

## Rekomendacje • Recommendations

# 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)

## Semen analysis - the manual method. Standards according to WHO guidelines from 2010, prepared by the Commission for the Medical-Diagnostic Consensus of the Polish Society of Andrology (PTA) with representatives of the Polish Society of Laboratory Diagnostics (PTDL)

### *Przewodniczący:*

dr med. Leszek Bergier,

DIAGNOSTYKA Spółka z o. o., Spółka komandytowa, Kraków (PTA, PTDL) \*

### *Członkowie:*

dr med. Szymon Bakalczuk,

OVUM Rozrodczość i Andrologia, Lublin (PTA)

dr med. Stanisław Frącki,

I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny, Warszawa (PTA)

dr n. med. Katarzyna Marchlewska,

Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny, Łódź (PTA)

dr hab. n. med. Małgorzata Piasecka,

Samodzielna Pracownia Histologii i Biologii Rozwoju. Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin (PTA)

dr n. med. Grażyna Taszarek-Hauke,

Pracownia Andrologii, Szpital Kliniczny, Uniwersytet Medyczny, Poznań (PTDL)

dr n. med. Renata Walczak-Jędrzejowska,

Zakład Andrologii, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny, Łódź (PTA)

mgr Jadwiga Wojtasik,

DIAGNOSTYKA Spółka z o. o., Spółka komandytowa, Kraków (PTDL)

mgr Ewa Zagocka,

Dział Diagnostyki Laboratoryjnej, Państwowy Szpital Kliniczny nr 1, Wrocław (PTA, PTDL)

### Przygotowanie Pacjenta do badania

1. Każdy Pacjent powinien otrzymać ustną lub pisemną instrukcję odnośnie warunków oddania próbki nasienia do badania.

### **UWAGA!**

Wszelkie informacje związane z badaniem nasienia powinny być przekazywane Pacjentowi w sposób poufny!

- Zaleca się wykonanie badania nasienia po zachowaniu okresu wstrzemięźliwości płciowej (czas od ostatniego wytrysku nasienia) od 2 do 7 dni. Informacja o okresie abstynencji powinna znaleźć się na wyniku.
- W przypadkach kolejnego badania nasienia, Pacjent powinien zachować ten sam okres wstrzemięźliwości płciowej, jaki zachowany był przy pierwszym badaniu.
- Zalecane jest oddanie nasienia w pomieszczeniu w pobliżu laboratorium, w warunkach zapewniających intymność.
- Pojemniki, do których oddawane jest nasienie powinny być wydane przez laboratorium (zalecane pojemniki jednorazowe o objętości 60-130 ml).
- Nasienie należy oddać drogą masturbacji.
- Pojemnik z nasieniem należy opisać (imię i nazwisko lub kod Pacjenta).
- Nasienie powinno być oddane do pojemnika w całości, przy zachowaniu podstawowych zasad higieny. Jeśli nasienie nie zostało oddane w całości, Pacjent zobowiązany jest poinformować o tym personel medyczny.
- W przypadku problemów z oddaniem nasienia w laboratorium, dopuszczalne jest oddanie nasienia w warunkach domowych podczas stosunku płciowego do specjalnej prezerwatywy bez środków plemnikobójczych i dostarczenie materiału do badania w czasie nie przekraczającym 60 min. od oddania ejakulatu. Próbkę nasienia należy zabezpieczyć przed wychłodzeniem (transport w temp. 20-37°C).

#### I Procedura badania nasienia

Etapy wykonywania badania nasienia:

- W ciągu pierwszych 5 minut od ejakulacji
  - ✓ pojemnik z próbką nasienia odstawić 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)
  - ✓ wpisanie do protokołu badania czasu upłynnienia (jeśli próbka nie upłynie się w przeciągu 30 min., odczekać z rozpoczęciem dalszych analiz kolejne 30 min.)
  - ✓ ocena wyglądu
  - ✓ ocena lepkości
  - ✓ ocena objętości
  - ✓ ocena pH
  - ✓ przygotowanie preparatu bezpośredniego do oceny mikroskopowej próbki nasienia
  - ✓ ocena ruchliwości plemników
  - ✓ przygotowanie rozcieńczeń do oceny liczby plemników
  - ✓ ocena żywotności
  - ✓ przygotowanie rozmazów do oceny morfologii plemników
  - ✓ ocena liczby plemników w komorze
  - ✓ ocena komórek peroksydazo-pozytywnych
  - ✓ wykonanie testu MAR (Mixed Antiglobulin Reaction) **(jeśli wymagane przez lekarza)**
  - ✓ przygotowanie plemników do testu immunobead **(jeśli wymagane przez lekarza)**

