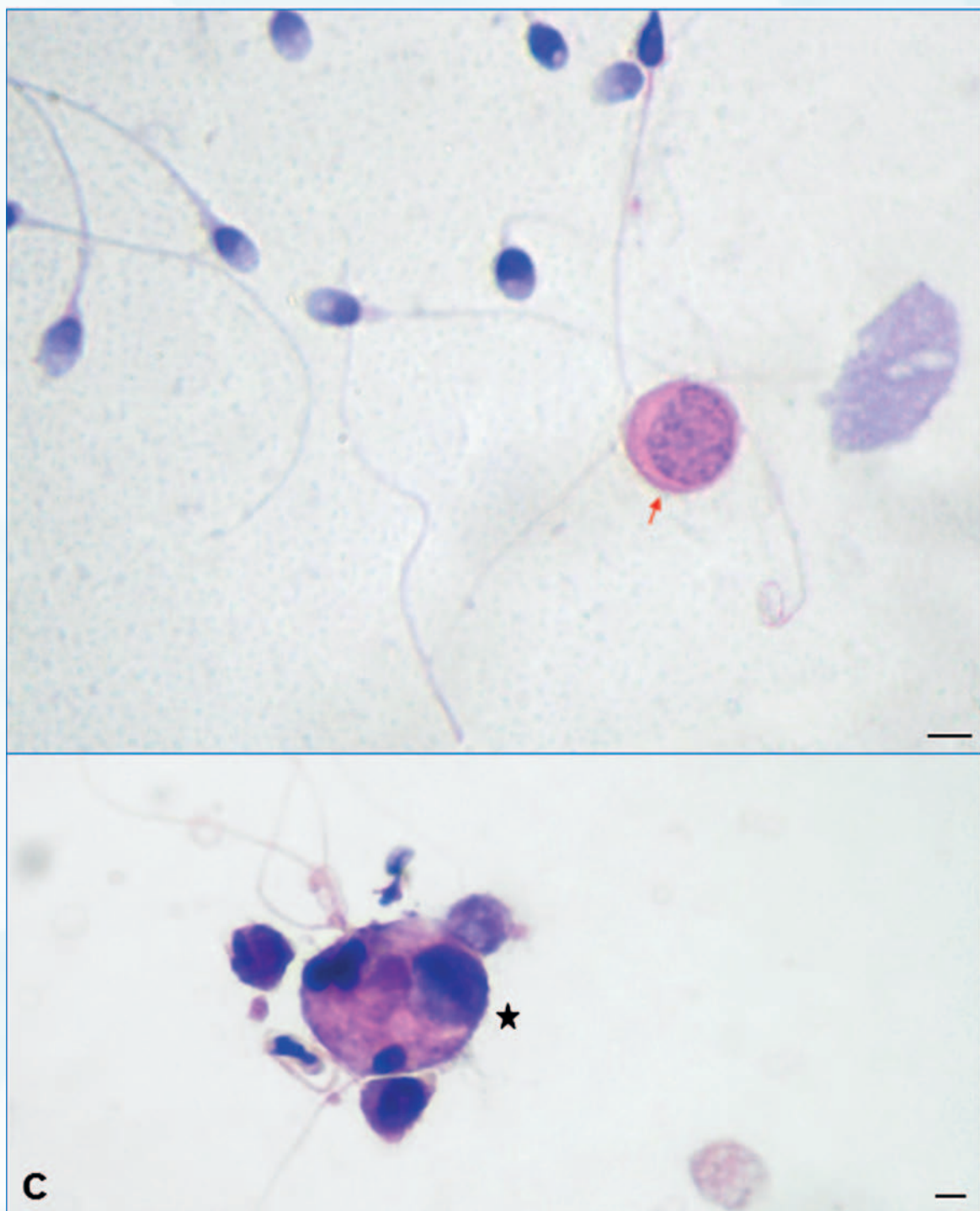
Wśród leukocytów występujących w nasieniu przeważającą liczbę stanowią granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) (Tomlinson i wsp., 1993; Johanisson i wsp., 2000). W większości przypadków udaje się zróżnicować je ze spermatydami, i spermatocytami w wybarwionych rozmazach nasienia (barwienie metodą Papanicolau), biorąc pod uwagę kolor wybarwienia oraz rozmiar i wygląd jądra komórkowego (Rycina 12 A-C). Zwykle leukocyty barwią się bardziej na niebiesko, w przeciwieństwie do spermatyd barwiących się bardziej na różowo. Jednakże trudności sprawia czasami odróżnienie granulocytów obojętnochłonnych od wielojądrzastych spermatyd (szczegóły opisane w artykule Johanisson i wsp., 2000).



Rycina 12 A.



Rycina 12 B.

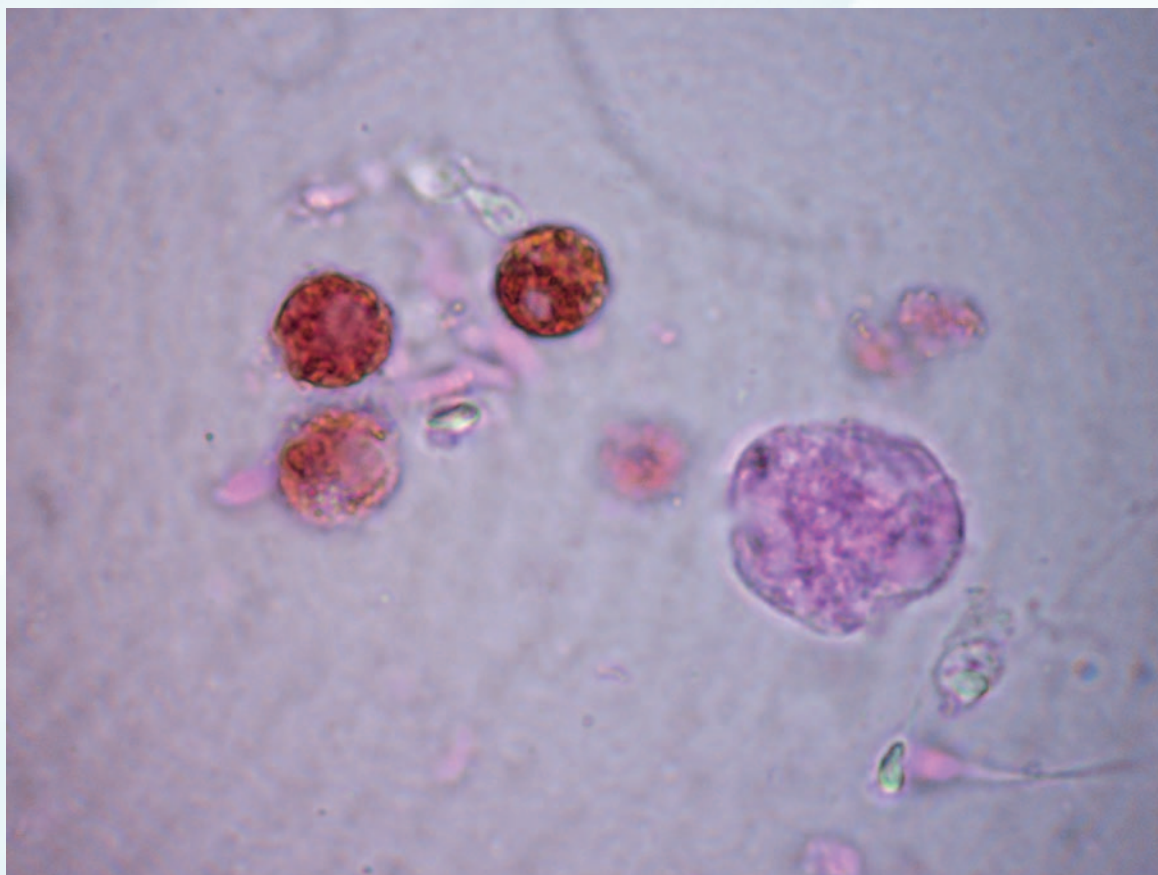


Rycina 12 C. Rycina 12 A-C – rozmazy nasienia barwione metodą Papanicolaou (WHO, 2010). Widoczne leukocyty: granulocyty obojętnochłonne (strzałki niebieskie) fagocytujące granulocyty (strzałki czarne), limfocyt (strzałka zielona), monocyt (strzałki czerwone), spermiofagia (gwiazdka). Skala = 5 μ m.

Ponieważ granulocyty peroksydazo-pozytywne stanowią najliczniejszą grupę leukocytów w nasieniu, WHO z 2010 r. zaleca wykonanie testów na obecność enzymu peroksydazy do ich zróżnicowania (Rycina 13) (Wolff, 1995; Johansson i wsp., 2000), a następnie ocenę ich koncentracji oraz całkowitej liczby. Enzym peroksydaza może być wykrywany cytochemicznie z wykorzystaniem orto-toluidyny. Dostępne są także testy komercyjne.

Wartość referencyjna dla koncentracji komórek peroksydazo-pozytywnych:
< 1 x10⁶ leukocytów / ml*

*Podana wartość referencyjna pochodzi z wcześniejszej wersji podręcznika WHO (1999), WHO z roku 2010 zachowuje tę wartość dla koncentracji komórek peroksydazo-pozytywnych.



Rycina 13. Komórki okrągłe peroksydazo-pozytywne (kolor brązowy) i komórka peroksydazo-negatywna (kolor różowy) w nasieniu po wykonaniu testu na obecność enzymu peroksydazy. Powiększenie 400x. Mikrofotografia autorstwa dr n. med. Katarzyny Marchlewskiej.

Przygotowanie odczynników do testu z orto-toluidyną:

- bufor fosforanowy, 67 mmol/L, pH 6,0: rozpuścić 9,47 g wodorofosforanu sodu (Na_2HPO_4) w 1000 ml wody destylowanej oraz 9,08 g diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4) w 1000 ml wody destylowanej; zmieszać oba roztwory do uzyskania pH 6,0 (około 12 ml Na_2HPO_4 i 88 ml KH_2PO_4);
- nasycony roztwór chlorku amonu (NH_4Cl): dodać 250 g NH_4Cl do 1000 ml destylowanej wody;
- wersenian disodowy (Na_2EDTA), 148 mmol/L: rozpuścić 50 g/L przygotowanego wcześniej buforu fosforanowego pH 6,0 (pkt. 1);
- substrat: rozpuścić 2,5 mg orto-toluidyny w 10 ml 0,9% (9 g/L) NaCl;
- nadtlenek wodoru (H_2O_2) 30% (v/v);
- roztwór roboczy: do 9 ml substratu orto-toluidyny dodać 1 ml nasyconego roztworu NH_4Cl , 1 ml 148 mmol/L Na_2EDTA oraz 10 μl 30% (v/v) H_2O_2 i dokładnie wymieszać. Roztwór jest stabilny przez 24 h.

Analizę wykonuje się w dwóch powtórzeniach. W celu wykonania testu pobiera się po 0,1 ml nasienia i miesza z 0,9 ml roztworu roboczego (rozcieńczenie 1+9 (1:10)). Następnie miesza się zawiesinę delikatnie przez 10 s i inkubuje w temperaturze pokojowej przez 20-30 min. Po tym czasie ponownie miesza się delikatnie zawiesinę i napełnia ko-

more zliczeniową. Ocenę koncentracji komórek peroksydazo-pozytywnych wykonuje się tak jak ocenę koncentracji plemników, przy czym jednostką zliczeniową jest zwykle siatka (patrz rozdział *Ocena liczby plemników*). W obliczeniach należy wziąć pod uwagę rozcieńczenie, jakiemu poddano nasienie w trakcie wykonywania testu.

Przykład 8: Przy rozcieńczeniu 1+9 (1:10) w pierwszym zliczeniu uzyskano 60 komórek peroksydazo-pozytywnych we wszystkich 9 siatkach jednego pola zliczeniowego komory, przy drugim zliczeniu uzyskano 90 komórek peroksydazo-pozytywnych. Suma dla wyników uzyskanych z obu zliczeń w 18 siatkach (2x po 9 siatek) wynosi 150 (60+90) a różnica 30 (90-60). Z Tabeli 6 wynika, że akceptowalna różnica dla uzyskanej sumy (150) wynosi 24, tak więc należy wykonać powtórnie całą procedurę oceny koncentracji zaczynając od wykonania dwóch rozcieńczeń próbki.

Przykład 9: Przy rozcieńczeniu 1+9 (1:10) w pierwszym zliczeniu uzyskano 204 komórki peroksydazo-pozytywne w 5 siatkach jednego pola zliczeniowego komory, przy drugim zliczeniu uzyskano 198 komórek peroksydazo-pozytywnych. Suma dla wyników uzyskanych z obu zliczeń w 10 siatkach (2x po 5 siatek) wynosi 402 (204+198) a różnica 6 (204-198). Z Tabeli 6 wynika, że akceptowalna różnica dla uzyskanej sumy (402) wynosi 39, tak więc wyniki są akceptowalne. Koncentracja komórek peroksydazo-pozytywnych będzie wynosiła $C = (402/10) \times (1/100) \times 10 = (402/10) \times (1/10) = 4,02$ komórek/nl, co jest równoznaczne z koncentracją 4,0 mln komórek / ml.

Po ocenie koncentracji komórek peroksydazo-pozytywnych wylicza się ich całkowitą liczbę w ejakulacie poprzez pomnożenie ich koncentracji przez objętość ejakulatu.

UWAGI:

- Cytochemiczne testy na obecność enzymu peroksydazy w komórkach nie wykrywają aktywowanych granulocytów obojętnochłonnych po wydzieleniu z nich ziarnistości (degranulacja zewnątrzkomórkowa) oraz innych typów leukocytów m.in. limfocytów, makrofagów i monocytów, które nie zawierają enzymu peroksydazy. Testy te pozwalają jednak odróżnić granulocyty obojętnochłonne od wielojądrzastych spermatyd.
- Jeżeli w komorze zliczy się mniej komórek peroksydazo-dodatnich niż 400, to błąd próby będzie większy od 5%. W takim wypadku należy na wyniku podać liczbę zliczonych komórek i odpowiedni błąd próby (Tabela 5).
- Jeżeli zliczy się w sumie mniej niż 25 komórek peroksydazo-pozytywnych, należy podać na wyniku liczbę zliczonych komórek z adnotacją: „Zbyt mało komórek peroksydazo-pozytywnych, aby dokładnie ocenić ich koncentrację”.
- Całkowita liczba komórek peroksydazo-pozytywnych w ejakulacie może odzwierciedlać nasilenie stanu zapalnego (Wolff, 1995).
- Leukocyty mogą powodować uszkodzenie ruchu plemników oraz uszkodzenie integralności plemnikowego DNA w wyniku stresu oksydacyjnego (Walczyk-Jędrzejowska i wsp., 2013).

Przyczyny zwiększonej liczebności komórek okrągłych w nasieniu (Bjorndahl, 2010; Cooper, 2010).

Obecność w nasieniu zwiększonej ilości:

- niedojrzałych komórek spermatogenezy może wskazywać na uszkodzenie nabłonka plemnikotwórczego np. przez stan zapalny, promieniowanie jonizujące, substancje toksyczne;

- leukocytów (leukocytospermia, pyospermia) może wskazywać na stan zapalny gruczołów dodatkowych męskiego układu płciowego.

