

Richtlijn Semenanalyse

Drs. C. Beijer, klinisch chemicus, Rijnland ziekenhuis, Leiderdorp

Dr. R.van Kooij, embryoloog, MC Kinderwens, Leiderdorp

Prof. Dr. S. Repping, embryoloog, AMC, Amsterdam, voorzitter

Dr. J. Rhemrev, gynaecoloog, Bronovo, Den Haag

Drs. E.M. E. den Breejen, arts-onderzoeker UMCN St Radboud, Nijmegen

Definities

Subfertiliteit: het uitblijven van een zwangerschap gedurende tenminste 12 maanden, bij onbeschermd op conceptie gerichte coïtus.

VCM: volume x concentratie zaadcellen x percentage progressief motiele spermatozoa /100

Inleiding

Een standaard semenanalyse wordt bij het paar met subfertiliteit uitgevoerd in het kader van het oriënterend fertiliteitsonderzoek (OFO), voor de bepaling van de prognose t.a.v. zwangerschap. Deze semenanalyse zal doorgaans aangevraagd worden door de huisarts of gynaecoloog. Soms is het nodig de semenanalyse uit te breiden met aanvullende bepalingen om tot een diagnose te komen of een behandelingskeuze te maken, welke doorgaans door de gynaecoloog dan wel uroloog aangevraagd zal worden.

Voor uitgebreidere informatie hierover wordt verwezen naar de richtlijnen: Oriënterend Fertiliteits Onderzoek (OFO) (NVOG)¹, de Standaard Subfertiliteit (NHG)², onverklaarde subfertiliteit (NVOG)³, en mannelijke subfertiliteit (NVOG/NVU)⁴.

Deze richtlijn concentreert zich op de aanvraag, de uitvoering en de interpretatie van de uitslag van een semenanalyse van het subfertiele paar en is bedoeld voor de professional die de semenanalyse aanvraagt, uitvoert of interpreteert.

Relevante bestaande richtlijnen

De werkgroep heeft naast de literatuur zoals genoemd in de richtlijn de volgende bronnen geraadpleegd:

- NICE guideline van de RCOG⁵
- ESHRE guideline van de Special Interest Group Andrology⁶
- ASRM guideline⁷

- guideline van de International Society of Andrology⁸
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010 5th edition⁹; (hierna afgekort als WHO- richtlijn)

1. Algemene Instructies bij de aanvraag van een semenanalyse

Vóór de aanvraag van een semenanalyse is het van belang dat patiëntenparen goed voorgelicht worden over de manier van opvangen van het semen. Om de professional en patiënt handvaten te bieden wordt daarom verwezen naar de van de netwerkrichtlijn afgeleide patiëntenfolder 'Semenanalyse; instructies voor de patiënt'.

Onderstaande aanbevelingen geven een overzicht van het bewijs t.a.v. de instructies, die gegeven dienen te worden aan de patiënt bij de aanvraag van een semenanalyse.

Seksuele onthouding

Studies naar het effect van onthoudingstijd op de semenkwaliteit wijzen op een sterk effect van de onthouding dat wisselt per semenparameter en afhankelijk is van de kwaliteit van het semen (normozoöspermie dan wel een oligozoöspermie). Een grote prospectieve cohort studie (n=6008) laat zien dat de onthoudingstijd een variërende invloed heeft op het volume, de concentratie, de morfologie en het percentage progressief motiele spermatozoa, afhankelijk van de kwaliteit van het semen (normozoöspermie dan wel een oligozoöspermie)¹⁰. Derhalve zal de aanvrager de onthoudingstijd in beschouwing moeten nemen bij de interpretatie van de uitslag van een semenanalyse.

De WHO- richtlijn beveelt 2 – 7 dagen onthouding aan als venster waarbinnen een semenanalyse verricht zou moeten worden⁹. Tevens wordt aanbevolen, indien aanvullende analyses nodig zijn, de onthoudingsperiode constant te houden. Gezien de wereldwijde acceptatie van deze WHO- richtlijn beveelt de werkgroep het volgende aan:

De werkgroep is van mening dat de patiënt geadviseerd dient te worden een onthoudingstijd van 2 – 7 dagen aan te houden voor de productie van zaad ten behoeve van een semenanalyse.

LOE D

De werkgroep is van mening dat de aanvrager van de semenanalyse bij opvolgende semenanalyses de patiënt dient te vragen zoveel mogelijk een zelfde onthoudingstijd aan te houden.

LOED

Bij de beoordeling van het resultaat zou de arts de onthoudingstijd in beschouwing moeten nemen.

LOE B

Inlevertijd

Volgens de WHO- richtlijn moet de analyse van de motiliteit en de pH van het semen binnen 1 uur na afname gestart worden⁹. In het algemeen wordt een vervloeiingstijd langer dan 1 uur als abnormaal gezien. Er is één studie, die een relatie tussen de motiliteit en de tijd na ejaculatie beschrijft¹⁴. In deze studie werd gevonden dat de motiliteit met 5-10% per uur afnam, beginnend 1 uur na ejaculatie.

De motiliteitsanalyse zou binnen 1 uur na ejaculatie moeten starten. LOEB

Verbod condoom

Vanwege de zaaddodende eigenschappen van het condoom is deze niet geschikt om het zaad op te vangen ten behoeve van een semenanalyse. Indien voor het verkrijgen van een ejaculaat het gebruik van een condoom het enige middel blijkt, kan gekozen worden voor een niet-latexhoudend condoom, welke niet over zaaddodende eigenschappen beschikt¹⁵.

Het opvangen van zaad met behulp van een latex- houdend condoom zou afgeraden moeten worden. LOE B

Bij paren waarbij het opvangen van zaad na masturbatie tot problemen leidt, kan een niet- latex houdend condoom gebruikt worden.

LOE C

Onderbroken gemeenschap

Bij de beoordeling van het semen is het van belang dat het monster compleet en niet gecontamineerd is. Derhalve is onderbroken gemeenschap geen geschikte productiewijze van zaad ten behoeve van een semenanalyse⁹.

De werkgroep is van mening dat het opvangen van zaad door middel van onderbroken geslachtsgemeenschap afgeraden moet worden. LOE D

Vraag naar medicijnen

Sommige geneesmiddelen hebben een spermatotoxische invloed en kunnen de uitkomst van de semenanalyse negatief beïnvloeden¹⁶⁻¹⁹.

De behandelend arts vraagt alvorens een semenanalyse aan te vragen naar het gebruik van geneesmiddelen en anabole steroïden en moet de medicatie zo nodig heroverwegen. LOE C

Vraag naar koorts

Een episode van koorts kan nog gedurende ongeveer 3 maanden van invloed zijn op de semenkwaliteit. In een review van Jung *et al.* worden meerdere case reports beschreven, echter veelal in het kader van dierproeven. Slechts één prospectieve studie beschrijft de significant negatieve gevolgen van anamnestic bevonden koorts op de concentratie, motiliteit en morfologie van het semen²⁰. Derhalve is de werkgroep van mening dat bij een afwijkende semenanalyse gevraagd moet worden naar koorts in de periode van 3 maanden voorafgaand aan de semenanalyse.