- ✓ odwirowanie nasienia (oznaczenie parametrów biochemicznych w plazmie nasienia **jeśli jest wymagane przez lekarza**, lub w przypadku azoospermii)
- Po upływie 1 godziny od ejakulacji
    - ✓ utwalenie, wybarwienie rozmazów nasienia i ocena morfologii plemników
  - Przed upływem 3 godzin od ejakulacji
    - ✓ przesłanie próbki do badania mikrobiologicznego **(jeśli wymagane przez lekarza)**
  - Później, ale tego samego dnia (lub następnego dnia po uprzednim zamrożeniu próbki) wykonanie badań związanych z czynnością gruczołów dodatkowych **(jeśli wymagane przez lekarza)**
    - ✓ wykonanie pośredniego testu immunobead **(jeśli wymagane przez lekarza)**

#### Ocena makroskopowa nasienia

Ocena makroskopowa nasienia powinna zostać przeprowadzona zaraz po upłynnieniu się nasienia, najlepiej w czasie do 30 min. (oprócz oceny pH), jednak nie później niż w ciągu 60 min. od ejakulacji.

#### Czas upłynnienia

Upłynnienie nasienia następuje samoistnie w ciągu 60 min. od ejakulacji (zwykle - 15 min.). W trakcie upłynnienia zaleca się umieszczenie pojemnika z próbką na mieszadło rotacyjnym (temp. pokojowa 20-25°C lub cieplarnia 37°C). Upłynnienie ocenia się makroskopowo, w sytuacjach wątpliwych potwierdza się mikroskopowo. Czas upłynnienia podajemy w minutach. Jeśli upłynnienie nie nastąpi w ciągu 60 min., to na wyniku podajemy informację – upłynnienie >60 min. Czasami nasienie nie ulega upłynnieniu, powodując trudności w wykonaniu badania. Aby przeprowadzić dalsze badanie, należy poddać próbkę dodatkowej obróbce poprzez kilkukrotne zaaspirowanie (6-10 razy) ejakulatu do strzykawki z igłą o wewnętrznej średnicy od 0,69 do 0,84 mm, lub dodanie określonej objętości roztworu Dulbecco lub bromeliny (1g/l) i wymieszanie przy użyciu pipety Pasteura.

**UWAGA!** W tym przypadku przy dalszych obliczeniach należy uwzględnić rozcieńczenia nasienia. Zastosowanie ww. procedur musi zostać odnotowane na wyniku.

#### Objętość nasienia

Objętość wyrażana jest w ml - zalecana jest wagowa metoda pomiaru objętości.

W celu określenia objętości tą metodą należy:

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

Dokładność ważenia do 0,1 grama.

Przyjmując, że gęstość nasienia wynosi 1 g /ml (dokładnie 1.014 g/ml) to [g] = [ml].

Wyliczona waga nasienia w [g] odpowiada objętości ejakulatu wyrażonej w [ml].

Druga metoda polega na pomiarze objętości w wyskalowa-

nym cylindrze z dokładnością do 0,1 ml.

Barwa nasienia

Terminologia używana do określania barwy:

– prawidłowa: *szaro-opalizująca, mleczno–szara, nieprzezroczysta*

– nieprawidłowa: *przezroczysta, żółtawa* (żółtaczką, przyjmowane leki), *czerwono-brunatna* (domieszka krwi)

Lepkość nasienia

Lepkość nasienia określa się na podstawie długości kropli wypływającej z pipety o szerokim ujściu (jednorazowa pipeta Pasteura). W przypadku nieprawidłowej lepkości nasienie nie wypływa kroplami, ale tworzy nici o długości powyżej 2 cm.

Druga metoda: zanurzoną w nasieniu szklaną pałeczką podciągamy nasienie do góry. W przypadku nieprawidłowej lepkości tworzy się nitka długości powyżej 2 cm.

W celu zmniejszenia podwyższonej lepkości stosuje się takie same metody jak przy opóźnionym upłynnieniu lub braku upłynnienia (mechaniczne, enzymatyczne).

