

Spermatologické vyšetření

MUDr. Vladimír Kubíček, CSc.

Centrum andrologické péče, České Budějovice

Analýza spermatu, stanovující přesně koncentraci spermií, pohyblivost a morfologii je základním kamenem pro hodnocení mužské fertility. Jak technika odběru spermatu, tak metody laboratorní analýzy mohou dramaticky ovlivnit výsledky. Analýza spermatu vyžaduje specifické technické dovednosti a cvik, stejně jako neustávající péči o kvalitní hodnocení. Pokročilé metody analýzy spermatu a funkční testy jsou cennými nástroji pro vědecké účely, ale mohou významně přispět také k léčbě infertilního páru. Je důležité podpořit používání standardních postupů, aby mohly být stanoveny referenční hodnoty. To umožní zlepšení srovnatelnosti výsledků mezi různými laboratořemi a zlepšení komunikace mezi laboratorními profesionály, kliniky a pacienty.

Klíčová slova: analýza spermatu, standardní postupy, referenční hodnoty, srovnatelnost výsledků, klinický význam.

Semen analysis

Semen analysis, accurately measuring sperm concentration, motility and morphology, is the cornerstone of male fertility assesment. Both the technique of semen collection and the methods of laboratory analysis can influence the results dramatically. Semen analysis requires specific technical skills and training, as well as constant care for quality assurance. Advanced methods of semen analysis and functional tests are valuable instruments for research purposes, but can substantially contribute to the management of the infertile couple. It is important to encourage the use of standard procedures to establish reference values. This will permit improved comparability of results between laboratories and improved communication between laboratory profesionals, clinicians and patients.

Key words: sperm analysis, standard procedures, reference values, comparability, clinical importance.

Urolog. pro Praxi, 2010; 11(4): 204–210

Pojmy spermiogram a vyšetření spermatu (spermatologické vyšetření) se často zaměňují. Nejsou to však synonyma. Analýza spermatu (= spermatologické vyšetření) je definována WHO. Spermiogram definován (standardizován) není. Proto se pod tímto názvem můžeme setkat s velmi odlišnými soubory dat. Účelem tohoto příspěvku je podpořit používání postupů, které umožňují vytvořit soubory referenčních údajů pro analýzu spermatu. Tyto postupy mohou zlepšit komparabilitu (srovnatelnost) výsledků jednotlivých pracovišť a laboratoří, která je u nás malá. Důraz na detaily standardních postupů zvyšuje preciznost a reprodukovatelnost výsledků.

Zprávy o poklesu koncentrace spermií a zvyšujícím se výskytu urogenitálních postižení u mužů a nádorových onemocnění varlat v některých oblastech vyvolávají pozornost veřejnosti. Výsledky studií jsou geograficky rozdílné, jejich závěry si někdy protirečí. Dobře připravená metodika laboratorní diagnostiky s definovanými výsledky analýz zjednodušuje komunikaci nejen mezi pracovníky různých oborů laboratorních a klinických, ale také s pacienty, kteří dostávají lépe podané informace.

Jako odpověď na rostoucí potřebu standardizace spermatologické diagnostiky vydává WHO opakovaně příručku „WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction“. První vydání vyšlo v roce 1980, další aktualizovaná v r. 1987

a 1992. Poslední revize vyšla v roce 1999 (WHO, 4th Editon, 1999), verze 2010 je nyní v přípravě.

Spermiogram

Spermiogram je základním vyšetřením mužské plodnosti. Aby byly výsledky vyšetření spermiogramu u jednoho pacienta srovnatelné, je nutné, aby vyšetření byla provedena za stejných podmínek, tedy stejnou metodikou, při konstatní době pohlavní abstinence před vyšetřením. Optimální je, pokud vyšetření provádí lékař, který pacienta pak dále vyšetřuje klinicky, léčí jej a má možnost srovnání stavu před a po terapii.

Normální sperma je směs spermatozoí suspendovaných v sekretech z varlat a nadvarlat, které jsou smíchány se sekretem z prostaty, semenných váčků a bulbouretrálních žláz v okamžiku ejakulace. Konečným výsledkem je viskózní tekutina nazývaná ejakulát (semeno, sperma).

Analýza spermatu poskytuje esenciální informace o stavu fertility daného muže. Je proto nutné, aby odběr a analýza spermatu byly prováděny za standardizovaných podmínek, aby výsledky poskytovaly validní informace. Metody vyšetření dělíme na standardní, specifické a výzkumné (1).

- Standardní metody („standard procedures“).
- Vyšetření specifická, ke zjištění speciálních údajů, nebo v rámci zvláště podrobného vyšetření („optional tests“).

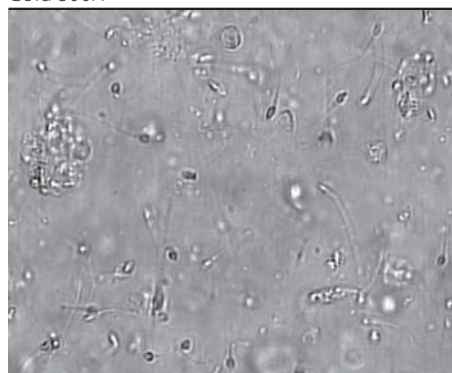
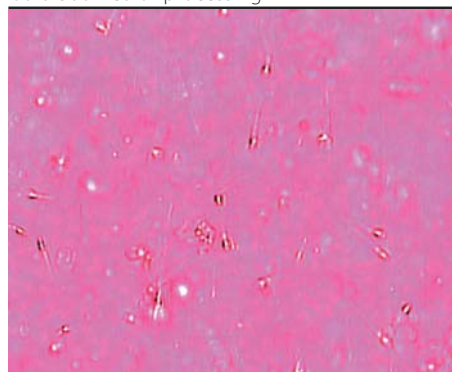
C. Výzkumná vyšetření („research tests“).

Standardní metody vyšetření ejakulátu

Získání a transport ejakulátu

Pacient má být jednoznačně poučen o způsobu odběru ejakulátu, eventuálně o jeho transportu. Před vyšetřením je nutná konstantní doba několika dnů bez ejakulace, dle WHO manuálu 48 hodin až 7 dnů. Při jednotlivých vyšetřeních však by tato doba měla být stejná. Stabilizace (tj. minimální výkyvy) parametrů spermiogramu nastává 3.–5. den ejakulační abstinence, tato doba se jeví jako optimální (2). Je nutno vzorek jednoznačně identifikovat, zaznamenat čas od poslední ejakulace, dobu odběru, kompletnost vzorku, případné problémy při získání vzorku, interval mezi odběrem a analýzou.

