

# Das neue WHO-Laborhandbuch 2021

***H.-Chr. Schuppe***

JUSTUS-LIEBIG-



UNIVERSITÄT  
GIESSEN

***F.-M. Köhn***

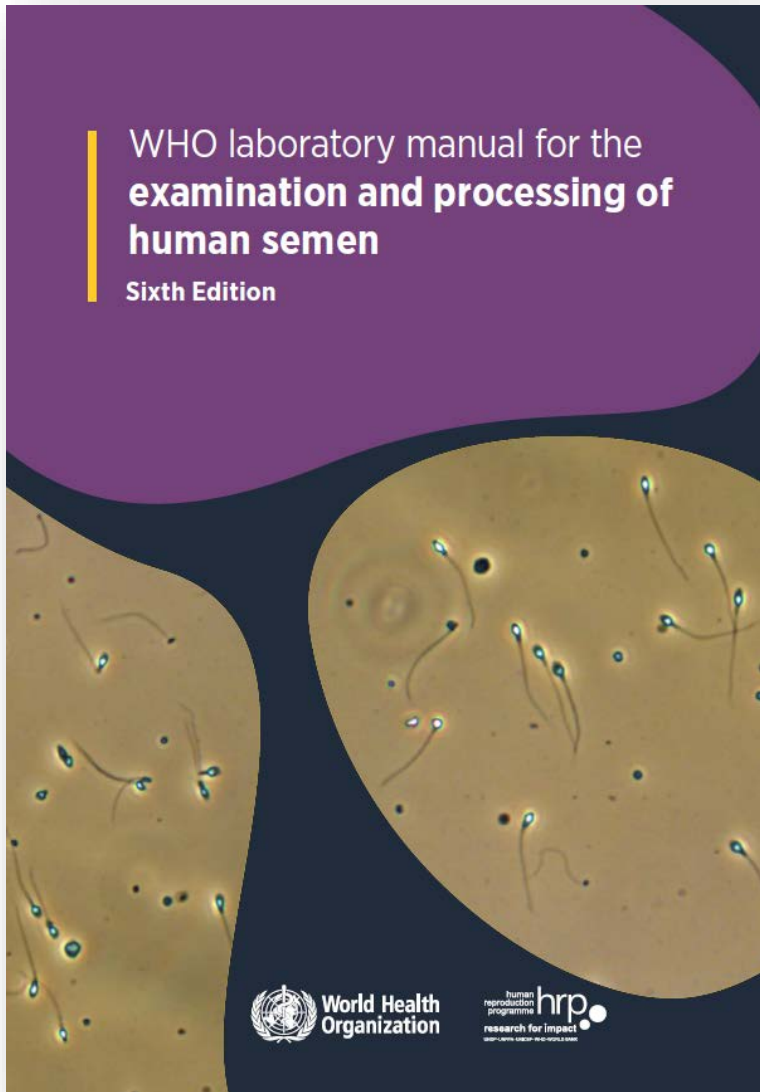


Andrologikum München

SCHOOL OF  
REPRODUCTIVE MEDICINE  
& ENDOCRINOLOGY

**DGRM SCHOOL**  
jetzt **VIRTUELL!**

26. Januar 2022  
**Das neue WHO-Laborhandbuch –  
was ändert sich in der Praxis?**



- Kapitel 2-4
  - **Ejakulatanalyse**
    - **Basisuntersuchung**
    - Ergänzende / fakultative Untersuchungen
    - Erweiterte / forschungsrelevante Testverfahren
- Kapitel 5-6
  - Spermienaufbereitung
  - Kryokonservierung
- Kapitel 7
  - Qualitätssicherung / –kontrolle
- Kapitel 8 (Appendices)
  - **Interpretation der Ergebnisse (Basis-Spermiogramm)**
  - ...

# WHO 2010 vs. 2021

## Wesentliche Unterschiede

- Keine Angaben mehr zu Untersuchungen des Mukus
- Keine Angaben zu HOP-Test
- Reduktion der Basisuntersuchungen
- Differenzierung in erweiterte („*extended*“) und fortgeschrittene („*advanced*“) Untersuchungen
- Rückkehr zu Motilitätskriterien WHO a, b, c, d
- Keine Doppelbestimmungen der Morphologie mehr
- Keine Angaben mehr zur Nomenklatur
- Geringfügige Änderungen der Referenzwerte (untere 5. Perzentile) der Spermogrammvariablen
- „*Decision limits*“

# WHO 2021 vs. WHO 2010

Table 8.3 Distribution of semen examination results from men in couples starting a pregnancy within one year of unprotected sexual intercourse leading to a natural conception. From Campbell et al. (5); fifth percentile given with variability (95% confidence interval)

