

Standaardisatie van semen-analyse

J.H. van ROIJEN, J.T.M. VREEBURG, M.W. KLUIT, F. PIERIK, G.R. DOHLE en R.F.A. WEBER

De analyse van het semen is de hoeksteen van de evaluatie van mannelijke subfertiliteit. Het is al geruime tijd bekend dat als gevolg van het ontbreken van een gestandaardiseerd protocol, een interne en een externe kwaliteitsbewaking, de nauwkeurigheid hiervan sterk te wensen over laat. Echter, met de komst van geavanceerde artificiële voortplantingstechnieken worden belangrijke klinische beslissingen op steeds kleinere verschillen in de semenkwaliteit genomen. Met het oog hierop is het niet langer aanvaardbaar dat semenanalyse anders dan op een gestandaardiseerde en nauwkeurige wijze wordt uitgevoerd. De Wereld Gezondheids Organisatie (WHO) heeft een voorschrift uitgegeven dat hiervoor inmiddels in de wereld als standaard geldt; het ligt voor de hand dit ook in Nederland als leidraad te gebruiken. Vanuit de European Society for Human Reproduction (ESHRE) worden in Europa (ook in Nederland) cursussen georganiseerd voor klinisch chemici en analisten belast met het analyseren van semen, met als doel om het sperma-onderzoek te standaardiseren volgens WHO-richtlijnen.

Trefwoorden: semen-analyse; standaardisatie; kwaliteitscontrole; WHO-richtlijn

Bij de evaluatie van een paar waarbij een gewenste zwangerschap uitblijft, worden routinematig semenanalyses aangevraagd. Gezien het feit dat in ongeveer 50% van de subfertiele paren, er één of meerdere semenafwijkingen bij de man te vinden zijn is dit gerechtvaardigd (1). Desondanks is de hoeksteen van de andrologische "work-up", de semen-analyse, als één van de weinige verrichtingen in de meeste laboratoria nauwelijks gestandaardiseerd. Door het ontbreken van een structurele externe kwaliteitscontrole en vaak ook een interne kwaliteitstoetsing, is er inmiddels een scala van verschillende methoden van zaadonderzoek in gebruik met als resultaat dat de verkregen uitslagen niet gemakkelijk te interpreteren zijn ten opzichte van de literatuurgegevens, uitslagen afkomstig uit andere centra en zelfs van eigen waarnemingen. In het verleden is de belangstelling voor een zeer nauwkeurig uitgevoerde semen-analyse niet erg groot geweest daar effectieve behandelingsmog-

lijkheden nauwelijks voorhanden waren. Met de komst van verschillende kunstmatige inseminatietechnieken (intra uterine inseminatie (IUI), 'fallopian-tube sperm perfusion' (FSP), in vitro fertilisatie (IVF) en, sinds kort in Nederland, intracytoplasmatische sperma-injectie (ICSI)), is met name met het oog op de indicatiestelling het belang van secure procedures onontbeerlijk geworden.

Semen-analyse: prognose en behandeling

Ongeveer vier van de vijf paren die een arts bezoeken in verband met een uitblijvende zwangerschap zijn niet volledig onvruchtbaar (2). Er is een groot aantal afwijkingen bekend die het ontstaan van een zwangerschap bemoeilijken, doch niet onmogelijk maken (1,3). Bij de man kunnen deze zich uiten in oligozoospermie (lage concentratie spermatozoën), asthenozoospermie (slechte beweeglijkheid van de aanwezige spermatozoën), teratozoospermie (veel afwijkende vormen van spermatozoën) of een combinatie hiervan. De aanwezigheid van auto-antistoffen tegen de eigen zaadcellen doet eveneens de conceptiekans dalen. Als er bij herhaling in het geheel geen spermatozoën in het ejaculaat aanwezig zijn (azoospermie), of er wordt geen ejaculaat geproduceerd (aspermie), dan kan men pas (met voorbehoud) van steriliteit spreken.

De mate van vruchtbaarheid laat zich niet gemakkelijk indelen in afgebakende termen als 'fertil, subfertil of infertil'. Er zijn talloze vaak onbekende factoren die de conceptiekans van een paar beïnvloeden. Het begrip 'vruchtbaarheid' is een glijdende schaal met aan de ene kant 'zeer vruchtbaar' en aan de andere kant 'steriel'. De WHO heeft voor subfertiliteit van paren een arbitraire grens van 1 jaar onbeschermde coïtus, zonder het ontstaan van een zwangerschap, aangegeven (4). Een eenvoudige berekening laat echter zien dat van een populatie fertiele paren (conceptiekans per cyclus van bijvoorbeeld 15%), 14% na een jaar nog geen zwangerschap zal hebben bewerkstelligd.

