

**Der Einfluß uropathogener Erreger auf
Motilitätsparameter von humanen
Spermatozoen –
eine in vitro Untersuchung**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Petra Huwe

aus Frankenthal/Pfalz

Gießen 2004

**Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des
Zentrums für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie
des Universitätsklinikums Gießen**

Direktor: Prof. Dr. med. W. Weidner

Gutachter: Prof. Dr. W. Weidner

Gutachter: Prof. Dr. A. Sziegoleit

Tag der Disputation: 06.12.2004

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicheer Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

1 Einleitung	4
1.1 Definition der männlichen Infertilität	4
1.2 Urogenitale Infektionen als Infertilitätsursache	5
1.2.1 Häufigkeit urogenitaler Infektionen	5
1.2.2 Spezielle Erkrankungen	6
1.2.2.1 Urethritis	6
1.2.2.2 Prostatitis	7
1.2.2.3 Epididymitis	9
1.2.2.4 Orchitis	11
1.2.2.5 Asymptomatische Bakteriospermie	12
1.2.3 Erreger der männlichen Uroadnexitis	13
1.2.4 Pathomechanismen der Infertilität	14
1.2.4.1 Verschuß der Samenwege	14
1.2.4.2 Sekretorische Dysfunktion	15
1.2.4.3 Spermatozoenantikörper (SPAK)	15
1.2.4.4 Leukozytospemie	16
1.2.4.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	17
1.2.4.6 Entzündliche Spermatogenesestörungen	18
1.2.4.6.1 Beeinflussung der Spermatozoendichte	19
1.2.4.6.2 Beeinflussung der Spermatozoenmorphologie	19
1.2.4.6.3 Beeinflussung der Spermatozoenmotilität	20
1.2.4.7 Direkte Erreger-Spermatozoen-Interaktion	22
1.2.4.7.1 Escherichia coli (E. coli)	22
1.2.4.7.2 Enterokokken (Streptococcus faecalis)	23
1.2.4.7.3 Pseudomonas aeruginosa	23
1.2.4.7.4 Staphylococcus saprophyticus	24
1.2.4.7.5 β -hämolisierende Streptokokken der Gruppe B	24
1.2.4.7.6 Ureaplasma urealyticum	24
1.2.4.7.7 Chlamydia trachomatis	25
1.2.4.7.8 Candida albicans	25
1.3 Aufgabenstellung der Dissertation	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Versuchsablauf	27
2.1.1 Nativejakulate und Spender	27
2.1.2 Erstuntersuchung und Aufarbeitung des Ejakulates	27
2.2 Motilitätsanalysen	29
2.2.1 Verwendete Erreger	31
2.2.1.1 Escherichia coli (E. coli)	31
2.2.1.2 Enterokokken (Streptococcus faecalis)	31

2.2.1.3 Pseudomonas aeruginosa (Ps. aeruginosa)	31
2.2.1.4 Staphylococcus saprophyticus (Staph. saprophyticus)	32
2.2.1.5 Candida albicans	32
2.2.1.6 β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B	32
2.2.2 Motilitätsanalysen	33
2.2.2.1 Vorversuche mit Escherichia coli	33
2.2.2.2 Motilitätsanalysen mit Enterokokken (Erste Versuchsreihe)	33
2.2.2.3 Motilitätsanalysen mit Pseudomonas aeruginosa (Zweite Versuchsreihe)	35
2.2.2.4 Motilitätsanalysen mit Candida albicans und Staphylococcus saprophyticus (Dritte Versuchsreihe)	36
2.2.2.5 Motilitätsanalysen mit β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B (Vierte Versuchsreihe)	37
2.2.3 Statistische Auswertung der Daten	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Vorversuche mit Escherichia coli	40
3.2 Motilitätsanalysen mit Enterokokken	41
3.3 Motilitätsanalysen mit Pseudomonas aeruginosa	45
3.4 Motilitätsanalysen mit Candida albicans und Staphylococcus saprophyticus	49
3.5 Motilitätsanalysen mit β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B	54
4 Diskussion	59
4.1 Verwendete Methoden	59
4.1.1 Probengewinnung und Spermatozoenaufbereitung	59
4.1.2 Motilitätsanalysen mit der computerassistierten Spermatozoenanalyse (CASA)	61
4.2 Verwendete Erreger	64
4.3 Diskussion der Ergebnisse der Motilitätsanalysen aus den durchgeführten Versuchsreihen	65
4.3.1 Diskussion der Ergebnisse der Vorversuche mit E. coli	65
4.3.2 Diskussion der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit Enterokokken	66
4.3.3 Diskussion der Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe mit Pseudomonas aeruginosa	67
4.3.4 Diskussion der Ergebnisse der dritten Versuchsreihe mit Candida albicans und Staphylococcus saprophyticus	69
4.3.5 Diskussion der Ergebnisse der vierten Versuchsreihe mit β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B	72
4.4 Zusammenfassung und Schlußfolgerung	74
4.5 Summary	75
5 Literaturverzeichnis	76
6 Appendix	90

6.1 Software-Einstellung des Mika-Motion-Analysers	90
7 Danksagung	91
8 Lebenslauf	93
9 Publikationsliste	94
9.1 Originalarbeiten	94
9.2 Veröffentlichte Vorträge	94
9.3 Übersichtsartikel	96
9.4 Buchkapitel	96

1 Einleitung

Ca. 10-20 % der Ehen in der Bundesrepublik Deutschland bleiben ungewollt kinderlos (Schmidt-Matthiesen 1992). Die Ursachenhäufigkeit einer sterilen bzw. infertilen Partnerschaft liegt dabei zu 50 % beim weiblichen, zu 30 % beim männlichen und zu 20 % bei beiden Partnern (Schmidt-Matthiesen 1992). Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang die durch urogenitale Infektionen verursachte Infertilität.

1.1 Definition der männlichen Infertilität

Die WHO (1993) definiert die männliche Infertilität als fehlenden Eintritt einer Schwangerschaft nach spätestens 12 Monaten ungeschützten Geschlechtsverkehrs. Dabei unterscheidet man eine primäre und sekundäre Infertilität des Mannes. Eine primäre Infertilität liegt dann vor, wenn ein Mann niemals zuvor eine Frau befruchtet hat. Bei der sekundären Infertilität war der Mann zuvor schon einmal Vater, ungeachtet der Tatsache ob dieses mit der jetzigen Partnerin war und ob die Schwangerschaft erfolgreich ausgetragen wurde (WHO 1993). In 50 % aller „sterilen Partnerschaften“ wird dem Mann eine (co-)ätiologische Rolle zugeschrieben (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Urologe A 1997).

Verschiedene ätiopathogenetische Ursachen werden für die männliche Infertilität verantwortlich gemacht. Diese sind von der WHO 1993 (WHO 1993) festgelegt und werden in der folgenden Aufstellung dargestellt:

- Sexuelle und/oder ejakulatorische Dysfunktion
- Immunologische Ursachen
- Keine erfaßbare Ursache
- Isolierte Abnormalität des Seminalplasmas
- Iatrogene Ursachen
- Systemische Ursachen
- Kongenitale Abnormalitäten
- Erworbener testikulärer Schaden
- Varikozele
- Männliche Adnexinfektionen (urogenitale Infektionen)
- Endokrine Ursachen
- Idiopathische Oligozoospermie
- Idiopathische Asthenozoospermie
- Idiopathische Teratozoospermie
- Obstruktive Azoospermie
- Idiopathische Azoospermie

Einen Faktor der männlichen Infertilität können damit urogenitale Infektionen darstellen. Mittlerweile ist es generell akzeptiert, daß eine der wesentlichen Ursachen der männlichen Infertilität die symptomatische oder asymptomatische Infektion des Urogenitaltraktes darstellt (Weidner et al. 1999).

1.2 Urogenitale Infektionen als Infertilitätsursache

Als urogenitale Infektionen bezeichnet man die Invasion, Adhärenz, Vermehrung sowie die Ausbreitung von Erregern im Urogenitaltrakt. Infolge einer Keimbesiedelung und Entzündung des Urogenitalsystems kommt es im Verlauf zu einer unspezifischen oder spezifischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die eingedrungenen Erreger (Weidner und Schiefer 1998, Huwe und Weidner 2000 b). Hierbei unterscheidet man die verschiedenen Infektionen nach ihrer Erregermanifestation: Pyelonephritis, Nierenabszeß, Zystitis, akute und chronische Prostatitis, Prostataabszeß, Epididymitis, Orchitis, Urethritis und Balanitis. Zahlreiche klinische und experimentelle Studien haben sich mit dem Einfluß entzündlicher Prozesse und der direkten Wirkung von Mikroorganismen auf die Spermatozoen, die männlichen Adnexorgane und deren Sekrete beschäftigt. Hierbei ist der Einfluß auf die Spermatozoenkonzentration, -motilität und -morphologie sowie auch Veränderungen des Seminalplasmas (Schirren und Zander 1966, Weidner et al. 1985, Jaques et al. 1990, Christiansen et al. 1991, Diemer et al. 1996 und 2000 b) von besonderem Interesse. Kommt es zu einer Infektion mit sexuell übertragbaren Erregern (z.B. Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Ureaplasmen), kann es zu den für diese Erreger typischen Krankheitsbildern beim Mann (Urethritis, Prostatitis, Epididymitis, Orchitis) kommen, aber auch zur Übertragung der Erreger auf das weibliche Genitale, welches ebenfalls die weibliche Fertilität beeinträchtigen kann.

1.2.1 Häufigkeit urogenitaler Infektionen

Infektionen des männlichen Urogenitaltraktes sind für ca. 15 % der Fälle männlicher Infertilität verantwortlich (Diemer et al. 2000 a). Es ist mittlerweile anerkannt, daß einer der wesentlichen Ursachen der männlichen Infertilität symptomatische oder asymptomatische Infektionen des männlichen Urogenitaltraktes darstellen (Weidner et al. 1999). In diesem Zusammenhang erwähnt die Weltgesundheitsorganisation die Urethritis, Epididymitis, Orchitis und Prostatitis als mehr oder weniger häufige Verursacher männlicher Infertilität (WHO 1993). Nieschlag (1997) beschreibt bei einem Patientenkollektiv von 7802 infertilen Männern aus der Infertilitätssprechstunde, daß in 9 % urogenitale Infektionen festgestellt wurden. Im Folgenden werden die für die männliche Infertilität wichtigsten Erkrankungen dargestellt.

1.2.2 Spezielle Erkrankungen

1.2.2.1 Urethritis

Die infektiöse Urethritis (Tab. 1) wird am häufigsten von sexuell übertragbaren Erregern wie Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae und Ureaplasma urealyticum verursacht (Weidner et al. 1999). Candida Spezies, Viren, z.B. das Herpes simplex-Virus oder auch das Protozoon Trichomonas vaginalis können in weniger als 5 % eine Urethritis hervorrufen (Näher 1998). Mischinfektionen sind häufig. In ca. 20 % der Fälle kann bei der infektiös bedingten Urethritis kein Erregernachweis erbracht werden. Eine nicht infektiös bedingte Urethritis kann aufgrund von allergischen Reaktionen, Traumata oder durch Manipulationen an der Harnröhre hervorgerufen werden (Weidner et al. 1999). Asymptomatische Infektionen der Urethra finden sich in 5-10 % der Fälle und spielen epidemiologisch als Erregerreservoir eine wichtige Rolle (Weidner et al. 1999).

Die charakteristischen Merkmale einer akuten Urethritis sind der Fluor urethralis und brennende Beschwerden in der Harnröhre bei der Miktion. Diagnostisch hinweisend sind ≥ 4 Granulozyten/Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung im Ausstrich des Urethralfluors oder ≥ 15 Granulozyten/Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung im Ausstrich des Sediments des Ersturins (Schiefer 1998). Eine chronische Urethritis liegt bei fehlendem Fluor urethralis und Nachweis von ≥ 15 Leukozyten/Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung im Sediment des Ersturins vor.

Tabelle1: Erregerspektrum der infektiösen Urethritis (nach Weidner et al. 1999)

	Häufigkeit 5 %	Häufigkeit 95 %
Sexuell übertragen	Candida spp. Trichomonas vaginalis Herpes simplex-Virus II	Chlamydia trachomatis Ureaplasma urealyticum Neisseria gonorrhoeae
Nicht sexuell übertragen	Enterobacteriaceae spp. Streptococcus spp. Staphylococcus spp. Anaerobier	

Der Einfluß einer Urethritis auf Fertilitätsstörungen des Mannes ist umstritten (Weidner et al. 1999). Die WHO (1993) beschreibt noch entzündlich bedingte Urethrastrikturen als mögliche Ursachen einer eingeschränkten Fertilität durch Störungen der Samendeposition. Während einer Urethritis ist die vordere Harnröhre mit Erregern und Entzündungszellen angesiedelt (Weidner et al. 1999), was eine Ejakulatanalyse zur Diagnostik von Fertilitätsproblemen unmöglich macht.

1.2.2.2 Prostatitis

Der Begriff des Prostatitissyndroms umfaßt eine Vielzahl entzündlicher und nichtentzündlicher Krankheiten der Prostata. Historisch wurde das Prostatitissyndrom in die von Drach et al. (1978) festgelegte akute bakterielle, die chronische bakterielle und die abakterielle Prostatitis sowie die Prostatodynie unterteilt. Aufgrund der klinisch schwierigen Unterscheidung zwischen abakterieller Prostatitis und Prostatodynie bzw. der Tatsache, daß Patienten mit Prostatodynie alle Symptome eines chronischen Schmerzsyndromes aufweisen, wurde eine neue Prostatitis-Klassifikation eingeführt. Diese wurde vom „National Institute of Health“ (NIH) der USA propagiert und verdrängte die alte Nomenklatur (Nickel 1998). Nach der neuen NIH-Klassifikation (1999) teilt man das Prostatitissyndrom in vier Kategorien ein:

- NIH I: Akute bakterielle Prostatitis (akute Infektion der Prostata)
- NIH II: Chronische bakterielle Prostatitis (rezidivierende Infektionen der Prostata)
- NIH III: Chronische abakterielle Prostatitis/„Chronic-Pelvic-Pain-Syndrome“ (CPPS)(keine nachweisbare Infektion)
- NIH III A: Entzündliches CPPS (Leukozyten im Ejakulat, Prostatasekret oder Exprimaturin)
- NIH III B: Nichtentzündliches CPPS (Keine Leukozyten im Ejakulat, Prostatasekret oder Exprimaturin)
- NIH IV: Asymptomatische entzündliche Prostatitis (keine Beschwerden, entdeckt bei Prostatabiopsie oder durch Nachweis von Leukozyten im Prostatasekret oder Ejakulat)

Die akute, bakterielle Prostatitis (NIH I) imponiert durch ihre klinischen Symptome und wird von den typischen Erregern der Harnwegsinfektionen (E. coli, Streptococcus faecalis, Proteus species, etc.) verursacht (Weidner et al. 1991). Bei inkonsequenter Therapie ist ein Übergang in eine chronische Verlaufsform möglich.

Die chronische, bakterielle Prostatitis (NIH II) wird neben den bekannten spezifischen Entzündungsformen der Urogenitaltuberkulose vor allem durch die gram-negativen Enterobakterien, aber auch von gram-positiven Enterokokken hervorgerufen. Es gibt unterschiedliche Beurteilungen dieser Entzündungsformen und deren Einfluß auf die Ejakulatparameter. Eine tuberkulöse Prostatitis soll bei den Betroffenen in 75 % zu einer Oligo-Asthenozoospermie führen (Jimenez-Cruz et al. 1979).

Weidner et al. (1991) konnten in einer klinischen Studie im Vergleich aller Prostatitisformen mit einer Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen von Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie feststellen. Die folgende Tabelle (Tab. 2) soll die kon-

troversen Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich der Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie vergleichend gegenüberstellen.

Tabelle 2: Einfluß von „chronischer Prostatitis“ auf Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie im Vergleich zur korrekten Diagnosestellung (nach Weidner et al. 1999 und Ludwig et al. 2001)

Studie	Negativer Einfluß auf Dichte	Negativer Einfluß auf Motilität	Negativer Einfluß auf Morphologie	Prostatitis aufgrund von Leukozyten-nachweis im Prostatasekret	Kommentar (korrekte Prostatitis-diagnose?)
Caldamone et al. (1980)	n.u.	+	n.u.	n.u.	nein
Giamarellou et al. (1984)	+	+	(+)	+	ja
Christiansen et al. (1991)	+	+	+	-	nein
Weidner et al. (1991)	-	-	-	+	ja
Leib et al. (1994)	-	+	+	-	nein
Krieger et al. (1996)	-	+	-	+	ja
Huaijin et al. (1998)	+	n.u.	n.u.	+	ja
Pasqualotto et al. (2000)	-	-	-	n.u.	ja

(+) negativer Einfluß, (-) kein Einfluß, (n.u.) nicht untersucht

Eine deutliche Verbesserung der Ejakulatparameter nach antibiotischer Therapie bei einer chronischen Prostatitis sowie bessere Schwangerschaftsraten konnten Giamarellou et al. (1984) verzeichnen. Dabei wurden im wesentlichen E. coli und Staphylokokken als Erreger isoliert. Baker et al. (1979) konnten eine Zunahme der Spermatozoenmotilität und nachfolgende Schwangerschaften nach antibiotischer Therapie bei chronischer Prostatitis aufzeigen, obwohl der Nachweis von pathogenen Mikroorganismen im Prostataexpressat in allen Fällen fehlte.

Die chronische, abakterielle Prostatitis (NIH III A) stellt eine weitere wichtige Prostatitisform dar. Hierbei sind Symptome und Entzündungszeichen nachweisbar, ein signifikanter Erregernachweis fehlt jedoch (Krause und Weidner 1983). Es lassen sich zuweilen bei diesen Entzündungen sexuell übertragbare Erreger (STD-Erreger) wie Ureaplasma urealyticum und Chlamydia trachomatis in signifikanter Erregerzahl als fragliche Ursache nachweisen (Weidner et al. 1980, Weidner et al. 1984, Weidner et al. 1988, Weidner et al. 1999). Die Bedeutung dieser chronischen Prostatitisformen auf die Ejakulatparameter ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Krause und Weidner (1983) und Weidner et al. (1985) konnten lediglich eine Leukozytenerhöhung in Ejakulaten von Patienten mit nachgewiesener Ureaplasmen assoziierter Prostatitis nachweisen, jedoch waren keine Veränderungen der Spermatozoendichte und -motilität zu verzeichnen (Comhaire et al. 1980,

Desai et al. 1980, Naessens et al. 1986). Diese Patienten wiesen ferner noch erniedrigte Fruktose- und Zinkkonzentrationen im Ejakulat als Zeichen der Organaffektion auf. Christiansen et al. (1991) und Leib et al. (1994) beobachteten bei Patienten mit abakterieller Prostatitis stark beeinträchtigte Ejakulatparameter (Motilitätsverminderung, erhöhte Anzahl abnormer Spermatozoen) gegenüber einem gesunden Kontrollkollektiv. Zusätzlich stellten Leib et al. (1994) fest, daß bei einer Prostatitisanamnese, die länger als 3 Jahre war, vermehrt morphologische Defekte der Spermatozoen und eine Verminderung der Motilitätsparameter auftraten. Es muß bei diesen Studien jedoch angemerkt werden, daß nicht die Einteilung der Prostatitis nach Drach et al. (1978) vorgenommen wurde, die den Nachweis eitrigen Prostatasekretes voraussetzt.

Im Gegensatz zu den entzündlichen Formen des Prostatitissyndroms ist das nichtentzündliche "chronic pelvic pain syndrome" (NIH III B), welches früher als Prostatodynie bezeichnet wurde, charakterisiert durch das Fehlen von Erregern und Entzündungszellen im Prostataexprimat, Exprimatharn und Ejakulat. Die Ätiologie dieses nichtentzündlichen Prostatitissyndroms ist unklar. Differentialdiagnostisch müssen Veränderungen im Enddarm (Anogenitalbereich) abgeklärt werden. Desweiteren werden auch psychoneurotische Krankheiten, funktionelle Blasenentleerungsstörungen und morphologisch-obstruktive Veränderungen am Blasen Hals (bulbäre Enge, Blasenhalssklerose) dafür verantwortlich gemacht (Weidner und Jantos 1991, Vidal und Ludwig 1999). Veränderungen von Ejakulatparametern werden kontrovers diskutiert. Weidner et al. (1991 und 1999) hatten keinerlei Unterschiede bezüglich der Spermatozoendichte, der Motilität und der Morphologie gegenüber gesunden Kontrollpersonen gefunden. Krieger et al. (1996) fanden keine Unterschiede zwischen der abakteriellen Prostatitis (NIH III A) und der Prostatodynie (NIH III B) bei den Entzündungsparametern im Seminalplasma und Prostatasekret bezüglich des Ejakulatvolumens, der Spermatozoendichte und -morphologie. Es konnte jedoch bei der abakteriellen Prostatitis eine Verminderung der Spermatozoenmotilität festgestellt werden. Pasqualotto et al. (2000) konnte ebenfalls keine Unterschiede bei der Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie bei 36 Patienten mit chronischer Prostatitis (NIH III A), 8 Patienten mit Prostatodynie (NIH III B) und 19 Kontrollen feststellen.

1.2.2.3 Epididymitis

Die akute, infektiöse Epididymitis ist eine schmerzhafte Entzündung des Nebenhodens, die ein- oder beiderseits ausgebildet sein kann und mit einer starken Schwellung des Nebenhodens einhergeht. Bei Männern im jungen Erwachsenenalter sind meistens *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis* als Erreger nachweisbar. In diesen

Fällen ist eine ascendierende Urethritis die Ursache für die Epididymitis. Bei älteren Männern und bei Patienten mit Harnabflußstörungen sind die typischen Harnwegsinfektionskeime, wie z. B. E. coli, Pseudomonas aeruginosa und Streptococcus faecalis, am häufigsten (Weidner et al. 1990). Besonders bei Infektionen mit E. coli ist ein Übergreifen der Entzündung auf den Hoden, sog. Epididymo-Orchitis, mit anschließender Abszedierung beschrieben. Die Diagnosefindung ergibt sich aus der klinischen Symptomatik und einer ausführlichen Infektionsdiagnostik (Tabelle 3). Ein direkter Erregernachweis durch eine Ejakulatanalyse ist aufgrund der Schmerzsymptomatik bei der Ejakulation nicht praktikabel (Weidner 1998).

Tabelle 3: Infektionsdiagnostik bei akuter Epididymitis, Vorgehen der Gießener Arbeitsgruppe (modifiziert nach Weidner 1998)

Akute Epididymitis Mit Ausfluß/Urethritisanamnese	Akute Epididymitis Ohne Ausfluß/Prädisposition Blasenentleerungsstörung	Chronische Epididymitis
1. Urin: Bakterien, Sediment, LCR, PCR für Chlamydia trachomatis	Mittelstrahlurin: Sediment, Bakterien	Mittelstrahlurin: Sediment, Bakterien
Urethralabstrich: Neisseria gonorrhoeae Chlamydia trachomatis Gram Färbung Leukozytenzählung	bei steriler Urinkultur Prostatitisdiagnostik	Tuberkulosedagnostik Ejakulatanalyse (Entzündungsparameter)

Die Folgen einer akuten Epididymitis auf die Fertilität können vielfältig sein. Die klinisch gravierendste andrologische Folge ist das Auftreten einer Verschlussazoospermie nach bilateraler Epididymitis, die häufiger bei gonorrhöischer und tuberkulöser Epididymitis vorkommen kann (Weidner 1998). Therapie der Wahl hierbei ist dann in der Folge eine mikrochirurgische Epididymovasostomie. Die Ejakulatqualität kann jedoch auch durch einen einseitigen Verschluss des Samenleiters vermindert sein, ebenso die Ausreifung der Spermatozoen im Nebenhoden. In vielen Fällen kann auch eine Abnahme der Spermatozoenzahl und Vorwärtsmotilität der Spermatozoen beobachtet werden (Weidner et al. 1999). Bekannt sind auch Spermatogenesestörungen nach Übergreifen der Infektion auf den Hoden (sog. Begleitorchitis) (Weidner 1998, Diemer et al. 2000 c). Die häufigste Ver-

änderung ist das Auftreten eines reversiblen Oligoasthenoteratozoospermie-Syndroms. Ferner besteht die Möglichkeit der Ausbildung einer chronischen Epididymitis, die als Narbe oder Restinfiltrat imponiert und eine Erregerpersistenz ermöglicht (Berger et al. 1984). Weiterhin wird die Entstehung von Spermatozoenantikörpern diskutiert, die vermutlich durch Schädigung der Blut-Hodenschranke aufgrund von genitalen Infektionen oder Obstruktion der ableitenden Samenwege gebildet werden und als weiterer Infertilitätsmechanismus dienen könnten (siehe auch Kapitel 1.2.4.3 Spermatozoenantikörper (SPAK), Diemer et al. 2000 c).

1.2.2.4 Orchitis

Die Orchitis ist eine entzündliche Läsion des Hodens, die meistens mit einer Leukozyteninfiltration innerhalb und außerhalb der Tubuli seminiferi einhergeht und oftmals in der Folge mit einer fokalen tubulären Sklerose und testikulären Atrophie vergesellschaftet ist (Weidner und Krause 1999). Eine isolierte Entzündung des Hodens, die Orchitis, ist selten. Meistens tritt sie mit einer Epididymitis zusammen als sogenannte Epididymorchitis auf (siehe auch Kapitel 1.2.2.3 Epididymitis). Die Orchitis wird nach ihrer Ätiologie klassifiziert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Klassifikation der Orchitis (modifiziert nach Weidner et al. 1999)

Unspezifische	Spezifische	virale
Akute bakterielle Epididymorchitis <ul style="list-style-type: none"> - Neisseria gonorrhoeae - Chlamydia trachomatis - E. coli (und andere Enterobakterien) 	Spezifisch-granulomatöse Orchitis <ul style="list-style-type: none"> - Tuberkulose - Syphillis - Brucellose 	Mumps-Orchitis <ul style="list-style-type: none"> - Coxsackie-B-Virus
Unspezifisch-chronische Epididymorchitis		
Granulomatös-idiopathische Orchitis <ul style="list-style-type: none"> - Pneumokokken - Salmonellen - Klebsiellen - Haemophilus influenzae 		

Klinisch imponiert die akute Orchitis durch eine schmerzhafte Schwellung des Hodens. Bezüglich der Ejakulatqualität zeigt sich, insbesondere bei der akuten Epididymo-Orchitis ein Rückgang der Spermatozoenzahl und eine Verminderung der Spermatozoen-Vorwärtsbeweglichkeit (Weidner et al. 1999). Eine seltene Komplikation ist ein kompletter Verschluss des Rete testis, welches zu einer akuten obstruktiven Azoospermie führt. Die Folgen einer jeden Orchitis, insbesondere einer bilateralen Mumps-Orchitis kann eine Hodenatrophie mit testikulärer Azoospermie sein. Bei jeder Orchitis können Spermatozoenautoantikörper nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 1.2.4.3 Spermatozoenantikörper).

1.2.2.5 Asymptomatische Bakteriospermie

Die Rolle der asymptomatischen Bakteriospermie wird bis heute kontrovers diskutiert (Dahlberg 1976, Toth und Lesser 1981). Definitionsgemäß handelt es sich bei der asymptomatischen Bakteriospermie nicht um eine klassische Infektion mit klinischer Symptomatik und Entzündungszeichen, sondern um eine bakterielle Besiedelung des Ejakulates mit den typischen gramnegativen Harnwegsinfektionserregern in einer signifikanten Keimzahl, d.h. $\geq 10^3$ Keime/ml (WHO 1993).

Diese Art von Keimbesiedelung des Ejakulates ist verantwortlich für den unbemerkten Keimtransport in den weiblichen Genitaltrakt mit nachfolgender Infektion und gegebenen-

falls tubarer Sterilität als Folge. Von einigen Autoren wird dieser Mechanismus als einzig entscheidend für die Infertilität eines Paares angesehen und ist zumindest für *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen (Eggert-Kruse et al. 1987). Die WHO (1993) beschreibt, daß eine primäre oder sekundäre Infertilität bei der Frau häufig die Folge von sexuell übertragenen Infektionen oder anderen Infektionen im Bereich der Beckenorgane ist. Dabei besteht in fast 60 % der Fälle eine Infektionsanamnese bei beiden Partnern. Bei zirka zwei Dritteln der betroffenen Frauen liegt eine asymptomatische Chlamydieninfektion zugrunde. Eine weitere wichtige Frage ist die Bedeutung der asymptomatischen Bakteriospermie für die assistierten Reproduktionstechniken (artifizielle Insemination, In vitro-Fertilisation), die aufgrund der in vitro Technik besonders anfällig für bakterielle Kontaminationen sind.

1.2.3 Erreger der männlichen Uroadnexitis

Wie schon beschrieben, können verschiedene Erreger Entzündungen der männlichen Adnexe hervorrufen und einen negativen Einfluß auf die Ejakulatparameter haben. Des Weiteren sind auch verschiedene direkte Beeinflussungsmechanismen auf Spermatozoen beschrieben worden (Caldamone und Cockett 1978). Diesbezüglich die am häufigsten in der Vergangenheit untersuchten Erreger in vivo und in vitro sind *E. coli*, *Ureaplasma urealyticum* und *Chlamydia trachomatis*. Über andere wichtige urogenitale Erreger gibt es kaum experimentelle Untersuchungen, insbesondere solche die sich mit dem Einfluß auf die Motilitätsparameter beschäftigen.

Escherichia coli gilt als die häufigste Ursache von Urogenitalinfektionen, die in 85 % für die allgemein erworbenen Infektionen und in ca. 50 % für die nosokomialen erworbenen Infektionen verantwortlich sind. *Proteus* Spezies, Klebsiellen, *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus saprophyticus* sind ursächlich bei den meisten allgemein erworbenen Urogenitalinfektionen, wohingegen als sogenannte Hospitalerreger der Urogenitalinfektionen Enterokokken, Klebsiellen, *Citrobacter* Spezies, *Serratia*, *Pseudomonas* Spezies und *Providencia* Spezies zu nennen sind. Es gibt Unterschiede im Vorkommen der einzelnen Erreger bezüglich der verschiedenen Altersgruppen, so ist zum Beispiel *Staphylococcus saprophyticus* häufig bei jungen Frauen zu finden (Carson et al. 1982, Schaeffer 1998). Die meisten Anaerobier gehören zu der normalen Standortflora der distalen Urethra und Vagina und sind nur in seltenen Fällen Verursacher einer symptomatischen Cystitis (Schaeffer 1998).

Die folgende Übersichtstabelle soll die wichtigsten männlichen urogenitalen Infektionen und Erreger darstellen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Nach H. G. Schiefer (1998): Erreger, die eine männliche Urethroadnexitis verursachen

	Unspezifische Erreger	Spezifisch Erreger	Sexuell übertragene Erreger
Balanitis	Staphylococcus spp Streptococci Gruppe A,D Enterobakterien		Streptococcus Gruppe B Gardnerella vaginalis Herpes simplex Virus II Candida spp Trichomonas vaginalis
Urethritis	Enterobakterien Streptococcus spp Staphylococcus spp Anaerobier		Neisseria gonorrhoeae Gardnerella vaginalis Chlamydia trachomatis Ureaplasma urealyticum Herpes simplex Virus II Trichomonas vaginalis
Akute Prostatitis, Prostataabszeß	Escherichia coli Pseudomonas spp Staphylococcus spp Anaerobier	Mycobacterium tuberculosis	Neisseria gonorrhoeae Candida spp
Chronische Prostatitis	Escherichia coli Pseudomonas spp Enterobakterien Streptococcus Gruppe D Staphylococcus spp	Mycobacterium tuberculosis	Ureaplasma urealyticum Chlamydia trachomatis Neisseria gonorrhoeae Candida spp Trichomonal vaginalis
Epididymitis	Escherichia coli Pseudomonas spp	Mycobacterium tuberculosis	Neisseria gonorrhoeae Chlamydia trachomatis
Orchitis	Escherichia coli Pseudomonas spp Brucella spp Coxiella burnetii Mumps Virus	Mycobacterium tuberculosis	Treponema pallidum

1.2.4 Pathomechanismen der Infertilität

1.2.4.1 Verschuß der Samenwege

Eine Verschußazoospermie infolge einer Obstruktion des Ductus ejaculatorius liegt in ca. 5% der Infertilitätsfälle vor (Schroeder-Printzen et al. 2000). Die infektiös bedingte Verschußazoospermie kommt nach beiderseitiger Epididymitis vor. Derartige Krankheitsverläufe sind häufiger nach gonorrhöischer und tuberkulöser Nebenhodenentzündung zu beobachten. Weitere Ursachen einer obstruktiven Azoospermie können kongenitale Aplasien oder partielle Aplasie von Nebenhoden und Samenleiter sein sowie iatrogen durch operative Maßnahmen. Ein zentraler Samenwegsverschuß ist selten (Schroeder-

Printzen und Weidner 1998). In der Ejakulatanalyse findet sich dann neben der Azoospermie ein geringes Ejakulatvolumen und eine verminderte oder fehlende Fruktosekonzentration (Schroeder-Printzen et al. 1998 und 2000). Die häufigste infektiöse Ursache ist ein entzündungsbedingter Verschuß des Ductus ejaculatorius (Schroeder-Printzen et al. 2000). Zur Prophylaxe einer entzündlich bedingten Verschußazoospermie ist die initiale Antibiotikatherapie bei akuter Epididymitis unabdingbar. Weidner et al. (1999) beschreiben, daß bei der initialen 14-tägigen Therapie mit Ofloxacin bei akuter Epididymitis kaum eine Azoospermie in der Folge auftritt. Desweiteren sollte bei einer Epididymitis mit dem Verdacht oder Nachweis eines sexuell übertragbaren Erregers, z.B. *Neisseria gonorrhoeae* oder *Chlamydia trachomatis*, dringend die Mitbehandlung des Sexualpartners angestrebt werden (Weidner et al. 1999).