OCENA PRAWIDŁOWEJ BUDOWY MORFOLOGICZNEJ PLEMNİKÓW

Ocena morfologii plemników jest ważnym parametrem, który ma istotne znaczenie zarówno dla naturalnego, jak i wspomaganego medycznie rozrodu (Auger, 2010, Menkveld, 2010, Menkveld i wsp., 2011, Perdrrix i wsp., 2013). Dąży ona do obiektywizacji i sprecyzowania prawidłowych parametrów budowy męskich gamet (Tabela 7). Przeprowadzana jest z użyciem mikroskopu świetlnego, w oparciu o rekomendowane procedury barwienia plemników (metoda Papanicolaou, Shorr'a, zestaw barwiący Diff-Quik).

Dolna wartość referencyjna dla odsetka plemników z prawidłową budową morfologiczną wynosi:

4%

(5. centyl, 95% przedział ufności: 3-5%)

UWAGI:

- Dolna wartość referencyjna dla odsetka prawidłowych plemników (4%) jest obowiązująca tylko wtedy, gdy ocena morfologii plemników wykonana jest wg przedstawionych poniżej zaleceń (klasyfikacja plemników wg ścisłych kryteriów Krugera).
- Z klinicznego punktu widzenia istotne jest obliczenie całkowitej liczby plemników o prawidłowej budowie morfologicznej w ejakulacie. Uzyskuje się ją mnożąc całkowitą liczbę plemników w ejakulacie przez odsetek plemników prawidłowych (patrz przykład 1 – wyliczanie całkowitej liczby plemników o ruchu postępowym).

Dolna wartość referencyjna dla całkowitej liczby plemników o prawidłowej budowie morfologicznej:

1,6 mln/ejakulat*

*Wartość tę obliczamy mnożąc dolną wartość referencyjną dla całkowitej liczby plemników w ejakulacie (39 mln) przez dolną wartość referencyjną dla odsetka plemników prawidłowych (4%).

Przygotowanie rozmazów

Należy przygotować co najmniej dwa, lub więcej rozmazów próbki nasienia na wypadek problemów z barwieniem lub uszkodzenia szkiełka. Procedura przygotowania rozmazu jest taka sama jak dla rozmazów krwi. Należy pamiętać, aby przed każdorazowym pobraniem próbki do wykonania rozmazu dokładnie wymieszać nasienie.

- Na opisane szkiełko podstawowe w niedużej odległości od jednego z krótszych brzegów należy nanieść 5 lub 10 μ l nasienia (patrz Uwagi poniżej).
- Jak najszybciej do kropli nasienia przykładamy szkiełko „rozmazujące” pod kątem ok. 45°. Kropla musi rozprzestrzenić się wzdłuż krawędzi szkiełka „rozmazującego” i następnie szybkim, pewnym ruchem bez nacisku wykonuje się rozmaz „ciągnąc” za szkiełkiem kroplę nasienia do przeciwległego, krótszego końca szkiełka podstawowego.
- Rozmazy pozostawia się do wyschnięcia.

Jeśli w nasieniu jest niska koncentracja plemników ($< 2 \times 10^6/\text{ml}$), próbkę należy zagęścić przed wykonaniem rozmazu. W tym celu wiruje się próbkę przy 600 g przez 10 min, odbiera większość supernatantu, miesza dokładnie pozostałą część próbki i wykonuje rozmaz a następnie barwienie wybraną metodą. Powinno się uzyskać jak najwyższe zagęszczenie próbki, jednak nie przekraczające 50×10^6 plemników w jednym ml. Wirowanie może wpływać na morfologię plemników, więc procedura ta powinna być odnotowana w uwagach na wyniku.

Czasami trudność sprawia wykonanie rozmazu, gdy próbka ma zwiększoną lepkość. W takim wypadku należy zastosować procedury wykorzystywane przy opóźnionym upłynnieniu nasienia (patrz rozdział *Czas upłynnienia*) lub zastosować przemywanie nasienia. W tym celu należy:

- rozcieńczyć próbkę nasienia (zwykle 0,2-0,5 ml, w zależności od koncentracji plemników) w 10 ml soli (0,9 g NaCl w 100 ml wody destylowanej);
- odwirować przy 800 g przez 10 min;
- odebrać większość supernatantu;
- rozprowadzić osad w pozostałej ilości supernatantu (zwykle 20-40 μl) poprzez delikatne aspirowanie pipetą;
- wykonać rozmaz powstałą zawiesiną (5-10 μl);
- pozostawić do wyschnięcia, następnie wybarwić (patrz poniżej).

Procedura ta może wpływać na morfologię plemników więc jej zastosowanie powinno być odnotowane w uwagach na wyniku.

UWAGI:

- Jeśli w rozmazie zbyt dużo plemników zachodzi na siebie, należy przygotować kolejny rozmaz z mniejszej objętości próbki (5 μl).
- Jeśli plemniki są zbyt rozrzucone na szkiełku (mało plemników do oceny), należy przygotować kolejny rozmaz z większej objętości próbki (10 μl) lub zagęścić próbkę jak opisano powyżej.

Metody barwienia

Rekomendowane metody barwienia to barwienie Papanicolau, Shorr'a i Diff-Quick. We wszystkich trzech metodach główka plemnika barwi się na kolor jasnoniebieski w regionie akrosomalnym oraz ciemnoniebieski w regionie postakrosomalnym. Wstawka może wykazywać zabarwienie czerwone, a witka wybarwia się na kolor niebieski lub czerwony. Nadmiar reszkowej cytoplazmy, zwykle ulokowany wokół wstawki, barwi się na różowo lub czerwono w metodzie Papanicolau, lub czerwono-pomarańczowo w metodzie Shorr'a.

W metodzie Papanicolau, pomimo długiej procedury (ok. 40 min), uzyskuje się bardzo dobre wybarwienie plemników i innych elementów komórkowych, co pozwala na precyzyjne wykrycie defektów poszczególnych struktur plemników, oraz zróżnicowanie innych komórek w nasieniu (komórki nabłonkowe, spermatogenezy i zapalne) (Rycina 10, 12, 15). Rozmazy wybarwione tą metodą po zabezpieczeniu (np. balsamem kanadyjskim) można przechowywać do ponownej oceny i do kontroli jakości.

Odczynniki wykorzystywane w barwieniu Papanicolau:

- barwniki dostępne komercyjnie lub przygotowane samodzielnie: EA-50, Orange G6, hematoksylina Harrisa (bez kwasu octowego),
- kwaśny etanol: dodać 1 ml lodowatego kwasu octowego do 200 ml 70% (v/v) etanolu,
- mieszanina ksylenu:etanol, 1+1 (1:2): zmieszać równe części 100% etanolu i ksylenu.

Etapy barwienia metodą Papanicolau:

Utrwalić wyschnięte rozmazy w 95% (v/v) etanolu – co najmniej 15 min, następnie zanurzyć w:

- | | |
|--------------------------|--|
| 1. 80% (v/v) etanolu | 30 s |
| 2. 50% (v/v) etanol | 30 s |
| 3. woda destylowana | 30 s |
| 4. hematoksylina Harrisa | 4 min |
| 5. woda destylowana | 30 s |
| 6. kwaśny etanol | 4-8 zanurzeń
(jedno zanurzenie powinno trwać ok. 1 s) |
| 7. woda bieżąca | 5 min |
| 8. 50% (v/v) etanol | 30 s |
| 9. 80% (v/v) etanol | 30 s |
| 10. 95% (v/v) etanol | co najmniej 15 min |
| 11. Oragne G 6 | 1 min |
| 12. 95% (v/v) etanol | 30 s |
| 13. 95% (v/v) etanol | 30 s |
| 14. 95% (v/v) etanol | 30 s |
| 15. EA-50 | 1 min |
| 16. 95% (v/v) etanol | 30 s |
| 17. 95% (v/v) etanol | 30 s |
| 18. 100% etanol | 15 s |
| 19. 100% etanol | 15 s |

UWAGI:

- Po utrwaleniu 95% etanolem można od razu rozpocząć procedurę barwienia lub też szkiełko można pozostawić do wyschnięcia. W tym drugim wypadku, po rozpoczęciu barwienia należy pozostawić szkiełko dłużej (2-3 min) w 50% etanolu (etap 2).
- Szkiełka mogą być oceniane bez, jak i po, zabezpieczeniu odpowiednim preparatem zabezpieczającym; jeśli używamy preparatu zabezpieczającego rozpuszczalnego w etanolu to bezpośrednio po etapie 19 (100% etanol) zabezpieczamy przy jego użyciu szkiełko; jeśli używamy preparatu zabezpieczającego nierozpuszczalnego w etanolu to po etapie 19 należy szkiełko zanurzyć w:

1. mieszaninie ksilen:etanol, 1+1	1 min
2. ksylenie 100%	1 min

Następnie należy zabezpieczyć rozmaz szkiełkiem nakrywkowym o odpowiedniej wielkości.

Metoda Shorr'a jest porównywalna z metodą Papanicolau zarówno pod względem długości procedury, jak i jakości preparatów, i dostarcza podobne wyniki, jeśli chodzi o odsetek plemników z prawidłową morfologią (Meschede i wsp., 1993).

Odczynniki wykorzystywane w barwieniu Shorr'a:

- hematoksylina Harrisa;
- roztwór Shorr'a: dostępny komercyjnie lub przygotowany samodzielnie poprzez rozpuszczenie 4 g odczynnika Shorr'a w 220 ml ciepłego 50% (v/v) etanolu; po ostygnięciu dodaje się 2 ml lodowatego kwasu octowego, i przesącza;
- kwaśny etanol: dodać 25 ml lodowatego kwasu octowego do 75 ml 95% (v/v) etanolu;
- amonowy etanol: dodać 5 ml 25% (v/v) roztworu wodnego amoniaku do 95 ml 75% (v/v) etanolu).

Etapy barwienia metodą Shorr'a:

Utrwalić wyschnięte rozmazy w 75% (v/v) etanolu przez 1 h, następnie zanurzyć w:

1. bieżącej wodzie 12-15 zanurzeń
2. hematoksylinie Harrisa 1-2 min
3. bieżącej wodzie 12-15 zanurzeń
4. etanolu amonowym 10 zanurzeń
5. bieżącej wodzie 12-15 zanurzeń
6. 50% (v/v) etanolu 5 min
7. barwniku Shorr'a 3-5 min
8. 50% (v/v) etanolu 5 min
9. 75% (v/v) etanolu 5 min
10. 95% (v/v) etanolu 5 min

Szkiełka mogą być oceniane bez, jak i po, zabezpieczeniu odpowiednim medium (patrz wyżej).

Metoda Diff-Quik jest metodą szybką (barwienie w ciągu 1-2 min), dostępną komercyjnie w formie zestawu. Jednak niektóre próbki nasienia wybarwione tą metodą wykazują silne wybarwienie tła, co może utrudniać ocenę plemników. W sytuacji, gdy dojdzie do znacznego wybarwienia tła, należy zastosować przemywanie nasienia (patrz powyżej).

Odczynniki wykorzystywane w barwieniu Diff-Quik:

- utrwalcacz (dostępny z zestawem lub metanol);
- roztwór barwiący 1 (eozynofilny ksanten);
- roztwór barwiący 2 (bazofilna tiazyna).

Etapy barwienia metodą Diff-Quik:

Utrwalić wyschnięte rozmazy w komercyjnie dostępnym utrwalczu przez 15 s lub w metanolu przez 1 h, następnie zanurzyć w:

1. roztworze barwiącym 1 10 s
2. roztworze barwiącym 2 5 s
3. bieżącej wodzie 10-15 min

Szkiełka mogą być oceniane bez, jak i po, zabezpieczeniu odpowiednim medium (patrz wyżej)

Ocena wybarwionych preparatów wg ścisłych kryteriów Krügera

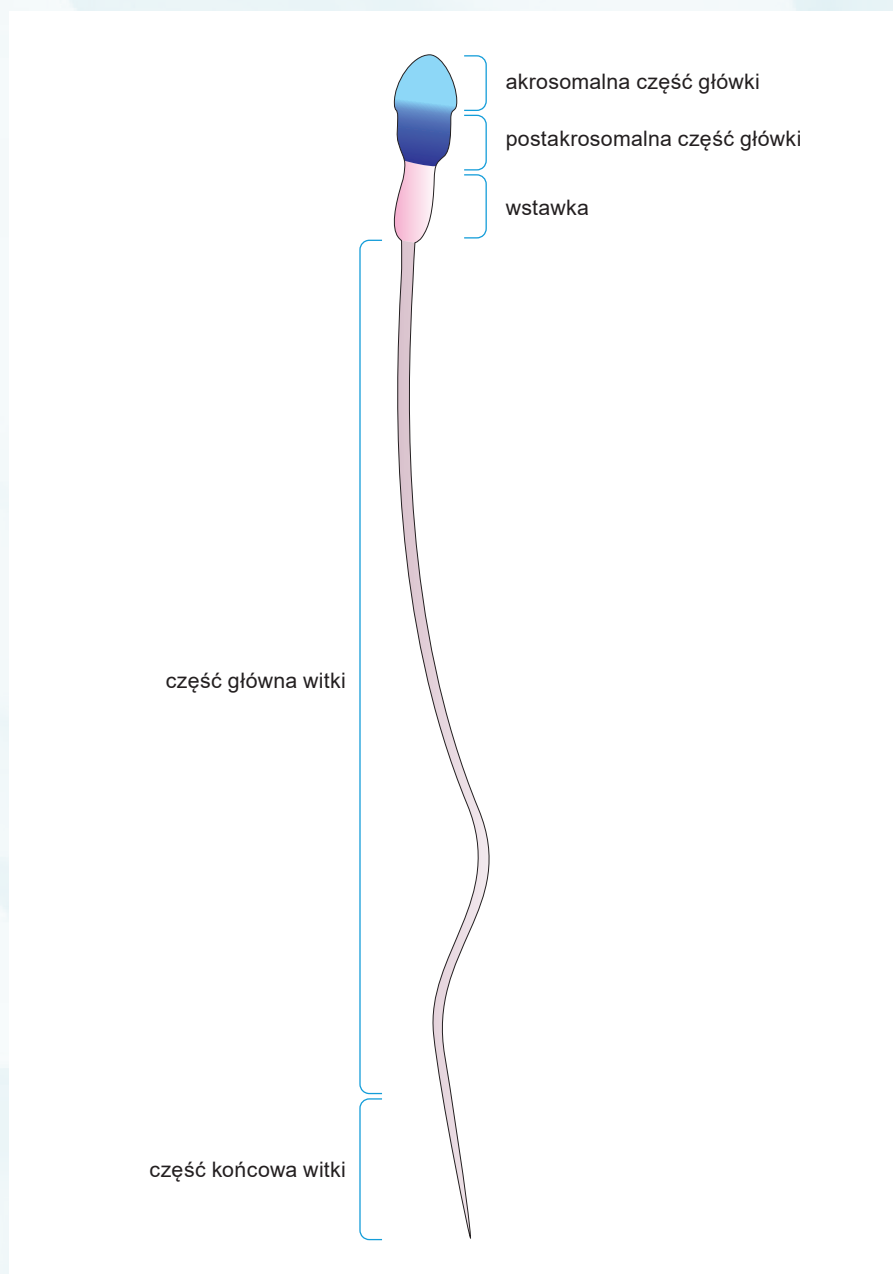
Ocenie poddaje się każdy element budowy plemnika weryfikując jego kształt, lokalizację i wymiar (Rycina 14, 15, 16 A-E):

- główkę, a w jej obrębie akrosom, i część postakrosomalną;
- szyjkę i wstawkę zawierającą osłonkę mitochondrialną;
- wtkę;
- nadmiar resztkowej cytoplazmy (jeśli obecna).