De behandelend arts zou in geval van een afwijkende semenanalyse moeten vragen naar koorts bij de man in de drie maanden voorafgaand aan de semenanalyse. LOE B

Instructie vervoerwijze en temperatuur

Het advies in de WHO-richtlijn luidt: 'keeping it warm in a pocket near your body'. Er is geen bewijs beschikbaar voor de optimale vervoerstemperatuur van het zaadmonster⁹.

De werkgroep is van mening dat het zaadmonster op het lichaam (tussen kamertemperatuur en lichaamstemperatuur) vervoerd dient te worden. LOE D

Welk potje?

Het is van belang om opvangpotjes te gebruiken waarvan aangetoond is dat ze geen effect hebben op de zaadkwaliteit. Er kan daartoe gebruik worden gemaakt van specifieke commercieel verkrijgbare producten. Hiervoor zijn eisen beschreven in de richtlijn "Hulpmiddelen voor geassisteerde voortplantingstechnologieën (ART)"²¹. Indien deze niet voorhanden zijn kan een ander, door het laboratorium gevalideerd product, worden gebruikt. Derhalve dient men contact op te nemen met het laboratorium over het te gebruiken potje.

De werkgroep is van mening dat voor het opvangen van het zaadmonster gebruik gemaakt dient te worden van een potje dat door het laboratorium is aangewezen. LOE D

Opvangen in kliniek of thuis

Er zijn maar twee studies die gekeken hebben naar het verschil tussen de zaadkwaliteit bij thuisproductie versus in de kliniek^{22,23}. Elzany *et al.* (379 monsters, 273 in de kliniek en 106 thuis) vonden een betere progressieve motiliteit ($P < 0,03$) en een hogere concentratie ($P < 0,02$) bij thuisproductie. Licht *et al.* vonden geen significant verschil tussen thuisproductie versus de kliniek.

Het zaadmonster kan zowel thuis als in de kliniek geproduceerd worden, mits de analyse van de motiliteit binnen 1 uur na ejaculatie kan starten. LOE B

2. Uitvoering

2.1. Standaard bepalingen

De werkgroep is van mening dat de volgende standaard bepalingen uitgevoerd dienen te worden in geval van een initiële semenanalyse:

a) het volume

b) de concentratie spermatozoa in miljoenen per milliliter

c) de motiliteit van de spermatozoa, in te delen in de klassen: progressief- bewegend (voorwaartse beweging aanwezig), niet progressief- bewegend (alleen ter plekke bewegend) en stilliggend.

d) de morfologie van de spermatozoa en

e) de aanwezigheid van andere cellen in het semen

LOED

Op indicatie kunnen aanvullende bepalingen uitgevoerd worden (bv. een vitaliteitkleuring, leukocytenkleuring, etc.).

Voor de technische details van de uitvoering van deze bepalingen wordt verwezen naar de WHO-richtlijn⁹.

2.2 Handmatige versus geautomatiseerde semenanalyse

De semenanalyse wordt in veel laboratoria handmatig uitgevoerd met gebruik van een telkamer en waarneming via de microscoop. De verkregen getallen zijn sterk afhankelijk van de opleiding en training van het analytisch personeel.

Met een geautomatiseerde methode kunnen concentratie, mobiliteit en morfologie worden uitgevoerd. Er zijn twee automatische methoden beschikbaar. Beide types gaan in principe uit van onverdund materiaal, waardoor de kans op fouten in het voortraject geringer is.

Eenzijds is er apparatuur die met behulp een electro-optische methode het aantal bewegende deeltjes in een suspensie bepaalt. Hierbij krijgt men echter geen beeld van de individuele zaadcellen in het preparaat en kunnen indirect ook leucocyten meegeteld worden. Anderzijds is er apparatuur die een videobeeld via de microscoop analyseert m.b.v. zogenaamde 'frame grabbing'.

Bij de meeste methoden heeft men de mogelijkheid ter controle een beeld van de zaadcellen te vormen. Beide methoden worden in de literatuur omschreven als 'CASA methoden' (Computer Automated Semen Analysis).

Bij de werkgroep geeft de voorkeur aan methoden die ruimte laten voor een simultane eigen beoordeling van de preparaten op andere elementen dan zaadcellen in het aangeleverde materiaal, via microscoop of videodisplay. Met de meeste methoden zijn vergelijkende studies gedaan die goede overeenstemming laten zien²⁴⁻²⁶. Het is nodig rekening te houden met de gebruikte telkamer en zonodig een correctiefactor toe te passen^{27,28}. Vergelijkende studies laten zien dat de verschillende motiliteitsklassen met CASA nauwkeuriger bepaald kunnen worden dan met de handmatige methodes.

De handmatige methode vergt veel validatie en afstemming tussen de werknemers onderling²⁹, maar ook de geautomatiseerde methoden vragen een goede validatie en kunnen bij onvoldoende kennis foutgevoelig zijn. Verder is externe kwaliteitscontrole voor CASA nog niet beschikbaar.

Aanbeveling:

De werkgroep is van mening dat de concentratie en de motiliteit zowel handmatig als geautomatiseerd bepaald kunnen worden mits voor beide procedures interne en externe kwaliteitscontrole plaatsvindt.
LOE D

2.3 Aanvullende testen

Op indicatie kan een aanvullende bepaling verricht worden, indien deze diagnostische meerwaarde heeft. Onderstaande aanbevelingen geven een overzicht van de beschikbare kennis.

pH- bepaling in semen

pH- bepaling in het semenplasma wordt in de WHO- richtlijn beschouwd als onderdeel van het basaal semenonderzoek⁹. Zo kan onderscheid gemaakt worden tussen een obstructie van het ductale systeem als oorzaak voor een azoöspermie (pH <7) en het vinden van een infectie (pH > 7.8)³⁰.

De zaadblaasjes dragen voor een belangrijk deel (50%-80%) bij aan het semenvolume van het ejaculaat. De prostaat draagt voor circa 30% bij aan het zaadvolume. Het vocht afkomstig van de zaadblaasjes is alkalisch (pH >7) en het vocht afkomstig uit de prostaat is zuur (pH <7).

Wanneer het vas deferens van de zaadblazen niet is aangelegd of sprake is van een obstructie van de ductus ejaculatorius, heeft het ejaculaat een lage pH en een klein volume.

