



ΑΝΗΡ

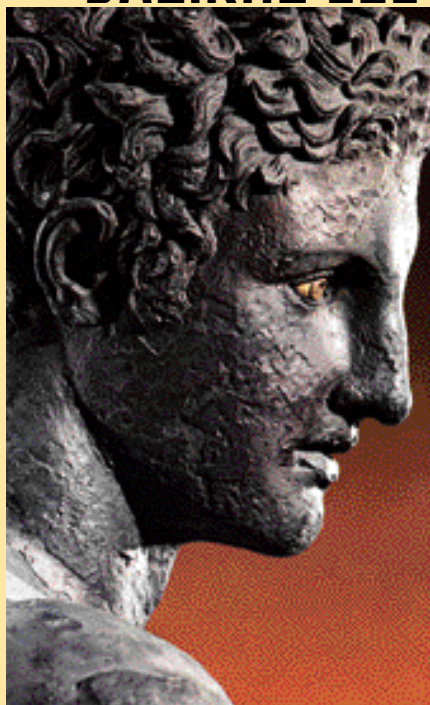
ΕΠΙΣΗΜΗ ΕΚΔΟΣΗ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

OFFICIAL JOURNAL
OF THE HELLENIC SOCIETY OF
ANDROLOGY

ΤΟΜΟΣ 5ος • ΤΕΥΧΟΣ 3ο • ΙΟΥΛΙΟΣ-ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ-ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2003

αφιέρωμα:

- **ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΑ ΕΣΗΡΕ:
ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ
ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ 1^ο ΜΕΡΟΣ**



ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

ΠΛΗΡΩΜΕΝΟ
ΤΕΛΟΣ
Ταχ. Γραφείο
ΚΕΜΠ.ΑΘ.



ΕΝΤΥΠΟ ΚΛΕΙΣΤΟ ΑΡ.ΑΔ. 797/94 ΚΕΜΠ. ΑΘ.

MEDLINE, ΖΑΝ ΜΩΡΕΑΣ 114, 152 31 ΧΑΛΑΝΔΡΙ

ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ - ΕΚΔΟΤΗΣ:

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ

Ενδοκρινολογικό Τμήμα Νοσοκομείου "ΕΛΕΝΑ ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ"

Πλατεία Ε. Βενιζέλου 2 - Αθήνα 115 21

Τηλ. 010 64 11156 - 010 6402179 - Fax : 010 6411156

Copyright - Ελληνική Ανδρολογική Εταιρεία**Συντ. Τίτλος** - Ανήρ**ISSN** 1108-3522**ΕΚΔΟΤΗΣ:** Δ.Α.Αδαμόπουλος

Τριμηνιαία έκδοση.

Εκδίδεται σε 2000 αντίτυπα.

Επιμέλεια εκτύπωσης, σελιδοποίηση: MEDLINE

"ANIR" is published quarterly as the official Journal of the Hellenic Society of Andrology

Copyright : Hellenic Society of Andrology**Short title:** ANIR**ISSN** 1108-3522**Correspondance:** D.A. Adamopoulos, MD, Endocrine Department

"Elena Venizelou" Hospital, 2, E. Venizelou Square, 115 21 Athens, Greece

Tel : 010 6411156, 010 6402179, Fax : 010 6411156

E-mail:hel-soc-andro@ath.forthnet.gr

Το περιοδικό "ANHP" είναι η τριμηνιαία έκδοση της Ελληνικής Ανδρολογικής Εταιρείας. Σκοπό έχει την ενημέρωση των ιατρών πάνω σε θέματα που αφορούν την Ανδρολογία. Τα άρθρα που δημοσιεύονται αφορούν τον ευρύ τομέα του ενδιαφέροντός της, από τη μοριακή και γενετική πλευρά ως το νεοαναδυόμενο πεδίο των προβλημάτων στον γηράσκοντα άνδρα. Στα περιεχόμενα θα περιλαμβάνονται ανασκοπήσεις, άρθρα σύνταξης, ερευνητικές εργασίες, ενδιαφέροντα περιστατικά αλλά και παρουσιάσεις εκ των δραστηριοτήτων της Εταιρείας με κείμενα συμποσίων, στρογγύλων τραπεζών, διαλέξεων, που θα διοργανώνει η Εταιρεία. Τέλος, μέσω του περιοδικού θα προβάλλονται αξιόλογες εργασίες δημοσιευμένες στα διεθνή περιοδικά ενώ θα γίνεται και ενημέρωση για γεγονότα και εκδηλώσεις που αφορούν την Ανδρολογία στον Ελληνικό και διεθνή χώρο.

ANHPΕΠΙΣΗΜΗ ΕΚΔΟΣΗ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ**ANIR**OFFICIAL JOURNAL
OF THE
HELLENIC SOCIETY OF ANDROLOGY**COPYRIGHT**

Τα δημοσιευμένα άρθρα είναι ιδιοκτησία του περιοδικού "ANHP" και απαγορεύεται μερική ή ολική αναδημοσίευσή τους χωρίς την έγγραφη συγκατάθεση του Διευθυντού Σύνταξης. Για την αναπαραγωγή εικόνων, σχεδίων και πινάκων απαιτείται επίσης σχετική έγκριση και αναφορά της πηγής.

ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ

Ε. Κούκκου,

Ενδοκρινολογικό Τμήμα Νοσοκομείου "ΕΛΕΝΑ ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ"

ΔΙΑΦΗΜΙΣΕΙΣ

Για καταχώρηση διαφημίσεων οι ενδιαφερόμενοι παρακαλούνται να επικοινωνούν με την Εταιρία **MEDLINE**, ΤΗΛ.: 210 6755473, 210 6773316, FAX: 210 6722849, e-mail: medline@otenet.gr (Υπεύθυνοι: Θανάσης Μάστορας, Χριστίνα Τσαρούχα).

**ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ: Ιωάννης Παπαδήμας, *Ενδοκρινολόγος*
ΑΝΤΙΠΡΟΕΔΡΟΣ: Μιχαήλ Μπουρούνης, *Ουρολόγος*
ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ: Δημήτριος Γουλής, *Ενδοκρινολόγος*
ΤΑΜΙΑΣ: Ευτυχία Κούκκου, *Ενδοκρινολόγος*
ΜΕΛΗ: Ευαγγελία Βενάκη, *Ενδοκρινολόγος*
 Άλκης Καρανίκας, *Ουρολόγος*
 Κωνσταντίνος Μαυρομάτης, *Μαιευτήρας-Γυναικολόγος*

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αλεβιζάκη Μαρία *Ενδοκρινολόγος*
 Αναπλιώτου Μαργαρίτα *Ενδοκρινολόγος*
 Αρβανίτη Ηβη *Παθολογοανατόμος*
 Βαϊδάκης Νικόλαος *Ψυχίατρος*
 Βενάκη Ευαγγελία *Ενδοκρινολόγος*
 Ζεγκινιάδου Θεοδοσία *Βιολόγος*
 Θωμόπουλος Ανδρέας *Ενδοκρινολόγος*
 Καλοβιδούρης Άγγελος *Ακτινολόγος*
 Λιάπη Ανθή *Μαιευτήρας/Γυναικολόγος*
 Λυμπερόπουλος Γεώργιος *Βιολόγος/Βιοχημικός*
 Μηλίγκος Σπύρος *Μαιευτήρας/Γυναικολόγος*
 Μιχαλάκης Γεώργιος *Ουρολόγος*
 Μπαρμπαλιάς Γεώργιος *Ουρολόγος*
 Νικοπούλου Σταματίνα *Ενδοκρινολόγος*
 Πάγκαλος Κωνσταντίνος *Γενετιστής*
 Παπαδοπούλου Φωτεινή *Ενδοκρινολόγος*
 Παπαθανασίου Ζήσης *Μαιευτήρας/Γυναικολόγος*
 Παπανικολάου Αθανάσιος *Παθολογοανατόμος*
 Ταρλατζής Βασίλειος *Μαιευτήρας/Γυναικολόγος*
 Τσίγκος Κωνσταντίνος *Ενδοκρινολόγος*

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ:

Δ.Α. Αδαμόπουλος, *Ενδοκρινολόγος*

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΕΣ:

Δ. Πανίδης, *Ενδοκρινολόγος*

Ν. Σοφικίτης, *Ουρολόγος*

ΥΠΕΥΘΥΝΟΙ ΥΛΗΣ:

Κούκκου Ευτυχία, *Ενδοκρινολόγος*

Μαυρομάτης Κων/νος, *Μαιευτήρας-Γυναικολόγος*

ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΟΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

Το περιοδικό ANHP, έκδοση της Ελληνικής Ανδολογικής Εταιρείας έχει στόχο τη συνεχή επιμόρφωση των ασχολούμενων στο χώρο της Ανδρολογίας και την προαγωγή του γνωστικού αντικείμενου της στον ελληνικό χώρο. Για την πραγμάτωση αυτού του σκοπού δημοσιεύονται στο περιοδικό:

1. Άρθρα Σύνταξης. Σύντομες ανασκοπήσεις σε επίκαιρα και αμφιλεγόμενα θέματα, που γράφονται με προτροπή της συντακτικής επιτροπής. Όταν εκφράζουν συλλογικά τη Σύνταξη του περιοδικού, είναι ανυπόγραφα. Στις άλλες περιπτώσεις είναι ανυπόγραφα.

2. Γενικά θέματα. Σχετιζόμενα με την Ανδρολογία

3. Ανασκοπήσεις. Ολοκληρωμένες αναλύσεις ιατρικών θεμάτων, στις οποίες υπογραμμίζονται οι σύγχρονες απόψεις. Γίνονται δεκτές ανασκοπήσεις μέχρι δύο συγγραφέων.

4. Ερευνητικές εργασίες. Κλινικές δοκιμές ή μη πειραματικές έρευνες προοπτικού ή αναδρομικού χαρακτήρα, που πραγματοποιήθηκαν με βάση ερευνητικό πρωτόκολλο, το οποίο να περιγράφεται αναλυτικά στη μεθοδολογία. Περιέχουν πρωτοδημοσιευμένα αποτελέσματα.

5. Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις. Γίνονται δεκτά άρθρα εφόσον αφορούν νέα και πολύ σπάνια νοσήματα ή νοσήματα εμφανίζοντα ιδιαιτερότητες ως προς την κλινική τους εκδήλωση ή την διερευνητική τους προσπέλαση ή έχει ακολουθηθεί νέα θεραπευτική μεθόδευση με ελεγμένο το αποτέλεσμα. Επίσης στα άρθρα αυτά μπορούν να παρουσιασθούν πρωτότυπες περιπτώσεις προς συζήτηση με τους αναγνώστες του περιοδικού.

6. Επίκαιρα θέματα. Σύντομη περιγραφή των τελευταίων απόψεων σε συγκεκριμένα θέματα.

7. Πρακτικά από σεμινάρια και στρογγυλά τραπέζια ή κείμενα από διαλέξεις.

8. Περίληψη άρθρων της διεθνούς βιβλιογραφίας συνοδευόμενη από σύντομο σχόλιο. Δημοσιεύονται ανυπόγραφα.

9. Γράμματα προς τη Σύνταξη. Περιέχουν κρίσεις για δημοσιευμένα άρθρα, πρόδρομα αποτελέσματα εργασιών, παρατηρήσεις για ανεπιθύμητες ενέργειες, κρίσεις για το περιοδικό κ.λ.π. Δημοσιεύονται ανυπογράφως.

Προηγούμενη ταυτόχρονη δημοσίευση. Τα άρθρα που υποβάλλονται στο περιοδικό ANHP δεν μπορεί να έχουν υποβληθεί ταυτόχρονα για δημοσίευση σε άλλα Ελληνικά περιοδικά. Το γεγονός πρέπει να βεβαιώνεται από επιστολή - δήλωση του πρώτου συγγραφέα προς τον Διευθυντή Σύνταξης. Όμως επιτρέπεται η υποβολή εργασιών μέρος των οποίων έχει δημοσιευθεί ή παρουσιασθεί με μορφή περίληψης σε Ελληνικό ή Διεθνές Συνέδριο.

Όλα τα χειρόγραφα συνοδεύονται από επιστολή που υπογράφεται από τον υπεύθυνο για την αλληλογραφία συγγραφέα. Η συνοδευτική επιστολή πρέπει να περιλαμβάνει δήλωση ότι τα χειρόγραφα έχουν εγκριθεί και από όλους τους υπόλοιπους συγγραφείς οι οποίοι και συνυπογράφουν την επιστολή.

Προετοιμασία του χειρόγραφου. Η γλωσσική ομοιομορφία των άρθρων είναι απαραίτητη. Τα άρθρα που υποβάλλονται για δημοσίευση πρέπει να είναι γραμμένα στη δημοτική και με το μονοτονικό σύστημα.

Το περιοδικό ANHP έχει αποδεχθεί το σύστημα Vancouver και εφαρμόζει το ελληνικό πρότυπο γραφής βιοιατρικών κειμένων.

Τα άρθρα πρέπει να είναι δακτυλογραφημένα με διπλό διάστημα σε λευκό χαρτί, από τη μια πλευρά των σελίδων, με περιθώρια τουλάχιστον 2,5 cm. Τα εξής κεφάλαια αρχίζουν σε ιδιαίτερη σελίδα: η σελίδα με τον τίτλο, η περίληψη και οι λέξεις ευρετηρίου, το κείμενο, οι ευχα-

ριστίες, η αγγλική περίληψη, οι βιβλιογραφικές παραπομπές, οι πίνακες, οι εικόνες και οι λεζάντες των εικόνων. Όλες οι σελίδες αριθμούνται, αρχίζοντας από τη σελίδα τίτλου.

Σελίδα τίτλου. Περιλαμβάνει (α) τον τίτλο του άρθρου, ο οποίος πρέπει να είναι σύντομος (μέχρι 12 λέξεις), (β) το όνομα και τον τίτλο του συγγραφέα (-ων), (γ) το ίδρυμα ή το εργαστήριο, από το οποίο προέρχεται η εργασία και η προέλευση του συγγραφέα, (δ) το όνομα, τη διεύθυνση και το τηλέφωνο του συγγραφέα για αλληλογραφία και ανάτυπα, (ε) πηγές που ενδεχομένως ενίσχυσαν και βοήθησαν στην πραγματοποίηση της εργασίας, (στ) αν υπάρχουν διαφωνούντες με την εργασία.

Περίληψη και λέξεις ευρετηρίου. Η περίληψη δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 200 - 300 λέξεις, ενώ για τα επίκαιρα θέματα και τις περιγραφές περιπτώσεων ασθενών τις 150 - 200 λέξεις. Για τις ανασκοπήσεις πρέπει να εφαρμόζονται οι περιγραφικές περιλήψεις (descriptive), που αναφέρουν συνοπτικά όλα τα κεφάλαια που περιέχει το άρθρο και σημαντικά συμπεράσματα. Οι περιλήψεις των ερευνητικών εργασιών πρέπει να χωρίζονται σε τέσσερις παραγράφους, οι οποίες φέρουν κατά σειρά την ακόλουθη επικεφαλίδα. Σκοπός, Υλικό Μέθοδος, Αποτελέσματα, Συμπεράσματα. Μετά την περίληψη παρατίθενται 3 - 10 λέξεις κλειδιά. Οι λέξεις αυτές πρέπει να αντιστοιχούν στους διεθνείς όρους που χρησιμοποιεί το Index Medicus.

Κείμενο. Οι ερευνητικές εργασίες αποτελούνται συνήθως από την Εισαγωγή, Υλικό και μέγεθος, Αποτελέσματα και Συζήτηση. Η εισαγωγή περιλαμβάνει τις απαραίτητες βιβλιογραφικές παραπομπές και αναφέρει το λόγο για τον οποίο πραγματοποιήθηκε η εργασία.

Στη μεθοδολογία περιγράφεται το πρωτόκολλο, με βάση το οποίο εξελίχθηκε η έρευνα. Αναφέρονται λεπτομερώς ο τρόπος επιλογής ασθενών ή οποιουδήποτε υλικού, καθώς και η μέθοδος που εφαρμόστηκε, ώστε η ίδια έρευνα να μπορεί να αναπαραχθεί από μελλοντικούς ερευνητές. Στην περίπτωση ερευνών που αφορούν ανθρώπους, πρέπει να τονίζεται ότι η έρευνα πραγματοποιήθηκε με βάση την Υπουργική απόφαση Αριθ. Α6/10983/1 {ΦΕΚ 886/Β 20-12-84} για τη "Διεξαγωγή Κλινικών Δοκιμών φαρμάκων και την προστασία του ανθρώπου" και η οποία παραπέμπει στη Διακήρυξη του Ελσίνκι (1975). Οι φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη πρέπει να αναφέρονται με την κοινόχρηστη ονομασία τους. Περιγράφεται το υλικό που αξιολογήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης και το κεφάλαιο ολοκληρώνεται με τα στατιστικά κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ολοκληρωμένα και σύντομα. Όσα αναφέρονται σε πίνακες, δεν επαναλαμβάνονται στο κείμενο.

Στη συζήτηση περιγράφονται οι προοπτικές που διανοίγονται με τα αποτελέσματα της μελέτης, καθώς και τα τελικά συμπεράσματα. Δεν επαναλαμβάνονται όσα έχουν αναφερθεί στα αποτελέσματα. Επίσης, μπορεί να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων ομοειδών εργασιών. Συνδέονται τα αποτελέσματα με τους στόχους της μελέτης, αποφεύγονται όμως αυθαίρετα συμπεράσματα, που δεν προκύπτουν από τα αποτελέσματα της εργασίας.

Ευχαριστίες. Απευθύνονται μόνο προς τα άτομα, που έχουν βοηθήσει ουσιαστικά.

Στα υπόλοιπα είδη άρθρων, το κείμενο διαμορφώνεται ανάλογα με τις απαιτήσεις και τους στόχους του συγγραφέα. Στις ενδιαφέρουσες περιπτώσεις ασθενών προηγείται η εισαγωγή και ακολουθούν η περιγραφή της περιπτώσεως και η συζήτηση.

Βιβλιογραφικές παραπομπές. Αριθμούνται στο κείμενο με αύξοντα αριθμό, ανάλογα με τη σειρά που εμφανίζονται. Σε περίπτωση αναφοράς σε ονόματα συγγραφέων στο κείμενο, εφόσον είναι ξένοι, μετά το επώνυμο του πρώτου συγγραφέα ακολουθεί η συντομογραφία et al, ενώ στους Έλληνες συγγραφείς "και συν.". Εφόσον οι συγγρα-

φείς είναι δύο, μεταξύ των επωνύμων τοποθετείται η λέξη "και". Όλες οι βιβλιογραφικές παραπομπές του κειμένου - και μόνον αυτές - πρέπει να υπάρχουν στο βιβλιογραφικό κατάλογο.

Ο αριθμός των βιβλιογραφικών παραπομπών πρέπει να περιορίζεται στον τελειώς απαραίτητο. Στις ανασκοπήσεις, οι βιβλιογραφικές παραπομπές δεν πρέπει να είναι περισσότερες από 100. Στα άρθρα επικαιρότητας (επίκαιρα θέματα, άρθρα Σύνταξης) θα πρέπει να αναφέρονται μόνο 5-6 άρθρα ή μονογραφίες, για τα οποία ο συγγραφέας πιστεύει ότι είναι απαραίτητα για την ολοκληρωμένη πληροφόρηση του αναγνώστη στο θέμα.

Η σύνταξη του βιβλιογραφικού καταλόγου γίνεται αριθμητικώς, με βάση τον αύξοντα αριθμό και τη σειρά των βιβλιογραφικών παραπομπών στο κείμενο. Αναφέρονται τα επώνυμα και τα αρχικά των ονομάτων όλων των συγγραφέων μέχρι έξι (όταν είναι περισσότεροι ακολουθεί η ένδειξη et al), ο τίτλος της εργασίας, η συντομογραφία του τίτλου του περιοδικού, το έτος, ο τόμος, η πρώτη και η τελευταία σελίδα της δημοσίευσης π.χ. You CH, Lee KY, Chey WY, Menguy R. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea. *Gastroenterology* 1980, 79:311 - 314.

Σε περίπτωση που δεν αναφέρεται όνομα συγγραφέως, σημειώνεται η λέξη Ανώνυμος (για ελληνική δημοσίευση) ή Anonymous Π.χ. Anonymous. Coffe drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J* 1981, 283:628.

Παραπομπές που αναφέρονται σε εργασίες που δημοσιεύονται σε συμπληρώματα (supplements) εκδόσεων, πρέπει να συνοδεύονται με τον αριθμό του συμπληρώματος, που σημειώνεται σε παρένθεση, μετά τον τόμο. Π.χ. *Blood*, 54 (Suppl 1):26. Οι συντμήσεις των τίτλων των περιοδικών πρέπει να γίνονται με βάση το *Index Medicus*. Δεν τοποθετούνται τελείες στα ακρώνυμα των συγγραφέων και στις συντμήσεις των περιοδικών. Στη βιβλιογραφία των επίκαιρων θεμάτων, παραλείπονται οι τίτλοι των εργασιών. Για την καταχώρηση συγγραμμάτων ή μονογραφιών στο βιβλιογραφικό κατάλογο, αναφέρονται στη σειρά τα επώνυμα και τα αρχικά των συγγραφέων, ο τίτλος, ο αριθμός εκδόσεως, ο εκδότης, η πόλη εκδόσεως, το έτος και οι σελίδες της αναφοράς. Η αναφορά σε κεφάλαιο βιβλίου πρέπει να γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο: Παπαβασιλείου ΙΘ. Πρωτόζωα. Στο: Παθογόνοι μύκητες και παράσιτα. ΒΗΤΑ, Αθήνα, 1983:67 - 113.