W Tabeli 7 poniżej przedstawiono prawidłowe parametry poszczególnych elementów budowy plemnika wraz z wymiarami morfometrycznymi. Przy wykorzystywaniu do klasyfikacji plemników ścisłych kryteriów Krügera większe znaczenie ma kształty główek niż ich wymiary, chyba że odbiegają one znacznie od przedstawionych w poniższej tabeli. Okular z podziałką mikrometryczną może być pomocny przy różnicowaniu prawidłowej wielkości główki plemnika i pozostałych elementów jego budowy.

Tabela 7. Prawidłowe parametry morfologiczne plemnika ludzkiego opracowane wg rekomendacji WHO z 2010 – ściśle kryteria Krugera (wg *Piasecka i wsp.*, 2013, zmodyfikowane). Wymiary poszczególnych elementów budowy plemników opracowane na podstawie pomiarów po wybarwieniu plemników metodą Papanicolaou.

Struktury plemnika	Parametry
Główka	regularna w zarysie, owalna akrosom regularny w zarysie z jednolitą barwliwością, powierzchnia akrosomu powinna stanowić 40–70% powierzchni główki dopuszcza się obecność nie więcej niż 2 jasnych, małych wakuoli zajmujących $\leq 20\%$ prawidłowej powierzchni główki w części akrosomalnej; część postakrosomalna nie powinna zawierać żadnych wakuoli długość $4,1 \mu\text{m}$ (95% przedział ufności: 3,7–4,7) szerokość $2,80 \mu\text{m}$ (95% przedział ufności: 2,5–3,2) stosunek długości do szerokości 1,5 (95% przedział ufności: 1,3–1,8)
Wstawka	wysmukła, regularna w zarysie, z prawidłową pozycją – oś długa wstawki powinna być przedłużeniem osi główki; należy zwrócić uwagę na połączenie główki z wstawką, podobnej długości co główka plemnika długość $4,0 \mu\text{m}$ (95% przedział ufności: 3,3–5,2) szerokość $0,6 \mu\text{m}$ (95% przedział ufności: 0,5–0,7)
Witka	jednolita na całej długości, cieńsza niż wstawka, nie złamana, bez wygięć, skręceń i zawinięć, część końcowa witki zwężona dopuszczalne są subtelne zagięcia witki (brak zagięć pod kątem ostrym) długość $45,0 \mu\text{m}$
Kropla cytoplazmatyczna	regularna w zarysie, mniejsza niż 1/3 wielkości główki plemnika

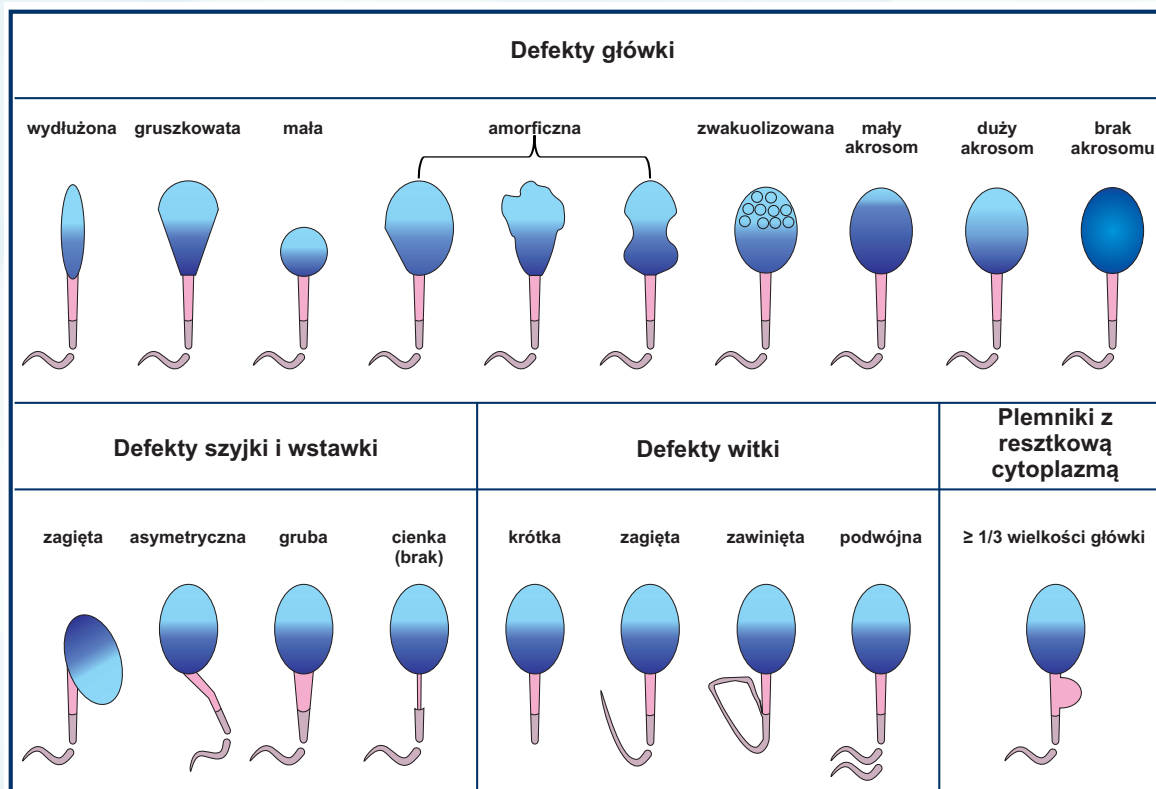


Rycina 14. Schemat budowy plemnika ludzkiego. Kolory struktur zgodne z barwieniem metodą Papanicolaou. Rycina autorstwa dr hab. n. med., prof. nadzw. PUM Małgorzaty Piaseckiej.

Plemnik uznaje się za nieprawidłowy, gdy występuje zaburzenie któregośkolwiek z elementów jego budowy (Rycina 15, 16 A-E). W mikroskopie świetlnym, przy wykorzystaniu ww. metod barwienia m. in. można ujawnić:

- defekty główki: duża lub mała, zwężona, gruszkowata, okrągła, amorficzna, zwakuolizowana (więcej niż dwie wakuole lub $>20\%$ główki zajęte przez wakuole), obecność wakuoli w regionie postakrosomalnym, podwójne główki, zbyt duży lub zbyt mały akrosom ($<40\%$ lub $>70\%$ powierzchni główki); globozoospermie czyli główki plemników okrągłe, bez akrosomu (całkowita globozoospermia – 100% plemników nieprawidłowych, częściowa globozoospermia – 20–90% plemników nieprawidłowych) (Dam i wsp., 2007; Noveski i wsp., 2013);
- defekty szyjki i wstawki: nieprawidłowe (asymetryczne) połączenie główki i wstawki, aplazję osłonki mitochondrialnej (cienka wstawka lub jej brak), gruba lub nieregularna wstawka, zgięta wstawka;

- defekty witki: krótkie, grube, niekiedy „kikutowate” witki, wielokrotne witki, witki złamane, zagięte pod ostrym kątem, witki o nieregularnej szerokości, zwinęte witki;
- nadmiar resztkowej cytoplazmy (ERC, ang. *excess residual cytoplasm*).



Rycina 15. Nieprawidłowości strukturalne plemników ludzkich (Piasecka i wsp., 2013). Kolory struktur zgodne z barwieniem metodą Papanicolaou.

- W każdym z dwóch przygotowanych rozmazów, w różnych polach widzenia liczy się po co najmniej 200 plemników z wykorzystaniem sumatora hematologicznego, różnicując je na prawidłowe i nieprawidłowe (bierze się pod uwagę tylko plemniki nie nałożone na siebie i nie splątane, zawierające główkę i witkę).
- Wynik podaje się jako odsetki plemników morfologicznie prawidłowych i nieprawidłowych, będące średnią uzyskaną z oceny dwóch rozmazów po zweryfikowaniu różnicy z poszczególnych zliczeń (patrz rozdział *Ruchliwość plemników*; Tabela 1). Przy ocenie morfologii plemników do weryfikacji dopuszczalnej różnicy pomiędzy wynikami uzyskanymi z obu rozmazów należy porównać wyniki dla prawidłowych plemników.
- Jeżeli różnica z poszczególnych zliczeń przekroczy wartość dopuszczalną należy powtórzyć procedurę ocenę w tych samych dwóch rozmazach.

UWAGI:

- Ocenie morfologicznej poddaje się tylko kompletne plemniki, a więc takie które mają główkę i witkę.
- Ponieważ osobne witki oraz osobne główki nie są uważane za plemniki, nie są liczone jako nieprawidłowości budowy plemników, jeśli występują sporadycznie w rozmazie. Jednak, gdy ich liczba jest duża, należy ocenić ich odsetek.
- Gdy wiele plemników wykazuje jeden specyficzny defekt budowy np.: małe, okrągłe główki bez akrosomu lub kikutowate witki, to w takiej sytuacji zaleca

się wyliczenie odsetka plemników z danym defektem. Informacja taka powinna znaleźć się na wyniku w Uwagach.

- ERC nie powinien być nazywany kroplą cytoplazmatyczną, gdyż kropla cytoplazmatyczna jest fizjologicznym elementem prawidłowego plemnika (Rycina 16 B, D). Jest to osmotycznie wrażliwy pęcherzyk charakteryzujący plemniki żywe i ruchliwe, który na rozmazach plemników standardowo utrwalanych i barwionych, po ich wyschnięciu jest mało widoczny, bowiem najprawdopodobniej zapada się lub pęka. Najczęściej „prawdziwą” kroplę cytoplazmatyczną można zobaczyć na preparatach przyżyciowych lub utrwalonych i mokrych ocenianych w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Wielkością swą nie powinna ona przekraczać 1/3 powierzchni główki plemnika i powinna wykazywać regularny, gładki kształt. Z kolei obecność ERC jest wyrazem zaburzeń morfogenezy plemników powodujących ich dysfunkcję. A więc, ta nieregularna cytoplazma plemnika, którą obserwuje się na standardowo przygotowanych i wybarwionych rozmazach, jest przede wszystkim resztkową cytoplazmą plemnika, która zlokalizowana na poziomie szyjki i wstawki, gdy jest równa lub większa niż 1/3 powierzchni główki (Rycina 15) niewątpliwie należy do patomorfologicznych defektów, których geneza sięga zaburzeń różnicowania i dojrzewania spermatyd (Cooper i wsp., 2004, 2005, 2011; WHO, 2010).

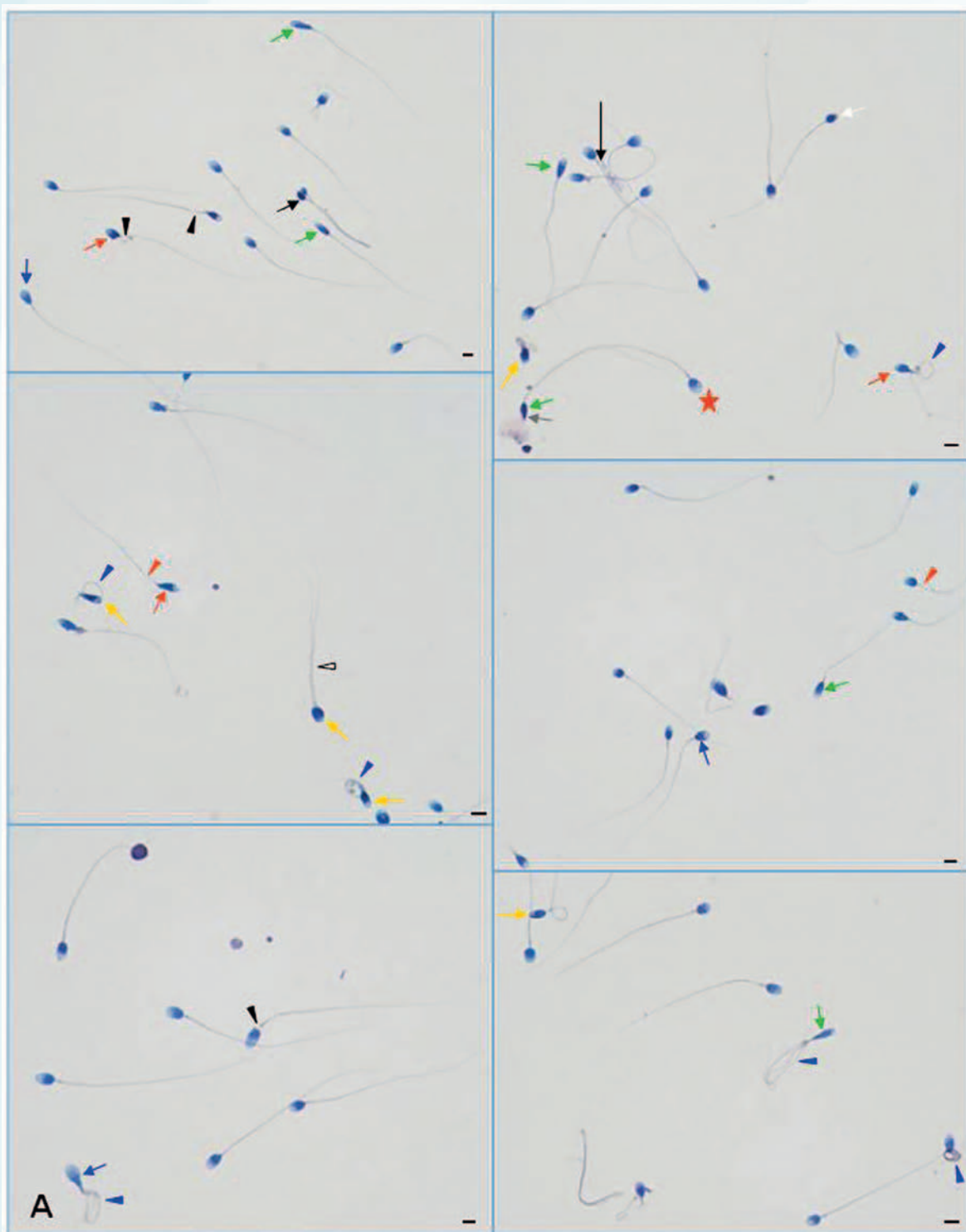
Z klinicznego punktu widzenia w niektórych wypadkach istotna może być dodatkowa ocena plemników nieprawidłowych i różnicowanie ich w zależności od miejsca uszkodzenia (główka, wstawka, witka, obecność ERC). Następnie można obliczyć odsetki plemników z danym uszkodzeniem wg poniższego wzoru lub wykorzystać uzyskane wyniki do wyliczenia dodatkowych wskaźników morfologicznych (patrz rozdział *Dodatkowe wskaźniki morfologiczne*).

$$\% = \frac{\text{całkowita liczba plemników z danym uszkodzeniem}}{\text{całkowita liczba ocenionych plemników (prawidłowych i nieprawidłowych)}} \times 100$$