Vzorek má být získán masturbací, nikoliv při coitus interruptus, aby nemohla uniknout první porce ejakulátu, nejbohatší na spermie, mimo nádobu. Není možné použít běžné kondomy, neboť latex působí spermicidně. V zahraničí se proto pro osoby, které odmítají masturbaci z religiózních či morálních důvodů, vyrábí speciální kondomy bez spermicidních složek. Nejlepší je okamžité zpracování čerstvého ejakulátu, odebraného v laboratoři do čisté, širokohrdlé sklenice, která nemusí být sterilní, musí však být prostá jakýchkoliv zbytků dezinfekce a chemikálií. Nádobu má mít teplotu 20–40 °C. Pokud

Obrázek 1. Analyzátor spermatu SQA-V Gold**Obrázek 2.** Videomikroskopický záznam SQA-V Gold 500x**Obrázek 3.** Videomikroskopický záznam SQA-V Gold 500x color processing

pacient není schopen v určitém času a prostoru dosáhnout ejakulace, je možný odběr v domácím prostředí. Pacient však musí dostat nádobu, písemné pokyny, jak správně provést odběr a je nutno mu zdůraznit, že vzorek musí být kompletní. Transport ke zpracování nesmí trvat déle než 60 minut. Nádoba musí být transportována ve tmě, při teplotě blízké teplotě těla (ne méně než 20 °C, ne více než 40 °C). Je-li motilita spermií v takto odebraném vzorku snižena, tj. méně než 25 % spermií s rychlou progresí (stupeň a) dle

WHO), je nutné vyšetření čerstvého vzorku. K iniciálnímu vyšetření je třeba zpracovat 2 vzorky ejakulátu, časově od sebe více než 7 dnů, méně než 3 týdny vzdálené. Jsou-li hodnoty v těchto nálezech velmi rozdílné, je nutné třetí vyšetření.

Bezpečné zacházení se vzorky

Vzorky ejakulátu mohou obsahovat choroboplodné zárodky (viry hepatitidy B, HIV, herpes viry, cytomegaloviry), podle toho je nutno s nimi zacházet, aby nedošlo k přenosu infekčního agens. Pokud jsou odebírány vzorky na kultivaci spermatu, k intrauterinní inseminaci či k in vitro fertilizaci, je nutno použít sterilní odběrové nádoby a techniky. Zásady bezpečného zacházení s biologickým materiálem je nutné bezpodmínečně dodržovat.

Makroskopické vyšetření

Zkapalnění, vzhled ejakulátu

Normální vzorek je šedavě opalescentní, homogenní a při pokojové teplotě obvykle do 15 minut zkapalní, nejdéle do 60 minut. Delší dobu je nutno zaznamenat. Je třeba zaznamenat průhlednost, nebo naopak příměsi čerstvé krve, hnědavého hematinu (stará krev), vláken hleny, žlutozelenou příměs hnisu. Žlutavé zbarvení může být způsobeno také užíváním multivitaminů. V normálním vzorku mohou být gelová zrna, která nezkapalní. Vzorek má být vyšetřen ihned po zkapalnění. Během zkapalnění je možné jemně míchat spermatem rotací nádoby. Pokud nedojde ke zkapalnění, je třeba enzymatické digesce (bromelain 1 g/l). Zkapalnění je možné napomoci naředěním kultivačním médiem či opakovaným průchodem pipetou. Tyto postupy mohou ovlivnit motilitu a morfologii spermií a je nutno je zaznamenat.

Objem

Stanovení objemu se provádí v pipetě, válci, či stříkačce. Norma je 2 až 5 ml.

Konzistence (viskozita)

Po zkapalnění hodnotíme viskozitu aspirací do 5 ml pipety, ze které má sperma volně odkapávat. Normální sperma vytváří jednoduché kapky, při zvýšené viskozitě se vytváří vlákna délky až 2 cm. Podobně lze stanovit viskozitu nabráním vzorku na skleněnou tyčinku a sledováním délky vytvořeného vlákna. Vysoká viskozita může interferovat s motilitou spermií a koncentrací antispermatických protilátek. Snižit viskozitu lze podobným postupem jako u nedostatečné kolivace spermatu.

Hodnota pH

K vyšetření se používá papírek s indikačním rozmezím 6,4–8,0, nebo 6,1–10. Hodnocení se provádí 30 sekund po natření vzorkem. Normální pH ejakulátu je 7,2–7,8. Je-li pH vyšší než 7,8, je nutno myslet na infekci, je-li pH při azoospermii pod 7,0, může to ukazovat na obstrukci semenného traktu při bilaterální kongenitální absenci vas deferens.

Iniciální mikroskopické vyšetření

Při iniciálním mikroskopickém vyšetření vzorku je hodnocena koncentrace spermií, jejich pohyblivost (motilita), aglutinace spermatozoí a přítomnost jiných buněčných elementů než spermií. Pro všechna vyšetření nebarvených preparátů čerstvého spermatu je doporučováno použití mikroskopu s fázovým kontrastem. Lze užít také obvyklého světelného mikroskopu, kdy kondenzátor je v nižší poloze a dochází tím k větší disperzi světla.

Příprava pro rutinní analýzu spermatu

Objem semene a rozměry krycího sklíčka je třeba standardizovat tak, aby analýza byla prováděna v preparátu o stálé hloubce 20 mikrometrů. To umožňuje zhodnocení koncentrace spermií tak, aby bylo možno rozhodnout o další přípravě spermatu k podrobnější analýze. Hloubka menší než 20 mikrometrů může omezovat rotační pohyblivost spermií. Na čisté podložní sklíčko je umístěno 10 mikrolitrů spermatu a překryto krycím sklíčkem 22 × 22 mm. Váha krycího sklíčka rozšíří vzorek spermatu po celé ploše pro optimální přehled. Je třeba vyhnout se zachycení vzduchu mezi sklíčky a tvorbě bublin. Čerstvě připravený vlhký preparát je nutno nechat stabilizovat asi jednu minutu. Pohyblivost a rychlost pohybu spermií závisí výrazně na teplotě, je proto nejlépe hodnotit motilitu při teplotě 37 °C. Vyšetření lze provést při teplotě 20–24 °C, ale teplota v laboratoři musí být standardizována, neboť může ovlivnit klasifikaci stupňů pohyblivosti spermií. Iniciální vyšetření se provádí při celkovém zvětšení 100× (tj. 10× objektiv, 10× okulár), které poskytuje přehled o tvorbě hlenových vláken, agregaci spermií a rovnoměrnosti rozšíření spermií na sklíčku. Poté je preparát vyšetřován při celkovém zvětšení 400×.