Voor differentiatie tussen een niet- obstructieve azoöspermie en een obstructieve- azoöspermie heeft een pH- bepaling beperkte diagnostische meerwaarde. In 2 studies^{31,32} wordt beschreven dat de gemiddelde pH van het semen van mannen groter is dan 8. Het referentie-interval voor de pH van het semen van mannen (n= 602) met een normale zaadconcentratie en -motiliteit is niet afwijkend van het semen van mannen (n= 597) met afwijkende waarden³², waarbij een referentie-interval van 7,6-8,8 (gemiddelde ± 2SD) gekozen wordt, hetgeen afwijkt van de WHO⁹ – richtlijn (pH ≥ 7.2).

Derhalve is de werkgroep van mening dat een pH bepaling niet geadviseerd dient te worden als onderdeel van de initiële semenanalyse. Bij een opvolgende semenanalyse kan een pH- bepaling gedaan worden om onderscheid te maken tussen een obstructieve en een niet- obstructieve azoöspermie.

De werkgroep is van mening dat pH- bepaling niet standaard uitgevoerd dient te worden.
LOED

Anti- Sperma Antilichamen

Het aantonen van anti-sperma antilichamen (ASA) middels de MAR of IBT test dient volgens de WHO-richtlijn uitgevoerd te worden bij iedere semenanalyse. Echter, er is onduidelijkheid over het nut van het uitvoeren van deze tests. Er zijn in totaal 5 studies verricht. In een grote retrospectieve analyse van 1.025 subfertiele paren, werden significant meer zwangerschappen gezien, indien minder dan 50% van de zaadcellen gebonden waren aan immunoglobulines ($p < 0.05$)³³. Er werden echter geen details gegeven over de gebruikte test. Daarnaast was de uitkomst niet alleen een spontane zwangerschap maar ook een zwangerschap na behandeling. Bij 103 mannen die na refertilisatie getest werden op IgG antilichamen was er een grotere kans op zwangerschap in de IgG positieve groep ($> 10\%$ binding, zonder een IgA respons) (86%) dan in de negatieve groep (67%)³⁵. In deze studie werd een positieve test gedefinieerd als meer dan 10% binding. Echter, de definitie van zwangerschap werd niet gegeven. Tevens werd een zwangerschap vastgesteld m.b.v een vragenlijst of via een telefonisch interview.

In een prospectieve studie onder 191 subfertiele paren, was het verschil in zwangerschap significant tussen de MAR-positieve groep ($\geq 10\%$ binding) (6/31, 19%) versus de MAR negatieve groep (37/88, 42%) ($p < 0.02$)³⁶. Er werd echter geen onderscheid gemaakt tussen IgG en IgA positieve monsters. Ook werd er geen definitie van zwangerschap gegeven en werden tevens met voortplantings technieken behandelde paren geïnccludeerd. In een andere prospectieve studie onder 534 mannen die onderdeel waren van een subfertil paar werd geen significant effect gevonden van de MAR-uitkomst op de kans op zwangerschap³². Zowel indien $>10\%$ en $>50\%$ binding werden gezien als een positieve test. In de grootste en methodologisch meest sterke studie onder 1,794 subfertiele mannen werd ook geen significant effect gevonden van een positieve MAR test (gedefinieerd als positief indien er $>50\%$ binding was) en de kans op spontane zwangerschap³⁷.

Bij patiënten die IUI/IVF/ICSI ondergaan waarbij er sprake is van een positieve MAR test bij de semenanalyse van de man, wordt vaak het sperma in medium opgevangen met het idee dat dit bijdraagt aan het voorkomen van agglutinatie. Een beperkte en oude studie laat zien dat het opvangen in sperma in medium bijdraagt aan een verhoogd percentage bevruchte eicellen bij IVF behandelingen³⁸.

Aanbevelingen:

Een ASA- test tijdens de initiële semenanalyse dient afgeraden te worden, omdat deze niet voorspellend is voor de kans op spontane zwangerschap. LOE A

De werkgroep is van mening dat het bepalen van ASA geadviseerd kan worden bij een opvolgende semenanalyse indien de initiële semenanalyse daartoe aanleiding geeft. LOED

Bij patiënten met een positieve ASA- test zijn er aanwijzingen dat het opvangen van het semen in medium bijdraagt aan een betere bevruchting. LOE C

De Sperma Opwerk Test (SOT)

De scheiding van humane zaadcellen van semenplasma met het doel om een populatie zaadcellen te isoleren met een hoog percentage progressieve beweeglijkheid en normale morfologie zonder cellulaire debris, bacteriën en dode zaadcellen lijkt nuttig voorafgaande aan ART.

Er zijn verschillende manieren om sperma te op te werken. Ten eerste bestaat er een zogenaamde swim-up procedure met een relatieve lage opbrengst (15-20%) van progressief beweeglijke zaadcellen. Een tweede veel toegepaste techniek is centrifugatie over een dichtheidsgradiënt. Meestal bestaat deze gradiënt uit gecoate silica deeltjes. Over het algemeen zal een swim up vooral geschikt zijn bij een patiënt met normozoöpermie terwijl de dichtheidsgradiënt zinvoller is bij zaadmonsters van mindere kwaliteit.

De efficiëntie van de verschillende technieken wordt uitgedrukt in de oogst na opwerken. Dit betreft meestal het absolute aantal progressief beweeglijke zaadcellen dat geïsoleerd wordt. Zo ontstaat een VCM na opwerken. In meerdere studies is aangetoond dat de opbrengst progressief beweeglijke zaadcellen na de scheidingsprocedure bepalend is voor het succes van de daarop volgende IUI of IVF behandeling.

IUI

Voor IUI geldt dat er een significant verschil gevonden wordt in zwangerschapskansen bij een VCM van minder dan 0.5×10^6 versus groter dan 1×10^6 progressief motiele zaadcellen ($p=0.05$)^{39,40}. Ook andere studies laten significant minder zwangerschappen zien bij lage ($< 5 \times 10^6$) dan bij hoge ($> 5 \times 10^6$) aantallen progressief motiele zaadcellen na opwerken (5.55% versus 24.28% per cyclus)^{41,42}.

De keuze voor behandeling met IUI hangt niet alleen af van de resultaten van de semenanalyse, maar van ook van andere factoren. Voor indicaties voor behandeling wordt verwezen naar de NVOG richtlijnen onverklaarde subfertiliteit en mannelijke subfertiliteit^{3,4}.

IVF

Teneinde de kans op totaal fertilisatie falen (TFF) te minimaliseren ($\leq 25\%$) ten tijde van een IVF poging dient er bij een SOT tenminste 1×10^6 progressief beweeglijke zaadcellen na bewerken gevonden te worden^{43,44}.