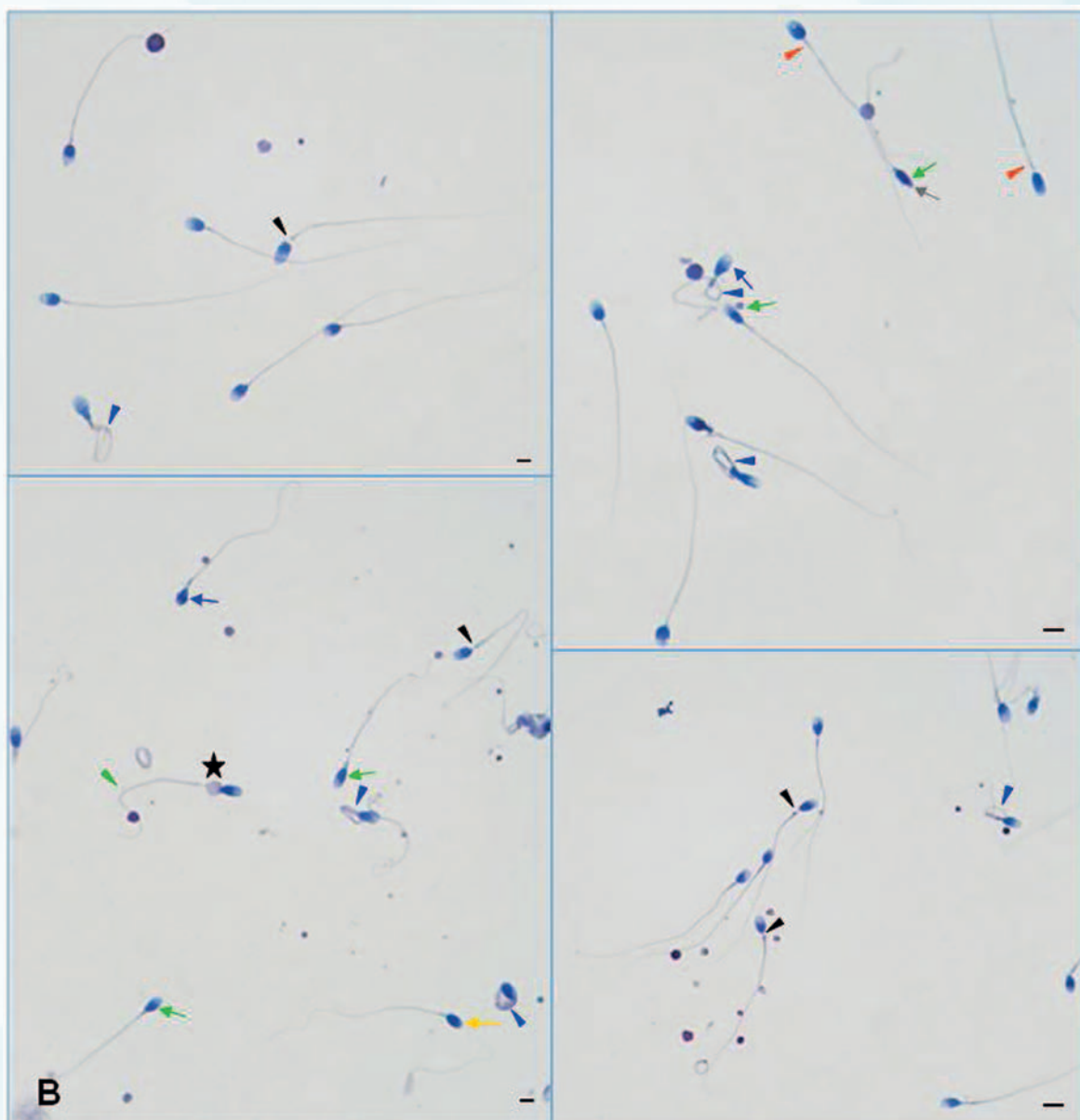
Jako, że jeden nieprawidłowy plemnik może mieć kilka uszkodzeń, to uzyskane w ten sposób odsetki nie będą się sumowały do 100.

Przykład 10: W pierwszym zliczeniu na 200 ocenionych w rozmazie plemników uzyskano: 42 plemniki o prawidłowej budowie i 158 plemników nieprawidłowych. Wśród plemników nieprawidłowych 140 miało defekt główki, 102 defekt wstawki, 30 – defekt witki, a 44 – obecność ERC. W drugim rozmazie na 200 ocenionych plemników wyniki były następujące: 36 plemników prawidłowych, 164 plemniki nieprawidłowe, z których 122 miały defekt główki, 108 defekt wstawki, 22 defekt witki, a w 36 zanotowano obecność ERC.

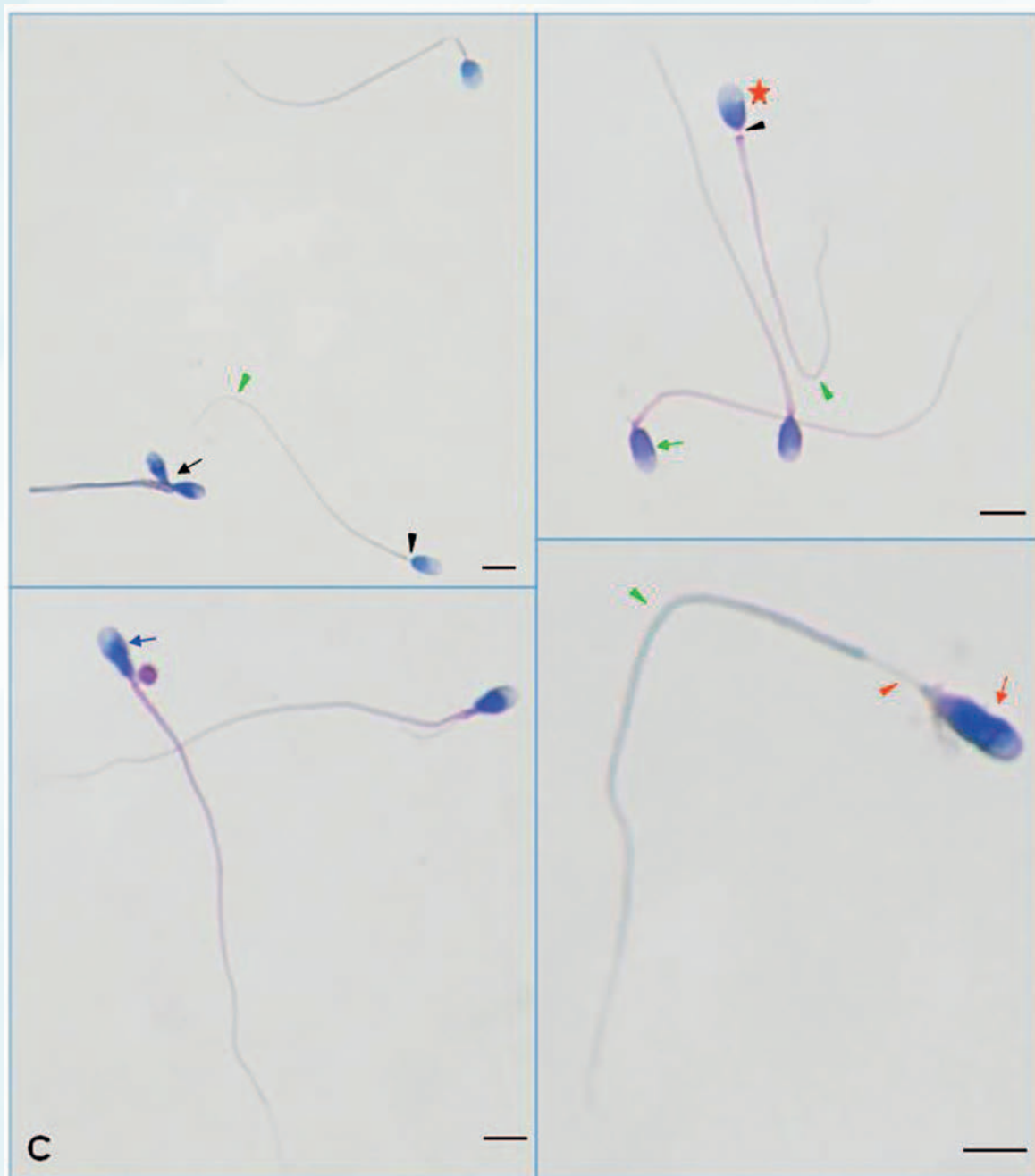
Porównuje się tylko wyniki dla prawidłowych plemników w celu weryfikacji dopuszczalnej różnicy. W pierwszym zliczeniu jest 21% prawidłowych plemników, w drugim zliczeniu – 18%. Średnia wynosi 19,5% (zaokrąglą się do 20%), a różnica wynosi 3%. Z Tabeli 1 wynika, że dla średniej 20% akceptowalna różnica wynosi 8%. Tak więc, uzyskane wyniki są akceptowalne: odsetek plemników prawidłowych wynosi 20%, a nieprawidłowych 80%. Następnie wylicza się wg ww. wzoru odsetki dla plemników z danym uszkodzeniem: nieprawidłowe główki $[(140 + 122) / 400] \times 100 = 66\%$, nieprawidłowe wstawki $[(102 + 108) / 400] \times 100 = 53\%$, nieprawidłowe witki $[(30 + 22) / 400] \times 100 = 13\%$, plemniki z ERC $[(44 + 36) / 400] \times 100 = 20\%$.



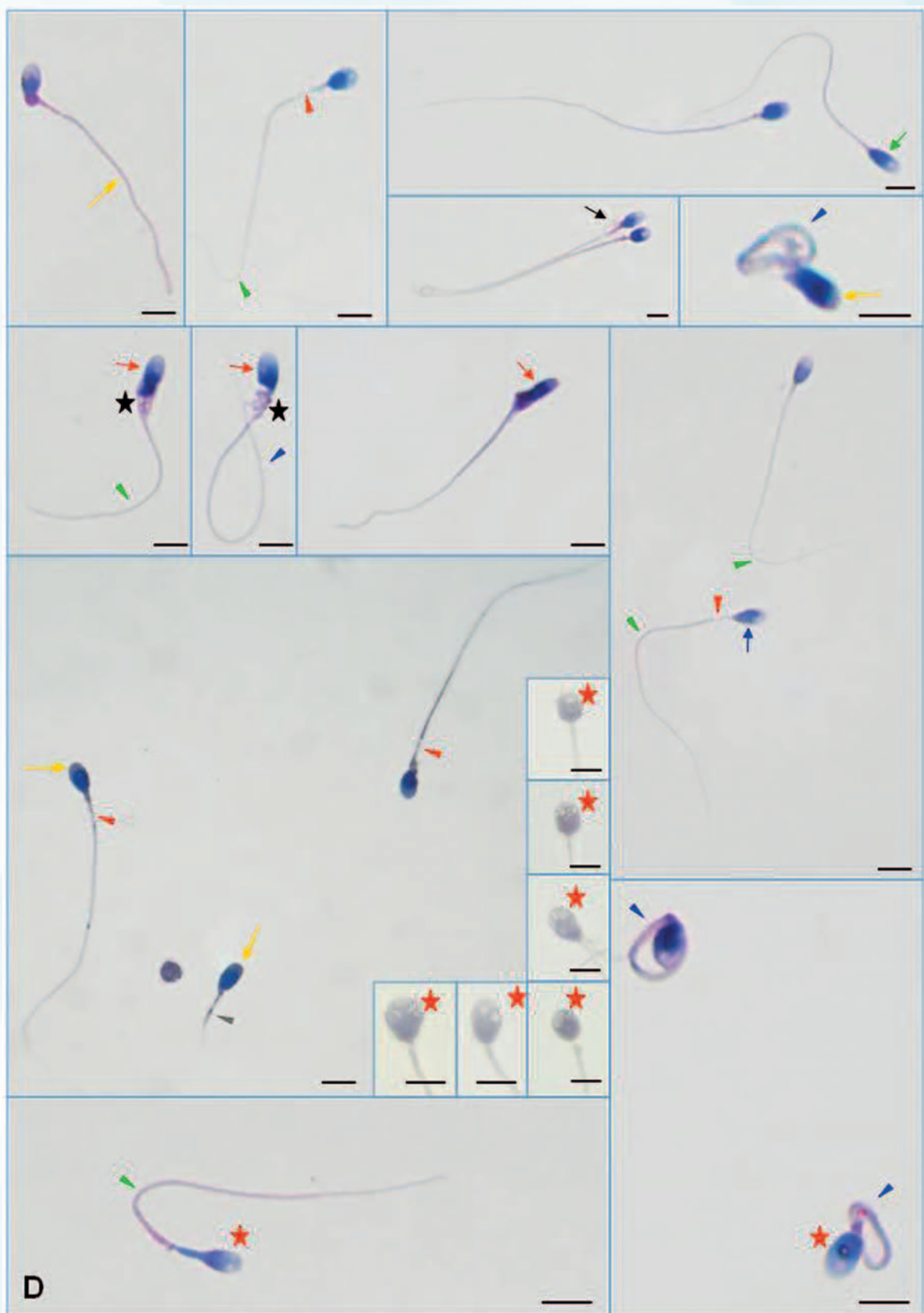
Rycina 16 A.



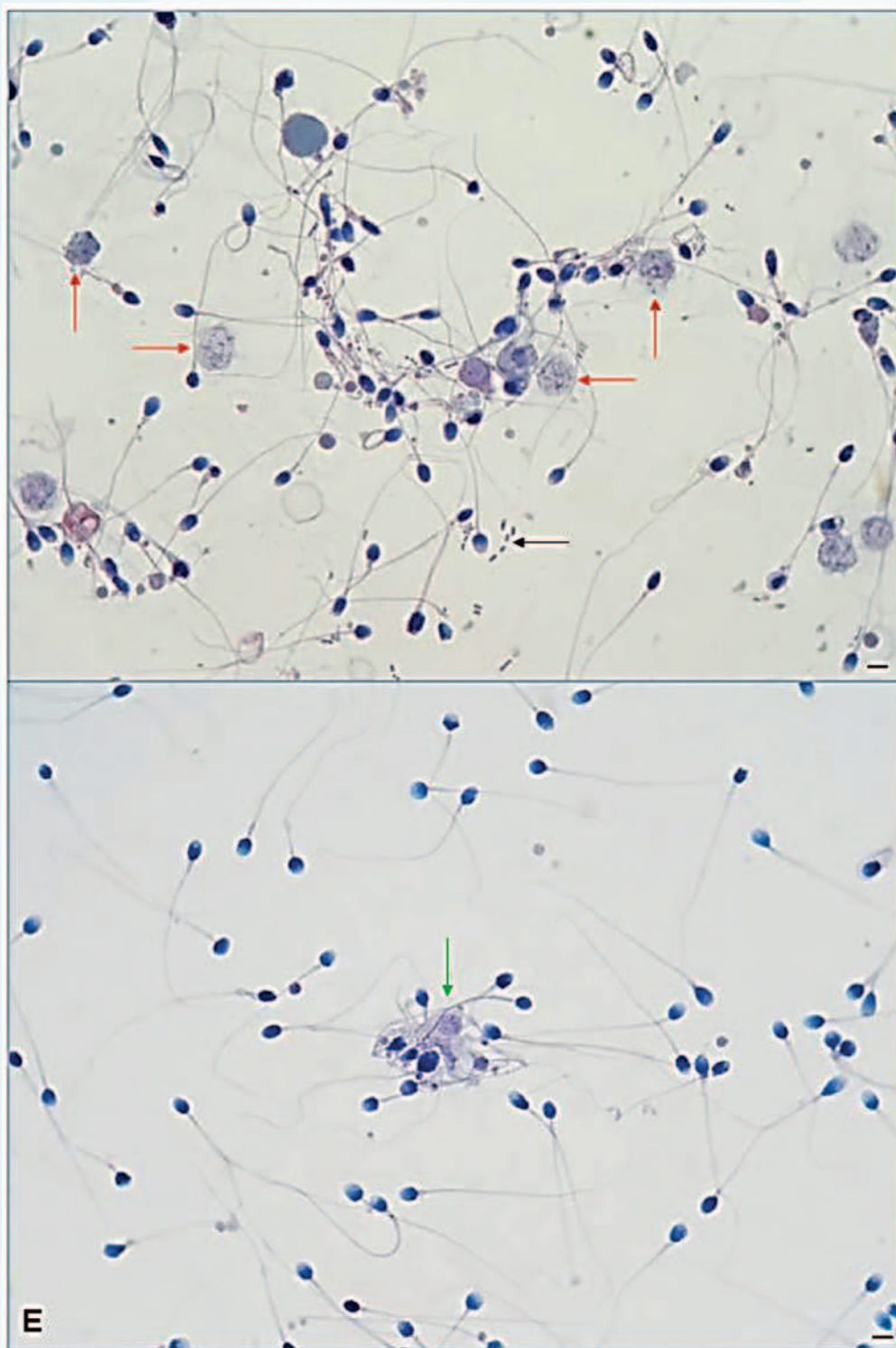
Rycina 16 B.