1.2.4.2 Sekretorische Dysfunktion

Eliasson et al. (1968) beschrieben erstmals Ende der 60er Jahre, daß nach einer urogenitalen Infektion eine sekretorische Dysfunktion des Seminalplasmas resultieren könnte. Zahlreiche Autoren beschrieben die Verminderung der Zitronensäure, Phosphatase, Zink und Glutamytransferase-Aktivität als Zeichen einer herabgesetzten sekretorischen Prostatafunktion (Weidner et al. 1985, Cooper et al. 1990, Wolff et al. 1991, Purvis und Christiansen 1995, Depuydt et al. 1996). Eine reduzierte Fruktose-Konzentration gilt als Indikator für eine gestörte Samenbläschenfunktion (Comhaire et al. 1980, Weidner et al. 1985). Desweiteren ist bei einer Epididymitis unter anderem die Alpha-Glucosidase herabgesetzt (Cooper et al. 1990). Welchen Einfluß diese verschiedenen Sekretionsparameter in Bezug auf die Fertilität haben ist bislang nicht geklärt und ihre Relevanz diesbezüglich fraglich. Studien zur Untersuchung dieser Sekretionsparameter verglichen mit Entzündungsparametern insbesondere bei Prostatitispatienten liegen bislang nicht vor (Weidner et al. 1999).

1.2.4.3 Spermatozoenantikörper (SPAK)

Autoantikörper können im Serum und Seminalplasma von Patienten mit und ohne urogenitaler Infektion nachgewiesen werden. Der Nachweis von Spermatozoenautoantikörpern erfolgt mittels gemischtem Antiglobulin-Test, sog. MAR-Test oder Immunobeadtest (WHO 1999). Bilden sich beim MAR-Test Mischagglutinine aus Partikeln (beschichtet mit humanem IgG oder IgA) und motilen Spermatozoen, beweist dies, daß auf den Spermatozoen IgG- oder IgA-Antikörper vorhanden sind (WHO 1999). Dabei spielen nach allgemeiner Überzeugung Spermatozoenantikörper im Serum keine Rolle (Eggert-Kruse et al. 1998). Autoantikörper gegen Spermatozoen im Seminalplasma (aus dem Englischen

„Anti-Sperm-Antibodies“) beim Mann entstehen spontan nach Läsion der Blut-Hoden-Schranke, die durch Vasektomie, Traumen des Hodens, Nebenhodens oder Ductus deferens entstehen kann (Krause 1998, Weidner et al. 1999). Bezüglich der urogenitalen Infektionen haben neuere Untersuchungen den Hinweis erbracht, daß es keine Korrelation zwischen symptomatischer bzw. asymptomatischer männlicher Adnexinfektion und dem Vorhandensein von Spermatozoenantikörpern (IgG und IgA) im Seminalplasma gibt (Eggert-Kruse et al. 1998). Es konnten ferner keine Beziehungen zwischen Leukozytospemie, Granulozytenelastase oder mikrobiologischem Erregernachweis gefunden werden (Eggert-Kruse et al. 1998).

Bei ca. 20 % der männlichen Adnexinfektionen tritt ein positiver MAR-Test auf (Hinting et al. 1996). Allgemein anerkannt ist, daß nur Antikörper, die an Oberflächenantigene von vitalen Spermatozoen binden, klinisch relevant sind (Weidner et al. 1999). Eine endgültige Bewertung der Relevanz steht aus.

1.2.4.4 Leukozytospemie

Die klinische Bedeutung erhöhter Leukozytenzahlen im Ejakulat als Ursache einer männlichen Subfertilität wird kontrovers diskutiert (Aitken und Baker 1995). Es scheint jedoch akzeptiert, daß für das Vorliegen einer urogenitalen Infektion der Nachweis von erhöhten Leukozytenzahlen im Ejakulat typisch ist (Caldamone et al. 1980, Comhaire et al. 1980, Weidner et al. 1985, Gonzales et al. 1989, Weidner et al. 1991, Krieger et al. 1996). Eine Leukozytospemie liegt nach WHO (1999) bei einer Leukozytenzahl von mehr als 1×10^6 peroxidase-positiver Leukozyten/ml im Ejakulat vor. In der Vergangenheit sind erhöhte Leukozytenzahlen immer wieder in Zusammenhang mit anderen pathologischen Ejakulatparametern gebracht worden (Gonzales et al. 1989, Wolff et al. 1990, Kortebani 1992). Van der Ven et al. (1988) und Hill et al. (1987 und 1989) beschrieben in in vitro-Versuchen eine verminderte Fertilisierungskapazität unterschiedlicher Ursache. Es scheinen bislang immer noch ungeklärte Mechanismen auf die Spermatozoen einzuwirken: Zum einen die Leukozyten selber (Wolff et al. 1990) und zum anderen auch ihre Sekretionsprodukte, wie z. B. Lymphokine, Monokine und die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die mit einer Störung der Spermatozoen-Oozyten-Fusion einhergeht (Aitken et al. 1995). Trotz dieser theoretischen Implikationen konnte eine prospektive Studie von Tomlinson et al. (1993) an 512 sterilen Paaren einer Leukozytospemie keine entscheidende Bedeutung für die Konzeptionsrate beimessen. Über eine große Spannbreite der Leukozytenzahlen im Ejakulat nachweislich fertiler Männer berichten el Demiry et al. (1986 b) und Harrison (1991). Diese Männer zeigten keinerlei Zeichen einer urogenitalen Infektion, und es wurde bei den Untersuchungen keine

Korrelation zwischen veränderten Ejakulatparametern und erhöhten Leukozytenzahlen gefunden. Barratt et al. (1988 und 1991) beschrieben als Hauptursache für die widersprüchlichen Daten die ungenaue Bestimmung der Leukozytenzahlen durch das Fehlen einer einfachen Methode. Das Problem bei der Identifikation der Leukozyten liegt in der Unterscheidung zwischen Granulozyten einerseits gegenüber den regelmäßig im Ejakulat vorhandenen Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und Spermiogenesenzellen andererseits. Sowohl die von der WHO empfohlene Peroxidase-Methode (Riedel 1980, Comhaire et al. 1980, Barratt et al. 1989) als auch ältere Färbetechniken (Papanicolaou, Byran, Leishmann) können diese Zellen nicht eindeutig unterscheiden. Auch mittels modernerer und aufwendigerer Techniken zur Leukozytenidentifikation, wie z. B. die immunhistochemische Markierung mit monoklonalen Antikörpern (Wolff und Anderson 1988 a, el Demiry et al. 1986 a), Elektronenmikroskopie (Smith et al. 1989) und Durchflußzytometrie (Otto et al. 1990, Diemer et al. 1994) konnte bisher kein Zusammenhang zwischen bakterieller Besiedelung, Art der Infektion und Leukozytenzahl hergestellt werden. Aufgrund der vorgestellten Untersuchungen läßt sich abschließend feststellen, daß die Bedeutung der Leukozytospermie für die männliche Fertilität in dem genannten Zusammenhang bislang noch nicht ausreichend geklärt ist.

1.2.4.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies (aus dem Englischen „reactive oxygen species“ abgekürzt ROS) bezüglich der männlichen Adnexinfektionen ist nicht hinreichend geklärt. Man weiß bislang, daß ROS bei chronischen urogenitalen Infektionen erhöht und mit einer erhöhten Leukozytenzahl im Seminalplasma vergesellschaftet sind (Weidner et al. 1999). ROS sind hochreaktive Moleküle wie z.B. Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal oder das Hyperoxid-Anion. Diese können die Spermatozoenmembran schädigen und somit z.B. die Spermatozoenmotilität herabsetzen oder sogar den Zelltod des Spermatozoons hervorrufen. Es wird diskutiert, ob bei Infektionen der pathogene Erreger selbst eine erhöhte Menge von ROS produziert oder die Entzündungszellen durch Verbrauch von Antioxidantien ROS in vermehrter Menge generieren (Ochsendorf 1999). Potts et al. (2000) konnten erhöhte ROS-Mengen bei Patienten mit positiven Ureaplasma urealyticum-Ejakulatkulturen feststellen. ROS induziert die Lipidoxidation, welche die Membranfluidität und die Fertilisierungskapazität der Spermatozoen herabsetzt, und könnte einen möglichen Pathomechanismus darstellen, mit dem Ureaplasmen die Spermatozoenfunktion verringern. Anzumerken ist noch, daß eine fehlende Leukozytospermie eine Ureaplasma urealyticum Besiedelung bzw. Infektion ausschließt (Potts et al. 2000). Desweiteren fanden Pasqualotto et al. (2000) heraus, daß beim chronischen

Beckenschmerzsyndrom (NIH III A und B) ein „oxidativer Streß“ unabhängig von begleitender Leukozytospemie im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv vorliegt.

1.2.4.6 Entzündliche Spermatogenesestörungen

Spermatogenesestörungen führen ursächlich zu einer herabgesetzten Spermatozoenzahl, einer verminderten Spermatozoenmotilität und einem erhöhten Anteil abnormaler Spermatozoen. Diese Befundkonstellation bezeichnet man als Oligo-Asthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom). Spermatogenesestörungen generell verursachen per se keine klinischen Symptome, jedoch werden diese Patienten meist durch einen unerfüllten Kinderwunsch auffällig. Wichtigste Ursache für eine Spermatogenesestörung ist eine Infektion der männlichen Adnexe und hierbei am häufigsten die akute Orchitis. Diese liegt meistens kombiniert mit einer Epididymorchitis vor (siehe Kapitel 1.2.2.4 Orchitis). Bei jungen Männern unter 35 Jahren sind häufig sexuell übertragbare Erreger verantwortlich, bei älteren Männern häufig Blasenentleerungsstörungen auf der Basis einer benignen Prostatahyperplasie oder instrumenteller Eingriffe. Desweiteren können aber auch urogenitale Malformationen oder virale Infektion (Mumps-Orchitis durch Coxsackie-B-Virus) eine entzündliche Orchitis verursachen. Bei der akuten Epididymorchitis kann häufig eine verminderte Spermatozoendichte und Verminderung der Spermatozoenvorwärtsbeweglichkeit beobachtet werden. Eine akute Azoospermie auf der Basis einer kompletten Obstruktion des Rete testis ist eine seltene Komplikation (Weidner und Krause 1999). Bei einer Mumps-Orchitis kann eine bilaterale Hodenatrophie die Folge sein und zur testikulären Azoospermie führen (Weidner und Krause 1999). Die Angaben über die irreversible Infertilität nach uni- bzw. bilateraler Mumpsorchitis schwanken in der Literatur zwischen 12 % und 61 % (Scholz et al. 1996). Noch immer führen unter dem herkömmlichen Therapie-regime der Mumpsorchitis (rein symptomatisch und Antibiotikaphylaxe zur Vermeidung von Superinfektionen) 50 % zu einer Hodenatrophie, in 6 % der Fälle liegt das Hodenvolumen unter der dritten Standardabweichung (Scholz et al. 1996). Die Zerstörung der Hodentubuli führt zu einer Verschlechterung der Samenqualität. Die Sterilität nach einseitiger Orchitis wird durch einen inapperenten beiderseitigen Befall, durch Antikörperbildung, die den klinisch unauffälligen Hoden mitschädigen, oder einen vorgeschädigten kontralateralen Hoden erklärt (Scholz et al. 1996).

Wie schon oben dargestellt können entzündliche Spermatogenesestörungen konsekutiv die Ejakulatqualität verändern. Dieses wirkt sich auf die drei wichtigen Ejakulatparameter Spermatozoendichte, -morphologie, und -motilität aus, die im Folgenden näher beschrieben werden.

1.2.4.6.1 Beeinflussung der Spermatozoendichte

Bei jeder männlichen Adnexinfektionen kann es durch eine Begleitorchitis zu einer deutlichen Reduktion der Spermatozoendichte kommen. Es wird häufig über eine vorübergehende Verminderung der Spermatozoenzahl bei der akuten Epididymo-Orchitis berichtet (Weidner et al. 1999). Ob eine Abnahme der Spermatozoenzahl bei der chronischen Prostatitis stattfindet, wird kontrovers beschrieben (Weidner et al. 1999). Über einen negativen Einfluß auf die Spermatozoenzahl bei der chronischen Prostatitis berichten Giamarellou et al. (1984), Christiansen et al. (1991) und Huaijin et al. (1998). Demgegenüber konnten Weidner et al. (1991), Leib et al. (1994), Krieger et al. (1996) und Pasqualotto et al. (2000) keinen Einfluß auf die Spermatozoendichte bei chronischer Prostatitis beobachten.

1.2.4.6.2 Beeinflussung der Spermatozoenmorphologie

Die Bedeutung der Morphologie für die Fertilität des Mannes ist unklar. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen hohen Prozentsätzen pathologisch geformter Spermatozoen und erniedrigten Schwangerschaftsraten, jedoch keine Korrelation zu Aborten oder pathologischen Schwangerschaften (Ludwig und Frick 1987). Von einer sogenannten Teratozoospermie spricht man, wenn weniger als 30% der Spermatozoen normal geformt sind (WHO 1992). In dem neuen WHO Laborhandbuch von 1999 wird der Normwert für die Morphologie offen gelassen. Die Beurteilung der Spermatozoen erfolgt nach den „strict criteria“ (Kruger et al. 1986, Menkveld et al. 1990), wobei der Spermatozoenkopf im Mittelpunkt steht. Nach den strikten Kriterien zeichnet sich ein normales Spermatozoon durch einen ovalen Kopf, eine klar abgrenzbare akrosomale Kappe, welche 40-70% des gesamten Kopfes ausmacht, sowie fehlende Hals-, Mittelstück- und Schwanzdefekte aus. In der Routineanalyse ist es unnötig, zwischen den verschiedenen Form- und Größenvarianten des Spermienkopfes und den verschiedenen Arten von Schwanzdefekten zu unterscheiden (WHO 1999).

Bei der morphologischen Beurteilung nach den „strikten Kriterien“ ist der Normwert bei 15% normal geformte Spermatozoen angesetzt (Menkveld 1995). Es zeigte sich, daß die Fertilisierungsrate pro Eizelle in vitro bei < 15% normal geformter Spermatozoen deutlich herabgesetzt war gegenüber denen \geq 15% (Menkveld et al. 1990). Die klinische Beurteilung ist immer noch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Deshalb wurde aufgrund der noch andauernden multizentrischen Studien und der zur Zeit noch in der Untersuchungsphase befindlichen strengen Morphologie-Analyse auf eine konkrete Angabe der Normwertgrenze verzichtet (WHO 1999). Menkveld et al. (1999) und Huwe et al. (1999) konnten aufzeigen, daß es zwischen den verschiedenen Lokalisationen der männlichen

Adnexinfektionen (Chronisches Beckenschmerzsyndrom NIH III A und B und Epididymitis) keine Unterschiede nach den strikten Kriterien gab. Desweiteren konnten innerhalb der drei Krankheitsgruppen in der speziellen morphologischen Analyse bezüglich der elongierten Spermatozoen, dem Teratozoospermieindex und dem Akrosomindex keine Unterschiede gefunden werden. Eine signifikante Erhöhung der elongierten Spermatozoen konnte bei Patienten mit Epididymitis gegenüber den Patienten mit Prostatodynie (NIH III B) beobachtet werden (Menkveld et al. 2003). Verglichen mit einem gesunden Kontrollkollektiv schien ein signifikanter negativer Effekt auf die spezielle Morphologie bei den untersuchten urogenitalen Entzündungen vorzuliegen (Huwe et al. 2000 a). Dabei zeigte sich eine signifikante Verminderung des Akrosomindex bei den Patientenkollektiven mit einem chronischen Beckenschmerzsyndrom NIH III A und NIH III B gegenüber dem Kontrollkollektiv, und der prozentuale Anteil der elongierten Spermatozoen war bei den Patienten mit chronischer Prostatitis (NIH III A) gegenüber der Kontrolle erhöht (Huwe et al. 2000 a). Bei Patienten mit Epididymitis waren ebenfalls die elongierten Spermatozoen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Menkveld et al. 2003).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Diemer et al. (2000 b) die ultrastrukturellen Schädigungen der Spermatozoen durch E. coli nachweisen, die im gesamten Bereich des Spermatozoons, insbesondere im Bereich des Akrosoms (91,6%), des Hals- und Mittelstück (83,3%) und der Schwanzregion (58,3%) zu finden waren. Insbesondere die Schädigung des Akrosoms bei Samenwegsinfektionen mit E. coli war eine wichtige Beobachtung, da hierdurch eine herabgesetzte Fertilisierungsrate erklärt werden könnte (Diemer et al. 2000 b).

1.2.4.6.3 Beeinflussung der Spermatozoenmotilität

Man unterteilt nach WHO (1992 und 1999) die Spermienmotilität in 4 Kategorien:

- a) Schnelle progressive Beweglichkeit
- b) Langsame oder träge progressive Beweglichkeit
- c) Nicht progressive Beweglichkeit und
- d) Immotilität.

Hierbei sind die progressiv motilen Spermatozoen (Kategorie a und b) von besonderem Interesse und ihre Zahl sollte mindestens 50% betragen, oder mindestens 25% davon sollten von schnell progressiver Beweglichkeit (Kategorie a) sein.

Findet man eine verminderte Beweglichkeit der Spermatozoen, die sogenannte Asthenozoospermie, so kann je nach prozentualem Anteil der immotilen Spermatozoen die Fertilität deutlich eingeschränkt sein. Im Folgenden eine Übersichtstabelle, die zusammenfassend die Erreger darstellt, für die in der Literatur bislang eine Motilitätsver-

minderung humaner Spermatozoen beschrieben wurde. Dabei wird nicht zwischen in vitro und in vivo Untersuchungen unterschieden.

Tabelle 6: Erregerbedingte Motilitätsverminderung (Literaturübersicht)

Erreger	Autoren
E. coli	Schirren et al. (1966) Buxton et al. (1954) Caldamone und Cockett (1978) Riley et al. (1956) Del Porto et al. (1975) Teague et al. (1971) Bisson et al. (1974) Diemer et al. (1996) Köhn et al. (1998)
Proteus sp.	Buxton et al. (1954) Caldamone und Cockett (1978)
Clostridien sp.	Buxton et al. (1954) Caldamone und Cockett (1978)
Trichomonas vaginalis	Dahlberg et al. (1976) Tuttle et al. (1977) Caldamone und Cockett (1978)
Candida albicans	Tuttle et al. (1977) Caldamone und Cockett (1978)
Mykoplasma hominis	Köhn et al. (1998)
Ureaplasmen	Hofstetter et al. (1978) Fowlkes et al. (1975) Caldamone und Cockett (1978) Chang et al. (1984)
Chlamydien (Chlamydia trachomatis)	Dequelon et al. Mardh et al. (1978) Hansen und Mardh (1984)
Streptokokken sp.	Buxton et al. (1954)
Enterokokken	Bisson und Czyglick (1974)
Staph. aureus	Buxton et al. (1954)
Streptococcus viridans	Buxton et al. (1954) Caldamone und Cockett (1978)
Hämolyisierende Streptokokken	Riley et al. (1956) Caldamone und Cockett (1978)

1.2.4.7 Direkte Erreger-Spermatozoen-Interaktion

Als ein weiterer möglicher Pathomechanismus der männlichen Subfertilität bei Adnexeinfektionen wird die direkte Interaktion der Erreger mit dem Spermatozoon angesehen (Diemer et al. 1996, Huwe et al. 1998). Diese Interaktionen sind in der Vergangenheit meistens nur in vitro beobachtet worden und ihre Relevanz in vivo ist noch immer fraglich (Köhn et al. 1998). Im folgenden sollen nun die wichtigsten Erreger und ihr Einfluß auf die Spermatozoen unter besonderer Berücksichtigung der Spermatozoenmotilität, soweit bisher bekannt, kurz dargestellt werden.

1.2.4.7.1 Escherichia coli (E. coli)

Erstmals wurde ein motilitätshemmender Einfluß von *E. coli* auf humane Spermatozoen in vitro von Schirren und Zander (1966) beschrieben. Hierbei wurden hohe Konzentrationen von 10^8 Keime/ml verwendet. Ebenfalls beschrieben Teague et al. (1971) eine Motilitätsverminderung in vitro und beobachteten zusätzlich noch eine Spermatozoenagglutination. Schon Ende der 70er Jahre konnten Paulson und Polakoski (1977 a) einen sogenannten „Spermatozoen immobilisierenden Faktor“, ein hitzestabiles Toxin aus *E. coli*-Filtraten, isolieren. Durch Membranfiltration wurde dieser hitze- und kältestabile Faktor separiert und hatte die gleichen Eigenschaften wie die original *E. coli*-Suspensionen. Dieser sogenannte SIF (Spermatozoa inhibitory factor) sollte die Motilitätsminderung durch *E. coli* erklären. Diemer et al. (1996) konnten einen solchen Faktor oder Endotoxin in *E. coli*-Filtraten (Serotyp O6) nicht nachweisen. Teague et al. (1971) konnten ebenfalls keinen Einfluß eines *E. coli* Endotoxins auf die Spermatozoenmotilität feststellen. Dies kann möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Serotypen erklärt werden.

Die Wirkung von *E. coli* auf die Spermatozoenmotilität wurde in der Folge immer wieder kontrovers diskutiert. Von einigen Autoren wurde der motilitätshemmende Effekt von *E. coli* bestätigt (Paulson und Polakoski 1977 a, del Porto et al. 1975, Auroux et al. 1991, Wolff et al. 1993, Diemer et al. 1996) oder in Frage gestellt (Appell und Evans 1978, Makler et al. 1981). Diemer et al. (1996) konnten erstmals in in vitro-Versuchen ein genaues Bakterien/Spermatozoenverhältnis angeben, bei dem eine Immobilisation der Spermatozoen stattfand. Bei einem Spermatozoen/Bakterienverhältnis von 1:1 immobilisierte *E. coli* (Serotyp O6) die Spermatozoen. Wolff et al. (1993) fanden heraus, daß das Agglutinationsphänomen durch Mannose-bindende Strukturen induziert wird. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Diemer et al. als weitere Ursache der Immobilisierung neben der Adhäsion und Agglutination ultrastrukturelle Schädigungen des Spermatozoons, insbesondere die Ablösung des Akrosoms und Schwellung des Mittelstückes mit anschließender Invagination der Geißel, nachweisen (Diemer et al. 1996

und 2000 b). Ferner konnten mittels Negativ-Kontrast-Technik auch Pili an den Bakterien nachgewiesen werden, die vermutlich ursächlich für die Adhäsion und Agglutination der Bakterien und Spermatozoen auf der Basis von Mannose-bindenden Strukturen verantwortlich sind. Diese Adhäsions- und Agglutinationsphänomene von *E. coli* gewinnen an Bedeutung, wenn man sich diesen Pathomechanismus als Übertragungsweg in den weiblichen Genitaltrakt vorstellt: Sanchez et al. (1989) konnten zwei verschiedene Adhäsionsmechanismen mittels Fimbrienreaktionen (Typ 1 und Typ 2) elektronenmikroskopisch sichern, die nach Migration durch Cervikalschleim noch vorhanden waren und die morphologische Erklärung für die Verschleppung von Samenwegsinfektionen in den weiblichen Genitaltrakt sein könnten und dort Entzündungen verursachen, die gegebenenfalls eine Sterilität zur Folge haben können. Zusätzlich untersuchten andere Arbeitsgruppen mit verschiedenen Tests die Penetrationsfähigkeit von Spermatozoen im Cervikalschleim unter dem Einfluß von *E. coli* (Schmidt und Knöll 1987, Grillo et al. 1991). Hierbei konnte keine signifikante Verschlechterung der Penetrationsfähigkeit festgestellt werden. Die Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien wird durch die doch sehr unterschiedlichen Versuchsansätze sowie die Verwendung unterschiedlicher Serotypen erschwert.

1.2.4.7.2 Enterokokken (*Streptococcus faecalis*)

Enterokokken sind wichtige Erreger von Harnwegsinfektionen, Prostatitis und Epididymitis (Weidner et al. 1995). Schon Schirren und Zander untersuchten 1966 *in vitro* einen haemolysierenden Streptokokkenstamm und konnten keine Beeinflussung der Spermatozoenmotilität finden. Bisson und Czyglick (1974) hingegen konnten einen starken motilitätshemmenden Effekt von *Streptococcus faecalis* in einem *in vitro* Versuch beobachten. Makler et al. (1981) postulierten, daß *Streptococcus faecalis* in hohen Konzentrationen keinerlei Einfluß auf die Spermatozoenmotilität hat. Eine *in vivo* Studie von Jaques et al. (1990) stellte ebenfalls keinen motilitätshemmenden Effekt fest. Ausreichend standardisierte Versuchsreihen mit Enterokokken liegen jedoch nicht vor.

1.2.4.7.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Für *Pseudomonas aeruginosa* als relevantem Erreger der Prostatitis und Epididymitis wurde in der Vergangenheit kein motilitätshemmender Effekt auf die Spermatozoenmotilität beschrieben (Matthews und Buxton 1951, Buxton et al. 1954, Jaques et al. 1990).

1.2.4.7.4 Staphylococcus saprophyticus

In der Literatur gibt es bislang keine Berichte über den Einfluß von *Staphylococcus saprophyticus* auf die Spermatozoenmotilität. Diesem Erreger wird eine pathogene Bedeutung bei Einzelfällen mit bakterieller Prostatitis zugeschrieben (Carson et al. 1982, Nickel et al. 1992). Desweiteren ist er auch in bis zu 30 % für Harnwegsinfektionen bei jungen Frauen verantwortlich (Kayser et al. 1993).

1.2.4.7.5 β -hämolisierende Streptokokken der Gruppe B

β -hämolisierende Streptokokken der Gruppe B gehören zu einer fakultativen Standortflora in Ejakulat und Urin (Schieferstein et al. 1986), sie können jedoch auch bei der Balanitis sexuell übertragen werden (Schiefer et al. 1994) oder als Erreger einer Harnwegsinfektion (Kayser et al. 1993) auftreten. Über diesen Erreger gibt es in der Literatur nur in den 50er Jahren (Matthews und Buxton 1951, Buxton et al. 1954) Berichte über eine komplette Spermatozoenimmobilisation. Eine standardisierte in vitro Untersuchung der eventuellen Spermatozoen-Erreger-Interaktion liegt nicht vor.

1.2.4.7.6 *Ureaplasma urealyticum*

Seit Anfang der 70er Jahre beschäftigten sich Arbeitsgruppen mit der Wirkung von *Ureaplasma urealyticum* auf die Spermatozoenmotilität, nachdem eine fragliche Bedeutung bei der chronischen Prostatitis von Gnärpe und Friberg (1972) beschrieben wurde. Diese fanden erstmals in elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine Adhäsion von Ureaplasmen an Spermatozoen. Eine Reihe von klinischen (O'Leary und Frick 1975) und experimentellen (Hofstetter et al. 1978, Chang et al. 1984, Núñez-Calonge et al. 1998) Studien konnten eine Beeinflussung der Motilität humaner Spermatozoen oder deren Bewegungsparameter (Auroux 1989) darlegen. Verschiedene Autoren beschreiben morphologische Veränderungen der Spermatozoen bei Ureaplasmennachweis (Fowlkes et al. 1975, Xu et al. 1997, Núñez-Calonge et al. 1998). Insbesondere werden diese Veränderungen durch Adhäsionen an Kopf und Geißeln sowie eine spiralige Aufdrehung derselben erklärt. Grossgebauer et al. (1979) konnten ebenfalls elektronenmikroskopisch bei massiv Mykoplasmen-kontaminierten Nativejakulaten infertiler Männer spiralig geformte und am Halsabschnitt knotig aufgetriebene Spermatozoen nachweisen. Keine Veränderungen dieser Ejakulatparameter bei Ureaplasmennachweis fanden die Arbeitsgruppen um Desai et al. (1980), Cintron et al. (1981) und Hargreave et al. (1982). Bei einer erfolgreichen antibiotischen Therapie von Patienten mit positiver Ureaplasmenkultur, konnten Swenson et al. (1979) eine verbesserte Motilitätsrate

registrieren. Xu et al. (1997) wiesen eine Verminderung der Befruchtungsfähigkeit in vitro nach, da sie im Tiermodell eine dramatische Verminderung der Spermatogenese und ebenso morphologische Veränderungen in den Tubuli seminiferi feststellten.

1.2.4.7.7 Chlamydia trachomatis

Chlamydia trachomatis ist verantwortlich unter anderem für die nichtgonorrhöische Urethritis, die akute Epididymitis und spielt eventuell auch eine Rolle bei der abakteriellen Prostatitis. Für *Chlamydia trachomatis* ist ebenfalls ein motilitätsmindernder Effekt und die Adhäsion an Spermatozoen aufgezeigt worden (Mardh et al. 1978, Hansen und Mardh 1984). Eggert-Kruse et al. (1987 und 1990) sehen die Hauptbedeutung der Chlamydien-Besiedelung des Ejakulates in deren Verschleppung in den oberen weiblichen Genitaltrakt mit anschließender Adnexinfektion und späterer entzündlich bedingter tubarer Sterilität bzw. Erregerpersistenz. Ferner begünstigt eine subklinische Infektion mit *Chlamydia trachomatis* eine Immunreaktion auf Spermatozoen (Witkin et al. 1993). Eine ähnliche Immunantwort kann im weiblichen Genitaltrakt mit der Bildung von Spermatozoenantikörpern erfolgen (Witkin et al. 1993). Infertilität solcher Chlamydien-infizierter Paare resultiert vielleicht aus einer direkten entzündlichen Immunantwort in der Cervix oder dem Endometrium bei wiederholter Chlamydienexposition im Sinne einer „Ping-Pong-Infektion“ (Witkin et al. 1993). Soffer et al. (1990) haben bei positivem Nachweis von *Chlamydia trachomatis* im Ejakulat infertiler Männer gleichzeitig Spermatozoenantikörper gefunden. Eine neuere Arbeit von Levy et al. (1999) konnte jedoch aufzeigen, daß keine Korrelation zwischen einer positiven *Chlamydia-trachomatis*-Kultur und dem Nachweis von Spermatozoenantikörpern bestand. Soffer et al. (1990) und Levy et al. (1999) fanden Spermatozoenantikörper ebenfalls bei Infektionen mit *Ureaplasma urealyticum*. Es gibt bislang leider nur wenige in vitro Studien mit Chlamydien, da dieser intrazelluläre sich vermehrende Erreger schwierig anzuzüchten ist und somit die experimentellen Versuche limitiert.

1.2.4.7.8 Candida albicans

Zu den sexuell übertragbaren Erregern gehören auch *Candida* Spezies (Schiefer 1994 und 1998). Dieser Erreger ist von Bedeutung bei der Balanitis, Urethritis und Prostatitis sowie bei Vaginalinfektionen. Es ist in der Literatur nur eine Studie (Tuttle et al. 1977) zu finden, die sich mit der Spermatozoeninteraktion beschäftigt. Tuttle et al. (1977) fanden eine deutliche Motilitätsabnahme und Spermatozoenagglutination bei der in vitro-Infektion von Spermatozoen mit *Candida albicans*.

1.3 Aufgabenstellung der Dissertation

Wie das vorangegangene Kapitel *1.2.4.7 Direkte Erreger-Spermatozoen-Interaktion* zeigt, sind die häufigsten Erreger urogenitaler Infektionen bezüglich ihres Einflusses auf die Motilität von humanen Spermatozoen bisher nicht ausreichend untersucht worden. Dieser Frage soll daher in der vorliegenden Promotionsarbeit anhand von in vitro Infektionen mit *E. coli*, Enterokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Staphylococcus saprophyticus* und β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B nachgegangen werden.

Der Einfluß der oben genannten Erreger auf die humane Spermatozoenmotilität und andere Bewegungsmodalitäten (Art der Bewegung, Spermatozoengeschwindigkeiten) wird mit Hilfe einer computergestützten Motilitätsanalyse (CASA) untersucht.

Insbesondere soll der Frage nachgegangen werden, ob und wie die Motilität durch unterschiedliche Erreger in verschiedenen Konzentrationen beeinflusst wird, und ob ein solcher Einfluß zeitabhängig ist.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsablauf

2.1.1 Nativejakulate und Spender

Die für die Versuchsreihen benötigten Nativejakulate (n=10) gesunder, fertiler Probanden wurden durch Masturbation in einen sterilen Plastikcontainer aus Polypropylen (Sherwood) gewonnen. Es wurden ausschließlich Ejakulatproben freiwilliger Spender im Alter zwischen 20-35 Jahren verwendet, die zum Zeitpunkt der Versuche unter keinerlei Pharmakotherapie, insbesondere antibiotischer Therapie, standen. Desweiteren wurde bei der Auswahl der Spender auch darauf geachtet, daß sie gegenwärtig nicht an einer klinisch manifesten urogenitalen Infektion erkrankt waren. Die Spender waren darauf hingewiesen worden, vor Probenabgabe eine fünftägige sexuelle Karenz einzuhalten. Vor der Masturbation sollten Hände und Eichel mit Meatus urethrae externus mit Wasser und Seife gewaschen werden, um die Kontamination so gering wie möglich zu halten.