Předběžné stanovení koncentrace spermií

U různých mikroskopů je pole při 400násobném zvětšení většinou v rozmezí 250–400 mikrometrů, což odpovídá 1 až 2,5 nl při hloubce vzorku 20 mikrometrů. Průměr zorného pole je

možné změřit mikrometrem nebo podle mřížky počítací komůrky. Spočítání spermatozoí na ploše odpovídající 1 nl udává přibližnou koncentraci spermií v milionech na mililitr spermatu. Tento odhad je používán k rozhodnutí o stupni ředění pro přesné určení koncentrace spermií v hemocytometru: méně než 15 spermatozoí: ředění 1:5, 15–40 spermatozoí: ředění 1:10, 40–200 spermatozoí: ředění 1:20, více než 200 spermatozoí: ředění 1:50. Pokud se počet spermií v zorných polích výrazně liší, je to známkou nehomogenity vzorku. V tomto případě je třeba vzorek znovu pečlivě promíchat. Nehomogenita vzorku může vycházet také z abnormální konzistence či zkapalnění vzorku, agregace spermatozoí v mukózních vláknkách či z aglutinace spermatozoí. Tyto abnormality je nutno zaznamenat ve zprávě.

Je-li počet spermatozoí nízký (méně než 1–2 na zorné pole při zvětšení 400x), je možné stanovit koncentraci spermií po centrifugaci vzorku. Mililitr spermatu (nebo takový objem, jaký je k dispozici) se centrifuguje při 600 g po dobu 15 minut. Známý objem seminální plazmy se odstraní a zbytek se pečlivě promíchá a provede se počítání spermií, jak je uvedeno výše. Konečná koncentrace se upraví dle celkového objemu centrifugovaného vzorku. Hodnocení pohyblivosti spermií a morfologie mohou být také provedeny ve vzorku po centrifugaci. Je-li počet spermatozoí malý (1–2/zorné pole), dostačuje pro klinické účely stanovení koncentrace jako méně než 2 miliony na mililitr, s poznámkou, zda byly či nebyly zachyceny pohyblivé spermie. Všechny vzorky, v nichž nebyla zjištěna spermatozoa, mají být centrifugovány, aby byla zjištěna přítomnost spermií v sedimentu. Centrifugace má probíhat při více než 3 000 g po dobu 15 minut. Pokud nejsou ani zde nalezena spermatozoa při kompletním a systematickém vyšetření resuspendovaného precipitátu, má být vzorek označen jako azoospermie.

Hodnocení pohyblivosti (motility) spermií

Nejvíce používán je jednoduchý systém, který umožňuje stanovení stupně pohyblivosti spermií bez složitějšího vybavení. Další metody hodnocení včetně počítačové analýzy jsou uvedeny později.

K hodnocení pohyblivosti má být hodnoceno nejméně 5 zorných polí mikroskopu a systematicky má být klasifikováno 200 spermatozoí. Pohyblivost je klasifikována podle následujících kritérií:

- a) rychlá progresivní motilita = 25 mikrometrů/sec či více při 37°C, nebo 20 mikrometrů/sec. či více při 20°C. 25 mikrometrů odpovídá asi

pěti délkám hlavičky nebo polovině délky bičíku,

- b) pomalá progresivní motilita („sluggish“ = jako slimák),
- c) nonprogresivní motilita = méně než 5 mikrometrů/sec.,
- d) imotilní spermie.

Počet 200 spermií je opakovaně hodnocen na druhém samostatném vzorku 10 mikrolitrů z téhož odběru spermatu a obě zjištěné hodnoty pohyblivosti se porovnají. Větší rozdíly ukazují na špatné hodnocení nebo nedostatečnou homogenitu spermií ve vzorku spermatu. V tomto případě je třeba připravit dvě nová sklíčka a postup celý zopakovat.

Jiné buněčné elementy nežli spermie

V ejakulátu nacházíme vždy také jiné buňky než spermatozoa, které se souhrnně nazývají „kulaté buňky“ („round cells“). Jsou to epitelální buňky z urogenitálního traktu, prostatické buňky, spermatogenní buňky a leukocyty. Všeobecně nemá normální ejakulát obsahovat více než 5 milionů kulatých buněk na mililitr.

Leukocyty, hlavně neutrofily jsou přítomny ve většině ejakulátů. Jejich nadměrné množství (leukocytospermia) může být spojeno s infekcí a špatnou kvalitou spermatu.

Pokud je koncentrace těchto buněk vyšší než 1 milion na mililitr, je možné použít barvení, odlišující peroxydáza – pozitivní polymorfonukleární leukocyty od jiných buněk. Pokud přesahuje počet peroxydáza – pozitivních buněk koncentraci 1 milion/ml, je nutné mikrobiologické (kultivační) vyšetření pro suspektní infekci testikulárních adnex. Toto vyšetření sestává z vyšetření první porce moči, druhé porce moči, exprimované prostatické tekutiny a porce moči po masáži prostaty (dle Stameyho). Nepřítomnost leukocytů nevylučuje možnost infekce akcesorních pohlavních žláz.

Nezralé zárodečné buňky. Kulaté buňky, které nejsou leukocyty, jsou kulaté spermatidy, spermatocyty, spermatogonie a odloupané epitelální buňky. Ty často degenerují a těžko se identifikují. Různé typy nezralých zárodečných buněk obvykle ukazují na poruchu spermiogeneze. Jejich identifikace je možná barvením dle Bryana-Leishmana. Od leukocytů se odlišují cytologickými charakteristikami, nepřítomností intracelulární peroxydázy a leukocytárního specifického antigenu. Kulaté spermatidy lze identifikovat barvením na přítomnost akrozomu, např. periodickým kyselým Schiffovým barvením. Nadměrné odcházení nezralých zárodečných buněk z testes je obvykle důsledkem poškoze-

né funkce semenotvorných kanálků při hypospermiogenezi, varikokéle, dysfunkci Sertoliho buněk a je spojeno se sníženou úspěšností IVF. Koncentraci těchto buněk je možné stanovit ve vlhkém preparátu stejně jako u spermatozoí, za použití vhodného hemocytometru.