Rycina 16 C.



Rycina 16 D.



Rycina 16 E. Ryciny 16 A-E – rozmazy plemników ludzkich barwionych metodą Papanicolaou (WHO, 2010). Plemnik potworkowaty (strzałki czarne); główka amorficzna (strzałki czerwone), gruszkowata (strzałki niebieskie), wydłużona (strzałki zielone), mała bez akrosomu (strzałka biała); mały akrosom (strzałki żółte), brak akrosomu (strzałki szare), wakuole w obrębie główki (gwiazdki czerwone); nieprawidłowe połączenie główki i witki plemnika (czarne groty strzałki); brak wstawki (czerwone groty strzałki); witka podwójna (biały grot strzałki), zawinięta (niebieskie groty strzałki), zagięta (zielony grot strzałki), zbyt krótka i pogrubiała (żółty grot strzałki), krótka – „kikutowata” (szary grot strzałki); nadmiar resztkowej cytoplazmy (gwiazdki czarne). Widoczne pałeczki bakterii (czarne długie strzałki), komórki zapalne wchodzące w interakcję z plemnikami (czerwone długie strzałki), spermiofagia (zielona długa strzałka). Skala = 5 μ m. Mikrofotografie autorstwa dr hab. n. med., prof. nadzw. PUM Małgorzaty Piaseckiej.

Przyczyny zaburzeń budowy plemników (Baccetti i wsp., 1989, 2001; Chemes, 2000; Chemes i wsp., 1999; Cooper i wsp., 2004, 2005, 2011; Esser i wsp., 2010, Kubo-Irie i wsp., 2004; Moretti i wsp., 2011; Porsu i wsp., 2003; Rawe i wsp., 2002; Piasecka i wsp., 2013; Krausz, 2014) **to m.in.:**

- zakłócenia spermiogenezy (różnicowanie okrągłej spermatydy w wydłużoną) związane z dysfunkcją centrioli spermatyd o podłożu genetycznym;
- zaburzenia budowy akrosomu o podłożu genetycznym – plemniki z okrągłą główką (globozoospermia) i dużą główką (macrocephalia);
- dysplazja osłonki włóknistej witki plemnika (DFS, ang. *dysplasia of fibrous sheath in sperm flagellum*) o podłożu genetycznym – w zależności od zaawansowania zmian w nasieniu widoczne krótkie, grube, niekiedy „kikutowate” witki, co może być związane z hipertrofią i hiperplazją osłonki włóknistej;
- nadmiar resztkowej cytoplazmy (ang. ERC) – jej obecność jest wyrazem zaburzeń morfogenezy plemników, których geneza sięga zaburzeń różnicowania i dojrzewania spermatyd i powoduje dysfunkcję plemników;
- stan zapalny jąder i najądrzy, który może powodować wcześniejsze uwalnianie nie w pełni dojrzałych plemników, które rozpoznawane są w nasieniu jako plemniki nieprawidłowe;
- bakterie i ich toksyny oraz leukocyty obecne podczas stanu zapalnego, które mogą uszkadzać plemniki;
- niedobór witamin i mikroelementów;
- czynniki toksyczne np. metale ciężkie, ksenoestrogeny.

DODATKOWE WSKAŹNIKI MORFOLOGICZNE

Plemniki o nieprawidłowej budowie często posiadają kilka defektów (tj. główki, wstawki, witki). Dlatego też dokładna analiza wskaźników morfologicznych nieprawidłowości może być bardziej przydatna przy badaniach dotyczących zakresu zaburzenia procesu spermatogenezy niż standardowa ocena różnicująca plemniki tylko na prawidłowe i nieprawidłowe (Jouannet i wsp., 1988, Auger i wsp., 2001).

W praktyce wykorzystuje się trzy wskaźniki morfologiczne:

- wskaźnik (indeks) teratozoospermii (TZI, ang. *teratozoospermia index*);
- wskaźnik zniekształcenia (deformacji) plemnika (SDI, ang. *sperm deformity index*);
- wskaźnik anomalii wielokrotnych (MAI, ang. *multiple anomalies index*).

TZI pozwala określić zakres wielokrotnych defektów plemnika i informuje o uśrednionej liczbie defektów przypadających na plemnik nieprawidłowy (współistnienie defektów poszczególnych elementów budowy plemnika). TZI jest to stosunek liczby plemników z ≥ 1 defektem główki, wstawki, witki i liczby plemników z nadmiarem resztkowej cytoplazmy do liczby morfologicznie nieprawidłowych plemników. Maksymalna wartość tego wskaźnika wynosi 4. Wartość TZI wynosząca 1 oznacza, że większość ocenianych plemników zawiera tylko jeden defekt strukturalny należący do określonej kategorii. Z kolei wzrost wartości TZI sugeruje większą liczbę anomalii morfologicznych przypadających na plemnik.

Analiza nasienia mężczyzn płodnych i o obniżonej płodności ujawniła zależność między zdolnością plemnika do zapłodnienia komórki jajowej a jego morfologią wyrażaną wartością TZI. W badaniach obejmujących 103 płodne pary oraz 107 par nie mogących uzyskać potomstwa stwierdzono różnice w wartościach indeksu teratozoospermii: średnia wartość tego parametru dla mężczyzn płodnych wynosiła $1,51 \pm 0,2$ (zakres 1,04–2,38), natomiast dla niepłodnych $1,81 \pm 0,3$ (zakres 1,26–2,60) (Menkveld i wsp.,

2001; WHO, 2010). Tak więc autorzy zaproponowali wartość 2,09 wskaźnika TZI za wartość graniczną, umożliwiającą odróżnienie mężczyzn płodnych od niepłodnych.

SDI – informuje o uśrednionej liczbie defektów przypadających na plemnik. Jest to stosunek sumy liczby wszystkich identyfikowanych defektów główki plemnika, liczby plemników z ≥ 1 defektem wstawki, witki i liczby plemników z resztkową cytoplazmą do liczby wszystkich plemników (morfologicznie prawidłowych i nieprawidłowych). Maksymalna wartość SDI wynosi 3. W przypadku tego parametru każdy defekt główki (nieprawidłowy kształt, wielkość, struktura, wakuolizacja, obecność i wielkość akrosomu) zliczany jest osobno. Natomiast różne defekty wstawki, witki i obecność resztkowej cytoplazmy zliczane są jak w przypadku indeksu TZI (WHO, 2010).

Wykazano, że u mężczyzn płodnych wartość indeksu SDI wynosi 1,50–1,60, u niepłodnych z niskimi wartościami reaktywnych form tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*) 1,60–1,70, natomiast u mężczyzn niepłodnych z wysokimi wartościami RFT w nasieniu i leukocytospermią wartość tego wskaźnika jest zdecydowanie wyższa 1,90–2,00 (Aziz i wsp., 2007, 2011; Said i wsp., 2005a, 2005b).

MAI – określa występowanie wielu nieprawidłowości w jednym plemniku i informuje o uśrednionej ilości defektów przypadających na plemnik (WHO, 2010). Jest to stosunek liczby wszystkich zaburzeń główki, wstawki oraz witki plemnika do liczby nieprawidłowych plemników. W przypadku tego parametru nie bierze się pod uwagę plemników z nadmiarem resztkowej cytoplazmy. W odróżnieniu od indeksu TZI i SDI wartość tego wskaźnika jest nieokreślona.

Tabela 8. Przykład obliczania dodatkowych wskaźników morfologicznych (WHO, 2010, zmodyfikowane)

	TZI	SDI	MAI
Wartość maksymalna	4.00	3.00	
Wykorzystywany mianownik	liczba plemników nieprawidłowych	liczba wszystkich plemników	liczba plemników nieprawidłowych
(A) Liczba ocenionych plemników	200	200	200
Liczba plemników prawidłowych	46	46	46
Odsetek plemników prawidłowych	23	23	23
(B) Liczba plemników nieprawidłowych (200-46)	154	154	154
(1) Liczba defektów główki (MAI, SDI) lub liczba plemników z ≥ 1 defektem główki (TZI)	154	284	284
(2) Liczba defektów wstawki (MAI) lub liczba plemników z ≥ 1 defektem wstawki (SDI, TZI)	52	52	54
(3) Liczba defektów witki (MAI) lub liczba plemników z ≥ 1 defektem witki (SDI, TZI)	46	46	54
(4) Liczba plemników z ERC	14	14	14
(C) Suma defektów MAI: $1+2+3=$ (C)			392
(D) Suma defektów SDI, TZI: $1+2+3+4=$ (D)	266	396	
Wyliczenie wskaźnika	D/B	D/A	C/B
Wartość wskaźnika	1,72	1,98	2,55

DODATKOWE ZJAWISKA OBSERWOWANE PODCZAS BADANIA NASIENIA

Mimo, że ocena ejakulatu jest złożona i szczegółowa, to i tak nie opisuje wszystkich zjawisk, które mogą być obserwowane podczas badania nasienia. Każdy wynik może być dodatkowo uzupełniony o uwagi, które pozwalają na precyzyjniejsze określenie zjawisk zaobserwowanych w preparacie, ale nie opisanych na wyniku. Aby uwagi te były dobrze zrozumiane przez lekarzy interpretujących wyniki, powinny być formułowane w podobny sposób (Tabela 9).

Tabela 9. Przykłady uwag, które opisują dodatkowe obserwacje w nasieniu.

Treść uwagi	Interpretacja
Pacjent zgłosił utratę części ejakulatu, nie znana całkowita objętość.	Wartości obliczone na podstawie całkowitej liczby plemników są zaniżone.
Nasienie dostarczone już w formie upłynnionej, nie znany czas upłynnienia.	Pacjent dostarczył próbkę nasienia do analizy, ale nie ma pewności co do czasu od ejakulacji. W związku z tym wątpliwa jest ocena żywotności i ruchliwości plemników.
W nasieniu obecne pasma śluzu.	Może to świadczyć o stanie zapalnym, ale obserwowane pasma śluzu nie wpływają na ocenę preparatu. Oceny ruchliwości dokonano poza pasmami śluzu.
W nasieniu obecne pasma śluzu, zawierające liczne leukocyty.	Leukocyty poza pasmami śluzu mają bardzo niską koncentrację. Pasma śluzu uniemożliwiają określenie prawdziwej liczby leukocytów.
W nasieniu obecne pasma śluzu, zawierające liczne plemniki.	Plemniki poza pasmami śluzu mają swobodę poruszania się. Plemniki, które są „uwięzione” w pasmach śluzu nie wchodzą do analizy liczby i ruchliwości plemników w konsekwencji uzyskane wyniki nie odzwierciedlają prawdziwych wartości.
W nasieniu obecne ciała (liczne/pojedyncze) żelatynowe.	Mogą stanowić znaczną objętość ejakulatu, co może zafałszować ocenę objętości ejakulatu a tym samym całkowitej liczby plemników w nasieniu.
Ocena ruchliwości dotyczy wolnych od aglutynacji plemników	Plemniki ulegające aglutynacji brane są pod uwagę przy ocenie liczby plemników, ale nie przy ocenie ruchliwości.
Ruch postępowy plemników słaby i nieprostoliniowy.	Brak lub bardzo niewiele plemników o szybkim ruchu postępowym (dawny typ A)
Ruch całkowity plemników powyżej dolnej granicy wartości referencyjnej. Oceny żywotności nie wykonano.	WHO dopuszcza nie wykonywanie oceny żywotności plemników przy prawidłowym odsetku plemników ruchliwych.
Z powodu niskiej liczby plemników nie wykonano standardowej oceny morfologicznej. Na 115 ocenionych plemników w dwóch rozmazach 9 plemników miało budowę prawidłową.	Nie zaleca się obliczania odsetka plemników o prawidłowej budowie, jeśli ich liczba w preparacie nie pozwala na zależenie co najmniej 200 plemników.

W preparacie bezpośrednim nie znaleziono plemników. Po odwirowaniu nasienia w osadzie stwierdzono 3 ruchliwe plemniki.	Preparat bezpośredni oznacza analizę 2 próbek nasienia, łącznie 20 μ l. Przy braku plemników konieczna jest dokładna analiza całego osadu. Opisuje się wszystkie znalezione plemniki uwzględniając ich ruchliwość.
W preparacie bezpośrednim znaleziono pojedyncze (lub jeden, dwa itd. ruchome, nieruchome) plemniki.	Wartość koncentracji nie pozwala na znalezienie 200 plemników w komorze Neubaeuera. (koncentracja: <0,1 mln/ml) poniżej zakresu dokładności komory.
W nasieniu stwierdzono obecność bakterii.	W preparacie barwionym do oceny morfologii plemników (pow. 1000x) można stwierdzić obecność bakterii, ale zwykle nie można ich zidentyfikować.

ZNACZENIE WEWNĘTRZNEJ I ZEWNĘTRZNEJ KONTROLI JAKOŚCI BADAŃ W LABORATORIUM SEMINOLOGICZNYM

Ważnym elementem zarządzania jakością w każdym laboratorium, w tym także w laboratorium seminologicznym, jest systematyczne przeprowadzanie wewnętrznej kontroli jakości oraz uczestnictwo w zewnętrznej kontroli jakości co najmniej raz w roku zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [Dz.U. nr 61 poz. 435 z późniejszymi zmianami] (*Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r.*). Głównym celem kontroli jakości jest znalezienie błędu, zarówno systematycznego, jak i przypadkowego, oszacowanie jego zakresu i zminimalizowanie go (*Gernand, 2000*), co przekłada się bezpośrednio na wiarygodność uzyskanego wyniku i tym samym jego kliniczną użyteczność.

Jednym z pierwszych etapów wprowadzenia do laboratorium programu zarządzania jakością jest opracowanie księgi jakości z dokładnym opisem standardowych procedur operacyjnych (SOP, ang. *standard operating procedures*), która w jasny i zrozumiały sposób dostarcza diagnostom szczegółowych instrukcji wykonywania poszczególnych czynności oraz analiz laboratoryjnych, zapewniając standaryzację procedur zarówno rutynowych, wykonywanych przy każdym badaniu nasienia, jak i wykonywanych sporadycznie (*Baszczuk, 2012; Palacios i wsp., 2012; WHO 2010*).