2.1.2 Erstuntersuchung und Aufarbeitung des Ejakulates

Nach Erhalt wurde die Probe in ein 37°C warmes Wasserbad gebracht, die Verflüssigung des Ejakulates abgewartet und die Verflüssigungszeit dokumentiert. Direkt im Anschluß wurde das Volumen der abgegebenen Probe mit einer sterilen 5 ml Plastikspritze (Luer-Lock[®], Braun, Melsungen, Deutschland) aufgezogen, kalibriert und anschließend wieder vorsichtig in das Gefäß zurückgespritzt. Der pH-Wert wurde mit einem Spezialindikatorpapier (Spezialindikator pH 6,5 - 10,0, Merck, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Danach wurde eine Supravitalfärbung mittels Eosin (Eosintest) durchgeführt. Dafür wurden 5 µl Ejakulat und 5 µl Eosin auf einem Objektträger vermischt und mit einem Deckglas abgedeckt. Danach wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie 100 Spermatozoen ausgezählt und der Anteil der vitalen (ungefärbten Spermien) und der avitalen (rot gefärbten Spermien) ermittelt. Nach dreimaliger Wiederholung der Messung in verschiedenen Gesichtsfeldern wurde der Mittelwert gebildet. Mit Hilfe dieses Tests konnten die Ergebnisse der anschließenden Motilitätsbeurteilung überprüft werden. Der Prozentsatz der avitalen Spermatozoen sollte dabei nicht die Zahl der immotilen Spermatozoen überschreiten. Jetzt wurden nach sorgfältiger Durchmischung der Probe 10 µl mit einer verstellbaren Pipette (Varipette[®], Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und sterilen Einmalplastikspitzen (Comfortips[®], Eppendorf, Hamburg, Deutschland) entnommen und in eine Zählkammer (Makler-Kammer[®], Sefi Medical Instruments, Jaffa, Israel) gebracht. Die erste Begutachtung der Ejakulatprobe erfolgte bei 200-facher Endvergrößerung im Phasenkontrastmikroskop (Optiphot-2-Mikroskop[®], Nikon, Japan). Hierbei wurde eine erste Abschätzung der

Spermatozoendichte und -motilität vorgenommen. Die Morphologie wurde ebenfalls grob orientierend im Phasenkontrast beurteilt. Zeigte sich beim ersten Eindruck ein normales Bild, wurde sogleich eine automatisierte Dichte- und Motilitätsmessung mit der MIKA-MOTION-ANALYSIS[®] (Mika medical, Rosenheim, Deutschland), einer computergestützten Bildverarbeitung zur Spermatozoenanalyse durchgeführt. Dieses Analyseverfahren zur objektiven Bestimmung der Spermatozoendichte, -motilität und anderer Bewegungsparameter (ESHRE Andrology Special Interest Group 1996) wurde bei allen Analysen dieser Arbeit angewendet und wird an anderer Stelle näher erläutert. Bei Erzielung normaler Meßergebnisse nach WHO (1992) konnte mit der weiteren Aufarbeitung des Ejakulates begonnen werden. Dabei wurden einzelne Abweichungen von der WHO-Norm, z. B. ein Ejakulatvolumen < 2 ml, Verflüssigungszeit > 45 Minuten etc. toleriert, wenn die Spermatozoenkonzentration und Gesamtmotilität der Probe eine erfolgversprechende Versuchsdurchführung vermuten ließen.

Nach diesen Voruntersuchungen erfolgte die Aufarbeitung der gesamten Ejakulatprobe mittels Swim-up-Technik. Dieses Verfahren ist eine gängige Methode zur Selektion reiner und hochmotiler Spermatozoen aus Nativejakulaten (Wilke et al. 1991, Diemer et al. 1996). Dabei wurde jeweils 1 ml der gut durchmischten Ejakulatprobe in ein steriles, mit Bajonettverschluß verschließbares Zentrifugenröhrchen (PS-Röhrchen[®], 12 ml, Greiner, Deutschland) gebracht und mit dem Medium HAM's F 10 bis zur Eichmarkierung (ca. 9 ml) aufgefüllt und manuell vermischt. Danach erfolgte die 10-minütige Zentrifugation der Suspension in einer Tischzentrifuge (Rotana[®], Hettich, Deutschland) bei 400 x g (1200 Umdrehungen/Minute). Anschließend wurde der flüssige Überstand aus Seminalplasma und Medium mittels steriler 2 ml Spritze (Luer-Lock[®], Braun, Melsungen, Deutschland) und einer langen, sterilen Luer-Lock-Nadel (Neoject[®], Kaliber 0,9 mm, Länge 7 cm, Braun, Melsungen, Deutschland) vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Hardpellet aus Ejakulatzellen durfte dabei nicht verletzt werden. Dann wurde das Hardpellet mit einem Milliliter auf 37°C vorgewärmten HAM's F 10 Medium mittels 2 ml Spritze und langer Nadel (s. o.) vorsichtig überschichtet, ohne dabei das Hardpellet aufzuwerfen. Sogleich wurden die geschlossenen Röhrchen für 30 - 60 Minuten bei 37°C inkubiert (Inkubator, Heraeus, Deutschland). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der flüssige Überstand, der nun die aufgeschwommenen, hochmotilen Spermatozoen enthielt, wieder vorsichtig mit einer Spritze abgesaugt und in einen sterilen, verschließbaren Mikrocup (Volumen 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gebracht.

Die gewonnenen Swim-up-Proben wurden ebenfalls einer computergestützten Motilitätsanalyse unterzogen. Wenn die gemessenen Spermatozoen alle internen Versuchs-kriterien (Gesamtmotilität > 80 %, Konzentration \geq 22 Millionen Spermatozoen/ml) erfüllten, konnte

die Spermatozoensuspension zum eigentlichen Experiment verwendet werden. Um die Versuche weitgehend zu standardisieren und reproduzierbar zu machen, erfolgte abschließend eine Konzentrationseinstellung der Spermatozoensuspension auf 22 Millionen Spermatozoen/ml. Dies geschah durch Verdünnen mit HAM's F 10 Medium. Das hier beschriebene Verfahren zur Ejakulataufbereitung wurde in allen durchgeführten Versuchsreihen angewendet.

2.2 Motilitätsanalysen

Alle Motilitätsanalysen der Versuchsreihen wurden mit der MIKA MOTION ANALYSIS® (Mika medical, Rosenheim, Deutschland), einer computergestützten Bildverarbeitung zur Spermatozoenanalyse, erstellt. Diese Meßmethode ist seit 1996 im ESHRE Consensus Workshop als ein etabliertes Verfahren zur objektiven Erfassung von Motilitätsparametern anerkannt (ESHRE Andrology Special Interest Group, 1996). Historisch gesehen wurde dieses Meßverfahren Ende der 70er Jahre von Makler (1978) mit Hilfe der „multiple exposure photography“ (MEP) entwickelt. Es ermöglichte erstmals neben der prozentualen Bestimmung der Spermatozoenmotilität, auch Bewegungscharakteristika von Spermatozoen und deren Geschwindigkeiten zu bestimmen. Das Gerät funktioniert nach folgendem Grundprinzip: Das phasenkontrastmikroskopische Bild (Optiphot-2-Mikroskop®, Nikon, Japan) der Spermatozoen in einer Makler®-Kammer wird über eine Videokamera aufgezeichnet und in einem angeschlossenen Computer mittels spezifischer Software in ein Bildschirmbild digitalisiert, d. h. über Schwarzweißkontrastierung in einzelne Bildpunkte zerlegt. Die in einem Zeitraum stattfindenden Bildveränderungen durch die Spermatozoenbewegungen werden über einen Bildvergleich im Rechner erkannt und ausgewertet. Dabei ist der Computer in der Lage, durch Kontrastunterschiede und Größe einzelner Bildpunktgruppen Spermatozoen von anderen Zellen des Ejakulates zu unterscheiden und nur diese auszuwerten. Zur zusätzlichen Identifikation der Spermatozoen wird auch noch eine spezielle Schwanzerkennung eingesetzt. Die Spermatozoenkonzentration im eingestellten Bild wird ebenfalls vom System errechnet. Die Einstellung des jeweils zu messenden mikroskopischen Ausschnittbildes wird vom Untersucher selbst vorgenommen. Erfahrungsgemäß erhält man genaue Messungen einer Probe nach Einzelmessungen von 10 Ausschnittsbildern oder 100 Spermatozoen (WHO 1992). Das Einzelergebnis jeder Messung sowie das Gesamtergebnis der bis dahin gemessenen Bildausschnitte wird auf einem zweiten Monitor dargestellt. Nach Beendigung der Messung einer Probe kann das Gesamtergebnis sofort ausgedruckt oder auch in einer Datenbank gespeichert werden.

Folgende Qualitäten, einschließlich derjenigen im Ergebnisteil, werden von dem Analysegerät ermittelt und in dieser Arbeit dargestellt. Hierfür werden in den Graphiken jeweils die nachstehenden Abkürzungen verwendet:

Spermatozoenmotilität (gemessen in %):

Gesamtmotilität, Definition: Summe aus Progressivmotilität und ortsständiger Motilität

Progressive Motilität (mot.), Definition: $VAP > 20 \mu\text{m}/\text{sec}$. (Motilitätsklasse a und b)

Ortsständige Motilität (lok. Mot.), Definition: $10 \mu\text{m}/\text{sec} < VAP < 20 \mu\text{m}/\text{sec}$. (Motilitätsklasse c)

Immotilität (imo.), Definition: $VAP < 10 \mu\text{m}/\text{sec}$. (Motilitätsklasse d)

Bezug: Motilitätsklassen der Spermatozoen nach WHO (1992)

Art der Spermatozoenbewegung (gemessen in %):

Lineare Vorwärtsbeweglichkeit (lin.)

Nicht-lineare Vorwärtsbeweglichkeit (n.lin.)

Kreisbewegliche Spermatozoen (cir.)

Geschwindigkeiten der Spermatozoen (gemessen in $\mu\text{m}/\text{sec}$):

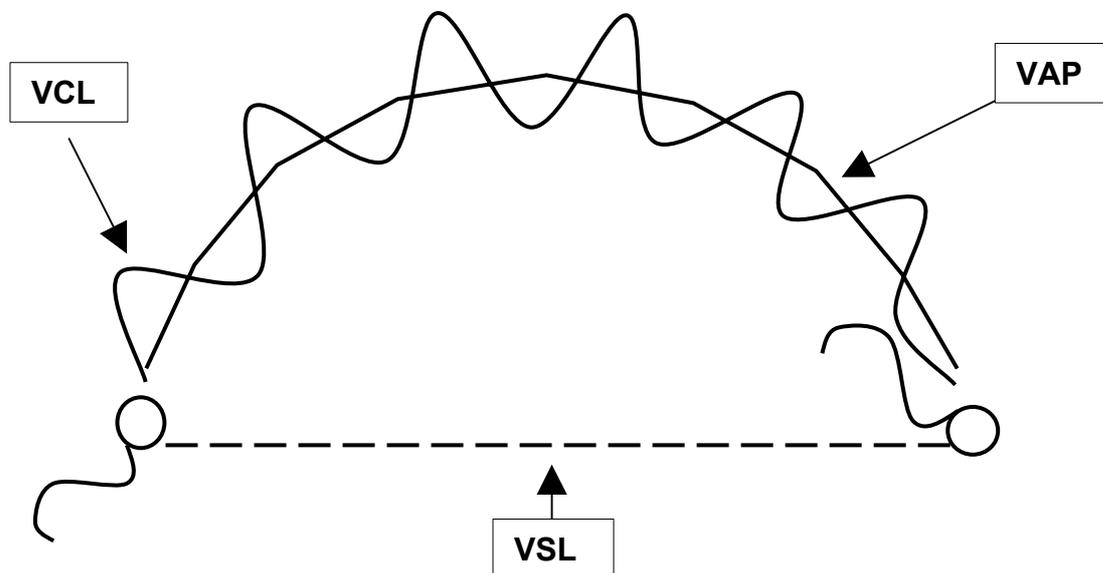
Velocity straight linear (VSL), die Progressiv- bzw. Lineargeschwindigkeit

Velocity average Path (VAP), die durchschnittliche Pfadgeschwindigkeit

Velocity curvilinear (VCL), die kurvenlineare Geschwindigkeit bzw. die Geschwindigkeit der Originalwegpunkte

Die Bewegungscharakteristika der Spermatozoen, die mittels CASA ermittelt werden, sind in Abbildung 1 dargestellt.

Abb. 1: Bewegungscharakteristika von Spermatozoen (modifiziert nach Weidner und Krause 1995)



2.2.1 Verwendete Erreger

2.2.1.1 Escherichia coli (E. coli)

Als Basisuntersuchung zur Etablierung der im Folgenden dargestellten Versuchsreihen wurden die gleichen Erreger wie von Diemer et al. (1996) verwendet: Es handelt sich um einen reinen, humanpathogenen Stamm (Serotyp O6), welcher ursprünglich von einem Patienten mit einer chronisch-bakteriellen Prostatitis isoliert wurde und in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Dr. H.-G. Schiefer) angezüchtet worden war. Es handelt sich um einen hämolysierenden, hämagglutinierenden, mannose-sensitiven, serumresistenten und eingekapselten E. coli-Stamm. Die Versuche in dieser Arbeit wurden mit dem gleichen Erregerstamm reproduziert. Dabei wurden jedoch ausschließlich E. coli-Konzentrationen von > 2 Millionen/ml, bei denen ein signifikanter Motilitätshemmender Effekt bewiesen worden war (Diemer et al. 1996), verwendet. Die Bakterienanzucht erfolgte hierfür auf Blutagarplatten, und Bakterien-suspensionen wurden mit dem Medium HAM's F 10 hergestellt.

2.2.1.2 Enterokokken (Streptococcus faecalis)

In der ersten Versuchsreihe wurde ein uropathogener, stark hämolysierender, gram-positiver Enterokokken-Stamm verwendet, der in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angezüchtet worden war (Prof. Dr. H.-G. Schiefer). Dort wurde ebenfalls deren Konzentrationseinstellung und Gefrierung in Mikrocups vorgenommen. Insgesamt wurden vier Konzentrationen der Enterokokken-Suspensionen hergestellt: A (20 Millionen Enterokokken/ml), B (2 Millionen Enterokokken/ml), C (200.000 Enterokokken/ml), D (20.000 Enterokokken/ml). Die so portionierten Bakterien wurden bei minus 80°C im Gefrierschrank aufbewahrt, unmittelbar vor ihrer Verwendung in den einzelnen Cups im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und für die Versuchsansätze weiterverwendet. In den Versuchsreihen wurden die Enterokokken nur in einem Zehntel des Volumens und in der zehnfachen Konzentration des definitiven Versuchsansatzes der Spermatozoensuspension zugesetzt, so daß sie die Spermatozoensuspension um 10 Prozent verdünnten. Die initial verwendeten Bakterien-suspensionen waren dann ebenfalls in ihrer Konzentration 10 Prozent niedriger als ursprünglich.

2.2.1.3 Pseudomonas aeruginosa (Ps. aeruginosa)

In der zweiten Versuchsreihe kam ein Pseudomonas aeruginosa-Erreger zur Anwendung, der von einem Patienten, der an chronisch-bakterieller Prostatitis litt, isoliert wurde und in der Medizinischen Mikrobiologie angezüchtet worden war (Prof. Dr. H.-G. Schiefer). Dort wurde ebenfalls dessen Konzentrationseinstellung und Gefrierung in Mikrocups vorge-

nommen. Insgesamt wurden vier Konzentrationen der *Pseudomonas*-Suspensionen hergestellt: A (20 Millionen *Ps. aeruginosa*/ml), B (2 Millionen *Ps. aeruginosa*/ml), C (200.000 *Ps. aeruginosa* /ml), D (20.000 *Ps. aeruginosa* /ml). Die so portionierten Bakterien wurden bei minus 80°C im Gefrierschrank aufbewahrt, unmittelbar vor ihrer Verwendung in den einzelnen Cups im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und für die Versuchsansätze weiterverwendet. In den Versuchsreihen wurden die *Pseudomonaden* nur in einem Zehntel des Volumens und in der zehnfachen Konzentration des definitiven Versuchsansatzes der Spermatozoensuspension zugesetzt, so daß sie die Spermatozoensuspension um 10 Prozent verdünnten. Die initial verwendeten Bakteriensuspensionen waren dann ebenfalls in Ihrer Konzentration 10 Prozent niedriger als ursprünglich.

2.2.1.4 *Staphylococcus saprophyticus* (Staph. saprophyticus)

In der dritten Versuchsreihe wurde ein *Staphylococcus saprophyticus*-Erreger verwendet, der aus einer vaginalen Probe entstammte (Laborstamm: USA ATCC-No. 15305). In der Medizinischen Mikrobiologie erfolgte die Anzüchtung des Keimes (Prof. Dr. H.-G. Schiefer). Vor jedem Versuchsansatz wurden frische Bakteriensuspensionen in hohen Konzentrationen, die mit dem Medium HAM's F 10 verdünnt wurden, hergestellt. Die Bakteriendichte wurde in der Makler-Kammer orientierend ausgezählt. Für die Versuchsansätze kamen initiale Konzentrationen zwischen 200 - 400 Millionen *Staph. saprophyticus*/ml (C) zur Anwendung.

2.2.1.5 *Candida albicans*

Ebenfalls in der dritten Versuchsreihe wurde ein *Candida albicans*-Stamm, der aus einer vaginalen Abstrichprobe bei *Candida*-Kolpitis stammte und in der Medizinischen Mikrobiologie kultiviert wurde, verwendet (Prof. Dr. H.-G. Schiefer). Der Pilz wurde auf McConkey-Agarplatten frisch angezüchtet. Vor jedem Versuchsansatz erfolgte die Herstellung frischer Erregersuspensionen in hohen Konzentrationen mit dem Medium HAM's F 10. Für die Versuchsansätze wurden zwei verschiedene initiale Konzentrationen (A 20 Millionen *Candida*/ml und B 2 Millionen *Candida*/ml) verwendet.

2.2.1.6 β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B

In der vierten Versuchsreihe fand ein β -hämolyisierender Streptokokken-Stamm der Gruppe B Verwendung, der aus einem vaginalen Isolat stammte und in der Medizinischen Mikrobiologie angezüchtet worden war (Prof. Dr. H.-G. Schiefer). Dort wurde ebenfalls deren Konzentrationseinstellung und Gefrierung in Mikrocups vorgenommen. Insgesamt

wurden vier Konzentrationen der Streptokokken-Suspensionen hergestellt: A (20 Millionen Streptokokken/ml), B (2 Millionen Streptokokken/ml), C (200.000 Streptokokken/ml), D (20.000 Streptokokken/ml). Die so portionierten Bakterien wurden bei minus 80°C im Gefrierschrank aufbewahrt, unmittelbar vor ihrer Verwendung in den einzelnen Cups im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und für die Versuchsansätze weiterverwendet. In den Versuchsreihen wurden die Streptokokken nur in einem Zehntel des Volumens und in der zehnfachen Konzentration des definitiven Versuchsansatzes der Spermatozoensuspension zugesetzt, so daß sie die Spermatozoensuspension um 10 Prozent verdünnten. Die initial verwendeten Bakterienkonzentrationen waren dann ebenfalls in ihrer Konzentration 10 Prozent niedriger als ursprünglich.

2.2.2 Motilitätsanalysen

2.2.2.1 Vorversuche mit Escherichia coli

Als Basisuntersuchung wurden vor der ersten Versuchsreihe und auch zur Etablierung derselben ein Probenansatz mit E. coli-Bakterien in einer Konzentration > 2 Millionen E. coli/ml gegenüber einer Kontrollprobe mit dem Medium HAM's F 10 untersucht. Hierfür erfolgte die Herstellung einer frischen Bakteriensuspension mit dem Medium HAM's F 10, wie weiter oben schon beschrieben. Ein steriles, verschließbares Röhrchen (Greiner, Eppendorf) wurde mit 180 µl Spermatozoensuspension und 20 µl Bakteriensuspensionen bestückt. Als Kontrolle diente eine Probe mit dem Medium HAM's F 10. Die hier erzielten Ergebnisse dienten zur Etablierung der Versuchsreihe und um zu klären, ob dieser E. coli-Stamm auch in einem anderen Labor die gleichen motilitätshemmenden Effekte wie zuvor bei Diemer et al. (1996) haben würde. Die Vorversuche sind nicht in die statistische Analyse eingegangen.

2.2.2.2 Motilitätsanalysen mit Enterokokken (Erste Versuchsreihe)

In der ersten Versuchsreihe wurden die einzelnen Versuchsansätze nach der oben beschriebenen Aufarbeitung des Ejakulates hergestellt. Die jeweils verwendete Swim-up-Suspension wurde in fünf Teile gesplittet. Die Versuchsreihe wurde mit fünf Ansätzen mit jeweils insgesamt 200 µl Spermatozoen/Bakterien-Suspension durchgeführt. Hierfür wurden fünf sterile, verschließbare Röhrchen (Greiner, Eppendorf) mit jeweils 180 µl Spermatozoensuspension bestückt. Danach wurden vier dieser Röhrchen mit den unterschiedlich konzentrierten Bakteriensuspensionen von jeweils 20 µl bestückt und ein Röhrchen mit 20 µl HAM's F 10 Medium als Kontrollprobe. Dabei waren die Bakterienausgangskonzentrationen 2 Millionen/ml (Ansatz A), 200.000/ml (Ansatz B), 20.000 (Ansatz C) und 2.000 (Ansatz D). Als Kontrolle diente Ansatz E mit dem Medium HAM's F 10. Bei

der eingestellten Spermatozoenkonzentration von 22 Millionen/ml ergab sich rechnerisch nach dem fertigen Probenansatz eine Spermatozoenkonzentration von 20 Millionen/ml. Die Versuchsansätze werden in dem folgenden Pipettierschema verdeutlicht:

Tabelle 7: Pipettierschema der ersten Versuchsreihe (Enterokokken)

Versuchsansatz	A	B	C	D	E
Spermatozoensusp. 22 Mio./ml	180 µl				
Bakteriensuspension A: 20 Mio./ml	20 µl	-	-	-	-
Bakteriensuspension B: 2 Mio./ml	-	20 µl	-	-	-
Bakteriensuspension C: 200.000/ml	-	-	20 µl	-	-
Bakteriensuspension D: 20.000/ml	-	-	-	20 µl	-
Kontrolle E: HAM's F 10	-	-	-	-	20 µl
Gesamtmenge	200 µl				

Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubator (Fa. Heraeus) über 6 Stunden. Die einzelnen Messungen der Proben wurden direkt nach Inkubationsbeginn, 2, 4 und 6 Stunden nach Inkubationsbeginn durchgeführt. Nach sorgfältiger Durchmischung der jeweiligen Probe mit dem Vibrax® (Serono) wurden jeweils 10 µl der Spermatozoen/Bakterien-Suspension mit einer sterilen Pipette entnommen, in eine Makler®-Kammer gebracht und mit der computerisierten Spermatozoenanalyse auf ihre Motilitätsparameter untersucht. Dabei wurden bei jeder Messung mindestens 100 Spermatozoen ausgezählt. Zusätzlich wurde, soweit beurteilbar, bei jeder Messung die Enterokokken-Konzentration zum jeweiligen Zeitpunkt mit Hilfe der Maklerkammer bestimmt. Die Anzahl der in 10 Quadraten gezählten Bakterien ergab deren Konzentration in Millionen pro Milliliter (dieses galt analog für die Spermatozoen). Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe 10 Ejakulate für 10 Versuche mit jeweils 5 Probenansätzen verwendet. Dabei konnten 220 einzelne Motilitätsanalysen (nativ, swim-up, 10 Versuche mit jeweils 5 Einzelproben zu je 4 Inkubationszeitpunkten) dokumentiert werden. In die statistische Analyse gingen die 200 Motilitätsanalysen der Versuchsansätze ein.

2.2.2.3 Motilitätsanalysen mit *Pseudomonas aeruginosa* (Zweite Versuchsreihe)

In der zweiten Versuchsreihe wurden die einzelnen Versuchsansätze wieder nach der oben beschriebenen Aufarbeitung des Ejakulates hergestellt. Die jeweils verwendete Swim-up Suspension wurde in fünf Teile gesplittet. Die Versuchsreihe wurde mit fünf Ansätzen mit jeweils insgesamt 200 µl Spermatozoen/Bakterien-Suspension durchgeführt. Hierfür wurden fünf sterile, verschließbare Röhrchen (Greiner, Eppendorf) mit jeweils 180 µl Spermatozoensuspension bestückt. Danach wurden vier dieser Röhrchen mit den unterschiedlich konzentrierten Bakteriensuspensionen von jeweils 20 µl bestückt und ein Röhrchen mit 20 µl HAM's F 10 Medium als Kontrollprobe. Dabei waren die Bakterienausgangskonzentrationen 2 Millionen/ml (Ansatz A), 200.000/ml (Ansatz B), 20.000 (Ansatz C) und 2.000 (Ansatz D). Als Kontrolle diente Ansatz E mit dem Medium HAM's F 10. Bei der eingestellten Spermatozoenkonzentration von 22 Millionen/ml ergab sich rechnerisch nach dem fertigen Probenansatz eine Spermatozoenkonzentration von 20 Millionen/ml. Die Versuchsansätze werden in dem folgenden Pipettierschema verdeutlicht:

Tabelle 8: Pipettierschema der zweiten Versuchsreihe (*Pseudomonas aeruginosa*)

Versuchsansatz	A	B	C	D	E
Spermatozoensusp. 22 Mio./ml	180 µl				
Bakteriensuspension A: 20 Mio./ml	20 µl	-	-	-	-
Bakteriensuspension B: 2 Mio./ml	-	20 µl	-	-	-
Bakteriensuspension C: 200.000/ml	-	-	20 µl	-	-
Bakteriensuspension D: 20.000/ml	-	-	-	20 µl	-
Kontrolle E: HAM's F 10	-	-	-	-	20 µl
Gesamtmenge	200 µl				

Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubator (Fa. Heraeus) über 6 Stunden. Die einzelnen Messungen der Proben wurden direkt nach Inkubationsbeginn, 2 , 4 und 6 Stunden nach Inkubationsbeginn durchgeführt. Nach sorgfältiger Durchmischung der jeweiligen Probe mit dem Vibrax[®] (Serono) wurden jeweils 10 µl der Spermatozoen/Bakterien-Suspension mit einer sterilen Pipette entnommen, in eine Makler[®]-Kammer gebracht und mit der com-

puterisierten Spermatozoenanalyse auf ihre Motilitätsparameter untersucht. Dabei wurden bei jeder Messung mindestens 100 Spermatozoen ausgezählt. Die Ermittlung der Pseudomonas-Konzentration zum jeweiligen Zeitpunkt mit Hilfe der Makler[®]-Kammer konnte nicht durchgeführt werden, da der Erreger zu klein für eine genaue Zählung war. Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe 10 Ejakulate für 10 Versuche mit jeweils 5 Probenansätzen verwendet. Dabei konnten 220 einzelne Motilitätsanalysen (nativ, swim-up, 10 Versuche mit jeweils 5 Einzelproben zu je 4 Inkubationszeitpunkten) dokumentiert werden. In die statistische Analyse gingen die 200 Motilitätsanalysen der Versuchsansätze ein.

2.2.2.4 Motilitätsanalysen mit *Candida albicans* und *Staphylococcus saprophyticus* (Dritte Versuchsreihe)

In der dritten Versuchreihe wurden die einzelnen Versuchsansätze wieder nach der oben beschriebenen Aufarbeitung des Ejakulates hergestellt. Die jeweils verwendete Swim-up-Suspension wurde in vier Teile gesplittet. Die Versuchsreihe wurde mit vier Ansätzen mit jeweils insgesamt 200 µl Spermatozoen/Erreger-Suspension durchgeführt. Hierfür wurden vier sterile, verschließbare Röhrchen (Greiner, Eppendorf) mit jeweils 180 µl Spermatozoensuspension bestückt. Danach wurden drei dieser Röhrchen mit den unterschiedlich konzentrierten Erregersuspensionen von jeweils 20 µl bestückt und ein Röhrchen mit 20 µl HAM's F 10 Medium als Kontrollprobe. Dabei waren die Erregerausgangskonzentrationen 20 Millionen *Candida*/ml (Ansatz A), 2 Millionen *Candida*/ml (Ansatz B), 200 - 400 Millionen *Staph. saprophyticus*/ml (Ansatz C). Als Kontrolle diente Ansatz D mit dem Medium HAM's F 10. Bei der eingestellten Spermatozoenkonzentration von 22 Millionen/ml ergab sich rechnerisch ergab sich nach dem fertigen Probenansatz eine Spermatozoenkonzentration von 20 Millionen/ml.

Die Versuchsansätze werden in dem folgenden Pipettierschema verdeutlicht:

Tabelle 9: Pipettierschema der dritten Versuchsreihe (Candida albicans und Staphylococcus saprophyticus)

Versuchsansatz	A	B	C	D
Spermatozoensusp. 22 Mio./ml	180 µl	180 µl	180 µl	180 µl
Candidasuspension A: 20 Mio./ml	20 µl	-	-	-
Candidasuspension B: 2 Mio./ml	-	20 µl	-	-
Bakteriensuspension C: 200 - 400 Mio./ml	-	-	20 µl	-
Kontrolle D: HAM's F 10	-	-	-	20 µl
Gesamtmenge	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubator (Fa. Heraeus) über 6 Stunden. Die einzelnen Messungen der Proben wurden direkt nach Inkubationsbeginn, 2 , 4 und 6 Stunden nach Inkubationsbeginn durchgeführt. Nach sorgfältiger Durchmischung der jeweiligen Probe mit dem Vibrax[®] (Serono) wurden jeweils 10 µl der Spermatozoen/Erreger-Suspension mit einer sterilen Pipette entnommen, in eine Makler[®]-Kammer gebracht und mit der computerisierten Spermatozoenanalyse auf ihre Motilitätsparameter untersucht. Dabei wurden bei jeder Messung mindestens 100 Spermatozoen ausgezählt. Die Messung der jeweiligen Erregerkonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt wurde mit Hilfe der Makler[®]-Kammer wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe 10 Ejakulate für 10 Versuche mit jeweils 4 Probenansätzen verwendet. Dabei konnten 180 einzelne Motilitätsanalysen (nativ, swim-up, 10 Versuche mit jeweils 4 Einzelproben zu je 4 Inkubationszeitpunkten) dokumentiert werden. In die statistische Analyse gingen die 160 Motilitätsanalysen der Versuchsansätze ein.

2.2.2.5 Motilitätsanalysen mit β-hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B (Vierte Versuchsreihe)

In der vierten Versuchreihe wurden die einzelnen Versuchsansätze ebenfalls nach der oben beschriebenen Aufarbeitung des Ejakulates hergestellt. Die jeweils verwendete

Swim-up Suspension wurde in fünf Teile gesplittet. Die Versuchsreihe wurde mit fünf Ansätzen mit jeweils insgesamt 200 µl Spermatozoen/Bakterien-Suspension durchgeführt. Hierfür wurden fünf sterile, verschließbare Röhren (Greiner, Eppendorf) mit jeweils 180 µl Spermatozoensuspension bestückt. Danach wurden vier dieser Röhren mit den unterschiedlich konzentrierten Bakteriensuspensionen von jeweils 20 µl bestückt und ein Röhren mit 20 µl HAM's F 10 Medium als Kontrollprobe. Dabei waren die Bakterienausgangskonzentrationen 2 Millionen/ml (Ansatz A), 200.000/ml (Ansatz B), 20.000 (Ansatz C) und 2000 (Ansatz D). Als Kontrolle diente Ansatz E mit dem Medium HAM's F 10. Bei der eingestellten Spermatozoenkonzentration von 22 Millionen/ml ergab sich rechnerisch nach dem fertigen Probenansatz eine Spermatozoenkonzentration von 20 Millionen/ml. Die Versuchsansätze werden in dem folgenden Pipettierschema verdeutlicht:

Tabelle 10: Pipettierschema der vierten Versuchsreihe (Streptokokken Gruppe B)

Versuchsansatz	A	B	C	D	E
Spermatozoensusp. 22 Mio./ml	180 µl				
Bakteriensuspension A: 20 Mio./ml	20 µl	-	-	-	-
Bakteriensuspension B: 2 Mio./ml	-	20 µl	-	-	-
Bakteriensuspension C: 200.000/ml	-	-	20 µl	-	-
Bakteriensuspension D: 20.000/ml	-	-	-	20 µl	-
Kontrolle E: HAM's F 10	-	-	-	-	20 µl
Gesamtmenge	200 µl				

Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubator (Fa. Heraeus) über 6 Stunden. Die einzelnen Messungen der Proben wurden direkt nach Inkubationsbeginn, 2 , 4 und 6 Stunden nach Inkubationsbeginn durchgeführt. Nach sorgfältiger Durchmischung der jeweiligen Probe mit dem Vibrax[®] (Serono) wurden jeweils 10 µl der Spermatozoen/Bakterien-Suspension mit einer sterilen Pipette entnommen, in eine Makler[®]-Kammer gebracht und mit der computerisierten Spermatozoenanalyse auf ihre Motilitätsparameter untersucht. Dabei wurden bei jeder Messung mindestens 100 Spermatozoen ausgezählt. Die Ermittlung der Streptokokken-Konzentration zum jeweiligen Zeitpunkt der Messungen mit Hilfe der

Makler®-Kammer konnte nicht bestimmt werden, da der Erreger lichtmikroskopisch zu klein für eine genaue Zählung war.

Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe 10 Ejakulate für 10 Versuche mit jeweils 5 Probenansätzen verwendet. Dabei konnten 220 einzelne Motilitätsanalysen (nativ, swim-up, 10 Versuche mit jeweils 5 Einzelproben zu je 4 Inkubationszeitpunkten) dokumentiert werden. In die statistische Analyse gingen die 200 Motilitätsanalysen der Versuchsansätze ein.

2.2.3 Statistische Auswertung der Daten

Die in dieser Dissertation erhobenen Daten zur Spermatozoenmotilität, Bewegungsmodalitäten und Geschwindigkeiten der Spermatozoen, die mit Hilfe der MIKA MOTION ANALYSIS® erstellt wurden, sind in MS EXCEL®-Tabellen (Version 5.0) gespeichert und anschließend ausgewertet worden. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Box plots, welche neben dem Median, der 25%-Percentile und der 75%-Percentile (Box) auch die Minima und Maxima als Linien angeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit der 2-faktoriellen Varianzanalyse mit Meßwiederholungen auf 2 Faktoren, d. h. es wurden die Signifikanzen für die Parameter Zeit und Konzentration und deren Wechselwirkung untereinander bestimmt (SPSS® for MS Windows Version 6.0).¹

¹ Ich danke Herrn Pabst (Institut für Medizinische Informatik an der Justus-Liebig-Universität Gießen) für die Beratung und Hilfe bei der statistischen Aufarbeitung.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche mit *Escherichia coli*

Bei dem Versuchsansatz mit einer initialen Konzentration > 2 Mio. *E. coli*/ml konnte der gleiche deutliche motilitätshemmende Effekt wie in den standardisierten in vitro Experimenten mit *E. coli* des gleichen Serotypes (O6) von Diemer et al. (1996) beobachtet werden. Bei einem Spermatozoen/Bakterienverhältnis ≥ 1 wurde dieser Effekt deutlich. Dieses war nach 6 Stunden Inkubation sowohl in der Gesamtmotilität als auch Progressivmotilität erreicht. Die folgenden Graphiken sollen diesen motilitätshemmenden Effekt verdeutlichen (Abb 2.1-2.4 und 3.1-3.4). Die Vorversuche wurden nicht statistisch ausgewertet.