Terminologia używana do określania lepkości:

– prawidłowa

– zwiększona

pH nasienia

Należy je oznaczać po upłynnieniu nasienia, zawsze w jednakowym czasie, najlepiej po 30 min., lecz nie później niż 60 min. od ejakulacji przy użyciu papierków wskaźnikowych o zakresie pH 6,0 do 10,0.

### **Badanie mikroskopowe**

Zaleca się używanie mikroskopu z kontrastem fazowym i zestawem obiektywów o powiększeniu 10x, 20x, 40x, 100x. Dopuszczalne jest badanie z zastosowaniem zwykłego mikroskopu świetlnego.

Badanie mikroskopowe rozpoczynamy 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. próbka powinna być poddana dodatkowej obróbce (mechanicznej lub enzymatycznej). Fakt ten należy odnotować na wyniku.

Przygotowanie preparatu bezpośredniego:

Przed każdorazowym pobraniem próbki do oceny mikroskopowej nasienie należy bardzo starannie, ale delikatnie wymieszać, unikając tworzenia się pęcherzyków powietrza. Do mieszania polecana jest jednorazowa pipeta Pasteura o szerokim ujściu (1,5 mm), którą należy delikatnie zaaspirować próbkę około 10 razy. Nie wolno stosować wytrząsarki, ponieważ powoduje uszkodzenie plemników. Następnie, przy użyciu pipety automatycznej należy nanieść 10  $\mu$ l nasienia na szkiełko podstawowe, przykryć szkiełkiem nakrywkowym o wymiarach 22 x 22 mm unikając tworzenia się pęcherzyków powietrza. Tak przygotowany preparat pozostawić na ok. 1 minutę w temp. 20-25°C lub 37°C, a następnie poddać

ocenie mikroskopowej.

Temperaturą z wyboru do oceny nasienia jest temp. 37°C, jednak ocenę ruchu można przeprowadzać również w temp. pokojowej tj. 20-25°C.

Wstępna ocena mikroskopowa preparatu bezpośredniego

I. powiększenie całkowite 100x (okular 10x i obiektyw 10x)

1. występowanie pasm śluzu

2. ocena nieprawidłowości w zachowaniu się plemników (agregacja, aglutynacja)

3. obecność innych elementów morfotycznych

II. powiększenie całkowite 200x / 400x

1. ocena ruchliwości plemników

2. ustalenie rozcieńczenia próbki nasienia do oceny koncentracji plemników (liczba plemników wyrażona w mln/ml nasienia)

Ocena preparatu bezpośredniego

Ocena nieprawidłowości w zachowaniu się plemników

Niespecyficzną agregację – obserwujemy, gdy zarówno nieruchome jak i ruchome plemniki przylegają do siebie oraz do pasm śluzu, innych komórek lub do ciałek resztkowych tworząc skupiska.

Aglutynację – obserwujemy gdy ruchome plemniki przylegają do siebie tworząc skupiska – zjawisko dotyczy tylko plemników.

Aglutynacja określa się w stopniach od 1 do 4:

- stopień 1 - <10 plemników tworzących skupiska, wiele plemników wolnych
- stopień 2 – od 10 do 50 plemników tworzących skupiska, obecne wolne plemniki
- stopień 3 - >50 plemników w skupiskach, obecne pojedyncze wolne plemniki
- stopień 4 – wszystkie plemniki tworzą skupiska, poszczególne skupiska łączą się ze sobą

Obecność innych elementów morfotycznych

W preparacie bezpośrednim wymienione poniżej elementy morfotyczne oceniane są wg oceny szacunkowej:

- a) ciała resztkowe
- b) bakterie
- c) nabłonki
- d) kryształki sperminy

Używana terminologia:

- pojedyncze, nieliczne, dość liczne, liczne, bardzo liczne w polu widzenia lub w preparacie

Komórki okrągłe w nasieniu

W nasieniu mogą znajdować się leukocyty oraz komórki spermatogenezy określane wspólnie jako „komórki okrągłe”. Koncentrację komórek okrągłych (liczba komórek wyrażona w mln/ml ejakulatu) liczymy metodą komorową podczas określania koncentracji plemników. Inna zalecana technika polega na wykonaniu rozmazu na szkiełku podstawowym i

zabarwieniu go metodą Papanicolau, zestawem Diff-Quick lub May-Grunwald-Giemzy (MGG).

