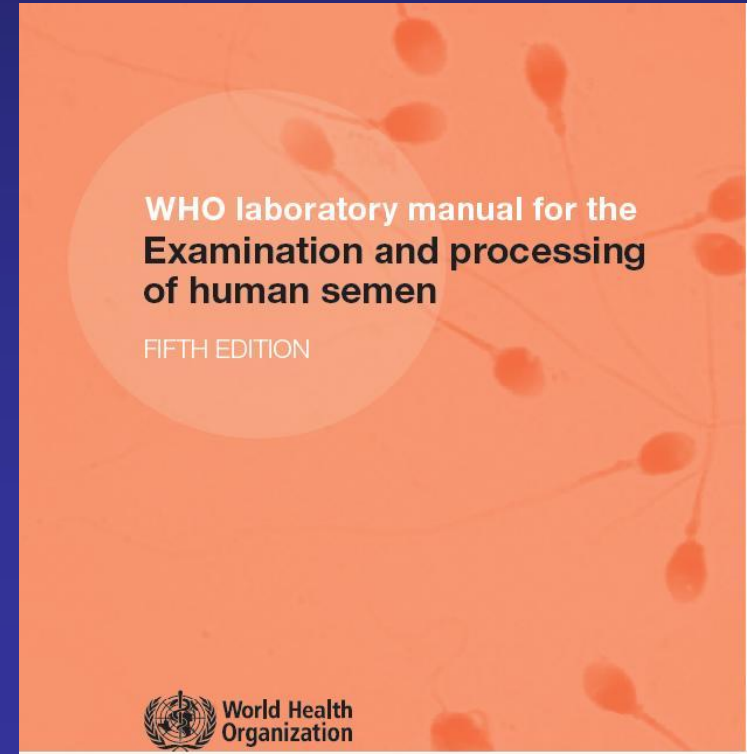


**WHO 2010
SEMEN ANALİZİ KRİTERLERİNDE
NELER DEĞİŞTİ?**

**DOÇ.DR. ENGİN KANDIRALI
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ**

- "The WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction"
- İlk kez 1980 yılında basılmıştır.
- İkinci basım 1987
- Üçüncü basım 1992
- Dördüncü basım 1999
- Beşinci basım 2010



Neden

- Yeni kanıt ve veriler
- Teknisyen ve bilim adamları için metodların detaylı açıklanması
- Üç kıta sekiz ülke
- Değerlendirilmeye alınan erkekler - Eşleri 12 ay veya daha kısa sürede gebe kalmış
- Değerlendirilen semen sayısı 400-1900



5. Baskıda 3 bölüm mevcut

Semen analizi

Standard testler
İsteğe bağlı testler
Araştırma testleri

Sperm hazırlama (IUI, IVF, ICSI)