Abb. 2.1-2.4: Spermatozoengesamtmotilität der Vorversuche mit *E. coli* mit der initialen Bakterienkonzentration von > 2 Mio./ml (A) und der Kontrolle (B).

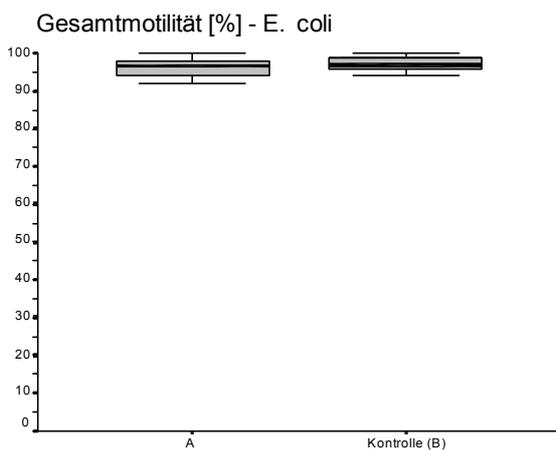


Abb. 2.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

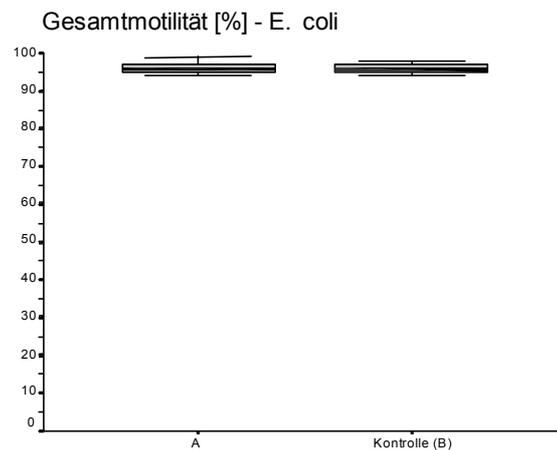


Abb. 2.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

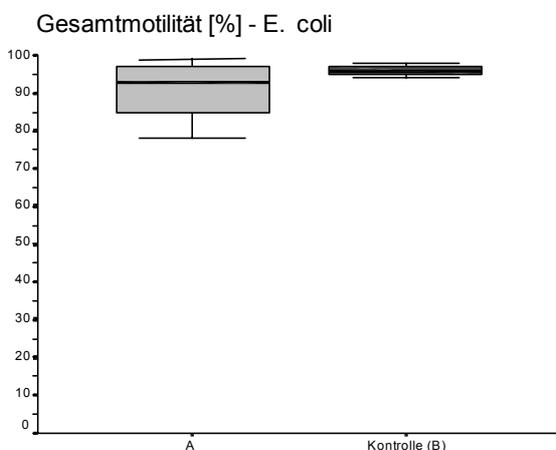


Abb. 2.2 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

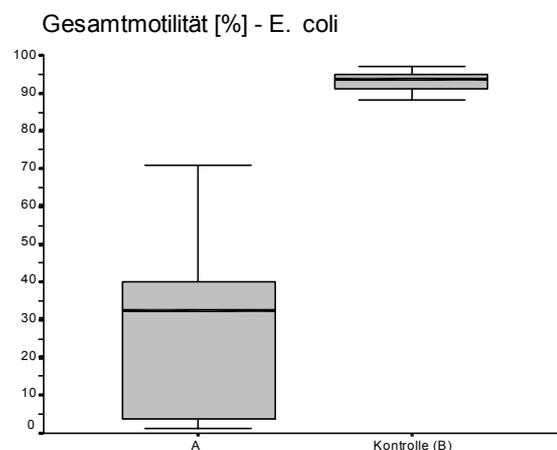


Abb. 2.2 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Abb. 3.1-3.4 Spermatozoenprogressivmotilität der Vorversuche mit *E. coli* mit der initialen Bakterienkonzentration von > 2 Mio./ml (A) und der Kontrolle (B).

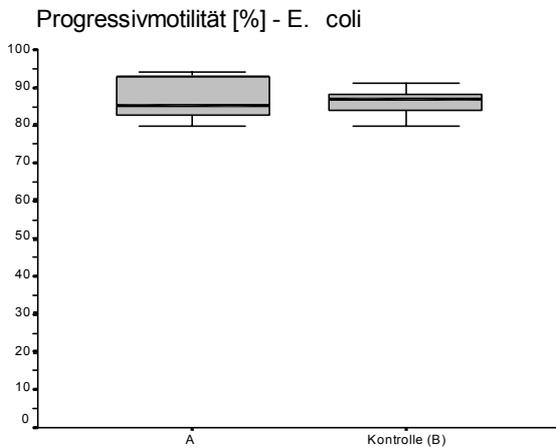


Abb. 3.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

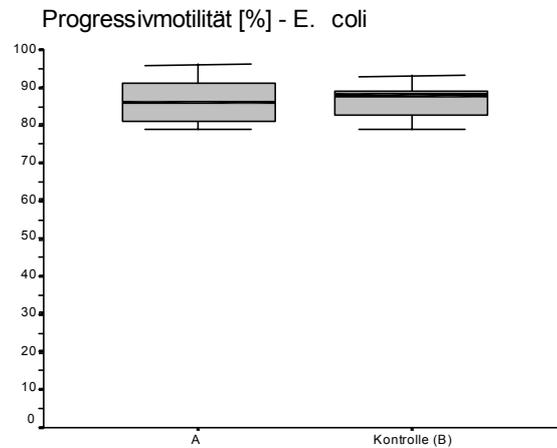


Abb. 3.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

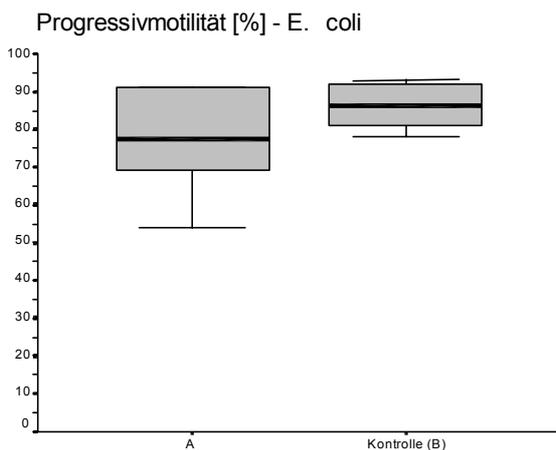


Abb. 3.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

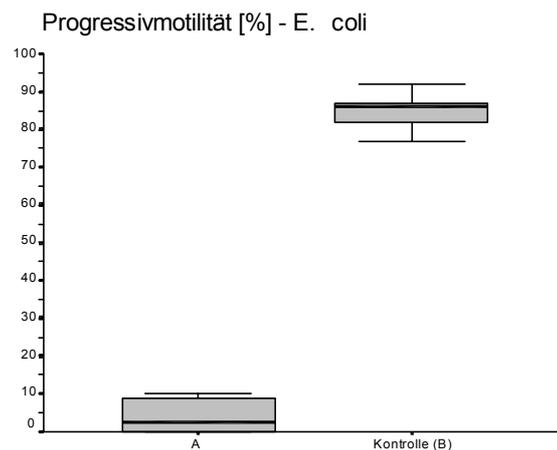


Abb. 3.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

3.2 Motilitätsanalysen mit Enterokokken

Direkt nach Inkubationsbeginn fand sich für die mittlere Gesamtmotilität ein Prozentsatz von 87 % (Abb. 4.1). Im Verlauf, d.h. nach 2, 4 und 6 Stunden nach Inkubation fand sich, trotz einer Abnahme kein signifikanter Unterschied der Gesamtmotilität (Abb. 4.2, Abb. 4.3, Abb. 4.4). Die Motilitätsraten der einzelnen Ansätze lagen nach 6 Stunden im Mittel noch bei 70 % und unterschieden sich damit nicht signifikant vom Kontrollansatz (Abb. 4.4).

Abb. 4.1-4.4: Spermatozoengesamtmotilität der Versuchsansätze mit Enterokokken mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

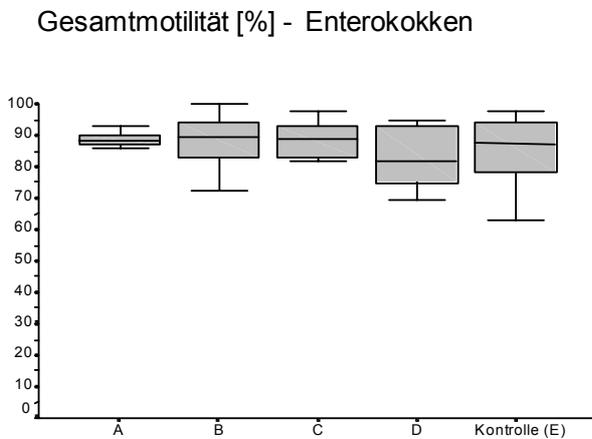


Abb. 4.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

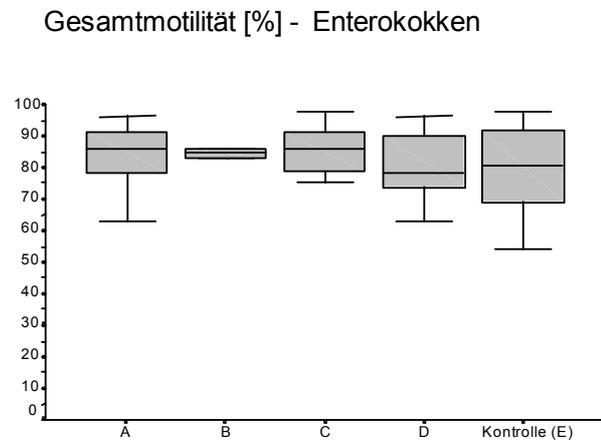


Abb. 4.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

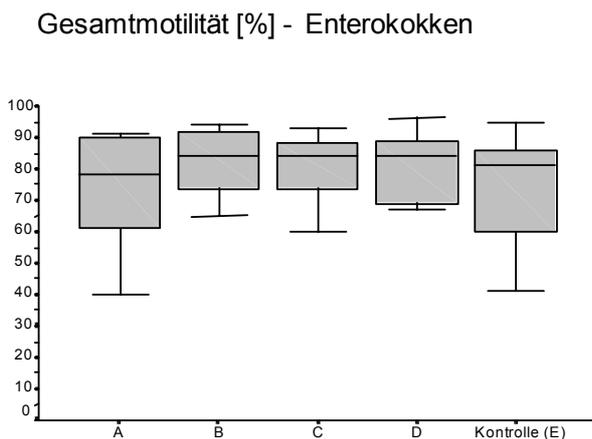


Abb. 4.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

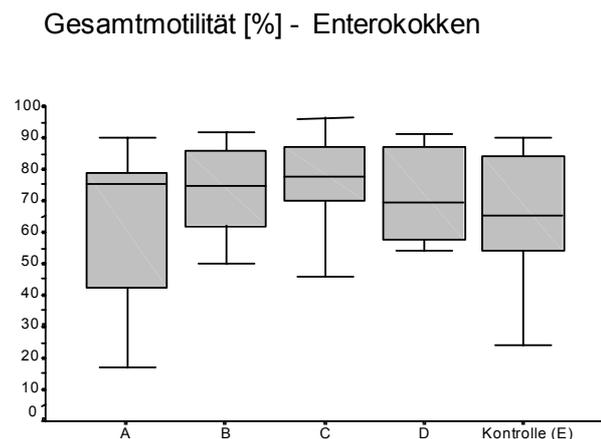


Abb. 4.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Bei der mittleren Progressivmotilität fand sich direkt nach Inkubationsbeginn ein Prozentsatz von 78% (Abb. 5.1). Ebenfalls zeigte sich im Inkubationsverlauf über 6 Stunden kein signifikanter Unterschied der Progressivmotilität, obwohl auch hier eine Motilitätsminderung zu verzeichnen war (Abb. 5.2, Abb. 5.3, Abb. 5.4). Im Mittel lagen die Motilitätsraten der einzelnen Proben nach 6 Stunden bei 58 % und unterschieden sich damit nicht signifikant von der Kontrollprobe (Abb. 5.4).

Abb. 5.1-5.4: Spermatozoenprogressivmotilität der Versuchsansätze mit Enterokokken mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

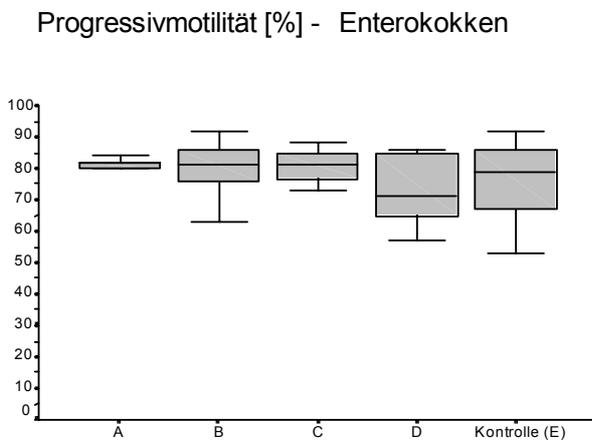


Abb. 5.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

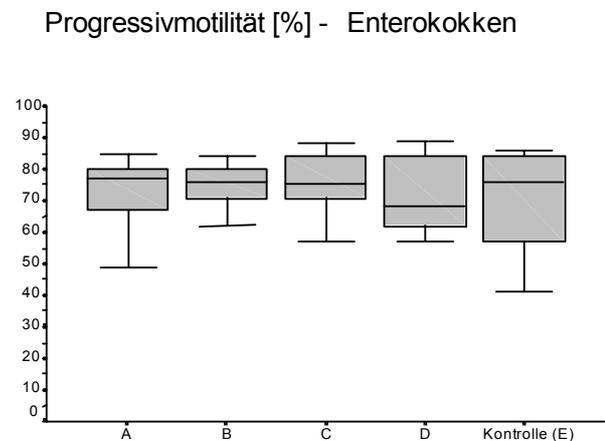


Abb. 5.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

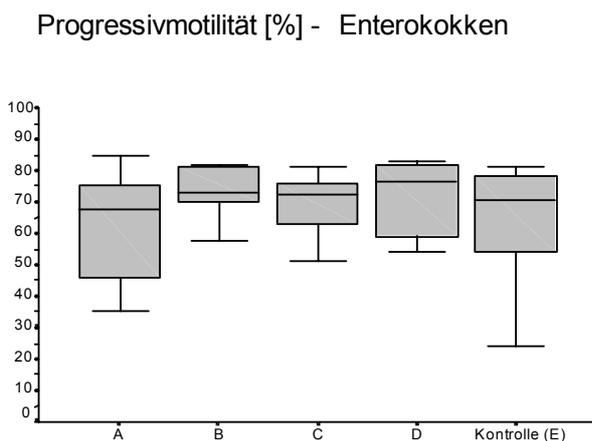


Abb. 5.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

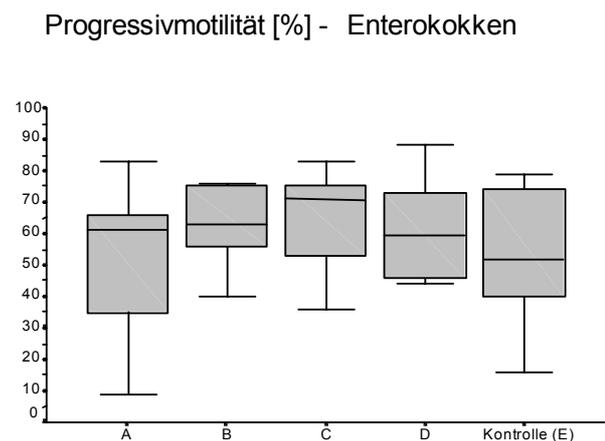


Abb. 5.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Die Analyse der Bewegungsmodalitäten zeigte im Verlauf der Inkubation lediglich bei den linear progressiv motilen Spermatozoen (LIN) eine Abnahme der linearen Vorwärtsbeweglichkeit ($p=0,004$). Ebenso nahm die nicht-lineare Vorwärtsbeweglichkeit (NLIN) signifikant ($p>0,0001$) ab. Diese Veränderungen waren nicht von der verwendeten Bakterienkonzentration (Abb. 6.1-6.4) abhängig. Alle anderen Parameter der Bewegungsmodalität blieben unverändert.

Abb. 6.1-6.4: Spermatozoenbewegungsmodalitäten [Kreisläufer (CIR), nicht-lineare Vorwärtsbeweglichkeit (NLIN), lineare Vorwärtsbeweglichkeit (LIN)] der Versuchsansätze mit Enterokokken mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

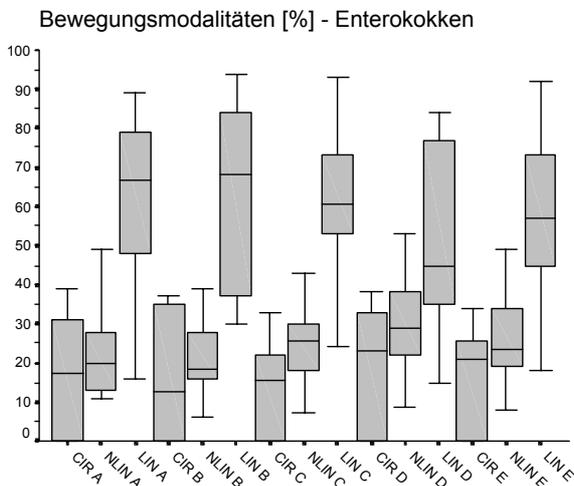


Abb. 6.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

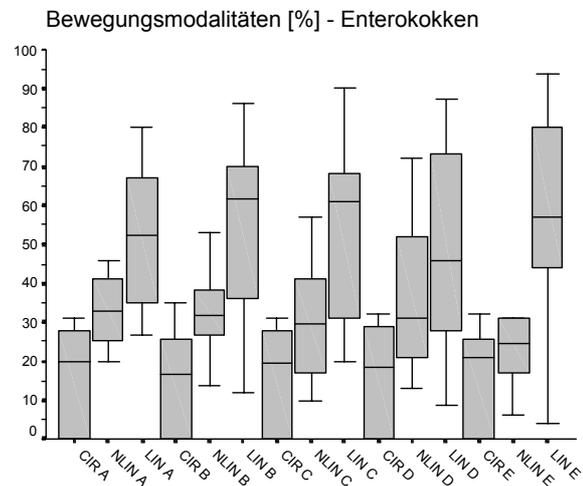


Abb. 6.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

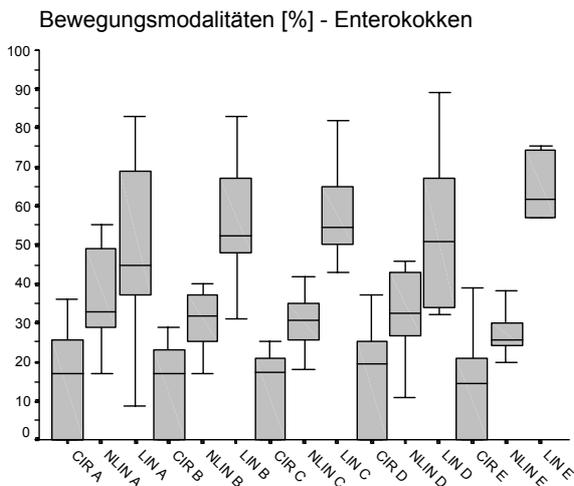


Abb. 6.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

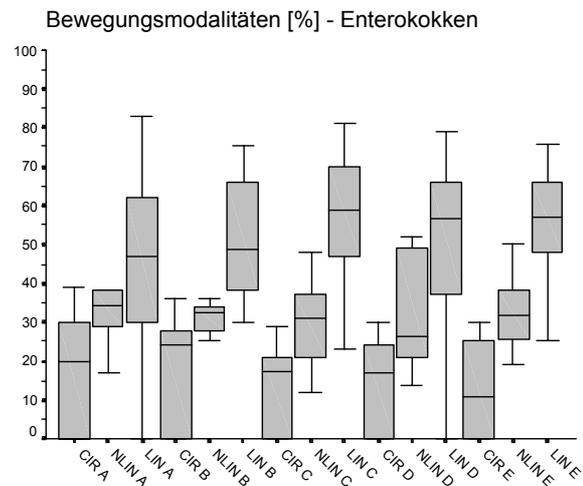


Abb. 6.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Bezüglich der Spermatozoengeschwindigkeiten ergab sich nach 6 Stunden eine hochsignifikante Geschwindigkeitsabnahme ($p < 0,0001$) für die Parameter VSL, VAP und VCL (Abb. 7.1-7.4). Diese Veränderung war ebenfalls von der gewählten Bakterienkonzentration unabhängig.

Abb. 7.1-7.4: Spermatozoengeschwindigkeiten (VAP, VCL, VAP) der Versuchsansätze mit Enterokokken mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

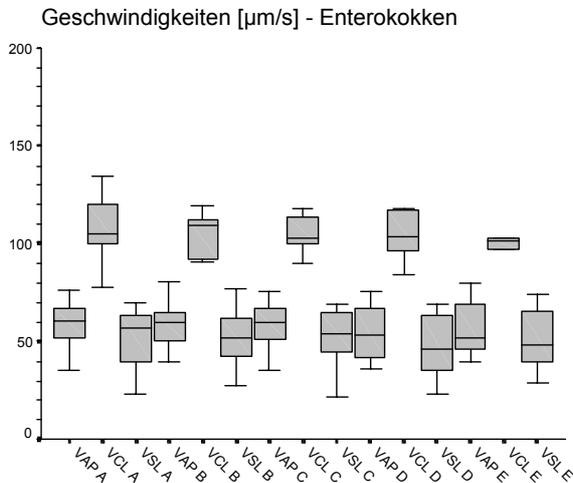


Abb. 7.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

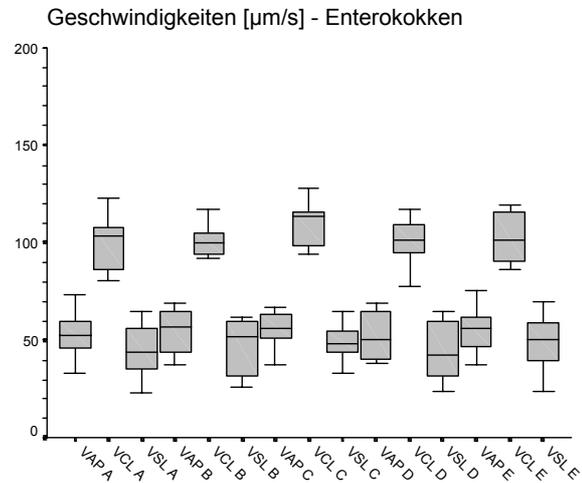


Abb. 7.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

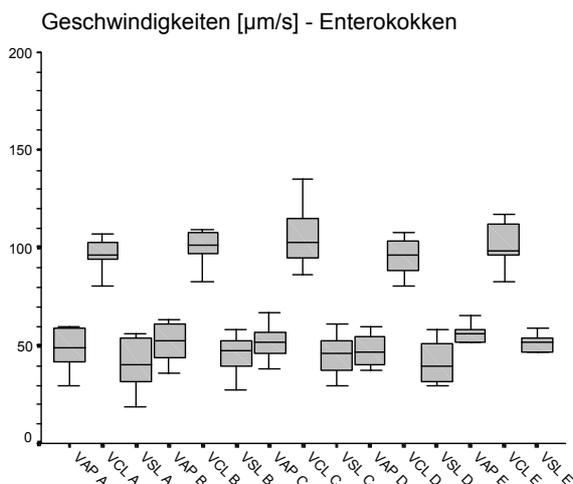


Abb. 7.3 Versuchsansätze nach 4 h Inkubation

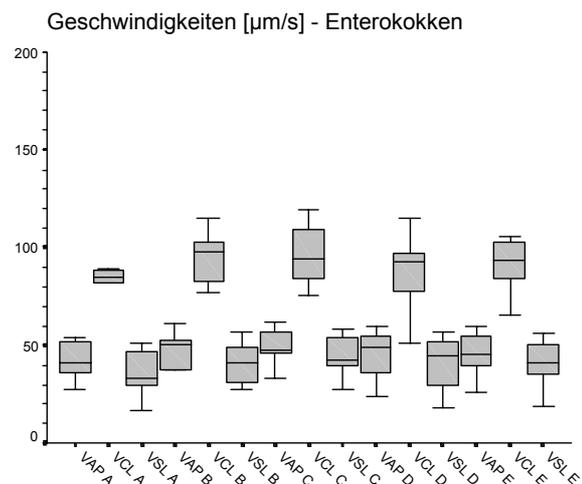


Abb. 7.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

3.3 Motilitätsanalysen mit *Pseudomonas aeruginosa*

Direkt nach Inkubationsbeginn war die mittlere Gesamtmotilität der einzelnen Versuchsansätze 93 % (Abb. 8.1). Im Versuchsverlauf, d.h. nach 2, 4 und 6 Stunden Inkubation fand sich eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) Abnahme der Motilität, die nicht von den unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (Abb. 8.1, 8.2, 8.3 und 8.4) abhing. Für die Gesamtmotilitäten nach 6 Stunden ergaben sich die folgenden Werte: In Ansatz A 76 %, B 82 %, C 82 %, D 79 % und Kontrolle E 90 % (Abb. 8.4). 6 Stunden nach Inkubation war eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme der Gesamtmotilität innerhalb der verschiedenen

Bakterienkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Ein Rückschluß auf eine bestimmte Bakterienkonzentration, die für diesen Effekt nach 6 Stunden verantwortlich sein könnte, war nicht möglich.

Abb. 8.1-8.4: Spermatozoengesamtmotilität der Versuchsansätze mit *Ps. aeruginosa* mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

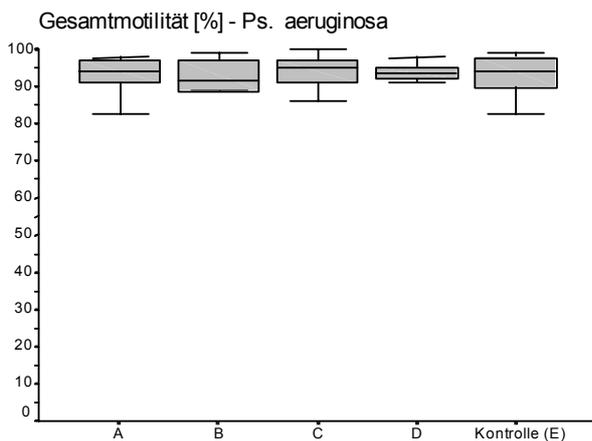


Abb. 8.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

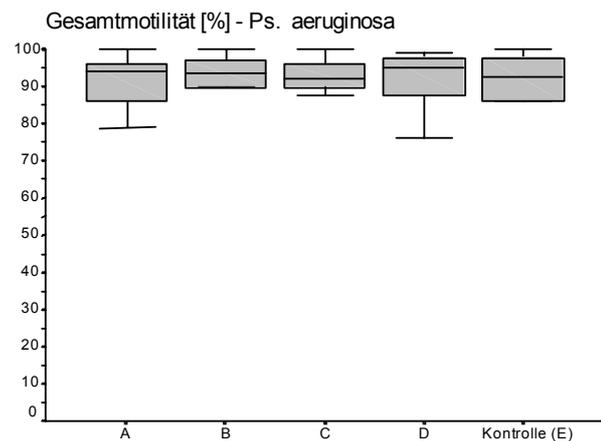


Abb. 8.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

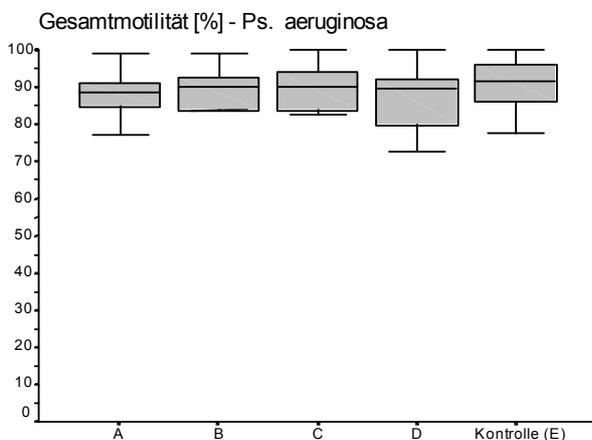


Abb. 8.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

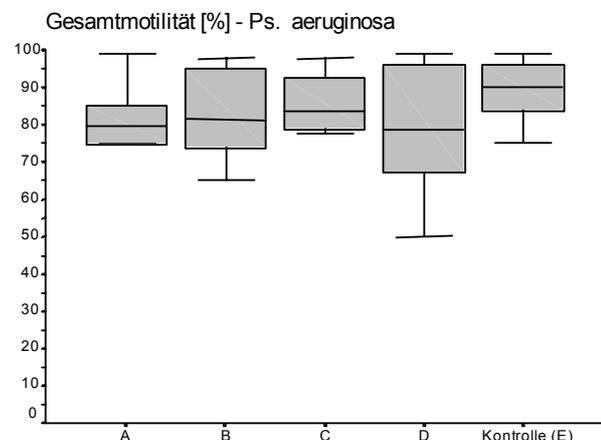


Abb. 8.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Die mittlere Progressivmotilität war direkt nach Inkubationsbeginn 80 % (Abb. 9.1). Im Verlauf von 6 Stunden Inkubation zeigte sich eine signifikante ($p < 0,0001$) Motilitätsabnahme (Abb. 9.1, 9.2, 9.3 und 9.4). Für die Progressivmotilität ergab sich nach 6 Stunden: In Ansatz A 53 %, B 58 %, C 57 %, D 55 % und in der Kontrolle E 69 %. Während der 6 Stunden Inkubation war eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Progressivmotilität innerhalb der verschiedenen Bakterienkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle zu

beobachten. Diese Motilitätsraten lagen nach 6 Stunden im Mittel bei 56 % und unterschieden sich nicht signifikant vom Kontrollansatz mit 69% (Abb. 9.4). Eine Zuordnung dieses Effektes zu einer bestimmten Bakterienkonzentration konnte nicht nachgewiesen werden.

Abb. 9.1-9.4: Spermatozoenprogressivmotilität der Versuchsansätze mit *Ps. aeruginosa* mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

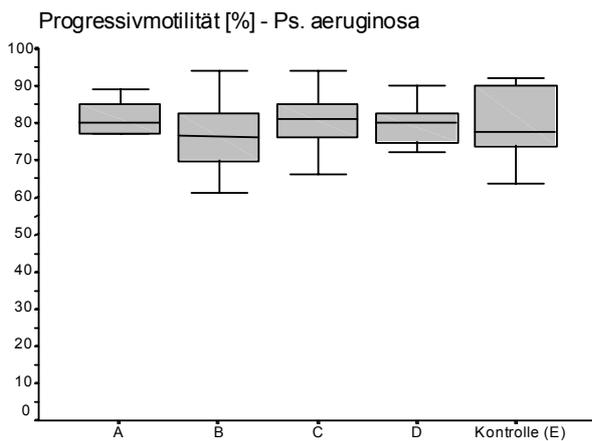


Abb. 9.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

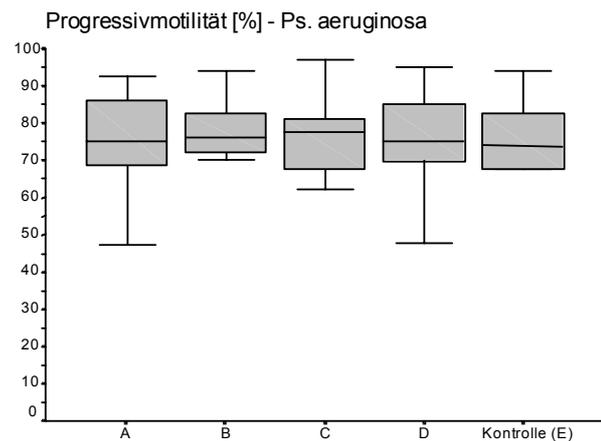


Abb. 9.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

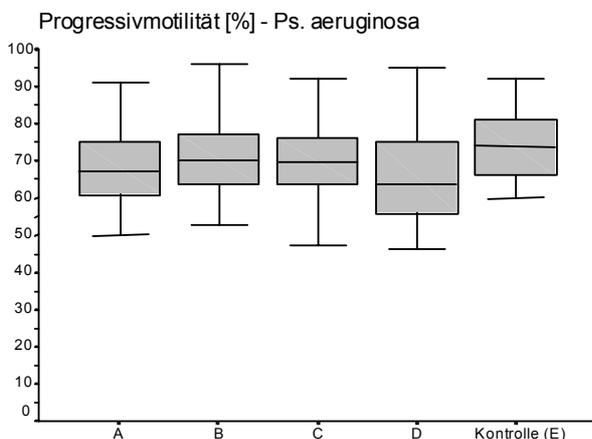


Abb. 9.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

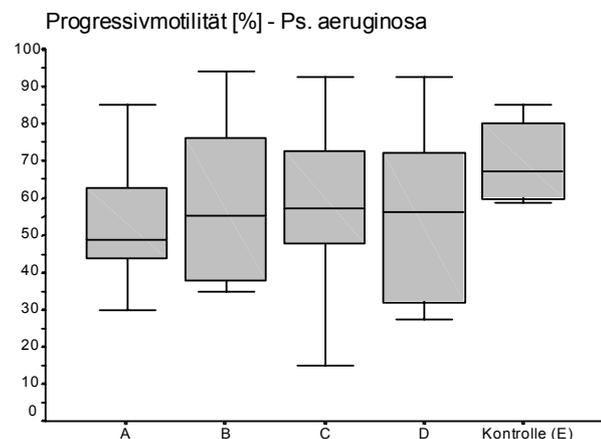


Abb. 9.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Bei den Bewegungsmodalitäten zeigte die nicht-lineare Vorwärtsbeweglichkeit (NLIN) eine signifikante ($p=0,011$) Zunahme im Verlauf der 6 Stunden Inkubation (Abb. 10.1, 10.2, 10.3 und 10.4). Die lineare Vorwärtsbeweglichkeit (LIN) und die Kreisläufer (CIR) zeigten im Verlauf von 6 Stunden keine signifikanten Unterschiede (Abb. 10.1-10.4).