**UWAGA!** Preparat wybarwiony metodą MGG nie może być wykorzystywany do oceny morfologii plemników.

Elementy komórkowe oceniamy pod immersją (powiększenie 1000x) w mikroskopie. Do obliczenia wartości bezwzględnych stosuje się odpowiedni wzór:

$$C = (n \times S) / 100$$

**C** - koncentracja komórek spermatogenezy i leukocytów – w mln/ml ejakulatu

**n** - liczba policzonych komórek spermatogenezy i leukocytów przypadających na 100 plemników

**S** - koncentracja plemników wyrażona w mln/ml ejakulatu.

Jeśli koncentracja komórek okrągłych będzie  $\geq 1$  mln/ml zaleca się wykonanie dodatkowych procedur w celu określenia koncentracji leukocytów peroksydazo-dodatnich

#### Ocena ruchliwości plemników

Ruch plemników klasyfikuje się według następującej skali (klasyfikacja WHO 2010):

- ruch postępowy – plemniki poruszające się ruchem postępowym zarówno liniowym, jak i po dużym okręgu bez względu na ich szybkość
- ruch niepostępowy- plemniki poruszające się ruchem niepostępowym (w miejscu i po małym okręgu)
- plemniki nieruchome

Oceny dokonuje się w dwóch preparatach bezpośrednich wykonanych z tego samego ejakulatu. W danym polu widzenia 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. Przy ocenie ruchu należy pamiętać, aby w ostatnim polu widzenia ocenić ruch wszystkich plemników, nawet jeśli wcześniej przekroczona została liczba 200 ocenionych plemników. 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 w dwóch preparatach po zweryfikowaniu róż-

nicy z poszczególnych zliczeń. W celu zweryfikowania dopuszczalnej różnicy pomiędzy wynikami uzyskanymi z obu preparatów należy porównać wynik reprezentujący najliczniejszą kategorię ruchu (Tab. 5).

**Przykład:** W wyniku dwukrotnego zliczenia 200 plemników 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 średni wynik to 50% a różnica pomiędzy nimi wynosi 30%. Z tabeli 5 wynika, że dla wartości 50% dopuszczalna różnica pomiędzy wynikami wynosi 10%. W takiej sytuacji analizę należy powtórzyć, przygotowując nowe preparaty.

W przypadkach niezgodności co do różnicy wynikającej z tabeli 5 liczenie musi być wykonane w całości od początku – od wykonania preparatu bezpośredniego.

Ustalenie rozcieńczenia do oceny koncentracji plemników W celu ustalenia odpowiedniego rozcieńczenia próbki nasienia do oceny koncentracji plemników (liczba plemników wyrażona w mln/ml nasienia) wykonuje się ocenę liczby plemników w polu widzenia pod całkowitym powiększeniem 200x lub 400x (Tab. 1).

Do wykonania rozcieńczeń zalecane jest używanie automatycznych pipet tłokowych (ang. positive-displacement pipette) oraz aspirowanie objętości nasienia nie mniejszej niż 50  $\mu$ l. Należy pamiętać o dokładnym i delikatnym wymieszaniu próbki tuż przed wykonaniem rozcieńczeń. Wykonujemy dwa takie same rozcieńczenia.

Jako rozcieńczalnika używa się roztworu hipertonicznego. Zalecany rozcieńczalnik:

50 g  $\text{NaHCO}_3$   
10 ml 35% Formalina (v/v)

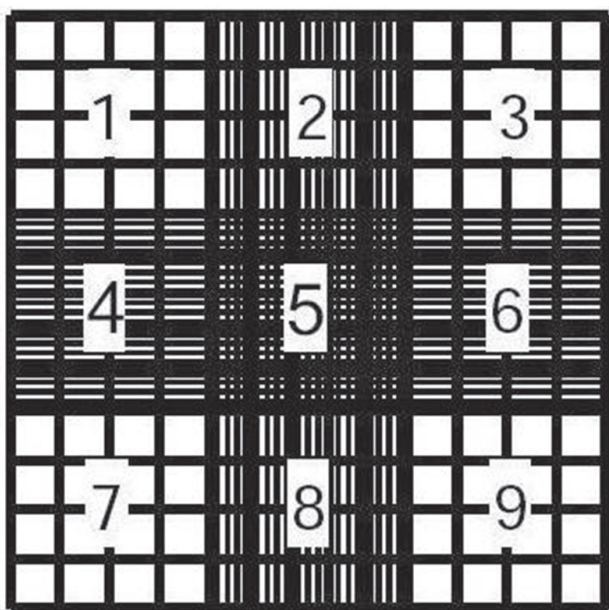
Dobrze wymieszać i uzupełnić wodą destylowaną do 1000 ml (Trwałość roztworu w temp. 4 °C - 12 miesięcy)