Aglutinace

Aglutinací rozumíme vzájemné shlukování pohyblivých spermií hlavičkami, středními částmi či bičíky, či smíšeně (např. středními částmi s bičíky apod.). Přilepení spermií na vlákna hleny, jiné buněčné elementy či detritus je považováno za nespecifickou agregaci a není považováno za aglutinaci. Aglutinace ukazuje na možnou imunologickou příčinu infertility, ale nedokazuje ji. Důležitý je stupeň aglutinace. WHO manuál neuvádí toleranci aglutinace v rámci normy, starší prameny (2, 3) tolerovaly aglutinaci do 10% spermatozoí.

Další mikroskopická vyšetření

Vitalita spermií

Vitalitu spermií ukazuje proporce spermatozoí, které jsou zjištěny supravitálním barvením nebo hypoosmotickým „swell“ testem. Tyto postupy je třeba provést, pokud procento nepohyblivých spermií převyšuje 50%. Živé spermie lze stanovit barvicími technikami založenými na tom, že mrtvé buňky s porušenou cytoplazmatickou membránou přijímají určitá barviva. Používá se buď eozin na vlhkém preparátu, nebo kombinace eozinu a negrozinu na suchém preparátu. Hodnotí se 200 spermií, živé jsou nezbarvené, mrtvé zbarvené. Supravitální barvicí techniky umožňují odlišit živé, ale imotilní spermie od mrtvých. Metoda je kontrolou přesnosti hodnocení motility, protože procento živých spermií má mírně převyšovat počet pohyblivých spermií. Větší zastoupení živých, ale nepohyblivých spermií ukazuje na strukturální defekty bičíků spermií.

Hodnocení koncentrace spermií

Koncentrace spermií má být stanovena pomocí hemocytometru ve dvou oddělených preparátech z téhož vzorku semene (každý na jedné straně počítací komůrky). Ředění je stanoveno z předběžného hodnocení koncentrace (1:5, 1:10, 1:20, 1:50). Např. ředění 1:20 se provádí ředěním 5 mikrolitrů zkapalněného spermatu v 95 mikrolitrech ředícího roztoku. Diluens je připravován přidáním 50 g natrium bikarbonátu a 10 ml 35% formalinu, nebo 0,25 g trypanové modři (Colour Index C. I. 23850) nebo 5 ml saturované vodné genciánové violeti do celkového množství 1 litru destilované vody. Barviva není nutné přidávat,

pokud je používán mikroskop s fázovým kontrastem.

Pipety na počítání leukocytů a automatické pipety pracující na principu odsávání vzduchu nejsou dosti přesné pro volumetrickou diluci spermatu. Mají být užívány pipety s pozitivním typem posunu sloupce tekutiny.

Krycí sklíčko je třeba připevnit na komůrku hemocytometru (Neubauerova, Bürkerova či Thomova komůrka). WHO manuál zmiňuje zlepšenou Neubauerovu komůrku. Pipetou se přenáší asi 10 mikrolitrů pečlivě promíchaného ředěného vzorku spermatu, ke každé hemocytometrické mřížce komůrky (= 2 vzorky). Koncem pipety se přenesou objem vzorku k okraji krycího sklíčka, komůrka se nechá naplnit kapilárním sáním. Komůrka se nesmí přeplnit či dostatečně nenaplnit, krycí sklíčko se nesmí pohybovat. Hemocytometr se poté nechá asi pět minut stát ve vlhkém prostředí, aby nedocházelo k jeho vysychání. Buňky během této doby sedimentují a lze je dobře počítat, optimálně při zvětšení 200–400násobném. Počítají se kompletní spermatozoa = hlavičky s bičíky. Defektní spermatozoa bez bičíků nebo samostatné bičíky se počítají a zaznamenávají odděleně. Počítají se spermatozoa v určitém počtu čtverců daném stupněm ředění vzorku a konstrukcí hemocytometru. Počítání se provádí dvakrát, aby byla redukována pravděpodobnost chyby. Větší rozdíly ukazují na chybu v ředění vzorku, nesprávný postup při počítání, nebo nerovnoměrné rozdělení spermatozoí v ředěném vzorku spermatu. Pokud jsou výrazné rozdíly výsledků, je třeba připravit dva čerstvé ředěné vzorky spermatu a počítat znovu. Pro počítání spermií existují také speciální komůrky: Maklerova komůrka a Microcell. Tyto komůrky mohou být použity bez ředění vzorku, přičemž může být preciznost a přesnost počítání oproti hemocytometrickému postupu menší.

Hodnocení morfologie spermií

Morfologická variabilita spermatozoí způsobuje obtížnost hodnocení jejich morfologie. Pozorováním spermatozoí získaných z ženského reprodukčního traktu (zejm. při postkoitálním vyšetření cervikálního hlenu) či z povrchu zóna pellucida napomohla k definici morfologicky normálního spermatozoa.

Příprava stěrů: z čerstvého vzorku spermatu mají být vyšetřeny nejméně dva stěry kvůli dvojímu hodnocení v případě problémů s barvením preparátů. Vyšetření morfologických charakteristik spermatozoí je v komplexním vyšetření vzorku spermatu stejně důležité jako vyšetření počtu a pohyblivosti spermií.

Barvení preparátu

WHO manuál (1) doporučuje barvení podle Papanicolaoua modifikované pro spermie, které poskytuje dobré zbarvení spermií i ostatních buněk ve spermatu. Umožňuje nabarvení akrozomální a postakrozomální oblasti hlavičky, cytoplazmatické kapky („droplets“) krčku a bičíku. Barvení podle Shorra poskytuje podobné výsledky jako metoda dle Papanicolaoua pro morfologicky normální spermie. V některých laboratořích se používají rychlé barvicí metodiky např. Diff-Quik (3). Při použití této techniky se hlavička spermie jeví větší než při klasickém postupu. U všech barvení se hlavička barví slabě modře, v akrozomální a postakrozomální oblasti tmavě modře, krček načervenalé, bičík také modře či načervenalé. Cytoplazmatické kapky v oblasti za hlavičkou a v krčku se barví při metodě dle Papanicolaoua zeleně. Technologie je v bodech podrobně popsána v manuálu. Existují i předbarvená sklíčka podložní a krycí.

Účelné morfologické zhodnocení barveného preparátu je možné i po obarvení stěru na vitalitu eozinem – negrozinem. Výhodou je možnost stanovení procenta živých spermií s normální morfologií, nevýhodou je to, že není možná klasifikace zárodečných buněk a leukocytů.