Abb. 10.1-10.4: Spermatozoenbewegungsmodalitäten [Kreisläufer (CIR), nicht-lineare Vorwärtsbeweglichkeit (NLIN), lineare Vorwärtsbeweglichkeit (LIN)] der Versuchsansätze mit *Ps. aeruginosa* mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

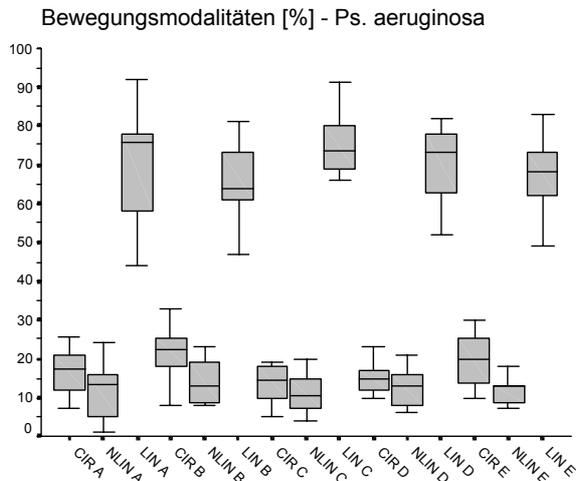


Abb. 10.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

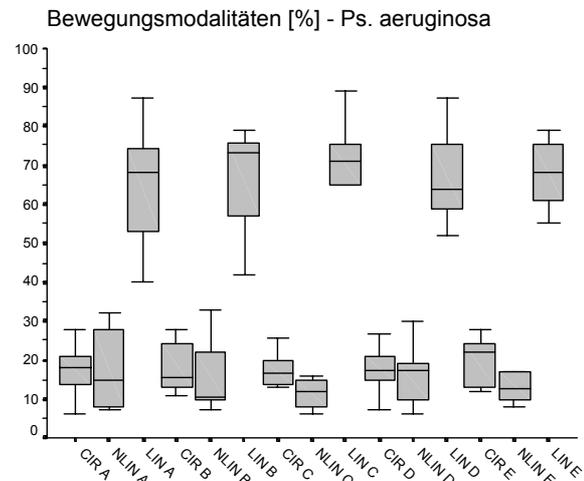


Abb. 10.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

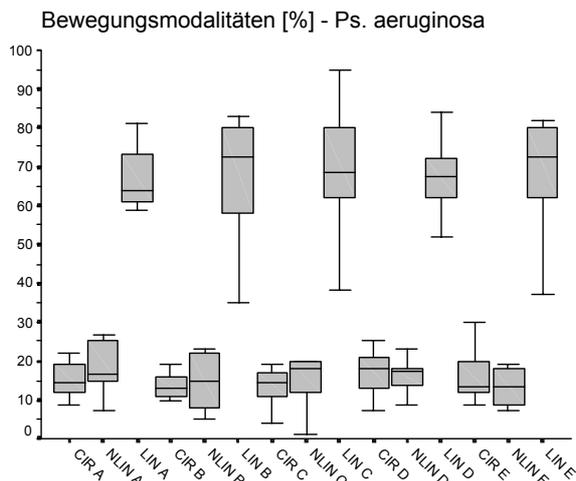


Abb. 10.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

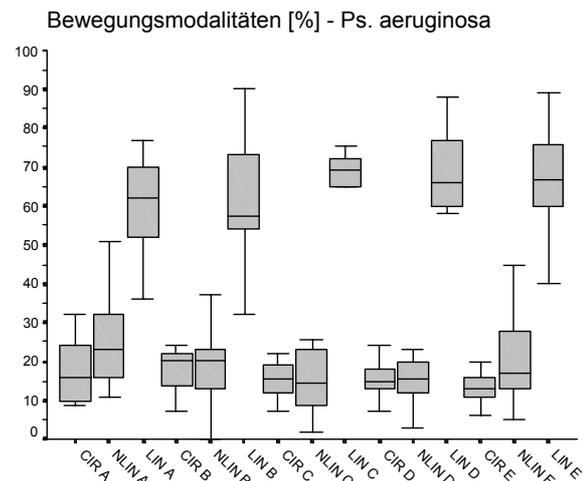


Abb. 10.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Die Geschwindigkeiten der Spermatozoen VSL und VAP fielen hochsignifikant ($p < 0,0001$), VCL signifikant ($p < 0,001$) innerhalb von 6 Stunden ab (Abb. 11.1, 11.2, 11.3 und 11.4). Die gewählte Bakterienkonzentration beeinflusste dies nicht (VSL $p = 0,072$, VAP $p = 0,162$, VCL $p = 0,668$).

Abb. 11.1-11.4: Spermatozoengeschwindigkeiten (VAP, VCL, VAP) der Versuchsansätze mit *Ps. aeruginosa* mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

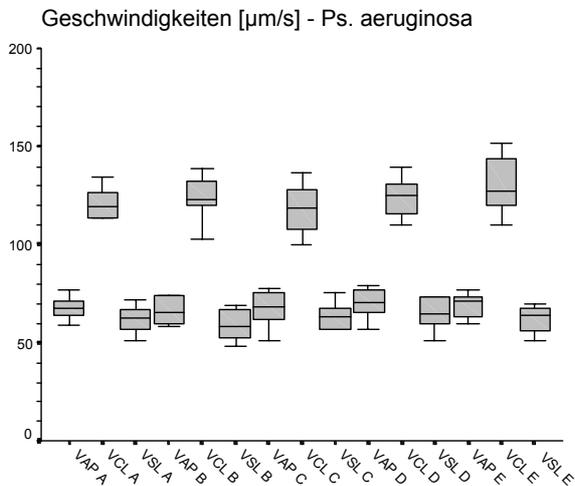


Abb.11.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

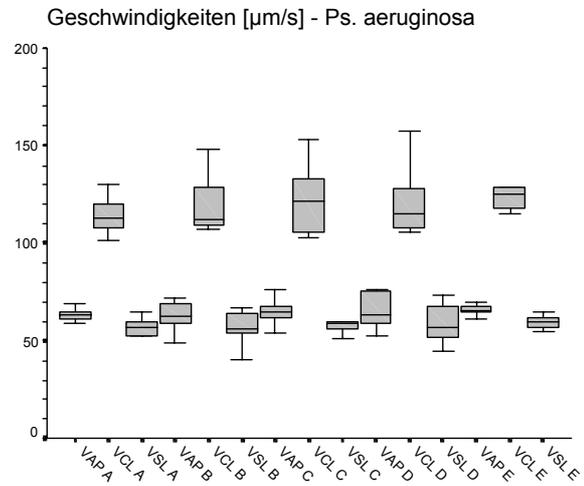


Abb. 11.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

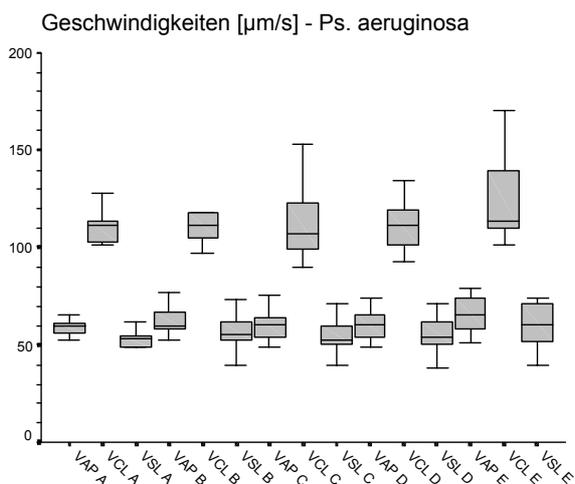


Abb. 11.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

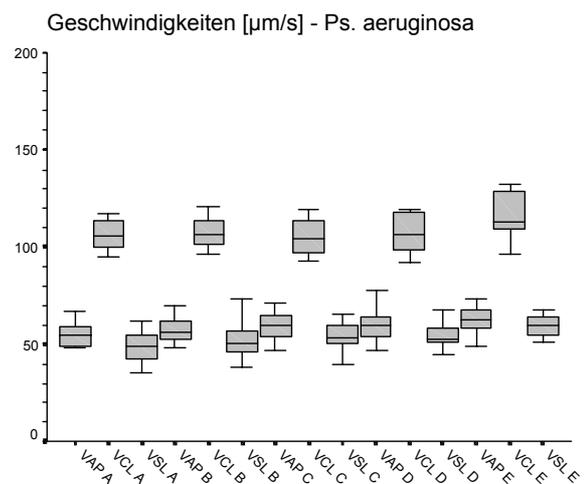


Abb. 11.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

3.4 Motilitätsanalysen mit *Candida albicans* und *Staphylococcus saprophyticus*

In dieser Versuchsreihe wurden zwei verschiedene Erreger getestet. Bei *Candida albicans* trat im Verlauf der 6-stündigen Inkubation eine Abnahme ($p=0,01$) der Gesamtmotilität auf (Abb. 12.4). Diese Motilitätsabnahme war jedoch zwischen den einzelnen *Candida*-Konzentrationen nicht signifikant ($p=0,213$) unterschiedlich. Dies verdeutlichen die mittleren Gesamtmotilitäten in den Probenansätzen A 98 %, B 98 % und in der Kontrolle D 98 % direkt nach Inkubationsbeginn (Abb. 12.1). Im Vergleich nach 6 Stunden

Inkubationsbeginn betrug die mittlere Gesamtmotilität der Probe A 95 %, B 95 % und der Kontrolle D 97 % (Abb. 12.4).

Staphylococcus saprophyticus zeigte in hohen Erregerzahlen (200-400 Millionen Erreger/ml) keinen Einfluß auf die Motilität. Die mittlere Gesamtmotilität betrug in Ansatz C 97 %, in der Kontrolle D 98 % direkt nach Inkubationsbeginn (Abb. 12.1) und nach 6 Stunden Inkubation in Ansatz C 96 % und in der Kontrolle D 97 % (Abb. 12.4).

Abb. 12.1-12.4: Spermatozoengesamtmotilität der Versuchsansätze mit *Candida albicans* und *Staphylococcus saprophyticus* (Staph. saprophyticus) mit der initialen Bakterienkonzentration von 20 Mio. *Candida*/ml (A), 2 Mio. *Candida*/ml (B), 200-400 Mio. Staph. saprophyticus/ml (C), Kontrolle (D).

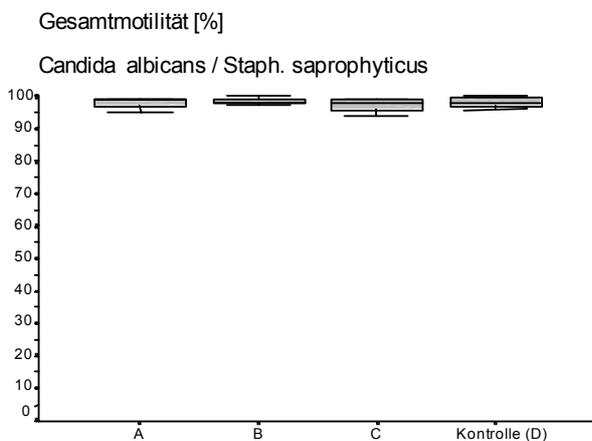


Abb.12.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

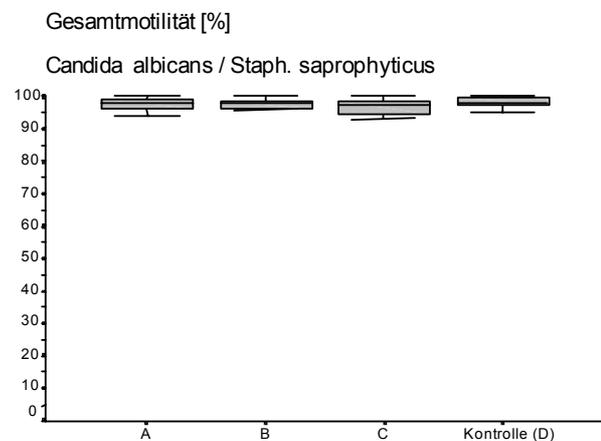


Abb. 12.2 Versuchsansätze 2h nach Inkubation

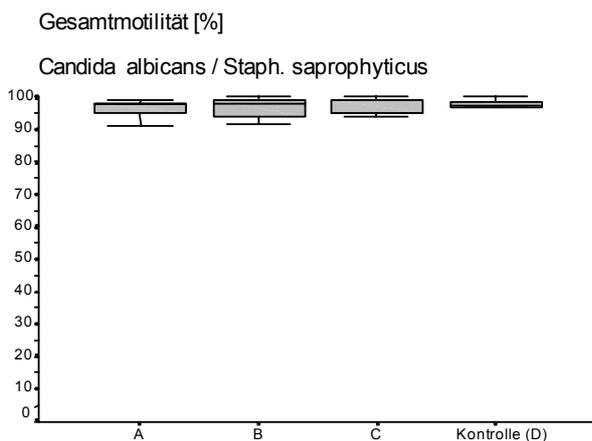


Abb. 12.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

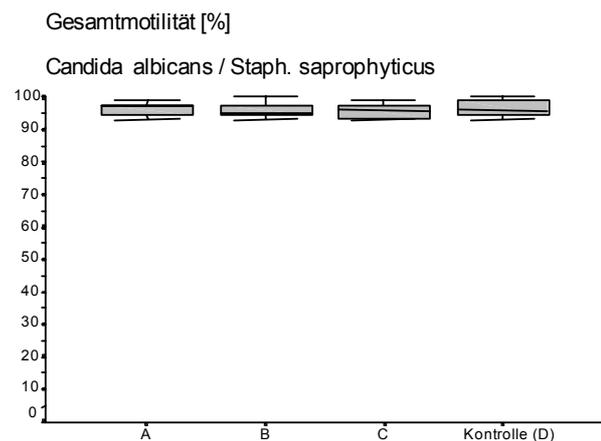


Abb. 12.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Bei der Progressivmotilität zeigte sich bei den Versuchen mit *Candida albicans* eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) Motilitätsabnahme direkt nach Inkubationsbeginn (Abb. 13.1), die sich auf die Probe A mit einer initialen Bakterienkonzentration von 20 Millionen *Candida*/ml

bezieht. Dieser Einfluß war zeitabhängig ($p=0,027$). Direkt nach Inkubationsbeginn war die mittlere Progressivmotilität in Ansatz A 65 %, B 88 % und in der Kontrolle D 90 % (Abb. 13.1). Nach 6 Stunden Inkubation betrug die mittlere Progressivmotilität in Ansatz A 67 %, B 85 % und in der Kontrolle D 86 % (Abb. 13.4).

Bei *Staphylococcus saprophyticus* zeigte sich in hohen getesteten Erregerzahlen kein Einfluß auf die Progressivmotilität. Hier war die mittlere Progressivmotilität in Ansatz C 87 %, in der Kontrolle D 90 % direkt nach Inkubationsbeginn (Abb. 13.1) und 6 Stunden nach Inkubationsbeginn betrug sie in Ansatz C 85 % und in der Kontrollprobe D 86 % (Abb. 13.4).

Abb. 13.1-13.4: Spermatozoenprogressivmotilität der Versuchsansätze mit *Candida albicans* und *Staphylococcus saprophyticus* (Staph. saprophyticus) mit der initialen Bakterienkonzentration von 20 Mio. *Candida*/ml (A), 2 Mio. *Candida*/ml (B), 200-400 Mio. *Staph. saprophyticus*/ml (C), Kontrolle (D).

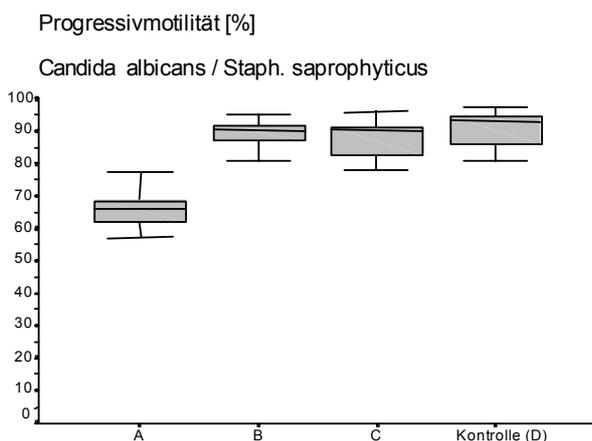


Abb.13.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

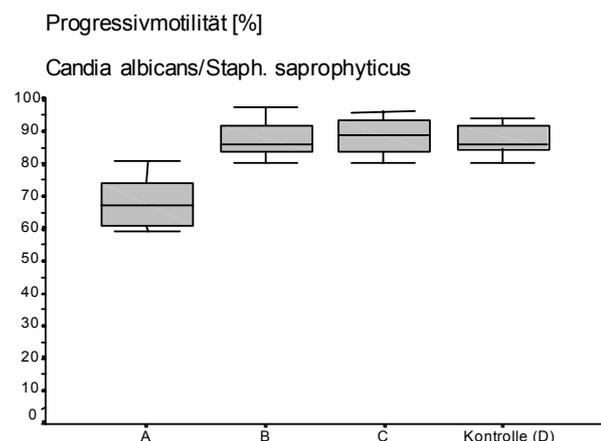


Abb. 13.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

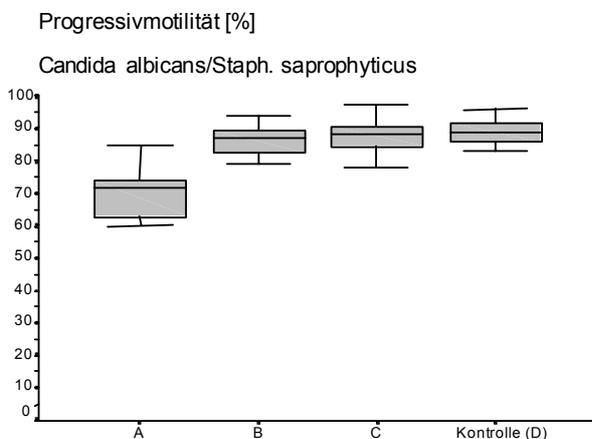


Abb. 13.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

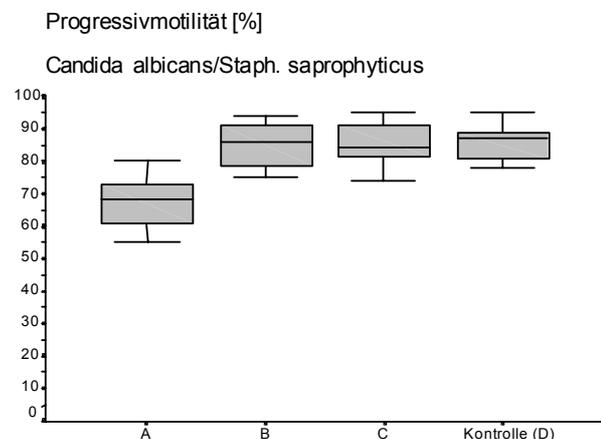


Abb. 13.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Die Analyse der Bewegungsmodalitäten zeigte im Verlauf der Inkubation von 6 Stunden eine hochsignifikante ($p=0,001$) Abnahme bei den Kreisläufern (CIR) und der linear progressiv motilen Spermatozoen (LIN), bei den nicht-linear progressiv motilen Spermatozoen (NLIN) eine signifikante ($p=0,02$) Abnahme der Vorwärtsbeweglichkeit (Abb. 14.1, 14.2, 14.3 und 14.4). Nur bei den linear progressiven Spermatozoen (LIN) konnte die Abnahme der Vorwärtsbeweglichkeit auf eine signifikante Abhängigkeit von der Erregerkonzentration ($p=0,031$) zurückgeführt werden (Abb. 14.1-14.4).

In den Proben mit *Staphylococcus saprophyticus* konnten im Verlauf der Inkubation in den Bewegungsmodalitäten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 14.1-14.4).

Abb. 14.1-14.4: Spermatozoenbewegungsmodalitäten [Kreisläufer (CIR), nicht-lineare Vorwärtsbeweglichkeit (NLIN), lineare Vorwärtsbeweglichkeit (LIN)] der Versuchsansätze mit *Candida albicans* und *Staphylococcus saprophyticus* (Staph. saprophyticus) mit der initialen Bakterienkonzentration von 20 Mio. *Candida*/ml (A), 2 Mio. *Candida*/ml (B), 200-400 Mio. *Staph. saprophyticus*/ml (C), Kontrolle (D).

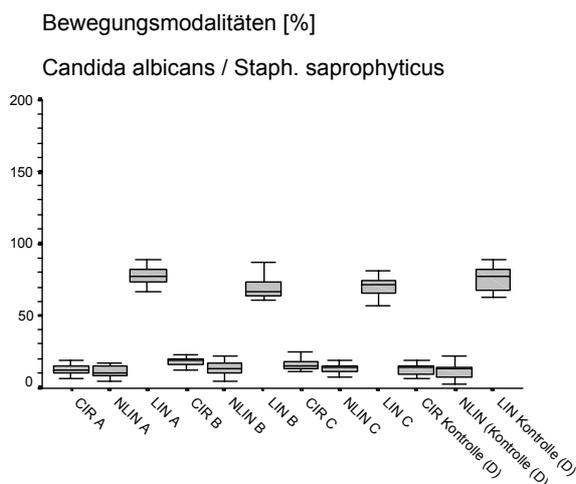


Abb.14.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

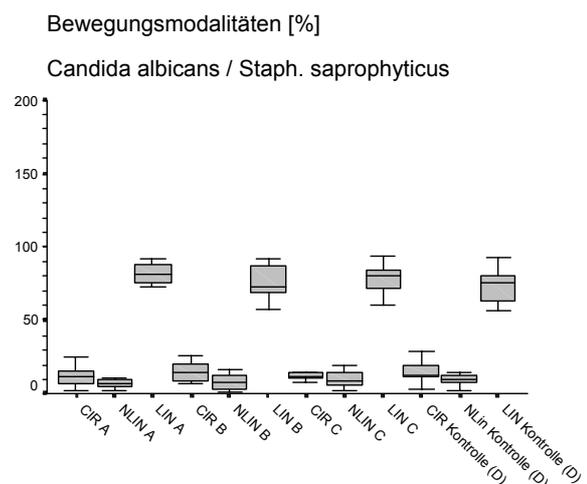


Abb. 14.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

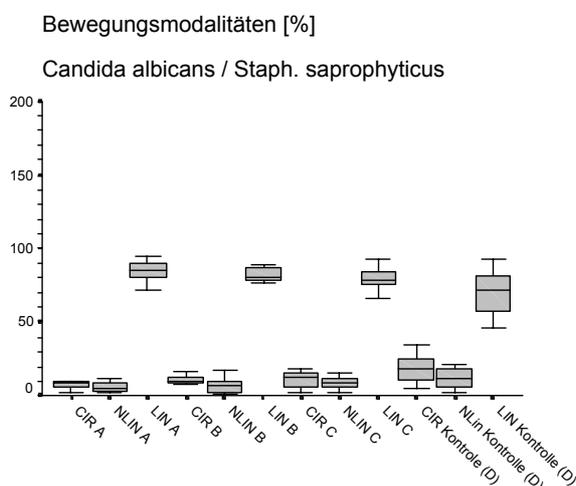


Abb. 14.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

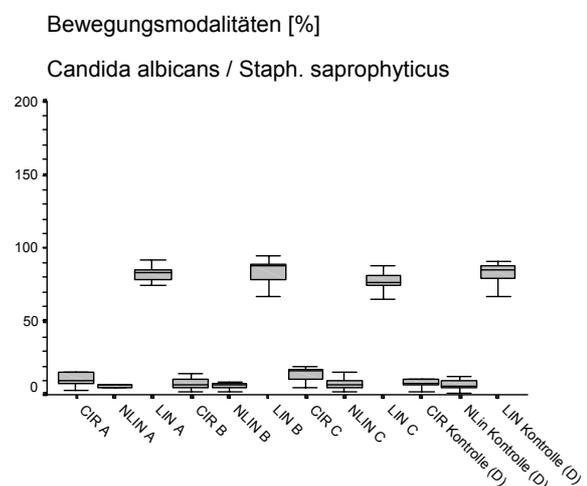


Abb. 14.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Die Geschwindigkeiten VSL und VAP zeigten bei den Versuchen mit *Candida albicans* keine signifikanten ($p=0,71$) Unterschiede im Verlauf der Inkubationszeit von 6 Stunden (Abb. 15.1, 15.2, 15.3 und 15.4). Während der Inkubation waren jedoch innerhalb der verschiedenen Erregerkonzentrationen bei beiden Geschwindigkeiten eine Abnahme (VSL $p=0,011$, VAP $p=0,009$) zu verzeichnen. Dies stand nicht in Beziehung zu dem zeitlichen Verlauf der Versuche. Bei der Geschwindigkeit VCL hingegen zeigte sich eine signifikante ($p<0,001$) Abnahme im Verlauf der 6-stündigen Inkubation.

Bei den Proben mit *Staphylococcus saprophyticus* war ebenfalls bei den Geschwindigkeiten VSL ($p=0,006$) und VCL ($p=0,004$) eine signifikante Abnahme im Verlauf von 6 Stunden zu verzeichnen (Abb. 15.1, 15.2, 15.3 und 15.4). Diese Veränderung war jedoch unabhängig von der Bakterienkonzentration. Bei der Geschwindigkeit VAP gab es keinerlei signifikanten Unterschiede.

Abb. 15.1-15.4: Spermatozoengeschwindigkeiten (VAP, VCL, VAP) der Versuchsansätze mit *Candida albicans* und *Staphylococcus saprophyticus* (*Staph. saprophyticus*) mit der initialen Bakterienkonzentration von 20 Mio. *Candida*/ml (A), 2 Mio. *Candida*/ml (B), 200-400 Mio. *Staph. saprophyticus*/ml (C), Kontrolle (D).

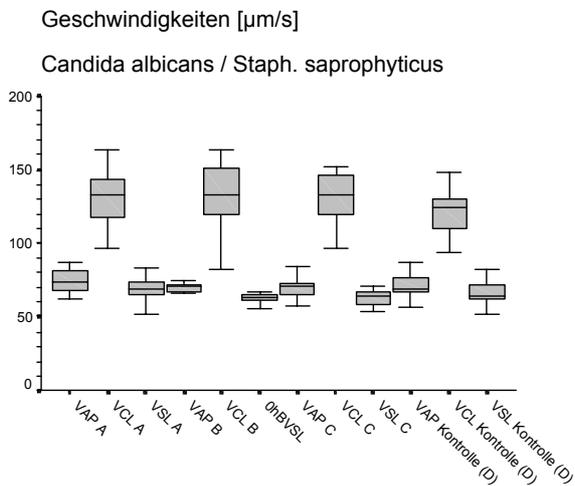


Abb.15.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

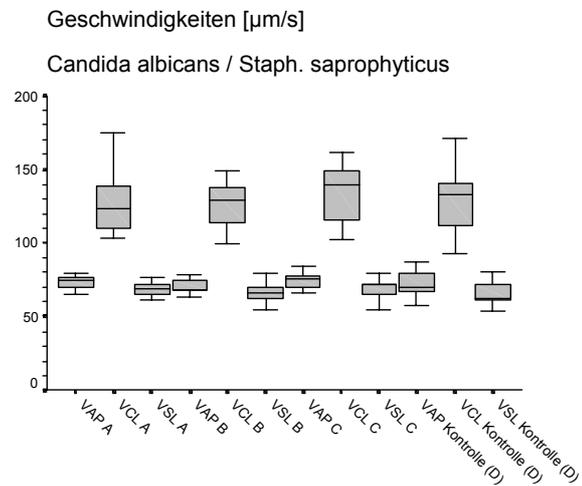


Abb. 15.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

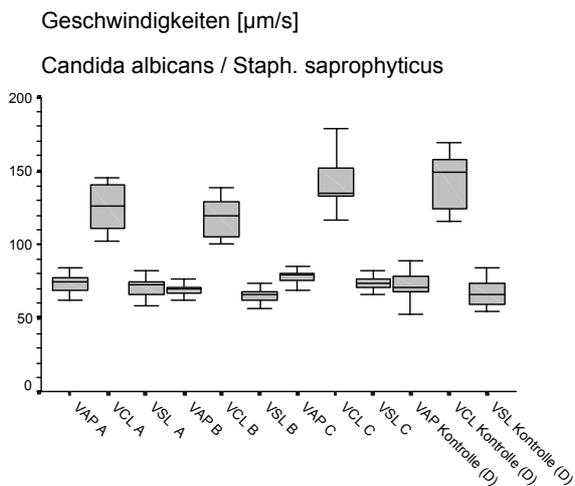


Abb. 15.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

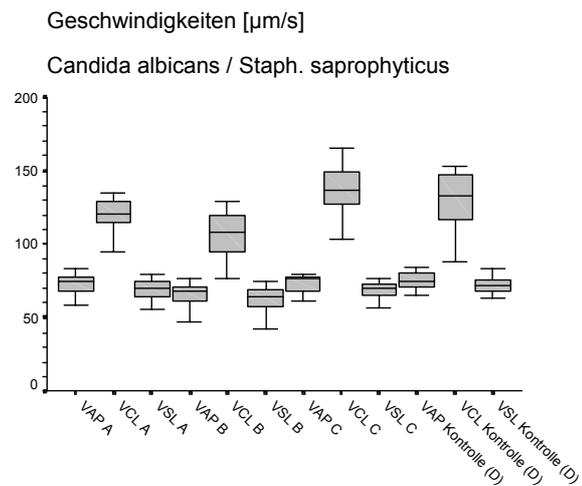


Abb. 15.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

3.5 Motilitätsanalysen mit β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B

In diesem Experiment war die mittlere Gesamtmotilität der einzelnen Proben direkt nach Inkubationsbeginn 97 % (Abb. 15.1). Im Verlauf des Versuches über 6 Stunden zeigte sich eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) Abnahme der Gesamtmotilität (Abb. 16.1, 16.2, 16.3 und 16.4). Die mittleren Gesamtmotilitäten nach 6 Stunden Inkubationszeit waren im Ansatz A 26 %, im Ansatz B 80 %, im Ansatz C 95 %, im Ansatz D 94 % und in der Kontrolle E 97 % (Abb. 16.4). Dieser negative Einfluß auf die Gesamtmotilität wird besonders deutlich

nach 6 Stunden Inkubation im Probenansatz A mit der initial höchsten Bakterienausgangskonzentration von 2 Mio./ml (Abb. 16.4).

Abb. 16.1-16.4: Spermatozoengesamtmotilität der Versuchsansätze mit Streptokokken Gr. B mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

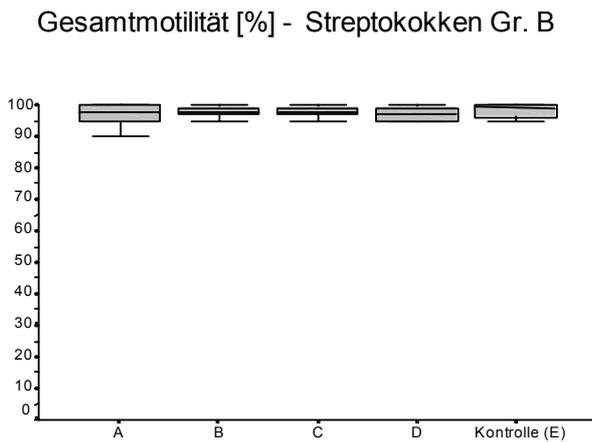


Abb.16.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

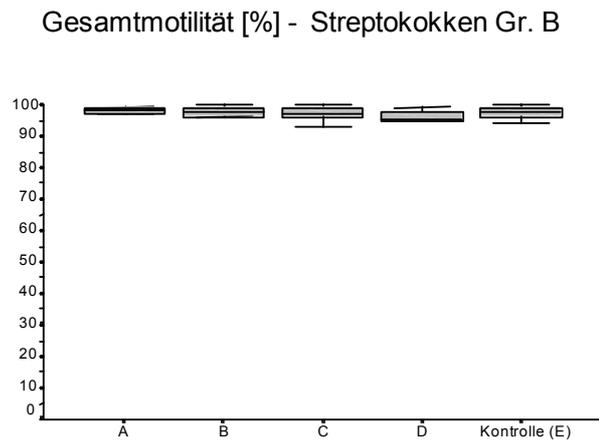


Abb. 16.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

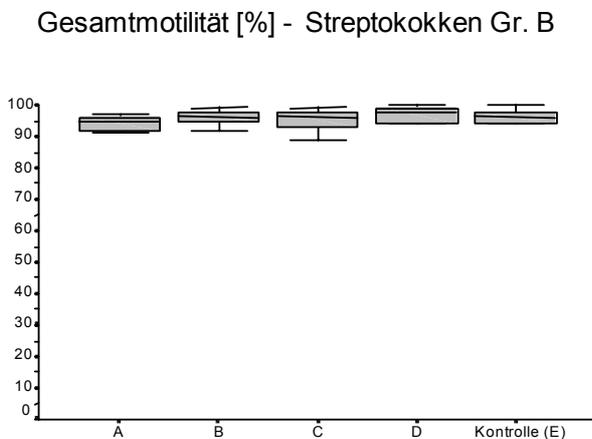


Abb. 16.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

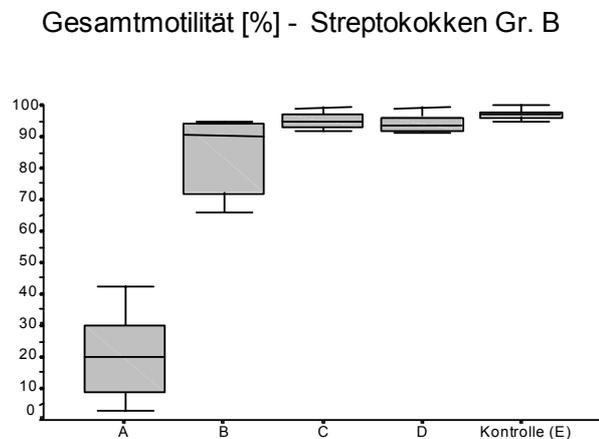


Abb. 16.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Bei der mittleren Progressivmotilität fand sich direkt nach Inkubation ein Prozentsatz von 88 % (Abb. 17.1). Ebenfalls zeigte sich im Verlauf von 6 Stunden eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) Abnahme der Progressivmotilität (Abb. 17.1, 17.2, 17.3 und 17.4). Die mittlere Progressivmotilität betrug nach 6 Stunden im Ansatz A 13 %, im Ansatz B 55 %, im Ansatz C 82 %, im Ansatz D 83 % und in der Kontrolle E 87 % (Abb. 17.4). Der negative Einfluß

der Erregerkonzentration wird im Probenansatz A mit der initial höchsten Bakterienausgangskonzentration von 2 Mio./ml besonders deutlich.