	N	Centiles									
		2.5th	5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th	97.5th	
Semen volume (ml)	3586	1.0	1.4	1.5 (1.2-1.5)	1.8	2.0	2.5	3.0	5.5	6.2	6.9
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> per ml)	3587	11	16	15 (15-18)	22	36	66	110	166	208	254
Total sperm number (10 <sup>6</sup> per ejaculate)	3584	29	39	40	100	200	300	400	561	701	865
Total motility (PR + NP, %)	3488	35	42	40 (40-43)	47	55	64	73	83	90	92
Progressive motility (PR, %)	3389	24	30	32 (27-31)	38	45	55	63	71	77	81
Non-progressive motility (NP, %)	3387	1	1	1 (1-1)	2	4	8	15	26	32	38
Immotile spermatozoa (IM, %)	2800	15	20	58	68	70	73	75	83	87	90
Vitality (%)	1337	45	54	58 (55-56)	65	70	75	80	95	97	98
Normal forms (%)	3335	3	4	4 (3.9-4.0)	5	8	14	23	32	39	45

1.5

15

40

32

58

2 x 200

2 x 200

nur 1 x 200 !

# Vorbereitungen für das Spermogramm

## WHO 2021

- **Karenz:** 2 - 7 Tage, **2-7 Tage**
- **2 oder mehr Ejakulate:** Abstand ?, ?
- **Transport von zu Hause:** innerhalb von 1 h  
im Labor, **30 Minuten,**  
**spätestens 60 Minuten**
- **Auffanggefäße:** Chargenkontrolle auf Toxizität
- **Instruktion**

# Samenanalyse

## WHO 2010 / 2021

- **Innerhalb 5 Minuten**
  - **Ejakulatgefäß auf Labortisch oder in Inkubator (37°C) /  
Bestimmung des Ejakulatvolumens durch Gewichtsmessung**

# Basis-Samenanalyse

## WHO 2010 / 2021

(Routine, muss nicht zwingend  
in einem andrologischen Labor erfolgen)

- **Zwischen 30 und 60 Minuten**
  - Verflüssigung, Aussehen ✓
  - ~~Ejakulatvolumen~~
  - pH, wenn indiziert
  - Motilität ✓
  - Vitalität, wenn Motilität niedrig
  - Bestimmung der Konzentration und Gesamtzahl, Vorbereitung
  - Ausstriche für Spermienmorphologie ✓
  - Zentrifugation von Seminalplasma für Biochemie, wenn notwendig
  - MAR-Test, wenn indiziert
  - Bestimmung peroxidasepositiver Zellen, wenn notwendig

# Samenanalyse

## WHO 2010 / WHO 2021

- **Innerhalb 3 Stunden**
  - **Bestimmung der Spermienkonzentration, evtl. auch später**
  - **Versendung von Proben an das mikrobiologische Labor, wenn notwendig**
- **Nach 4 Stunden, später oder an folgenden Tagen**
  - **Färbung für Beurteilung der Morphologie**
  - **Biochemische Untersuchungen**



# Verflüssigung / Viskosität

## WHO 2021

- **Verflüssigung: bis max. 60 Minuten** ✓
- **Verbesserung der Verflüssigung** ✓
  - Mischung mit Spermienpräparationsmedium 1:1
  - Mehrfaches Aufziehen durch Kanüle (Gauge 18/19)
  - Mischung mit Bromelain 10 IU/ml 1:1 bis 1:2
- **Viskosipathie** ✓
  - Fadenlänge > 2 cm bei Abtropfen aus Pipette (1.5 mm Durchmesser)

# Ejakulat-Volumen

## WHO 2010 / WHO 2021

- Bestimmung mit Waage
- ~~Bestimmung mit graduiertem Glaszylinder~~

# Spermatozoenmotilität WHO 2010

- **Progressiv motile Spermien (PR)**
- **Nicht-progressiv motile Spermien (NP)**
- **Immotile Spermien (IM)**