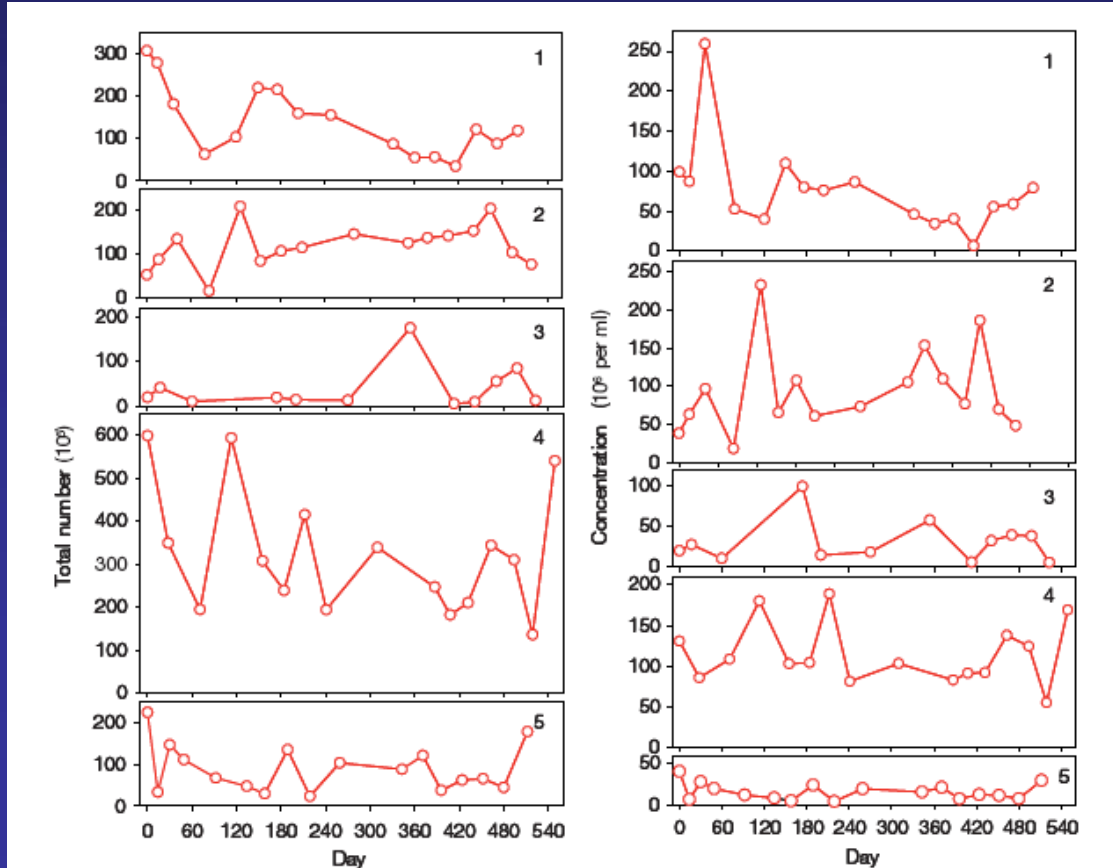
Ejakülat
Epididim
testis

Kalite kontrol



Semen Analizi

- Semen kalitesini deęerlendirmek için tek analiz yeterli değil
- En az 2-3 kez yapılmalı



Cinsel Perhiz (2-7 gün)

Refleksojenik Ereksiyon + Visuel seksuel Stimulasyon

Semen

5 dakika

Sıvılaşma için (37 C)

İlk 30-60 dakika

Makroskopik analiz
Mikroskopik analiz
Semen Santrifüjü
İmmunobead Test

İlk 3 saat

Mikrobiyolojik
incelemesi

İlk 4 saat

Morfoloji
boyanma-değerlendirme

Sonraki gün

Gerekli olduğunda
Dondurulan örnekte
Yardımcı bez işlevlerinin
değerlendirilmesi
İndirekt immunobead



Semen Toplanması

Analiz için semen alma yeri

Laboratuvar yakınında (ideal olarak)
Özel bir odada

Alınış metodu
Cinsel Pehiz süresi

masturbasyon
2- 7gün

Toplama kabı

temiz, geniş ağızlı
cam veya plastikten yapılmış
sperm için toksik olmayan

Saklama koşulu

Numune kabı 37 C de sıvılaşıana kadar

Isı değışiklikleri olmamalıdır

Semenin tamamı örnek alma kabı içine toplanmalı

Örnek tam alınmadıysa 2-7 günlük cinsel perhiz periyodu ile ikinci örnek alınmalıdır.



Makroskopik Analiz

- Renk
- Sıvılaşma süresi
- Viskozite
- pH
- Hacim

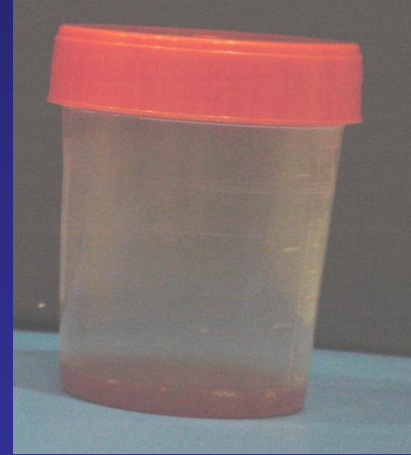


Renk

Normal semen
homojen, gri ve opak.



Eritrosit varlığı
kırmızı kahverengi



Sıvılaşma

Ortalama 15 dk (0-60 dk)

Sıvılaşmayan örneklerde :

Ejakülasyon sonrası 60 dk içinde Sıvılaşma (-)

Fizyolojik solusyonu

Eřit hacimde salinde
Dulbecco fosfat
tamponu ilavesi

Mekanik iřlem

Pipete veya enjektöre çekip
bırakma
6-10 kez 18 gauge veya 19
gauge iğneye

Enzimatik

1 g/l bromelin,
0.5 cu/ml plasmin
veya
10 IU/ml bromelain



Viskozite

- Semen yerçekimi etkisiyle damla damla akması
 - Pipet (1,5 mm çapında)
 - Cam çubuk
- Değerlendirme
- Semen damlasındaki uzama