Er zijn geen studies bekend die aangeven wanneer er een SOT gedaan moet worden. In de regel lijkt het uitvoeren van een SOT bij een VCM $< 1 \times 10^6$ niet nodig en kan men uitgaan van een ICSI behandeling. Gezien het feit dat een correlatie lijkt te bestaan tussen de opbrengst na de SOT en de kans op zwangerschap bij IUI en IVF en de kans op TFF bij IVF wordt onderstaande aanbeveling gedaan.

Men kan een SOT verrichten indien overgegaan wordt tot behandeling middels geassisteerde voortplanting en de VCM voor opwerken $> 1 \times 10^6$ bedraagt. LOEC

Het bepalen van de L-carnitine- en L-acetylcarnitineconcentratie in semenplasma

L-carnitine uit het serum wordt opgenomen door de tubuluscellen van de epididymis en getransporteerd naar het lumen van de epididymis. De concentratie aan vrij L-carnitine (LC) in de vloeistof van de epididymis is circa 2000 maal zo hoog als in het serum. In het lichaam speelt LC een belangrijke rol in het cellulair energiemetabolisme. In zaadcellen, de vloeistof van de epididymis en in semenplasma is het L-acetylcarnitine (LAC) de belangrijkste carnitinecomponent en niet de lange-keten vetzuur acylcarnitines. Vanwege de hoge concentratie in de vloeistof van de epididymis lijkt een belangrijke rol weggelegd voor LC in het metabolisme van de zaadcel.

In de literatuur wordt beschreven dat de L-carnitineconcentratie en/of de L-acetylcarnitineconcentratie in semenplasma correleert met een aantal semenparameters zoals de zaadconcentratie en de motiliteit van de zaadcellen⁴⁵⁻⁴⁷. Tevens wordt beschreven dat bij subfertiele mannen de concentratie in semenplasma aan LC en/of LAC lager is dan in het semenplasma van fertiele mannen.

In een aantal studies is de totale concentratie van LC en LAC voor en na het toedienen ervan in het semenplasma bepaald van subfertiele mannen. In deze studies kan geen statistisch significante stijging in de totale concentratie van LC en LAC in semenplasma worden vastgesteld^{48,49}, wel wordt een toename in de motiliteit van de zaadcellen vastgesteld⁴⁹.

Men kan de bepaling van de carnitineconcentratie in het semenplasma van subfertiele mannen afraden, daar het oorzakelijk verband tussen de carnitineconcentratie in semenplasma en de semenparameters niet aangetoond is. LOE C

Het bepalen van de folaatconcentratie in bloed bij subfertiele mannen

Folaat speelt een belangrijke rol in de RNA en DNA synthese. Folaat is belangrijk voor de kwaliteit en rijping van de eicel⁵⁰. In een interventiestudie waarin 30 dagen lang 10 mg folaat werd gegeven werd aangetoond dat folaat geen gunstig effect heeft op de concentratie aan zaadcellen van mannen met een normozoöspermie of oligozoöspermie⁵¹. Wong et al toonden aan dat de folaatconcentratie in serum van fertiele en subfertiele mannen gelijk is⁵². Na het toedienen van folaat stijgt de folaatconcentratie in serum en in semenplasma. Het toedienen van alleen folaat heeft geen effect op de concentratie zaadcellen of motiliteit van de zaadcellen.

Het toedienen van dagelijks 5 mg zink als zinksulfaat (66mg) en folaat (5mg) geeft wel een positief effect op de concentratie zaadcellen in het semen van subfertiele mannen^{52,53}. Het mechanisme van het effect van het toedienen van zink en folaat is nog niet opgehelderd. Wel is duidelijk dat zowel zink als folaat een rol spelen in de pathogenese en het voorkomen van subfertiliteit⁵³.

De bepaling van de folaat- concentratie in serum als ondersteuning voor de diagnose subfertiliteit zou afgeraden moeten worden. LOE B

Het bepalen van de fructoseconcentratie in semenplasma

Het fructose in het semenplasma is afkomstig uit de zaadblaasjes en kan daardoor een geschikte marker zijn voor de secretiefunctie van deze klier⁹. De bepaling van fructose in semenplasma is toegepast bij mannen met een obstructieve azoöspermie en een ontsteking van de zaadblaasjes. Ontsteking kan leiden tot atrofie van de zaadblaasjes en een lage fructoseconcentratie in het semenplasma⁵⁴. Bij mannen met een obstructie in de tractus genitalis is de fructoseconcentratie in het semen verlaagd. Een zaadvolume van <1 ml kan ook al suggestief zijn voor een obstructie.

In de loop der jaren is er onderzoek verricht naar de relatie tussen de fructoseconcentratie in semen en de concentratie aan motiele zaadcellen. Het idee bestaat dat fructose glucose kan aanvullen of vervangen als energiebron om de motiliteit van zaadcellen te handhaven⁵⁵.

Gonzales et al⁵⁵ beschrijven dat in mannen met een asthenozoöspermie het product van de logaritme uit de concentratie aan motiele zaadcellen en de fructoseconcentratie in semen beter correleert met de concentratie aan motiele zaadcellen dan alleen de fructoseconcentratie in semen. De sterkte van deze correlatie, $r = 0,45$, is echter zwak. Buckett et al⁵⁶ tonen aan dat de fructoseconcentratie in het semenplasma van mannen met een niet-obstructieve azoöspermie met een verhoogde serum FSH concentratie hoger is dan die met een FSH concentratie in het referentie-interval of bij gezonde vrijwilligers. De auteurs schrijven de verhoogde fructoseconcentratie in semen van mannen met een azoöspermie toe aan een toegenomen fructoseproductie vanuit de zaadblaasjes of aan een verminderd fructosemetabolisme. Meerdere studies stellen echter vast dat er geen correlatie of geen significante correlatie is tussen de fructoseconcentratie en de concentratie aan motiele zaadcellen in het semen⁵⁷⁻⁶⁰. Derhalve wordt de bepaling van de fructoseconcentratie afgeraden in semen.

Men kan de bepaling van de fructoseconcentratie in semenplasma bij mannen met een vermoeden van een verstoring van de secretoire functie van de zaadblaasjes afraden. LOE C

Het bepalen van de α -glucosidase activiteit in semenplasma

α -Glucosidase komt voor in 2 isovormen, het neutrale en het zuur α -glucosidase. Het eerste enzym wordt uitsluitend geproduceerd door het epitheel van de epididymis. Het zure α -glucosidase wordt voornamelijk in de prostaat geproduceerd. Het (neutrale) α -glucosidase wordt wel genoemd als marker voor de functie van de epididymis⁹. In mannen met een non-azoöspermie is de enzymactiviteit een weerspiegeling van de functie van de epididymis. Een positieve correlatie tussen de zinkconcentratie, de α -glucosidase activiteit en de zaadcelconcentratie is aangetoond⁶¹.