Αν η βιβλιογραφική παραπομπή αποτελεί κεφάλαιο συγγραμματος που έχει γραφτεί από άλλον συγγραφέα, η αναφορά γίνεται ως εξής: Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: (Στο): Sodeman WA ed (:h eds ;h Συντ.) *Pathologic Physiology*. Saunders, Philadelphia, 1987: 457-472.

Μη δημοσιευμένες εργασίες καθώς και "προσωπικές επικοινωνίες" δεν χρησιμοποιούνται ως βιβλιογραφικές παραπομπές. Άρθρα, που έχουν γίνει δεκτά για δημοσίευση, μπορούν να περιληφθούν στη βιβλιογραφία. Στην τελευταία περίπτωση, μετά τη συντομογραφία του περιοδικού σημειώνεται η ένδειξη "υπό δημοσίευση".

Αγγλική περίληψη. Περιλαμβάνει τα ονόματα των συγγραφέων και την ιδιότητά τους, τον τίτλο της εργασίας και το ίδρυμα ή το εργαστήριο από το οποίο προέρχεται η εργασία. Η περίληψη δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 200 - 300 λέξεις, ενώ για τα επίκαιρα θέματα και τις περιγραφές περιπτώσεων ασθενών τις 150 - 200 λέξεις. Για τις ανασκοπήσεις πρέπει να εφαρμόζονται οι περιγραφικές περιλήψεις (descriptive), που αναφέρουν συνοπτικά όλα τα κεφάλαια που περιέχει το άρθρο και σημαντικά συμπεράσματα. Οι περιλήψεις των ερευνητικών εργασιών πρέπει να χωρίζονται σε τέσσερις παραγράφους, οι οποίες φέρουν κατά σειρά την ακόλουθη επικεφαλίδα. Aim, Material, Methods, Results, Conclusions. Μετά την περίληψη παρατίθενται 3-10 λέξεις, απαραίτητες για τη σύνταξη των ευρετηρίων του περιοδικού (Key words).

Η ποιότητα των αγγλικών περιλήψεων πρέπει να είναι αρκετά ικανοποιητική, επειδή αποτελεί σημαντικό κριτήριο αποδοχής του περιοδικού στους διεθνείς καταλόγους βιοιατρικών περιοδικών (*Index Medicus*).

Αρίθμηση κεφαλαίων σε ανασκοπήσεις, επίκαιρα θέματα. Όλα τα κεφάλαια αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς: 1,2,3 κλπ. Τα υποκεφάλαια φέρουν τον αριθμό του αρχικού κεφαλαίου, τελεία και ακολουθεί ο αριθμός του υποκεφαλαίου: 1.1., 1.2 ή 1.1.1., 1.2.1. κ.ο.κ.

Πίνακες. Δακτυλογραφούνται με διπλό διάστημα, σε χωριστή σελίδα. Αριθμούνται με τη σειρά που εμφανίζονται στο κείμενο, με αραβικούς αριθμούς. Πρέπει να φέρουν περιεκτική και σύντομη επεξήγηση, ώστε για την κατανόησή τους να μην είναι απαραίτητο να καταφύγει ο αναγνώστη στο κείμενο. Κάθε στήλη φέρει επεξηγηματική και σύντομη επικεφαλίδα. Οι επεξηγήσεις των συντομογραφιών καθώς και οι λοιπές διευκρινίσεις γίνονται στο τέλος του πίνακα.

Εικόνες. Τα σχήματα, σχεδιασμένα με σιλική μελάνη, και οι φωτογραφίες πρέπει να στέλνονται στο πρωτότυπο, ώστε να είναι κατάλληλα για άμεση φωτογραφική αναπαραγωγή και εκτύπωση. Στο πίσω μέρος τους να γράφονται με μολύβι ο αριθμός της εικόνας, ένα βέλος που να δείχνει το άνω μέρος και οι συγγραφείς. Τοποθετούνται σε φάκελο, ανάμεσα σε δύο σκληρά χαρτόνια, για να μην τσακιστούν στη μεταφορά. Οι τίτλοι των εικόνων πρέπει να αναγράφονται με τον αριθμό που αντιστοιχεί στην εικόνα σε χωριστό χαρτί. Επεξηγήσεις σχετικές με τις εικόνες μπορούν να αναφερθούν στον τίτλο. Για το μέγεθος των εικόνων συμβουλευθείτε το σχήμα του περιοδικού. Εφόσον χρησιμοποιούνται φωτογραφίες ασθενών, το πρόσωπο δεν πρέπει να φαίνεται. Στην αντίθετη περίπτωση επιβάλλεται έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς για τη δημοσίευση της φωτογραφίας. Όλες οι εικόνες αναφέρονται στο κείμενο και αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς.

Ονοματολογία. Οι συγγραφείς πρέπει να χρησιμοποιούν τους παγκοσμίως παραδεκτούς τίτλους. Για την επιλογή των όρων και των ονομάτων (ουσιών, οντοτήτων, οργανισμών, νοσημάτων κ.λπ.), κρίνεται σκόπιμο οι συγγραφείς να συμβουλευθούν το Λεξιλόγιο Βιοιατρικής Ορολογίας, MeSH-ΕΛΛΑΣ. Εκδοση ΙΑΤΡΟΤΕΚ, Αθήνα, 1991.

Μετρήσεις. Μετρήσεις μήκους, ύψους, βάρους και όγκου πρέπει να αναφέρονται σε μετρικές μονάδες (μέτρο, χιλ., λίτρο) ή στις υποδιαιρέσεις τους. Οι θερμοκρασίες πρέπει να δίνονται σε βαθμούς Κελσίου. Οι αρτηριακές πιέσεις πρέπει να δίνονται σε χιλιοστά στήλης υδραργύρου.

Διόρθωση τυπογραφικών δοκιμών. Πραγματοποιείται μία φορά από τους συγγραφείς. Εκτεταμένες μεταβολές δεν γίνονται δεκτές.

Ανάτυπα. Απαγορεύεται η φωτοτυπική αναπαραγωγή των δημοσιευμένων εργασιών. Η προμήθεια από τους συγγραφείς ανατύπων γίνεται αποκλειστικά από την εταιρεία MEDLINE. Οι συγγραφείς επιβαρύνονται με το κόστος τους. Τα ανάτυπα παραγγέλλονται κατά τη διόρθωση των δοκιμών.

Χειρόγραφα εργασιών που δημοσιεύονται, δεν επιστρέφονται στους συγγραφείς.

Υποβολή χειρογράφου: Τα χειρόγραφα αποστέλλονται στη διεύθυνση: Δ.Α. ΑΔΑΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΑΝΗΡ

ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ-ΠΓΝ ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟ "ΕΛΕΝΑ ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ"

ΠΛ. Ε. ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ 2 -115 21 ΑΘΗΝΑ

Η εργασία ταχυδρομείται σε φάκελο από χοντρό χαρτί, εσωκλείοντας τις φωτογραφίες και τη δισκέτα (εφ' όσον υπάρχει) μέσα σε σκληρό χαρτόνι. Εάν η αποστολή γίνεται μέσω των Ελληνικών Ταχυδρομείων να μην ακολουθείται συστημένη διαδικασία.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

- 119** Σημείωμα Σύνταξης
- 121** Γνωστοποίηση από NAFA-ESHRE
- 123**Πρόλογος
 - 124**Εισαγωγή
 - 125**Περιεχόμενα
 - 126-128**Σημείωμα συντακτών της Μονογραφίας
- 129** Μονογραφία ESHRE: Εγχειρίδιο βασικής εξέτασης σπέρματος
.Μέρος 1°
- 129-134**Εξέταση σπέρματος: επισκόπηση
 - 135-141**Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων
 - 142-144**Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων
 - 145**Η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων
- 146** Προσεχείς εκδηλώσεις
- 147** Διεθνές Συμπόσιο: "Genetics of the Male Infertility: from Research to Clinic".
- 149** 3° Ευρωπαϊκό Συνέδριο Ανδρολογίας

ΕΠΟΜΕΝΟ ΤΕΥΧΟΣ (Τόμος 5, Τεύχος 4)

Μονογραφία ESHRE: Εγχειρίδιο βασικής εξέτασης σπέρματος - Μέρος 2°

ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

Σεπτέμβριος 2003

Η συνεχής ανάπτυξη του αντικειμένου της Ανδρολογίας έχει βασισθεί σχεδόν αποκλειστικά στις εξελίξεις σε θέματα μεθοδολογίας. Ειδικά στα προβλήματα υπογονιμότητας ανδρικής αιτιολογίας, οι βελτιώσεις στις συνθήκες διεξαγωγής των αναλύσεων σπέρματος σχετίζονται κύρια με την προσπάθεια αντικειμενοποίησης των σχετικών μεθόδων, την κατάλληλη εκπαίδευση των ασχολουμένων, αλλά και την ευρεία εφαρμογή ποιοτικού ελέγχου εντός και μεταξύ των εργαστηρίων.

Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ.) από την αρχή της περασμένης δεκαετίας παρουσίασε τις κατευθυντήριες οδηγίες για τη σωστή διεξαγωγή των αναλύσεων σπέρματος. Οι οδηγίες αυτές, υπό τη μορφή εγχειριδίου, απετέλεσαν σημείο αναφοράς για κάθε ερευνητική ή κλινική δραστηριότητα. Η έκδοση αυτή της Π.Ο.Υ. έτυχε ευρύτατης αποδοχής και αποκλειστικής εφαρμογής στο χώρο, και παρουσιάστηκε εκ νέου με βελτιώσεις και προσθήκες (1999).

Από την άλλη πλευρά, η Σκανδιναυική Ένωση για την Ανδρολογία, πήρε την πρωτοβουλία να σχηματίσει μια ομάδα για τον ποιοτικό έλεγχο των αναλύσεων σπέρματος. Στα πλαίσια αυτά ανέπτυξε ένα σύστημα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου το οποίο παρουσιάστηκε με τη μορφή εγχειριδίου (1997) και ανανεώθηκε (1998, 2000) ώστε να συμφωνεί με τις οδηγίες της Π.Ο.Υ.

Το πόνημα αυτό παρουσιάζεται σε μετάφραση στον Ελληνικό χώρο από το περιοδικό μας. Την πρωτοβουλία είχε η βιολόγος Δρ Θ. Ζεγκινιάδου, η οποία επωμίσθηκε τη μετάφραση και την επιμέλεια της έκδοσης. Την προσπάθεια βοήθησαν με την κριτική συμβολή του ο βιολόγος Δρ Γ. Λυμπερόπουλος, ενώ τη γλωσσολογική επίβλεψη είχε η φιλόλογος κ. Δέσποινα Μπασσιούδη.

Η συντακτική επιτροπή τους ευχαριστεί θερμά για την προσφορά τους. Ευχαριστεί επίσης θερμά την Nordic Association for Andrology (NAFA) και ιδιαίτερα τους υπεύθυνους Urlik Kvist και Lars Bjorndahl καθώς και την Oxford University Press για τη γενναιόδωρη προσφορά των δικαιωμάτων μετάφρασης και ερμηνείας του εγχειριδίου. Λόγω της έκτασης του κειμένου, το εγχειρίδιο θα παρουσιασθεί σε δύο μέρη σε διαδοχικά τεύχη του περιοδικού ANHP.

Με την ευκαιρία θέλουμε να προσέξετε τις προσεχείς εκδηλώσεις της Εταιρείας μας καθώς και την ανακοίνωση για το 3^ο Πανευρωπαϊκό Συνέδριο Ανδρολογίας.

Με τις ευχές της συντακτικής επιτροπής για δημιουργική δραστηριότητα κατά την περίοδο του φθινοπώρου.

Δ.Α. Αδαμόπουλος
Υπεύθυνος Σύνταξης

ESHRE Monographs

**Monograph series Editor-in-Chief
Maas Jan Heineman**

Manual on Basic Semen Analysis 2002

Editors
U.Kvist and L.Björndahl



This manual is revised to comply with the 1999 edition of the WHO laboratory manual

ΓΝΩΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ΝΑΦΑ-ESHRE
European Society of Human Reproduction and Embryology

"This publication was originally published as the ESHRE Monograph: NAFA-ESHRE Manual of Basic Semen Analysis and is published by the arrangement with the European Society of Human Reproduction and Embryology and the Nordic Association for Andrology."

"This work is subject to copyright. All rights are reserved, whether the whole or part of the material, specifically the rights for translation, reprinting, reuse of illustrations, broadcasting, reproduction on CD-Rom, microfilm, online publication, or in any other way, and storage in data banks."

"The use of registered names trademarks etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt for the relevant laws and regulations and therefore free for general use."

" Product liability: the publishers cannot guarantee the accuracy of any information about the publication of medications contained in this publication. In every individual case, the user must check such information by consulting the relevant literature."

Η σειρά βιβλίων Μονογραφίες της ESHRE

Τα επιστημονικά περιοδικά της European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE), *Human Reproduction*, *Molecular Human Reproduction* και *Human Reproduction Update* είναι πολύ γνωστά στους ασχολούμενους στο χώρο της επιστήμης της αναπαραγωγής και της ιατρικής της αναπαραγωγής. Η εγκυρότητα των επιστημονικών αυτών περιοδικών είναι από όλους αναγνωρίσιμη. Και τα τρία επιστημονικά περιοδικά κατέχουν υψηλή θέση στη λίστα κατάταξης των δεικτών απήχησης στην επιστημονική περιοχή της "Βιολογίας της Αναπαραγωγής" καθώς και της "Μαιευτικής και Γυναικολογίας".

Στο παρελθόν, παράλληλα με το *Human Reproduction*, εκδόθηκαν διάφορες συμπληρωματικές εκδόσεις, οι οποίες έγιναν ευρέως αποδεκτές. Αυτές οι εκδόσεις βασίστηκαν στα πρακτικά των επιστημονικών συγκεντρώσεων της ESHRE, όπως εφαρμοσμένων φροντιστηρίων, συμποσίων, και συνεδρίων. Αυτές οι συμπληρωματικές εκδόσεις κάλυψαν ένα μεγάλο εύρος θεμάτων, που σχετίζονται τόσο με τη βασική έρευνα στον χώρο της αναπαραγωγής όσο και με την ιατρική της αναπαραγωγής.

Η Επιτροπή Εκδόσεων της ESHRE ασχολήθηκε με το θέμα της δημοσίευσης αυτών των συμπληρωματικών εκδόσεων. Σε συνεργασία με τους αρχισυντάκτες και με την υποστήριξη της Εκτελεστικής Επιτροπής αποφασίστηκε να διακοπεί αυτός ο τύπος εκδόσεων και να προστεθεί μια καινούργια δημοσίευση στα τρία επιστημονικά περιοδικά. Αυτή η δημοσίευση θα ονομαστεί *Μονογραφίες της ESHRE* και θα αντικαταστήσει τις προηγούμενες συμπληρωματικές εκδόσεις του *Human Reproduction*.

Η σειρά *Μονογραφίες της ESHRE* θα επικεντρωθεί στη δημοσίευση οδηγιών και πρακτικών από τις επιστημονικές συναντήσεις της ESHRE στο χώρο της επιστήμης της αναπαραγωγής και της ιατρικής της αναπαραγωγής. Σκοπός μας είναι η σειρά *Μονογραφίες* να βρεθεί στο ίδιο υψηλό επίπεδο με τα ήδη υπάρχοντα επιστημονικά περιοδικά. Η αποδοχή των χειρόγραφων προς δημοσίευση θα υπόκειται σε έγκριση από την Επιτροπή Εκδόσεων της ESHRE. Κάθε τεύχος των *Μονογραφιών της ESHRE* θα έχει ένα προσκεκλημένο εκδότη, ο οποίος θα είναι υπεύθυνος για την εις βάθος ανασκόπηση ενός θέματος με την βοήθεια του αρχισυντάκτη και του υπεύθυνου σύνταξης της σειράς *Μονογραφιών*. Οι *Μονογραφίες της ESHRE* θα επιχορηγούνται από την ESHRE και έναν εξωτερικό χορηγό.

Τα δύο πρώτα τεύχη των *Μονογραφιών της ESHRE* είναι "Οδηγίες για την Αντιμετώπιση της Υπογονιμότητας" και "Εγχειρίδιο της Βασικής Εξέτασης Σπέρματος". Προσκαλώ το αναγνωστικό κοινό να επιλέξει άλλα θέματα και δραστηριότητες μέσα στο φάσμα των ενδιαφερόντων μας, που θα ήταν κατάλληλα να αποτελέσουν θέμα ενός τεύχους *Μονογραφιών της ESHRE*.

Maas Jan Heineman,

Αρχισυντάκτης της σειράς Μονογραφιών

Πρόλογος

Εγχειρίδιο της Βασικής Εξέτασης Σπέρματος.

Το Εγχειρίδιο της Βασικής Εξέτασης Σπέρματος είναι το αποτέλεσμα της κοινής προσπάθειας των μελών της Nordic Association for Andrology (NAFA) και του Special Interest Group on Andrology (SIGA) της ESHRE.

Το εγχειρίδιο αυτό είναι χρήσιμο σε όλους όσους δουλεύουν στον χώρο της βιολογίας και της ιατρικής της αναπαραγωγής και ιδιαίτερα σε αυτούς που είναι υπεύθυνοι για τον ποιοτικό έλεγχο και την διασφάλιση ποιότητας στο εργαστήριο σπέρματος.

Το εγχειρίδιο αυτό παρουσιάζει με λεπτομέρειες το υπόβαθρο και τις αρχές των μεθόδων πάνω στις οποίες βασίζεται σήμερα η εξέταση σπέρματος. Τα πρώτα έξι κεφάλαια επικεντρώνονται στις μετρήσεις του αριθμού, της κινητικότητας, ζωτικότητας και μορφολογίας των σπερματοζωαρίων καθώς και στα αντισπερματικά αντισώματα. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις εργαστηριακές μεθόδους, υπολογισμούς, αποτελέσματα, αντιδραστήρια, εξοπλισμό, και υλικά. Το τελευταίο κεφάλαιο έχει ως θέμα του τον ποιοτικό έλεγχο και την διασφάλιση ποιότητας. Το εγχειρίδιο ολοκληρώνεται με ορισμένα χρήσιμα παραρτήματα.

Αν και το Εγχειρίδιο για την Βασική Εξέταση Σπέρματος είναι διαθέσιμο στο διαδύκτιο, στην ιστοσελίδα της NAFA (<http://www.ki.se/org/nafa>) και της ESHRE (<http://www.eshre.com>) κρίθηκε σκόπιμο να δημοσιευτεί επίσης και σαν Μονογραφία της ESHRE. Προσδοκώ ότι αυτό το εγχειρίδιο θα είναι χρήσιμο τόσο στην κλινική πράξη όσο και στο εργαστήριο. Οι κλινικοί γιατροί, που δεν είναι εξοικωμένοι με το εργαστήριο σπέρματος, καλούνται να προσέξουν τις βασικές αρχές των μεθόδων του εργαστηρίου για την εξέταση σπέρματος. Σε άλλους θα είναι χρήσιμο για να ανανεώσουν την τεχνική τους.

Ευχαριστώ τα μέλη της ομάδας εργασίας της NAFA-ESHRE για αυτό το πολύ αξιόλογο Εγχειρίδιο για τη Βασική Εξέταση Σπέρματος.

Maas Jan Heineman,

Αρχισυντάκτης της σειράς Μονογραφιών

Εισαγωγή

Η Nordic Association for Andrology (NAFA) αποφάσισε στο Turku, τον Αύγουστο του 1995 να σχηματίσει μια ομάδα για τον ποιοτικό έλεγχο του σπέρματος στο Ανδρολογικό Εργαστήριο. Η αποστολή αυτής της ομάδας ήταν να αναπτύξει ένα λεπτομερές εγχειρίδιο με τις εργαστηριακές μεθόδους βασισμένο στις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ), (WHO, 1992). Ο στόχος ήταν αυτό το εγχειρίδιο να αποτελέσει την βάση για το σύστημα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου και για επιστημονική συνεργασία στο χώρο.

Τα μέλη της ομάδας της NAFA είναι οι: Anders Bjardell (President), Ulrik Kvist (συντονιστής), Aleksander Giwercman, Trine B. Haugen, Jyrki Suominen και Lars Bjorndahl (γραμματέας). Άλλοι συνεργαζόμενοι είναι οι: Birute Zilaitiene, Margus Punab, Oystein Magnus, Ase Strutz, Trine Henrichsen, Turid Vollen, Ingmarie Sundgren, Inger Soderlund, Maiken Simonsen, Lene Andersen, Majbrit Kvist και Antero Horte.

Αυτό το εγχειρίδιο αρχικά εκδόθηκε το 1997. Η δεύτερη έκδοση έγινε το 1998 και η τρίτη το 2000, που επανεκδόθηκε για να συμφωνεί με τις οδηγίες της ΠΟΥ, έκδοσης του 1999.

Κατά την ετήσια συνεδρίαση του Special Interest Group in Andrology (SIGA) της ESHRE, που έγινε στην Bolonia, τον Ιούλιο του 2000, αποφασίστηκε να γίνουν προσπάθειες για την δημιουργία ενός κοινού εγχειριδίου NAFA-ESHRE με θέμα την βασική εξέταση σπέρματος. Έτσι σχηματίστηκε μια ομάδα εργασίας με αντιπροσώπους από το SIGA της ESHRE, με μέλη, εκ μέρους της ESHRE την Usha Punjabi, τον David Mortimer, τον Christopher Barratt και τον Lars Bjorndahl και εκ μέρους της NAFA την ομάδα για τον ποιοτικό έλεγχο του σπέρματος στο Ανδρολογικό Εργαστήριο. Συντονιστής αυτής της ομάδας ήταν ο Ulrik Kvist και γραμματέας ο Lars Bjorndahl.