Minimalne wymagania dotyczące kontroli jakości w laboratorium seminologicznym wg WHO (2010) to:

- nadzór i współzależność wyników w obrębie próbki, wykonywane cały czas podczas analizy danej próbki;
- analiza parametrów nasienia (materiał kontrolny) przez różne osoby i ocena zróżnicowania uzyskanych wyników wykonywane raz na tydzień lub raz na miesiąc;
- analiza średnich wyników testów wykonywana raz na miesiąc lub raz na kwartał;
- udział w zewnętrznej kontroli jakości, raz na kwartał lub raz na pół roku;
- kalibracja sprzętu (pipety, wagi, komory zliczeniowe i pozostałe wyposażenie) wykonywane raz na rok.

Podczas każdego badania nasienia należy zwracać uwagę na wyniki zaskakujące, nie pasujące do pozostałych wyników analizy np. kiedy odsetek martwych plemników przewyższa odsetek plemników nieruchomych, przypadki nagłego pojawienia się azoospermii u danego pacjenta itp. Pierwszym etapem wewnętrznej kontroli jakości jest wykonywana w trakcie badania nasienia ocena poszczególnych parametrów w dwóch

niezależnych powtórzeniach (dwóch preparatach, dwóch polach komory zliczeniowej) oraz weryfikacja dopuszczalnej (akceptowalnej) różnicy pomiędzy uzyskanymi wynikami z wykorzystaniem odpowiednich tabel (patrz rozdział *Ocena ruchliwości plemników i Ocena liczby plemników*).

Kiedy w laboratorium badanie nasienia wykonywane jest przez różne osoby, niezbędne jest przeprowadzanie przez nie (raz w tygodniu lub raz w miesiącu) oceny próbek kontrolnych oraz statystyczna analiza zróżnicowania uzyskanych wyników. Idealem jest przebadanie przez diagnostów świeżego materiału kontrolnego, w tym wypadku świeżej próbki nasienia, w rutynowych warunkach w celu scharakteryzowania oczekiwanej zmienności pomiarów i ustalenia oczekiwanego rozkładu wyników pomiarów kontrolnych. W celu statystycznej analizy uzyskanych wyników wykorzystuje się dwukierunkową analizę wariancji i test na znamiennej różnicę pomiędzy oceną wykonywaną przez różne osoby. Najczęściej jednak materiał kontrolny stanowią próbki stabilizowane wykonywane w laboratorium na bazie próbek nasienia pacjentów np. pula próbek kontrolnych do oceny koncentracji plemników, zachowane preparaty z testu eozyna-nigrozyna lub barwienia do oceny morfologii oraz ruch plemników nagrany na DVD lub CD. Do oceny zróżnicowania wyników uzyskanych przez różnych diagnostów stosuje się także karty kontrolne (karta wartości średniej i karta odchylenia standardowego). Tworzenie i interpretacja wykresów kontrolnych są integralną częścią kontroli jakości.

W zależności od ilości wykonywanych analiz można raz na miesiąc lub raz na kwartał przeprowadzać analizę średnich wyników testu umożliwiającą monitorowanie trendu analizy. Wprowadzenie tej analizy powinno być poprzedzone co najmniej 6-miesięcznym okresem wstępnym, w którym co miesiąc podsumowuje się wyniki dla poszczególnych parametrów uzyskane od pacjentów z wartościami prawidłowymi (średnia, odchylenie standardowe). Uzyskane wyniki przedstawia się na kartach kontrolnych np. Shewharta.

Założeniem zewnętrznej kontroli jakości jest oszacowanie efektu standaryzacji procedur wykonywanych w laboratorium, porównanie wyników danej grupy z pozostałymi grupami, dzięki czemu można ocenić i porównać wyniki uzyskiwane różnymi metodami w skali niemożliwej do uzyskania w pojedynczym laboratorium. Najczęściej programy takie obejmują uczestnictwo w 2 lub 4 kontrolach w ciągu roku. Przesyłane są próbki nasienia do oceny koncentracji plemników, próbki do oceny ruchliwości plemników na płycie DVD lub dostępne on-line na platformie ośrodka, rozmazy nasienia do oceny morfologii plemników oraz preparaty do oceny żywotności plemników. Każda taka kontrola ma charakter edukacyjny (Jędrzejczak i wsp., 2012; Jędrzejczak i wsp., 2008; WHO 2010). W Polsce jest możliwość odpłatnego uczestnictwa w programie zewnętrznej kontroli jakości oferowanej przez Labquality (Helsinki, Finlandia), którego dystrybutorem jest spółka Systemy Oceny Wiarygodności Analiz Medycznych (SOWA-med; <http://www.sowa-med.pl/index.php>). Oprócz oferowanego wyżej programu jest możliwość uczestnictwa w zagranicznych programach zewnętrznej kontroli jakości np. Nordic Association for Andrology (NAFA, prof. Lars Bjorndahl, co-ordinator EQA, email.: lars.bjorndahl@ki.se); QuaDeGa (Munster, Niemcy; <http://www.quadega.de>), czy UK NEQAS Reproductive Science (Manchester, Wielka Brytania: <http://www.cmft.nhs.uk/ukneqasrepsci.aspx>).

Porównania międzylaboratoryjne są minimalną zewnętrzną formą kontroli jakości badania nasienia. Polskie Centrum Akredytacji w przypadku braku dostępnej zewnętrznej kontroli jakości na terenie kraju zaleca uczestnictwo w badaniu biegłości i porównań międzylaboratoryjnych, w którym powinny uczestniczyć co najmniej 2 laboratoria (choćby korzystniejsze jest uczestnictwo większej liczby laboratoriów). Jak do tej pory w 2011 roku zaproponowano jedyne w Polsce nieodpłatne porównanie międzylaboratoryjne koncentracji, ruchu i morfologii plemników (Pracownia Andrologii Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu) (Jędrzejczak i wsp., 2012).

WYPOSAŻENIE LABORATORIUM SEMINOLOGICZNEGO

Pomieszczenie do oddania nasienia

Pacjent powinien mieć zapewnioną możliwość oddania nasienia w pobliżu laboratorium, w ustronnym pomieszczeniu, w miarę możliwości wyposażonym w umywalkę, jednorazowe ręczniki i środki higieny osobistej. Jeśli nie ma takiej możliwości, pacjent może oddać nasienie poza laboratorium, jednak powinien być poinformowany na temat warunków wstępnych oddania nasienia (najlepiej pisemne oraz ustne instrukcje dotyczące oddania nasienia i jego transportu do laboratorium, patrz rozdział *Badanie nasienia – procedury przedlaboratoryjne*), i otrzymać pojemnik do oddania nasienia.

Pojemniki na nasienie

Do oddania nasienia dobrze sprawdzają się plastikowe pojemniki na moczu. Najlepiej, jeśli pojemniki są wydawane przez laboratorium po wcześniejszym ich zważeniu i zapisaniu wagi na pojemniku (w celu późniejszego zważenia pojemnika wraz z nasieniem i oceny objętości próbki). Jeśli pojemniki do oddania nasienia nie są wydawane przez laboratorium, a dostarczane przez pacjenta wraz z próbką, nie ma możliwości precyzyjnej oceny objętości próbki metodą wagową.

Dopuszczalne jest także używanie skalowanego cylindra z szerokim ujściem do oddania nasienia, jednak ze względów praktycznych nie jest to powszechnie stosowane.

W wypadku, kiedy chce się przetestować, czy materiał, z którego wykonany jest pojemnik nie jest toksyczny dla plemników należy wykonać następujący test:

- przygotować pojemnik kontrolny (o którym wiadomo, że nie jest toksyczny dla plemników, np. pojemnik szklany) oraz badany (którego ewentualną toksyczność chce się zbadać);
- wybrać kilka próbek nasienia o dużej koncentracji i prawidłowej ruchliwości plemników, podzielić objętość próbek na pół i umieścić w pojemniku badanym i kontrolnym;
- dokonać oceny ruchliwości plemników (zgodnie z zasadami obowiązującymi do oceny ruchliwości przy wykonywaniu badania ogólnego nasienia) dla każdego z pojemników po 1, 2, 3 i 4 godzinach (w temperaturze pokojowej lub 37°C);
- pojemnik badany może być traktowany jako nietoksyczny dla plemników, jeśli nie uda się wykazać różnic statystycznych pomiędzy pomiarami w żadnym z punktów czasowych (test t Studenta dla sparowanych danych).

Temperatura wykonywania badania nasienia

Optymalnie jest, gdy analiza nasienia przeprowadzana jest w temperaturze 20-37°C. Może to być zapewnione np. przez użycie stolika grzejnego w mikroskopie lub też przez zachowanie odpowiedniej temperatury powietrza w laboratorium. Dodatkowo taką temperaturę można zapewnić przez przechowywanie materiału oraz szkiełek mikroskopowych w inkubatorze/cieplarni i ocenę natychmiast po wykonaniu preparatu. Nadmierne ochłodzenie próbki może spowodować obniżenie ruchliwości plemników.

Wymagane wyposażenie laboratorium

Poniżej wymieniono niezbędny sprzęt i odczynniki do wykonania ogólnego badania nasienia. W zależności od organizacji pracy w danym laboratorium użycie dodatkowego sprzętu (np. statywów, probówek typu falkon) może ułatwić pracę. Poza tym urządzenia takie jak cieplarka (pracująca w temperaturze 37°C) lub płytki grzejne oraz mie-

szadło zapewniające delikatne mieszanie próbki do momentu upłynięcia, są zalecane, ale nie są niezbędne.

Do niezbędnych elementów wyposażenia laboratorium zalicza się:

- mikroskop laboratoryjny kontrastowo-fazowy z obiektywami 10, 20, 40, 100x i z okulem 10x (lub 12.5x); dodatkowo wymienne okulary: z siatką kwadratową np. 10x10 (do ograniczania powierzchni ocenianej w czasie analizy ruchliwości) oraz z podziałką mikrometryczną (do pomiarów morfometrycznych przy ocenie morfologii plemników). Zalecane jest także stosowanie podgrzanego stolika, którego temperatura pozwala na podtrzymanie ruchliwości plemników;
- waga laboratoryjna – niezbędna do oceny objętości nasienia, zalecana dokładność wagi 0,01 g;
- wirówka (zakres: 600 g do zagęszczania próbki np. do oceny morfologii plemników), 1000 g (do uzyskania plazmy do oceny markerów biochemicznych), 3000 g (do odwirowania osadu w przypadku podejrzenia azoospermii);
- sumator hematologiczny (wystarczające są sumatory 6 – lub 9-przyciskowe);
- komora do oceny koncentracji plemników – zmodyfikowana komora Neubauera ze szkiełkami nakrywkowymi grubości 0,44 mm;
- komora wilgotna do sedimentacji plemników w komorze zliczeniowej;
- wytrząsarka (ang. *vortex*) do mieszania rozcieńczonych próbek nasienia (nie należy jej używać do mieszania całej próbki nasienia);
- pipety laboratoryjne w zakresie 10–1000 μ l oraz odpowiednie końcówki;
- pipeta tłokowa w zakresie 10–100 μ l oraz odpowiednie końcówki.

Materiały laboratoryjne zużywalne:

- papierki wskaźnikowe do pomiaru pH w zakresie 6-10 (papierki w zakresie 0-14 nie mają zastosowania);
- pipety Pasteura (jednorazowe, plastikowe, o szerokim ujściu 1.5 mm, pojemność np. 3 ml);
- szkiełka mikroskopowe podstawowe;
- szkiełka mikroskopowe nakrywkowe o grubości 0,16–0,19 mm i wielkości 22x22 mm (w razie innej wielkości należy dostosować nakładaną na szkiełko objętość) oraz 24x50 mm (lub inne o dużych wymiarach, do stosowania przy analizie osadu);
- probówki typu eppendorf (do wykonywania rozcieńczeń, najlepiej 1,5 ml);
- barwiacze (pojemniki do barwienia rozmazów nasienia do oceny morfologii plemników);
- ołówek i marker do opisywania próbek i preparatów (nie nakleja się naklejek z danymi pacjenta na ważony pojemnik, bo wpłynie to na ocenę objętości nasienia metodą wagową);
- formularze do wypisywania wyników;
- minutnik;
- komputer i drukarka do przygotowania ostatecznego wyniku;
- odczynniki (patrz rozdziały powyżej).

KOMPUTEROWO WSPOMAGANA ANALIZA NASIENIA

Istnieje wiele systemów do komputerowo wspomaganej analizy nasienia (ang. *Computer Aided Sperm Analysis* – CASA). Należy podkreślić, że systemy te nie są całkowicie „komputerowe”, a jedynie „komputerowo wspomagane”, co oznacza że są przeznaczone do wspomagania wyszkolonego w analizie nasienia diagnosty w precyzyjnej ocenie wybranych parametrów nasienia. Szybki rozwój technologii komputerowych i możliwości technicznych powoduje, że w istniejących systemach pojawiają się udoskonalenia i coraz więcej parametrów może być dzięki nim precyzyjnie oznaczanych. Uważa się, że CASA może być stosowana do rutynowej oceny nasienia, daje precyzyjne i porównywalne z analizą manualną wyniki dla większości parametrów nasienia, jednak dla sprawności systemu konieczne jest zachowanie odpowiednich standardów w przygotowaniu próbek, szkolenie personelu oraz umiejętne stosowanie całego systemu (*Dearing i wsp., 2014; Lammers i wsp., 2014*). W badaniach wykazano korelacje pomiędzy prawdopodobieństwem zapłodnienia, a niektórymi parametrami plemników ocenianymi za pomocą CASA (*Shibahara i wsp., 2004; Garrett i wsp., 2003*).

Systemy CASA składają się z mikroskopu, komputera oraz oprogramowania, które jest zasadniczą częścią tego systemu i działają pod nadzorem diagnosty. Systemy składające się jedynie z analizatora (bez podglądu w mikroskopie) nie są urządzeniami rekomendowanymi i nie są przedmiotem opisu w tym rozdziale.

Nasienie do analizy wspomaganej komputerowo jest pobierane i początkowo przygotowywane w taki sam sposób jak w przypadku analizy manualnej. Parametry makroskopowe nasienia muszą być oznaczone ręcznie, gdyż najbardziej rozwinięte w tej chwili systemy CASA oceniają jedynie takie parametry badania ogólnego jak koncentracja, ruchliwość, żywotność i morfologia plemników, z czego ocena żywotności jest na tyle skomplikowana, że nie jest wykonywana rutynowo przy użyciu tych systemów. Do oceny koncentracji i ruchliwości plemników wykorzystuje się nagrania krótkich sekwencji filmowych natomiast do oceny morfologii i żywotności – zdjęcia.

W analizie nasienia wspomaganej komputerowo zasadniczym jest, aby materiały (filmy i zdjęcia) analizowane przez program komputerowy miały odpowiednią jakość, która pozwoli systemowi na ich właściwą ocenę. Istotną rolę w jakości uzyskiwanych filmów i zdjęć ma jakość układu optycznego w mikroskopie, jego czystość, właściwe ustawienie światła i ostrości, czystość komór i szkiełek stosowanych do nakładania preparatu. Przykładowo, obecność w preparacie pęcherzyków powietrza, nierównomierne oświetlenie pola widzenia, czy obecność odcisków linii papilarnych na szkiełku może utrudniać lub uniemożliwiać analizę. Analiza wspomagana komputerowo może też być utrudniona w przypadku nietypowych próbek (*Lammers i wsp., 2014*).

Ważną cechą CASA jest to, że to diagnosta podejmuje ostateczną decyzję, czy analiza jest przeprowadzona właściwie oraz może wprowadzić zmiany i korekty w ocenach dokonanych przez system komputerowy, jeśli uważa, że system zanalizował coś niewłaściwie np. jeśli system oznaczył jako plemnik element morfotyczny, który według oceny diagnosty nie jest plemnikiem.