Klasifikace morfologie spermií

Hlavičky barvených spermatozoí jsou o něco menší nežli hlavičky živých spermií. Pokud hodnotíme morfologickou normalitu spermatozoa, mají být užívána striktní kritéria podle Menkvelda (1990), normální musí být hlavička, krček, střední část i bičík spermie. Hlavička má být oválného obrysu, délky 4,0–5,0 mikrometrů a šíře 2,5–3,5 mikrometru. Poměr délky k šířce má být 1,5 až 1,75. Hodnocení délky a šířky lze provést mikrometrem okuláru. Má být dobře definována akrozomální oblast, představující 40–70 % oblasti hlavičky spermatozoa. Střední část má být štíhlá, méně než 1 mikrometr šíře, asi jeden a půlkrát delší než hlavička, napojena má být na hlavičku axiálně. Cytoplazmatické kapky nemají zabírat více než polovinu velikosti normální hlavičky. Bičík má být rovný, uniformní, tenčí než střední část, nestočený, délky asi 45 mikrometrů. Tato klasifikace vyžaduje vyloučení všech hraničních („borderline“) forem spermií, které jsou považovány za abnormální – Kruger, Menkveld. Při užití těchto klasifikačních kritérií byla prokázána prediktivní hodnota nálezu morfologie spermií pro fertilizaci in vitro.

Ačkoliv morfologické hodnocení bere v úvahu funkční oblasti spermatozoa, není rutinně považováno za nutné rozlišovat všechny variace

velikosti a tvaru hlaviček, středních částí a bičíků. Mají být zaznamenány tyto kategorie defektů:

- defekty hlaviček: velké, malé, kuželovité, hruškovité (pyriformní), kulaté, amorfní, vakuolizované (více než 20 % hlavičky vyplněno nezabarvenými vakuolami), hlavičky s malými akrozomálními oblastmi (méně než 40 % oblasti hlavičky), zdvojené hlavičky a kombinace výše uvedených defektů,
- defekty krčku a střední části: zahnutý („bent“) krček, kdy krček a bičík vytvářejí úhel větší než 90° k dlouhé ose hlavičky, asymetrické napojení střední části na hlavičku, ztlustělá a nepravidelná střední část, abnormálně tenká střední část (vs. bez mitochondrií) nebo vzájemné kombinace,
- defekty bičíku: krátký, mnohočetný, vlásenkovitý, zlomený, zahnutý více než o 90°, nerovnoměrně široký, stočený nebo vzájemné kombinace,
- cytoplazmatické kapky větší nežli polovina oblasti normální hlavičky spermatozoa.

Do diferenciálního hodnocení spermatozoí jsou zahrnována jen bezpečně rozpoznatelná spermatozoa. Nezralé buňky včetně kulatých spermatid, samostatné či ulomené hlavičky nejsou počítány, jsou zaznamenány zvlášť. Stočené bičíky mohou být spojeny s nízkou pohyblivostí a mohou ukazovat na expozici spermií hypoosmotickému stresu. Někdy mají četné spermie specifický strukturální defekt vznikající při poruše vývoje akrozomu, který způsobuje vývoj malé kulaté hlavičky – globozoospermie. Pokud se najdou samostatné bičíky bez hlaviček, je nutné je zaznamenat zvlášť, neboť mohou být důsledkem poruchy vývoje bazální ploténky, která se napojuje na opačné straně akrozomu. Hlavičky jsou poté absorbovány a zůstávají samostatné bičíky.

Z každého stěru má být odečteno nejméně 200 spermií při zvětšení 1 000–1 250násobném, okulár 10násobný, pod olejovou imerzí v pečlivě připraveném světlém poli koherentního osvětlení. Mnoho morfologicky abnormálních spermií vykazuje mnohočetné defekty, ideální diferenciálně morfologické hodnocení by mělo být multiparametrové, oproti staršímu způsobu popisu, kdy prioritu měl „majoritní“ defekt s asumpcí větší důležitosti hlavičky vzhledem ku střední části a střední části ku bičíku.

Testy na spermatické protilátky

Vazba spermatických protilátek na spermie je typická a specifická pro imunologicky podmíněnou infertilitu. Spermatické protilátky

v ejakulátu se týkají téměř výlučně dvou tříd imunoglobulinů: IgG a IgA. Větší klinický význam mají IgA protilátky. IgM protilátky se ve spermatu nacházejí zřídka pro větší objem molekul. Testy na IgA a IgG protilátky se provádí v čerstvém vzorku spermatu, buď „immunobead“ testem (IBT) nebo smíšenou antiglobulinovou reakcí („mixed antiglobulin reaction“ – MAR). Aby tyto testy byly validní, musí být k dispozici alespoň 200 spermií. Výsledek IBT a MAR testu nemusí být vždy ve vzájemném souladu. IBT koreluje dobře s imobilizačními testy v séru. Jsou-li tyto testy pozitivní, mají být provedena další dodatečná vyšetření: kontaktní test sperma-cervikální hlen, kapilární test sperma-cervikální hlen.

Immunobead test

Tímto testem lze prokázat protilátky na povrchu spermií. Immunobeads jsou kuličky z polyakrylu, které váží kovalentně antihumánní králičí imunoglobulin. V tomto testu lze stanovit současně podíl IgG a IgA. Spermatozoa jsou opakovaným centrifugováním oddělena od seminální plazmy a resuspendována v nárazníkovém roztoku. Suspenze spermií je smíchána s immunobeadsuspenzí, reakce je sledována v mikroskopu s fázovým kontrastem pod 400násobným zvětšením. Během pohybu spermií prostředím suspenze dochází u spermií s povrchovými protilátkami k navázání na immunobeads. Spočítá se podíl spermií s povrchovými protilátkami. Pomocí dvou různých immunobeads lze rozlišit třídy IgA a IgG.

MAR test

Čerstvý ejakulát je smíchán s latexovými částicemi nebo ovčími erytrocyty, značenými IgA nebo IgG. Přidáním imunospesifického, proti lidským proteinům cíleného IgG antiséra se vytvářejí smíšené aglutinace mezi částicemi a pohyblivými spermii jako důkaz navázání IgG protilátek na spermie. Diagnóza imunologické infertility je pravděpodobná, pokud 50 nebo více procent pohyblivých spermií naváže tyto částice, ale diagnóza má být potvrzena testy interakce spermatu a cervikálního hlenu.