Το εγχειρίδιο της NAFA-ESHRE βασίζεται στις οδηγίες της ΠΟΥ (WHO, 1999), για να διευκολύνει την εγκαθίδρυση κοινών, βαθμονομημένων μεθόδων και υλικών στα εργαστήρια Ανδρολογίας των Ευρωπαϊκών χωρών, γεγονός προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη του συστήματος εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου και της επιστημονικής συνεργασίας. Καμμία μεμονομένη μέθοδος δεν είναι ιδανική και η ομάδα συζήτησε διάφορες δυνατότητες για να επιτευχθεί ομοφωνία στις μεθόδους, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο Ανδρολογικό εργαστήριο και ακόμη να είναι αποδεκτές από μεθοδολογική άποψη (εξαλείφοντας τις πηγές λάθους).

Σε αυτό το εγχειρίδιο, οι εργαστηριακές μέθοδοι επίσης συμφωνούν με το πρόγραμμα μιας σειράς εκπαιδευτικών μαθημάτων για τη Βασική Εξέταση Σπέρματος, όπως αυτή αναπτύχθηκε και υλοποιήθηκε από την SIGA. Τέτοια μαθήματα έχουν για παράδειγμα δοθεί, ως από κοινού μαθήματα, στη Στοκχόλμη (1995, 1996 και 2001), στο Άρθους (1997), στο Γκέτενμπορ (1998), στο Όσλο (1998) και στο Ελσίνκι (2001).

Παραπομπές

WHO (1992) *WHO Laboratory Manual for the examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

WHO (1999) *WHO Laboratory Manual for the examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*, 4rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Διευθύνσεις

ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology. Ιστοσελίδα: <http://www.eshre.com>

NAFA: Nordic Association for Andrology, πρόεδρος Maria Rasanen. Ιστοσελίδα: <http://www.ki.se/org/nafa>

SIGA: Special Interest Group on Andrology, συντονιστής Herman Tournaye. Ιστοσελίδα <http://www.eshre.com>

Περιεχόμενα

Από τους Συντάκτες

1. Εξέταση σπέρματος: επισκόπηση

- Τεχνικές γνώσεις και αρχές
- Η ασφάλεια στο εργαστήριο Ανδρολογίας
- Το δείγμα σπέρματος
- Βαθμονόμηση
- Διαδικασία
- Εξοπλισμός και υλικά

2. Η συγκέντρωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων

- Αρχές της μεθόδου
- Αξιολόγηση της κατάλληλης αραιώσης
- Διαδικασία
- Υπολογισμοί
- Αποτελέσματα
- Ποιοτικός έλεγχος
- Αντιδραστήρια
- Εξοπλισμός και υλικά
- Η βεβαιότητα της μέτρησης των σπερματοζωαρίων

3. Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων

- Αρχές της μεθόδου
- Διαδικασία
- Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων στην οθόνη του βίντεο
- Εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων
- Υπολογισμοί
- Αποτελέσματα
- Ποιοτικός έλεγχος
- Εξοπλισμός
- Βιντεοσκόπηση

4. Η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων

- Αρχές της μεθόδου
- Διαδικασία
- Υπολογισμοί και αποτελέσματα
- Αντιδραστήρια
- Εξοπλισμός και υλικά

5. Μορφολογία σπερματοζωαρίων

- Αρχές της μεθόδου
- Υπόβαθρο για την εκτίμηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων
- Προετοιμασία του επιχρίσματος
- Εκτίμηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων
- Ποιοτικός έλεγχος
- Υπολογισμοί και αποτελέσματα
- Αντιδραστήρια
- Εξοπλισμός και υλικά
- Παραπομπές

6. Αντισπερματικά αντισώματα

- Αρχές της μεθόδου
- Αντισπερματικά αντισώματα
- Η μέθοδος SpermMAR
- Η μέθοδος Immunobead
- Ποιοτικός έλεγχος των μεθόδων Sperm MAR και Immunobead
- Εξοπλισμός και υλικά

7. Ποιοτικός έλεγχος και διασφάλιση ποιότητας

- Ποιοτικός Έλεγχος
- Εσωτερικός Ποιοτικός Έλεγχος (ΕσΠε)
- Έλεγχος σε επίπεδο μεμονωμένης ανάλυσης
- Βασικό πρόγραμμα ΕσΠε
- Μηνιαίος μέσος όρος των αποτελεσμάτων
- Έλεγχος του εξοπλισμού και των μηχανημάτων
- Εξωτερικός Ποιοτικός Έλεγχος (ΕξΠΕ)
- Διασφάλιση ποιότητας (ΔΠ)
- Παραπομπές
- Παράρτημα I
- Παράρτημα II

" For any references/citations from this Manual, the source must be given as the original chapter with full bibliographic details as given at the top of the first page of each chapter."

Η οποιαδήποτε παραπομπή ή χρήση αποσπασμάτων από το Εγχειρίδιο πρέπει να γίνεται με αναφορά στο αρχικό κεφάλαιο με όλη την αντίστοιχη βιβλιογραφία, όπως δίνεται στην πρώτη σελίδα κάθε κεφαλαίου.

“This publication was originally published as the ESHRE Monograph: Manual of Basic Semen Analysis and is published by arrangement with the European Society of Human Reproduction and Embryology, and the Nordic Association for Andrology”

“This work is subject to copyright. All rights are reserved, whether the whole or part of the material, specifically the rights for translation, reprinting, use of illustrations, broadcasting, reproduction on CD-Rom, microfilm, on line publication, or in any other way, and storage in data banks”.

“The use of registered names, trademarks etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt for the relevant laws and regulations and therefore free for general use”.

“Product liability: the publishers cannot guarantee the accuracy of any information about the publication of medications contained in this publication. In every individual case, the user must check such information by consulting the relevant literature”.

Σημείωμα Συντακτών της Μονογραφίας

Ulrik Kvist¹ and Lars Bjorndahl²

¹ Department of Women and Child Health, Andrology Center, Karolinska Hospital and Institute, Box 140, SE-171 76 Stockholm, Sweden and

² Assisted Conception Unit, Birmingham Women's Hospital, and Reproductive Biology and Genetics Group, University of Birmingham, Birmingham B15 2TG, UK

Η εξέταση σπέρματος δημιουργήθηκε σαν συμπληρωματικός επιστημονικός κλάδος παράλληλα με άλλους κλάδους που φροντίζουν τον υπογόνιμο άνδρα ή το ζευγάρι. Στην σύγχρονη ιατρική, η εξέταση σπέρματος πραγματοποιείται κάτω από ποικίλες περιστάσεις. Κατά συνέπεια, το μικροσκόπιο για την εξέταση σπέρματος μπορεί να βρεθεί στον πάγκο του ουρολόγου, του γυναικολόγου, του δερματολόγου ή του ενδοκρινολόγου, σε εργαστήριο ουρολογίας ή χημείας, σε πανεπιστημιακό τμήμα που ασχολείται με την ιατρική της απασχόλησης, και στις μέρες μας, σε ένα μεγάλο αριθμό διαρκώς εξελισσόμενων κλινικών που προσφέρουν θεραπεία στην υπογονιμότητα. Ένας τεχνολόγος με ημιαπασχόληση μπορεί να εκτελεί λίγες αναλύσεις μέσα σε ένα χρόνο, ενώ ένα εκπαιδευμένο μέλος της ομάδας του ανδρολογικού εργαστηρίου μπορεί να εκτελεί μερικές χιλιάδες αναλύσεων σπέρματος. Ως συνέπεια αυτής της μεγάλης ποικιλίας παραδόσεων και ρυθμίσεων δεν ήταν πάντοτε εφικτό ή εξέταση σπέρματος να βρίσκεται κάτω από τον ενδελεχή έλεγχο και τις τεχνικές εξελίξεις, τις οποίες η σύγχρονη ιατρική απαιτεί από την καλή εργαστηριακή πρακτική.

Στη διάρκεια του χρόνου έγιναν πολλές σημαντικές συνεισφορές στην προσπάθεια βελτίωσης των προτύπων για τη βασική εξέταση σπέρματος. Να αναφέρουμε ορισμένα αξιοσημείωτα γεγονότα: οι Freund και Carol πρότειναν ορισμένες θεμελιώδεις βελτιώσεις στις μεθόδους μέτρησης του αριθμού των σπερματοζωαρίων (Freund και Carol, 1964). Οι MacLeod και Freund έκαναν βελτιώσεις που αφορούσαν τη μορφολογία του σπέρματος (MacLeod, 1964; Freund, 1966). Πολύ σημαντική υπήρξε τόσο η εκτενής δουλειά του Eliasson, ο οποίος δημοσίευσε οδηγίες για τις εργαστηριακές μεθόδους και την καλή πρακτική του εργαστηρίου, όσο και του Mortimer, ο οποίος προσέθεσε οδηγίες για την εξειδικευμένη εκπαίδευση και για τον ποιοτικό έλεγχο του ανδρολογικού εργαστηρίου (Eliasson, 1971a,b, 1975, 1977, 1981; Mortimer, 1994). Τα εγχειρίδια της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) με θέμα την εξέ-

ταση σπέρματος (WHO, 1087,1992,1999; Belsey et al 1980) αποτέλεσαν θεμέλιο για την παγκόσμια δημιουργία προτύπων στην εξέταση σπέρματος. Ωστόσο, στην αρχή μιας σειράς μαθημάτων με θέμα την βασική εξέταση σπέρματος (Bjorndahl et al 2002), το ίδιο δείγμα σπέρματος εξετάστηκε από 20 συμμετέχοντες, οι οποίοι εργαζόνταν όλοι σε εργαστήρια σπέρματος και χρησιμοποιούσαν τις ενδεδειγμένες μεθόδους από την ΠΟΥ. Τα αποτελέσματά τους, ως προς τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, είχαν εύρος από $1-71 \times 10^6/\text{ml}$, αν και η τιμή για τον αριθμό των σπερματοζωαρίων μετρημένη από εκπαιδευμένους τεχνολόγους, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν ελεγχμένες μεθόδους, ήταν $41 \times 10^6/\text{ml}$.

Η έλλειψη ακρίβειας στα αποτελέσματα της βασικής εξέτασης σπέρματος είναι ακόμη ένα επείγον πρόβλημα. Βασικό στοιχείο σε αυτή την κατάσταση ήταν η έλλειψη παγκόσμιοι και λεπτομερούς προτύπου για τις μεθόδους της ανάλυσης σπέρματος (De Jonge and Barratt, 1999). Ένα μεμονωμένο εργαστήριο μπορεί να ελέγξει την ποιότητα των αποτελεσμάτων του και να δώσει έτσι στους ασθενείς του επαρκή φροντίδα, όταν όμως πρόκειται να γίνει σύγκριση ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια και σε επιστημονικές δημοσιεύσεις - καθώς και σε χρήση δημοσιεύσεων από εργαστήρια που χρησιμοποιούν παραλλαγές των μεθόδων που προτείνει η ΠΟΥ- τα αποτελέσματα είναι σπάνια εφαρμόσιμα σε άλλα εργαστήρια.

Εκτός από τη χρήση κοινών μεθόδων είναι βασικό το προσωπικό του εργαστηρίου που εκτελεί την εξέταση σπέρματος να είναι εκπαιδευμένο στη διεξαγωγή των αναλύσεων με τον ίδιο τρόπο. Το Special Interest Group in Andrology (SIGA) της ESHRE πήρε την πρωτοβουλία να δημιουργήσει εκπαιδευτικά μαθήματα στη βασική εξέταση σπέρματος (Bjorndahl et al 2002). Αυτά τα μαθήματα ήταν πολύ επιτυχή και πλέον γίνονται τακτικά, ειδικά στην Ολλανδία, το Βέλγιο, τις Σκανδιναβικές χώρες [εκεί τα μαθήματα αυτά γίνονται μαζί από την ESHRE και την Nordic Association for Andrology (NAFA)] και τη Νότιο

Αφρική. Τα τελευταία χρόνια δημοσιεύτηκαν πολλές πολύτιμες εργασίες με θέμα τον εσωτερικό και εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο και την εντατική εκπαίδευση, ώστε να επιτευχθεί σταθερότητα στα αποτελέσματα μέσα στο ίδιο εργαστήριο και ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια (Dunphy et al., 1989; Neuwinger et al., 1990; Clemens et al., 1995; Franken et al., 2000; Keel et al., 2000).

Όμως, έγινε προφανές ότι οι οδηγίες της ΠΟΥ δεν ήταν αρκετά λεπτομερείς ώστε να τυποποιηθούν όλες οι μέθοδοι και η δουλειά ρουτίνας ή να επιτρέψουν πλήρη τυποποίηση της εκπαίδευσης κατά τη διάρκεια των μαθημάτων ή μετά.

Για να βελτιωθεί αυτή η κατάσταση και να τοποθετηθούν τα θεμέλια για τη σταθεροποίηση των τιμών ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια, η NAFA το 1995 διόρισε μια ομάδα εργασίας για την ποιότητα του εργαστηρίου σπέρματος. Ο σκοπός αυτής της ομάδας ήταν να γράψει ένα λεπτομερές εργαστηριακό εγχειρίδιο, το οποίο θα πρότεινε η NAFA σε όλα τα εργαστήρια που ασχολούνται με την εξέταση σπέρματος στις Σκανδιναβικές χώρες. Η βάση για αυτό το εγχειρίδιο ήταν η τρίτη έκδοση του εργαστηριακού εγχειριδίου της ΠΟΥ. Η πρώτη έκδοση έγινε το 1997 και η δεύτερη το 1998. Όταν η ΠΟΥ προχώρησε στην έκδοση του τετάρτου εγχειριδίου το 1999, η NAFA αποφάσισε να κάνει και άλλες βελτιώσεις με σκοπό να συμφωνεί με το καινούργιο εργαστηριακό εγχειρίδιο της ΠΟΥ. Το 2000 η SIGA πρότεινε ότι η NAFA και η ESHRE έπρεπε να κάνουν από κοινού ένα εγχειρίδιο, το οποίο θα πρότειναν σε όλα τους τα μέλη. Μια κοινή ομάδα εργασίας συστήθηκε από μέλη της NAFA (Aleksander Giwercman, Trine Haugen, Jyrki Suominen και Ulrik Kvist, συντονιστής) και της SIGA (Usha Punjabi, David Mortimer, Christopher Barratt και Lars Bjorndahl, γραμματέας) και αυτό το εγχειρίδιο παρουσιάστηκε στις δύο οργανώσεις το καλοκαίρι του 2001.

Προσπάθειες έγιναν ώστε να δημιουργηθούν ξεκάθαρες και λεπτομερείς οδηγίες για την πρακτική δουλειά στο ανδρολογικό εργαστήριο. Στην επιλογή ανάμεσα σε διαφορετικές μεθόδους, η ομάδα εργασίας προσπάθησε να χρησιμοποιήσει εύκολες και ελεγχόμενες διαδικασίες με όσο το δυνατόν λιγότερες πηγές λάθους. Επιπλέον, ενσωματώθηκαν στις διαδικασίες βασικά βήματα ποιοτικού ελέγχου, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η εμφάνιση λαθών. Το αποτέλεσμα αυτής της προσπάθειας, το Εγχειρίδιο για τη Βασική Εξέταση Σπέρματος, είναι τώρα διαθέσιμο από την NAFA και την SIGA της ESHRE για να χρησιμοποιηθεί σε εργαστήρια και μαθήματα βασικής εξέτασης σπέρματος ανα τον κόσμο, να αποτελέσει την βάση για τη δημιουργία προτύπων, να βελτιώσει την ποιότητα της εξέτασης σπέρματος και να επιτρέψει την ανταλλαγή των επιστημονικών αποτελεσμάτων που συμπεριλαμβάνουν εξέταση σπέρματος.

REFERENCES

- Belsey M.A, Eliasson R., Gallegos A.J., Moghissi K.S. and Paulsen C.A., Prasad A.M.N. (1980) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Press Concern, Singapore.
- Bjorndahl L., Barratt C.L.R., Fraser L., Kvist U. and Mortimer D. (2002) ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training. *Hum. Reprod.*, **17**, 1299-1305.
- Clemens, S., Cooke, I.D., and Barratt C.L.R. (1995) Implementing comprehensive quality control in the andrology laboratory. *Hum. Reprod.*, **10**, 2096-2106
- De Jonge, C.J., and Barratt C.L.R. (1999) WHO manual. Who should care? *Hum. Reprod.*, **14**, 2431-2433
- Dunphy, B.C., Kay, R., Barratt C.L.R. and Cooke, I.D. (1989) Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J. Androl.*, **10**, 378-385.
- Eliasson, R. (1971a) Standards for the investigation of human semen. *Andrologie*, **3**, 49-84.
- Eliasson, R. (1971b) Interlaboratory coordination and control in andrology. *Andrologie*, **3**, 113-115.
- Eliasson, R. (1975) Analysis of semen. In Behrman S.J. and Kistner R.W. (eds) *Progress in Infertility*, 2nd edn. Little, Brown, Boston, USA, pp. 691-714.
- Eliasson, R. (1976) Semen analysis and laboratory workup. In Cockell A.T.K. and Urry R.L. (eds) *Male infertility: Workup, Treatment and Research*. Grune and Stratton, Orlando, FL, USA, pp. 169-188.
- Eliasson, R. (1981) Analysis of semen. In Burger H., and de Kretser D.M. (eds) *The Testis*. Raven Press, New York, USA, pp381-399.
- Franken, D.R., Smith, M., Menkveld, R., Kruger T.F., Sekadde-Kigundu, C., Mbizvo, M. and Akande, E.O. (2000) The development of a continuous quality control programme for strict sperm morphology among sub-Saharan African laboratories. *Hum Reprod.*, **15**, 667-671.
- Freud, M. (1966) Standards for rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int. J. Fertil.*, **2**, 97-118.
- Freud, M. and Carol, B. (1964) Factors affecting haemocytometer counts of sperm concentration in human semen. *J. Reprod. Fertil.*, **8**, 149
- Keel, B.A., Quimm, P., Schmidt, C.F.Jr, Serafy, N.T.Sr and Schlaue, T.K. (2000) Results of the American association of bioanalysts national proficiency testing program in andrology. *Hum. Reprod.*, **15**, 680-686
- MacLeod, J. (1964) Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. *Int. J. Fertil.*, **9**, 281.
- Mortimer D. (1994) Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reprod. Med. Rev.*, **3**, 97-111.
- Neuwinger, J., Behre, H. and Nieschlag, E. (1990) External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil. Steril.*, **54**, 308-314.
- WHO (1987) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- WHO (1992) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- WHO (1999) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

1. Εξέταση σπέρματος: επισκόπηση

Τεχνικές γνώσεις και αρχές

Τα αποτελέσματα μιας εξέτασης σπέρματος δεν μπορούν ποτέ να μας βοηθήσουν να προβλέψουμε αν ένας συγκεκριμένος άνδρας μπορεί να γίνει βιολογικός πατέρας ή όχι. Σε ολόκληρο τον πληθυσμό των σπερματοζωαρίων δεν υπάρχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες μετρήσιμες, οι οποίες να απεικονίζουν σαφώς την γονιμοποιητική ικανότητα εκείνου του ελάχιστου αριθμού σπερματοζωαρίων, που μπορούν να προσεγγίσουν το ωάριο. Ωστόσο, το σπερμοδιάγραμμα μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για τυχόν διαταραχές των γεννητικών οργάνων του άνδρα και συνεπώς να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στον συνεχιζόμενο έλεγχο της υπογονιμότητας. Όμως τα αποτελέσματα της εξέτασης σπέρματος έχουν χρησιμοποιηθεί για να κατατάξουν τους άνδρες σε κατηγορίες σύμφωνα με τις διαφορετικές πιθανότητες που έχουν να καταστήσουν μια γυναίκα έγκυο μέσα σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Ο σκοπός της βασικής εξέτασης σπέρματος είναι να αξιολογήσει τις περιγραφικές παραμέτρους της εκσπερμάτισης, που ελήφθη με αυνανισμό. Οι παράμετροι που αξιολογούνται είναι η όψη, η οσμή, η ρευστοποίηση, η γλοιότητα, ο όγκος, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και ο συνολικός τους αριθμός, η κινητικότητα και η ζωτικότητα τους. Επιπλέον η εξέταση σπέρματος περιλαμβάνει την αξιολόγηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, την αξιολόγηση της παρουσίας των συσσωρευσεων/συγκολλήσεων καθώς και της παρουσίας υπολειμμάτων (debris) και άλλων τύπων κυττάρων.

Η Ασφάλεια στο εργαστήριο Ανδρολογίας

Όλο το προσωπικό πρέπει να γνωρίζει ότι τα δείγματα σπέρματος ίσως περιέχουν επιβλαβείς ιούς και θα πρέπει, επομένως, να τα χειρίζονται με τη δέουσα προσοχή. Θα πρέπει να τηρούν αυστηρά τους κανόνες ασφάλειας, όπως επισημαίνονται στο παράρτημα II του εγχειριδίου

της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) του 1999.