< 2cm normal

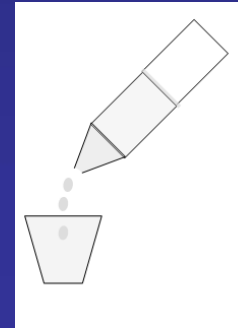


> 2cm anormal



Artan viskozite

Motilite ↓
IUI ve IVF
başarısı ↓



Semen pH

- Semen pH sı farklı yardımcı bez sekresyonları başlıca alkali seminal veziküler sekresyon ve asidik protatik sekresyonun ph değerleri arasındaki dengeyi gösterir.
- Likefaksiyon sonrası
 - Tercihen 30 dk
 - Mutlak 1 saat içinde
- pH metre
- referans değer $\text{pH} \geq 7,2$



Semen hacminin belirlenmesi

- Tavsiye edilen
 - gravimetrik yöntem
 - Örneğin dereceli geniş ağızlı kaba alınması



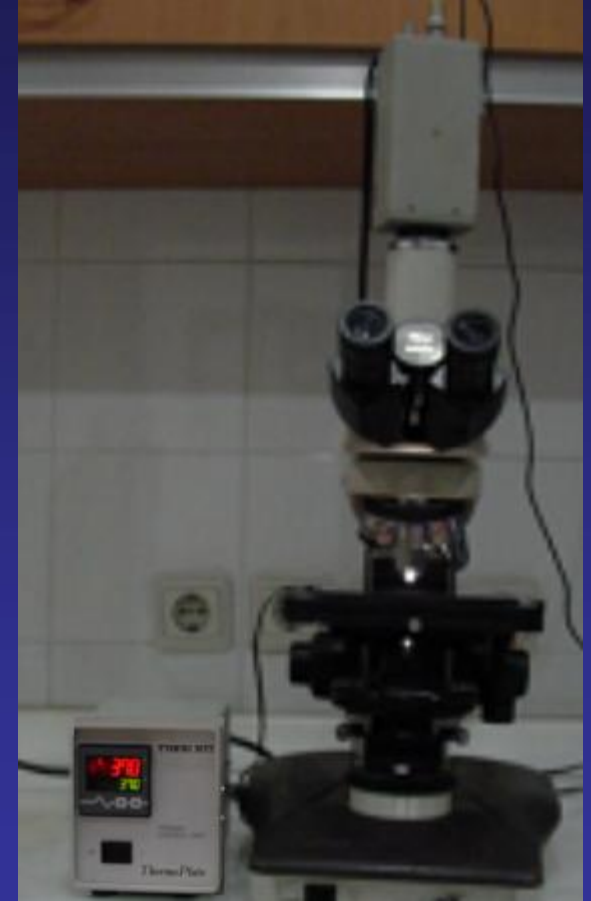
- Volümün aspire edilerek ölçülmesi tavsiye edilmemektedir
 - 0,3-0,9 ml kadar eksik ölçülmektedir.



- **NORMAL: 1.5 ml (WHO 2010)**
2.0 ml (WHO 1999)

Mikroskopik Analiz

- Sayı
- Hareket
- Canlılık
- Yuvarlak hücre → Lökosit
- Morfoloji



Agregasyon

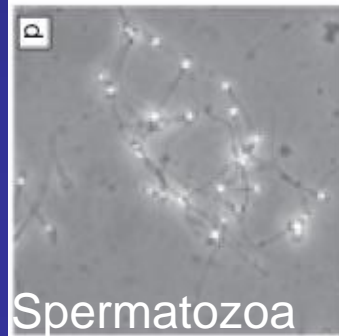
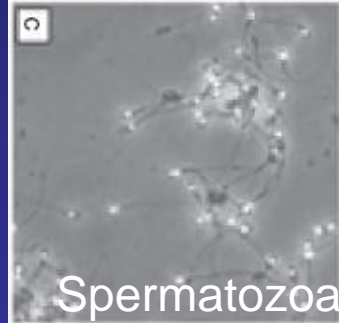
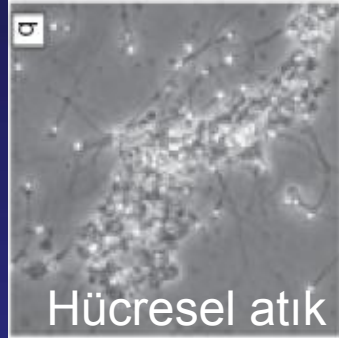
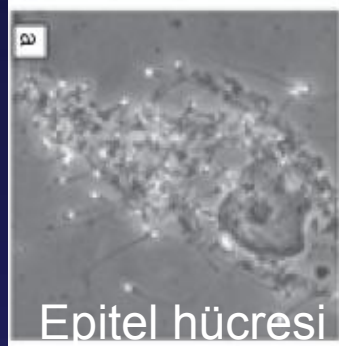
Hareketsiz spermlerin