Vyšetření specifická, ke zjištění speciálních údajů, nebo v rámci zvláště podrobného vyšetření („optional tests“)

Tato vyšetření nejsou obvykle doporučována jako rutinní součást analýzy spermatu, ale mohou být klinicky významná.

Výpočet indexů mnohočetných defektů spermií

Morfologicky abnormální spermie mají často mnohočetné defekty. Dříve se za majoritní považovaly defekty hlavičky, nyní se používají indexy, kdy počet defektů je dělen počtem defektních spermií = index teratozoospermie (TZI) nebo index mnohočetných anomálií (MAI). Počet defektů dělený celkovým počtem spermatozoí se nazývá sperm deformity index (SDI). Tyto indexy jsou prediktory funkcí spermií *in vitro* i *in vivo*. Manuální zpracovávání těchto dat je značně časově náročné, velmi dokonale a rychle je zvládají analyzátoři spermatu, o kterých bude pojednáno v dalším textu.

Hypo-osmotický „swelling“ test (HOS)

Jednoduchý test je založen na semipermeabilitě intaktní buněčné membrány, která způsobuje vnikání vody do buňky a expanzi objemu buňky při vystavení buňky hypoosmotickým podmínkám. Test je užíván jako aditivní test vitality spermatozoí. Jednoduše se odečítá a podává informaci o integritě a compliance buněčné membrány bičíku spermií.

Kultivace ejakulátu

Kultivace seminální plazmy je možná na aerobní i anaerobní mikroorganismy. Odběr je třeba zvláště pečlivě připravit. Od poslední ejakulace má být přestávka 5–7 dnů. Pacient se před odběrem vymočí, ruce a penis umyje důkladně vodou a mýdlem, k osušení použije čistý ručník. Nádobu na ejakulát musí být sterilní. Čas mezi odběrem a začátkem zpracování v mikrobiologické laboratoři nemá překročit 3 hodiny. Pozitivní kultivace spermatu svědčí zejména pro infekci prostaty. Vyšetření je indikováno při klinických potížích, ukazujících na infekci či při výskytu leukocytů v ejakulátu ve větším množství než 1 milion/ml. Výsledky je nutno interpretovat opatrně a porovnat je s výsledky kultivace segmentovaného odběru moči dle Stameyho (první porce moči, střední proud, exprimát z prostaty po masáži, první porce moči po masáži prostaty).

K vyšetření ejakulátu patří i biochemická vyšetření seminální plazmy.

Biochemická analýza seminální plazmy

K vyšetření funkce přídatných pohlavních žláz existují různé biologické markery:

- pro prostatu – kyselina citronová, zinek, gama-glutamyl-transpeptidáza, kyselá fosfatáza,
- pro semenné vajíčky – fruktóza a prostaglandiny,

- pro nadvarlata – volný L karnitin, glycerolfosfocholin a neutrální alfa-glukozidáza.

Nižší celková produkce specifického markeru ukazuje na nižší sekretorickou funkci, která může souviset s infekcí žlázy. Sperma mužů s oboustrannou agenezí vas deferens je charakterizováno nízkou hladinou fruktózy, nízkým objemem, nízkým pH a chyběním typického čichového vjemu.

Sekretorická kapacita prostaty

Biochemickým měřítkem prostatické sekrece jsou koncentrace zinku a kyseliny citronové v ejakulátu. Dobře koreluje s koncentrací kyselé fosfatázy, která se pro zjednodušení někdy nestanovuje. Normální hladina zinku v ejakulátu je 2,4 a více mikromol na ejakulát, u kyseliny citronové je norma 52 a více mikromol na ejakulát.

Sekretorická kapacita semenných vajíček

Tuto funkci odráží koncentrace fruktózy, která je normálně 13 a více mikromol na ejakulát. Stanovení fruktózy je důležité u azoospermie, kdy její nízká hladina může ukazovat na kongenitální vývojovou vadu semenných vajíček nebo chámovodů.

Sekretorická kapacita nadvarlat

Stanovení volného L karnitinu a neutrální alfa glukosidázy jsou užívány klinicky jako epididymální markery. V seminální plazmě jsou dvě izoformy alfa glukosidázy – jedna, neutrální – pochází pouze z nadvarlete a druhá – kyselá, pochází hlavně z prostaty. Stanovení neutrální aflaglukosidázy je specifitější a senzitivnější pro onemocnění epididymis nežli stanovení L karnitinu a glycerolfosfocholinu.

Spermatozoa

Biochemická analýza má souvislost i se spermatozoji, ale klinický význam není přesně stanoven, je nutno jej dalšími výzkumy upřesnit. Patří mezi ně stanovení izoenzymu laktátdehydrogenázy LDH – C4, který se uvolňuje při smrti spermie, je tedy markerem integrity spermií. Se ztrátou integrity spermií souvisí také hladina glutamát-oxalacetát transaminázy. Data týkající se markerů integrity spermatozoí jsou uvedena ve 3. vydání WHO manuálu z r. 1992, ve 4. vydání z r. 1999 chybí.

Zona-free hamster oocyte test

Spojení spermatozoa a oocyty u křečků je stejné jako u lidí, neboť fúze s membrána vitellina oocyty je iniciována plazmatickou membránou překlenující ekvatoriální segment a akrozomální

reakcí lidského spermatozoa. Test se liší od fyziologické situace tím, že chybí zona pellucida. Výsledek testu závisí na výskytu spontánní akrozomální reakce v populaci spermatozoí inkubovaných delší dobu *in vitro*. Byly častěji zaznamenány výsledky nesprávně negativní, kdy spermie muže neobstály v testu s křeččími vajíčky a oplodnily lidské vajíčko *in vitro* i *in vivo*. Intracelulární signály iniciující akrozomální reakci po interakci spermie – zona pellucida jsou přítok kalcia a cytoplazmatická alkalizace. Obojí lze generovat uměle bivalentním kationovým ionoforem.

Počítačová analýza spermatu – CASA („Computer Aided Sperm Analysis“)

Použití počítačové analýzy spermatu má přinést dvě hlavní výhody oproti manuálnímu počítání: vysokou přesnost a kvantitativní data kinetiky spermií. Při použití správných postupů je možné získávat spolehlivé a opakovatelné výsledky. Výsledky postupů CASA jsou ovlivňovány řadou faktorů: přípravou vzorků, koncentrací spermií a jejich uspořádáním. V roce 1996 vydala European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) guidelines pro používání CASA.