Το δείγμα σπέρματος

Η εξέταση του σπέρματος, το οποίο έχει ληφθεί με αυνανισμό, αρχίζει στο εργαστήριο 30 λεπτά μετά την εκσπερμάτιση. Για τη λήψη του σπέρματος πρέπει να υπάρχουν ειδικά δωμάτια. Πριν από τη λήψη του δείγματος, η ΠΟΥ συστήνει ένα μέγιστο διάστημα αποχής από επαφή μεταξύ 2 και 7 ημερών, με την παραίτηση αυτό να είναι κατά το δυνατόν σταθερό. Επομένως συνιστάται το διάστημα 3-4 ημερών ως διάστημα αποχής. Η περίοδος αποχής δοσμένη σε μέρες είναι πολύ ασαφής. Είναι χρήσιμο λοιπόν η περίοδος αποχής να δίνεται σε ώρες. Όταν τα αποτελέσματα πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες, οι οποίες σχετίζονται με την περίοδο αποχής, είναι υποχρεωτικό να δηλώνεται σε ώρες. Μερικοί άνδρες έχουν δυσκολία να παράγουν δείγμα σπέρματος στο εργαστήριο. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο άνδρας μπορεί να συλλέξει το δείγμα στο σπίτι και να το παραδώσει στο εργαστήριο εντός μίας ώρας. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ένα ειδικό προφυλακτικό, μη σπερματοκτόνο, για την συλλογή του σπέρματος κατά τη διάρκεια της συνουσίας.

Οδηγίες στους εξεταζόμενους

Το προς εξέταση δείγμα σπέρματος πρέπει να συνοδεύεται από ένα κατάλληλο έντυπο (καρτέλα του εξεταζόμενου), το οποίο θα περιέχει τις σχετικές κλινικές πληροφορίες. Πριν δώσει το δείγμα του σπέρματος ο εξεταζόμενος θα πρέπει να λάβει προφορικές όσο και γραπτές πληροφορίες σχετικά με το σκοπό της εξέτασης, για την αποφυγή τυχόν προβλημάτων. Στο γραπτό κείμενο μπορεί να συμπεριληφθεί μια σύντομη εξήγηση - διασαφήνιση των οργάνων του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος για τους μη ειδικούς. Ο εξεταζόμενος θα πρέπει να ενημερωθεί για τη σημασία του χρόνου αποχής και της συλλογής όλου του όγκου της εκσπερμάτισης. Αν το δείγμα δεν μπορεί να παραχθεί στο εργαστήριο, θα πρέπει να

μεταφερθεί προστατευμένο από το κρύο (έχοντάς το κοντά στο σώμα) και να παραδοθεί στο εργαστήριο το προτιμότερο μέσα σε 30 λεπτά, αλλά το αργότερο σε μία ώρα από την εκσπερμάτιση.

Βαθμονόμηση των οργάνων μέτρησης

Η βαθμονόμηση των οργάνων μέτρησης πρέπει πάντοτε να πραγματοποιείται μετά από αλλαγές που έχουν γίνει στον εξοπλισμό ή οποιαδήποτε στιγμή έχετε υποψιαστεί τυχόν λάθη.

Οι αυτόματες πιπέτες οι οποίες χρησιμοποιούνται για μετρήσεις (μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, βιοχημικές αναλύσεις) πρέπει να βαθμονομούνται τουλάχιστον 2 φορές τον χρόνο. Η διαδικασία για αυτές τις μετρήσεις καθώς και τα αποτελέσματά τους πρέπει να φυλάσσονται σε ειδικά ντοσιέ.

Οι ζυγοί ακριβείας για τη μέτρηση του βάρους του σπέρματος και των αντιδραστηρίων πρέπει να βαθ-

μονομούνται τουλάχιστον μία φορά τον χρόνο από τεχνικό ή μηχανικό, πιστοποιημένο από τον κατασκευαστή. Τα αποτελέσματα και πάλι πρέπει να φυλάσσονται σε ειδικά ντοσιέ.

Διαδικασία

Επισκόπηση διαδικασίας

Στο πίνακα 1 δίνονται οι οδηγίες για τα βήματα τα οποία ακολουθούνται με την κατάλληλη σειρά στην βασική εξέταση σπέρματος, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται όσο το δυνατόν πιο αποδοτική και ποιοτική πραγματοποίηση των εργαστηριακών πράξεων. Λεπτομέρειες για μεμονωμένα βήματα δίνονται στο κείμενο που ακολουθεί. Εάν πρόκειται να πραγματοποιηθεί καλλιέργεια σπέρματος πρέπει να χρησιμοποιείται αποστειρωμένος συλλέκτης για το δείγμα και αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσεως. Ορισμένα βήματα δεν είναι υποχρεωτικά, είτε γιατί βασίζονται σε παραδοχές είτε γιατί τα στάδια αυτά θεωρούνται προαιρετικά από την ΠΟΥ (δηλαδή το κάθε εργαστήριο μπορεί

Πίνακας 1. Τα βήματα της βασικής εξέτασης σπέρματος

Χρόνος μετά την εκσπερμάτιση	Εργαστηριακή πράξη
0-5 λεπτά	<ul style="list-style-type: none"> Καταχωρήστε, ζυγίστε^a και γράψτε την ετικέτα πάνω στο δοχείο συλλογής σπέρματος; η ετικέτα να είναι αντίστοιχη με την καρτέλα του εξεταζόμενου^b Τοποθετήστε το δείγμα σε ανακινητήρα κυκλικής κίνησης στον επωαστικό κλίβανο (37° C)
20-25 λεπτά	<ul style="list-style-type: none"> Εκτιμήστε τη ρευστοποίησις, την όψη και την οσμή
30 λεπτά	<ul style="list-style-type: none"> Εκτιμήστε τη γλοιότητα του σπέρματος^c Εξετάστε τη σταγόνα του δείγματος για: την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, καθώς και την παρουσία συσσωρεύσεων/συγκολλήσεων: επίσης την παρουσία άλλων κυττάρων και υπολειμμάτων. Διεξάγετε το τεστ των αντισωμάτων. Κάντε επιχρίσμα για χρώση εωσίνης-νιγκροζίνης αν η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι μικρότερη του 40% και υπολογίστε τη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων^d. Κάντε αραιώσεις για τον προσδιορισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Φυλάξτε 100μl σπέρματος για τον υπολογισμό των κυττάρων φλεγμονής. Φτιάξτε επιχρίσματα για χρώση για τον υπολογισμό της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων. Φυλάξτε και φυγοκεντρήστε δείγμα για μετέπειτα βιοχημικές αναλύσεις^e
Αργότερα	<ul style="list-style-type: none"> Υπολογίστε τον αριθμό των σπερματοζωαρίων στη βελτιωμένη πλάκα Neubauer . Αν υπάρχουν πάνω από 1×10^6 στρογγυλά κύτταρα/ ml : υπολογίστε τα κύτταρα φλεγμονής^d Πραγματοποιήστε τις βιοχημικές αναλύσεις της εκκριτικής συμβολής από τον προστάτη (πχ ψευδάργυρος), σπερματοδόχες κύστες (πχ φρουκτόζη) και την επιδιδυμίδα (πχ α-γλυκοσιδάση)^e Κάντε χρώση του επιχρίσματος για την εκτίμηση της μορφολογίας Υπολογίστε τη μορφολογία (διαφορική μέτρηση)

^a ο όγκος του σπέρματος μπορεί να υπολογιστεί με πιπέτα ακριβείας, με ακρίβεια 0,1 μl; η ζύγιση τότε δεν είναι απαραίτητη.

^b οι ετικέτες πρέπει γενικά να αποτελούνται από 2 μοναδικά στοιχεία ταυτότητας πχ όνομα και ένα μοναδικό αριθμό

^c η πιπέτα που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του όγκου του σπέρματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της γλοιότητας του σπέρματος, όταν αυτό αφήνεται να στάξει από την πιπέτα.

^d περιορισμοί που συμφωνήθηκαν από την ομάδα εργασίας

^e αυτά τα βήματα είναι προαιρετικά

να διαλέξει εάν θα τα ακολουθήσει ή όχι).

Λεπτομέρειες της διαδικασίας

Καταχωρήστε, ζυγίστε και τοποθετήστε ετικέτα στο δοχείο συλλογής του δείγματος

Αρχικά, το δείγμα πρέπει να καταχωρηθεί. Στο δοχείο του δείγματος πρέπει να τοποθετείται η ετικέτα του, αμέσως μετά την λήψη των στοιχείων της καρτέλας του εξεταζόμενου με το προαιρετικό ερωτηματολόγιο. Γενικά, η ετικέτα πρέπει να περιλαμβάνει 2 μοναδικά στοιχεία ταυτότητας, π.χ. όνομα και ένα κωδικό, που θα είναι μοναδικός για το συγκεκριμένο δείγμα.

Αν η εκσπερμάτιση γίνει στο εργαστήριο, το δοχείο της συλλογής πρέπει να ζυγιστεί και να μαρκαριστεί πριν από τη συλλογή του δείγματος. Όταν η συλλογή του δείγματος δεν γίνει στο εργαστήριο, το βάρος του άδειου δοχείου καταγράφεται πάνω στον συλλέκτη πριν να διανεμηθεί στον παραπέμποντα γιατρό ή δοθεί κατευθείαν στον εξεταζόμενο. Όταν παραλαμβάνεται το δείγμα σημειώνεται ευκρινώς πάνω στο δοχείο, καθώς και στην καρτέλα του εξεταζόμενου ο χρόνος της εκσπερμάτισης. Το καθαρό βάρος του δείγματος (συνολικό βάρος μείον το βάρος του δοχείου συλλογής) πρέπει να σημειώνεται στην καρτέλα του εξεταζόμενου ως όγκος σπέρματος (μονάδα μέτρησης το ml: ακρίβεια ενός δεκαδικού)

Τοποθετήστε το δείγμα στον ανακινητήρα κυκλικής κίνησης μέσα στον κλίβανο (37° C)

Το δείγμα πρέπει να τοποθετηθεί χωρίς καθυστέρηση σε περιστρεφόμενο δίσκο στον ανακινητήρα κυκλικής κίνησης (37° C). Είναι σημαντικό να ελέγξετε ότι ο συλλέκτης που χρησιμοποιήθηκε επιτρέπει πλήρη ανάμιξη του δείγματος. Ο χρόνος τοποθέτησης του δείγματος στον επωαστικό κλίβανο πρέπει να αναγραφεί στην καρτέλα του εξεταζόμενου. Το δείγμα πρέπει να μείνει 25-30 λεπτά μετά την εκσπερμάτιση στον κλίβανο, έτσι ώστε η εξέταση να αρχίσει αμέσως μετά. Βγάλτε το δοχείο συλλογής από τον κλίβανο και ελέγξτε ότι το δείγμα είναι καλά ανακατεμένο στροβιλίζοντας το γύρω από τον πυθμένα του δοχείου για περίπου 20 sec. Αν το δείγμα έχει ληφθεί εκτός εργαστηρίου, πρέπει να ζεσταθεί στον κλίβανο για 5-10 λεπτά πριν από την εξέταση.

Αξιολόγηση της ρευστοποίησης, της όψης και της γλοιότητας του δείγματος

Αξιολογήστε το δείγμα σε σχέση με τη χροιά (χωρίς ασυνήθη χροιά ή κοκκινωπό-καφέ, ιριδίζον ή διαυγές), την παρουσία κολλοειδών σωματιδίων (gel particles) ή βλέννας (mucous streaks). Το κιτρινωπό χρώμα του σπέρματος συνήθως οφείλεται στην αυξημένη περιεκτικότητα σε

φλάβο-πρωτεΐνες, οι οποίες προέρχονται από τις σπερματοδόχους κύστες, ενδεικτικό της μεγάλης περιόδου σεξουαλικής αποχής ή της παρουσίας βιταμίνης Β. Ο ίκτερος μπορεί επίσης να δώσει κιτρινωπό χρώμα. Η κοκκινωπή ή καφέ χροιά του χρώματος κυρίως οφείλεται στην παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμοσφαιρίνη).

Ελέγξτε ότι η ρευστοποίηση έχει ολοκληρωθεί. Αν δεν έχει (ύπαρξη κολλοειδών σωματιδίων ή βλέννας), βάλτε το δείγμα πάλι πίσω στον κλίβανο για λίγα λεπτά (η εξέταση, ωστόσο, πρέπει να αρχίσει μέσα σε 60 λεπτά από την εκσπερμάτιση, βλέπε: Μεταχείριση δειγμάτων με αυξημένη γλοιότητα, παρακάτω). Οι αποκλίσεις από τα συνηθισμένα ευρήματα σημειώνονται στην καρτέλα του εξεταζόμενου. Εάν η οσμή του δείγματος διαφέρει αισθητά από την πλειοψηφία των δειγμάτων, τότε καταγράφεται και αυτό στην καρτέλα του ασθενή.

Η γλοιότητα (ιξώδες) του δείγματος αξιολογείται υπολογίζοντας πόσο γρήγορα τρέχει έξω από την πιπέτα (π.χ. μια πιπέτα 5 ml. Αν ο όγκος δεν μετρηθεί με ζύγιση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια πιπέτα αναλυτικής ακρίβειας). Γεμίστε μία πιπέτα με το δείγμα του σπέρματος και αφήστε το να τρέξει πάλι πίσω στο δοχείο συλλογής. Εάν τα σταγονίδια σχηματίζουν ίνες που είναι >2 cm, σημειώστε αυξημένη γλοιότητα στην καρτέλα του εξεταζόμενου.

Μεταχείριση δειγμάτων με αυξημένη γλοιότητα

Σε ότι αφορά τα δείγματα με μέτρια ή αυξημένη γλοιότητα αρκεί ένα σχόλιο στην καρτέλα του εξεταζόμενου, ως ανεξάρτητο κείμενο. Η αυξημένη γλοιότητα εμποδίζει τον προσδιορισμό της κινητικότητας, του αριθμού και της επικάλυψης των σπερματοζωαρίων από αντισώματα. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνιστάται αραιώση του δείγματος με γνωστό όγκο φυσιολογικού ορού, ή θρεπτικού υλικού και προσεκτικό ανακάτεμα με πιπέτα με ευρύ στόμιο, ώστε να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές διάλυμα κατάλληλο για εξέταση. Ο αρχικός όγκος πρέπει να υπολογιστεί και να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων στο αδιάλυτο δείγμα. Αν το δείγμα του σπέρματος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής πρέπει να αποφευχθεί η μόλυνση και για την αραιώση να χρησιμοποιηθεί το θρεπτικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία σπέρματος. Σημείωση: Όταν τα δείγματα σπέρματος αραιώνονται, επηρεάζονται τα χαρακτηριστικά της κινητικότητας.

Άμεσο παρασκεύασμα

Εξέταση του άμεσου παρασκευάσματος : Βάλτε 6ml καλά αναμεμιγμένου σπέρματος σε μια καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθετείστε από πάνω καλυπτρίδα

(18X18mm, #1,5; εάν χρησιμοποιηθεί καλυπτρίδα 22X22, τότε ο όγκος στην αντικειμενοφόρο πρέπει να είναι 10 µl). Σε αυτή την περίπτωση το βάθος του πεδίου είναι ~20µm. Η εξέταση του άμεσου παρασκευάσματος θα πρέπει να αρχίσει όταν η ροή στο παρασκεύασμα σταματήσει. Εάν η ροή δεν σταματήσει μέσα σε 60 δευτερόλεπτα, το παρασκεύασμα πρέπει να πεταχτεί και να ετοιμαστεί καινούριο. Χρειάζεται μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Εάν υπάρχει κατά μέσο όρο <1 σπερματοζωάριο ανά πεδίο (40X αντικειμενικός με προσοφθάλμιο ευρέους πεδίου) το δείγμα πρέπει να αντιμετωπιστεί ως πιθανή αζωοσπερμία. Για λεπτομέρειες και καθορισμό της κινητικότητας σε οθόνη βίντεο βλέπε κεφ. 3 σε αυτό το εγχειρίδιο.

Αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοσπερμία: Αν δεν υπάρχουν καθόλου ή αν υπάρχουν ελάχιστα σπερματοζωάρια στο άμεσο παρασκεύασμα πρέπει να το σημειώσετε με ένα αστερίσκο (*) στην καρτέλα του εξεταζόμενου και, ως ανεξάρτητο σχόλιο, γράψτε πόσα από αυτά που ευρέθησαν παρουσίαζαν κινητικότητα και πόσα ήταν ακίνητα. Αν δεν παρατηρηθούν κινητά σπερματοζωάρια ή αν εντοπιστεί πολύ χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων, το δείγμα πρέπει να φυγοκεντρηθεί το λιγότερο στα 1000g για 15 λεπτά και το ίζημα να εξεταστεί στο μικροσκόπιο (40X φακό, αντίθεση φάσεων). Αν μπορεί να προσδιοριστεί η ύπαρξη κινητών ή ακίνητων σπερματοζωαρίων αφού εξεταστεί λεπτομερώς ολόκληρη η περιοχή της καλυπτρίδας (τουλάχιστον 400 πεδία σε 22X22 καλυπτρίδα), τότε πρέπει να αναφερθεί στην καρτέλα του εξεταζόμενου τόσο ο αριθμός τους όσο και το αν κινούνται ή όχι.

Εκτίμηση της κινητικότητας: Η πρώτη παράμετρος που αξιολογούμε στο άμεσο παρασκεύασμα είναι η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Αυτή η μέτρηση πρέπει να ξεκινήσει αμέσως, για να αποφύγουμε πτώση της θερμοκρασίας ή την αφυδάτωση του παρασκευάσματος. Για λεπτομερείς μεθόδους βλέπε κεφ. 3 σε αυτό το εγχειρίδιο.

Συγκόλληση και Συσσώρευση των σπερματοζωαρίων: Η ύπαρξη συσσωρεύσεων ή συγκολλήσεων των σπερματοζωαρίων εκτιμάται σε 10 τυχαία πεδία, μακριά από τις άκρες της καλυπτρίδας. Κατόπιν υπολογίζεται ο μέσος όρος του ποσοστού των σπερματοζωαρίων (στο πλησιέστερο 5%), τα οποία είναι παγιδευμένα σε μάζες. Η συγκόλληση δημιουργείται μόνο από σπερματοζωάρια χωρίς άλλα κύτταρα ή υπολείμματα. Εάν οι μάζες είναι πολύ μεγάλες, είναι δύσκολο να καθοριστεί το μοντέλο της συγκόλλησης (π.χ. κεφάλι με κεφάλι ή ουρά με ουρά). Εάν στη μάζα συμπεριλαμβάνονται κύτταρα, υπολείμματα ή

ακίνητα σπερματοζωάρια, τότε έχουμε συσώρευση. Οι συγκολλήσεις προκαλούνται από αντισπερματικά αντισώματα και συχνά περιέχουν κινούμενα σπερματοζωάρια, ενώ οι συσσωρεύσεις αποτελούνται από ακίνητα σπερματοζωάρια. Μικρές συσσωρεύσεις από νεκρά σπερματοζωάρια και άλλα υλικά βρίσκονται συχνά στο σπέρμα φυσιολογικών ανδρών ενώ η παρουσία μεγάλων συσσωρεύσεων που συμπεριλαμβάνουν εκατοντάδες σπερματοζωαρίων είναι μη φυσιολογική. Όταν η παρουσία των συσσωρεύσεων ή των συγκολλήσεων είναι ιδιαίτερα αυξημένη, αυτό πρέπει να αναφέρεται ξεχωριστά στην καρτέλα του εξεταζόμενου.

Άλλα κύτταρα και υπολείμματα: Άλλα κύτταρα και υπολείμματα που μπορούν να βρεθούν στο σπέρμα αξιολογούνται σε διάφορα πεδία και τα ασυνήθιστα ευρήματα εκφράζονται ως ανεξάρτητο σχόλιο στην καρτέλα του εξεταζόμενου με μερικές τυποποιημένες εκφράσεις:

- Η απουσία υπολειμμάτων είναι μια πολύ ασυνήθιστη κατάσταση, λίγα υπολείμματα είναι το σύνηθες, αλλά μέτρια μόλυνση με υπολείμματα δεν είναι κατά ανάγκη μη φυσιολογική. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας υπολειμμάτων είναι, βέβαια, μη φυσιολογική. Προσέξτε να κάνετε διάκριση ανάμεσα στα κομμάτια των υπολειμμάτων και στα κινούμενα βακτήρια.
- Ερυθρά αιμοσφαίρια δεν πρέπει να υπάρχουν στο σπέρμα, αν και η παρουσία ολίγων μπορεί να μην υποδεικνύει παθολογία.
- Τα επιθηλιακά κύτταρα (λεπιδώδη, κυβικά και μεταβατικά) βρίσκονται στο σπέρμα σε χαμηλούς αριθμούς. Η αυξημένη παρουσία τους δε σχετίζεται με καμία συγκεκριμένη λειτουργική βλάβη ή παρουσία λοίμωξης.
- Συχνά βλέπουμε στο σπέρμα "στρογγυλά κύτταρα" και είναι σημαντικό να διαφοροποιούμε τα λευκά αιμοσφαίρια από τους ανώριμους γαμέτες ή τα μεγάλα μορφώματα που μοιάζουν με κύτταρα (συνήθως χωρίς πυρήνα) από κυτταρόπλασμα, το οποίο έχει απολεπιστεί από το σπερματικό επιθήλιο του όρχεως. Επίσης, κύτταρα που προέρχονται από τον προστάτη εμφανίζονται στο σπέρμα. Εάν υπάρχουν >1X10⁶ στρογγυλά κύτταρα /ml, μετρημένα σε πλάκα Neubauer (ταυτόχρονα με τον προσδιορισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων), πρέπει να χρησιμοποιείται μια ειδική μέθοδος ανίχνευσης λευκοκυττάρων, ώστε να προσδιορίζεται η παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων.
- Βακτήρια και πρωτόζωα δεν βρίσκονται συνήθως στο σπέρμα, αλλά αν εντοπιστούν μικροοργανισμοί αυτό πρέπει να σημειωθεί στην φόρμα των αποτελεσμάτων.