- Haraketli veya hareketsiz spermlere
- Mukus iplikleri
- sperm dışı hücreler,
- hücresel atıklara bağlanma

WHO 2010

Hareketsiz spermlerin

- Mukus iplikleri
- sperm dışı hücreler,
- hücresel atıklara bağlanma



Sperm aglütinasyonu



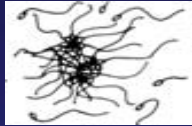





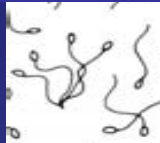











Hareketli spermlerin birbirine yapışarak bir arada bulunması

grade 1: isolated (seyrek)	aglütinasyon başına ayrılmış sperm <10 spermatozoa, spermlerin çoğu serbesttir.
grade 2: orta	aglütinasyon başına 10-50 sperm,serbest sperm
grade 3: geniş	agglutinasyon >50 spermatozoa, bazı spermatozoalar serbest
grade 4: gross (bütün)	Bütün spermatozoalar aglutine olmuş ve bağlantılar arası aglutinasyon

WHO 2010

Aglütinasyon (-)
Aglütinasyon (+)
Aglütinasyon (++)
Aglütinasyon (+++)
WHO 99



Bölümlerin içeriği	grade 1: isolated (seyrek)aglutinasyon başına ayrılmış sperm <10 spermatozoa, çoğu spermatozoa	grade 2: orta aglutinasyonbaşına 10-50 sperm, serbest sperm	grade 3: geniş agglutinasyon >50 bazı Spermatozoalar Hala serbest spermatozoa	grade 4: gross (bütün) Bütün spermatozoalar aglutine olmuş vr bağlantılar arası aglutinasyon
A- Baş başa				
B- Kuyruk kuyruğa Başlar serbest görünür ve aglutinatların hareketi nettir)				
C. kuyruk ucu kuyruk ucuna				
D- karışık (baş-başa ve kuyruk kuyruğa aglutinasyonlar nettir.)				
E. Dolaşmış Baş ve kuyruk ağ gibi sarılmış . aglutinatlarda baş net değil çünkü kuyruk kuyf-ruğa aglutinasyon				

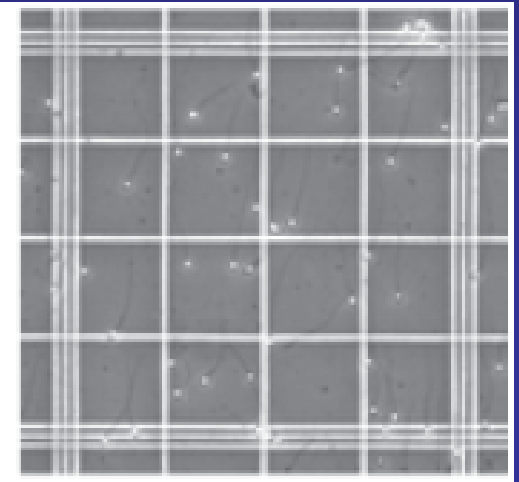
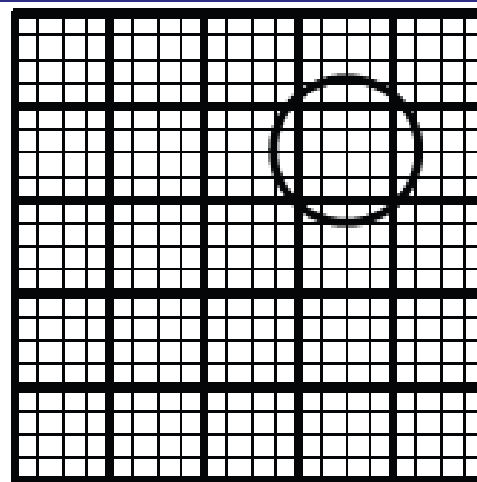
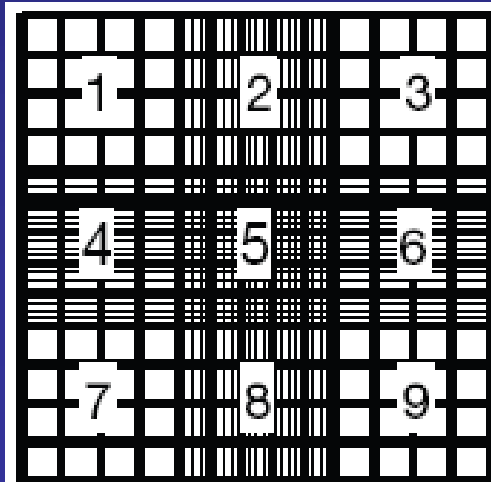
SAYI

