# Region Kalmar län METODBESKRIVNING

Klinisk kemi och transfusionsmedicin 2019-10-11

Kalmar och Västervik Metod i rutin:

 K 1974-06-01,

 V 1981-12-22

 **Ejakulatundersökning vid fertilitetsutredning**

Ejak-volym: NPU03412

Ejak-viskositet: NPU03408

Ejak-utseende: NPU03992

Ejak-progressiv rörlighet: NPU29352

Ejak-total rörlighet: NPU57216

Ejak -spermiekoncentration: NPU57231

Ejak- totalantal spermier per ejakulat: NPU03454

Ejak-runda celler: NPU08718

Ejak- leukocyter: NPU02595

**Medicinsk** Utredning med provtagning och analys av sperma görs vid infertilitets-

**bakgrund** utredningar. Ca 40 % av all barnlöshet anses bero på orsaker hos mannen. Spermatogenesen sker i testiklarna, är beroende av flera hormoner (LH, FSH och testosteron) och tar drygt 2 månader. Vid sädesuttömningen (ejakulationen) transporteras spermierna från bitestiklarna, där de lagrats, via sädesledarna till urethra där de blandas med sekreten från prostata och sädesblåsor. Det spermierika bitestikelsekretet utgör bara någon procent av den totala volymen sädesvätska.

Om den totala mängden rörliga, levande spermier är låg, om spermierna har avvikande utseende (morfologi), eller om det finns tecken på infektion eller förekomst av antikroppar kan fertiliteten hos mannen vara nedsatt. En graviditet kan dock inträffa trots lågt antal spermier i mannens sperma.

Total avsaknad av spermier (*azoospermi)*, lågt antal spermier (*oligozoospermi)*, spermier med dålig rörlighet (*astenozoospermi)* eller uteblivet ejakulat vid orgasm *(aspermi)*) kan bero på bl. a. endokrin påverkan (hypogonadotrop hypogonadism), genetiska eller utvecklingsmässiga varianter, miljöfaktorer (strålning, läkemedel), genomgångna infektioner, trauma eller andra sjukdomar (cystisk fibros, diabetes, MS, ryggmärgsskada, mm).

Absolut infertilitet förekommer nästan bara vid permanent azoospermi, aspermi och vid den ovanliga sjukdomen Kartageners syndrom (alla spermierna är orörliga) (1,2).

## Analysprincip I basal spermaanalys ingår följande:

**Makroskopisk undersökning**består av volym, likvifiering, viskositet, utseende och lukt.

Mikroskopisk undersökning omfattar bestämning av koncentration, totalantal, rörlighet, vitalitet samt analysering/bedömning av runda celler och leukocyter (4).

**Förberedelse** Provtagning bör ske efter 2-5 dagars avhållsamhet.

**av patient** Patienten erhåller särskilda provtagningsanvisningar (3,4,7).

**Provtagning och** Provet ska åstadkommas genom masturbation. Kondom får ej använ-

**provhantering** das vid uppsamling.

Det är viktigt att hela provmängden kommer med och särskilt den första delen av ejakulatet. Prov skyddas från kyla och värme, och får ej förvaras < 20° C eller > 40° C vid transport till laboratoriet. Analys ska utföras på färskt prov inom 90 min, i undantagsfall kan analysering utföras inom 120 minuter (1,3,4).

**Apparatur och** Plastburk med lock *alternativt* graderat plaströr med skruvkork och tratt.

**tillbehör** Våg med 1 eller flera decimaler

Precisionspipett

#  Spetsar

 Objektglas med eller utan mattrand

 Utstrykningsglas

Räknekammare: Maklerkammare, engångs CellVision från NordicCell 20 µm 10 x 10 grid, artnr 50001

*För Kalmar gäller:* Bürkersräknekammare, (se separat metod för denna kammare).

#  Mikroskop

#  Vagga eller cirkulationsblandare

#  Cellräknare

**Reagens** *För Kalmar gäller:*

 Spädningslösning av spermier

 NaHCO3 50 g

 Formaldehyd, 30-40 % 10 mL



 Löses i och spädes till 1000 mL med avjoniserat vatten.

 Filtreras och förvaras i en ren flaska.

 Förvaras i kylskåp.

 Hållbar ca 12 månader (3).

##

**Miljöaspekter** Prover och provavfall bör betraktas som potentiellt infektiöst och behandlas som biologiskt riskavfall.

**Kalibrering** Utföres ej.

**Spårbarhet** Saknas.

**Kontrollprover** Saknas.

**Utförande**  Provet kvitteras in i Flexlab när beställning är utfört via Cosmic eller registrera om pappersremiss används när det anländer till laboratoriet samt ange ankomsttid i protokollet.