Επιχρίσματα για χρώση με εωσίνη-νιγκροσίνη

Σύμφωνα με το εγχειρίδιο της ΠΟΥ, εάν το ποσοστό των καλώς κινούμενων σπερματοζωαρίων είναι < 50%, πρέπει να καθοριστεί το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων. Η εκτίμηση του ποσοστού ζωντανών σπερματοζωαρίων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την διαφοροποίηση ανάμεσα σε νεκρά και ζωντανά ακίνητα σπερματοζωάρια. Κλινικά, αυτή η διαφορά παρουσιάζει ενδιαφέρον, όταν δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν πολύ λίγα κινούμενα σπερματοζωάρια. Επομένως, ένα όριο απόφασης στα < 40% κινούμενα σπερματοζωάρια δεν θα οδηγήσει σε κάποια διαφυγούσα διάγνωση αλλά θα ελαττώσει το φόρτο δουλειάς ελατώνοντας τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία πρέπει να γίνει εκτίμηση της ζωτικότητας. Για λεπτομερή ανάλυση της μεθόδου εκτίμησης της ζωτικότητας βλέπε Τμήμα 4 σε αυτό το εγχειρίδιο.

Έλεγχος αντισωμάτων

Το εκκριτικό τμήμα των αντισωμάτων τύπου IgA δεσμεύεται στην τραχηλική βλένη. Η παρουσία αντισωμάτων IgA στο σπερματοζωάριο επομένως θα έχει ως αποτέλεσμα ελαττωμένη ικανότητα του σπερματοζωαρίου να διαπεράσει την τραχηλική βλένη.

Αντισώματα στα σπερματοζωάρια: Τα αντισώματα IgG και IgA των σπερματοζωαρίων μπορούν να προσδιοριστούν άμεσα στο δείγμα, για παράδειγμα με τη μέθοδο SpermMar™ για τις κατηγορίες IgG και IgA ή μετά από πλύση με τη μέθοδο του Immunobead™.

Αντισώματα σπερματικού υγρού: Σε δείγματα σπέρματος με έλλειψη σπερματοζωαρίων, η παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα με τον εξής τρόπο: το προς ανάλυση δείγμα, στο οποίο πιθανώς υπάρχουν αντισώματα, επωάζεται με δείγμα σπέρματος από δότη, το οποίο δεν έχει αντισώματα. Κατόπιν το δείγμα του δότη υποβάλλεται άμεσα στον έλεγχο των αντισωμάτων.

Όλες οι μέθοδοι βασίζονται στην ύπαρξη καλώς κινούμενων σπερματοζωαρίων. Τουλάχιστον 200 καλώς κινούμενα σπερματοζωάρια πρέπει να εκτιμηθούν.

Τα αποτελέσματα του SpermMar και του Immunobead δεν παρουσιάζουν πλήρη συσχέτιση. Ένα θετικό εύρημα για τα IgA (δηλαδή > 50% των καλώς κινούμενων σπερματοζωαρίων έχουν επικαλυφθεί από σφαιρίδια) πρέπει να επαληθευθεί με το τεστ αλληλεπίδρασης του σπέρματος με την τραχηλική βλένη.

Διάλυμα για τον προσδιορισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων

Για να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τον αριθμό των σπερ-

ματοζωαρίων, είναι απαραίτητη η καλή αλλά ήπια ανάδευση του δείγματος προτού ληφθεί συγκεκριμένος όγκος με πιπέτα θετικής αναρρόφησης. Για την ακριβή μέθοδο προσδιορισμού του αριθμού των σπερματοζωαρίων βλέπε κεφ. 2 αυτού του εγχειριδίου.

Φυλάξτε 100μl για τον υπολογισμό των κυττάρων της φλεγμονής

Για να προσδιορίσουμε εάν ο αριθμός των στρογγυλών κυττάρων του σπέρματος (>10⁶ στρογγυλά κύτταρα ανά ml) αποτελείται από πυοσφαίρια, πρέπει να χρησιμοποιηθεί συγκεκριμένη μέθοδος (κυτταρολογική ή ανοσοιστοχημική) για την ανίχνευση λευκοκυττάρων.

Κάντε επιχρίσματα προς χρώση για την εκτίμηση της μορφολογίας

Για την εκτίμηση της μορφολογίας, κάντε 2 επιχρίσματα από κάθε δείγμα σπέρματος σε καθαρές αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου. Τοποθετήστε ένα κλάσμα καλά αναμεμιγμένου σπέρματος στην αντικειμενοφόρο πλάκα (8-10-15 μl ανάλογα με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων του δείγματος για την αποφυγή υπερπληθώρας) και απλώστε τη σταγόνα με την άκρη της καλυπτρίδας. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί μία εναλλακτική μέθοδος για τη δημιουργία του επιχρίσματος: μια σταγόνα του σπέρματος τοποθετείται ανάμεσα σε 2 αντικειμενοφόρους πλάκες, οι οποίες μετά σύρονται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που θα επιλεγεί, τα επιχρίσματα πρέπει να είναι ομοιόμορφα και λεπτά για να επιτευχθεί ομοιόμορφη χρώση και εύκολη ανάγνωση του πλακιδίου.

Αφήστε τα επιχρίσματα να στεγνώσουν στον αέρα και μετά σταθεροποιήστε τα αμέσως και αποθηκεύστε τα μέχρι την χρώση τους, για την εκτίμηση της μορφολογίας του σπέρματος (βλέπε κεφ. 5 σε αυτό το εγχειρίδιο). Τα επιχρίσματα δειγμάτων με πιθανή αζωοσπερμία, πρέπει να σταθεροποιούνται σε ξεχωριστά φιαλίδια με αχρησιμοποίητο διάλυμα, για να αποφευχθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης με σπερματοζωάρια από τα άλλα επιχρίσματα.

Φυλάξτε και φυγοκεντρήστε σπέρμα για μετέπειτα βιοχημικές εξετάσεις

Ο όγκος του σπέρματος που απομένει φυγοκεντρείται (3000g, 15 λεπτά) και το υπερκείμενο (σπερματικό υγρό) τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα με ετικέτα για μετέπειτα βιοχημικές εξετάσεις. Ο δοκιμαστικός σωλήνας κλείνεται ερμητικά και τοποθετείται στον καταψύκτη σε ειδικό ράφι με βάση τον αύξοντα αριθμό (-20° C). Οι μέθοδοι για τις βιοχημικές εξετάσεις δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτό το εγχειρίδιο

Μέτρηση σε βελτιωμένη πλάκα Neubauer

Βλέπε κεφ. 2 σε αυτό το εγχειρίδιο

Επίχρισμα για βαφή για εκτίμηση της μορφολογίας

Βλέπε κεφ. 5 σε αυτό το εγχειρίδιο

Εξοπλισμός και υλικά

Ο εξοπλισμός και τα υλικά που απαριθμούνται εδώ προορίζονται για τη συλλογή και εξέταση του δείγματος σπέρματος γενικά. Στα παρακάτω κεφάλαια ο εξοπλισμός και τα υλικά για τις συγκεκριμένες μεθόδους που περιγράφονται καταγράφονται ξεχωριστά σε πίνακα.

- Δοχείο συλλογής δείγματος (π.χ. Sarstedt: 100 ml; #75.563; καπάκι : #76.564).
- Ειδικό προφυλακτικό για τη συλλογή σπέρματος (προϊόν Millex Inc., Chicago, Illinois 60631,USA; Male Factor Pack[®], Hygiene[®], FertiPro N.V., Belgium).
- Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (40X αντικειμενικό φακό).
- Αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου (κανονικό μέγεθος); καλυπτρίδες (18X18mm, # 1 ½(πάχος) 22X22 mm; #1 ½).
- Οι πιπέτες για την προετοιμασία του παρασκευάσματος μπορεί να είναι αναρρόφησης μέσω κενού αέρος (δε χρειάζεται θετικής αναρρόφησης). Για τα επιχρίσματα της μορφολογίας χρειάζεται πιπέτα των 6μl. Για τα επιχρίσματα της ζωτικότητας χρειάζεται πιπέτα των 8 – 15 μl και πιπέτα των 15-50 μl.
- Ρύγχη για πιπέτες: πλαστικά, για τις πιπέτες αναρρόφησης μέσω κενού αέρος, όγκου 5 – 50 μl.
- Φυγόκεντρος (1000 – 3000 g). N.B. Η σχετική δύναμη της φυγοκέντρωσης (RCF;g) υπολογίζεται από τον τύπο $g = 1118 \times 10^{-8} \times R \times N^2$; όπου R είναι η απόσταση ανάμεσα στο περιστρεφόμενο μέρος μέχρι το σημείο όπου χρειάζεται η δύναμη (δηλ στο άκρο του σωλήνα) και N είναι οι στροφές ανά λεπτό.
- Εργαστηριακός ζυγός με δυνατότητα ζύγισης 150 – 300g ; ανάλυση 0,01g.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες για τον προσδιορισμό των κυττάρων φλεγμονής, π.χ. πλαστικοί σωλήνες από πολυστυρένιο με μήκος 55mm και πλάτος 11mm (εξωτερική διάμετρος).
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με καπάκι για την κατάψυξη (βιοχημικές αναλύσεις), π.χ. πλαστικοί σωλήνες από πολυστυρένιο με μήκος 55mm και πλάτος 11mm (εξωτερική διάμετρος).
- Επωαστικός ή θερμαινόμενος θάλαμος (37° C).
- Πλαστικά γάντια για εργαστηριακή χρήση.

© European Society of Human Reproduction and Embryology

2. Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων

Αρχές της μεθόδου

Είναι εύκολο να υπολογίσουμε τον αριθμό των αραιωμένων και ακινητοποιημένων σπερματοζωαρίων στο μικροσκόπιο. Το πρόβλημα είναι να διασφαλίσουμε ότι αυτός ο πληθυσμός των σπερματοζωαρίων είναι αντιπροσωπευτικός και ότι το υπό εξέταση κλάσμα είναι επαρκές και αντιπροσωπευτικό. Αυτό σημαίνει ότι δεν πρέπει να αφήσετε τα σπερματοζωάρια να χαθούν λόγω δημιουργίας ιζήματος, συσσώρευσης ή επικόλλησης στα τοιχώματα του δοχείου του δείγματος, των ρυγχών της πιπέτας ή των δοκιμαστικών σωλήνων και ότι δεν πρέπει να υπάρχουν σφάλματα στην αραιώση. Είναι απαραίτητη η προσεκτική ανάμιξη του δείγματος πριν από την λήψη του δείγματος για την αραιώση και επίσης, πριν από την λήψη του όγκου από το αραιωμένο δείγμα για την τοποθέτηση στο θάλαμο μέτρησης.

Επιπλέον, η αραιώση πρέπει να είναι ακριβής. Η χρήση πιπέτας θετικής αναρρόφησης είναι υποχρεωτική για να ελαχιστοποιήσουμε τα σφάλματα, όταν παίρνουμε δείγμα συγκεκριμένου όγκου από καλά αναμεμιγμένο δείγμα για αραιώση. Ο λόγος για τη χρήση της πιπέτας θετικής αναρρόφησης είναι ότι μετρά ακριβή όγκο. Οι συνηθισμένες πιπέτες, που εκτοπίζουν συγκεκριμένο όγκο αέρα, είναι βαθμονομημένες έτσι ώστε να παίρνουν ακριβή όγκο νερού. Δεδομένου ότι η γλοιότητα του σπέρματος είναι υψηλότερη από αυτή του νερού και ποικίλλει από το ένα δείγμα στο άλλο, οι συνηθισμένες θα πάρουν διαφορετικό όγκο δείγματος από διαφορετικά δείγματα σπέρματος.

Επιπρόσθετα, για να επιτευχθεί ο σωστός όγκος στον θάλαμο μέτρησης, η καλυπτρίδα πρέπει να τοποθετηθεί σωστά (σφιχτά) και ο θάλαμος να γεμίσει σωστά

Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων ($10^6/ml$ δείγματος) υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που καταμετρήθηκαν στους θαλάμους μέτρησης με ένα συντελεστή που εξαρτάται από την αραιώση και τον αριθμό των τετραγώνων που καταμετρήθηκαν. Ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ($10^6/εκσπερμάτιση$) είναι το προϊόν του όγκου της εκσπερμάτισης και

του αριθμού των σπερματοζωαρίων.

Αξιολόγηση της κατάλληλης αραιώσης

Το άμεσο παρασκεύασμα χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο αριθμός των σπερματοζωαρίων και για να επιλέξουμε την πιο κατάλληλη αραιώση. Σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο ετοιμασίας του άμεσου δείγματος (6μl σπέρματος, καλυπτρίδα 18X18 mm, "πάχος" #1.5), το βάθος πεδίου του δείγματος που φαίνεται σε ένα οπτικό πεδίο, είναι περίπου ~20 μm. Με την προϋπόθεση ότι η διάμετρος του οπτικού πεδίου είναι 500 μm, οι δεδομένοι αριθμοί σπερματοζωαρίων ανά οπτικό πεδίο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να επιλέξουμε την κατάλληλη αραιώση για το δείγμα όπως δίνεται στον πίνακα I. (4 σπερματοζωάρια ανά πεδίο αντιστοιχούν στη συγκέντρωση των $\sim 1 \times 10^6$ σπερματοζωαρίων/ml). Η ακριβής περιοχή του πεδίου στο μικροσκόπιο μπορεί να υπολογιστεί με μικρομετρική πλάκα τράπεζας, δηλ μία αντικειμενοφόρο πλάκα με διαβαθμισμένη κλίμακα, συνήθως με ενδείξεις 0,1 και 0,01 mm. Μετρήστε τη διάμετρο του πεδίου και υπολογίστε την περιοχή πεδίου με τον ακόλουθο τύπο Περιοχή = πr^2 όπου r = διάμετρος /2.

ΠΙΝΑΚΑΣ I. Αραίωση της εκσπερμάτισης

Σπερματοζωάρια ανά οπτικό πεδίο με αντικειμενικό 40X	Αραίωση	Δείγμα (μl)	Διαλύτης (μl)
Μέθοδος Swim-up	1 + 1 (1:2)	100	100
<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

Σε παλαιότερα μικροσκόπια, η διάμετρος του πεδίου μπορεί να είναι κατά πολύ μικρότερη, οπότε φαίνονται λιγότερα σπερματοζωάρια ανά οπτικό πεδίο (πχ εάν η διάμετρος είναι 250 μm, 1 σπερματοζωάριο ανά οπτικό πεδίο αντιστοιχεί σε 1×10^6 σπερματοζωάρια / ml, και τα

"σπερματοζωάρια ανά οπτικό πεδίο" που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο πρέπει να πολλαπλασιάζονται επί 4 προτού να χρησιμοποιηθεί ο πίνακας I.

Επομένως οι τυποποιημένες αραιώσεις είναι 1+19 και 1+9. Για επεξεργασίες με την τεχνική swim up όπου υπάρχουν $<10 \times 10^6$ σπερματοζωάρια/ml μπορεί να χρησιμοποιηθεί αραιώση 1+1. Όταν πιθανολογείται αζωοσπερμία εξετάζεται το ίζημα (μετά τη φυγοκέντρωση) ως προς την παρουσία καλώς κινούμενων και ακίνητων σπερματοζωαρίων στο ίζημα (βλέπε "Αζωοσπερμία..." στο κεφάλαιο 1, Άμεσο παρασκεύασμα).

Οι αραιώσεις μπορούν να φυλαχτούν το μέγιστο για 4 εβδομάδες σε ηλεγγμένους σωλήνες στους 4° C, αλλά είναι προτιμότερο να μετρηθούν την ίδια μέρα. Τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν μετά από παρατεταμένη αποθήκευση είναι η δημιουργία συσσωμάτων καθώς και επικόλληση σπερματοζωαρίων στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα.

Διαδικασία

(i) Για κάθε δείγμα σπέρματος ετοιμάστε μία αραιώση σύμφωνα με τον πίνακα I. Πάρτε ακριβή όγκο ρευστοποιημένου δείγματος, το οποίο έχει ανακατευθεί καλά με πιπέτα θετικής αναρρόφησης, και προσθέστε το στο διαλυτή μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα με σφιχτό καπάκι.

(ii) Τοποθετείστε την καλυπτρίδα (πρέπει να είναι ειδική σε πάχος καλυπτρίδα για κυτταρόμετρα ώστε να πετύχουμε το σωστό βάθος στον θάλαμο) στον θάλαμο μέτρησης (κυτταρόμετρο βελτιωμένης έκδοσης Neubauer). Τα μοτίβα επαφής (>10 δακτύλιους Newton/πλευρά, ή ιριδίζουσες γραμμές) ανάμεσα στις επιφάνειες του γυαλιού και των 2 περιοχών όπου η καλυπτρίδα προσαρμόζεται στην πλάκα Neubauer, πρέπει να είναι εμφανή. Αν είναι ορατές πολύ ελάχιστες γραμμές, τότε η απόσταση μεταξύ της καλυπτρίδας και της πλάκας Neubaueer αυξάνεται και έτσι ο όγκος του θαλάμου γίνεται πολύ μεγάλος και το αποτέλεσμα του υπολογισμού δεν θα είναι σωστό.

(iii) Πρέπει να αναμίξετε τους σωλήνες που περιέχουν το αραιωμένο δείγμα για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα (σε δονητή σωληναρίων, vortex) ακριβώς πριν γεμίσει ο θάλαμος μέτρησης. Μετά την ανάδευση αφαιρέστε ένα κλάσμα περίπου 6-10 μl και τοποθετείστε το με μια πιπέτα στη μία πλευρά του κυτταρόμετρου Neubauer. Ο ακριβής όγκος εξαρτάται από τον όγκο που χρειάζεται για να γεμίσει κατάλληλα την περιοχή κάτω από την καλυπτρίδα. Κατόπιν τοποθετείτε ένα δεύτερο κλάσμα στην άλλη πλευρά. Ο κάθε θάλαμος πρέπει να γεμίσει εντελώς. Αν ο θάλαμος παραγεμίσει δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να ξαναγεμίσετε καινούργιο

θάλαμο. Δεν πρέπει να αφαιρέσετε τον περιττό όγκο από τον θάλαμο, επειδή αυτό μπορεί να αλλάξει τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων. Κατόπιν συγκρίνετε τις μετρήσεις των δύο κλασμάτων.

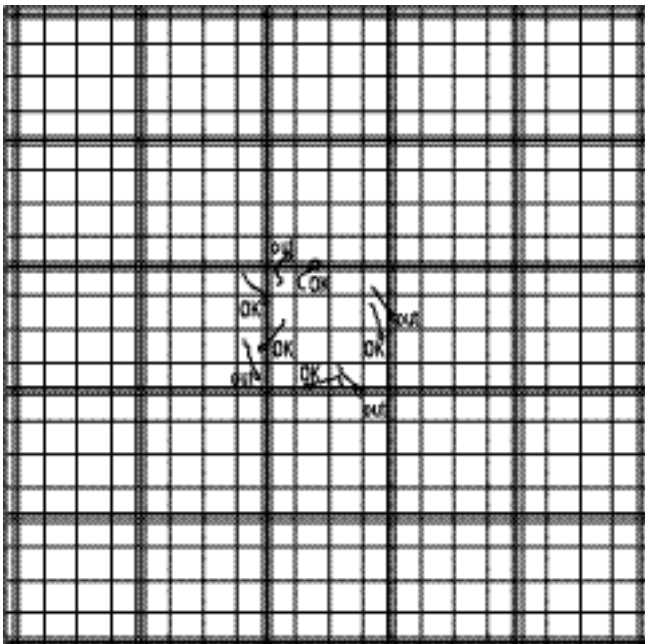
(iv) Αφήστε τον θάλαμο για 10-15 λεπτά σε υγρό περιβάλλον, για να επιτραπεί στα σπερματοζωάρια να κατακάθισουν στο πλέγμα του θαλάμου μέτρησης.

(v) Μετρήστε τα σπερματοζωάρια με 20X -40X αντικειμενικό φακό (αντίθεσης φάσης) σύμφωνα με τα παρακάτω κριτήρια: το περίγραμμα ενός μεγάλου τετραγώνου είναι η τριπλή γραμμή (βλ επίσης σχ 1: πώς φαίνεται το κεντρικό πλέγμα του κυτταρόμετρου Neubauer). Για να προσδιορίζετε κάθε μεγάλο τετράγωνο πρέπει πάντα να χρησιμοποιείτε τις επάνω και αριστερά πλευρές ως όρια. Σημειώστε ότι είναι απαραίτητος ο αντικειμενικός φακός 40X σε μεγάλη απόσταση όταν χρησιμοποιείτε τον θάλαμο Neubauer.