- Kullanılacak Hemasitometrinin derinliği $100\mu\text{m}$ olmalıdır.
- Improved Neubauer kamerası
- Toplam 200 sperm sayılmalı
- Sayım iki kez yapılmalı
- Farkın kabul edilebilir olup
- olmadığı tablodan kontrol edilmeli

Toplam	Kabul edilebilir fark
144-156	24
157-169	25
170-182	26
183-196	27
197-211	28
212-226	29
227-242	30
243-258	31
259-274	32
275-292	33
293-309	34
310-328	35

Toplam	Kabul edilebilir fark
329-346	36
347-366	37
367-385	38
386-406	39
407-426	40
427-448	41
449-470	42
471-492	43
493-515	44
516-538	45
539-562	46
563-587	47

**Based on the rounded 95% confidence interval.*



SAYI

- Normal: 15×10^6 sperm/ml
toplam sperm sayısı: 39×10^6
WHO 2010

- Normal: 20×10^6 sperm/ml
toplam sperm sayısı: 40×10^6
WHO 99



Kriptozoospermi Değerlendirilmesi (AZOOSPERMİ)

- İlk mikroskopik incelemede spermatozoa (-)



3000 g 15 dk santrifuj

- Pellette spermatozoa (+) ⇒
kriptozoospermi
- Toplam sperm sayısı
Motilite
Canlı sperm sayısı

Pellette spermatozoa (-): azoospermi



Hareket

- Sıvılaştıktan sonra 60 dk içinde tercihen 30 dk içinde değerlendirilir.
- Oda sıcaklığında veya 37 C de
- 20 μm derinlikte ve 200X veya 400X büyütmede
- Toplam 200 hücre sayılarak

İleri hareketli

Hızı ne olursa olsun Spermin aktif olarak hareketi hem lineer hem de geniş dairesel.

Yerinde hareketli

İlerlemenin olmadığı motilitenin tüm modelleri küçük daire içinde yüzme,

Hareketsiz

Normal değerler

İleri hareket %32

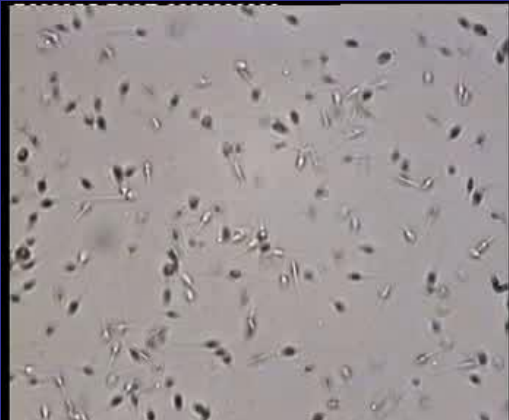
Toplam hareketli sperm sayısı %40

(ileri hareket+yerinde hareket)

WHO2010

- A. Hızlı ileri hareketli (25 $\mu\text{m}/\text{sn}$)
- B. Yavaş ileri hareketli
- C. Yerinde hareketli (5 $\mu\text{m}/\text{sn}$)
- D. Hareketsiz

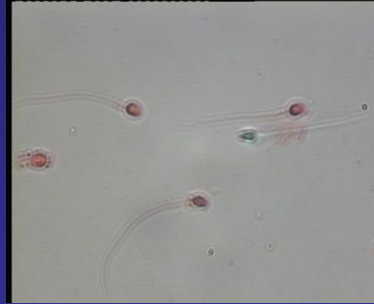
WHO 99



Canlılık

- Sperm canlılığı hücrenin membran bütünlüğü ile tanımlanır
- Toplam 200 hücre sayılarak canlı sperm oranı belirlenir.