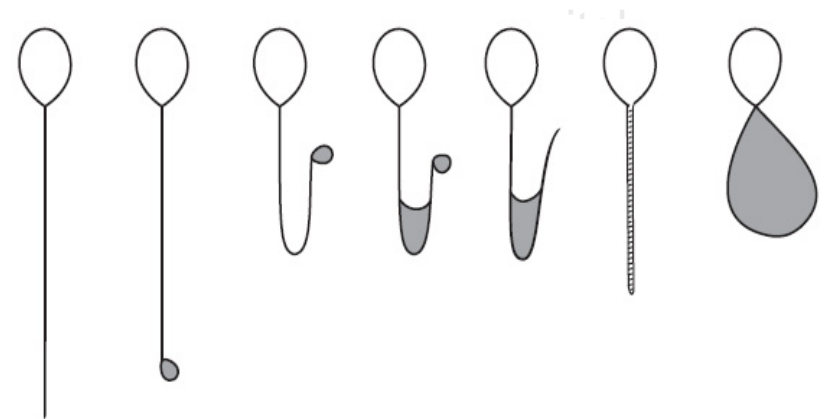
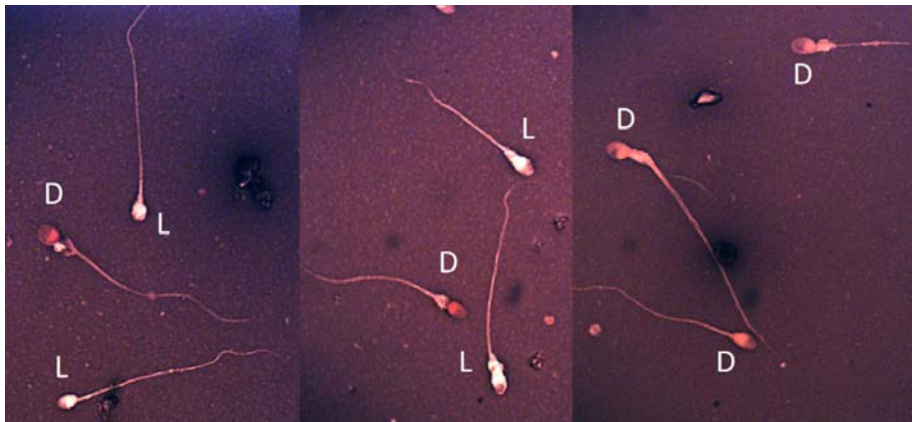
# Spermatozoenmotilität

## WHO 1999 / 2021

- **WHO a** ✓ schnelle progressive Motilität  
> 25  $\mu\text{m/s}$  bei 37°C
- **WHO b** ✓ langsame oder träge progressive Motilität
- **WHO c** ✓ nicht-progressive Motilität < 5  $\mu\text{m/s}$
- **WHO d** ✓ Immotilität

# Vitalität WHO 2010 / 2021

- Eosin, Eosin-Negrosin, hypoosmot. Schwelltest ✓
- immer, falls PR < 40% ✓
- 5% Perzentile: 58% / 54%
- ~~Definition Nekrozoospermie~~
  - ~~niedriger % vitaler Spermien~~



# Beurteilung der Morphologie

## WHO 2010 / 2021

- Papanicolaou ✓
- Shorr-Färbung ✓
- Diff-Quik ✓

# WHO 2021

## Erweiterte Analyse

(bei speziellen Fragestellungen des Labors oder Kliniklers)

<b>Chapter 3: Extended examination</b> .....	<b>83</b>
3.1 Indices of multiple sperm defects.....	83
3.2 Sperm DNA fragmentation.....	86
3.3 Genetic and genomic tests .....	105
3.4 Tests related to immunology and immunological methods .....	108
3.5 Assessment of interleukins - .....	116
3.6 Assessment of immature genital tract inflammation .....	119
3.7 Testing for antibody coating of spermatozoa.....	125
3.8 Biochemical assays for accessory sex gland function.....	125
3.9 Assessment of sequence of ejaculation .....	135

Peroxidase positive Zellen

MAR-Test

z.B. Fruktose,  $\alpha$ -Glukosidase

**MAR-Test: „Spermien-Mucus-Penetration und IVF sind beeinträchtigt, wenn > 50% der motilen Spermien Antikörper an der Oberfläche tragen.“ „Keine evidenzbasierten Referenzwerte verfügbar!“**

# WHO 2021

## Fortgeschrittene Analyse

(keine Routine bei initialer Evaluation

des subfertilen Mannes; wissenschaftliche Fragestellungen)

<b>Chapter 4: Advanced examinations</b> .....	<b>139</b>
4.1 Seminal oxidative stress and reactive oxygen species testing .....	140
4.2 Assessment of the acrosome reaction.....	144
4.3 Assessment of sperm chromatin .....	149
4.4 Transmembrane ion flux and transport in sperm.....	152
4.5 Computer-aided sperm analysis (CASA) .....	155
4.6 Emerging technologies .....	159



# WHO 2021

## Kryokonservierung von Spermien

<b>Chapter 6: Cryopreservation of spermatozoa .....</b>	<b>171</b>
6.1 Introduction.....	171
6.2 Reasons for cryopreservation of spermatozoa.....	172
6.3 Risk assessment of cryopreservation and storage of human semen.....	174
6.4 Semen cryopreservation protocols.....	177
6.5 Vitrification.....	182

**Neu**



## Chapter 8: Appendices

8.1 Interpretation of semen examination results.....	211
8.2 Equipment and safety .....	214
8.3 Microscopy for basic ejaculate examination.....	221
8.4 Stock solutions and media .....	226
8.5 Template for a semen analysis recording form.....	233
8.6 QC material .....	235
8.7 National external quality control programmes for semen analysis.....	246

### 8.1 Interpretation of semen examination results

This manual is not a guideline for clinical decisions as the choice of treatment modalities for male factor infertility. Still, it is the responsibility of each laboratory to provide information that can facilitate the interpretation of the results.