- Προσδιορίστε τον αριθμό των τετραγώνων που πρέπει να μετρηθούν. Πρώτον, μετρήστε τον αριθμό των σπερματοζωαρίων στο τετράγωνο που βρίσκεται στην επάνω και αριστερά γωνία του θαλάμου. Για < 10 σπερματοζωάρια, μετρήστε όλο το πλέγμα (25 τετράγωνα σε κάθε θάλαμο). Για 10-40 σπερματοζωάρια, μετρήστε 10 τετράγωνα σε κάθε θάλαμο. Για >40 σπερματοζωάρια, μετρήστε 5 τετράγωνα σε κάθε θάλαμο (π.χ. 4 ακριανά τετράγωνα και το κεντρικό). Ο σκοπός είναι να μετρηθούν τυπικά 200 σπερματοζωάρια σε κάθε θάλαμο, αριθμός ο οποίος θεωρείται αρκετός για να γίνει σύγκριση μεταξύ 2 μετρήσεων.
- Αν αναγνωριστεί με βεβαιότητα ελεύθερη κεφαλή σπερματοζωαρίου, προτείνουμε να συμπεριληφθεί στον υπολογισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Πρέπει να μετρήσετε ξεχωριστά τα σπερματοζωάρια με κεφαλή καρφίτσας και να κάνετε κάποιο σχόλιο στην αναφορά των αποτελεσμάτων. Δεν πρέπει να μετρήσετε τα άωρα κύτταρα της σπερματικής σειράς (αυτό θα υπολογιστεί μόνο στη μορφολογία), ενώ πρέπει να μετρηθούν τα στρογγυλά κύτταρα και τα κύτταρα φλεγμονής ξεχωριστά στον θάλαμο μέτρησης.
- "Τα σπερματοζωάρια που βρίσκονται στις γραμμές των ορίων": προσδιορίζετε τα σπερματοζωάρια των οποίων η κεφαλή βρίσκεται στις επάνω και αριστερές πλευρές (οι οποίες σημειώνονται με OK στο σχ. 1) σαν να ανήκουν σε αυτό το τετράγωνο. Επομένως, μην μετράτε τα σπερματοζωάρια που βρίσκονται στις κάτω και δεξιές πλευρές (που σημειώνονται με την λέξη OUT στο σχ. 1).

Υπολογισμοί

Συγκρίνετε τις μετρήσεις από τα δύο κλάσματα όπως περιγράφεται στο Παράρτημα I. Υπολογίστε τον συνολικό



ΣΧΗΜΑ 1

Ο θάλαμος αποτελείται από 25 “μεγάλα τετράγωνα”, όπως φαίνεται στο σχήμα. Κάθε “μεγάλο” τετράγωνο περιβάλλεται από τριπλές γραμμές και περιέχει 16 μικρά τετράγωνα. Αυτά τα μικρά τετράγωνα χρησιμοποιούν όταν υπάρχουν πολλά σπέρματα για μέτρηση στο μεγάλο τετράγωνο. Με αντικειμενικό φακό 40X, φαίνεται ανά οπτικό πεδίο ένα μόνο μεγάλο τετράγωνο. Κάθε θάλαμος μέτρησης (25 μεγάλα τετράγωνα) έχει πλευρά 1X1mm και βάθος 0,1mm(100μm). Έτσι ο συνολικός όγκος του θαλάμου είναι 0,1mm³=0,1μl=100nl. (Ο θάλαμος Makler έχει επίσης πλευρά 1X1mm, αλλά βάθος μόνο 0,01mm. Έτσι ο συνολικός όγκος στον θάλαμο Makler είναι το ένα δέκατο της Neubauer=0,01μl=10nl.)

αριθμό των σπερματοζωαρίων που μετρήθηκαν (άθροισμα) και τη διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων. Οι υπολογισμοί είναι αποδεκτοί αν η διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων είναι μικρότερη ή ίση με την τιμή που πήρατε στο Παράρτημα Ι. Αν όχι, μη λάβετε υπόψιν σας τις μετρήσεις, ανακατέψτε το αραιωμένο δείγμα στο vortex, γεμίστε τους 2 θαλάμους και κάντε καινούργιους υπολογισμούς.

ΠΙΝΑΚΑΣ II. Συντελεστής για τη διαίρεση του ολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων που μετρήθηκαν

Αραίωση	Αριθμός των τετραγώνων που μετρήθηκαν		
	25	10	5
1 + 1	100	40	20
1 + 4	40	16	8
1 + 9	20	8	4
1 + 19	10	4	2
1 + 49	4	1.6	0.8

Το άθροισμα των δύο μετρήσεων (συνολικός αριθμός

σπερματοζωαρίων στους δύο θαλάμους διαιρείται με τον κατάλληλο συντελεστή [πίνακας II] για να υπολογίσετε τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων στο δείγμα του σπέρματος (που εκφράζεται σε 10⁶ σπερματοζωάρια /ml).

Σημείωση: Σε αυτό το εγχειρίδιο διαιρούμε τον συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων που μετρήθηκαν με τους συντελεστές που μας δίνονται στον πίνακα II. Στο εγχειρίδιο της ΠΟΥ, ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων που καταμετρήθηκε διαιρείται πρώτα με το δύο, για να πάρουμε πρώτα τον μέσο όρο, και μετά αυτός ο μέσος όρος διαιρείται με άλλο συντελεστή. Ως εκ τούτου οι συντελεστές που δίνονται στο εγχειρίδιο της ΠΟΥ είναι μόνο το ήμισυ των τιμών που δίνονται εδώ. Η διαδικασία που περιγράφεται εδώ είναι συντομότερη κατά μια διαίρεση και έτσι μειώνει πιθανά αριθμητικά σφάλματα.

ΙΕάν οι δύο μετρήσεις είναι αποδεκτές πρέπει να γίνουν τρεις υπολογισμοί για να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων σε 10⁶ Αυτά τα βήματα μπορούν να γίνουν ένα-ένα, ή προτιμότερο μπορούν να συνδυαστούν σε έναν μόνο υπολογισμό.

I. Πρώτον, υπολογίζετε τον μέσο όρο διαιρώντας το άθροισμα των σπερματοζωαρίων που μετρήθηκαν με το 2 (x1/2).

II. Δεύτερον, πρέπει να υπολογιστεί η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων σε κάθε θάλαμο (δηλ. στο αραιωμένο δείγμα). Για να γίνει αυτό πρέπει να ξέρεις τον όγκο που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε θάλαμο. Ο όγκος ενός μεγάλου τετραγώνου στο βελτιωμένο κυτταρόμετρο Neubauer είναι 4nl (200 X 200 X 100 μm βάθος). Έτσι 5, 10 και 25 τετράγωνα αντιστοιχούν σε όγκους 20, 40 και 100 nl αντίστοιχα.

Ο μέσος όρος των σπερματοζωαρίων διαιρείται με τον όγκο μέσα στον οποίο μετρήθηκαν : (X 1/20 ; 1/40; 1/100).

Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που παίρνουμε είναι ο αριθμός ανά nl που ισοδυναμεί με αριθμό των σπερματοζωαρίων σε εκατομμύρια ανά ml (σπερματοζωάρια / 10⁹ l = σπερματοζωάρια X 10⁶ / 10⁻³ l).

III. Τρίτον, έχει γίνει η αραιώση του αρχικού δείγματος, οπότε για να πάρουμε τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, πρέπει να πολλαπλασιάσουμε με τον συντελεστή αραιώσης: (X 2; 5; 10; 20; 50). Οπότε αραιώσεις 1+1, 1+4, 1+9, 1+19 και 1+49 αντιστοιχούν σε αραιώσεις X2, 5, 10, 20 και 50 αντίστοιχα.

Αυτά τα βήματα μπορούν να γίνουν με μία διαίρεση, όπου ο ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων στους δύο θαλάμους διαιρείται με ένα συντελεστή που δίνεται στον πίνακα III).

Αποτελέσματα

Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων αναγράφεται στην

καρτέλα του εξεταζόμενου και ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτιση υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας την συγκέντρωση επί τον όγκο της εκσπερμάτισης. Εκτός από την ατελή συλλογή δείγματος και τους διαφορετικούς χρόνους αποχής, υπάρχουν πολλοί άλλοι εξωτερικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τον συνολικό αριθμό σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτιση π.χ. πυρετός, φάρμακα και επιδράσεις λόγω της φύσεως του επαγγέλματος. Για μια σωστή εκτίμηση των ποσοτικών προσδιορισμών του σπέρματος, τα αποτελέσματα του εργαστηρίου πρέπει να περιέχουν στοιχεία για τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, τον όγκο της εκσπερμάτισης (ή τον ολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων), τον χρόνο αποχής και το αν η συλλογή ήταν πλήρης.

Σχετικά με το αποτέλεσμα "καθόλου σπερματοζωάρια" είναι προτιμότερο να παρουσιάζεται το αποτέλεσμα σαν 0.0×10^6 σπερματοζωάρια ανά ml αλλά ένας αστερίσκος (*) να γράφεται στο σημείο της συγκέντρωσης και του ολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων. Ως σχόλιο πρέπει να αναγράφεται το αν βρέθηκε έστω και ένα κινητό ή ακίνητο σπερματοζωάριο στην εκσπερμάτιση ή στο ίζημα μετά από φυγοκέντρηση. Εάν στο ίζημα των 100 μl δε βρεθούν σπερματοζωάρια, ο μέγιστος αριθμός σπερματοζωαρίων, τα οποία ακόμα μπορεί να υπάρχουν, πρέπει να δοθεί (λεπτομέρειες για τους υπολογισμούς δίνονται στο τελευταίο τμήμα αυτού του κεφαλαίου) π.χ. δε βρέθηκαν σπερματοζωάρια : υπάρχει πιθανότητα να υπάρχουν <188 σπερματοζωάρια σε ολόκληρο το δείγμα.

Ποιοτικός Έλεγχος

Διπλές μετρήσεις πρέπει να γίνονται για να ανιχνευθούν τυχαία λάθη τόσο στη δειγματοληψία όσο και στον θάλαμο μέτρησης.

Οι πιπέτες θετικής αναρρόφησης (ορισμένες φορές καλούνται PCR πιπέτες) καθώς και οι κοινές πιπέτες για τη μέτρηση των αραιώσεων πρέπει να βαθμονομούνται τακτικά. Οι πιπέτες που δείχνουν λανθασμένα αποτελέσματα πρέπει να διορθώνονται ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ή να στέλνονται για επιδιόρθωση και ρύθμιση. Τα αποτελέσματα της βαθμονόμησης όπως επίσης και οι επισκευές και οι ρυθμίσεις πρέπει να αναγράφονται σε μία ξεχωριστή φόρμα για κάθε πιπέτα.

Μεγάλη προσοχή χρειάζεται όταν ανακατεύουμε και αραιώνουμε το δείγμα του σπέρματος, όταν ανακατεύουμε το αραιωμένο δείγμα και όταν ετοιμάζουμε τους θαλάμους μέτρησης (τοποθέτηση της καλυπτρίδας). Οι θάλαμοι μέτρησης πρέπει να ελέγχονται για την ακρίβεια τους όταν είναι καινούριοι και κατά τακτά χρονικά διαστήματα μετά από χρήση (κίνδυνος φθοράς και αλλαγή βάθους του θαλάμου).

Αντιδραστήρια

Διαλύτης : 50 gr NaHCO_3 ; 10 ml 36-40% διαλύματος φορμαλδεύδης (ένα κορεσμένο διάλυμα φορμαλδεύδης)

- Διαλύετε τα συστατικά σε απεσταγμένο νερό (>10 MΩ/cm) και αραιώνετε έως τα 1000 ml
- Φιλτράρετε (για να αποφύγετε τους κρυστάλλους) σε ένα καθαρό μπουκάλι
- Αποθηκεύετε στους 4°C (μπορεί να αποθηκευτεί για τουλάχιστον 12 μήνες)
- Δεν πρέπει να περιέχει στερεά σωματίδια

Εξοπλισμός και υλικά

- Αναδευτήρας Vortex.
- Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (αντικειμενικός 40X ή 20X και 10X για εύκολη εστίαση).
- Υγρός θάλαμος: μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κουτί με καπάκι και υγρή γάζα ή χαρτί πάνω στο οποίο στηρίζεται ο θάλαμος μέτρησης. Σημείωση: Ο θάλαμος μέτρησης πρέπει να βρίσκεται σε οριζόντια θέση.
- Υπολογιστής, μετρητής κυττάρων, φυγόκεντρος, καρτέλα του εξεταζόμενου.
- Θάλαμος μέτρησης: βελτιωμένος κυτταρομετρητής Newbauer με την κατάλληλη καλυπτρίδα.
- Πιπέτα θετικής αναρρόφησης: πχ Finnpiquette PCR 20-200 μl; ρύγχη πχ Labsystems 9403 080.
- Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου, βαθμονομημένες: πχ Finnpiquette Digital 200-1000 μl; Ρύγχη : πχ μπλέ Treff ή Finntip.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες Trombo-test-tube ή "Stockholm tube" (KEBO 104.112-250).
- Καπάκι για τον δοκιμαστικό σωλήνα Trombo-test-tube ή "Stockholm tube" (KEBO 103.811-12).

Η βεβαιότητα της μέτρησης των σπερματοζωαρίων

Τι σημαίνει όταν δε βρίσκονται σπερματοζωάρια ;

Εάν, θεωρητικά, ένα ολόκληρο δείγμα σπέρματος εξεταστεί και δε βρεθούν καθόλου σπερματοζωάρια τότε το αποτέλεσμα είναι 0 σπερματοζωάρια. Βέβαια, στη σταγόνα του δείγματος ή στον θάλαμο μέτρησης εξετάζετε μόνον ένα μικρό τμήμα από όλο το δείγμα. Κατά συνέπεια το αποτέλεσμα 'καθόλου σπερματοζωάρια' σημαίνει ότι ένα δείγμα περιέχει λιγότερα από μία συγκεκριμένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων με κάποια συγκεκριμένη πιθανότητα. Η ακρίβεια της μέτρησης εξαρτάται από την πραγματική συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και από το πόσο μεγάλο τμήμα του αρχικού δείγματος εξετάστηκε στο μικροσκόπιο. Όσο μεγαλύτερο το τμήμα, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η ακρίβεια. Π.χ. : αν ένα δείγμα αραιωθεί 1+1 και εξεταστεί στο βελτιωμένο κυτταρόμετρο

Neubauer (δύο θάλαμοι) έχετε εξετάσει 100 nl του αρχικού δείγματος. Εάν έχετε εξετάσει το δείγμα χωρίς αραιώση σε θάλαμο Makler έχετε εξετάσει 10 nl. Σε μία σταγόνα δείγματος μπορεί να εξετάσετε δέκα πεδία που αντιστοιχούν σε όγκο 40 nl. Ο πίνακας III δείχνει τον κίνδυνο να μη βρεθούν σπερματοζωάρια σε διαφορετικές πραγματικές συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων. Ο κίνδυνος του να μη βρεθούν καθόλου σπερματοζωάρια είναι <5% για συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων >300.000 /ml σε θαλάμους 10 nl ή >75.000 / ml για μία σταγόνα δείγματος (40 nl), και > ή = 30.000 / ml σε θαλάμους των 100 nl. Αυτοί οι αριθμοί, επίσης, δείχνουν ότι υπάρχει ένας κίνδυνος της τάξης του 5% να αγνοήσουμε μια συγκέντρωση σπερματοζωαρίων της τάξης των 290.000 / ml και 50% να αγνοήσουμε 70.000 /ml, όταν εξετάζουμε τους μικρότερους θαλάμους των 10 nl. Αυτό δίνει έμφαση στην ανάγκη που υπάρχει να ελεγχεται το ίζημα μετά από φυγοκέντρηση, όταν δε βρίσκονται σπερματοζωάρια στη σταγόνα του δείγματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ III. Ο κίνδυνος να μη βρεθούν σπερματοζωάρια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων που εκτιμήθηκαν σε θαλάμους μέτρησης των 100 και 10 nl και στη σταγόνα του δείγματος (~40 nl). Ο κίνδυνος αυτός είναι <5% σε συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων ≥300 000/ml για τον θάλαμο των 10 nl, ≥75 000/ml για τη σταγόνα του δείγματος και ≥30 000 για τους θαλάμους των 100 nl

Πραγματική συγκέντρωση σπερμ/ρίων (σπερμ/ml) στο προς ανάλυση δείγμα	1 Makler	Σταγόνα του δείγματος (10 πεδία~40nl)	Neubauer (2 θάλαμοι) 1 + 1 αραιώση (100 nl)
	Κίνδυνος να μην βρεθούν σπερματοζωάρια		
1000	0.99	0.96	0.90
10 000	0.90	0.67	0.37
30 000	0.74	0.30	< 0.05
70 000	0.50	0.06	
75 000	0.47	< 0.05	
100 000	0.37		
200 000	0.14		
300 000	< 0.05		

ΠΙΝΑΚΑΣ IV. Υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να μη βρεθούν σπερματοζωάρια ακόμη και αν ένα δείγμα έχει σπερματοζωάρια. Σε αυτόν τον πίνακα δίνονται κρίσιμοι αριθμοί για τις περιπτώσεις που ο κίνδυνος αυτός είναι κάτω του 5% σχετικά με τον αριθμό των πεδίων που έχουν εξεταστεί. Έτσι ο κίνδυνος να μην βρεθούν σπερματοζωάρια είναι <5% όταν το δείγμα περιέχει 188 σπερματοζωάρια και έχουν εξεταστεί 400 πεδία. Αν το δείγμα περιέχει λιγότερα σπερματοζωάρια, π.χ. 100, ο κίνδυνος να μη βρεθεί είναι >5% (20%). Η διάμετρος πεδίου είναι 500 μm και το βάθος του πεδίου 20 μm.

	Αριθμός εξετασθέντων πεδίων		
	4	40	400
Κρίσιμος αριθμός σπερματοζωαρίων	18 750	1 875	188

Η βεβαιότητα της σταγόνας των 10 μl από το ίζημα της φυγοκέντρησης

Σε μικροσκόπιο με αντικειμενικό φακό 40 X ένα οπτικό πεδίο αντιστοιχεί σε 4 nl. Εάν το αριθμητικό άνοιγμα έχει διάμετρο 500 μl, βλέπεις μία περιοχή των 196.427 μm² και με μία σταγόνα των 10 μl, με καλυπτρίδα των 22 X 22, το βάθος είναι 20,7 μm, άρα ο όγκος παρατήρησης των 4.058.442 μm³, περίπου 4 nl.

Κάθε φορά που ελέγχουμε την καλυπτρίδα στο μικροσκόπιο περνάμε περίπου 40 πεδία. Ελέγχοντας πάνω και κάτω 10 φορές σημαίνει ότι ελέγχουμε περίπου 400 πεδία. Όταν έχουν ελεγχθεί 400 πεδία ο συνολικός όγκος είναι περίπου 1.600 nl (4 X 400), δηλαδή περίπου 1/62 του ολικού όγκου του ιζήματος των 100 μl (100.000 nl). Εάν υπάρχουν > 100 σπερματοζωάρια στο ίζημα της φυγοκέντρησης ο κίνδυνος να μη βρεθούν σπερματοζωάρια είναι < 5%. Βέβαια με μικρότερη συγκέντρωση η πιθανότητα να μη βρεθούν σπερματοζωάρια είναι >5%. Έτσι, όταν δε βρεθούν σπερματοζωάρια μετά από εξέταση συνολικού όγκου 1.600 nl μπορείτε να απαντήσετε ότι το ίζημα των 100 μl, και κατά συνέπεια και το δείγμα, περιέχει <188 σπερματοζωάρια (Πίνακας IV).

Μετρώντας τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που επιλέχθηκαν για χρήση σε τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Η επιλογή των σπερματοζωαρίων μετά από φυγοκέντρηση σε διαλύματα διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ή την τεχνική swim up πρέπει να μετρηθεί μετά από αραιώση 1+1 (για να ακινητοποιηθούν τα σπερματοζωάρια) σε βελτιωμένο κυτταρόμετρο Neubauer. Και οι δύο θάλαμοι πρέπει να μετρηθούν.