Krause⁶² stelt een referentie-interval vast van 7,2-46,4 U/l (gemiddelde \pm 2SD) voor het neutrale α -glucosidase in semen van 47 mannen met volgens de WHO⁹ normale semenparameters. In het semen van 9 mannen met een obstructieve en 12 mannen met een niet-obstructieve azoöspermie bepaalt hij de glucosidase activiteit (gemiddelde \pm 2SD) van respectievelijk $7,7 \pm 9,5$ en $15,4 \pm 11,45$ U/l hetgeen statistisch niet-significant verschillend is. In 6 van de 9 mannen met een obstructieve en in 2 van de 12 mannen met een niet-obstructieve azoöspermie bepaalt Krause een neutraal α -glucosidase activiteit lager dan de ondergrens van het referentie-interval ($< 7,2$ U/l).

Op basis van deze gegevens stelt Krause de sensitiviteit en de specificiteit van de neutraal α -glucosidase activiteit vast als respectievelijk 0,33 en 0,63 voor de aanwezigheid van een obstructie en concludeert dat het bepalen van de neutrale α -glucosidase activiteit geen toegevoegde waarde heeft t.o.v. andere klinische onderzoeken of parameters van de semenanalyse.

Kret⁶³ toont evenwel aan dat met het gebruik van een juiste afkapwaarde (10 U/l) de activiteit van het neutrale α -glucosidase in semenplasma gebruikt kan worden voor het aantonen van een disfunctie of obstructie van de epididymis. In deze studie hebben 8 van de 15 mannen met een azoöspermie een α -glucosidase activiteit in semen < 10 U/l tegenover 3 van de 25 controlemonsters. Ook in het semen van mannen met een astenozoöspermie (4/6) en een oligozoöspermie (3/5) worden enzymactiviteiten gemeten < 10 U/l.

Comhaire^{64,65} beweert dat met gebruikmaking van een afkapwaarde van 12 U/l voor de activiteit van het *totaal* α -glucosidase een 95% specificiteit wordt bereikt voor het aantonen van een obstructieve azoöspermie en bestrijdt de bevindingen van Kraus. Er wordt aangetoond dat het meten van de totaal α -glucosidase activiteit sterk correleert met het meten van de activiteit van het neutraal α -glucosidase ($r=0,85$, $P=0,003$, $n=13$)⁶⁵. Comhaire baseert zijn bevindingen op zijn studie waarin de totaal α -glucosidase activiteit ondermeer gemeten wordt in semen van 38 patiënten met een azoöspermie waarvan 5 met een bewezen obstructie van de epididymis, 33 patiënten met een idiopathische azoöspermie met een oorzaak gelegen in de testis en in het semen van 33 mannen die een succesvolle vasectomie hebben ondergaan⁶⁵. Er zijn aanwijzingen dat met het hanteren van de juiste afkapwaarde voor de activiteit van het enzym α -glucosidase aangetoond kan worden of er sprake is van een al dan niet obstructieve azoöspermie. Gezien de beperkte bewijs wordt bepaling van α -glucosidase niet aanbevolen in het kader van de diagnostiek bij een azoöspermie.

De werkgroep is van mening dat de neutraal α -glucosidase of totaal α -glucosidase activiteit in het semenplasma van mannen met een azoöspermie niet routinematig bepaald dient te worden om onderscheid te maken in een obstructieve versus een niet- obstructieve azoöspermie. LOE D

Het bepalen van de zinkconcentratie in semenplasma en in bloed

Zink is een essentiële cofactor voor tal van metalloenzymen en is betrokken bij de polymere organisatie van RNA en DNA. Zink is belangrijk voor de ontwikkeling van de testis, voor de spermatogenese en de motiliteit van de zaadcellen. Klinische symptomen van een zinktekort zijn ondermeer haarverlies, groeivertraging en hypofunctie van de gonaden. De concentratie zink in de mannelijke geslachtsorganen is hoog. Zink wordt door de prostaat gesecreteerd in het semen⁶⁶. Zink heeft antioxidant eigenschappen en kan daardoor bijdragen aan de instandhouding van de oxidant-antioxidant status.

De zinkconcentratie in *semenplasma* vertoont een statistisch significante positieve correlatie met de concentratie zaadcellen en met de motiliteit van de zaadcellen^{67,68}. De sterkte van de genoemde correlaties (r) zijn echter beperkt, te weten voor de concentratie respectievelijk 0,33 en 0,34 en voor de motiliteit respectievelijk 0,22 en 0,25. Het geometrisch gemiddelde van de zinkconcentratie in semenplasma van subfertiele mannen is significant lager dan die in het semenplasma van fertiele mannen, wel is er een aanzienlijke overlapping in de zinkconcentraties in het semenplasma van beide groepen⁶⁸.

De bepaling van de zinkconcentratie in semenplasma kan afgeraden worden, gezien het feit dat de correlatie met de concentratie en de motiliteit zwak zijn. LOEC

Ebisch⁶⁹ toonde aan dat de zinkconcentratie in het *serum* van fertiele mannen hoger is dan van subfertiele mannen. De zinkconcentratie in serum van beide groepen mannen liggen binnen het referentie-interval voor zink hetgeen de waarde van deze bevinding aan discussie onderhevig maakt. Wong^{70,71} vond evenwel dat de zinkconcentratie van fertiele mannen en subfertiele mannen in serum en semen respectievelijk gelijk zijn. Het verschil in de resultaten van de zinkconcentratie in de subfertiele en fertiele groep mannen in de studies van respectievelijk Wong en Ebisch wordt door laatstgenoemde verklaard door de kleinere studiepopulatie (eg Wong: 108 fertiele en 103 subfertiele mannen; Ebisch: 47 fertiele en 40 subfertiele mannen).

Het toedienen van zink aan subfertiele en fertiele mannen heeft geen effect op de zinkconcentratie in serum of semenplasma, een stijging in de zinkconcentratie wordt niet waargenomen^{69,71}. In deze studies, waarbij de studie van Ebisch een onderdeel vormt van de studie van Wong, wordt beschreven dat het gecombineerd toedienen van zink en folaat een positief statistisch significant effect heeft op de concentratie zaadcellen^{69,71}; i.t.t. de toediening van alleen zink.

De bepaling van de zinkconcentratie in het serum kan afgeraden worden, daar deze bij subfertiele en fertiele mannen niet significant van elkaar verschilt en geen klinische meerwaarde heeft. LOEC

3. Interpretatie uitslag semenanalyse

Er is al meer dan 50 jaar discussie over de definitie van mannelijke subfertiliteit. In de jaren 50 van de vorige eeuw zijn reeds de eerste afkapwaarden voorgesteld ($>20 \times 10^6$ /mL, totale hoeveelheid sperma count $> 100 \times 10^6$) om onderscheid te maken tussen fertiele en subfertiele mannen^{72,73}. Omdat men vervolgens waarnam dat ook bij paren waarbij de man volgens bovenstaande definitie slecht sperma had spontane zwangerschappen ontstonden, zijn er vervolgens vele studies geweest die betere afkapwaarden probeerden te vinden⁷⁴⁻⁸³. In 1980 heeft de WHO in haar eerste "manual for the examination of human semen" geprobeerd om de definities van normospermie te uniformiseren⁸⁴. Sindsdien worden de WHO criteria wereldwijd gebruikt.