Abb. 17.1-17.4: Spermatozoenprogressivmotilität der Versuchsansätze mit Streptokokken Gr. B mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

Progressivmotilität [%] - Streptokokken Gr. B

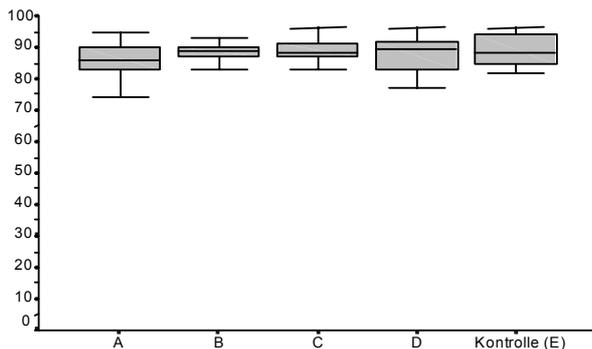


Abb.17.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

Progressivmotilität [%] - Streptokokken Gr. B

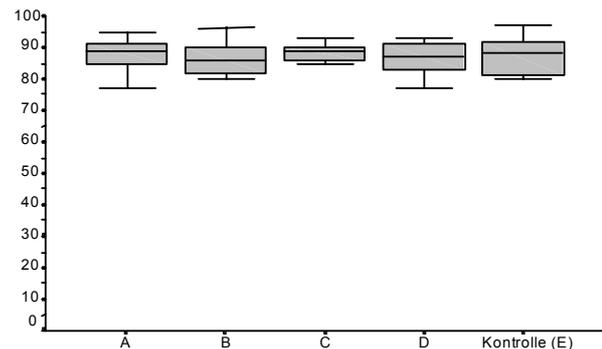


Abb. 17.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

Progressivmotilität [%] - Streptokokken Gr. B

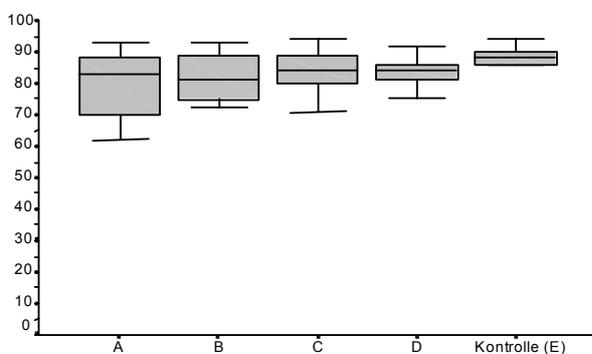


Abb. 17.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

Progressivmotilität [%] - Streptokokken Gr. B

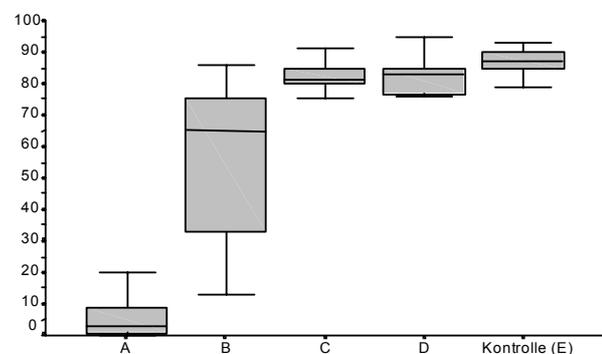


Abb. 17.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Bei den verschiedenen Bewegungsarten der Spermatozoen zeigte sich bei den linear progressiv motilen (LIN) und nicht-linear progressiv motilen (NLIN) Spermatozoen eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) Abnahme der Vorwärtsbeweglichkeit während der 6 Stunden Inkubation (Abb. 18.1, 18.2, 18.3 und 18.4), wobei dies am deutlichsten in den beiden Proben A und B mit den höheren Bakterienkonzentrationen zu beobachten war. Dabei verschob sich das Verhältnis von linear motilen (LIN) zugunsten der nicht-linear motilen

(NLIN) Spermatozoen (Abb. 18.4). Bei den Kreisläufern (CIR) zeigten sich keine signifikante Veränderung im Versuchsverlauf.

Abb. 18.1-18.4: Spermatozoenbewegungsmodalitäten [Kreisläufer (CIR), nicht-lineare Vorwärtsbeweglichkeit (NLIN), lineare Vorwärtsbeweglichkeit (LIN)] der Versuchsansätze mit Streptokokken Gr. B mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

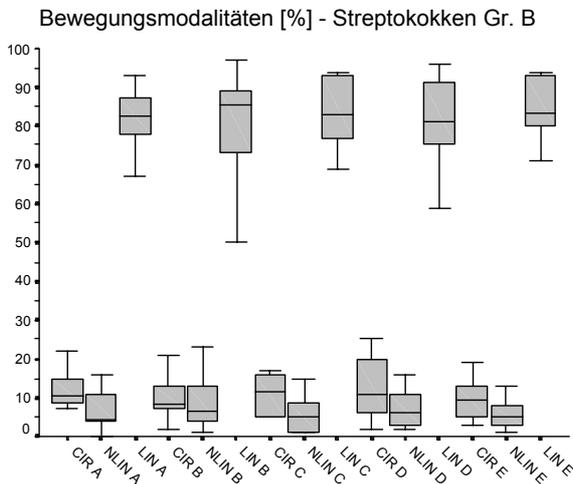


Abb.18.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

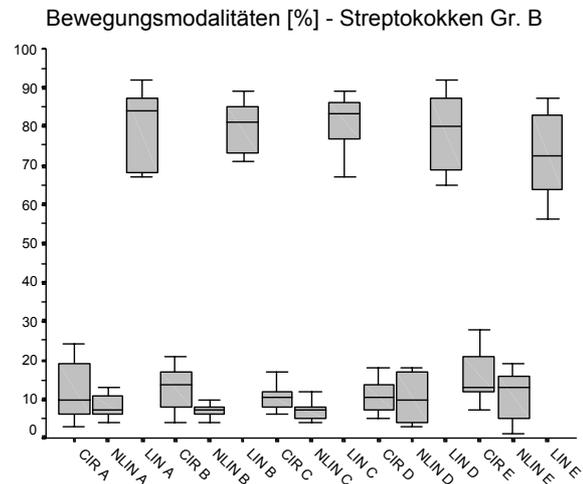


Abb. 18.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

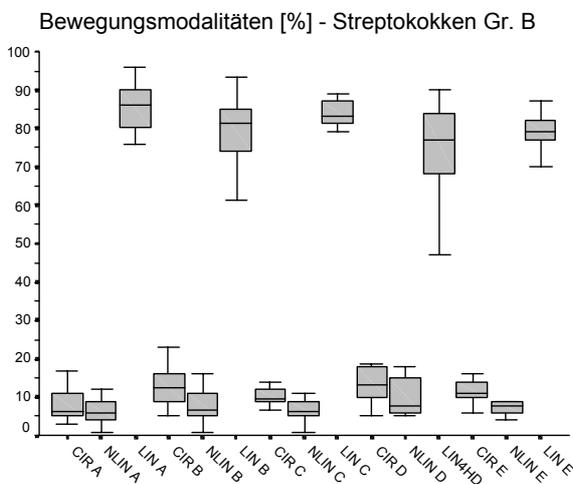


Abb. 18.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

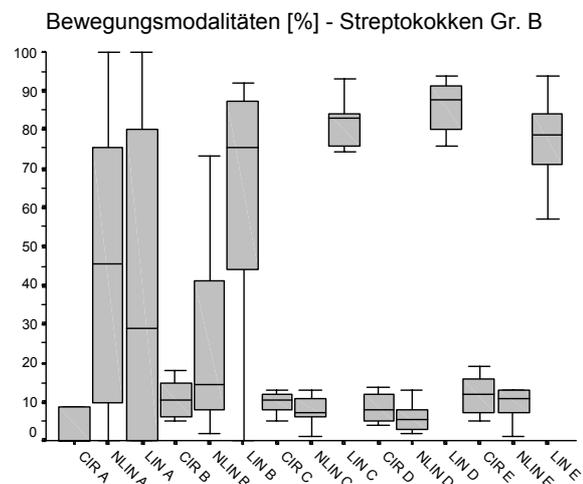


Abb. 18.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

Die Geschwindigkeiten VCL, VAP und VSL zeigten einen hochsignifikanten ($p < 0,0001$) konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitsverlust während der Inkubationszeit von 6 Stunden (Abb. 19.1, 19.2, 19.3 und 19.4). Dies zeigte sich am ausgeprägtesten in der letzten Messung nach 6 Stunden Inkubation in der höchsten Konzentration A und in der Konzentration B (Abb. 19.4).

Abb. 19.1-19.4: Spermatozoengeschwindigkeiten (VAP, VCL, VAP) der Versuchsansätze mit Streptokokken Gr. B mit der initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml (A), 200.000/ml (B), 20.000 (C), 2000 (D), Kontrolle (E).

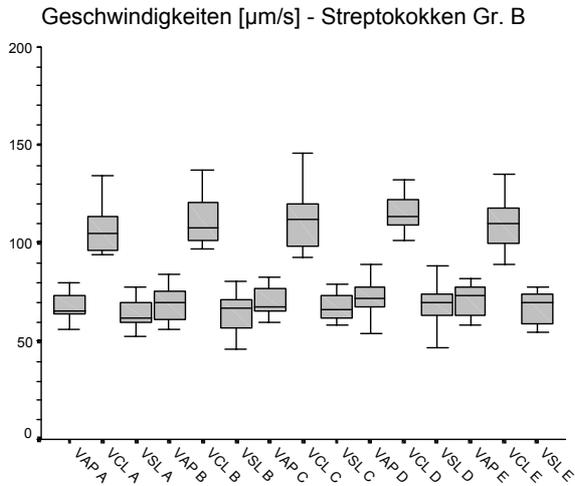


Abb.19.1 Versuchsansätze direkt nach Inkubation

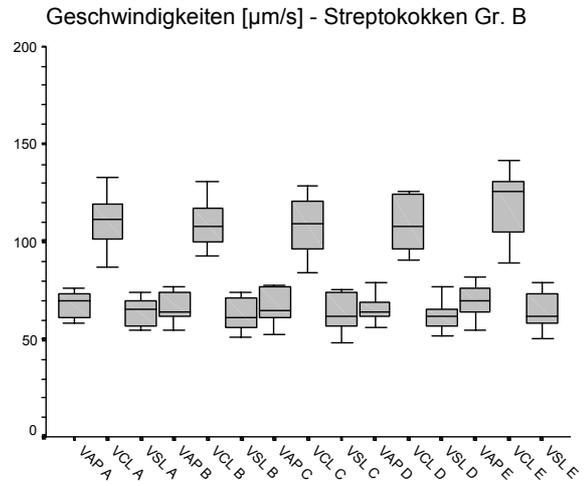


Abb. 19.2 Versuchsansätze 2 h nach Inkubation

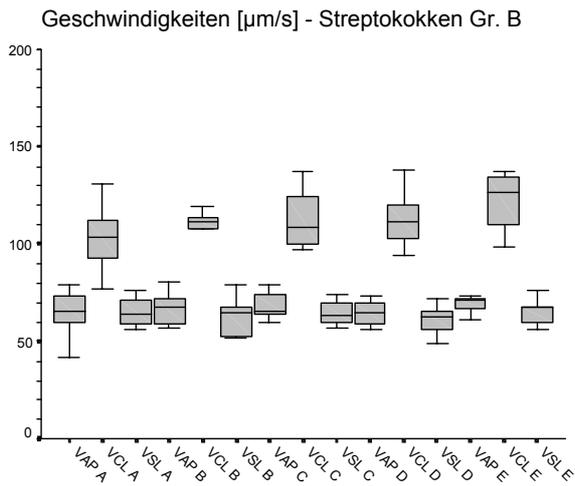


Abb. 19.3 Versuchsansätze 4 h nach Inkubation

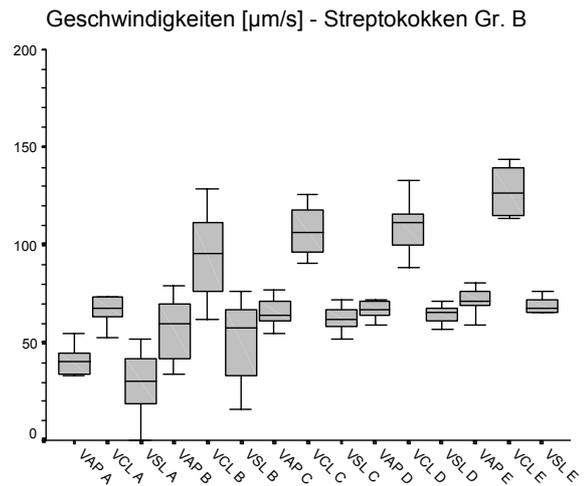


Abb. 19.4 Versuchsansätze 6 h nach Inkubation

4 Diskussion

4.1 Verwendete Methoden

4.1.1 Probengewinnung und Spermatozoenaufbereitung

Nativejakulate wurden durch Masturbation gesunder Versuchspersonen in einem speziellen Spenderraum in der Klinik gewonnen. Zum Auffangen des Ejakulates wurden sterile Plastikeinmalgefäße aus Polypropylen mit Schraubdeckelverschluß (Sherwood) verwendet (Ludwig und Frick 1987). Entsprechend allgemeiner Regeln waren die Spender dazu angehalten, sich vor der Masturbation das äußere Genitale mit Wasser und Seife zu reinigen und nach Möglichkeit vor der Ejakulatspende noch zu miktionieren, damit die Kontamination des Ejakulates aus der vorderen Harnröhre so gering wie möglich gehalten wurde. Ein weiteres Kriterium zur Auswahl der Probanden war, daß sie derzeit keinerlei Medikamente, insbesondere Antibiotika wegen ihrer möglichen Einschränkung der Spermatogenese oder Spermatozonenfunktion (Schlegel et al. 1991, Hargreaves et al. 1998), einnahmen und weiterhin in der kürzeren Vergangenheit nicht an einer urogenitalen Infektion erkrankt waren. Die hier beschriebene Technik zur Ejakulatgewinnung ist für die Routineuntersuchungen in der Praxis sowie für wissenschaftliche Untersuchungen allgemein anerkannt (Ludwig und Frick 1987, Krause und Weidner 1998, WHO 1992, WHO 1999).

Die Untersuchungen des Ejakulates erfolgte nach den WHO-Empfehlungen von 1992 (WHO 1992). Zusätzlich wurde in allen Versuchen die computer-assistierte Spermatozoenanalyse (aus dem Englischen „Computer Assisted Sperm Analyser“, abgekürzt CASA) - der MIKA-MOTION-ANALYSER[®] verwendet. Diese Untersuchungsmethode ist eine mittlerweile etablierte Methode zur standardisierten und objektiv-reproduzierbaren Motilitätsmessung von humanen Spermatozoen (ESHRE Andrology Special Interest Group 1996 und 1998). Da die Versuchsreihen über mehrere Stunden andauerten und immer bis zu 5 Proben zum gleichen Zeitpunkt gemessen werden mußten, war eine einfache, untersucherunabhängige und schnelle Meßmethode sehr wichtig. Diese Kriterien erfüllte die CASA vollständig und garantierte einen zügigen und zum jeweiligen Meßzeitpunkt fast zeitgleiche Messungen. In Kapitel 4.1.2 wird die CASA noch näher diskutiert werden.

Bei der Aufarbeitung der Nativejakulate wurde auf eine detaillierte Analyse der Morphologie verzichtet, da die Bedeutung der Spermatozoenmorphologie immer noch kontrovers diskutiert wird. Die WHO hat 1992 in ihrem Laborhandbuch (WHO 1992) den prozentualen Anteil morphologisch normaler Spermatozoen von 50 % (WHO 1987) auf 30 % herabgesetzt. Das 1999 neu erschienene WHO-Handbuch gibt keinen Normwert mehr an und empfiehlt bei der Klassifikation eines normalen Spermatozoons die Anwendung der „strict

criteria“ (Kruger et al. 1986, Menkveld et al. 1990). Werden diese Kriterien zur morphologischen Klassifikation angewendet, ließen sie gegebenenfalls eine Normwertsenkung auf ca. 15 % normale Spermatozoen zu, wenn man die Ergebnisse mit den Fertilitätsraten vergleicht (Menkveld et al. 1990). Es ist anzumerken, daß bei männlichen Adnexinfektionen, wie z.B. Prostatitis und Epididymitis, die morphologische Routineanalyse nach den strikten Kriterien nicht ausreichend ist, um morphologische Veränderungen zu erkennen (Menkveld et al. 1999, Huwe et al. 1999 und 2000 a). Nur mit speziellen Analysen, wie z.B. der Bestimmung des Akrosomindex und der elongierten Spermatozoen, konnten bei chronischer Entzündung morphologische Veränderungen nachgewiesen werden (Huwe et al. 1999 und 2000 a).

Nach der routinemäßigen Untersuchung des Nativejakulates erfolgte die Aufbereitung der Proben mittels Swim-up-Technik. Dies ist eine etablierte Methode zur Separation von hochmotilen Spermatozoen in ein Kulturmedium (Wilke et al. 1991, Hano et al. 1986). Dieses Verfahren basiert auf der aktiven Wanderung bzw. Bewegung der Spermatozoen gegen die Schwerkraft in ein Kulturmedium hinein, z.B. in das bei unseren Versuchsreihen verwendete Medium HAM's F 10 (Ludwig und Frick 1987, Wilke et al. 1991). Der entscheidende Vorteil der Swim-up-Technik war die hohe prozentuale Spermatozoenmotilität der gewonnenen Spermatozoensuspension (Hano et al. 1986, Möslin et al. 1987, Wilke et al. 1991), die für die Zielsetzung der Motilitätsmessungen von wesentlicher Bedeutung war. Des weiteren war für die Versuche die Reinheit der Spermatozoensuspension, d. h. die fast völlige Freiheit von kontaminierenden Bakterien oder störenden Elementen, wie z.B. Spermatogenezellen oder Leukozyten, wichtig. Die Swim-up-Technik garantierte die Selektion von hochmotilen Debris-freien Spermatozoenpopulationen (Ludwig und Frick 1987, Hano et al. 1986). Im Vergleich mit den anderen Spermatozoenaufarbeitungen, z.B. die von Paulson und Polakoski (1977 b) beschriebene Glaswollfiltration oder die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation, bei der die verbleibenden Silikonpartikel in der Spermatozoensuspension nur durch weitere Waschschrte entfernt werden können, was zu erneuten Motilitätsverlusten führt, schienen nicht geeignet.

Ein Nachteil der Methode liegt im deutlichen Verlust von Spermatozoen durch den Waschvorgang, da sich nur bis zu 30 % der motilen Spermien im Überschichtungsmedium ansammeln und die restlichen 70 % im Hardpellet verbleiben (Hano et al. 1986, Ludwig und Frick 1987). Dies zeigte sich bei den Probenaufbereitungen sehr deutlich, da jeweils für eine Versuchsreihe 1 ml Spermatozoensuspension benötigt wurden, also auch unser Hardpellet mit den zentrifugierten Spermatozoen mit 1 ml Medium überschichtet werden mußte. Dies stellt eine sehr hohe Menge dar, und hierfür waren folglich Ejakulatproben mit einer überdurchschnittlichen Spermatozoendichte und -motilität wünschenswert, damit die

Ausbeute an motilen Spermatozoen den intern festgelegten Versuchskriterien entsprach (80 % Progressivmotilität, 22 Mio. Spermatozoen/ml). Bei unseren Probanden waren diese Ausgangskriterien erfüllt. Ein weiteres Problem kann das Abziehen des Überstandes der Probe mit der Spritze darstellen. Bei stark viskösen Ejakulaten kann das Hardpellet, welches sich nach der Zentrifugation am Boden des Probenröhrchens ansammelt, mit der Spritze angesaugt und somit für eine weitere Verarbeitung unbrauchbar werden. Das gleiche gilt für das anschließende Überschichten des Hardpellets mit Medium, bei dem das Pellet bei unvorsichtigem Überschichten aufgewirbelt werden kann und somit wieder Verunreinigungen, Spermatogenezellen und Leukozyten aufgewirbelt werden können und die Reinheit der Swim-up-Probe gefährden würden. Trat ein solcher Fehler bei der Probenaufbereitung auf, wurde der Swim-up verworfen und nicht für eine Versuchreihe verwendet.

4.1.2 Motilitätsanalysen mit der computerassistierten Spermatozoenanalyse (CASA)

In allen Versuchsreihen wurde für die Messung der Motilitätsparameter eine computergestützte Spermatozoenanalyse die MIKA MOTION ANALYSIS[®] benutzt. Dieses Verfahren zur Motilitätsmessung von Spermatozoen beruht auf dem Prinzip der „multiple exposure photography“ (MEP) welches von Makler Ende der 70er Jahre entwickelt und von ihm immer wieder überarbeitet wurde (Makler 1978/1980 a und b). Diese Methode stellte das erste objektiv-reproduzierbare Verfahren zur Motilitätsbestimmung dar. So werden neben der prozentualen Bestimmung der Motilität ebenso die Geschwindigkeiten der Spermatozoen und deren Bewegungscharakteristika erfaßt. Das früher aufwendige manuelle, jedoch objektive Analysieren bei der MEP wird heutzutage durch entsprechende Computer mit hoher Rechengeschwindigkeit und einer speziell entwickelten Software übernommen. Von Davis und Katz wurde der Begriff CASA, im Englischen „Computer-aided sperm analyser“ bzw. im Deutschen „Computer-assistierte Spermatozoenanalyse“, geprägt (Davis und Katz 1986). Die modernen CASA-Systeme funktionieren nach dem Grundprinzip, daß ein mikroskopisches Bild einer Spermatozoensuspension über eine Videokamera aufgezeichnet und mittels spezifischer Software in einem angeschlossenen Computer digitalisiert, d. h. in einzelne Bildpunkte (Pixel) zerlegt wird. Dabei sind die heutigen Rechner in der Lage, durch Kontrastunterschiede und Größe einzelner Bildgruppen Spermatozoen von anderen Zellen des Ejakulates zu unterscheiden. Zur zusätzlichen Identifikation eines Spermiums dient eine spezielle Schwanzerkennung.

In dieser Arbeit wurde ein CASA-Gerät der „zweiten Generation“, welches sich durch eine anwenderfreundliche Windows[®]-Oberfläche gegenüber der früheren DOS-Oberfläche auszeichnete, benutzt, und welches dem schnellen Arbeiten bei den zahlreichen

Motilitätsanalysen sehr entgegen kam. Ein weiterer Vorteil für die Versuche schien neben der Objektivität der Messungen die exzellente Reproduzierbarkeit (Krause und Viethen 1999) und geringe Interassayvariabilität (Krause et al. 1993). Mittlerweile zeichnen sich die Dichte- und Motilitätsmessungen durch eine hohe Genauigkeit bzw. Korrelation gegenüber der früheren Zähl- bzw. Schätzmethode aus (Mathur et al. 1986, Krause et al. 1993, Centola 1996). Knuth und Nieschlag (1988) hingegen beschreiben keine gute Korrelation zwischen den Dichte- und Motilitätsmessungen der CASA gegenüber der klassischen Zähl- bzw. Schätzmethode. Sie beschreiben, daß Ejakulate mit hoher Dichte falsche niedrige Werte und Ejakulate mit niedriger Dichte falsche hohe Ergebnisse liefern. Dies beruhe auf der normalen Kontamination des Ejakulates und Spermatogenezellen, Leukozyten etc.. Dies beschrieben ebenfalls bezüglich der Dichtebestimmungen Petzold und Engel (1994) und auch schon Wilke et al. (1991). Mathur et al. (1986) stellten vergleichbare Ergebnisse zwischen der klassischen gegenüber der computerisierten Erfassung sowohl der Dichte- als auch der Motilitätsbestimmung fest. Des weiteren wiesen sie auch noch eine gute Korrelation zwischen verschiedenen Untersuchern nach, welches die Objektivität dieses Verfahrens wieder unterstreicht. Die Ungenauigkeiten in der Dichtebestimmung sind, wie oben im Text beschrieben, bei normalen Ejakulaten in bestimmten Bereichen zu bestätigen, jedoch bei den hier durchgeführten Versuchen von geringer Relevanz, da mit durch die Swim-up-Technik aufbereiteten gereinigten Spermatozoensuspensionen gearbeitet wurde. Somit können sie vernachlässigt werden. Knuth und Nieschlag (1988) bestätigten dies für die Swim-up-Technik, da die verunreinigenden störenden Zellbestandteile entfallen würden. Des weiteren wurden Spermatozoenkonzentrationen um 22 Mio. Spermatozoen/ml verwendet und damit einer Verminderung der Motilitätsparameter bei hoher Dichte, wie sie von Wetzels et al. (1993) beschrieben wurden, vorgebeugt. Diese empfehlen zur Messung am besten Konzentrationen um 25 Mio. Spermatozoen/ml. Ein weiterer Vorteil des hier benutzten Analysegerätes zur Vermeidung der möglichen Unterschätzung der Dichte war die Möglichkeit der Nachbearbeitung der Bildsequenz mittels mausgesteuerter Korrekturfunktion (Togni et al. 1994). Diese Korrekturfunktion fand bei den hierdurchgeführten Messungen jedoch keine große Anwendung, da mit gereinigten Spermatozoensuspensionen gearbeitet wurde und die Ergebnisse immer parallel zu den Messungen in der Makler[®]-Kammer direkt ausgezählt wurden und sofort mit den Computerwerten verglichen werden konnten. Bestanden große Abweichungen, was selten vorkam, wurde eine erneute Messung der Probe mit einer neuen Kammerfüllung vorgenommen. Es ist anzumerken, daß die computer-assistierte Spermatozoenanalyse aufgrund ihrer Objektivität und guten Reproduzierbarkeit sowie einfachen Handhabung, speziell auch bei aufwendigen Versuchsreihen, eine mittlerweile

anerkannte Methode zur Dichte- und Motilitätsbestimmung bei wissenschaftlichen Fragestellungen ist (Makler et al. 1980 a und b, Möslein et al. 1987, Diemer et al. 1996, ESHRE Andrology Special Interest Group 1996). Die Laser-Doppler-Spektroskopie, eine weitere Methode zur Spermatozoenanalyse, scheint sich aufgrund der hohen Kosten nicht durchgesetzt zu haben. Für den Routinebedarf in der Praxis sind die Anschaffungskosten eines CASA-Gerätes immer noch hoch, weshalb es bislang nur großen IVF-Praxen und Universitäten vorbehalten ist.

Schwieriger wird es bei der Beurteilung der Bewegungsmodalitäten, z. B. die Geschwindigkeiten, Bewegungscharakteristika, Kopfauslenkung etc., die nur mit den automatisierten Analysesystemen erfaßt werden können. Leider ist es bisher nicht eindeutig möglich, das Fertilisierungspotential einzelner Spermatozoen mit Geschwindigkeitsparametern zu assoziieren (Knuth und Nieschlag 1988, Krause et al. 1993). Hinney et al. (1993) beschreiben als Minimalkriterium für Spermatozoen zur erfolgreichen Insemination eine Vorwärtsgeschwindigkeit (VSL) von 30 $\mu\text{m/s}$. Dies ist bisher nicht widerlegt worden, jedoch muß man sich ebenso die Frage stellen, welchen Stellenwert dieser Wert im Zeitalter der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) überhaupt haben kann. Hinzu kommt auch, daß man zur ICSI das Spermatozoon zusätzlich noch immobilisiert. Barratt et al. beschrieben 1993 in einer ersten Langzeitstudie einen prädiktiven Wert der CASA bezüglich der in vivo Fertilität. Dabei bestand eine gute Korrelation bezüglich der Spermatozoendichte, -motilität und -geschwindigkeit und der Kontrazeptionszeit. Kritisch anzumerken ist hierbei, daß es immer noch erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Herstellern und der Berechnung der einzelnen Motilitätsparameter gibt und diese deshalb nur schwer vergleichbar sind. Alle erhaltenen Bewegungsparameter wurden ausgewertet, um gegebenenfalls die Ergebnisse unterstützend interpretieren bzw. neue Erkenntnisse erlangen zu können.

Es ist hier nochmals anzumerken, daß die automatisierte Analyse dem vorliegenden Versuchskonzept durch ihre schnelle Handhabung die Fülle der Motilitätsmessungen in einem relativ zeitgleichen Rahmen für die einzelnen Proben durchführbar machte. Die meisten Motilitätsexperimente mit Bakterien sind in der Vergangenheit, außer von Diemer et al. (1996), mit der klassischen Schätzmethode durchgeführt worden (Schirren und Zander 1966, Teague et al. 1971, Auroux et al. 1991 u.v.m.) und sind deshalb mit den hier erzielten Ergebnissen schwer zu vergleichen. Makler et al. arbeiteten 1981 erstmals bei Motilitätsanalysen mit Bakterien mit der halbautomatisierten Technik der „multiple exposure photography“ (MEP). Für die hier in dieser Arbeit vorgestellten Erreger gibt es in der Literatur nur wenige Motilitätsversuche, und somit stellen die Ergebnisse bezüglich der neuen Auswertung mittels CASA ein Novum dar.

4.2 Verwendete Erreger

In den in dieser Arbeit präsentierten Versuchsreihen wurden die schon im Kapitel „Material und Methoden“ vorgestellten Erreger Enterokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Candida albicans*, β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B verwendet. Deshalb wird hier jetzt nicht mehr näher auf die Herkunft dieser Keime eingegangen. Die Auswahl gerade dieses Erregerspektrums wurde getroffen, um die wesentlichen Erreger der Uroadnexitis beim Mann und andererseits auch teilweise pathogene Keime des weiblichen Genitaltraktes abzudecken.

Zur Etablierung der Versuchsreihen wurden die Koinkubationsversuche von Diemer et al. (1996) mit einem serotypisierten *E. coli*, wie schon im Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.2.1 beschrieben, reproduziert. Dabei war es wichtig, ein paar Versuche (10) nachzustellen, da in der vorliegenden Arbeit nach dem gleichen Versuchsaufbau gearbeitet wurde und es zu überprüfen galt, ob die Ergebnisse in einem anderen Labor mit dem gleichen Keim reproduzierbar waren.

Enterokokken sind wichtige Erreger bei der asymptomatischen Bakteriospermie und der infektiösen Epididymitis (Weidner et al. 1995). Des Weiteren findet man diese Bakterienart auch unspezifisch bei der chronischen Prostatitis, Urethritis und Balanitis (Schiefer et al. 1994).

Pseudomonas aeruginosa gilt als häufig verursachender Erreger der akuten und chronischen Prostatitis, auch des Prostataabszesses, sowie als unspezifischer Erreger bei der Epididymitis und Orchitis (Schiefer et al. 1994). Schieferstein et al. (1986) beschreiben *Pseudomonas aeruginosa* als fakultativ pathogene Standortflora der Eichel.

Staphylococcus saprophyticus verursacht das akute Urethralyndrom bei der Frau (Schiefer et al. 1994) und ist zu 10 - 20% der Erreger der akuten Harnwegsinfektion bei jungen Frauen (Kayser 1993). In der Literaturrecherche fand sich lediglich eine Arbeit von Carson et al. (1982) welche die Bedeutung von *Staphylococcus saprophyticus* bei der bakteriellen Prostatitis, besonders bei jüngeren Männern, beschreibt. Es interessierte daher herauszufinden, ob ein ebenfalls in der normalen Standortflora der Vagina vorkommender Keim bzw. ein Erreger welcher insbesondere bei der Prostatitis des jüngeren Mannes eine wichtige Rolle spielen könnte, einen negativen Einfluß auf die Spermatozoenmotilität haben könnte.

Ein vaginales Isolat von *Candida albicans* wurde getestet, da die vaginale Candidose eine häufige, teils unbemerkte Infektion, z. B. auch nach vorheriger Antibiotikatherapie, ist. Des Weiteren findet man auch *Candida albicans* als sexuell übertragbaren Erreger bei der Balanitis (Schiefer et al. 1994).

β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B gehören zum einen zur fakultativen Standortflora in Ejakulat und Urin (Schieferstein et al. 1986) zum anderen können sie auch sexuell bei einer Balanitis übertragen werden (Schiefer et al. 1994) und können auch ferner als Erreger einer Harnwegsinfektion vorkommen.

Allen für die Versuchsreihen ausgewählten Keimen ist die Uropathogenität gemeinsam und deren seit Jahren teilweise schon diskutierten Einflüsse auf die Fertilität. Die ausgewählten Erreger sind in der Literatur oftmals in in vivo Studien genannt, jedoch ist häufig ihre Pathogenität bezüglich des Einflusses auf die Motilitätsparameter ungenau beschrieben. Es gibt nur sehr wenige in vitro Studien über die in der vorliegenden Arbeit getesteten Keime. Insbesondere *Staphylococcus saprophyticus* ist in in vitro Experimenten bislang noch nie beschrieben, *Candida albicans* in nur einem in vitro Experiment (Tuttle et al. 1977) erwähnt worden.