Σπερματοζωάρια επιλεγμένα μετά από φυγοκέντρηση σε διαλύματα διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ή μετά την

τεχνική swim up, χρησιμοποιούνται για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή ή σε διάφορες πειραματικές μελέτες. Όταν το αποτέλεσμα πρόκειται να συσχετιστεί, ή να εκτιμηθεί, ως προς τον αριθμό των σπερματοζωαρίων (π.χ. σε δημοσίευση) η καλή πρακτική του εργαστηρίου απαιτεί μία βεβαιότητα της τάξης του $\pm 10\%$ στη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Άρα συγκέντρωση των σπερ-

ματοζωαρίων $4 \times 10^6/\text{ml}$ πρέπει τότε να σημαίνει $4.0 \times 10^6/\text{ml} \pm 10\%$, δηλαδή $3,6 - 4,4 \times 10^6/\text{ml}$ με εύρος εμπιστοσύνης 95%. Αυτή η βεβαιότητα είναι εύκολο να επιτευχθεί. Είναι απλά θέμα μέτρησης τουλάχιστον 400 σπερματοζωαρίων. Ένα κυτταρόμετρο Neubauer (και οι δύο θάλαμοι) παίρνει 2×100 nl αραιωμένου δείγματος, 1+1 (για να ακινητοποιηθούν τα σπερματοζωάρια). Ο

ΠΙΝΑΚΑΣ V. Έκφραση των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων με 95% διάστημα εμπιστοσύνης λόγω του αριθμού των σπερματοζωαρίων που μετρήθηκαν σε θάλαμο 10 nl (π.χ. ένα θάλαμο Makler) και σε θάλαμο βελτιωμένο Neubauer (δύο θάλαμοι)

Ένας θάλαμος 10 nl (αδιάλυτο δείγμα)					Ένας θάλαμος Neubauer Δύο θάλαμοι, δείγμα αραιωμένο 1+1 για ακινητοποίηση των σπερματοζωαρίων				
Αριθμός μετρούμενων σπερματοζωαρίων	Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων $\times 10^6/\text{ml}$	95% από όλες τις μετρήσεις βρίσκονται σε αυτό το διάστημα ($\times 10^6/\text{ml}$)			Αριθμός μετρούμενων σπερματοζωαρίων	Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων $\times 10^6/\text{ml}$	95% από όλες τις μετρήσεις βρίσκονται σε αυτό το διάστημα ($\times 10^6/\text{ml}$)		
		Ελάχιστο	Μέγιστο	+%			Ελάχιστο	Μέγιστο	+%
1	0.1	0.0	0.3	148	10	0.1	0.0	0.2	62
2	0.2	0.0	0.5	119	20	0.2	0.1	0.3	44
3	0.3	0.0	0.6	107	30	0.3	0.2	0.4	36
4	0.4	0.0	0.8	98	40	0.4	0.3	0.5	31
5	0.5	0.1	0.9	88	50	0.5	0.4	0.6	28
6	0.6	0.1	1.1	80	60	0.6	0.4	0.8	25
7	0.7	0.2	1.2	74	70	0.7	0.5	0.9	23
8	0.8	0.2	1.4	69	80	0.8	0.6	1.0	22
9	0.9	0.3	1.5	65	90	0.9	0.7	1.1	21
10	1.0	0.4	1.6	62	100	1.0	0.8	1.2	20
11	1.1	0.4	1.8	59	110	1.1	0.9	1.3	19
12	1.2	0.5	1.9	57	120	1.2	1.0	1.4	18
13	1.3	0.6	2.0	54	130	1.3	1.1	1.5	17
14	1.4	0.7	2.1	52	140	1.4	1.2	1.6	17
15	1.5	0.7	2.3	51	150	1.5	1.3	1.7	16
16	1.6	0.8	2.4	49	160	1.6	1.4	1.8	16
17	1.7	0.9	2.5	48	170	1.7	1.4	2.0	15
18	1.8	1.0	2.6	46	180	1.8	1.5	2.1	15
19	1.9	1.0	2.8	45	190	1.9	1.6	2.2	14
20	2.0	1.1	2.9	44	200	2.0	1.7	2.3	14
25	2.5	1.5	3.5	39	250	2.5	2.2	2.8	12
30	3.0	1.9	4.1	36	300	3.0	2.7	3.3	11
35	3.5	2.3	4.7	33	350	3.5	3.1	3.9	11
40	4.0	2.8	5.2	31	400	4.0	3.6	4.4	10
45	4.5	3.2	5.8	29	>400				<10
50	5.0	3.6	6.4	28					
55	5.5	4.0	7.0	26					
60	6.0	4.5	7.5	25					
65	6.5	4.9	8.1	24					
70	7.0	5.4	8.6	23					
75	7.5	5.8	9.2	23					
80	8.0	6.2	9.8	22					
85	8.5	6.7	10.3	21					
90	9.0	7.1	10.9	21					
95	9.5	7.6	11.4	20					
100	10.0	8.0	12.0	20					
150	15.0	12.6	17.4	16					
200	20.0	17.2	22.8	14					
250	25.0	21.9	28.1	12					
300	30.0	26.6	33.4	11					
350	35.0	31.3	38.7	11					
400	40.0	36.1	43.9	10					
>400				<10					

θάλαμος Makler παίρνει 10 nl αδιάλυτου δείγματος. Έτσι στο κυτταρόμετρο Neubauer υπάρχουν 10 φορές περισσότερα σπερματοζωάρια σε σχέση με τον θάλαμο των 10 nl. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τον μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων που παίρνουμε μετά από επιλογή. Με τους συνηθισμένους τρόπους μέτρησης των αριθμών των σπερματοζωαρίων, η μέτρηση όλων των κυττάρων και στις δύο πλευρές του κυτταρόμετρου Neubauer δίνει ακριβή αποτελέσματα για αριθμούς $\geq 4 \times 10^6/\text{ml}$. Αντίθετα η μέτρηση όλων των σπερματοζωαρίων σε ένα θάλαμο 10nl δίνει ακριβή αποτελέσματα με $\pm 10\%$ μόνο όταν η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων είναι $\geq 40 \times 10^6/\text{ml}$. Για να πάρουμε αποτέλεσμα με $\pm 10\%$ σε δείγματα με συγκέντρωση της τάξης των $4 \times 10^6/\text{ml}$ πρέπει να μετρηθούν 10 θάλαμοι των 10 nl.

Ο πίνακας V παρουσιάζει την συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων με εύρος εμπιστοσύνης 95%, για μέτρηση τους σε θάλαμο βελτιωμένου κυτταρόμετρου Neubauer ή σε θάλαμο 10 nl. Όταν παρουσιάζεται διακύμανση μεγαλύτερη του $\pm 10\%$, το αποτέλεσμα πρέπει να δίνεται με το εύρος της διακύμανσης. Για παράδειγμα, εάν η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων μετρημένη με την πλάκα Neubauer, είναι $2 \times 10^6/\text{ml}$, αυτό το αποτέλεσμα αναφέρεται σαν $2 \times 10^6/\text{ml}$ (εύρος 1,7 – 2,3) ή $\pm 14\%$. Εάν όμως, με βάση την καλή πρακτική του εργαστηρίου, απαιτείται διακύμανση μικρότερη του $\pm 10\%$, τότε πρέπει να μετρηθούν δύο θάλαμοι Neubauer. Εάν το ίδιο αποτέλεσμα είχε μετρηθεί σε ένα θάλαμο των 10 nl, θα ήταν $2 \times 10^6/\text{ml}$ (εύρος 1,1 – 2,9) ή $\pm 44\%$. Για να επιτύχουμε το αποτέλεσμα των $2 \times 10^6/\text{ml} \pm 10\%$ χρησιμοποιώντας τον θάλαμο των 10 nl, θα έπρεπε να κάνουμε 20 μετρήσεις. Εάν, με βάση το πρωτόκολλο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, πρέπει να προστεθούν 50.000 σπερματοζωάρια σε κάθε ωάριο και η μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων σε θάλαμο των 10 nl έδειξε $1 \times 10^6/\text{ml}$ (εύρος 0,4 – 1,6), $\pm 62\%$, η σταγόνα των 50 μl μπορεί πραγματικά να περιέχει από 20000 έως 80000 σπερματοζωάρια. Μόνο στο 24% των περιπτώσεων έχουν προστεθεί 50000, $\pm 10\%$, δηλαδή 45000 – 55000 σπερματοζωάρια. Στις περισσότερες περιπτώσεις (76%), τοποθετούνται >55000 ή < 45000 σπερματοζωάρια.

3. Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων

Αρχές της μεθόδου

Ιδανικά, όλες οι μετρήσεις πρέπει να γίνονται σε οθόνη video (βλ. παρακάτω) με σκοπό να ελαχιστοποιηθούν οι διαφορές στην εκτίμηση των βιντεοσκοπημένων δειγμάτων για λόγους ποιοτικού ελέγχου και για τις ημερήσιες εκτιμήσεις ρουτίνας των 'ζωντανών' δειγμάτων. Εάν δεν υπάρχει εξοπλισμός video τότε οι εκτιμήσεις γίνονται με το μάτι μέσω του προσοφθάλμιου φακού, χρησιμοποιώντας 40X αντικειμενικό φακό αντίθεσης φάσεων.

Η εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων πρέπει να ξεκινήσει αμέσως για να αποφευχθούν σφάλματα που μπορεί να προκληθούν είτε από πτώση της θερμοκρασίας είτε από αφυδάτωση του δείγματος.

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων καθορίζεται από την μέτρηση όλων των κινητών και ακίνητων σπερματοζωαρίων σε αρκετά επιλεγμένα πεδία (αλλά όχι κοντά στις άκρες της καλυπτρίδας) χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό 40X. Αν περισσότερο από το 25% των σπερματοζωαρίων εμπλέκονται σε συσσωρεύσεις, η εκτίμηση της κινητικότητας γίνεται μόνο στα ελεύθερα σπερματοζωάρια και αυτό πρέπει να σχολιαστεί στο έντυπο των αποτελεσμάτων. Σπερματοζωάρια με κεφαλή καρφίτσας καθώς και ελεύθερες ουρές δεν πρέπει να μετρώνται.

Διαδικασία

Το άμεσο παρασκεύασμα

Βάλτε 6μl από καλά αναμεμιγμένο δείγμα σπέρματος (37°C) πάνω σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα (37°C) και τοποθετήστε την καλυπτρίδα (18 X 18 mm πάχος #1,5). Αυτό δίνει στο δείγμα ένα βάθος πεδίου περίπου 20 μm. Η εξέταση αυτής της 'σταγόνας' πρέπει να αρχίσει αμέσως μόλις το δείγμα σταθεροποιηθεί. Εάν δε σταθεροποιηθεί μέσα σε 60 sec, ένα καινούριο δείγμα πρέπει να ετοιμαστεί και να εξεταστεί.

Εάν η καλυπτρίδα είναι μεγέθους 22 X 22 mm, ο όγκος του δείγματος πρέπει να είναι 10 μl για να έχουμε βάθος πεδίου περίπου 20 μm.

Μέτρηση

Το λιγότερο 200 σπερματοζωάρια αξιολογούνται σε διπλή μέτρηση, δηλαδή το λιγότερο 400 σπερματοζωάρια στο σύνολο (για τα κριτήρια και την ακριβή μέθοδο της εκτίμησης της κινητικότητας : βλέπε παρακάτω: Εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων). Το λιγότερο 5 πεδία πρέπει να εξεταστούν σε κάθε μέτρηση.

Μέσα σε κάθε πεδίο μετριοούνται αρχικά όλα τα καλώς κινούμενα σπερματοζωάρια (τύπος A κατά ΠΟΥ) και τα μετρίως κινούμενα σπερματοζωάρια (τύπος B κατά ΠΟΥ). Πρέπει να προσέχουμε να μετράμε μόνο όλα τα κύτταρα που βρίσκονται σε ένα πεδίο στην ίδια χρονική στιγμή. Σημείωση: Εάν ο αριθμός των καλώς κινούμενων σπερματοζωαρίων στο πεδίο είναι πολύ μεγάλος πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα μικρότερο τμήμα του πεδίου. Σε αυτή την περίπτωση, είναι πολύ χρήσιμο το μικρομετρικό πλέγμα ή η κλίμακα μέτρησης στον προσοφθάλμιο φακό.

Όταν όλα τα καλώς κινούμενα σπερματοζωάρια έχουν μετρηθεί τότε μετράμε τα σπερματοζωάρια που δεν έχουν προωθητική κινητικότητα (τύπος Γ κατά ΠΟΥ) και τα ακίνητα (τύπος Δ κατά ΠΟΥ).

Οι τέσσερις κατηγορίες εκφράζονται ως ποσοστά (καλώς κινούμενα, μετρίως κινούμενα, με επιτόπια κίνηση και ακίνητα).

Οι διπλές μετρήσεις είναι σημαντικές για να ανιχνεύσουν και να ελαχιστοποιήσουν τυχαία λάθη από τη διακύμανση, η οποία προκύπτει με τη δειγματοληψία διαφορετικών κλασμάτων από το ίδιο δείγμα σπέρματος στην εκτίμηση της σταγόνας του δείγματος. Η εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων πρέπει να επαναλαμβάνεται σε ένα δεύτερο κλάσμα που έχει προετοιμαστεί με τον ίδιο τρόπο. Κατόπιν υπολογίζεται ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων και δίνεται ως αποτέλεσμα. Εάν υπάρχει πολύ μεγάλη διαφορά ανάμεσα στις δύο μετρήσεις τότε πρόκειται για τυχαίο σφάλμα και σε αυτή την περίπτωση πρέπει να γίνουν δύο καινούριες μετρήσεις (βλ. παρακάτω τις λεπτομέρειες για τη μέθοδο και τις συγκρίσεις στις διπλές μετρήσεις).

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων στην οθόνη του video

Στην οθόνη εμφανίζεται μία μαύρη μάσκα με ένα κυκλικό άνοιγμα ή μία διαφάνεια από οξικό άλας με ένα κυκλικό πεδίο. Στο κυκλικό πεδίο που έχει οριστεί με αυτό τον τρόπο πρέπει να τοποθετηθεί ένα πλέγμα με τετράγωνα που αντιστοιχούν σε 25 X 25 μm του δείγματος, για να διευκολύνεται η εκτίμηση της κινητικότητας.

Χρησιμοποιήστε τον 10X αντικειμενικό φακό αντίθεσης φάσεων και τον αντίστοιχο συμπυκνωτή για αντίθεση φάσης. Έλέγξτε στο προσοφθάλμιο ότι το δείγμα έχει εστιαστεί σωστά. Ρυθμίστε την εστίαση, καθώς εξετάζετε την εικόνα στην οθόνη.

Εκτίμηση της κινητικότητας

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων κατατάσσεται σε τέσσερις κατηγορίες κινητικότητας στους 37°C όπως φαίνεται στον πίνακα 1.

(i) Διαλέξτε τυχαία ένα πεδίο (εάν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι πολύ υψηλός, μετρήστε εκείνα τα σπερματοζωάρια που βρίσκονται σε ένα μικρότερο πεδίο π.χ. στα πιο κεντρικά τέσσερα τετράγωνα). Πρώτα μετρήστε όλα τα σπερματοζωάρια με καλή και μέτρια κινητικότητα. Μετά μετρήστε τα σπερματοζωάρια που παρουσιάζουν επιτόπια κίνηση και τέλος, εκείνα που είναι ακίνητα στο ίδιο πεδίο.

(ii) Μετρήστε το λιγότερο πέντε διαφορετικά πεδία. Τουλάχιστον 200 σπερματοζωάρια πρέπει να μετρηθούν σε κάθε δείγμα.

(iii) Επαναλάβετε την εκτίμηση της κινητικότητας το λιγότερο σε 200 σπερματοζωάρια σε μία καινούρια σταγόνα από το ίδιο δείγμα σπέρματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Κατηγορίες της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων

Κατηγορίες ΠΟΥ	Κωδικός	Αντίστοιχη ταχύτητα
Ζωηρή προωθητική	A	≤25μm/s (≥1τετράγωνο οθόνης ή μήκος 5 κεφαλών σπερματοζωαρίων)
Νωθρή προωθητική	B	5 –24 μm/s
Μη προωθητική	Γ	<5 μm/s (<από το μήκος 1 κεφαλής σπερματοζωαρίου)
Ακίνητα	Δ	-

Υπολογισμοί

Για κάθε μια από τις δύο προετοιμασίες, ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων σε κάθε κατηγορία κινητικότη-

τας διαιρείται με τον ολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων που εξετάστηκαν για να πάρουμε το ποσοστό για τις τέσσερις κατηγορίες (A – Δ).

Για να ελέγξουμε ότι οι διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες είναι μέσα σε αποδεκτά όρια, γίνονται οι κάτωθι υπολογισμοί :

(i) Υπολογίστε το ποσοστό των σπερματοζωαρίων σε κάθε κατηγορία κινητικότητας (A – Δ)

(ii) Υπολογίστε τον μέσο όρο σε κάθε κατηγορία για τις δύο μετρήσεις

(iii) Μετά επιλέξτε την κατηγορία των κινούμενων σπερματοζωαρίων με το μεγαλύτερο ποσοστό (δηλαδή μία από τις κατηγορίες A ή B ή Γ ή Δ) και υπολογίστε τις διαφορές στο ποσοστό ανάμεσα στις δύο μετρήσεις σε αυτή την κατηγορία

(iv) Οι μετρήσεις είναι αποδεκτές εάν η διαφορά ανάμεσα στις δύο μετρήσεις είναι ίση ή χαμηλότερη από την τιμή που φαίνεται στο Παράρτημα II. Εάν δεν είναι, ακυρώστε τις μετρήσεις, κάντε δύο καινούρια δείγματα και ξαναμετρήστε.

Όταν πραγματοποιηθούν δύο αποδεκτές μετρήσεις, ο μέσος όρος (A – Δ) στρογγυλοποιείται στον ακέραιο αριθμό (χωρίς δεκαδικά). Κατά συνέπεια, το 0.5% στρογγυλοποιείται στον κοντινότερο ακέραιο αριθμό. Τελικά, το σύνολο των ποσοστών (A – Δ) πρέπει να αθροίζει στο 100%. Εάν υπάρχει ανάγκη, η κατηγορία με το μεγαλύτερο ποσοστό κινητικότητας ρυθμίζεται (μειώνεται ή αυξάνεται) για να πάρουμε το άθροισμα 100%.

Αποτελέσματα

Τα ποσοστά για τις τέσσερις κατηγορίες κινητικότητας, τα ποσοστά για τα κινούμενα σπερματοζωάρια (A + B + Γ) και προαιρετικά για τα προωθητικώς κινούμενα σπερματοζωάρια (A + B) γράφονται στην ίδια την καρτέλα του εξεταζόμενου.

Ποιοτικός Έλεγχος

Οι διπλές μετρήσεις πραγματοποιούνται για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος τυχαίου σφάλματος. Για τα δείγματα σπέρματος που βιντεοσκοποούνται, η ταχύτητα ξεχωριστών σπερματοζωαρίων μπορεί να μετρηθεί 'καρέ-καρέ', για να ταξινομηθούν τα σπερματοζωάρια στις διαφορετικές κατηγορίες κινητικότητας (A – Δ) με μεγαλύτερη αντικειμενικότητα.

Ορισμένα θέματα του εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου μπορούν να καλυφθούν με κατ' επανάληψη εξέταση των ταινιών video με γνωστές τιμές από όλους τους τεχνολόγους σε κάθε εργαστήριο.

Η εξέταση των ταινιών video από ένα τεχνολόγο του εργαστηρίου και η εν συνεχεία διανομή τους στα άλλα συμ-

μετέχοντα εργαστήρια, αποτελεί τη βάση του εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου.

Εξοπλισμός

- Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (αντικειμενικός φακός 10X) με θερμαινόμενη πλάκα σε 37° C. Τριπλός προσοφθάλμιος (προσοφθάλμιοι και έξοδος για video με επιπρόσθετη μεγέθυνση 10X).
- Ασπρόμαυρη (ή έγχρωμη) κάμερα video π.χ. Panasonic : (1/2inch, WV-BL 200) ; σύνδεση με τη γεννήτρια κειμένου.
- Οθόνη 13 cm (ασπρόμαυρη π.χ. Panasonic WV5340 ή WV5370 (κανονικό μέγεθος). Μία μαύρη μάσκα με κυκλικό άνοιγμα περίπου 13 cm. Συνδέσεις : με VIDEO, διακόπτης : 75 Ω.
- Μία συνολική μεγέθυνση στην οθόνη: 100 μm=75–88mm (περισσότερη μεγέθυνση συνήθως χρειάζεται πάνω από τη μεγέθυνση των 10X στον αντικειμενικό φακό: συνήθως ακόμη 10X στον σωλήνα του video. Ελέγξτε τη συνολική μεγέθυνση με μια μικρομετρική βαθμίδα.
- Μικρομετρική βαθμίδα τοποθετημένη στην τράπεζα του μικροσκοπίου (για βαθμονόμηση).
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου : καλυπτρίδες 18 X 18 mm, #1.5.
- Μετρητής κυττάρων με 4 πλήκτρα.

Βιντεοσκόπηση

Επιπλέον εξοπλισμός που χρειάζεται για την εγγραφή σε video.

- Γεννήτρια κειμένου συνδεδεμένη με μία συσκευή video (π.χ. Hama Video Script 550) Είσοδος: κάμερα video Έξοδος: σύνδεση με το σύστημα εγγραφής σε video (SCART multi pin socket: In).
- Σύστημα εγγραφής video σε κασέτες (VHS) με την δυνατότητα μετακινούμενης οθόνης (1/25 s). Τα κοινά οικιακά video και δύο SCART υποδοχέας πολλαπλής ακίδας (είσοδος και έξοδος). Είσοδος από τη γεννήτρια κειμένου. Έξοδος στην οθόνη.
- Ταινίες video (30 – 60 min εγγραφής: υψηλής ποιότητας).