Při správném užívání přístrojů a přípravě vzorků mohou být počítačové metodiky používány k rutinní diagnostice při monitoraci koncentrace a procenta progresivně pohyblivých spermií. K dosažení a udržení vysokého standardu je třeba dodržovat striktní postupy kontroly kvality. Původně nebyly počítačové postupy ESHRE doporučeny k zjišťování koncentrace spermií pro obtížnou diferenciaci spermatozoí a buněčného detritu. Pokročilé technologie nyní umožňují odlišit detritus a koncentraci spermií lze přesně odečítat. Podle některých studií je CASA hodnocení v signifikantní relaci k poměru fertilizace *in vitro* a *in vivo* (4).

Pracnost a časová náročnost manuálního zpracování ejakulátu vede k vývoji analyzátorů spermatu, které v současné době spojují možnosti digitalizace (s možností počítačového zpracování) a vizualizace spermií (kontrola nálezu okem vyšetřujícího). Vizualizovaný záznam lze snadno převést do digitální podoby a uchovat jej spolu s číselnými údaji ve formě počítačového souboru, takto jej archivovat a kdykoli srovnat s novými daty.

Během posledních 15 let byla vyvinuta již 4. generace analyzátorů, příkladem může být Sperm Quality Analyzer SQA-Vision Gold izraelské firmy MES.

Kombinuje elektro-optické a computerové algoritmy a videomikroskopii, přičemž precizní výsledky jsou hotovy během 75 sekund. Je dodáván se software, který umožňuje výše uvedenou

digitalizaci a archivaci dat. Software vytvoří zprávu o vyšetření, ke které přiřadí obrázek či videosekvenci z videomikroskopu. Analyzátor počítá koncentraci spermií, pohyblivost dle stupňů a-b-c-d, % morfologicky normálních spermií a další parametry. Není nutné ředění vzorku, je možnost použít vzorek o objemu 0,25 ml či jen 20 mikrolitrů. Je možné vyšetřovat čerstvý, „washed“, i rozmražený vzorek spermatu. Zvláštní možností je vyšetření vzorku po vazektomii. Přístroj se před každým použitím automaticky testuje a kalibruje, čímž zaručuje striktní kritéria kvality vyšetření. Optická vizualizace mikroskopu je se zvětšením 200–500násobným (viz obrazová příloha), vizualizační systém funguje s testovací kapilárou nebo se standardním podložním sklíčkem. Videomikroskop umožňuje uchování statického záznamu nebo pohyblivé sekvence v digitální podobě. Archivace je užitečná pro porovnávání a hodnocení vývoje nálezů u pacienta v časovém odstupu. Statický digitální záznam je možné upravit barevným počítačovým postprocessingem, který nenahrazuje barvení, přesto výrazně usnadňuje hodnocení morfologie spermií. Testovací kapiláry a další spotřební materiál je na jedno použití. Přístroj je velmi cenným pomocníkem, nevýhodou je jeho cena cca 500 000 Kč a vysoké náklady na spotřební materiál na jednorázové použití.

Výzkumná vyšetření („research tests“)

Z výzkumných postupů byly vybrány ty, které mají možnosti klinické aplikace:

Funkční testy spermií

„Reactive oxygen species = ROS“ a mužská infertility

Nadměrná tvorba ROS a jejich vysoká koncentrace v cytoplazmatických enzymech (např. kreatinfosfokináza) mohou odrážet výskyt abnormálních spermatozoí nebo nezralých spermatozoí s nadměrným množstvím cytoplazmy retinovaným ve střední části spermie. ROS jsou metabolity kyslíku, zahrnují superoxidový anion, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, hydroxyperoxidový radikál a oxid dusný. Jsou-li přítomny v nadměrném množství, mohou iniciovat patologické poškození indukci oxidativního poškození buněčných lipidů, proteinů a DNA. Většina buněk je vybavena buď enzymatickými antioxidačními systémy (superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza, kataláza), nebo nonenzymatickými antioxidačními systémy (kyselina močová, vitamin C, vitamin E). Jsou-li překonány tyto obranné mechanismy, je poškozována funkce buňky.

V lidském ejakulátu jsou ROS produkovány spermatozoí a leukocyty. Antioxidační scavengery a enzymy seminální plazmy mohou být u některých pacientů nedostatečné. Odstranění seminální plazmy při přípravě spermatu k asistované reprodukci může zvýšit vulnerabilitu spermií k oxidativnímu poškození. Asi 40 % mužů přicházejících s infertilitou a 97 % mužů po poranění míchy má detekovatelné hladiny ROS ve spermatu. Produkci ROS lze měřit chemiluminiscenčními postupy.

„Human zona pellucida binding tests“

Proces vazby spermatozoa na zónu pellucida iniciuje akrozomální reakci, uvolnění lytických akrozomálních komponent a penetraci spermatozoa matrix zóny. K vyšetření těchto jevů lze užít neživá, nefertilizovatelná lidská vajíčka, získaná z ovarií po operačních výkonech. Testy jsou omezeny dostupností humánních oocytů.

Hodnocení akrozomální reakce

Hodnocení stavu akrozomu po indukci akrozomální reakce kalciovým ionoforem identifikuje dysfunkční akrozomální reakci. Pro hodnocení stavu akrozomu je řada barvicích metod, využívajících světelné nebo fluorescenční mikroskopie. Mikroskopie a průtokové cytometrie lze užít k hodnocení akrozomu fluorescentně značeným lecitem („pea agglutinin“) a monoklonálními protilátkami.

Fyziologická akrozomální reakce se dostává na zónu pellucida po vazbě spermatozoa. Vývoj validních bioesejí pro hodnocení akrozomální reakce spermatozoí, která fertilizují vajíčka je obtížný. Kalciové ionofory nebo progesteron mohou být užívány k hodnocení kapacitovaného spermatozoa k iniciaci normální akrozomální reakce. Klinickou relevanci uvedených metodik je nutno stanovit.

Computer-aided sperm analysis: morfologie spermií

Několik studií ukázalo, že hodnocení morfologie spermií pomocí počítačových metod poskytuje klinicky užitečné informace. Některé CASA přístroje poskytují možnosti hodnocení morfologie spermií, ale málokdy jsou plně automatizované (současná optická kontrola vyšetřujícím). Při plně automatizované analýze je někdy problém s odlišením spermatozoí od buněčného detritu.