Nowoczesne systemy CASA są wyposażone w programy do przeprowadzania kontroli zewnętrznej i wewnętrznej oraz powinny podlegać weryfikacji i standaryzacji.

Ocena koncentracji i ruchliwości plemników

Ocena koncentracji i ruchliwości plemników w większości systemów wspomaganych komputerowo jest wykonywana jednocześnie, wykorzystując fakt zliczania plemników ruchliwych w znanej jednostce objętości ejakulatu. Przygotowanie filmów do oceny ruchliwości i koncentracji powinno być wykonane w takim samym czasie jak

analiza ruchliwości plemników metodą manualną (najlepiej w ciągu 30–60 min od odnawiania). Rekomendowane jest przygotowanie preparatu do oceny koncentracji i ruchliwości w komorze o głębokości 20 μl (jednorazowe komory różnych firm są dostępne komercyjnie).

Ocena ruchliwości i koncentracji powinna być przeprowadzona z dwóch komór, z przynajmniej 6 pól widzenia w każdej komorze oraz na podstawie analizy minimum 200 plemników w każdej komorze. Stosuje się mikroskop kontrastowo-fazowy, powiększenie stosowane przy takiej analizie jest mniejsze niż przy ocenie manualnej i wynosi tylko 100x. Wydaje się, że minimalny czas nagrania powinien wynosić 1 s, choć producenci systemów rekomendują czasem dłuższe czasy analizy.

W próbkach, w których koncentracja plemników jest wyższa niż 50 mln/ml ocena koncentracji metodą CASA jest utrudniona ze względu na nakładanie się plemników na siebie. W takich przypadkach zalecane jest rozcieńczenie próbki plazmą nasienia od tego samego pacjenta. W tym celu należy podzielić nasienie na 2 części i jedną z nich odwirować (16000 g, 6 min) w celu uzyskania plazmy nie zawierającej plemników. Następnie należy użyć tej plazmy do rozcieńczenia próbki wyjściowej w sposób zapewniający przewidywaną koncentrację plemników na poziomie <50 mln/ml. Po uzyskaniu wyniku koncentracji z systemu należy go pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia np. jeśli koncentracja w danej próbce wynosiła około 160 mln/ml, to próbkę można rozcieńczyć 4 razy (mieszając np. 200 μl próbki wyjściowej i 600 μl plazmy po odwirowaniu), a uzyskany wynik koncentracji należy następnie pomnożyć przez 4. W przypadku próbek o koncentracji plemników niższej niż 2 mln/ml ocena koncentracji może być także utrudniona (Garrett i wsp., 2003).

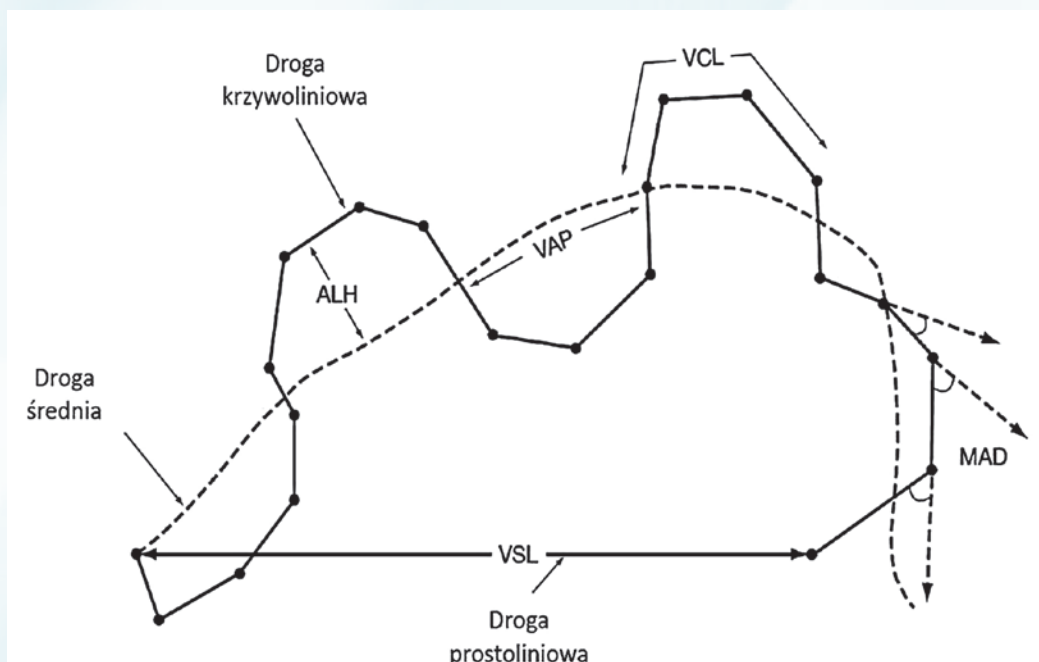
UWAGI:

- Z praktycznego punktu widzenia najlepiej jest najpierw zapisać wystarczającą liczbę filmów z danej próbki (przesuwając tylko obraz pod mikroskopem i nagrywając kolejne filmy w systemie), a dopiero po zakończeniu wszystkich nagrań dokonać analizy filmów. Pozwala to na szybkie utrwalenie plemników widzianych w preparacie, a dzięki temu zmniejszenie błędu wynikającego z ich wychładzania, czy wysychania.
- Analizę można też wykonać później, w dowolnym czasie, o ile zapisane filmy są dobrej jakości i jest pewność, że nie będzie potrzeby ich ponownego nagrania.

W zależności od ustawień systemu może on kategoryzować plemniki na ruchliwe z określoną prędkością, ruchliwe w miejscu i nieruchliwe. System daje także możliwość (niedostępną w analizie manualnej) oceny parametrów kinematycznych plemników (Rycina 17), między innymi takich jak:

- ALH (ang. *amplitude of lateral head displacement*) – amplituda bocznych wychyleń główki (μm);
- BCF (ang. *beat-cross frequency*) – częstość przecinania ścieżki średniego śladu przez główkę plemnika (Hz);
- VCL (ang. *curvilinear velocity*) – szybkość przebycia przez plemnik całkowitej drogi krzywoliniowej w jednostce czasu ($\mu\text{m/s}$);
- VSL – (ang. *straight-line velocity*) – szybkość przebycia przez plemnik całkowitej drogi prostoliniowej w jednostce czasu ($\mu\text{m/s}$);
- VAP (ang. *average path velocity*) – średnia szybkość przebycia przez plemnik całkowitej drogi w jednostce czasu ($\mu\text{m/s}$);
- LIN (ang. *linearity*) – udział (%) szybkości przebycia przez plemnik całkowitej drogi prostoliniowej w stosunku do jego szybkości na całkowitej drodze krzywoliniowej (VSL/VCL);

- STR (ang. *straightness*) – udział (%) szybkości przebycia przez plemnik całkowitej drogi prostoliniowej w stosunku do jego średniej szybkości na całkowitej drodze (VSL/VAP);
- MAD (ang. *mean angular displacement*) – wartość bezwzględna średniego kąta wychylenia główki plemnika poruszającego się wzdłuż drogi krzywoliniowej wobec drogi prostoliniowej.



Rycina. 17. Standardowa ocena parametrów kinematycznych plemników w komputerowo wspomaganą analizę nasienia (CASA) (WHO, 2010).

Ocena morfologii plemników

Komputerowo wspomaganą ocenę morfologii plemników wykonywana jest w preparatach barwionych na szkiełkach podstawowych. Zastosowanie mają te same metody barwienia, które wykorzystywane są w metodzie manualnej.

Większość systemów CASA stosowanych w ocenie morfologii plemników analizuje przede wszystkim główkę i wstawkę plemnika, pozostawiając ocenę wtki diagnostycznej. Ocena oparta jest o precyzyjne pomiary długości i szerokości główki i wstawki, ich kształtu, kąta ich połączenia oraz wielkości akrosomu. Oceny wtki każdego plemnika powinien dokonać diagnosta i manualnie uzupełnić te dane dla każdego plemnika, tak żeby wyliczane wskaźniki (indeksy) np. teratozoospermii lub wielokrotnych uszkodzeń mogły być prawidłowo obliczone. W przeciwnym wypadku komputer przypisuje domyślnie wartość 0 dla wad dotyczących wtki plemników. Najnowsze wersje systemów są także w stanie wykrywać i uwzględniać w analizie obecność wakuoli w główce plemnika.

UWAGI:

- Komputerowo wspomaganą analizę morfologii przyczynia się do dużego obiektywizmu, precyzji i powtarzalności oceny, a także pozwala na uzyskanie dokładnych pomiarów morfometrycznych plemników.
- Na jakość tej analizy mogą negatywnie wpłynąć nieprawidłowości związane z barwieniem preparatu, ustawieniem ostrości i światła w mikroskopie oraz obecne w preparacie inne niż plemniki elementy morfotyczne nakładające się na główkę, czy wstawkę.

- Metoda ta jest dość pracochłonna i czasochłonna, ponieważ wymaga wykonania wielu zdjęć (zwykle na jednym zdjęciu można ocenić najwyżej kilka plemników). Zalecana przez producentów liczba ocenianych plemników wynosi 100, ale zgodnie z rekomendacjami WHO powinno się oceniać 400 plemników.
- Przy niskich koncentracjach plemników zaleca się odwirowanie nasienia (600g, 10 min) i wykonanie rozmazu z zagęszczonej próbki, co powinno być odnotowane na wyniku.

Współpraca z laboratoriami satelitarnymi

Niektóre systemy CASA umożliwiają także zdalną ocenę próbek, polegającą na nagrywaniu filmów i zdjęć preparatów z nasienia w jednej placówce (tzw. satelicie), a następnie ich przesyłanie przez internet do innej placówki wyposażonej w system CASA, która je analizuje i generuje wynik. Takie rozwiązanie jest stosowane, ponieważ wyposażenie placówki satelitarnej w część systemu CASA, przeznaczoną tylko do nagrywania filmów i zdjęć, jest zdecydowanie tańsze niż wyposażenie w cały system, mogący dokonać pełnej analizy i wygenerować wynik. Współpracujące w ten sposób placówki mogą być od siebie znacznie oddalone np. dane nadsyłane są z innych krajów.

UWAGI:

- Bardzo ważne jest, aby personel ośrodków satelitarnych miał gruntowne przeszkolenie z metod badania nasienia.
- Ważne jest także, aby materiał filmowy i zdjęcia przesyłane do ośrodka analizującego miały bardzo dobrą jakość, ponieważ w momencie ich analizy (po kilku godzinach lub dniach od oddania nasienia) nie jest już możliwy powrót do pierwotnego materiału.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik nr 1

Wartości referencyjne dla parametrów nasienia

BADANIE NASIENIA	
Parametr	Wartości referencyjne
czas upłynięcia ejakulatu	do 60 min
objętość ejakulatu (ml)	≥ 1.5
pH	≥ 7.2
całkowita liczba plemników (10^6 / ejakulat)	≥ 39
koncentracja plemników (10^6 / ml)	≥ 15
całkowity ruch plemników (%)	≥ 40
ruch postępowy plemników (%)	≥ 32
żywe plemniki (%)	≥ 58
Plemniki z prawidłową morfologią (%)	≥ 4
leukocyty peroksydazo-dodatnie (10^6 / ml)	< 1
komórki okrągłe (10^6 / ml)	< 5

Załącznik nr 2

Nazewnictwo zaburzeń parametrów nasienia

Aspermia	Brak nasienia (brak ejakulacji lub ejakulacja wsteczna)
Asthenozoospermia	Odsetek plemników z ruchem postępowym poniżej wartości referencyjnej
Asthenoteratozoospermia	Odsetek plemników z ruchem postępowym i prawidłowa morfologią poniżej wartości referencyjnej
Azoospermia	Brak plemników w ejakulacie
Kryptozoospermia	Brak plemników w preparatach bezpośrednich, ale stwierdzone po odwirowaniu ejakulatu
Hemospermia (hematospermia)	Obecność erytrocytów w ejakulacie
Leukospermia (leukocyto-spermia, pyospermia)	Obecność leukocytów w ejakulacie powyżej wartości granicznej
Nekrozoospermia	Niski odsetek żywych plemników oraz wysoki plemników nieruchomych w ejakulacie
Normozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie oraz odsetek plemników z ruchem postępowym i prawidłową morfologią powyżej dolnych wartości referencyjnych
Oligoasthenozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie oraz odsetek plemników z ruchem postępowym poniżej dolnych wartości referencyjnych
Oligoasthenoteratozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie oraz odsetek plemników z ruchem postępowym i prawidłową morfologią poniżej dolnych wartości referencyjnych
Oligoteratozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie oraz odsetek plemników z prawidłową morfologią poniżej dolnych wartości referencyjnych
Oligozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie poniżej dolnych wartości referencyjnych
Teratozoospermia	Odsetek plemników z prawidłową morfologią poniżej dolnych wartości referencyjnych

Załącznik nr 3

Wzór wyniku badania nasienia

Jednostka kierująca

miejsceowość, data

Dane Pacjenta:

Nazwisko i imię:

PESEL:

Lekarz kierujący:

WYNIK BADANIA NSIENIA NR.....

DANE OGÓLNE

Liczba dni od ostatniej ejakulacji	
Miejsce oddania ejakulatu (laboratorium, z zewnątrz)	
Data i czas oddania ejakulatu w laboratorium	
Czas dostarczenia ejakulatu z zewnątrz	

OCENA MAKROSKOPOWA

BADANE PARAMETRY	WYNIK	Wartość referencyjna*
Upłynnienie (min)		< 60 min
Objętość (ml)		≥ 1,5 ml
pH		≥ 7,2
Barwa		
Lepkość		

OCENA MIKROSKOPOWA

BADANE PARAMETRY	WYNIK	Wartość referencyjna*
Aglutynacja (skala I-IV)		I < 10 plemników / aglutynat, wiele wolnych plemników II 10-50 plemników / aglutynat, obecne wolne plemniki III > 50 plemników / aglutynat, pojedyncze wolne plemniki IV wszystkie plemniki w aglutynatach, aglutynaty połączone

Koncentracja plemników (mln/ml)		≥15 mln/ml
Całkowita liczba plemników w ejakulacie (mln/ejakulat)		≥39 mln/ejakulat

Ruch postępowy	%		≥32 %
	mln/ejakulat		≥12,5 mln/ejakulat
Ruch całkowity	(%)		≥40 %
	mln/ejakulat		≥15,6 mln/ejakulat
Brak ruchu	%		

Żywotność	%		≥58 %
	mln/ejakulat		≥22,6 mln/ejakulat

Plemniki o prawidłowej budowie	%		≥4%
	mln/ejakulat		≥1,6 mln/ejakulat

Koncentracja komórek okrągłych (mln/ml)		<5 mln/ml
Koncentracja leukocytów peroksydazo-dodatnich (mln/ml)		<1 mln/ml

Uwagi:

Podpis i pieczęć osoby wykonującej badanie

*Wartości referencyjne wg WHO 2010r.