Rutin olarak tüm semen örneklerine yapılmalı
Özellikle ileri hareketli sperm $< \%40$ ise canlılık testi
WHO 2010



Hareketsiz sperm oranı $> \%50$ canlılık testi
WHO 99

Sperm Canlılığı

•Referans değer

Boyama testleri

Eosin Y %58 canlı

Eosin-nigrosin %58 canlı

HOS testi %58 canlı

WHO 2010

•Referans değer

- Boyama testleri
 - Eosin > %75 canlı
 - Eosin-nigrosin > %75 canlı
- Hipoosmotik şişme testi
 - Canlılık oranı \geq %60 normal
 - Canlılık oranı < %50 anormal

WHO 1999



Yuvarlak Hücre

- Sperm dışı hücreler
 - Epitel ve prostat hücreleri,
 - Spermatogenik hücreler
 - Lökosit
-
- Yuvarlak hücre sayısı $< 5 \times 10^6$

Yuvarlak hücre



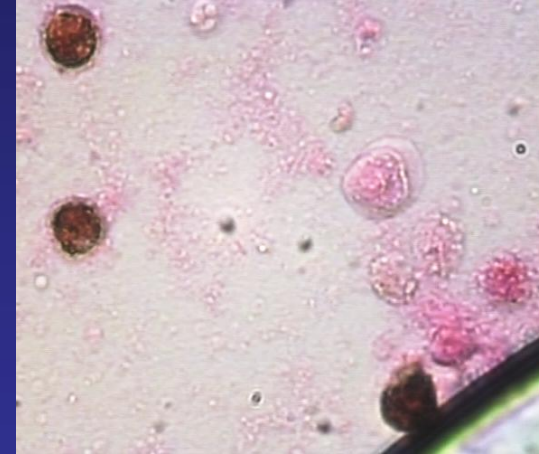
Lökosit

Lökosit sayısını belirlemede kullanılan teknikler:

1. İntrasellüler peroksidaz varlığı
2. Lökosit spesifik antijen

İntrasellüler peroksidaz varlığına dayalı testte ;

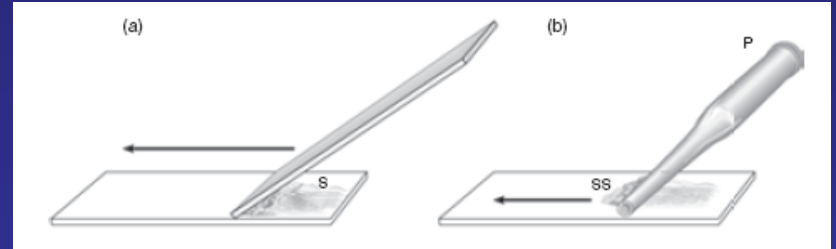
Lökositler (nötrofiller) ortama ilave edilen benzidin ve hidrojenperoksitle kahverengiye boyanır.



- Normal semende → Lökosit sayısı < 1 milyon/ml
- Yuvarlak hücre sayısı > 1×10^6 ise lökosit tanıma testi yapılır

MORFOLOJİ

- İki smear hazırlanır
- Havada kurumaya bırakılır
- Fikse edilip boyanır
 - Papanicolaou
 - Shorr
 - Diff-Quick



Parametreler	WHO 1999	WHO 2010
Baş		
Genişlik	2.5-3.5 μm	2.8 μm
Uzunluk	4.0-5.0 μm	4.1 μm
boy/en	1,5-1,75	1,5
Akrozomal bölge	%40-70 kaplamalıdır	
Boyun ve orta parça		
Genişlik	< 1.0 μm	0.6 μm
Uzunluk	Baş uzunluğunun 1,5 katı	4.0 μm
Sitoplazmik atıklar	normal baş alanı < 1/3	
Kuyruk		
Uzunluğu	~45 μm	
Genişliği	< orta parça	



•Papanicolaou boyama ve bilgisayar sistemi ile ortalama sperm ölçüleri

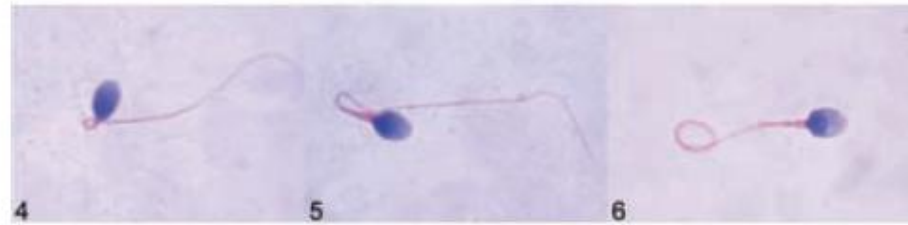
- **Baş**
- Oval
- Akrozomal bölge %40-70
- Vakuol sayısı < 2
- Vakuol başın kapıldığı alanın %20'nden az
- Postakrozomal bölgede vakuol olmamalıdır.
- **Kuyruk** kırık , kıvrık olmamalıdır
- Kuyruk 360 dönmemelidir.