Een aantal studies heeft zich bezig gehouden met de vraag in hoeverre de kans op een natuurlijke zwangerschap te voorspellen is met behulp van uitsluitend de uitslagen van semen-analyse (5,6). Ook al was de tijd tot conceptie vaak gecorreleerd met de concentratie spermatozoën of de concentratie van motiele spermatozoën, het voorspellen van een zwangerschap was op basis van uitsluitend de analyse van het semen uiterst onbevredigend (1,7,8). Een van de belangrijkste boodschappen van enkele recente studies op dit gebied is dan ook dat bij de voorspelling van

Afdeling Andrologie en Andrologisch Laboratorium, Dijkzigt ziekenhuis Rotterdam

Correspondentie: Afdeling Andrologie, Academisch Ziekenhuis, Dr Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam.
Ingekomen: 18.10.94

zwangerschap ook in sterke mate rekening gehouden moet worden met anamnestiche gegevens en gegevens van het lichamelijk onderzoek van beide partners (9,10,11). Belangrijkste parameters zijn de duur van de kinderwens, de leeftijd van de vrouw, of het een primaire of secundaire infertiliteit betreft, de uitslag van de post-coitum test en of in de familie van de man fertilitateitsproblemen vaker voorkomen. In alle modellen ter voorspelling van de conceptie-kans per cyclus, spelen gegevens van de semen-analyse, met name de motiliteitsparameters, een belangrijke rol.

Een niet onaanzienlijk deel van de infertiliteitsproblematiek wordt veroorzaakt door een bijzonder slechte zaadkwaliteit van de man. Voor deze groep mensen is met name op het gebied van 'assisted fertilisation' grote vooruitgang geboekt. Bij conventionele IVF is een concentratie van 1 miljoen bewegende spermatozoën per milliliter ejaculaat al voldoende voor een goede kans op bevruchting, terwijl bij ICSI slechts enkele zaadcellen nodig zijn. Voor de behandelaar is het essentieel om te beschikken over semen-analyses die met grote precisie zijn verricht om de patiënt een optimale behandeling te kunnen aanbieden. Met name is van extreme oligoasthenozoospermie bekend dat de intra- en inter-observer variabiliteit vaak onaanvaardbaar hoog is (12,13). Een verschil tussen 40 en 50% motiliteit in een monster van 2 miljoen zaadcellen per milliliter kan dan het verschil zijn tussen ICSI (alleen in enkele gespecialiseerde centra, lange wachtlijsten en hoge kosten) en routine IVF (meer mogelijkheden in Nederland, korte wachtlijsten en beduidend lagere kosten). Klinische beslissingen worden aldus, in tegenstelling tot voorheen, nu genomen op verschillen van enkele honderdduizenden zaadcellen per milliliter.

Standaardisatie en kwaliteitscontrole

Een klinicus zal bij de interpretatie van uitslagen van semen-analyses uigaaan van de normaalwaarden (zie

Tabel 1. Normaalwaarden volgens de WHO

Volume:	≥2 ml
Concentratie:	≥20 x 10 ⁶ zaadcellen/ml
Aantal:	≥40 x 10 ⁶ zaadcellen in het hele ejaculaat
Motiliteit:	≥50% progressief beweeglijk of ≥25% graad 'a' beweeglijkheid (≥25 μm/sec)
Vitaliteit:	≥75% vitaal
pH:	7,2-8,0
Leucocyten:	<1 x 10 ⁶ leucocyten/ml
Morfologie:	≥30% normaal
MAR test:	≤10% binding
Immunobead test:	≤20% binding