1. Adamopoulos D, Mitios G, Nicopolou S. Defining male factor infertility. W: Clinical andrology. EAU/ESAU course guidelines. Bjorndahl L, Giwercman A, Tournaye H, Weidner W (red.). Informa Health, 2010; 293-300
2. Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal R, Short RA, Sabanegh E, Marmar JL. Efficacy of varicocele surgery in improving semen parameters: new meta-analytical approach. Urology 2007; 70(3):532-538
3. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. Hum Reprod 2010; 25:2415-2426
4. Aksglaede L, Link K, Giwercman A, Jorgensen N, Skakkebaek NE, Juul A. 47,XXY Klinefelter syndrome: clinical characteristics and age-specific recommendations for medical management. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2013; 163C(1):55-63
5. Andersson AM, Petersen JH, Jorgensen N, Jensen TK, Skakkebaek NE. Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as tools in the evaluation of infertile men: significance of adequate reference values from proven fertile men. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:2873-2879
6. Auger J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? Asian J Androl 2010; 12:36-46
7. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. Hum Reprod 2007; 22:1413-1419
8. Aziz N, Sharma RK, Mahfouz R, Jha R, Agarwal A. Association of sperm morphology and the sperm deformity index (SDI) with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage inhibition. Fertil Steril 2011; 30:2481-2484
9. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, Weidner W, Zini A. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. Eur Urol 2011; 60(4):796-808
10. Bablok L, Dziadecki W, Szymusik I, Wolczynski S, Kurzawa R, Pawelczyk L, Jedrzejczak P, Hanke W, Kaminski P, Wielgos M. Patterns of infertility in Poland k P, Hanke W,, Hanke W,e W,Endocrinol Lett 2011; 32(6):799-804
11. Baccetti B, Burrini AG, Capitani G, Collodel E, Moretti P, Piomboni P. Notulae seminologicae. 2. The 'the short tail' and 'stump' defect in human spermatozoa. Andrologia 1993; 25:331-335
12. Baccetti B, Burrini AG, Collodel G, Magnano AR, Piomboni P, Renieri T, Sensini C. Crater defect in human spermatozoa. Gamete Res 1989; 22:249-255
13. Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Di Cairano G, Gambera L, Moretti E. Genetic sperm defects and consanguinity. Hum Reprod 2001; 16:1365-1371
14. Baccetti B, Collodel G, Estenoz M, Manca D, Moretti E, Piomboni P. Gene deletion in an infertile man sperm fibrous sheath dysplasia. Hum Reprod 2005; 20:2790-2794
15. Barratt CL, Bjorndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. Hum Reprod 2011; 26(12):3207-3212
16. Baszczuk A. Organizacja, wprowadzenie i utrzymanie systemu jakości. Materiały do kursu specjalizacyjnego, Poznań, 2012
17. Behre HM, Nieschlag E, Partsch CJ, Wieacker P, Simoni M. Diseases of the hypothalamus and the pituitary gland. W: Andrology. Male reproductive health and dysfunction. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2010, 167-192
18. Bergier L, Bakalczuk S, Frzuk S, Frerlin, 2010, 167-192ka M, Taszarek-Hauke G, Walczak-Jędrzejowska R, Wojtasik J, Zagocka E. Badanie nasienia – metoda manualna. Standardy według wytycznych WHO z 2010 r. opracowane przez Komisję do Spraw Konsensusu Lekarsko-Diagnostycznego Polskiego Towarzystwa Andrologicznego (PTA) z udziałem przedstawicieli Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej (PTDL). Diagnostyka Lab 2010; 46(2):161-170
19. Bjorndahl L. Basic semen analysis and laboratory quality for clinicians. W: Clinical andrology. EAU/ESAU course guidelines. Bjorndahl L, Giwercman A, Tournaye H, Weidner W (red.). Informa Health, 2010, 28-38
20. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first pregnancy planners. Lancet. 1998; 352(9135):1172-1177
21. Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Study for Future Families Research Group. Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. J Androl 2004; 25(4):635-644
22. Brinkworth MH, Handelsman DJ. Environmental influences on male reproductive health. W: Andrology. Male reproductive health and dysfunction. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag, S (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2010, 373-397
23. Bruckert E. How frequent is unintentional childlessness in Germany? Andrology 1991; 23:2451; 23

24. Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, Brugo Olmedo S, Zanchetti F, Hermes R. Acep halic spermatozoa and abnormal development of the head–neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod* 1999; 14:1811-1818
25. Chemes HE, Rawe VY. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 2010; 341:349-357
26. Chemes HE. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. *J Androl* 2000; 21:799-808
27. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using BH, Hansen, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology* 2005; 63(4):992-1003
28. Cooper TG, Yeung CH, Fetic S, Sobhani A, Nieschlag E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Hum Reprod* 2004; 19:2283-2288
29. Cooper TG. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod* 2005; 20:9-11
30. Cooper TG. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl* 2011; 13:130-138
31. Cooper TG, Hellenkemper B, Jonckheere J, Callewaert N, Grootenhuis AJ, Kersemaekers WM, Leung A, Wang C. Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *J Androl* 2006; 27(4):483-490
32. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16(3):231-245
33. Cooper TG. Semen analysis. W: *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2010, 137-150
34. Corea M, Campagnone J, Sigman M. The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. *Fertil Steril* 2005; 83(4):920-922
35. Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJ, Kremer JA. Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update* 2007; 13(1):63-75
36. Dearing CG, Kilburn S, Lindsay KS. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Hum Fertil (Camb)* 2014; 17(1):37-44
37. Dembińska-Kieć A, Naskalski JW. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Poddiagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. class aElsevier Urban &Partner, Wrocław, 2009
38. Dohle GR. Clinical investigation of the infertile man. W: *Clinical andrology. EAU/ESAU course guidelines*. Bjorndahl L, Giwercman A, Tournaye H, Weidner W (red.). Informa Health, 2010, 293-300
39. EAU/ESAU course guidelines. Bjorndahl L, Giwercman A, Tournaye H, Weidner W (red.). Informa Health, 2010, 293-300
40. Esser S, Landeata-Hernandez A, Hernandez-Fonseca JP, Verlander J, Stunic G, Escalona F, Madrid-Bury N, Quintero-Moreno A, Bollwein H, Kaske M, Chenoweth PJ. Diadem/crater defect in spermatozoa of Brahman bull: seminal traits, microscopic findings and IVF fertility. Genetic Predisposition? *Mol Reprod Dev* 2010; 77:1000
41. Filipiak E, Marchlewska K, Oszukowska E, Walczak-Jedrzejowska R, Swierczynska-Cieplucha A, Kula K, Slowikowska-Hilczer J. Presence of aerobic micro-organisms and their influence on basic semen parameters in infertile men. *Andrologia* 2015; 47(7):826-831
42. Forti G, Corona G, Maggi M. Clinical investigation and laboratory analyses in male hypogonadism. EAU/ESAU course guidelines. Bjorndahl L, Giwercman A, Tournaye H, Weidner W (red.). Informa Health, 2010, 245-259
43. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod* 2003; 18(8):1643-1649
44. Gernand W. Podstawy kontroli jakości badań laboratoryjnych. CPNM, Lublin, 2000
45. Jaffe TM, Kim ED, Hoekstra TH, Lipshultz LI. Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *J Urol* 1998; 159(5):1548-1550
46. Jędrzejczak P, Talarczyk J, Taszarek-Hauke G, Berger A, Hauke J, Pawelczyk L. Zewnętrzna ocena jakości badania seminologicznego w Polsce. *Ginekol Pol* 2012; 83(11):835-840
47. Jędrzejczak P, Frączek M, Szumała-Kąkol A, Taszarek-Hauke G, Pawelczyk L, Kurpisz M. Consequences of semen inflammation and lipid peroxidation on fertilization capacity of spermatozoa in vitro conditions. *Int J Androl* 2005; 28(5):275-283
48. Jędrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Duleba AJ. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters *Int J Androl* 2008; 31(5):499-507
49. Johanisson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of tion of ion of n of of ion of oa comparative study. *Hum Reprod Update* 2000; 6(4):404-412
50. Jorgensen N, Liu F, Andersson AM, Vierula M, Irvine DS, Auger J, Brazil CK, Drobnis EZ, Jensen TK, Jouannet P, Overstreet JW, Redmon JB, Sparks A, Toppari J, Wang C, Skakkebaek NE, Swan SH. Serum inhibin-B in fertile men is strongly correlated with low but not high sperm counts: a coordinated study of 1,797 European and US men. *Fertil Steril* 2010; 94(6):2128-2134

51. Juul S, Karmaus W, Olsen J. Regional differences in waiting time to pregnancy: Pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. The European Infertility and Subfecundity Study Group. *Hum Reprod* 1999; 14:1250-1254
52. Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod* 1998;13(3):611-9
53. Krausz CG, Carrell DT. Advances in understanding the genetics underlying male infertility and evolving diagnostic and treatment options. *Andrology* 2014; 2(3):302-303
54. Kubo-Irie M, Matsumiya K, Iwamoto T, Keneko S, Ishijima S. Morphological abnormalities in the spermatozoa of fertile and infertile men. *Mol Reprod Dev* 2004; 70:70-81
55. Kula K, Słowikowska-Hilczner J. Choroby jąder. W: Interna Szczeklika, Gajewski P (red.), Medycyna Praktyczna, Kraków, 2013, 1303-1311
56. Le Lannou D, Griveau JF, Le Pichon JP, Quero JC. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Hum Reprod* 1992;7(10):1417-21
57. Lammers J, Splingart C, Barriarr P, Jean M, Fr, Je T. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(1):35-43
58. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod* 2000; 15(7):1562-1567
59. Lindsay KS, Floyd I, Swan R. Classification of azoospermic samples. *Lancet* 1995; 345(8965):1642
60. Marchlewska K, Filipiak E, Oszukowska E, Walczak-Jedrejowska R, Kula K, SR, Kula K, -Hilczner J. Comparison of the precision in determination of human sperm concentration between an improved Naubauer haematocytometer and Makler counting chamber. *Clin Exp Med Lett* 2010; 51(2):131-134
61. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012; 9(12):e1001356
62. Menkveld R, Holleboom CA, Rhemrev JP. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl* 2011; 13:59-68
63. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* 2001; 16:1165-1171
64. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl* 2010; 12:47-58
65. Moretti E, Geminiani M, Terzuoli G, Renieri T, Pascarelli N, Collodel G.: Two cases of sperm immotility: a mosaic of flagellar alterations related to dysplasia of the fibrous sheath and abnormalities of head-neck attachment. *Fertil Steril* 2011; 95:19-23
66. Mortimer D. Practical laboratory andrology. Oxford, Oxford University Press, 1994
67. Nieschlag E. Scope and goals of andrology. W: Andrology. Male reproductive health and dysfunction. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2010, 1-10
68. Noveski P, Madjunkova S, Maleva I, Sotiroska V, Petanovski Z, Plaseska-Karanfilska D. A homozygous deletion of the DPY19L2 gene is a cause of globozoospermia in men from the republic of Macedonia. *Balkan J Med Genet* 2013; 16:73-76
69. Oakley L, Doyle P, Maconochie N. Lifetime prevalence of infertility and infertility treatment in the UK: results from a population-based survey of reproduction. *Hum Reprod* 2008; 23(2):447-450
70. Palacios ER, Clavero A, Gonzalvo MC, Rosales A, Mozas J, Martinez L, Ramirez JP, Bjorndahl L, Morancho-Zaragoza J, Fernandez-Pardo E, Castilla JA. Acceptable variability in external quality assessment programmes for basic semen analysis. *Hum Reprod*; 2012; 27(2):314-322
71. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 140(1):3-11
72. Perdrix A, Travers A, Clatot F, Sibert L, Mitchell V, Jumeau F, Macé B, Rives N. Modification of chromosomal architecture in human spermatozoa with large vacuoles. *Andrology* 2013; 1:57-66
73. Piasecka M, Gill K, Gączarzewicz D, Kazienko A, Rosiak A, Udała J, Frączek M, Kurpisz M, Laszczyńska M. Znaczenie morfologicznej oceny plemników w diagnostyce seminologicznej. W: Układ pdW: Ukacuoles. seminokliniczne i doświadczalne. Małgorzata Piasecka (red). Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, Szczecin, 2013, 97-123
74. Pierik FH, Van Ginneken AM, Dohle GR, Vreeburg JT, Weber RF. The advantages of standardized evaluation of male infertility. *Int J Androl* 2000; 23(6):340-346
75. Porcu G, Mercier G, Boyer P, Achard V, Banet J, Vasserot M, Melone C, Saias-Magnan J, D'Ercole C, Chau C, Guichaoua MR. Pregnancies after ICSI using sperm with abnormal head-tail junctions from two brothers: case report. *Hum Reprod* 2003; 18(3):562-567
76. Rawe VY, Galaverna GD, Acosta AA, Olmedo SB, Chemes HE. Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; 16:879-886

77. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych
78. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Sikka SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril* 2005a; 83:95-103
79. Said TM, Aziz N, Sharma RK, Lewis-Jones I, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian J Androl* 2005b; 7:121-126
80. Sanocka D, Kurpisz M. Infertility in Poland-present status, reasons and prognosis as a reflection of Central and Eastern Europe problems with reproduction. *Med Sci Monit* 2003; 9(3):SR16-20
81. Shibahara H, Obara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Ohno A, Takamizawa S, Suzuki M. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *Int J Androl*; 2004; 27:63-68
82. Simoni M, Nieschlag E. Endocrine laboratory diagnosis. W: *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2010, 109-118
83. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 16:972-978
84. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Joregensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen AN, Keiding N, Skakkebaek NE, Spira A, Jouannet P. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002; 17(2):503-515
85. Słowikowska-Hilczer J. Xenobiotics with estrogen or antiandrogen action – disruptors of the male reproductive system. *CEJM* 2006; 3:205-227
86. te Velde ER, Eijkemans R, Habbema HD. Variation in couple fecundity and time to pregnancy, an essential concept in human reproduction. *Lancet* 2000; 355(9219):1928-1929
87. Templeton AA. The epidemiology of infertility. W: Templeton AA, Drife JO (red.) *Infertility*. Springer, London, 1992
88. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 1993; 60(6):1069-1075
89. Turner RMO, Musse MP, Mandal A, Klotz K, Jayes FCL, Herr JC, Gerton GL, Moss SB, Chemes HE. . Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl* 2001; 22:302-315
90. Tuttelmann F, Nieschlag E. Classification of andrological disorders. W: *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2010, 100-105
91. Van Ahlen H, Kleisch S. Disorders of erection, cohabitation, and ejaculation. W: *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2010, 279-321
92. Walczak-Jedrzejowska R, Marchlewska K, Oszukowska E, Filipiak E, Bergier L, Słowikowska-Hilczer J. Semen analysis standardization: is there any problem in Polish laboratories? *Asian J Androl* 2013b; 15(5):616-621
93. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Słowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central Eur J Urol* 2013a; 1 (64):60-67
94. Weidner W, Diemer T, Wagenlehner FME. Male infertility in chronic urogenital infections and inflammation with special reference to ejaculate findings. W: *Clinical andrology. EAU/ESAU course guidelines*. Bjorndahl L, Giwercman A, Tournaye H, Weidner W (red.). Informa Health, 2010, 293-300
95. WHO. Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. WHO: Geneva. Programme on Maternal and Child Health and Family Planning, Division of Family Health, 1991
96. WHO. Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge: Cambridge University Press, 2000
97. WHO. Manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press, 2004
98. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1995; 63(6):1143-1157
99. World Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril* 1996; 65(4):821-829
100. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. World Health Organization Press, Geneva, 2010
101. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1999
102. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl* 2000; 21(1):145-153



ISBN: 978-83-944226-2-2