Morfoloji

Normal \geq % 4
WHO 2010

- Normal
- > % 30 WHO kriterleri
- % 14 Kruger
 - WHO99



Sperm	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification	Comments
1	abnormal		ERC		abnormal	>one-third
2	normal		bent	normal	abnormal	
3	abnormal	>70% acr		looped	abnormal	
4	normal		bent	normal	abnormal	
5	normal		thick	looped	abnormal	
6	abnormal	PA vac		coiled	abnormal	
7	normal				normal	
8	normal			double	abnormal	
9	abnormal			coiled	abnormal	
10	abnormal		bent, insert	coiled	abnormal	
11	normal		thick	bent	abnormal	
12	normal		bent	normal	abnormal	



DEĞER	WHO 1999	WHO 2010
Semen hacmi (mL)	≥ 2	1,5
Toplam sperm ($\times 10^6$ /ejakulat)	40	39
Sperm sayısı/ ml ($\times 10^6$ / ml)	20	15
Total motilite(%)	(a+b+c) > 50	40
İleri hareket (%)	a+b > 50 a > 25	32
Vitalite (canlı spermatozoa, %)	75	58
Sperm morfoloji (normal form, %)	30 (WHO) 14 (Kruger)	4
pH	≥ 7.2	≥ 7.2
Peroxidaz-pozitif lökosit (10^6 /ml)	< 1.0	< 1.0
MAR test İmmunobead test %	< 50 hareketli sperm	< 50 hareketli sperm



Table A1.3 Nomenclature related to semen quality

aspermia	no semen (no or retrograde ejaculation)
asthenozoospermia	percentage of progressively motile (PR) spermatozoa below the lower reference limit
asthenoteratozoospermia	percentages of both progressively motile (PR) and morphologically normal spermatozoa below the lower reference limits
azoospermia	no spermatozoa in the ejaculate (given as the limit of quantification for the assessment method employed)
cryptozoospermia	spermatozoa absent from fresh preparations but observed in a centrifuged pellet
haemospermia (haematospemia)	presence of erythrocytes in the ejaculate
leukospermia (leukocytospermia, pyospermia)	presence of leukocytes in the ejaculate above the threshold value
necrozoospermia	low percentage of live, and high percentage of immotile, spermatozoa in the ejaculate
normozoospermia	total number (or concentration, depending on outcome reported)* of spermatozoa, and percentages of progressively motile (PR) and morphologically normal spermatozoa, equal to or above the lower reference limits
oligoasthenozoospermia	total number (or concentration, depending on outcome reported)* of spermatozoa, and percentage of progressively motile (PR) spermatozoa, below the lower reference limits
oligoasthenoteratozoospermia	total number (or concentration, depending on outcome reported)* of spermatozoa, and percentages of both progressively motile (PR) and morphologically normal spermatozoa, below the lower reference limits
oligoteratozoospermia	total number (or concentration, depending on outcome reported)* of spermatozoa, and percentage of morphologically normal spermatozoa, below the lower reference limits
oligozoospermia	total number (or concentration, depending on outcome reported)* of spermatozoa below the lower reference limit
teratozoospermia	percentage of morphologically normal spermatozoa below the lower reference limit

Preference should always be given to total number, as this parameter takes precedence over concentration.

Note: The suffix "spermia" refers to the ejaculate and "zoospermia" to the spermatozoa. Thus, the following terms should not be used: asthenospermia, asthenoteratospermia, cryptospermia, oligoasthenospermia, oligoteratospermia, oligospermia, teratospermia.



Perspectives

Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects

Rune Eliasson

Björnstigen 13, SE 165 71 HASSELBY, Sweden

In a yet unpublished study on 100 men whose partners were pregnant in the first trimester, I found 0.25 million spermatozoa per day per mL testis volume to be the lower (5%) reference limit. This has been very helpful in my contacts with patients who have a ‘low sperm count’

Table 1. In a routine evaluation, patient A had been classified as ‘fertile’ and patient B as ‘infertile’. In reality, B has a testicular function that is four times better than that of A.