tabel 1) zoals die zijn opgesteld door de WHO (4). Deze getallen hebben echter weinig waarde als de analyse zelf niet volgens WHO richtlijnen is uitgevoerd. Deze richtlijnen staan beschreven in een voorschrift (14) (inmiddels in zijn derde druk) welke inmiddels wereldwijd als standaard erkend wordt. Het ligt voor de hand dit ook in Nederland als zodanig te gebruiken. Het grote aantal verschillende methoden en telkamers die hier echter in gebruik zijn (zonder dat deze zijn getoetst tegen de WHO of enig andere standaard) brengt met zich mee dat de uitslagen met grote voorzichtigheid dienen te worden geïnterpreteerd. Ter illustratie: tijdens een workshop van de British Andrology Society in 1981 werd een semenmonster onderzocht door 26 analisten en pathologen die routinematig dit werk verrichtten (15). Elk deed dit op de wijze waarop hij of zij dat gewend was; desondanks was de spreiding in de uitslagen groot: mediaan: 44x10⁶ zaadcellen/ml; de 25^e en 75^e percentiel waren respectievelijk 34 en 60 miljoen zaadcellen/ml. Drie zeer ervaren analisten kwamen ook niet tot een eenduidig resultaat: respectievelijk 95, 55 en 49 miljoen zaadcellen/ml. De auteurs concludeerden dat aan uitslagen van semen-analyses weinig waarde kan worden gehecht zo lang er geen standaard protocol is ingevoerd. In tabel 2 staat, in het kort, vermeld hoe

Tabel 2. Uitvoering van semen-analyse volgens het WHO-voorschrift

Volume:	Opzuigen in een pipet of injectiespuit (zonder naald) en aflezen van het volume. De 'weegmethode' wordt afgeraden
Concentratie:	Met het gebruik van een verbeterde Neubauer hemocytometer, na verdunning van het semen met gebruik van een "positive displacement pipette" (16)
Beweeglijkheid:	In een vers preparaat (< 2 uur na productie) bij 37 °C tellen van het aantal snel bewegende (graad 'a': ≥25 μm/sec), matig bewegende (graad 'b': ≥5 μm/sec), niet progressief bewegende (graad c) en niet bewegende (graad d) zaadcellen
Vitaliteit:	Indien minder dan 50% van de zaadcellen beweegt (graad a+b+c) dient een vitaal kleuring gedaan te worden (bijvoorbeeld met eosine)
pH:	Bij alle preparaten met voldoende gevoelig pH-papier
Leucocyten:	Tijdens de concentratiemeting dient eveneens het aantal ronde cellen geteld te worden. Indien hiervan meer dan 1 miljoen per ml. worden geteld moet een specifieke kleuring uitmaken of het hier gaat om leucocyten of voorstadia van spermatozoa (bijvoorbeeld m.b.v. een peroxidase kleuring)
Morfologie:	De volgende defecten moeten worden gescoord: - Kop grootte en vormdefecten - Nek en midpiece defecten - Staart defecten - Cytoplasmatische aanhangsels (De strengere Kruger criteria zijn eveneens aanvaardbaar)
Auto-antistoffen:	In een vers preparaat moet de aanwezigheid van IgA en IgG antilichamen gericht tegen eigen spermatozoa worden opgespoord middels de MAR-test of immunobead test

een basis-analyse van semen volgens WHO-normen verricht dient te worden. In aanvulling hierop kan er een aantal optionele bepalingen verricht worden die buiten het bestek van dit artikel vallen.

Naast de invoering van een standaard semen-analyse is voor het waarborgen van de nauwkeurigheid een gedegen interne en externe kwaliteitscontrole noodzakelijk. De interne kwaliteitscontrole dient zich te richten op de vaardigheid van het personeel en de betrouwbaarheid van het gebruikte materiaal. Stockverdundingen van zaadcellen (in fixatief) of commercieel verkrijgbare latex beads kunnen regelmatig worden geteld door de analisten en met elkaar vergeleken. Voor de kwaliteitsbewaking van de morfologiebepalingen kan gebruik worden gemaakt van standaard preparaten die regelmatig opnieuw beoordeeld worden. De motiliteit is moeilijk te standaardiseren, echter het regelmatig gezamenlijk tellen van een vers preparaat kan hierin uitkomst bieden. Het doel is hier uiteraard om ingeslopen afwijkende of foutieve telmethodes op te sporen en nieuw personeel inzicht te geven in hun vaardigheid en vooruitgang. In de literatuur zijn enkele goede voorbeelden van interne kwaliteitscontrole voor semen-analyse te vinden (13,17,18,19). De betrouwbaarheid van het materiaal (met name de diepte van telkamers) laat nog al eens te wensen over (20). Telkamers dienen onderling vergeleken te worden om de exemplaren die onaanvaardbare afwijkingen vertonen op te sporen. Onze eigen ervaringen leerde ons dat afwijkingen in de resultaten van tellingen met verschillende kamers tot ongeveer 30% kunnen oplopen. Het is wellicht van belang hier te vermelden dat bij de vergelijking van twee tellingen, of het nu om twee onderzoekers of twee telkamers gaat, men niet mag uigaan van correlatiecoëfficiënten, maar dat men de gegevens dient te toetsen volgens de methode beschreven door Bland en Altman waarbij een vergelijking wordt gemaakt tussen de gemiddelde waarde en het verschil van twee metingen (21).