Διαδικασία

i) Ενεργοποιήστε την video κάμερα, την οθόνη, τον καταγραφέα video και τη γεννήτρια κειμένου. Η γεννήτρια κειμένου αρχίζει δείχνοντας μία παρουσίαση –κλείστε το πατώντας τρεις φορές το mode.

ii) Τοποθετείστε την κασέτα στη συσκευή του video. Γυρίστε την μέχρι το τέλος και μετά ξανά στην αρχή πριν

να ξεκινήσετε την πρώτη εγγραφή.

iii) Ρυθμίστε την αρίθμηση ώστε να βρίσκεται στην στιγμή 0. Ελέγξτε ότι ο καταγραφέας video δείχνει "used time" στην οθόνη.

iv) Αρχικά, μαγνητοσκοπήστε τις εικόνες της μικρομετρικής βαθμίδας για να γίνει 'βαθμονόμηση'. Μαγνητοσκοπήστε για περίπου 10 sec μετά βάλτε τον καταγραφέα στο «pause».

v) Ρυθμίστε τον επιλογέα οπτικού δρόμου έτσι ώστε το φως να μην μπαίνει μέσα στην κάμερα, δηλαδή κάντε την εικόνα μαύρη. Βάλτε το αρχικό κείμενο από τη γεννήτρια σήματος (π.χ. Εργαστήριο Ανδρολογίας XXXX Νοσοκομείο, Ποιοτικός Έλεγχος). Όταν το κείμενο είναι ορατό στην οθόνη, αρχίστε την εγγραφή για περίπου 10 sec. Μαγνητοσκοπήστε για ακόμη 5 sec χωρίς κείμενο αλλά με μαύρο φόντο.

vi) Τώρα, βάλτε μία σταγόνα από το δείγμα στην αντικειμενοφόρο πλάκα του μικροσκοπίου (προθερμασμένο στους 37° C) και εστιάστε το μικροσκόπιο. Βάλτε τον επιλογέα οπτικού δρόμου έτσι ώστε το φως να πηγαίνει μέσα στην κάμερα και ρυθμίστε την εστίαση. Προεπιλέγουμε τον οπτικό δρόμο για να έχουμε σήμα στην κάμερα.

vii) Σημειώστε τον χρόνο έναρξης και τον αριθμό του δείγματος που θα μαγνητοσκοπηθεί. Βάλτε το «δείγμα κειμένου» στη γεννήτρια κειμένου (π.χ. «Δείγμα 1»).

viii) Με το δείγμα κειμένου στη θέση του αρχίστε την εγγραφή για 5 sec

ix) Κλείστε το δείγμα κειμένου και ρυθμίστε το επιλογέα οπτικού δρόμου έτσι ώστε το φως να πηγαίνει προς την κάμερα.

x) Ελέγξτε την εστίαση. Μαγνητοσκοπήστε για 10 – 15 sec. Εκτιμήστε πόσα σπερματοζωάρια μπορούν να μετρηθούν σε αυτό το πεδίο. Επαναλάβετε τα βήματα x-xii μέχρι >200 σπερματοζωάρια να έχουν εκτιμηθεί και να έχουν καταγραφεί.

xi) Αλλάξτε το πεδίο του μικροσκοπίου μετά ρυθμίστε το επιλογέα οπτικού δρόμου έτσι ώστε το φως να πηγαίνει στην οθόνη.

xii) Μαγνητοσκοπήστε 5 sec με μαύρο φόντο μετά από εγγραφή κάθε πεδίου.

xiii) Αφού τελειώσει ένα δείγμα κάντε μεγαλύτερο διάστημα από «μαύρη καταγραφή» (10 sec).

xiv) Επαναλάβετε από το βήμα η) μέχρι να ολοκληρωθεί μία video ταινία των 60 λεπτών. (Είναι δυνατόν να χωρέσουν περίπου 10 – 12 δείγματα, εάν τα δείγματα έχουν λογικό αριθμό σπερματοζωαρίων).

xv) Κάντε εγγραφή το μήνυμα 'τέλος της ταινίας' αμέσως μετά το τελευταίο πεδίο του τελευταίου δείγματος.

"ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis p. 12, 2002"

4. Η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων

Αρχές της μεθόδου

Ένα κύτταρο με ακέραια κυτταροπλασματική μεμβράνη δεν μπορεί να απορροφήσει τη χρωστική εωσίνη Υ, ενώ ένα νεκρό κύτταρο (δηλαδή ένα κύτταρο με κατεστραμμένη κυτταροπλασματική μεμβράνη) απορροφά την κόκκινη χρωστική. Η χρωστική νιγκροσίνη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για να δημιουργηθεί αντίθεση για τα αχρωμάτιστα (λευκά) ζωντανά κύτταρα.

Διαδικασία

Α. Ανακατέψτε μία σταγόνα (50 μl) από αδιάλυτο, καλά αναμειγμένο, ρευστοποιημένο σπέρμα με μία σταγόνα (50 μl) από διάλυμα χρωστικών εωσίνης-νιγκροσίνης (π.χ. σε ένα πορσελάνινο πιάτο) και επιάστε για 30 sec.

Β. Τοποθετήστε τη σταγόνα από το διάλυμα (12-15 μl ανά αντικειμενοφόρο πλάκα) σε μία καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα, και κάντε ένα επίχρισμα. Το επίχρισμα γίνεται γλιστρώντας την καλυπτρίδα μπροστά από τη σταγόνα. Εάν πρόκειται να γίνουν συγχρόνως δύο επιχρίσματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία σταγόνα των 20 - 30 μl που θα απλωθεί ανάμεσα σε δύο αντικειμενοφόρους πλάκες. Μην κάνετε τα επιχρίσματα με μεγάλο πάχος, δεδομένου ότι η χρωστική για το υπόστρωμα μπορεί να είναι πολύ σκουρόχρωμη και να καλύψει τα σπερματοζωάρια.

Γ. Αφήστε τα επιχρίσματα να στεγνώσουν στον αέρα και εξετάστε τα αμέσως, ή τοποθετείστε το μονιμοποιητικό την ίδια μέρα και εξετάστε τα αφού το μονιμοποιητικό έχει στεγνώσει (π.χ. όλη τη νύχτα). Τα μονιμοποιημένα επιχρίσματα μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου.

Δ. Τουλάχιστον 200 σπερματοζωάρια πρέπει να εκτιμηθούν σε μεγέθυνση 1000X (ή 1250 X) σε ελαιοκαταδυτικό υψηλής ευκρίνειας 100 X (όχι αντίθεσης φάσεων) με σωστή ρύθμιση των οπτικών συστημάτων του πεδίου (φωτισμός Kohler). Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη μέθοδος αραιώνει το δείγμα κατά δύο φορές, χρειάζεται υπομονή μέχρι να βρεθούν 200 σπερματοζωάρια σε δείγματα με χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων. Τα σπερματοζωάρια που είναι

λευκά (χωρίς χρωστική) κατατάσσονται στα "ζωντανά" και αυτά που έχουν ροζ ή κόκκινο χρώμα κατατάσσονται στα "νεκρά".

Ε. Η ΠΟΥ δεν θεωρεί απαιτούμενη την πραγματοποίηση διπλών μετρήσεων για την εκτίμηση της ζωτικότητας, αλλά αν αυτό γίνει, η σύγκριση πρέπει να γίνει όπως για την κινητικότητα ή τη μορφολογία (σύγκριση των ποσοστών : παράρτημα II).

Υπολογισμοί και αποτελέσματα

Το αποτέλεσμα είναι το ποσοστό των "ζωντανών" σπερματοζωαρίων εκφρασμένο ως ακέραιο επί τοις εκατό ποσοστό (δηλαδή χωρίς δεκαδικά).

Το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων είναι συνήθως λίγο υψηλότερο από το ποσοστό των κινούμενων σπερματοζωαρίων σε ένα δείγμα.

Αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια : 0,67 g εωσίνη Υ (C.I. 45380, Europe M 15935), 10 g νιγκροσίνη (C.I. 50420, Europe M 15924) και 0,9 g χλωριούχου νατρίου σε 100 ml απεσταγμένο νερό.

Α. Διαλύστε 0,67 g εωσίνης και 0,9 g χλωριούχου νατρίου σε 100 ml απεσταγμένου νερού με ελαφρά θέρμανση και προσθέστε 10 γρ νιγκροσίνης.

Β. Βράστε το διάλυμα και αφήστε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Γ. Φιλτράρετε το διάλυμα μέσα από διηθητικό φίλτρο (π.χ. Muncstall Class II).

Δ. Αποθηκεύστε το σε ένα καλά κλεισμένο γυάλινο δοχείο.

Το διάλυμα με τις χρωστικές μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση.

Υλικό επικόλλησης της καλυπτρίδας: χρησιμοποιήστε Entellan της Merck ή οποιοδήποτε ισοδύναμο υλικό για γρήγορη επικόλληση της καλυπτρίδας.

Εξοπλισμός και υλικά

- Μικροσκόπιο με αντικειμενικό φακό 100 X (καταδυτικό)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου (το τυπικό μέγεθος) και καλυπτρίδες (δηλαδή 24 X 60 mm).

Προσεχείς εκδηλώσεις

1. Παρουσίαση: “Περιπτώσεις Ανδρολογικού Ενδιαφέροντος”

Σάββατο, 13 Δεκεμβρίου 2003, 10:30-13:00

Αμφιθέατρο Νοσοκομείου “Έλενα Βενιζέλου”

α) Ουρολογική Κλινική Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών (Διευθυντής **Μ. Μπουρούνης**)

β) Τμήμα Ενδοκρινολογίας της Αναπαραγωγής Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης
(Καθ. **Ι. Παπαδήμας - Δ. Γουλής**)

γ) Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Νοσοκομείο “Έλενα Βενιζέλου” (Δρ **Ε. Κούκκου - Ε. Μπίλλα**)

δ) Ουρολογικό Ιατρείο, Ι.Κ.Α. (Δρ **Χ. Ασβέστης**)

2. Ημερίδα με θέμα: “Γονάδες”

Θεσσαλονίκη, **Απρίλιος 2004** (η ακριβής ημερομηνία θα ανακοινωθεί προσεχώς)

Ξενοδοχείο “Μακεδονία Παλλάς”

Κοινή εκδήλωση Ελληνικής Ενδοκρινολογικής και Ελληνικής Ανδρολογικής Εταιρείας

3. 3^ο Ευρωπαϊκό Συνέδριο Ανδρολογίας

11-14 Σεπτεμβρίου 2004

Munster, Γερμανία

(ίδε ξεχωριστή ανακοίνωση)

Διεθνές Συμπόσιο: “Genetics of Male Infertility: from Research to Clinic”

Ευρωπαϊκή Ακαδημία Ανδρολογίας
Φλωρεντία, 2-4 Οκτωβρίου 2003

Με την ευρεία διάδοση και εφαρμογή των μεθόδων της υποστηριζόμενης αναπαραγωγής και ιδίως της μικρογονιμοποίησης τόσο οι κλινικοί γιατροί όσο και οι βιολόγοι των αντίστοιχων κέντρων άρχισαν να προβληματίζονται σχετικά με την ασφάλεια των μεθόδων αυτών, κυρίως όσον αφορά τους απογόνους που προκύπτουν. Από την άλλη πλευρά η “λύση” που προσφέρουν στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας δεν σταμάτησε την έρευνα για την αιτιοπαθογένειά της, έρευνα που οδηγεί και στην αξιολόγηση της συμμετοχής των γενετικών διαταραχών σ’ αυτήν. Έτσι το ως άνω πρόσφατο συμπόσιο της Φλωρεντίας παρουσίασε εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς μάλιστα συκέντρωσε επιφανείς ερευνητές από όλους τους χώρους γενετικής που έχουν σχέση με την ανδρική υπογονιμότητα.

Είναι φυσικό το μεγάλο ενδιαφέρον να επικεντρωθεί στο Y χρωμόσωμα μια και αυτό έχει συνδεθεί με τη βιολογική έκφραση του άρρενος και τη λειτουργία των όρχεων. Το χρωμόσωμα αυτό στην πορεία των 300 εκατομμυρίων ετών εξέλιξης, όπως ανέφερε ο καθηγητής DC Page, έχασε την ικανότητα γονιδιακής συνομιλίας με το ομόλογό του X, με αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση των γονιδίων του. Από τα γονίδια του, ένα μεγάλο μέρος, περίπου το 33% χαρακτηρίζονται ως “palindromes” και είναι ειδικά για τη λειτουργική έκφραση των όρχεων. Σημαντική θέση σ’ αυτά κατέχουν τα γονίδια DAZ (Deleted in AZoospermia), DAZL (DAZ-Like) και BOULE, που είναι και το πλέον αρχέγονο. Έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας των ως άνω γονιδίων έχει βρεθεί τόσο στον πυρήνα των γενετικών κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα τους κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης και παρά το γεγονός ότι ο ακριβής στόχος τους μένει να διευκρινισθεί, θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του mRNA (εισήγηση P.Yen).

Κυρίαρχο όμως ρόλο στη γενετική διερεύνηση των διαταραχών της σπερματογένεσης διαδραματίζουν οι γονιδια-

κές περιοχές στο Yq11 γνωστές ως AZoospermia Factor (AZF). Μετά την πλήρη καταγραφή των γονιδίων του χρωμοσώματος Y, 32 γονίδια που έχουν άμεση σχέση με τη σπερματογένεση περιλαμβάνονται στις ως άνω περιοχές και μικροελλείψεις τους έχουν συνδεθεί με διαταραχές στη σπερματογένεση. Αυτά περιλαμβάνουν 2 γονίδια στην περιοχή AZFa, 23 στην AZFb και στην AZFc. Η συχνότητα των μικροελλείψεων αυτών και η φαινοτυπική έκφρασή τους με εμφάνιση άλλοτε βαθμού διαταραχής της σπερματογένεσης, ποικίλλει ανάλογα με τον υπό μελέτη πληθυσμό. Βασική ένδειξη για αναζήτηση των μικροελλείψεων αυτών αποτελεί η μη αποφρακτική αζωοσπερμία ή σοβαρού βαθμού ολιγοζωοσπερμία με αριθμό σπερματοζωαρίων $<5 \times 10^6$ /κ.εκ. ή $<1 \times 10^6$ /κ.εκ. επί συνύπαρξης και άλλων επιβαρυντικών παραγόντων όπως κισσοκήλης, λοιμωξης γεννητικού, υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού κλπ (εισήγηση C.Krausz). Η Ευρωπαϊκή Ακαδημία Ανδρολογίας σε συνεργασία με την Ευρωπαϊκή ομάδα μοριακής γενετικής έχουν ήδη προτείνει τους σχετικούς γενετικούς ευοδωτές (primers) οι οποίοι πρακτικά καλύπτουν το 100% των μικροελλείψεων.

Η σημασία του συνεχώς βελτιούμενου τεχνικά προεμφυτευτικού ελέγχου είναι ένα σημαντικό επίσης βήμα στην επιτυχή εφαρμογή των μεθόδων υποστηριζόμενης αναπαραγωγής και όχι μόνο. Η εφαρμογή του απ’ ενός ελαχιστοποιεί τον αναπαραγωγικό κίνδυνο δημιουργίας φορέων μονογονιδιακών νοσημάτων όπως η κυστική ίνωση (εισήγηση L.Gianaroli), απ’ ετέρου αυξάνει το ποσοστό επιτυχών κυήσεων και γεννήσεων υγιών νεογνών καθώς ελαχιστοποιεί την πιθανότητα μεταφοράς εμβρύων με χρωμοσωματικές ανωμαλίες ή ανευπλοειδικών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε ο κύκλος εισηγήσεων με τίτλο “From mouse model to human”, που παρουσίασε τις πειραματικές ενδείξεις ρύθμισης της σπερματογένεσης από διαφόρους παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη μεταγραφή και στην παραγωγή πρωτεϊνών διόρθωσης (repair) του DNA κατά τη διαδικασία της μείωσης όσο και πειραματικά μοντέλα μελέτης και λειτουργικής έκφρασης των γονιδίων του χρωμοσώματος Y. Τα μοντέλα

αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην κατανόηση των πολύπλοκων σχετικών γενετικών μηχανισμών και σίγουρα αναμένεται να συμβάλλουν στην κατανόησή τους αλλά και στη μελλοντική θεραπευτική τους αντιμετώπιση.

Η γενετική διάσταση ενός σχετικά συχνού προβλήματος που συνδέεται τόσο με διαταραχές της σπερματογένεσης όσο και με την εμφάνιση κακοήθειας στους όρχεις, της κρυψορχίας, αναπτύχθηκε σε ξεχωριστή συνεδρία. Ο ρόλος του ινσουλινόμορφου παράγοντα 3 (INSL3) γνωστού και ως παράγοντα ανάλογου της ρελαξίνης (relaxinlike factor) και του γονιδίου του υποδοχέα του, GREAT, στην κάθοδο των όρχεων με τη δράση τους στον οσχείο σύνδεσμο είναι ιδιαίτερα σημαντικός αν και δε φαίνεται να επηρεάζουν την ποιότητα της σπερματογένεσης ή την εμφάνιση κακοήθειας που φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της έκτοπης παραμονής του ορχικού ιστού. Το ποσοστό των μεταλλάξεων στα εν λόγω γονίδια βρέθηκε σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα ατόμων με ιστορικό κρυψορχίας και αυτό δίνει μια νέα, γενετική διάσταση στο τόσο συχνό αυτό πρόβλημα.

Οι εργασίες του συμποσίου έκλεισαν με την ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ομιλία του καθηγητού Ian Wilmut, πατέρα της τόσο γνωστής Dolly, που αναφέρθηκε στο μεγάλο όραμα των βιολόγων, δηλαδή στην αναπαραγωγή οργανισμών ή ομάδας σωματικών κυττάρων, όραμα που θα αποτελέσει μια αξιόλογη θεραπευτική πρόταση σε πολλά νοσήματα και ίσως και στην ίδια την αναπαραγωγή. Η είσοδος γενετικού υλικού σε διηγεμένο ωάριο, με τον απαραίτητο και για τα δύο συγχρονισμό του κυτταρικού κύκλου, αποτελεί μια διαδικασία ιδιαίτερα επίπονη, δύσκολη με επί του παρόντος αμφίβολη αποτελεσματικότητα. Δίνει όμως μεγάλες προοπτικές, αποτελώντας ευχή των γενετιστών και πονοκέφαλο στους κοινωνικούς νομοθέτες.

Κλείνοντας τη σύντομη αυτή αναφορά στο τόσο ενδιαφέρον αυτό συμπόσιο, θα ήταν παράλειψη αν δεν εκφράζαμε τα θερμά μας συγχαρητήρια στους διοργανωτές της, τον πρόεδρο της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας Ανδρολογίας καθηγητή Gianni Forti αλλά και την αξιόλογη συνεργάτιδά του, Csilla Krausz, τόσο για το ιδιαίτερα ενδιαφέρον και υψηλού επιπέδου πρόγραμμα και την επιλογή αξιόλογων ομιλητών όσο και για την άψογη διοργάνωση αλλά και την καλλιτεχνική πλαισίωση αντάξια μιας πόλης μουσείου όπως είναι η Φλωρεντία.

Σ.Χ. Νικοπούλου
Δ.Α. Αδαμόπουλος

3rd European Congress of Andrology

16th Annual Congress
of the German
Society of Andrology

September 11-14, 2004
Münster, Germany



Hotel accommodation

The main congress hotel is at the site of the convention centre.

This and other hotels can be booked through:
www.marketing.muenster.de

Social programme

Welcome reception at the City Hall.

Poster party at the Halle Münsterland.

Social evening at the lakeside restaurant "Uferlos"

Portrait of the city

Münster is the capital of Westphalia in the North-

West of Germany close to the Dutch border. Münster is a 1200 year old city with a nicely preserved medieval core.

It became famous in 1648

when the Peace Treaty at the end of the 30 Years War was signed here. Today the city houses the 3rd largest university in Germany with a prominent medical faculty.

Travel information

Münster has a local airport, well connected to Frankfurt and Munich for international flights, but also with some direct international connections (Zurich, Copenhagen). Intercity trains between Hamburg and Cologne stop in Münster.

There is a quick access to motorway A1.

The bicycle is the most popular means of transportation inside the city

Information and registration

Website: www.3rd-eca.de
Email: eca@uni-muenster.de

Contact

Prof. Dr. E. Nieschlag
Institute of Reproductive
Medicine of the University
Domagkstr. 11
D-48129 Münster, Germany
Tel: +49-251-83 56097
Fax: +49-251-83 56093
Email:
nieschl@uni-muenster.de



The premier event in Andrology in 2004 in Europe, sponsored by the European Academy of Andrology (EAA) and the German Society of Andrology (DGA).

Congress venue

Conference Centre "Halla Münsterland", Münster

Main topics of the Congress:

- Spermatogonial stem cells
- Control of spermatogenesis
- Physiology and therapeutic use of androgens
- Erectile dysfunction
- Male infertility
- Assisted reproduction
- Paternally mediated teratogenicity
- Prostate cancer
- Testicular tumours
- Environment and reproduction
- Male contraception

-5 Plenary lectures

-12 Symposia

-Oral presentations and posters

-Postgraduate course

(in German)

Programme Organising Committee:

M. Simon (D), chairperson
EAA

S. Francavilla (I)

M. Goncharov (RUS)

A. Givercman (S)

C. Krausz (I)

R. Miesseut (F)

E. Nieschlag (D)

J. Pomeroy (E)

P. Saunders (GB)

O. Söder (S)

J. Toppari (SF)

H. Toumaye (B)

DGA

W. Krause (D)

F.M. Köhn (D)

E. Nieschlag (D)

W. Weidner (D)

Local Organising Committee:

E. Nieschlag, chairman

T.G.Cooper

J.Gromoll

J. Esselmann

L. Herflé

L. Kiesel

S. Kölesch

C.M. Luejens

A. Ojérik

M. Simon

J. Westuba

M. Züsmann

Call for abstracts

Abstracts from all areas of andrology are invited to be submitted.

Abstracts should be submitted electronically as indicated on the website.

The deadline for submission of abstracts is: **June 1, 2004**

Exhibition

There is ample space for technical and pharmaceutical exhibitions.

Official language

English (postgraduate course in German)

Registration fees

Congress (including Postgraduate Course)

Before June 1, 2004

EAA and DGA members	Non-members	Students
200,- Euro	250,-Euro	100,-Euro

After June 1, 2004

300,- Euro	350,-Euro	150,-Euro
------------	-----------	-----------

Postgraduate Course only
(September 11, 2004)

Before June 1, 2004

EAA and DGA members	Non-members	Students
100,- Euro	150,-Euro	50,-Euro

After June 1, 2004

200,- Euro	250,-Euro	100,-Euro
------------	-----------	-----------

Sum to be transferred to
ECA 2004
Sparkasse Münsterland Ost
Bank Number 400 501 50
Account Number 340 660 01

Prof. Dr. E. Nieschlag
Institute of Reproductive Medicine
of the University
Domagkestr. 11
D-48129 Münster
Germany

16th Annual Congress of the German Society of Andrology
and European Congress of Andrology and
September 11 to 14, 2004, Münster, Germany

- I intend to participate
 I want to register
 I want to receive the final programme

Name _____
Institution _____
Street _____
City _____
Country _____
Phone _____
Fax _____
Email _____