 Volym:

 Volymbestämning kan utföras via vägning av provet med våg, och anges med 1 decimal. Nollställ antingen vågen med tom behållare av samma sort innan vägning eller dra ifrån vikten på behållare som vägts in tidigare (8).

 Andra alternativet är att hälla över provet i ett graderat centrifugrör och avläsa samt notera volymen med en decimal (eventuellt avläses volymen direkt i röret om provtagning utförts i ett graderat provtagningsrör).

 Likvifiering:

 Låt provet vagga eller snurra minst 20 minuter tills det är homogent utan synliga större klumpar.

Normalt prov ska vara fullständigt homogent efter 30 till 40 minuter.

Mycket små gelé-klumpar får förekomma.

Mycket sega och slemmiga prov bör lösas upp efter ytterligare vaggning/blandning men i högst 60 minuter. Kontrollera provet efter 40 minuter och om det fortfarande är segt och slemmigt fortsätt ytterligare till 60 minuter.

Är provet fortfarande segt eller slemmigt efter 60 minuters vaggning/blandning kommenteras detta vilket tyder på ett onormalt prov.

Begär eventuellt ett nytt prov (4).

Tidpunkt för analys:

 Anteckna tid när analysering påbörjas.

 Kommentera i remisskommentar om provet är starkt illaluktande eller luktar urin (4).

 Viskositet/Utseende:

 Viskositet och utseende/färg bedöms och kommenteras (4).

 Rörlighet räknas i %:

Lägg upp 2 likvärdiga droppar välblandad seminalplasma på olika ställen på ett objektglas och lägg över täckglas på båda dropparna.

Välj ut en tårtbit på en av dropparna, 1/8 eller ¼ del av synfältet (eller eventuellt större eller mindre tårtbit beroende på antal spermier) och räkna de **snabba progressiva A och långsammare progressiva B** spermierna först vilka ska utgöra den största delen av procentsatsen.

Räkna sedan **icke progressiva C (ej snabba nästan orörliga) och orörliga spermier D.** Räkna 100 spermier totalt som anges i procent. Icke progressiva spermier **C** ska eller bör enbart utgöra ca 5 % av totala 100 stycken spermier.

 Justera med den största gruppen om summan inte är 100 %.

 *Progressiv rörlighet:* A och B

 *Total rörlighet:* A + B + C (4,5).

Spermiekoncentration:

Utföres med hjälp av Makler engångskammare/CellVision 20 µm

10 x 10 grid. Tillsätt 5 µL välblandad seminalplasma till högra sidan av täckglaset i kammare A eller B och, vänta 10 sek och mikroskopera skyndsamt med 40 x objektiv. För att erhålla antal miljoner spermier per mL så räknas 10 rutor och dividera resultatet med 2 = antal x 106/mL. Vid rikligt antal spermier räkna endast 5 rutor (4).

 *För Kalmar gäller:*

 Gör en spädning beroende på antal spermier (uppskattning i motilitetbedömningen).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Spermierper synfältx 40 objektiv | Spädning | SpermaμL | LösningμL |
|  |  < 15 | 1+4 (1:5) | 100 | 400 |
|  |  15-40 | 1+9 (1:10) | 50 | 450 |
|  |  40-200 | 1+19 (1:20) | 50 | 950 |
|  |  > 200  | 1+49 (1:50) | 50 | 2450 |

 Tag upp korrekt volym av den välblandade sperman med en preci-

 sionspipett. Torka av utsidan av pipetten utan att påverka volymen inne i spetsen.

 Överför denna exakta volym till spädningslösningen och skölj ett par gånger.

 Skaka omedelbart spädningen på en Vortexmixer minst 15 sekunder.

 Fyll räknekammaren med 10 μL spermielösning på vardera sidan. Lägg kammaren i en fuktig petriskål 15 –20 minuter, för att spermierna ska sedimentera (3).

 Antal miljoner spermier/ mL:

 Räkna 2 A-rutor och ta medelvärdet.

 1 A-ruta = 1/10 μL

 *Uträkning av antal spermier (gäller enbart för Kalmar):*

Medelvärdet (1 A ruta) x 10 x spädning/1000 = antal miljoner /mL (3)

Totalantal:

Antal miljoner spermier/mL (ovan) multipliceras med volymen i mL (med en decimal) = antal x 106 spermier per ejakulat (4).

Runda celler:

Räknas efter att man bedömt spermiekoncentrationen i Maklerkammare i samma upplägg. Räkna 10 rutor och dividera med 2 vilket ger antalet x 106/mL.

Till runda celler hör leukocyter eller omogna (runda) spermier som ej fullgjort spermiogenesen.

> 5 x 106/mL runda celler inkluderar leukocyter samt celler från spermatogenesen ( spermatogonier, spermatocyter och spermatider) (4).