# Nomenklatur der Ejakulatparameter WHO 2010 ~~21~~

~~Normozoospermie, Oligozoospermie, Asthenozoospermie,  
Teratozoospermie~~

~~Azoospermie, Aspermie, Kryptozoospermie,  
Nekrozoospermie, Hämatospermie, Leukozytospermie~~

# Aber.....

## Verwendung einzelner Begriffe im WHO 2021 Laborhandbuch

- **Seite 35, WHO 2021: „...Azoospermie bleibt die Beschreibung eines Ejakulatbefundes und ist keine Diagnose.....“**

**WHO 2010**  
**Lower reference values**



**WHO 2022**  
**Decision limits**

# Distribution of semen examination results 2020

*Campbell et al. (2021) Andrology 9: 817-822*

	N	Centiles									
		2.5 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>	(95% CI)	10 <sup>th</sup>	25 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	75 <sup>th</sup>	90 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>	97.5 <sup>th</sup>
Semen volume (ml)	3586	1.0	1.4	(1.3-1.5)	1.8	2.3	3.0	4.2	5.5	6.2	6.9
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> per ml)	3587	11	16	(15-18)	22	36	66	110	166	208	254
Total sperm number (10 <sup>6</sup> per ejaculate)	3584	29	39	(35-40)	58	108	210	363	561	701	865
Total motility (PR + NP, %)	3488	35	42	(40-43)	47	55	64	73	83	90	92
Progressive motility (PR, %)	3389	24	30	(29-31)	36	45	55	63	71	77	81
Non-progressive motility (NP, %)	3387	1	1	(1-1)	2	4	8	15	26	32	38
Immotile spermatozoa (IM, %)	2800	15	20	(19-20)	23	30	37	45	53	58	65
Vitality (%)	1337	45	54	(50-56)	60	69	78	88	95	97	98
Normal forms (%)	3335	3	4	(3.9-4.0)	5	8	14	23	32	39	45

The 5<sup>th</sup> centile, is indicated above, and provides the lower reference values, of the fertile man.

Daten von Männern aus 12 Ländern / 5 Kontinenten; Time-to-Pregnancy der Partnerin < 12 Monate;  
Ejakulatanalysen entsprechend WHO (2010), Anwendung der strikten Kriterien für die  
Spermienmorphologie; CI = Konfidenzintervall

# Interpretation of semen examination results (WHO 2021)

- "For an individual patient, a semen analysis is never prognostic of fertility, as it is the fertility potential of the couple that defines them as fertile or subfertile."
- "It is (...) well known that there is a substantial overlap of semen examination results between fertile and infertile men."
- "... points to the problem of applying a dichotomous categorization to fertility that must be considered a continuum."

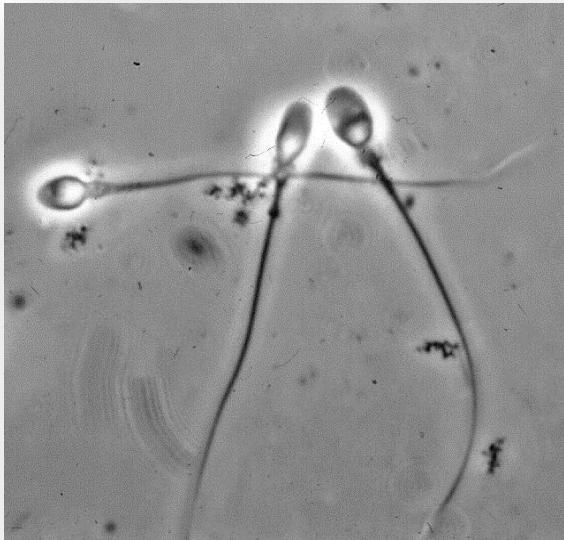
# Interpretation of semen examination results (WHO 2021)

- Distribution of results from presumed fertile men is not sufficient to establish clinically useful **decision limits**.
- Caution is needed to avoid over-interpretation of data describing the semen characteristics of a reference population of men whose partners had a time to pregnancy of  $\leq 12$  months.
- Lower reference values / percentiles do not represent distinct limits between fertile and subfertile men.
- **Decision limits** (“poor – intermediate – good prognosis”) are more accurate than reference ranges and reference limits.

A decision limit is based on clinical and statistical considerations that point to a need for a certain diagnostic or therapeutic intervention (429, 430).



*“Measurements made on the whole population of ejaculated spermatozoa cannot define the fertilizing capacity of the few that reach the site of fertilization, but semen analysis provides essential information on the clinical status of the individual.”*



*WHO<sup>5</sup> (2010) = WHO<sup>6</sup> (2021)*