De huidige criteria (WHO- richtlijn 2010) voor mannelijke subfertiliteit zijn: een semen volume van minimaal 1,5 ml, een concentratie van minimaal $15 \cdot 10^6$ zaadcellen per ml, tenminste 32% progressief motiele zaadcellen, minimaal 4% normaal gevormde zaadcellen en minimaal 40×10^6 zaadcellen in het totaal ejaculaat⁹.

Hoewel wijd toegepast, is de validatie van de WHO criteria beperkt tot de uitgave van 1999. In een aantal studies is gepoogd om de nauwkeurigheid van de WHO criteria te evalueren maar deze studies zijn van beperkte waarde vanwege kleine aantallen, het feit dat er geen rekening is gehouden met de spontane zwangerschapskans, het patient-controle ontwerp waarbij fertiele met subfertiele paren werden vergeleken, en het gebruik van een cohort design onder paren die voor het eerst probeerden zwanger te worden⁸⁵⁻⁹⁰. Wel worden in de WHO richtlijn 2010 resultaten van prospectieve studies gepresenteerd, waarin de kans op spontane zwangerschap als uitgangspunt genomen is.

Als onderdeel van de landelijk Oriënterend Fertiliteits Onderzoek (OFO)-studie is bij meer dan 3000 subfertile paren uitgezocht wat de voorspellende waarde van de semenanalyse is voor de kans op een spontane zwangerschap⁹¹ (zie Tabel 1). In een multivariable Cox regressie analyse zijn het volume, de concentratie, de motiliteit en de morfologie significant geassocieerd met kans op zwangerschap. Het discriminerend vermogen van deze nieuwe criteria is vele malen beter dan de klassieke WHO 99 criteria (OFO criteria: “beste groep” 41% kans versus “slechtste groep” 7% kans / WHO criteria: “afwijkend” 23% kans versus “normaal” 24% kans). Vanwege het feit dat het hier gaat om de vergelijking met de oude WHO- criteria is het aan te bevelen de nieuwe WHO criteria (2010) in het licht van de OFO-studie te evalueren. In het model is geen rekening gehouden met vrouwelijke factoren. Aangezien de kans op een spontane zwangerschap niet alleen bepaald wordt door de uitkomst van de semenanalyse, maar andere factoren zoals de leeftijd van de vrouw een rol spelen wordt geadviseerd deze parameters te verwerken in het prognostisch model, bij een VCM van $> 3 \times 10^6$ ^{92,93}.

Voor uitgebreide informatie wordt verwezen naar de NVOG/NVU- richtlijn mannelijke subfertiliteit⁴.

Men zou de resultaten van de semenanalyse uit het oriënterend fertiliteitsonderzoek samen met andere parameters in een prognostisch model (<http://www.freya.nl/probability.php>) moeten interpreteren om paren met een lage kans op zwangerschap te onderscheiden van paren met een hoge kans op zwangerschap in de eerst volgende 12 maanden. LOE B

Tabel 1

De parameters in de semenanalyse moeten gezien worden als continue parameters die op de volgende manier geïnterpreteerd kunnen worden:

Volume	>2ml	normaal	≤2 ml	afnemende kans op zwangerschap
Concentratie	>40x10 ⁶ /ml	normaal	≤40x10 ⁶ /ml	afnemende kans op zwangerschap
Motiliteit (minder motiel, minder kans)	% progressief motiel			lineair gecorreleerd met kans op zwangerschap
Morfologie	>20%	normaal	≤20%	afnemende kans op zwangerschap
Totaal aantal zaadcellen	>200x10 ⁶	normaal	≤200x10 ⁶	afnemende kans op zwangerschap

Table - Pregnancy and male subfertility, based on redefined semen parameters

Semen parameters	N (=3,345)	%	Univariable analysis			Multivariable analysis		
			HR*	95% CI†	P-value	HR*	95% CI†	P-value
Semen volume (mL)								
- continuous per mL								
≤ 2.0	952	29	0.78	(0.59-1.02)	0.07	0.70	(0.50-0.98)	0.04
> 2.0	2,393	71	1					
Sperm concentration (10⁶/mL)								
- continuous per 10 x 10 ⁶ less								
≤ 40	1,711	51	0.85	(0.80-0.90)	<0.01	0.88	(0.77-1.0)	0.05
> 40	1,634	49	1					
Sperm motility (%)								
continuous per 10% less	3,345	100	0.89	(0.85-0.93)	<0.01	0.94	(0.89-0.99)	0.01
Sperm morphology (% normal)								
- continuous per 10% less (N = 2,996)								
≤ 20	1,297	43	0.66	(0.55-0.79)	<0.01	0.78	(0.64-0.95)	0.01
> 20	1,699	57	1					
Total sperm count (10⁶)								
- continuous per 10 x 10 ⁶ less								
≤ 200	2,406	72	0.97	(0.96-0.98)	<0.01	‡		
> 200	939	28	1			‡		

* HR = hazard ratio

† CI = confidence interval

‡ = variable not analyzed in the multivariable analysis

4. Verslaglegging

Voor de interpretatie van de semenanalyse is het van belang dat alle laboratoria op vergelijkbare wijze hun resultaten weergeven.

Aanbeveling:

De werkgroep is van mening dat bij de verslaglegging minimaal de volgende zaken gerapporteerd dienen te worden:

- *volgens welke criteria de semenanalyse is uitgevoerd (versie WHO handboek, ESHRE SIGA, etc.)*
 - o *De gevonden waarden (inclusief normaalwaarden volgens de betreffende criteria) voor:*
 - o *Volume (ml)*
 - o *Concentratie (aantal $\times 10^6$ zaadcellen/ml)*
 - o *Motiliteit (percentage progressief motiele zaadcellen) inclusief de verdeling (WHO 2010)*
 - o *Morfologie (%) inclusief volgens welke criteria de beoordeling verricht is (WHO 2010)*
- *De VCM, volgens de formule: het volume (in ml) x de concentratie (in 10^6 /ml) x het percentage progressief motiele zaadcellen)/100.*