Leukocytbedömning:

 Observeras > 5 x 106/mL runda celler doppas en Combursticka i provet. Maxutslag (röd-lila) på Comburstickan indikerar förekomst av > 0,5 x 106/mL peroxidaspositiva leukocyter och motsvarar > 1 x 106/mL, vilket kan tyda på inflammation i genitalvägarna (leukospermi). Enligt WHO ska antalet leukocyter i sperma understiga 1 x 106/mL (4).

**Beräkning** Se utförande.

**Svarsrutin** Analys Enhet

 Tidpunkt för analys Kl.

 Ejak-volym i mL och anges med en decimal

#  Ejak-viskositet normalt, tunt, segt

#  Ejak-utseende normalt, grumligt, blodigt, gult

 *Ejak-rörlighet:*

 Progresiva spermier A + B i heltal som %

 Total rörlighet A + B + C i heltal som %

#  Ejak-spermakoncentration i heltal som x 106/mL

#  Ejak-total spermakonc. per ejakulat i heltal som x 106

#  Ejak-runda celler i heltal som 106/mL

#  Ejak-leukocyter i heltal som 106/mL (1,4,6)

#

**Interferenser** Då tillblandning av de sekundära könskörtlarnas sekret sker sekventi-

**och felkällor** ellt under ejakulationen kan ofullständig tömning ge abnormt hög andel prostatasekret. Om den första delen av ejakulatet inte kommer med i provet, blir bilden i stället dominerad av sekretionsprodukter från sädesblåsorna. Vid korrekt provtagning och analys ses ren prostatabild endast i något fall på tusen (1).

**Bedömning** Avvikelser uppåt på referensintervallet innebär sannolikt ingen nedsatt fertilitet. Ejakulatutseende och likvifieringsgrad bedöms liksom utseende. Rödaktigt eller brunaktigt utseende kan vara tecken på blodtillblandning. Gulaktig färgton kan vara tecken på lång abstinens eller ikterus. Finns förekomst av klumpar i ejakulatet? Hög viskositet (konsistens) interfererar med beräkning av spermierörlighet, koncentration och antikroppsförekomst. Ejakulatvolymen speglar tillståndet i de accessoriska könskörtarna. Antal levande spermier, rörlighet och antalet spermier med avvikande morfologi bedöms. Ett högt antal vita blodkroppar i ejakulatet kan vara tecken på infektion och patienten kan då få antibiotikabehandling. Ett betydande antal män är infertila trots att spermieanalysen gett ett normalt resultat. En orsak till att analys av sperman från infertila män inte identifierar orsaken till deras infertilitet beror på att många av de enskilda orsakerna till infertilitet inte är helt klarlagda (1).

**Referensintervall** Analys Ref. intervall

 Ejak-volym ≥ 1,5 mL

#  Ejak-viskositet normalt

 Ejak-utseende normalt

#  *Ejak-rörlighet:*

 Progresiva spermier A + B: ≥ 32 %

 Total rörlighet A + B + C ≥ 40 %

 Ejak-spermieakoncentration ≥ 15 x 106/mL

#  Ejak-totalantal spermier per ejakulat ≥ 39 x 106

#  Ejak-runda celler < 5 x 106/mL

Ejak-leukocyter < 1 x 106/mL

**Kvalitetssäkring** Kvalitetssäkring sker enligt denna metodbeskrivning.

**Metodvalidering/** Riktighet

**verifiering** Uppgifter om metodens riktighet finns under rubriken Interferenser samt i metodens bakgrundsdokumentation.

# **Referenser** 1. Nilsson-Ehle P, Berggren Söderlund M, Theodorsson E et al.

# Laurells klinisk kemi i praktisk medicin, 9:e uppl. 2012: 586-9.

 2. Nomenklatur för några spermieparametrar, RMC Kvinnokliniken Universitetssjukhuset i Linköping, version 1, 2008-06-19.

 3. Manual on Basic Semen Analysis 2002 (NAFA and ESHRE-SIGA). Kurslitteratur från Grundläggande sperma-analysutbildning, Karolinska sjukhuset 2010/RR. Final version 2002-03-11:

 1, 4; 7; 12-17.

 4. Spermaprovsanalys och vasektomi, kriterier och metodik, RMC

 Kvinnokliniken Universitetssjukhuset i Linköping, version 3,

 2019-02-25.

 5. Kurs i grundläggande spermaanalys, Karolinska sjukhuset 2010 /RR)

 6. Spermaundersökning, basal. Klinisk kemi, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping. Version 1, 2015-01

 7. Provtagningsanvisningar till Fertilitetslaboratoriet RMC Kvinnokliniken Universitetssjukhuset i Linköping.

 8. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 2.3.4 semen volyme. FIFTH Edition.

**Författare** Metoden är sammanställd av R Rosenqvist, Raja Ericsson och M Carlsson.