#### Ocena koncentracji plemników

Terminy „całkowita liczba plemników” oraz „koncentracja plemników” nie są synonimami. Termin „koncentracja plemników” odnosi się do liczby plemników w jednostce objętości nasienia (1 ml), podczas gdy „całkowita liczba plemników” odnosi się do liczby plemników w całej objętości eja-

**Tabela 1.**  
**Zalecane rozcieńczenia**

Liczba plemników w polu widzenia (pow. 400x)	Liczba plemników w polu widzenia (pow. 200x)	Rozcieńczenie	Objętość nasienia w $\mu$ l	Objętość rozcieńczalnika w $\mu$ l
< 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



**Rycina 1.**  
Jedna z dwóch komór zliczeniowych w udoskonalonej komorze Neubauera z zaznaczonymi 9 siatkami.

kulatu i wylicza się ją mnożąc koncentrację plemników przez objętości ejakulatu.

Do liczenia plemników zalecane jest używanie kamer o głębokości 100  $\mu\text{m}$  lub głębszych. Zaleca się przeprowadzanie procedury oceny koncentracji plemników w udoskonalonej

komorze Neubauera (ang. improved Neubauer haemocytometer) (Ryc. 1).

Udoskonalona komora Neubauera posiada dwie oddzielne komory zliczeniowe (o rozmiarach 3x3 mm). Każda z komór podzielona jest na 9 siatek o rozmiarach 1x1 mm. Siatki nr 1,3,7,9 zawierają 4 rzędy po 4 duże kwadraty. Siatki nr 2 i 8 zawierają 4 rzędy po 5 dużych kwadratów. Siatki nr 4 i 6 zawierają 5 rzędów po 4 duże kwadraty. Środkowa siatka nr 5 zawiera 5 rzędów po 5 dużych kwadratów.

Komorę przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym o określonej grubości (0.44 mm).

Przy głębokości 100  $\mu\text{m}$ , nad każdą z 9 siatek znajduje się 100 nl rozcieńczonej próbki nasienia. Objętość próbki nasienia znajdująca się nad jednym kwadratem oraz jednym rzędem w poszczególnych siatkach komory przedstawiona jest w tabeli 2.

Jedno z dwóch przygotowanych wcześniej rozcieńczeń wprowadza się nad jedną z komór, drugie nad drugą, po uprzednim dokładnym wymieszaniu. Liczenie przeprowadza się w obu komorach (zachowując regułę 2 boków Bürkera). Zaleca się zliczenie co najmniej 400 plemników z dwóch zliczeń (dwóch komór zliczeniowych w komorze), każde po około 200 plemników. Zliczamy tylko kompletne plemniki (z główką i wítką).

Tabela 3 przedstawia numery odpowiednich siatek w jednej komorze udoskonalonej komory Neubauera potrzebne do zliczenia co najmniej 200 plemników, w zależności od ilości

**Tabela 2.**  
Objętość rozcieńczonej próbki nasienia nad jednym kwadratem oraz jednym rzędem w poszczególnych siatkach w udoskonalonej komorze Neubauera.

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

**Tabela 3.**  
Numery siatek do zliczenia co najmniej 200 plemników.

Liczba plemników w polu widzenia (pow. 400x)	Liczba plemników w polu widzenia (pow. 200x)	Rozcieńczenie	Numery siatek w komorze do zliczania plemników
< 2	< 8	1:2 (1 + 1)	wszystkie 9 siatek
2-15	8-60	1:2 (1 + 1)	siatki nr 5,4,6
16-100	64-400	1:5 (1 + 4)	siatki nr 5,4,6
> 101	> 404	1:20 (1 + 19)	siatki nr 5,4,6



plemników obserwowanych w polu widzenia w preparacie bezpośrednim i wykonanego rozcieńczenia.

Liczenie rozpoczyna się zawsze od zliczania plemników w poszczególnych rzędach w siatce nr 5. Jeśli nie zliczymy 200 plemników po obejrzeniu wszystkich 5 rzędów siatki nr 5, kontynuujemy zliczanie w poszczególnych rzędach (każde po 4 kwadraty) w przyległych siatkach (siatki nr 4 i 6), aż do zliczenia co najmniej 200 plemników. Jeśli osiągnięto liczbę 200 plemników w połowie rzędu, należy kontynuować zliczanie plemników do końca danego rzędu.