Patient	A	B
Concentration of spermatozoa (million mL ⁻¹)	30	10
Volume (mL)	2	6
Total number of spermatozoa (million)	60	60
Abstinence (days)	5	2
Number of spermatozoa per day (million)	12	30
Testis size (mL)	20 + 20	12 + 12
Number of spermatozoa per day per mL testis volume (million)	0.3	1.25



Chapter 7	Quality assurance and quality control	179
7.1	Controlling for quality in the andrology laboratory	179
7.2	The nature of errors in semen analysis	179
7.3	Minimizing statistical sampling error	180
7.4	The QA programme	182
7.5	Laboratory procedures manual	182
7.6	Internal quality control	182
7.6.1	Purchased QC samples	183
7.6.2	Laboratory-made QC samples	183
7.6.3	Stored samples (purchased or laboratory-made)	183
7.6.4	Fresh QC samples (laboratory-made)	184
7.7	Statistical procedures for analysing and reporting within- and among-technician systematic errors	185
7.7.1	The \bar{X}_{bar} chart	185
7.7.2	The S chart	188
7.8	QC for percentages	189
7.9	Assessing \bar{X}_{bar} and S charts	189
7.9.1	How to recognize out-of-control values	189
7.9.2	Causes of out-of-control values	190
7.9.3	Responses to out-of-control values	191
7.10	Statistical procedures for analysing and reporting among-technician variability	191
7.10.1	Comparing results from two or more technicians	191
7.10.2	Monitoring monthly means	194
7.11	External quality control and quality assurance	194
7.11.1	Assessment of EQC results	196
7.11.2	Responses to out-of-control results	197
7.12	Frequency and priority of quality control	197

Perspectives

Practical semen analysis: from A to Z

Charlene Brazil

Center for Health and the Environment, University of California, Davis, CA 95616, USA

- Tecrübeli teknisyen
- WHO 2010 referans alınmalı
- Her sayım 2 kez yapılmalı
- İnternal kontrol
- External kontrol



Yardımcı seks organları fonksiyonları

- Epididim
 - free l-carnitine,
glycerophosphocholine (GPC), ve
neutral α -glucosidase
- Seminal vezikül
 - fructose ve prostaglandins
- Prostat
 - citric acid, çinko,
 γ -glutamyltranspeptidase



CASA

- İlerleyen teknoloji ve Fleurosyan DNA boyama kullanılması doğruluk oranlarını arttırdı.
 - Sperm sayısı, hareket ve sperm morfolojisi değerlendirilebilir.
 - CASA sadece boyanmış sperm başını sayar, spermin intakt olup olmadığı mikroskopik değerlendirme ile yapılabilir.
 - Objektif, keskinlik ve tekrar edilebilirliği yüksek
 - Klinik yararlılığının gösterilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç var
- WHO 2010





GÜNCEL ANDROLOJİ SEMPOZYUMU

Canlı
cerrahiler eşliğinde
"Her Yönüyle
Genitoüriner
Protezler"
kursu

21 - 23 Haziran 2010

İstanbul Hilton Kongre ve Sergi Merkezi

BİLİMSEL PROGRAM

21 Haziran 2010, Pazartesi

KURS I

CANLI CERRAHİLER EŞLİĞİNDE HER YÖNÜYLE GENİTOÜRİNER PROTEZLER KURSU

Kurs yöneticileri: **A. Metin, Ö. Yaman**

08:30 - 13:00

Peyronie hastalığında penil protez implantasyonu / **A. Kadioğlu**

Mekanik arıza nedeniyle penil protez revizyonu / **M. Çulha**

Eş zamanlı penil protez ve artifisiel üriner sfinkter implantasyonu / **I. Moncada**

13:00 - 14:00

ÖĞLE YEMEĞİ

KURS II

SEMEN ANALİZİ KURSU: WHO 2010 KILAVUZUNDA NELER DEĞİŞTİ?

Kurs yöneticileri: **O. Ekmekçioğlu, M. Şamlı**

14:00 - 14:15

Rutin semen analizi / **G. Aktan**

Makroskopik inceleme (Miktar, pH, renk, lifefaksiyon, viskozite)

Mikroskopik inceleme (Sayı hareketlilik, sperm canlılık testleri ve lökosit değerlendirmesi)

14:15 - 14:25

Sperm morfoloji değerlendirmesi / **N. Çalınlioğlu**

14:25 - 14:40

Sperm yıkama teknikleri / **A. Yükmən**

14:40 - 14:55

İsteğe bağlı ve araştırma amaçlı yapılan infertilite testleri / **S. Yılmaz**

Sperm DNA hasarı

Serbest oksijen radikalleri

14:55 - 15:10

Güncel sperm dondurma yöntemleri / **B. Özsait**

15:10 - 15:20

Genetik testler / **M. Şamlı**

15:20 - 15:30

Semen analizinden kliniğe yansımalar / **E. Kandıralı**

15:30 - 16:00

KAHVE ARASI