Eine weitere Schwierigkeit im Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit früheren Studien besteht in den oftmals ungenauen Keimzahlangaben und der Tatsache, daß die Erreger nur in unspezifischen Übergruppen, z.B. Streptokokken-Spezies, Staphylokokken-Spezies, angegeben werden. Somit ist ein unmittelbarer Vergleich mit den dargestellten Erregern nicht immer möglich. Dies wird dann in der Diskussion der einzelnen Keime und deren Versuchsergebnisse näher beleuchtet werden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der Motilitätsanalysen aus den durchgeführten Versuchsreihen

4.3.1 Diskussion der Ergebnisse der Vorversuche mit E. coli

In den Vorversuchen mit *E. coli* wurde der gleiche Erregerstamm (Serotyp O6) wie bei der Arbeitsgruppe von Diemer et al. (1996) verwendet. Bei den Motilitätsanalysen zeigte sich, daß bei einem Spermatozoen/Bakterienverhältnis $\geq 1:1$ ein deutlicher motilitätshemmender Effekt sowohl in der Gesamtmotilität (Motilitätsklasse a, b und c nach WHO) als auch der Progressivmotilität (Motilitätsklasse a und b nach WHO) nachweisbar war. Diese Dissertationsarbeit stützt daher die These von Diemer et al. (1996), daß uropathogene *E. coli*-Bakterien auf die Spermatozoenmotilität ab einem gleichzahligen Verhältnis von Bakterien und Spermatozoen einen signifikanten Einfluß ausüben. Es wurde ebenso bewiesen, daß diese Ergebnisse mit dem gleichen Erregerstamm auch unter anderen Versuchsbedingungen in unterschiedlichen Labors dennoch reproduzierbar sind. Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse stehen, wie auch schon diese von Diemer et al. (1996), im Gegensatz zu den Ergebnissen von Auroux et al. (1991) und del Porto et al. (1975), welche das Bakterienwachstum während der Versuche nicht berücksichtigten,

obwohl sie auch eine Motilitätsabnahme beobachten konnten. Die Vorversuche dienten zur Etablierung des Versuchskonzeptes, welches auch hervorragend in unserem andrologischen Labor umsetzbar war. Sie waren deshalb nicht Hauptbestandteil dieser Arbeit und gingen nicht in die statistische Analyse ein. Im lichtmikroskopischen Bild war eine deutliche Agglutination der Spermatozoen und die Adhäsion der *E. coli* an die Spermatozoen beobachtet worden. Diese Phänomene des Erregers waren in der Vergangenheit schon von del Porto et al. (1975), Auroux et al. (1991) und Wolf et al. (1993) beschrieben worden.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit Enterokokken

Die Ergebnisse der Motilitätsanalysen während der ersten Versuchsreihe zeigten keinerlei signifikante Motilitätsverluste sowohl in der Gesamtmotilität (Motilitätsklasse a, b und c nach WHO) als auch in der Progressivmotilität (Motilitätsklasse a und b nach WHO) innerhalb von 6 Stunden. Bei den Bewegungsmodalitäten war eine signifikante Abnahme der linear progressiv motilen Spermatozoen gegenüber einer Zunahme der nicht-linear motilen Spermatozoen im Verlauf von 6 Stunden zu beobachten. Die Kreisläufer blieben im Verhältnis unverändert. Die Spermatozoengeschwindigkeiten haben im zeitlichen Verlauf ebenfalls abgenommen unabhängig von der Bakterienkonzentration oder Kontrollprobe. Dies entspricht weitestgehend auch den Beobachtungen von Makler et al. 1979, die ebenfalls mittels „multiple exposure photography“ in der Mehrzahl der untersuchten Fälle einen schrittweisen Abfall der Spermatozoengeschwindigkeiten nach 4 Stunden verzeichneten. Des Weiteren konnten sie einen Abfall der Motilität um ca. 5 - 10 % pro Stunde schon 1 Stunde post ejaculationem beobachten. Dies entsprach auch den hier vorliegenden Beobachtungen und läßt sich auf die Bewegungsmodalitäten übertragen. Es entspricht zudem dem natürlichen Verhalten von Spermatozoen, die selbstverständlich intraindividuell unterschiedlich sein können. Hierzu gibt es jedoch keine neueren Angaben in der Literatur bezüglich der Veränderungen der einzelnen CASA-Parameter im zeitlichen Zusammenhang.

Schirren und Zander führten 1966 erstmals Inkubationsversuche über 24 Stunden mit einem β -hämolyisierenden Streptokokken-Stamm durch, der jedoch keinen Einfluß auf die Motilität hatte. Es ist dabei anzumerken, daß der Bakterienstamm nicht näher klassifiziert war und über die Bakterienkonzentrationen keine Angaben gemacht wurden. Deshalb sind diese Untersuchungen schwer mit den jetzigen Ergebnissen vergleichbar, obwohl sie mit den hier gemachten Beobachtungen übereinstimmen. Bisson und Czyglick (1974) hingegen hatten in in vitro Versuchen mit hohen Konzentrationen von *Streptococcus faecalis* eine deutliche Motilitätsabnahme verzeichnet. Ferner fanden sie, daß der

Prozentsatz an eingerollten Spermatozoenschwänzen proportional zur hinzugefügten Bakterienkonzentration anstieg. Dies konnte in den Versuchen nicht festgestellt werden. Im lichtmikroskopischen Bild war lediglich nach 4 Stunden eine beginnende Bakterienkettenbildung, wie sie für die Streptokokkenarten typisch ist, feststellbar. Es fanden sich jedoch keinerlei Bindungsphänomene von Bakterien und Spermatozoen oder eine Zunahme eingerollter Schwänze. Makler et al. (1981) führte einen in vitro Inkubationsversuch mit verschiedenen Erregern, unter anderem Enterokokken, in einer Bakterienkonzentration von 10^7 Keime/ml direkt nach Beimpfen des Ejakulates und 2 Stunden nach Inkubation desselben bei 37 °C durch. Als Kontrolle diente eine Probe mit zusätzlicher Antibiotikagabe zur Bakterienhemmung. Dabei konnte kein motilitätshemmender Effekt beobachtet werden. Dies unterstützt die hier aufgezeigten Ergebnisse, wobei anzumerken ist, daß nicht mit aufgearbeiteten Spermatozoensuspensionen gearbeitet wurde und die Beobachtungen nur über einen kurzen Zeitraum stattfanden. Es ist die einzige Studie, die ebenfalls die Motilitätsanalysen mit Hilfe der MEP durchführte (Makler 1980 a und b) und somit abgesehen von dem unterschiedlichen Versuchsaufbau durchaus vergleichbare Ergebnisse liefert. Es gibt noch zahlreiche in vivo Untersuchungen von Ejakulaten, die eine häufige Besiedelung mit Enterokokken, zum Teil auch als Standortflora, nachweisen (Schieferstein et al. 1986, Toth et al. 1981, Stone et al. 1986, Jaques et al. 1990). Schmidt und Knöll (1987) konnten keinen signifikanten Unterschied in der Eindringtiefe von Spermatozoen in mit Enterokokken kontaminierten bovinen Mukus im modifizierten Kapillar-Penetrationstest nach Kremer im Vergleich mit sterilem Mukus finden. Alle diese beschriebenen Studien, außer diejenige von Bisson und Czyglick (1974), unterstützen die hier erreichten Ergebnisse, daß Enterokokken keinen Einfluß auf die Motilitätsparameter haben und somit für die Fertilität von untergeordneter Bedeutung sind. Aufgrund der hier dargelegten Ergebnisse ist zu schließen, daß bei einer asymptomatischen Bakteriospermie mit Enterokokken gegebenenfalls auf eine antibiotische Therapie verzichtet werden kann, zumal Enterokokken häufig antibiotikaresistent sind. Schieferstein et al. (1986) beschrieben, daß sich bakteriologische Befunde im Ejakulat auch ohne Therapie wesentlich und in ähnlichem Umfang wie nach einer spezifischen Behandlung ändern können. Entscheidend sollte deshalb bei einer antibiotischen Behandlung die klinische Beschwerdesymptomatik sein.

4.3.3 Diskussion der Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe mit *Pseudomonas aeruginosa*

Bei der zweiten Versuchsreihe mit dem Erreger *Pseudomonas aeruginosa* zeigte sich ein hochsignifikanter Motilitätsverlust sowohl in der Gesamtmotilität als auch der Progressiv-

motilität im Verlauf von 6 Stunden Inkubation. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß die Spermatozoenmotilität auch natürlicherweise im Verlauf mehrerer Stunden abnimmt (Makler et al. 1979), wie schon bei der Diskussion der ersten Versuchsreihe ausführlich dargestellt worden ist. Zwischen den einzelnen Bakterienkonzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Beleuchtet man die Bakterienkonzentrationen unter Berücksichtigung der 6 Stunden Inkubationszeit, so erkennt man eine signifikante Abnahme der Gesamt- und Progressivmotilität, jedoch ist keine Bakterienkonzentration eindeutig dafür verantwortlich zu machen. Wenn überhaupt ein negativer Einfluß von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Motilität interpretiert werden könnte, dann wäre dies am deutlichsten im Vergleich der Probe A mit der Kontrolle E nach 6 Stunden Inkubation. Vielleicht sind die statistischen Ergebnisse deshalb nicht so eindeutig, weil die Erreger eine längere Inkubationszeit benötigen. Die längere Inkubation ist jedoch nicht sinnvoll, da es zu einer Kontamination der Probe im Verlauf der Messungen kommt und die Ergebnisse somit nicht eindeutig bezüglich des Keimes zu interpretieren wären. Bei den Bewegungsmodalitäten zeigte sich eine Verschiebung der linear progressiv motilen Spermatozoen zugunsten der nicht-linear motilen Spermatozoen, was jedoch insgesamt betrachtet vernachlässigbar ist. Die Geschwindigkeiten hatten ebenfalls innerhalb der Versuchsreihe abgenommen. Da es aber nicht in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen stand, sondern nur ein reiner Zeiteffekt war, kann dies ebenfalls vernachlässigt werden.

In der Literatur wurde erstmals von Matthews und Buxton (1951) Anfang der 50er Jahre in einer *in vitro* Studie neben anderen Erregern auch über *Pseudomonas aeruginosa* berichtet. Hierbei wurden aus Cervicalschleim Erreger isoliert, auch *Pseudomonas aeruginosa*, und anschließend *in vitro* mit Ejakulat vermischt und über 6 Stunden bei 37°C Inkubation beobachtet. Dabei konnte kein Einfluß von *Pseudomonas* auf die Spermatozoenmotilität nachgewiesen werden. Ebenfalls wurden auch keine Agglutinationssphänomene beobachtet. Bei den Versuchen in dieser Arbeit waren unter dem Lichtmikroskop auch keine Auffälligkeiten bezüglich Adhäsion oder Agglutination feststellbar. Während der gesamten Versuchszeit waren die *Pseudomonaden* aufgrund ihrer Winzigkeit schwer erkennbar. Erst nach sechs Stunden Inkubation waren diese als zahlreiche kleinste bewegliche Pünktchen zu sehen. Da während der Motilitätsmessungen die Erreger in der Makler[®]-Kammer nicht zu zählen waren, wurden die Restproben teilweise zur Überprüfung von Bakterienwachstum in die Mikrobiologie¹ gebracht. Hierbei war immer ein *Pseudomonas aeruginosa*-Wachstum nachweisbar. Die Bakterienkonzentration wurde nicht genau ermittelt, da diese aufgrund der zu kleinen verbliebenen Restprobe

¹ Herzlichen Dank an Prof. Dr. med. H.-G. Schiefer

nicht genau gewesen wäre. Das Testen galt ausschließlich der Überprüfung des Pseudomonadenwachstums. Jaques et al. (1990) fanden in einer in vivo Studie keine Unterschiede in der Spermaqualität, insbesondere der Motilität zwischen erreger-positiven und -negativen Ejakultkulturen. Darunter waren ebenfalls Pseudomonas-positive Kulturen, die keinerlei Einfluß auf die Motilitätsparameter hatten. Es ist anzumerken, daß Pseudomonas bei dieser Studie nur in 0,8 % der Fälle nachweisbar war und dies bei 100 Patienten mit positiver Ejakultkultur sicherlich nicht als repräsentativ gelten kann.

Pseudomonas aeruginosa gilt als häufig verursachender Erreger der akuten und chronischen Prostatitis, auch des Prostataabszesses, sowie als unspezifischer Erreger bei der Epididymitis und Orchitis (Schiefer et al. 1994). Eine antibiotische Therapie sollte bei signifikanter Bakteriospermie mit bestehenden klinischen Beschwerden bzw. Infertilität erfolgen, da ein eventueller Einfluß auf die Spermatozoenmotilität im vorliegenden Experiment nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnte.

4.3.4 Diskussion der Ergebnisse der dritten Versuchsreihe mit *Candida albicans* und *Staphylococcus saprophyticus*

In der vorliegenden Arbeit sollten auch Erreger getestet werden, die eventuell nach Verlassen des männlichen Genitaltraktes eine Beeinträchtigung der Spermatozoenmotilität und somit einen Einfluß auf die Fertilität nehmen könnten. In dieser Inkubationsreihe wurden deshalb zwei verschiedene aus dem weiblichen Genitaltrakt isolierte Erreger untersucht, zum einen *Candida albicans* und außerdem *Staphylococcus saprophyticus*, die gemeinsam gegenüber einer Kontrollprobe verglichen wurden. Die Erreger werden im folgenden getrennt voneinander besprochen.

Candida albicans zeigte nur eine geringe zeitabhängige Abnahme der Gesamtmotilität, jedoch ohne Unterschiede innerhalb der verschiedenen Konzentrationen, so daß die Gesamtmotilität fast unverändert im Verlauf der Inkubation blieb. Bei der Progressivmotilität verhielt es sich anders. Schon direkt nach der Inkubation zeigte sich in der hohen Konzentration von 20 Mio. *Candida*/ml eine hochsignifikante Abnahme der Progressivmotilität, die jedoch im Verlauf ohne zeitlichen Einfluß blieb und außerdem keine Abnahme der Motilität insgesamt zu verzeichnen war. Tuttle et al. beschrieben 1977 in klinischen Beobachtungen eine deutliche Abnahme der Spermatozoenmotilität, wenn man frisches Ejakulat und *Candida albicans* vermischte. Daraufhin führten sie Experimente mit aus Urinkulturen gewonnenen *Candida albicans* in Konzentrationen von 10^2 bis 10^7 Erregern/ml durch. Es wurden von insgesamt 8 Personen jeweils 0,2 ml frischen unaufbereiteten Ejakulates mit den verschiedenen *Candida*-Konzentrationen und zwei Kontrollproben (Kochsalzlösung sowie Rinderherzinfusionsbrühe mit Streptomycin und Penicillin,

die zur Anzucht der *Candida* benutzt wurde) vermischt, bei 37°C inkubiert und Motilitätsmessungen direkt nach Inkubation, 2 Stunden und 4 Stunden später durchgeführt. Gleich nach dem Ansetzen der Proben zeigte sich erst eine signifikante Motilitätsverminderung in Konzentrationen ab 10^4 *Candida*/ml, die sich bei einer Konzentration von 10^7 in einer völligen „Lokalbeweglichkeit“ nur mit Schwanzvibrationen äußerte. Dies setzte sich in der Messung nach 2 und 4 Stunden in den anderen niedrigeren Ausgangskonzentrationen fort. Bei den Versuchen von Tuttle et al. (1977) wurden die Motilitätsmessungen nach der Motilitätsskala von Emmens (Emmens 1947) vorgenommen, die die Motilität in 0,5-er Schritten von 0 mit keiner Motilitätsaktivität bis 4 mit vollständiger Motilitätsaktivität einteilt. Die hier vorliegenden Ergebnisse sind daher nicht unmittelbar mit denen von Tuttle et al. (1977) vergleichbar. Bei den Versuchen war in den Bewegungsmodalitäten eine signifikante Abnahme während der 6 Stunden Inkubation feststellbar, jedoch können die Unterschiede zwischen den einzelnen Erregerkonzentration vernachlässigt werden. Die Geschwindigkeiten zeigten schon zu Beginn der Inkubation eine signifikante Abnahme innerhalb der verschiedenen Erregerkonzentrationen. Dies unterstützt die Beobachtung der deutlichen Progressivmotilitätsverminderung bei der Erregerkonzentration von 20 Mio./ml direkt nach dem Erregerzusatz in die Spermatozoensuspension. Zu den Bewegungsmodalitäten und Geschwindigkeitsveränderungen der hier dargestellten Versuche konnten keine vergleichbaren Versuche in der Literatur gefunden werden.

Tuttle et al. (1977) konnten bei ihren Tests mit *Candida albicans* ein Phänomen der Spermatozoenagglutination bei Konzentrationen ab 10^4 Erregern/ml zuerst nach 2 Stunden und noch deutlicher nach 4 Stunden Inkubation beobachten. Des Weiteren stellten sie in den Proben mit 10^6 und 10^7 *Candida*/ml direkt nach der Inkubation eine Art Ausflocken der Proben mit anschließender granulöser, visköser und klebriger Veränderung der Konsistenz der Spermatozoensuspension fest. In dieser Arbeit konnten die Beobachtungen von Tuttle et al. (1977) nicht bestätigt werden. Während der gesamten Inkubationszeit konnten keine echten Agglutinationen oder Adhäsionen von *Candida*-Partikeln und Spermatozoen verzeichnet werden. Es schien vielmehr, daß die *Candida*-Partikel aufgrund ihres deutlichen Größenunterschiedes gegenüber den Spermatozoen ein mechanisches Hindernis darstellten. Dies würde die Beobachtung, daß gleich zu Beginn der Untersuchungen die Progressivmotilität deutlich in der hohen Konzentration von 20 Mio./ml herabgesetzt war, nicht jedoch die Gesamtmotilität, erklären könnten. Zusätzlich ist anzumerken, daß in den Versuchen eine Inkubationszeit über 6 Stunden vorlag und ebenfalls mit einer gereinigten Spermatozoensuspension gearbeitet wurde im Gegensatz zu Tuttle et al. (1977) und somit weitestgehend keine beeinflussenden Faktoren aus dem

Nativejakulat zum Tragen kamen, was man für die Versuche von Tuttle et al. nicht ausschließen kann, z. B. Enzymreaktionen und Antigen-Antikörper-Reaktion (Teague et al. 1971), Antiagglutinin (Amelar et al. 1975). Eine frühe in vitro Studie von Matthews und Buxton (1951) beschreibt ebenfalls die Agglutination von Spermatozoen, wenn man Cervicalsehim, der mit *Candida albicans* versetzt ist, in vitro Ejakulatproben zusetzt.

Die Candidosen zählen zu den durch Geschlechtsverkehr übertragenen Erkrankungen und kommen in ca. 21 % der vaginalen Infektionen vor (Hoyme 1994). Tuttle et al. (1977) postulierten, wie schon zuvor dargestellt, daß bei *Candida albicans*, der universell bei vaginalen Kontaminationen vorkommt, eine Motilitätsminderung und Agglutination von Spermatozoen auftritt und ursächlich die Fertilität herabsetzen kann. Aus den in dieser Dissertation dargestellten Ergebnissen läßt sich nur schlußfolgern, daß sehr hohe *Candida albicans*-Konzentrationen, die in vivo so nicht erreichbar sind, eventuell eine herabgesetzte Fertilität zur Folge haben könnten. Hypothetisch könnte man sich eher in der Vagina eine Candidose als eine mechanische Barriere aufgrund des sich ausbildenden Mycels, das wie ein „Fangnetz“ wirken könnte, vorstellen. Eine asymptomatische Candidose der Frau, zumindest außerhalb der Schwangerschaft, muß nicht therapiert werden (Hoyme 1994). Das gleiche wird für den Mann (Hoyme 1994) beschrieben und nur auf die Einhaltung der üblichen Hygienemaßnahmen hingewiesen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint eine Therapie einer asymptomatischen Candidose nicht erforderlich.

Der zweite getestete Erreger, *Staphylococcus saprophyticus*, zeigte in hohen nichtphysiologischen Konzentrationen sowohl in der Gesamtmotilität als auch der Progressivmotilität keinen Einfluß. Das gleiche galt für die Bewegungsmodalitäten und für die Spermatozoengeschwindigkeiten im gesamten Verlauf der 6 Stunden Inkubationszeit. Dieser Erreger gehört zu der Standortflora des Urogenitaltraktes sowohl der Frau als auch des Mannes und wurde früher als völlig apathogener Erreger angesehen. Heute weiß man, daß bei jungen Frauen dieser Keim in ca. 10 - 20 % für eine akute Harnwegsinfektion verantwortlich ist (Kayser et al. 1993). Diese Bedeutung des Erregers bei jungen Frauen wird ebenso von Carson et al. (1982) beschrieben. Ferner hatte diese Arbeitsgruppe (Carson et al. 1982) bei Untersuchungen an 27 Patienten mit Prostatitisbeschwerden mittels 4-Gläserprobe, welche nach Meares und Stamey (Meares und Stamey 1968) durchgeführt wurde, eine Bedeutung von *Staphylococcus saprophyticus* bei der bakteriellen Prostatitis herausgefunden. Jedoch gibt es in der Literatur keine vergleichbare Arbeit, die den Einfluß von *Staphylococcus saprophyticus* auf die Spermatozoenmotilität darstellt. Matthews und Buxton beschrieben 1951 in einer in vitro Studie, die hier schon mehrfach zitiert wurde, daß hämolysierende und nichthämolysierende Staphylokokken keinen Einfluß auf die

Motilitätsparameter haben. Die Staphylokokken werden in dieser Arbeit jedoch nicht näher unterteilt. In dieser hier vorgestellten Dissertationsarbeit konnte kein negativer Effekt auf die Spermatozoenmotilität festgestellt werden, so daß dieser Erreger als ungefährlich für die Fertilität angesehen werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse und dem Wissen, daß dieser Keim oftmals eine Resistenz gegen viele Antibiotika aufweist (Kayser et al. 1993) sollte nur bei einem symptomatischen Infekt antibiogrammgerecht therapiert werden. Carson et al. (1982) empfehlen bei einem symptomatischen Patienten bei einem Nachweis von *Staphylococcus saprophyticus* auch die antibiotische Therapie des Sexualpartners.

4.3.5 Diskussion der Ergebnisse der vierten Versuchsreihe mit β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B

In diesem letzten Experiment mit β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B konnte im Verlauf von 6 Stunden Inkubation eine hochsignifikante Abnahme der Gesamt- und Progressivmotilität festgestellt werden. Dies zeigte sich besonders deutlich nach 6 Stunden Inkubation in der höchsten initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml. Bei den Bewegungsmodalitäten wurde ebenfalls eine hochsignifikante Abnahme der linear progressiv motilen und nicht-linear progressiv motilen Spermatozoen im Verlauf von 6 Stunden beobachtet, wobei dies wiederum in den beiden höchsten Konzentrationen A und B am deutlichsten nach 6 Stunden zu sehen war. Das Verhältnis von linear progressiv motilen verschob sich zugunsten der nicht-linear progressiv motilen Spermatozoen. Die Kreisläufer blieben im Verlauf des gesamten Versuches unverändert. Bei den Geschwindigkeiten verhielt es sich genauso wie bei den Bewegungsmodalitäten. Es war der konzentrationsabhängige Geschwindigkeitsverlust zu verzeichnen, der sich am ausgeprägtesten in der 6-Stunden-Messung darstellte. Matthews und Buxton (1951) beschrieben für hämolysierende Streptokokken eine „spermizide“ Wirkung. Sie verwendeten isolierte Streptokokken der verschiedenen Serotypen A, B, C, D und G, die jeweils aus den Cervicalabstrichen von Frauen aus der Sterilitätssprechstunde isoliert wurden. Es wurden keine genauen Angaben über die Anzahl der verschiedenen verwendeten Serotypen gemacht und in welcher Bakterienkonzentration diese verwendet wurden. Bei diesen Versuchen wurde eine initiale Motilitätszunahme beobachtet, die jedoch schnell gefolgt war von einer kompletten Spermienimmobilisation bzw. „Spermienmortalität“. Die Beobachtungen dieser Versuche sind schwer mit den Ergebnissen dieser Dissertationsarbeit zu vergleichen, da nur sehr ungenaue Angaben über die Bakterienspezies gemacht wurden. Interessant war, daß Versuche mit Streptokokkenfiltraten keinen Einfluß auf die Spermatozoenmotilität hatten. Buxton et al. (1954) berichteten in einer erweiterten Studie,

daß der spermizide Effekt von verschiedenen Streptokokkenarten erst nach einer sehr langen Latenzzeit auftreten würde und ihre Bedeutung daher fragwürdig erschiene.

Während des gesamten Inkubationsversuches mit β -hämolyzierenden Streptokokken zeigten sich lichtmikroskopisch keinerlei Auffälligkeiten bezüglich einer Agglutination von Spermatozoen oder Adhäsion von Bakterien, die den Motilitätsverlust erklären könnten. Es könnte daher ein anderer immobilisierender Faktor, z. B. ein von den Bakterien gebildetes Endotoxin für den Motilitätsverlust verantwortlich sein. Von Paulson und Polakoski wurde 1977 für *E. coli* ein „Spermatozoen immobilisierenden Faktor“ („spermatozoal immobilisation factor“, abgekürzt SIF) beschrieben. Dieser SIF war in der Lage humane Spermatozoen reversibel zu immobilisieren und war kleiner als 500 Dalton. Dieser isolierte, hitzestabile Faktor führte nicht zu einer Avitalisierung der Spermatozoen und war nicht identisch mit dem *E. coli*-Endotoxin, welches sie ebenfalls testeten und das keinen Einfluß auf die Motilität hatte. Diese Fragestellung wurde von anderen Arbeitsgruppen nicht wieder aufgenommen. Da die Aufgabenstellung dieser Arbeit sich ausschließlich mit den Motilitätsanalysen beschäftigte, wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich eines löslichen immobilisierenden Faktors eingeleitet, da diese den Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschritten hätten. Die hohen Bakterienkonzentrationen, wie sie in diesen Versuchsreihen zum Teil verwendet wurden, kommen *in vivo* so nicht vor, so daß der eindrucksvolle Motilitätsverlust in der höchsten initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio./ml nach 6 Stunden Inkubation für die Therapie einer Infektion vernachlässigbar ist. In den initial niedrigeren Konzentrationen von 2.000 bzw. 20.000 Keime/ml, wie sie *in vivo* erreichbar sind zeigte sich zwar ebenfalls eine Motilitätsabnahme, die jedoch im zeitlichen Verlauf zu sehen ist, wie auch schon Makler (1979) beschrieben hatte.

β -hämolyzierenden Streptokokken der Gruppe B gehören zum einen zur fakultativen Standortflora in Ejakulat und Urin (Schieferstein et al. 1986). Zum anderen können sie auch sexuell bei einer Balanitis übertragen werden (Schiefer et al. 1994) oder als Erreger einer Harnwegsinfektion auftreten. Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse sollte bei einer symptomatischen Infektion des Urogenitaltraktes eine antibiotische Therapie in Erwägung gezogen werden, da ein motilitätshemmender Effekt dieser Erreger definitiv nachgewiesen wurde, wenn auch in niedrigeren Konzentrationen weniger deutlich. Bei einer asymptomatischen Kontamination ist eine antibiotische Therapie nicht unbedingt notwendig.

4.4 Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Enterokokken und *Staphylococcus saprophyticus* keinen wesentlichen Einfluß auf die Spermatozoenmotilitätsparameter haben, so daß bei asymptomatischem Nachweis dieser Keime im Ejakulat eher von einer Kontamination ausgegangen werden kann. Bei klinisch manifesten Symptomen sollte jedoch eine antibiogrammgerechte Therapie angestrebt werden. Als relevante Keime für die männliche Subfertilität sind diese Erreger sicherlich von untergeordneter Rolle.

Die Rolle von *Pseudomonas aeruginosa* und deren Einfluß auf die Motilitätsparameter und somit auf die männliche Fertilität konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es läßt sich aus unseren Experimenten zurückhaltend ableiten, daß ein Motilitätsverlust von *Pseudomonas aeruginosa* in sehr hohen Konzentrationen und nach einer Inkubationszeit von mehr als 6 Stunden auftreten kann. Deshalb wäre bei signifikanter asymptomatischer Bakteriospermie mit diesem Erreger sicherlich auch schon eine antibiogrammgerechte Therapie in Betracht zu ziehen.

Des weiteren konnte in dieser Arbeit der motilitätshemmende Effekt von *Candida albicans*, wie schon von Tuttle et al. (1977) nachgewiesen, bestätigt werden. Die klinische Relevanz kann jedoch abschließend nicht eindeutig festgelegt werden, da die Motilitätsminderung nur in initial sehr hohen Konzentrationen von 20 Mio. Erregern/ml, wie sie in vivo nicht erreichbar sind, stattfand. Agglutinationsphänomene, wie sie Tuttle et al. (1977) beschrieben, konnten nicht beobachtet werden. Kritisch anzumerken ist, daß nach den Versuchsbeobachtungen die *Candida*-Partikel in hohen Konzentrationen wie eine mechanische Barriere zu fungieren scheinen. Eine asymptomatische Candidose hat vermutlich keinen Einfluß auf die Fertilität und muß nicht unbedingt therapiert werden.

Bei den Versuchen mit den β -hämolisierenden Streptokokken zeigte sich eine deutliche Verschlechterung der Motilitätsparameter, die besonders eindrucksvoll in der höchsten initialen Bakterienkonzentration von 2 Mio. Keimen/ml nach 6 Stunden Inkubation war. Morphologische Veränderungen, die dafür verantwortlich gemacht werden könnten, wie z.B. Agglutination und Adhäsion der Bakterien, konnten nicht beobachtet werden. Das Vorhandensein eines Enterotoxins, das die Immobilisierung der Spermatozoen zur Folge hätte, ist zu diskutieren. Somit sollte auch eine signifikante Bakteriospermie, gegebenenfalls auch wenn sie asymptomatisch verläuft, antibiotisch therapiert werden.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche konnten aufzeigen, daß ein negativer Einfluß von verschiedenen Erregern auf die Spermatozoenmotilität erregers-, konzentrations- und zeitabhängig ist und nicht einheitlich beurteilt werden kann.

4.5 Summary

Enterococcus and Staphylococcus saprophyticus indicate no significant influence on sperm motility parameters. Therefore it can be concluded, that if an asymptomatic proof of these bacteria is given, it is more likely to be a contamination. If a patient has clinical symptoms an antibiotic therapy should be undertaken. These bacteria are probably secondary as relevant pathologic germs in male subfertility.

The role of Pseudomonas aeruginosa and its influence on sperm motility parameters could not be clarified. The effect on sperm motility parameters can be seen only in high concentrations of Pseudomonas aeruginosa after more than 6 hours of incubation. Therefore an antibiotic therapy is useful in patients with a significant, although asymptomatic bacteriospermia.

A significant inhibitory effect of Candida albicans on sperm motility parameters, like Tuttle et al. (1977) investigated before, could be confirmed. The clinical relevance can not be clearly established, because a significant decrease in motility was only detected in the samples with a very high initial concentration of 20 Mill. germs/ml, which is not found in vivo. The phenomenon of agglutination of spermatozoa, as before detected by Tuttle et al. (1977), could not be confirmed. It has to be mentioned critically, that the Candida particles in high concentrations seemed to loom large compared to the spermatozoa and seemed to function as a mechanical barrier. An asymptomatic candidiasis has probably no influence on fertility and needs not to be treated absolutely.

In the experiments with β -haemolytic streptococci group B a clear decrease of motility parameters could be investigated. This was particularly impressive in the highest initial bacterial concentration of 2 Mill. germs/ml after 6 hours of incubation. Morphological correlations, such as agglutination or adhesion of the bacteria could not be detected. The existing of an enterotoxin as a factor of immobilization for the spermatozoa has to be discussed. Therefore a significant, even clinical asymptomatic bacteriospermia should be treated antibioticly.

In conclusion, the data underline that a negative influence on sperm motility is always dependent on the different types of individual microorganisms. Concentrations and time of growth are also of great importance.