Zliczenie plemników w drugiej komorze wykonujemy tylko w tych samych rzędach poszczególnych siatek, nawet jeśli nie zliczymy 200 plemników.

Jeśli nie zliczy się 200 plemników w siatkach nr 4,5 : 6 to należy przygotować dwa niższe rozcieńczenia i przeprowadzić analizę powtórnie.

Po zweryfikowaniu różnicy (Tab. 4 ) z poszczególnych zliczeń, dokonujemy obliczenia wyniku wg wzorów lub powtarzamy cały cykl liczenia od początku:

1. rozcieńczenie 1+1 (1:2) i zliczanie plemników w rzędach siatek nr 4,5,6

$$C=(N/n) \times (1/20) \times 2 = (N/n) \times (1/10)$$

2. rozcieńczenie 1+4 (1:5) i zliczanie plemników w rzędach siatek nr 4,5,6

$$C=(N/n) \times (1/20) \times 5 = (N/n) \times (1/4)$$

3. rozcieńczenie 1+19 (1:20) i zliczanie plemników w rzędach siatek nr 4,5,6

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

4. rozcieńczenie 1+49 (1:50) i zliczanie plemników w rzędach siatek nr 4,5,6

$$C=(N/n) \times (1/20) \times 50 = (N/n) \times 2.5$$

N= suma zliczonych plemników z obu komór

n= suma rzędów z siatek nr 5,4,6, w których zliczano plemniki w obu komorach

Wynik otrzymujemy w mln/ml.

Postępowanie przy małej ilości plemników w preparacie bezpośrednim

Jeśli w preparacie bezpośrednim, pod powiększeniem 400x w polu widzenia było mniej niż 4 plemniki to szacunkowo zakłada się, że koncentracja plemników wynosi <1 mln/ml nasienia. Jeśli obserwowano mniej niż 2 plemniki w polu widzenia w preparacie, to szacunkowo zakłada się, że koncentracja plemników wynosi < 0,5 mln/ml nasienia.

W sytuacji, gdy badanie jest wykonywane jako badanie standardowe i nie ma potrzeby dokładnego obliczania koncentracji plemników z użyciem komory, dopuszcza się umieszczenie w wyniku badania szacunkowo zakładanej koncentracji plemników.

W sytuacjach, gdy określenie dokładnej koncentracji plemników jest wymagane, przygotowuje się dwa rozcieńczenia próbki 1:2 (1+1) i dokonuje się zliczania plemników w poszczególnych siatkach komór udoskonalonej komory Neubauera, zaczynając od siatki nr 1, aż do zliczenia co najmniej 200 plemników. Jeśli osiągnięto liczbę 200 plemników

w połowie siatki, należy kontynuować zliczanie plemników do końca danej siatki.

Zliczanie powtarza się z drugiego rozcieńczenia, w drugiej komorze zliczając plemniki z tych samych siatek, z jakich były zliczane wcześniej, nawet jeśli nie osiągnięta została liczba 200 plemników.

Po zweryfikowaniu różnicy z poszczególnych zliczeń (Tab. 4), dokonujemy obliczenia wyniku wg wzoru:

$$C=(N/n) \times (1/100) \times 2 = (N/n) \times (1/50)$$

N= suma zliczonych plemników z obu komór

**Tabela 4.**  
**Akceptowalna różnica w wynikach uzyskanych z poszczególnych dwóch zliczeń dla ich sumy.**

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

**Tabela 5.**  
**Akceptowalna różnica w odsetkach uzyskanych z poszczególnych dwóch zliczeń dla 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

n= suma siatek, w których zliczano plemniki w obu komorach  
Wynik otrzymujemy w mln/ml.

Jeśli w preparacie bezpośrednim nie znaleziono plemników, należy próbkę odwirować (15 min. 3000xg). Osad rozprowadzamy na szkiełku podstawowym, przykrywamy szkiełkiem nakrywkowym i oglądamy cały preparat w poszukiwaniu plemników. Jeśli nie znaleziono żadnego plemnika, w wyniku wpisujemy azoospermia (brak plemników w ejakulacie). Jeśli w osadzie znaleziono pojedyncze plemniki, w wyniku wpisujemy kryptozoospermia.