LOE D

Referentielijst richtlijn Semenanalyse

- 1) NVOG. Richtlijn Oriënterend fertiliteitsonderzoek. In: Richtlijnen, standpunten, modelprotocollen, etc. Utrecht: NVOG;2004:versie 2. www.nvog.nl
- 2) NHG. Standaard subfertiliteit (M25). In: Richtlijnen. Utrecht: NHG;2010:versie 2. www.artsennet.org
- 3) NVOG. Richtlijn Onverklaarde subfertiliteit. In: Richtlijnen, standpunten, modelprotocollen, etc. Utrecht: NVOG;2010:versie 2. www.nvog.nl
- 4) NVOG/NVU. Richtlijn Mannelijke subfertiliteit. In: Richtlijnen, standpunten, modelprotocollen, etc. Utrecht: NVOG;2010:versie 2. www.nvog.nl
- 5) RCOG. Fertility guideline; assessment and treatment for people with fertility problems. In: guidelines. London: RCOG;2004. www.nice.org.uk
- 6) ESHRE. Guideline for good practice in ivf laboratories. Hum Reprod. 2008 (6):1253-62.
- 7) ASRM. Guidelines. In: Practice guidelines. www.asrm.org
- 8) Guidelines van de International Society of Andrology. www.isa.org
- 9) World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge, England: Cambridge University Press; 2010.
- 10) Levitas E, Lunenfeld E, Weiss N, Friger M, Har-Vardi I, Koifman A, Potashnik G. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. Fertil Steril. 2005 Jun;83(6):1680-6.
- 11) Elzanaty S, Malm J, Giwercman A. Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. Hum Reprod. 2005 Jan;20(1):221-5.
- 12) Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. Fertil Steril. 2006 Jan;85(1):128-34.
- 13) Pellestor F, Girardet A, Andreo B. Effect of long abstinence periods on human sperm quality. Int J Fertil Menopausal Stud. 1994 Sep-Oct;39(5):278-82.
- 14) Makler et al. Factors affecting sperm motility. in vitro change in motility with time after ejaculation. Fertil Steril 1979 vol 31, p 147.
- 15) Gerris J. Methods of semen collection not based on masturbation or surgical sperm retrieval. Hum Reprod Update. 1999 May-Jun;5(3):211-5.
- 16) Marmor D. The effects of sulphasalazine on male fertility. Reprod Toxicol 1995;9:219-23.
- 17) Heetun ZS, Byrnes C, Neary P, O'Morain C. Review article: Reproduction in the patient with inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2007;26:513-33.
- 18) Sawyer D, Conner CS, Scalley R. Cimetidine: adverse reactions and acute toxicity. Am J Hosp Pharm 1981;38:188-97.
- 19) Hayashi T, Miyata A, Yamada T. The impact of commonly prescribed drugs on male fertility. Hum Fertil (Camb). 2008 Sep;11(3):191-6.
- 20) Jung A, Schuppe HC. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. Andrologia 2007;39:203-15.
- 21) NEN. Hulpmiddelen voor geassisteerde voortplantingstechnologieën. Delft: NTA 8070; 2008. www.nen.nl
- 22) Elzanaty S, Malm J. Comparison of semen parameters in samples collected by masturbation at a clinic and at home. Fertil Steril. 2008, Jun;89(6): 1718 –22.
- 23) Licht RS, Handel L, Sigman M. Site of semen collection and its effect on semen analysis parameters. Fertil Steril 2008;89:395-7.
- 24) Agarwal A, Sharma RK. Automation is the key to standardized semen analysis using the automated SQA-V sperm quality analyzer. Fertil Steril. 2007 Jan;87(1):156-62.

- 25) Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer-automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertil Steril.* 1996 Jan;65(1):150-5.
- 26) McKinney KA, Thompson W. Reproducibility of sperm motility measurements in asthenozoospermic and normozoospermic individuals using the Hamilton-Thorn motility analyzer. *Arch Androl.* 1994 Nov-Dec;33(3):151-5.
- 27) Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J Androl.* 2005 Jan-Feb;26(1):115-22.
- 28) Kuster C. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: why they can be different. *Theriogenology.* 2005 Aug;64(3):614-7.
- 29) Cooper TG, Yeung CH. Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. *Fertil Steril.* 2006 Jan;85(1):220-4.
- 30) WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge (UK): Cambridge University Press: 1993.
- 31) Haugen TB, Grotmol T. pH of human semen. *Int J Androl* 1998; 21: 105-108.
- 32) Harraway C, Berger NG, Dubin NH. Semen pH in patients with normal versus abnormal sperm characteristics. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1045-1047.
- 33) Ayvaliotis B, Bronson R, Rosenfeld D, and Cooper G. Conception rates in couples where autoimmunity to sperm is detected. *Fertil Steril* 1985;43:739-742.
- 34) Barratt CL, Dunphy BC, McLeod I, and Cooke ID. The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Hum Reprod* 1992;7:95-98.
- 35) Meinertz H and Hjort T. Detection of autoimmunity to sperm: mixed antiglobulin reaction (MAR) test or sperm agglutination? A study on 537 men from infertile couples. *Fertil Steril* 1986;46:86-91.
- 36) Busacca M, Fusi F, Brigante C, Doldi N, Smid M, and Vigano P. Evaluation of antisperm antibodies in infertile couples with immunobead test: prevalence and prognostic value. *Acta Eur Fertil* 1989;20:77-82.
- 37) Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, Repping S, Schöls W, van der Veen F, Mol BW, Hompes PG. Immunoglobulin G antisperm antibodies and prediction of spontaneous pregnancy. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1659-65. Epub 2008 Oct 31.
- 38) Elder KT, Wick KL, Edwards RG. Seminal plasma anti-sperm antibodies and IVF: the effect of semen sample collection into 50% serum. *Hum Reprod.* 1990 Feb;5(2):179-84.
- 39) Campana A, Sakkas D, Stalberg A, Bianchi PG, Pache T. Intrauterine insemination; evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Human Reprod.* 1996 Apr; 11(4): 732-6.
- 40) Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, Cox A, Jacobs P, Jansen M, Nijs M. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2003 Oct-Nov; 7(4): 485-92.
- 41) Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 2009 Mar 91 (3): 777-81.
- 42) Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001 Jan;80(1):74-81.
- 43) Rhemrev JP, Lens JW, Mc Donnell J, Schoemaker J, Vermeiden JP. The postwash Total progressively motile sperm count is a reliable predictor of Total fertilization failure during in vitro fertilization treatment. *Fertil. Steril.* 2001 Nov; 76(5): 884-91.
- 44) Van Weert JM, Repping S, Van Voorhis BJ, van der Veen F, Bossuyt PM, Mol BW. Performance of the postwash Total sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intra uterine insemination: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2004 Sept; 82(3): 612-20.