Indien een laboratorium veel semen-analyses verricht is het mogelijk om alle gemeten parameters per maand te middelen. De gegevens kunnen dan over langere perioden vergeleken worden zodat een systematische afwijking door een ingeslopen verandering (nieuw materiaal, methode of personeel) opgespoord kan worden (18).

In overleg met de European Society of Human Reproduction (ESHRE) zijn wij bezig met de opzet van een georganiseerde landelijke kwaliteitstoetsing voor de analyse van semen. Nog dit jaar hopen wij van start te gaan met het rondzenden van standaardmonsters voor de concentratiemeting (zaadcellen in fixatief en latex beads) en uitstrijkjes van semen voor de beoordeling van de morfologie. Voor de toetsing van de motiliteitsmetingen is vooralsnog geen goede methode voor handen. Het is de bedoeling deze rondzendingen 2 à 3 keer per jaar te laten plaatsvinden aan centra die zich hiervoor aanmelden. De resultaten van een eerste aanzet tot een dergelijke kwaliteitscontrole in Duitsland zijn gepubliceerd en lijken bemoedigend

(12). In Engeland is men hiermee eveneens van start gegaan, maar gegevens hiervan zijn helaas nog niet beschikbaar.

De standaardisatie van de semen-analyse kan alleen verwezenlijkt worden indien één voorschrift als uitgangspunt erkend wordt. Als andere methoden vergelijkbare uitslagen opleveren, dan zijn deze natuurlijk ook aanvaardbaar, maar hier dient dan ook daadwerkelijk een representatieve vergelijkende studie met de door de WHO gepropageerde methoden aan vooraf te gaan. De achtergronden, de praktijk en de waarde van hetgeen in het WHO-voorschrift wordt aanbevolen, worden sinds kort, in de vorm van een ééndaagse cursus, in Rotterdam behandeld. De opzet hiervan is interactief van aard en gericht op teams van klinisch chemici en één (of meerdere) analist(en) zodat het niet alleen een introductie van het WHO-voorschrift beoogt, maar tevens de mogelijkheid biedt om de haalbaarheid en de klinische aspecten van de standaardisatie van het semenonderzoek aan een kritische blik te onderwerpen. Het uiteindelijke doel is om dezelfde kwaliteitseisen die voor andere laboratoriumbepalingen gelden toe te passen op de routine semen-analyse, zodat een eventuele mannelijke factor binnen een relatie met onvervulde kinderwens efficiënt opgespoord kan worden en dat, als artificiële fertilisatietechnieken nodig blijken, een verwijzing en/of behandeling doelmatig kan geschieden.

Literatuur

1. The ESHRE Capri Workshop Group. Male sterility and subfertility: Guidelines for management. *Human Reproduction* 1994; 9: 1260-1264.
2. Farley TMM. WHO workshop on the infertile couple. XIth world congress for the international federation of fertility societies. Singapore 1986.
3. Comhaire FH, Kretser D de, Farley TMM, Rowe RJ. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl* 1987; suppl 7:1-53.
4. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ. WHO manual for the standardized investigation of the infertile couple. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK, 1993.
5. Comhaire FH, Vermeulen L, Schoonjans F. Reassessment of the accuracy of traditional sperm characteristics and adenosine triphosphate (ATP) in estimating the fertilizing potential of human semen in vivo. *Int J Androl* 1987; 10: 653-662.
6. Barratt CLR, Tomlinson MJ, Cooke ID. Prognostic significance of computerised motility analysis for in vivo fertility. *Fertil Steril* 1993; 60: 520-525.
7. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in the infertile couple. I: Study of sperm characteristics. *Int J Androl* 1988; 11: 379-394.
8. Polansky FF, Lamb EJ. Do the results of semen analysis predict future fertility? A survival analysis. *Fertil Steril* 1988; 49: 1059-1065.
9. Comhaire FH. Simple model and empirical method for the estimation of spontaneous pregnancies in couples consulting for infertility. *Int J Androl* 1987; 10: 671-680.
10. Bostofte E, Bagger P, Michael A, Stakemann G. Fertility prognosis for infertile men: results of follow-up study of semen analysis in infertile men from two different populations evaluated by the Cox regression model. *Fertil Steril* 1990; 54: 1100-1106.