#### Ocena żywotności plemników

Badanie odsetka żywych plemników ocenia się poprzez identyfikację plemników z nienaruszoną integralnością błony komórkowej. Ocenę można wykonywać rutynowo we wszystkich próbkach nasienia, jednak wymagane jest jej wykonanie w próbkach, gdzie ruch postępowy plemników był poniżej wartości referencyjnych (tzn. < 40% plemników poruszających się ruchem postępowym).

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.

Zalecane testy oceny żywotności plemników:

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

Test eozyna-nigrozyna oraz przyżyciowy test eozynowy opierają się na zasadzie przepuszczalności błony komórkowej martwego plemnika dla barwnika. Nigrozyna jest uży-

**Tabela 6.**  
**Wartości referencyjne dla parametrów nasienia wg WHO 2010.**

Badanie nasienia	
Parametr	Dolne wartości referencyjne
objętość ejakulatu (ml)	1.5
całkowita liczba plemników ( $10^6$ / ejakulat)	39
koncentracja plemników ( $10^6$ / ml)	15
całkowity ruch plemników (%)	40
ruch postępowy plemników (%)	32
żywe plemniki (%)	58
prawidłowa morfologia plemników (%)	4
Pozostałe, uzgodnione wartości progowe	
czas upłynięcia ejakulatu	do 60 min.
pH	$\geq 7.2$
leukocyty peroksydazo-dodatnie ( $10^6$ / ml)	< 1
komórki okrągłe ( $10^6$ / ml)	< 5
Dodatkowe testy	
MAR-test (% ruchomych plemników związanych z kuleczkami)	< 50
Immunobead test (% ruchomych plemników związanych z kuleczkami)	< 50
Testy biochemiczne plazmy nasienia	
cynk ( $\mu\text{mol}$ /ejakulat)	$\geq 2.4$
fruktoza ( $\mu\text{mol}$ /ejakulat)	$\geq 20$
$\alpha$ -glukozydaza obojętna (mU/ejakulat)	$\geq 13$

wana do podbarwiania tła co ułatwia różnicowanie. Plemniki żywe nie absorbują eozyny i pozostają niezabarwione, plemniki martwe natomiast barwią się na czerwono, lub ciemno-różwo. Liczymy po 200 plemników, w dwóch powtórzeniach, różnicując je na żywe i martwe. Wynik podaje się jako średnią z dwu wyników uzyskanych z oceny w dwóch preparatach po zweryfikowaniu różnicy z poszczególnych zliczeń (Tab. 5).

Odsetek plemników nie zabarwionych (żywych) nie powinien być mniejszy niż odsetek plemników ruchomych.

Test HOS (*Hypo-osmotic swelling test*) tzw. test pęcznienia jest metodą alternatywną do przedstawionych metod barwnych. Plemniki z nienaruszoną błoną komórkową (żywe) zawieszono w hipoosmotycznym medium „pęczniają” po 5 min. (zmiana wyglądu witki). Test ten powinien być wykonywany w laboratoriach specjalistycznych.

#### Ocena morfologii plemników

Morfologię plemników oceniamy w mikroskopie świetlnym pod imersją, przy powiększeniu 1000x, po uprzednim zabarwieniu rozmazu wykonanego z upłynionego i dobrze wymieszanego nasienia. Zalecane barwienie metodą Papanicolaou (hematoksylina Harrisa, oranż G6, EA 50), Shorr'a lub z wykorzystaniem zestawu barwiącego Diff-Quick. Liczymy po 200 plemników, w dwóch powtórzeniach, z dwóch różnych preparatów wykonanych z tej samej próbki, różnicując je na prawidłowe i nieprawidłowe. Wynik podaje się jako średnią z wyników uzyskanych z oceny morfologii plemników w dwóch rozmazach po zweryfikowaniu różnicy

z poszczególnych zliczeń (Tab. 5).

W badaniu ocenia się budowę główki, części pośredniej (szyjka i wstawka) i witki (część główna oraz końcowa). Zalecana jest klasyfikacja według Krugera (Krugger Strict Criteria).

Główka plemnika powinna być regularna w zarysie, o kształcie owalnym z dobrze widocznym regionem akrosomalnym zajmującym od 40 do 70% powierzchni główki. Region akrosomalny może zawierać nie więcej niż dwie wakuole, zajmujące do 20% powierzchni główki. Region poniżej akrosomu nie może zawierać żadnej wakuoli.