- 45) Gurbuz B, Yalti S, Ficicioğlu C and Zehir K. Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. *J Obstet Gynaecol* 2003; 23(6): 653-6.
- 46) De Rosa M, Boggia B, Amalfi B, Zarilli S, Vita A, Colao A and Lombardi G. Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal characteristics in men with semen dysfunction of various origins. *Drugs* 2005; 6: 1-9.
- 47) Li K, Li W and Huang Y. Determination of free L-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility. *Clin Chim Acta* 2007; 378: 159-163.
- 48) Sigman M, Glass S, Campagnone J and Pryor JL. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2006; 85: 1409-1414.
- 49) Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, and Gandini L. Use of carnitine in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003; 79: 292-300.
- 50) Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DDM, Steegers Theunissen RPM. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2007;13: 163-174.
- 51) Landau B, Singer R, Klein T, Segenreich E. Folic acid levels in blood and seminal plasma of normo- and oligospermic patients prior and following folic acid treatment. *Experientia* 1987; 34: 1301-1302.
- 52) Wong WY, Merkus HM, Thomas CMG, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers Theunissen RPM. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind randomized, placebo controlled trial. *Fertil Steril* 2002;77:491-498.
- 53) Ebisch IMW, Pierik FH, De Jong FH, Thomas CMG, Steegers-Theunissen RPM. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl* 2006; 29:339-345.
- 54) Coppens L. Diagnosis and treatment of obstructive seminal vesicle pathology. *Acta Urol Belg* 1997; 65:11-19.
- 55) Suominen J. Seminal fructose and glucose in asthenozoospermia. *Int J Androl* 2001; 24: 253-254.
- 56) Gonzales GF, Villena A. True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men. *Int J Androl* 2001; 24: 255-260.
- 57) Buckett WM, Lewis –Jones DI. Fructose concentrations in seminal plasma from men with nonobstructive azoospermia. *Arch Androl* 2002; 48: 23-27.
- 58) Lay MF, Richardson ME, Boone WR, Bodine AB, Thurston RJ. Seminal plasma and IVF potential. Biochemical constituents of seminal plasma of males from in vitro fertilization couples. *J Assist Reprod Genet* 2001; 11: 2465-2467.
- 59) Lewis Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum Reprod* 1996; 11: 2465-2467.
- 60) Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* 2002; 17: 2904-2911.
- 61) Mankad M, Sathawara NG, Doshi H, Saiyed HN Kumar S. Seminal plasma zinc concentration and alpha-glucosidase activity with respect to semen quality. *Biol Trace Elem Res* 2006; 110(2): 97-106.
- 62) Krause W, Bohring C. Why do we determine α -glucosidase activity in human semen during infertility work-up? *Andrologia* 1999; 31: 289-294.
- 63) Kret B, Milad M, Jeyendran RS. New discriminatory level for glucosidase activity to diagnose epididymal obstruction or dysfunction. *Arch Androl* 1995; 35(1): 29-33.
- 64) Comhaire F, Mahmoud A, Schoonjans F, Kint J. Why do we determine α -glucosidase in human serum? *Andrologia* 2002; 34: 8-10.
- 65) Mahmoud AM, Geslevich J, Kint J, Depuydt C, Huysse L, Zalata A, Comhaire FH. Seminal plasma α -glucosidase activity and male infertility. *Hum Reprod* 1998; 13: 591-5.
- 66) Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DDM, Steegers Theunissen RPM. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2007;13: 163-174.

- 67) Fuse H, Kazama T, Ohta S, Fujiuchi Y. Relationship between zinc concentration in seminal plasma and various sperm parameters. *Int Urol Nephrol* 1999; 31: 401-408.
- 68) Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl* 2000; 21: 53-57.
- 69) Ebisch IMW, Pierik FH, De Jong FH, Thomas CMG, Steegers-Theunissen RPM. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl* 2006; 29:339-345.
- 70) Wong WY, Flik G, Groenen PM, Swinkels DW, Thomas CM, Copius-Peereboom JH, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol* 2001; 15: 131-6.
- 71) Wong WY, Merkus HM, Thomas CMG, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers Theunissen RPM. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind randomized, placebo controlled trial. *Fertil Steril* 2002;77:491-498.
- 72) MacLeod J., Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Sperm counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *J Urol.* 1951;66:436.
- 73) MacLeod J, Gold. The male factor in fertility and infertility. VI. Semen quality and other factors in relation to ease of conception. *Fertil Steril.* 1953;4:10.
- 74) Zukerman Z, Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD, Steinberger E. Frequency distribution of sperm counts in fertile and infertile males. *Fertil Steril.* 1977;28:1310-1313.
- 75) David G, Jouannet P, Martin-Boyce A, Spira A, Schwartz D. Sperm counts in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 1979;31:453-455.
- 76) Kovacs AT, Lecton JF, Matthews CD et al. The outcome of artificial donor insemination compared to the husband's fertility status. *Clin Reprod Fertil.* 1982;1:295.
- 77) Emperaire JC, Gauzere-Soumireu E, Audebert AJ. Female fertility and donor insemination. *Fertil Steril.* 1982;37:90-93.
- 78) Hargreave TB, Elton RA. Is conventional sperm analysis of any use? *Br J Urol.* 1983;55:774-779.
- 79) Schoyswan R, Gerris. Twelve year followup: study of pregnancy rates in 1921 couples with idiopathically impaired male fertility. *Acta Eur Fertil.* 1983;14:51-55.
- 80) Baker HWG, Burger HG, de Kretser D. Male Infertility. In: Steinberger E, Frajese C, Steinberger A, eds. *Reproductive Medicine.* Raven Press, New York; 1986:187-97.
- 81) Sokol RZ, Sparkes R. Demonstrated paternity in spite of severe idiopathic oligospermia. *Fertil Steril.* 1987;47:356-358.
- 82) Sherins R. A low sperm concentration does not preclude fertility in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism after gonadotropin therapy. *Fertil Steril.* 1988;50:343-347.
- 83) Silber SJ. Evaluation and treatment of male infertility. *Clin Obstet Gynecol.* 2000;43:854-888.
- 84) World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.* Singapore: Press Concern; 1980.
- 85) Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril.* 2006;85:629-634.
- 86) Ombelet W, Bosmans E, Janssen M et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod.* 1997;12:987-993.
- 87) Bonde JP, Ernst E, Jensen TK et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet.* 1998;352:1172-1177.
- 88) Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl.* 2000;21:145-153.
- 89) Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med.* 2001;345:1388-1393.
- 90) Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ et al. 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.

91) Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, Repping S, Bossuyt PM, Blankenstein MA, Mol BW, van der Veen F, Hompes PG. Reproducibility and reliability of repeated semen analyses in male partners of subfertile couples. *Fertil Steril.* 2010 Dec;94(7):2631-5.

92) Hunault CC, Habbema JD, Eijkemans MJ, Collins JA, Evers JL, te Velde ER. Two new prediction rules for spontaneous pregnancy leading to live birth among subfertile couples, based on the synthesis of three previous models. *Hum Reprod* 2004;19:2019-26.

93) van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ et al. Pregnancy is predictable: a large-scale prospective external validation