11. Eimers JM, Velde ER te, Gerritse R, Vogelzang ET, Looman CWN, Habbema JDF. The prediction of the chance to conceive in subfertile couples. *Fertil Steril* 1994; 61: 44-52.
12. Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990; 54: 308-314.
13. Cooper TG, Neuwinger J, Bahrs S, Nieschlag E. Internal quality control of semen analysis. *Fertil Steril* 1992; 58: 172-178.
14. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3e ed. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK. 1992.
15. Jequier AM, Ukombe EB. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol* 1983; 55: 434-436.
16. Mortimer D, Shu MA, Tan R, Mortimer ST. A technical note on diluting semen for the haemocytometric determination of sperm concentration. *Human Reproduction* 1989; 4: 166-168.
17. Dunphy BC, Kay R, Barratt CLR, Cooke ID. Quality control during conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl* 1989; 10: 378-385.
18. Knuth UA, Neuwinger J, Nieschlag E. Bias to routine semen analysis by uncontrolled changes in laboratory environment-detection by long-term sampling of monthly means for quality control. *Int J Androl* 1989; 12: 375-383.
19. Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and motility counts in semen analysis. *Human Reproduction* 1986; 1: 299-303.
20. Ginsburg KA, Armant DR. The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration

and movement measurements obtained by Manual and videomicrographic analysis. *Fertil Steril* 1990; 53: 882-887.

21. Bland MJ, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; i: 301-310.

Summary

Standardization of semen analysis. Roijen JH van, Vreeburg JTM, Kluit MW, Pierik F, Dohle GR and Weber RFA. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 209-212.

Semen analysis is the basis for the diagnostic work-up of male factor subfertility. It has been recognized for several years that the inter- and intra-observer variation is considerable due to the absence of a standardized protocol and quality control programs. With the advent of highly sophisticated artificial fertilization techniques, clinically important decisions are now being made on the basis of small differences in semen quality. It is, therefore, imperative that semen analysis be performed with precision and with the use of a standardized protocol. The World Health Organization (WHO) has published a manual which already serves as a standard for semen analysis in a large part of the world. It seems logical to use this manual as a basis for standardization in The Netherlands. Courses on standardized semen analysis are now being organized in Europe (also in The Netherlands) through an initiative by the The European Society for Human Reproduction (ESHRE) for heads of laboratory and technicians using the WHO manual as a guideline.

Key-words: standardization, andrology, laboratory, semen analysis, quality control, WHO manual

Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 212-216

Bepalingen met de ACS: 180™ direct uit de bloedafnamebuis

J.D. OOSTING, F.J. VISSER en A.P.M. SCHELLEKENS

In 1993 is het "automated chemiluminescence system: 180™" (ACS) van Ciba Corning in het Algemeen Klinisch Laboratorium van het Catharina ziekenhuis in gebruik genomen. Er is onderzocht of monsternamen door de ACS direct uit het serum boven de cellen in de barcode gelabelde bloedafnamebuis (primaire buis), geen nadelige effecten heeft op de resultaten van de prolactine, LH, FSH, vrij T4, totaal T3, TSH, ferritine, vitamine B12 en folaat bepalingen. Verder is er gekeken naar de invloed van het gedurende langere tijd bewaren van het serum (op de bloedcellen) in de afnamebuis. Om dit te onderzoeken is van 17 gezonde vrijwilligers bloed afgenomen in

glazen buizen. Na stolling en centrifugatie zijn de buizen, zonder eerst het supernatant over te pipetteren, rechtstreeks in de rotor van de ACS geplaatst en zijn de bepalingen met het serum verricht. Daarna zijn de buizen bij kamertemperatuur bewaard en zijn na 6 en 24 uur de bepalingen opnieuw gedaan. Hoewel er bij sommige bepalingen significante effecten gevonden werden, kan er geconcludeerd worden dat het voor de klinische interpretatie van de resultaten geen nadelige effecten heeft om de bepalingen direct uit de afnamebuis te verrichten, mits de bepalingen binnen 6 uur afgehandeld worden.

Trefwoorden: hormoon stabiliteit, pré-analytische monsterbehandeling, binding-assays

Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven

Correspondentie: Dr. J.D. Oosting, Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Postbus 1350, 5602 ZA Eindhoven.

Ingekomen: 23.06.94

De laatste jaren is de automatisering steeds meer ingevoerd in het laboratorium. Ook in de endocrinologie heeft deze tendens zich voortgezet. Mechanisering van pipetteerstappen en wasprocedures voor ligand-binding-bepalingen is al langer bekend en