Wstawka powinna być regularna w zarysie, o długości odpowiadającej długości główki. Oś wstawki powinna być przedłużeniem osi głównej główki. Przywieszka cytoplazmatyczna, jeśli obecna, nie powinna przekraczać 1/3 wielkości główki.

Witka powinna mieć ok. 45  $\mu\text{m}$  długości (tj. 10 długości główki), powinna być cieńsza niż wstawka, o jednakowej grubości na całej długości (część końcowa witki jest zwężona). Dopuszczalne są łagodne zgięcia witki, nie wskazujące na jej złamanie (zgięcia pod ostrym kątem).

Plemnik uznajemy za nieprawidłowy, gdy występuje zaburzenie któregośkolwiek elementu budowy plemnika.

Wartości referencyjne dla parametrów nasienia wg WHO 2010 zostały przedstawione w tabeli 6, a międzynarodowe nazewnictwo klasyfikacji zaburzeń przy badaniu nasienia w tabeli 7.

Jeżeli do oceny budowy użyto klasyfikacji wg Krugera to należy tą informację napisać na wyniku.

**Tabela 7.**  
**Międzynarodowe nazewnictwo klasyfikacji zaburzeń przy badaniu nasienia wg WHO 2010.**

Aspermia	Brak nasienia (brak ejakulacji lub ejakulacja wsteczna)
Asthenozoospermia	Odsetek plemników z ruchem postępowym poniżej wartości referencyjnej
Asthenoteratozoospermia	Odsetek plemników z ruchem postępowym i prawidłową 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 (leukocytospermia, pyospermia)	Obecność leukocytów w ejakulacie powyżej wartości granicznej
Nekrozoospermia	Niski odsetek żywych plemników oraz wysoki odsetek plemników nieruchomych w ejakulacie
Normozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie (lub ich koncentracja) oraz odsetek plemników z ruchem postępowym i prawidłową morfologią powyżej dolnych wartości referencyjnych lub równy wartościom referencyjnym
Oligoasthenozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie (lub ich koncentracja) oraz odsetek plemników z ruchem postępowym poniżej dolnych wartości referencyjnych
Oligoasthenoteratozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie (lub ich koncentracja) oraz odsetek plemników z ruchem postępowym i prawidłową morfologią poniżej dolnych wartości referencyjnych
Oligoteratozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie (lub ich koncentracja) oraz odsetek plemników z prawidłową morfologią poniżej dolnych wartości referencyjnych
Oligozoospermia	Całkowita liczba plemników w ejakulacie (lub ich koncentracja) poniżej dolnych wartości referencyjnych
Teratozoospermia	Odsetek plemników z prawidłową morfologią poniżej dolnych wartości referencyjnych



Dane placówki  
wykonującej badanie

Data:

*Dane Pacjenta:*  
Nazwisko i imię  
Pesel

## WYNIK BADANIA NASIENIA

### 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		<60min.
Objętość		≥1,5ml
pH		≥ 7.2
Barwa		
Lepkość		

### OCENA MIKROSKOPOWA

BADANE PARAMETRY	WYNIK	Wartość referencyjna
Aglutynacja		brak
Koncentracja plemników		>15mln/ml
Całkowita liczba plemników w ejakulacie		>39mln
Ruch postępowy		>32%
Ruch całkowity		>40%
Brak ruchu		
Żywotność		>58%
Plemniki o prawidłowej budowie		>4%
Koncentracja komórek okrągłych		<5mln/ml
Koncentracja leukocytów peroksydazo-dodatnich		<1mln/ml

**Uwagi:** (np. czy stosowano dodatkowe procedury upłynniania nasienia, czy wirowano ejakulat, czy znaleziono plemniki w osadzie, czy występuje agregacja itp.)

Podpis i pieczęć osoby wykonującej badanie

\* Wartości referencyjne WHO – 2010r.

**Opracowano na podstawie:**

WHO laboratory manual for examination and processing of human semen. Fifth Edition. Prepublication version. 2010  
<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/index.html>

**Adres kontaktowy:**

dr med. Leszek Bergier  
DIAGNOSTYKA Spółka z o. o., Spółka komandytowa  
ul. Olszańska 5  
31-513 Kraków  
tel. 012 295-01-00  
fax. 012 295-01-02  
e-mail: [leszek.bergier@diag.pl](mailto:leszek.bergier@diag.pl)