„Swim-up“ technika

Separace lidských spermatozoí ze seminální plazmy tak, aby konečný preparát obsahoval

vysoké procento morfologicky normálních a pohyblivých spermatozoí, bez detritu a mrtvých spermií, je důležitá pro řadu terapeutických a diagnostických technik v klinické andrologii. Lze použít řadu metod, ale užívají se hlavně dvě:

- spermie jsou selektovány na základě své schopnosti plavat, proto se technika nazývá „swim-up“ (SU). Před SU nemá být prováděna centrifugace vzorku, aby nedošlo k poškození membrán spermií a k produkci ROS. Přímý swim-up ze spermatu je preferovanou technikou pro separaci pohyblivých spermatozoí. Technika je prováděna navrstvením kultivačního média přes zkapalněné sperma. Pohyblivá spermatozoa vyplavou do kultivačního média.
- druhá metoda spočívá v selekci spermií podle jejich gradientu denzity. Nejrozšířenější je jednoduchá dvoustupňová preparace. Obecně lze říci, že přímá swim-up technika je používána, když se vzorek spermatu zdá být normální. Pro sperma suboptimálních charakteristik jsou obvykle preferovány jiné techniky.

Může být nutné vybrat techniku preparace spermií podle individuálního vzorku spermatu. Účinnost různých technik je obvykle vyjadřována jako absolutní číslo nebo relativní podíl morfologicky normálních, pohyblivých spermatozoí. V některých případech může být stanovena funkční kapacita spermií (např. u „zona-free hamster oocyte“ testu) a podle toho je identifikována nejvhodnější metoda preparace.

V klinických studiích byly studovány výhody a nevýhody techniky Percoll. Tato technika byla nyní vyjmuta z technik separace spermatozoí v humánní klinické medicíně a je využívána jen k výzkumným účelům. Jsou však dostupné jiné techniky s podobným efektem, např. „glass woll columns“, která je stejně efektivní jako Percoll gradienty pro spermatozoa ze vzorků spermatu suboptimálních charakteristik.

Rozsah vyšetření, uvedený v posledním vydání WHO laboratorního manuálu pro vyšetření lidského semene a interakce spermatu a cervikálního hlenu (4th Edition, 1999, Cambridge University Press) je relativně široký. V rámci, označovaném WHO jako standard, má většina českých pracovišť znatelný deficit. Je nutno používat protokoly, které mají praktickou návaznost na vyšetření klinické, hormonální a na zobrazovací metody a terapie (5).

Protokol WHO k vyšetření ejakulátu **Identifikační data pacienta**

- Datum vyšetření:

- Doba karency před vyšetřením (dny):
- Časový interval mezi ejakulací a začátkem analýzy spermatu (minuty):
- Vzhled ejakulátu: 1 – normální 2 – abnormální
- Zkapalnění: 1 – normální 2 – abnormální
- Konzistence: 1 – normální 2 – abnormální
- Objem (ml):
- pH:
- Motilita (200 spermií):
 - a) rychlá progresivní motilita:
 - b) pomalá progresivní motilita:
 - c) nonprogresivní motilita:
 - d) imotilní spermie:
- Vitalita (% živých spermií):
- Koncentrace: (10^6 /ml)
- Morfologie:
- Hlavičky:
 - % normálních –
 - % velkých oválných –
 - % malých oválných –
 - % kuželovitých –
 - % kapkovitých –
 - % zdvojených hlaviček –
 - % amorfních –
 - % kulatých –
 - % špendlíkovitých –
- Střední část:
 - % normálních –
 - % abnormálních –
 - % cytoplazmatických kapek –
- Bičík:
 - % normálních –
 - % abnormálních –
- Leukocyty (10^6 /ml): peroxidáza pozitivní
- Jiné buňky (10^6 /ml): peroxidáza negativní
- Aglutinace: 1 – žádná 2 – zjištěná
- MAR test (% s navázanými částicemi):
- Immunobead test – % s navázanými IgG:
- % s navázanými IgA:

Referenční hodnoty dle WHO manuálu 1999

- Objem: 2,0 ml či více
- pH: 7,2–7,8
- Koncentrace spermií: 20×10^6 /ml či více
- Celkový počet spermií: 40×10^6 /ml či více
- Motilita: 50 nebo více % spermií s progresivní motilitou = kategorie a) + b)
- 25 nebo více % kategorie a) během prvních 60 minut od získání ejakulátu.
- Morfologie: 15 a více % spermií normální stavby.
- Podíl živých spermií: 50 a více % vitálních spermií, které nepřijímají barvivo.
- Leukocyty: méně než 1×10^6 /ml.

- Biochemické hodnoty
- Zinek (celkový): 2,4 mikromol na ejakulát či více
- Kyselina citronová (celková): 52 mikromol (10 mg) na ejakulát či více
- Fruktóza (celková): 13 mikromol na ejakulát či více
- MAR – test: méně než 50 % spermatozoí s navázanými částicemi
- Immunobead test: méně než 50 % spermatozoí s navázanými kuličkami (beads).

Nomenklatura parametrů ejakulátu

- Normozoospermia: normální ejakulát podle výše popsaných parametrů.
- Oligozoospermia: koncentrace spermií nižší než 20×10^6 /ml.
- Asthenozoospermia: méně než 50 % spermií s progresivní motilitou kategorie a) + b), nebo méně než 25 % spermií s motilitou kategorie a).
- Teratozoospermia: méně než 15 % spermií s normální morfologií.
- Oligoastenoteratozoospermia: kombinace všech tří výše uvedených postižení.
- Častější je kombinace snížené motility a koncentrace – oligoastenozoospermia.
- Azoospermia: v ejakulátu nejsou přítomny žádné spermie.
- Aspermia: není žádný ejakulát.

Literatura

1. Aitken J, Baker HWG, Barrat CLR, et al. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press, 1999.
2. Kubíček V. Mužská infertilita a asistovaná reprodukce. Postgraduální medicína 2/2004, Praha 2004.
3. Ludwig G, Frick J, Rován E. Praxis der Spermatologie. 2nd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1999.
4. Kubíček V. Mužská infertilita. Dizertační práce. Praha: 1. LF UK v Praze, 1999.
5. Kubíček V. Mužská infertilita a erektilní dysfunkce. Praha: Galén, 1996.

Článek přijat redakcí: 13. 1. 2010

Článek přijat k publikaci: 7. 2. 2010

MUDr. Vladimír Kubíček, CSc.
Centrum andrologické péče
U Tří lvů 4, 370 01 České Budějovice
kubicekmudr@iol.cz