5 Literaturverzeichnis

Aitken RJ und Baker HWG (1995): Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans?. Hum Reprod 10, 1736-1739

Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C (1975): Circulating sperm-agglutinating antibodies in azoospermic men with congenital bilateral absence of the vasa deferentia. Fertil Steril., 26 (3), 228-231

Appell RA, Evans PR (1978): The effect of temperature on sperm motility. II. Is bacterial growth a factor?. Fertil Steril 30, 436-38

Auroux M (1989): Le role des mycoplasmes dans la modification de la mobilité des spermatozoides. Contr Fert Sex 17, 845-847

Auroux MR, Jacques L, Mathieu D, Auer J (1991): Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in-vitro study in man with Escherichia coli. Int J Androl 14, 264-70

Baker HWG, Straffon WGE, Murphy G, Davidson A, Burger HG, de Kretser DM (1979): Prostatitis and male infertility: A pilot study. Possible increase in sperm motility with antibacterial chemotherapy. Int J Androl 2, 193-201

Barratt CLR, Li TC, Monterio EF (1988): Diagnosis and detection of male accessory gland infection. In: Advances in Clinical Andrology, hrsg. v. Barratt CLR, and Cooke ID (1988), C, Kapitel 9,91-98

Barratt CLR, Monterio EF, Chauhan M (1989): Screening donors for sexually transmitted disease in a donor insemination clinic in the UK. Br J Obstet Gynecol 96, 461-466

Barratt CLR, Harrison PE, Robinson A, Kessopolou E, Cooke ID (1991): Seminal white blood cells in men with urethral tract infection. A monoclonal antibody study. Br J Urol 68, 531-536

Berger RE (1984): Epididymitis; in: Sexually transmitted diseases; hrsg. v. Holmes KK et al.; Mc Graw-Hill Book Co.; New York 1984, 650-662

Bisson, JP, Czyglick, F (1974), Retentissement de l'infection génito-urinaire sur les spermatoïdes. J Urol Nephrol 7-8, 631

Buxton, L, Southam, A, Herrmann, W, Girvin, G., Nadel, H. (1954): Bacteriology of the cervix in human sterility. Fertil Steril, 5, 493

Caldamone AA, Cockett ATK (1978): Infertility and genitourinary infection. *Urology* 12, 304-311

Caldamone AA, Emilson LBV, Al-Juburi A, Cockett ATK (1980): Prostatitis: Prostatic secretory dysfunction affecting fertility. *Fertil Steril* 34, 602-603

Carson CC, McGraw VD, Zwadyk P (1982): Bacterial prostatitis caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *Urology* 19 (6), 576-578

Centola GM (1996): Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. *Arch Androl* 36 (1), 1-7

Chang MW, Choi TK, Matsuo Y, Yoshii Z (1984): Influence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* on the human spermatozoal motility. *Hiroshima J Med Sci* 33, 23-26

Christiansen E, Tollefsrud A, Purvis K (1991): Sperm quality in men with chronic abacterial prostatovesiculitis verified by rectal ultrasonography. *Urology* 38, 545-49

Cintron RD, Wortham JWE, Acosta A (1981): The association of semen factors with the recovery of *Ureaplasma urealyticum*. *Fertil Steril* 36, 648-652

Comhaire FH, Verschraegen G, Vermeulen L (1980): Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male fertility. *Int J Androl* 3, 32-45

Cooper TG, Weidner E, Nieschlag E (1990): The influence of inflammation of the human genital tract on secretion of the seminal markers alpha glucosidase, glyceryl-phosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl* 13, 329-336

Dahlberg B (1976): Asymptomatic bacteriospermia: Cause of infertility in men. *Urology* 8, 563-66

Davis RO, Katz DF (1986): Spectral analysis of sperm motion kinematics. *Biophys J* 49, 418 a

del Porto GB, Derrick FC, Bannister ER (1975) Bacterial effect on sperm motility. *Urology* 5, 638-39

Depuydt CE, Bosmans E, Zalata A, Schoonjans F, Comhaire FH (1996): The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection. *J Androl* 17, 600-707

Desai S, Cohen MS, Khatamee M, Leiter E (1980): Ureaplasma urealyticum (T-Mycoplasma) infection: Does it have a role in male infertility?. J Urol 124, 469-471

Diemer T (1994): Einfluß von Escherichia coli auf die Motilität und andere Bewegungsparameter sowie auf die Morphologie von humanen Spermatozoen in vitro. Dissertationsschrift

Diemer T, Weidner, W, Michelmann, HW, Schiefer, HG, Rován, E, Mayer, F (1996): Influence of Escherichia coli on motility parameters of human spermatozoa in vitro, Int J Androl 19, 271-77.

Diemer T, Ludwig L, Huwe P, Hales DB, Weidner W (2000 a): Influence of urogenital infection on sperm function, Curr Opin Urol 10, 39-44

Diemer T, Huwe P, Michelmann HW, Mayer F, Schiefer HG, Weidner W (2000 b): Escherichia coli induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis, Int J Androl 23, 178-86

Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W (2000 c): Urogenitale Infektionen beim Mann – können sie die Fertilität beeinflussen, Reproduktionsmedizin 16, 155-167

Drach GW, Fair WR, Meares EM, Stamey TA (1978): Classification of benign prostatic diseases associated with prostatic pain: prostatitis or prostatodynia, J Urol 120, 266

Eggert-Kruse W, Gerhard I, Hofmann H, Petzoldt D, Runnebaum B (1987): Bedeutung von Chlamydia trachomatis für die männliche Fertilität. Fertilität 3, 171-177

Eggert-Kruse W, Gerhard I, Näher H, Tilgen W, Runnebaum B (1990): Chlamydial infection-a female and/or male infertility factor?. Fertil Steril 53, 1037-1043

Eggert-Kruse W, Rohr G, Probst S, Rusu R, Hund M, Demirakca T, Aufenanger J, Runnebaum B, Petzoldt D (1998): Antisperm antibodies and microorganisms in genital secretions-a clinically significant relationship?. Andrologia 30 (Supp. 1), 61-71

ESHRE Andrology Special Interest Group (1996): Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. Hum Reprod 11, 1463-1479

ESHRE Andrology Special Interest Group (1998): Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of Spermatozoa. Hum Reprod 13, 142-145

El-Demiry MI, Hargreave TB, Busuttill A, James K, Chisholm GD (1986 a): Identifying leukocytes and leukocyte subpopulations in semen using monoclonal antibody probes. *Urology* 28, 492-496

El-Demiry MI, Young H, Elton RA, Hargreave TB, James K, Chisholm GD (1986 b): Leukocytes in the ejaculate from fertile and infertile men. *Br J Urol* 58, 715-720

Eliasson, R (1968): Biochemical analysis of human semen in the study of the physiology and pathophysiology of the male accessory sex glands. *Fertil Steril*, 19, 344-350

Emmens CW (1947): The motility and viability of rabbit spermatozoa at different hydrogen ion concentration. *J Physiol* 106, 471-481

Fowlkes DM, Dootheer GB, O'Leary WM (1975): Evidence by scanning electron microscopy for an association between spermatozoa and T- mycoplasmas in men of infertile marriage. *Fertil Steril* 26, 1203-1211

Giamarellou H, Tympanidis K, Bitos NA, Leonidas E, Daikos GK (1984): Infertility and chronic prostatitis. *Andrologia* 16, 417-422

Gnarpe H, Friberg J (1972): Mycoplasmas and human reproductive failure: I. The occurrence of different mycoplasmas in couples with reproductive failure. *Am J Obstet Gynecol* 114, 727-731

Gonzales GF, Garcia-Hjarles MA, Gutierrez R, Guerra-Garci R (1989): The secretory activity of seminal vesicles and its relationship with sperm motility: Effects of infections in the male reproductive tract. *Int J Androl* 12, 286-294

Grillo M, Rall S, Krausse R, Riedel HH (1991): Einfluß von Escherichia coli sowie dessen bakterienfreiem Filtrat auf die Ergebnisse des hyposmotischen Schwelltests und des bovinen Zervikal-Mukus-Penetrationstestes. *Fertilität* 7, 9-14

Grossgebauer K, Hennig A, Hartmann D (1979): Mykoplasmenbedingte Spermatozonenkopfschäden bei infertilen Männern. *Hautarzt* 28, 299-302

Hanssen P, Mardh PA(1984): In vitro tests of adherence of Chlamydia trachomatis to human Spermatozoa, *Fertil Steril* 42, 102-107

Hano R, Zenzes MT, Belkien L, Freund I, Nieschlag E (1986): Schutz menschlicher Spermien durch die "Swim up" Präparation. *Fertilität* 2, 77-80

Hargreaves CA, Rogers S, Hills F, Rahman F, Howell RJS, Homa ST (1998): Effects of co-trimoxazole, erythromycin, amoxicillin, tetracycline and chloroquine on sperm function in vitro. *Hup Reprod*, 1878-1886

Hargreave TB, Torrance M, Young H, Harris AB (1982): Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from seminal plasma in relation to sperm antibody levels and sperm motility. *Andrologia* 14, 223-227

Hill JA, Haimovici F, Politch JA, Anderson DJ (1987): Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil Steril* 47, 460-465

Hill JA, Cohen J, Anderson DJ (1989): The effects of lymphokines and monokines on sperm-fertilizing ability in the zona-free hamster egg penetration test. *Am J Obstet Gynecol* 160, 1154-1160

Hinney B, Wilke G, Michelmann HW (1993): Prognostic value of an automated sperm analysis in IVF or insemination therapy. *Andrologia* 25, 195 -202

Hinting A, Soebadi DM, Santoso, RI (1996): Evaluation of the immunological cause of male infertility. *Andrologia*, 28, 123-126

Hofstetter A, Schill WB, Wolff HH, David R (1978): Hemmung der Spermatozoenmotilität durch genitale Mykoplasmenstämme. *Therapiewoche* 28, 1923-1930

Hoyme UB (1994): Urogenitale Infektionen durch sexuell übertragene Erreger aus gynäkologischer Sicht, *Urologe [A]* 33, 217-223

Huaijin C, Junyan Z, Naigun C (1998): Prostatic fluid and sperm examination: 106 cases. Preliminary study on infertility. *Act Urolog Belg*, 66, 19-21

Huwe P, Diemer T, Ludwig M, Lui J, Schiefer HG, Weidner W (1998): Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in an in vitro experiment. *Andrologia* 30 (Supp. 1), 55-59

Huwe P, Menkveld R, Ludwig M, Weidner W (1999): Effect of location of male accessory gland inflammation on semen variables with special reference to sperm morphology. *Andrologia* 31, 378-379

Huwe P, Menkveld R, Ludwig M, Hochreiter W, Schaeffer AJ, Weidner W (2000 a): Der Einfluß des chronischen Beckenschmerzsyndroms auf die spezielle

Spermatozoenmorphologie, unter Einschluß der Tygerberg-Klassifikation. Urologe A 39 (Supp. 1), 61

Huwe P, Weidner W (2000 b): Infektiologie. In Hauri D und Jaeger P (Hrsg.) Checkliste Urologie, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 185-208

Jacques L, Mathieu D, Auer J, Auroux M (1990): Effect of urogenital infections on sperm parameters and hypofertility in man. Biomed Pharmacother 44, 225-228

Jimenez-Cruz JF, Saenz de Cabezon J, Soler-Rosello A, Sole-Balcells F (1979): The spermogram in urogenital tuberculosis. Andrologia 11, 67-71

Kayser, FH, Bienz KA, Eckert, J, Lindenmann J (1993): Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York 1993

Knuth UA, Nieschlag E (1988): Bewegungsmessung von Spermien durch automatische Bildanalyse. Fertilität 4, 5-12

Kortebani G, Gonzales GF, Barrera C, Mazzolli AB (1992): Leukocyte populations in semen and male accessory gland function: relationship with antisperm antibodies and seminal quality. Andrologia 24, 197-204

Köhn FM, Erdmann I, Oeda T, El Mulla KF, Schiefer HG, Schill WB (1998): Influence of urogenital infections on sperm functions. Andrologia 30 (Supp. 1), 73-80

Krause W, Weidner W (1983): Veränderungen des Ejakulates bei chronischer Prostatitis. Urologe (B) 23, 111-114

Krause W, Schonharl G, Brake A (1993): The variability of measuring sperm concentration and motility as determined by computer assisted image analysis and visual estimation. Andrologia 25, 181-187

Krause W, Weidner W (1998): Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane, 3. Auflage; Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1998

Krause W und Viethen G (1999): Quality assesment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. Andrologia 31, 125-129

Krieger JN, Berger RE, Ross SO, Rothmann I, Muller CH (1996): Seminal fluid findings in men with nonbacterial prostatitis and prostatodynia. J Androl 17, 310-318

Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K (1986): Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilisation. *Fertil Steril* 46, 1118-1123

Ludwig G, Frick J (1987): *Praxis der Spermatologie: Atlas und Anleitung*. 1. Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1987

Ludwig M, Dimitrakov J, Diemer T, Huwe P, Weidner W (2001): Das Prostatitisyndrom-Ejakulatveränderungen und Auswirkungen auf die Fertilität. *Urologe [A]* 40, 18-23

Leib Z., Bartoov B., Eltes F, Servadio C (1994): Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: an enigma or reality? *Fertil Steril* 61, 1109-1116

Leitlinien der DGU zur Diagnostik und Therapie urologischer Erkrankungen (1997). *Urologe [A]* 36, 484-503

Levy R, Layani-Milon MP, Giscard D'Estaing S, Najjioullah F, Lornage J, Aymard M, Lina B (1999): Screening for Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum infection in semen from asymptomatic male partners of infertile couples prior to in vitro fertilization, *Int J Urol* 22, 113-118

Makler A (1978): A new multiple exposure photography for objective human spermatozoal motility determination. *Fertil Steril* 30, 192-99

Makler A, Zaidise I, Paldi E, Brandes JM (1979): Factors affecting sperm motility. I. In vitro change in motility with time after ejaculation. *Fertil Steril* 31, 147-154

Makler A (1980 a): Use of the elaborated multiple exposure photography (MEP) method in routine sperm motility analysis and for research purposes. *Fertil Steril* 33, 160-66

Makler A (1980 b): Use of a microcomputer in combination with the multiple exposure photography technique for human sperm motility determination. *J Urol* 124, 372-74

Makler A, Urbach Y, Lefler DS, Merzbach D (1981): Factors affecting sperm motility. VI. Sperm viability under the influence of bacterial growth in human ejaculates. *Fertil Steril* 35, 666-70

Mardh PA, Ripa KT, Colleen S, Treharne JD, Darougar S (1978): Role of Chlamydia trachomatis in non-acute prostatitis. *Br J Vener Dis* 54, 330-334

Mathur S, Carlton M, Ziegler J, Rust PF, Williamson HO (1986): A computerized sperm motion analysis. *Fertil Steril* 46, 484-488

Matthews, CS, Buxton, CL (1951): Bacteriology of the cervix in cases of infertility. *Fertil Steril* 2, 45-52

Meares, EM, Stamey TA (1968): Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Invest Urol* 5, 492-518

Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger TF, van Zyl JA (1990): The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, *Hum Reprod* 5, 586-592

Menkveld R und Kruger TF (1995): Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology. *Int J Androl* 18 (Supp. 2), 36-42

Menkveld R, Huwe P, Ludwig M, Weidner W (1999): Effect of location of male accessory gland inflammation on semen variables with special reference to sperm morphology. *Hum Reprod* 14, Abstract Book 1, 156-157

Menkveld R, Huwe P, Ludwig M, Weidner W (2003): Morphological sperm alternations in different types of prostatitis. *Andrologia* 35, 288-293

Michelmann HW (1998): Influence of bacteria and leukocytes on the outcome of in vitro fertilisation (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Andrologia* 30 (Supp.1), 99-101

Möslein S, Pemper B, Wölbing R, Milbrandt R, Taubert HD (1987): Selektion motiler Spermien: Ein Vergleich der Separation- mit der Swim-up-Methode mittels Mikroprozessor-Bildanalyse. *Fertilität* 3, 157-161

Näher H, S. 250-257 in Krause W, Weidner W (1998): *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, 3. Auflage; Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1998

Naessens A, Foulon W, Debrucker P, Devroey P, Lauwers S (1986): Recovery of microorganisms in semen and relationship to semen evaluation. *Fertil Steril* 45, 101-105

Nickel JC, Costerton JW (1992): Coagulase-negative staphylococcus in chronic prostatitis. *J Urol* 147, 398-400

- Nickel JC (1998): Prostatitis: Consideration for the next millenium. *Curr Opin Urol* 8, 31-32
- Nieschlag E (1997): Classification of andrological disorders. In Nieschlag, E und Behre, H (Hrsg.) *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer Verlag, Berlin, 81-83
- Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, meseguer MA (1998): Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa, *Hum Reprod* 13, 2756-2761
- Ochsendorf F. R. (1999): Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 5, 399-420
- O'Leary WM, Frick J (1975): The correlation of human male infertility with the presence of mycoplasma T-strains, *Andrologia* 7, 309-316
- Otto FJ, Hettwer H, Hofmann N (1990): Differenzierung menschlicher Spermazellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie. *Urologe[A]* 29, 46-48
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A (2000): Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology*, 55, 881-885
- Paulson JD, Polakoski KL (1977 a): Isolation of a spermatozoal immobilization factor from Escherichia coli filtrates. *Fertil Steril* 28, 182-185
- Paulson JD, Polakoski KL (1977 b): A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Ferti Steril* 28, 178-181
- Petzoldt R, Engel S (1994): Zellkonzentrationen und Motilität der Spermien des Mannes - konventionell und computer-gestützt ermittelt. *Fertilität* 10, 26-30
- Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A (2000): Association of Ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol* 163, 1775-1778
- Purvis K, Christiansen, E (1995): The Impact of infection in sperm quality. *J Br Fertil Soc* 1, 31-41
- Riedel HH (1980): Techniques for the detection of leukocytospermia in human semen. *Arch Androl* 5, 287-293

Sanchez R, Villagran E, Concha M, Cornejo R (1989): Ultrastructural analysis of the attachment sites of Escherichia coli to the human spermatozoon after in vitro migration through estrogenic cervical mucus. *Int J Fertil* 34, 363-367

Schaeffer A J (1998): Aetiopathology and pathogenesis of urogenital infections. *Andrologia* 30 (Supp. 1), 3-6

Schiefer HG, Jantos C, Weidner W (1994): Uroadnexitis des Mannes und akutes Urethralesyndrom der Frau, *Urologe [A]* 33, 188-195

Schiefer HG (1998): Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for aetiological classification. *Andrologia* 30 (Supp. 1), 7-13

Schieferstein G, Hook B, Blasius C, Adam W, Schubring G, Cörlin R (1986): Zur Bedeutung mikrobiologischer Befunde im Ejakulat von Fertilitätspatienten. *Fertilität* 2, 144-149

Schirren C, Zander HA (1966): Genitalinfektionen des Mannes und ihre Auswirkungen auf die Spermatozoenmotilität. *Med Welt* 45, 45-47

Schlegel PN, Chang TSK, Marshall FF (1991): Antibiotics: potential hazards to male fertility. *Fertility and Sterility* 55, 255-242

Schmidt U, Knöll B (1987): Über den Erregereinfluß auf die In-vitro-Penetration menschlicher Spermatozoen in bovinen Cervixmucus. *Fertilität* 3, 121-124

Schmidt-Matthiesen H (1992): Gynäkologie und Geburtshilfe: Kurzlehrbuch für Studium und Praxis unter Berücksichtigung des Lernzielkataloges. 8. Auflage; F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart New York, 1992

Smith DC, Barratt CL, Williams MA (1989): The characterization of non-sperm cells in the ejaculates of fertile men using transmission electron microscopy. *Andrologia* 21, 319-333

Scholz M, Graf N, Steffens J, Schönhofen H, Jeannell, JP, Schofer O, Sitzmann C (1996): Mumpsorchitis im Jugend- und Erwachsenenalter: Ein vergessenes Krankheitsbild. *Dt. Ärzteblatt* 93, 33, A 2087-2090

Schroeder-Printzen I, S. 214-216 in Krause W, Weidner W (1998): *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, 3. Auflage; Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1998

Schroeder-Printzen I, Ludwig M, Köhn F, Weidner W (2000): Surgical Therapy in infertile men with ejaculatory duct obstruction: technique and outcome of a standardized surgical approach. *Hum Reprod* 15, 1364-1368

Soffer Y, Ron-El R, Golan A, Hermann A, Caspi E, Samra Z (1990): Male genital mycoplasmas and Chlamydia trachomatis: its relationship with accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity. *Fertil Steril* 53, 331-336

Stone SC, de la Maza LM, Peterson EM (1986): Recovery of microorganisms from the pelvic cavity after intracervical or intrauterine artificial insemination. *Fertil Steril* 46, 61-65

Swenson CE, Toth A, O'Leary WM (1979): Ureplasma urealyticum and human infertility: the effect of antibiotic therapy on semen quality. *Fertil Steril* 31, 660-665

Teague NS, Boyarsky S, Glenn JF (1971): Interference of human spermatozoa motility by Escherichia coli. *Fertil Steril* 22, 281-85

Tomlinson MJ, Barrat CLR, Cooke ID (1993): Prospective study of leukocytes and leucocytes subpopulations in semen suggests they are not the cause of male infertility. *Fertil Steril* 60, 1069-1075

Togni G, Gallicciotti G, Coccia P, Piffaretti-Yanez A, Stamm J, Balerna M (1995): Computer-aides semen analysis: sperm concentration assesment by the Strömberg-Mika system, *Andrologia* 27, 55-65

Toth A, Lesser ML (1981): Asymptomatic bacteriospermia in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 36, 88-91

Tuttle, JP, Bannister, ER, Derrick, FC (1977): Interference of spermatozoal motility and spermatozoal agglutination by Candida albicans, *J Urol* 118, 797-799

van der Ven HH, Jeyendran RS, A-Hasani S (1988): Glass wool column filtration on human semen: Relation to swim up procedure and outcome of IVF. *Hum Reprod* 3, 85-88

Vidal A, Ludwig M (1999): Das Prostatitissyndrom, *Internist. Prax.* 39, 495-503, Hans Marseille Verlag GmbH München

Weidner W, Brunner H, Krause W (1980): Quantitative culture of Ureplasma urealyticum in patients with chronic prostatitis or prostatosis. *J Urol* 124, 622-625

Weidner W, Krause W, Brunner H, Schiefer HG (1984): Fertilität und Adnexitis beim Mann. *Helv Chir Acta* 51, 357-362

Weidner W, Krause W, Schiefer HG, Brunner H, Friedrich HJ (1985): Ureaplasma infections of the male urogenital tract, in particular prostatitis, and semen quality. *Urol Int* 40, 5-9

Weidner W, Schiefer HG, Krauss H (1988): Role of Chlamydia trachomatis and mycoplasmas in chronic prostatitis. A review. *Urol Int* 43, 167-173

Weidner W, Garbe C, Weißbach L, Harbrecht J, Kleinschmidt K, Schiefer HG, Friedrich HJ (1990): Initiale Therapie der akuten einseitigen Epididymitis mit Ofloxacin. *Urologe [A]*, 29, 272-276

Weidner W, Jantos C (1991 a): Krankheiten der Prostata. Prostatitisyndrom; in: *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*; hrsg. v. Krause W, Rothauge CF; 2. Auflage; Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1991, 193-207

Weidner W, Jantos C, Schiefer HG, Haidl G, Friedrich HJ (1991 b): Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis. *Arch Androl* 26, 173-183

Weidner W, Zöller G, Ringert RH (1992): Sexuelle Differenzierungsstörungen aus andrologischer Sicht. *Urologe [A]*, 31, 322-327

Weidner W, Diemer T, Ludwig M (1995): Urogenitale Infektionen und Fertilitätsstörungen beim Mann, *Fertilität* 11, 145-152

Weidner W in Krause W, Weidner W (1998): *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, 3. Auflage; Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1998, S.201-207

Weidner W und Krause W (1999): Orchitis. In: *Encyclopedia of Reproduction*, Volume 3, Academic Press, 524-527

Weidner W., Krause W., Ludwig L. (1999): Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 5, 421-432

Wetzels AMM, Janssen HJG, Goverde HJM, Bastiaans BA, Takahashi K, Rolland R (1993): The influence of sperm density on the motility characteristics of washed human spermatozoa. *Int J Androl*, 16, 15-19

Wilke G, Scharf C, Hinney B, Michelmann HW, Kuhn W (1991): Percoll-Dichtegradientenzentrifugation versus Swim-up-Verfahren. Vergleich zweier Aufarbeitungsmethoden mit Hilfe eines vollautomatischen Samenzellanalysegerätes. *Fertilität* 7, 144-149

Witkin SS, Sultan KM, Neal GS, Jeremias J, Grifo JA, Rosenwaks Z (1993): Detection of Chlamydia trachomatis in semen by the polymerase chain reaction in male members of infertile couples, *Am J Obstet Gynecol*, 168, 1457-62

Wolff H, Anderson DJ (1988 a): Immunohistologic characterization and quantification of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril* 49, 497-504

Wolff H, Anderson DJ (1988 b): Evaluation of granulocyte elastase as a seminal plasma marker for leukocytospermia. *Fertil Steril* 50, 129-132

Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ (1990): Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 53, 528-536

Wolff H, Bezold G, Zebhauser M et al. (1991): Impact of clinically silent inflammation on male genital tract organs as reflected by biochemical markers in semen. *J Androl* 12, 331-334

Wolff H, Panhans A, Stolz W, Meurer M (1993): Adherence of Escherichia coli to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and E. coli. *Fertil Steril* 60, 154-158

World Health Organization (1987): WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 2. Auflage; The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1987.

World Health Organization (1992): WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3. Auflage; The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1992.

World Health Organization (1993): WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. 1. Auflage; The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1993.

World Health Organization (1999): WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4. Auflage; The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1999.

Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF (1997): The correlation of ureaplasma urealyticum infection with infertility, *Andrologia* 29, 219-226

6 Appendix

6.1 Software-Einstellung des Mika-Motion-Analysers

Anzahl der Bilder	32
Mindestbildanzahl	15
Vielfache der Bildgrundfrequenz	1
Minimale Fläche des Objektes	20 pixel
Maximale Fläche des Objektes	300 pixel
Schwellenwert für Objekte	159
Objekte	Hell
Geschwindigkeitsklassenbreite	5 $\mu\text{m/s}$
Geschwindigkeitsgrenze für unbewegliche Objekte (immotile)	5 $\mu\text{m/s}$
Geschwindigkeitsgrenze für lokal bewegliche Objekte (lok. motile)	20 $\mu\text{m/s}$
Tiefe der Kammer	10 $\mu\text{m/s}$
Verdünnung 1/(n)	1,0
Temperatur der Probe	37°C
Eichungsfaktor	408
Korrektur	Ein
Richtung	Ein
Zeilensprung 3	Distanz 31 pixel
Anzahl der Relaxationen	7
Pause	2
Tukeyfenster	6
Maximaler Radius	30 $\mu\text{m/s}$
Minimale Fläche der unbeweglichen Objekte	25 pixel
Maximale Fläche der unbeweglichen Objekte	100 pixel

7 Danksagung

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. W. Weidner, Direktor der Urologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Unterstützung und Verwirklichung dieser Promotionsarbeit sowie die vorbildliche Betreuung in allen Stadien meiner Arbeit bedanken. Sein großes Interesse an meiner Arbeit, die stetige Ansprechbarkeit, Geduld und Diskussionsbereitschaft der Versuchsergebnisse haben mich diese Arbeit erfolgreich zu Ende bringen lassen. Desweiteren gab er mir die Möglichkeit meine Ergebnisse auf diversen Kongressen durch Poster oder Vorträge präsentieren zu können und schließlich auch einige Publikationen zu veröffentlichen. Der immer wieder aufs Neue stattgehabte Gedankenaustausch hat mein Interesse an wissenschaftlichen Arbeiten geweckt. Dafür nochmals herzlichen Dank. Vielen Dank auch den Mitarbeitern der Urologischen Klinik für die stete Unterstützung meiner Bemühungen.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich Herrn Dr. T. Diemer aussprechen, der mir zum einen das etablierte Versuchskonzept überließ und mich zum anderen in die andrologische Basisuntersuchung im Labor sowie die Handhabung der CASA einführte. Desweiteren hat er mich immer wieder ermutigt und durch den steten Gedankenaustausch unterstützt sowie mit großer Sorgfalt meine Arbeit korrekturgelesen.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. med. H.-G. Schiefer vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Aufarbeitung und die unkomplizierte Bereitstellung der Erreger für die gesamten Experimente. Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei seiner Mitarbeiterin Frau U. Gerhard bedanken, welche bedauerlicherweise verstorben ist.

Desweiteren möchte ich mich sehr herzlich bei den technischen Assistentinnen Frau T. Schneider und Frau K. Schmidt aus dem Urologischen Labor bedanken, die immer tatkräftig und mit kreativem Gedankenaustausch die Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit begleiteten und mir ein uneingeschränktes und unkompliziertes Arbeiten ermöglichten. Ein herzliches Dankeschön auch an den damaligen Laborleiter Herrn Dipl.-Physiker J. Kraushaar für seine Unterstützung meiner Arbeit und Hilfestellung bei der Erstellung der Datenbanken für die statistische Auswertung.

Mein bester Dank gilt auch Herrn Pabst vom Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität, der für mich die gesamte statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt hatte.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich auch an Herrn Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill aussprechen, welcher meine Arbeit ebenfalls in regem Gedankenaustausch unterstützt hat und mir durch die Möglichkeit der Nutzung der Dermatologischen Bibliothek und

Kopiermöglichkeiten wesentlich bei der Literaturrecherche behilflich war, aber auch durch die offene Zusammenarbeit beider andrologischen Labors mir bei Schwierigkeiten zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch noch sehr herzlich bei meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Freunden und meinem Ehemann für die moralische Unterstützung und die Geduld mit mir bedanken.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Huwe
 Vorname: Petra
 Geburtsdatum/-ort: 05.12.68, Frankenthal
 Anschrift: Andreasteich 21
 35398 Gießen
 Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulbildung:

1975-1979 Grundschule in Heßheim
 1979-1988 Albert-Einstein-Gymnasium, Frankenthal
 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Praktikum:

1988 Bangalore/Indien
 Arbeitsbereiche: Krankenhaus, Kinderheim,
 Slum (Medizinische Betreuung/Sozialarbeit)

Freiwilliges Soziales Jahr:

1988-1989 Freiwilliges Soziales Jahr,
 Diakonissenkrankenhaus Speyer,
 Abteilung Chirurgie

Hochschulbildung:

1989-1990 Universität zu Mainz: Studiengang Medizin
 1990-1997 Universität zu Gießen: Studiengang Medizin
 ab 1990 2. Studiengang: Sportwissenschaften
 1994 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 1996 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 1997 Ärztliche Prüfung
 1998 Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr:

1996/1997 Lehrkrankenhaus Klinikum Wetzlar
 Urologische Universitätsklinik Gießen

AIP:

1997/1998 Bürgerhospital Friedberg, Chirurgie

Nebentätigkeit:

1994-1997 Studentische Hilfskraft bei Prof. Dr. W. Weidner,
 Urologische Universitätsklinik Gießen
 Projekt: Computerisierte Weiterbildung des
 Arbeitskreises für Andrologie (Kompendium der
 Andrologie unter www.med.uni-giessen.de/aka/andro)

Facharztausbildung:

seit 1998 Wiss. angest. Ärztin, Urologische Universitätsklinik Gießen
 seit 03.03.2004 Fachärztin für Urologie

Mitgliedschaften:

seit 1996 Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Andrologie
 seit 1999 Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Urologie
 seit 1999 Mitglied der European Society of Human Reproduction
 and Embryology (ESHRE)

9 Publikationsliste

9.1 Originalarbeiten

P. Huwe, T. Diemer, M. Ludwig, J. Liu, H.G. Schiefer, W. Weidner (1998): The influence of different uropathogenic microorganisms on human spermatozoal parameters in an in vitro experiment , *Andrologia* 30 (Supp. 1), 55-59

T. Diemer, P. Huwe, H. W. Michelmann, F. Mayer, H. G. Schiefer, W. Weidner (2000): Escherichia coli- induced alterations of human spermatozoa. An electron mikroskopy analysis. *Int J Androl* 23, 178-186

M. Ludwig, J. Dimitrakov, T. Diemer, P. Huwe. W. Weidner (2001): Das Prostatitissyndrom – Ejakulatveränderungen und Auswirkungen auf die Fertilität. *Urologe [A]* 40, 18-23

M. Ludwig, C. Stelz, P. Huwe, R. Schäffer, M. Altmannsberger, W. Weidner (2001): Immunocytological Analysis of Leukocyte Subpopulations in Urine Specimens before and after Prostatic Massage. *Eur Urol*, 39, 277-282

T. Diemer, P. Huwe, M. Ludwig, I. Schroeder-Printzen, H. W. Michelmann, H.-G- Schiefer, W. Weidner (2003): Influence of autogenous Leukocytes and Escherichia coli on sperm motility parameters in vitro. *Andrologia* 35, 100-105

M. Ludwig, A. Vidal, P. Huwe, T. Diemer, W. Pabst, W. Weidner (2003): Significance of inflammation on standard semen analysis in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Andrologia* 35, 152-156

T. Diemer, P. Huwe, M. Ludwig, E. W. Hauck, W. Weidner (2003): Urogenital infection and sperm motility. *Andrologia* 35, 283-287

R. Menkveld, P. Huwe, M. Ludwig, W. Weidner (2003): Morphological sperm alterations in different types of prostatitis. *Andrologia* 35, 288-293

9.2 Veröffentlichte Vorträge

P. Huwe (1995): Infection and Infertility

Im Begleitheft des Ausbildungszentrums für Andrologie der Europäischen Akademie für Andrologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 100-102

P. Huwe, T. Diemer, H.G. Schiefer, M. Dandal, I. Schroeder-Printzen, W. Weidner (1996): Influence of different uropathogenic bacteria on human sperm motility in an in vitro experiment. *Andrologia* 28, 72

P. Huwe, S. Gesell, T. Diemer, R. Henkel, W. Weidner (1998): Influence of antibiotics on sperm motility in vitro. *Hum Reprod* 13, Abstract Book 1, 147

P. Huwe, T. Diemer, H.G. Schiefer, L. Ludwig, I. Schroeder-Printzen, W. Weidner (1998): Influence of different uropathogenic bacteria on human sperm motility parameters in an in vitro experiment. *Andrologia* 30, 64

P. Huwe, S. Gesell, M. Ludwig, T. Diemer, R. Henkel, W. Weidner (1999): Der Einfluß von verschiedenen Antibiotika auf die Motilitätsparameter humaner Spermatozoen in in-vitro Inkubationsversuchen. *Urologe [A]*, 38, Suppl. 1, 14

R. Menkveld, P. Huwe, M. Ludwig, W. Weidner (1999): Effect of location of male accessory gland inflammation on semen variables with special reference to sperm morphology. *Hum Reprod* 14, Abstract Book 1, 156-157

P. Huwe, R. Menkveld, M. Ludwig, W. Weidner (1999): Effect of location of male accessory gland inflammation on semen variables with special reference to sperm morphology. *Andrologia* 31, 378-379

P. Huwe, R. Menkveld, M. Ludwig, W. Hochreiter, A.J. Schaeffer, W. Weidner (2000): Der Einfluß des chronischen Beckenschmerzsyndroms auf die spezielle Spermatozoenmorphologie, unter Einschluß der Tygerberg-Klassifikation. *Urologe [A]*, 39, Suppl. 1, 64

P. Huwe, A. Nowotny, T. Diemer, M. Ludwig, M. Slavov, W. Weidner (2003): Evaluation of Sperm-Antibodies using the direct SpermMAR[®]-Test and the direct Immunobead-Test in patients with andrological disorders, *Urologe [A]* 42, Suppl. 1, 93

9.3 Übersichtsartikel

T. Diemer, M. Ludwig, P. Huwe, D. Buchanan Hales, W. Weidner (2000): Urogenitale Infektionen beim Mann – können sie die Fertilität beeinflussen?. Reproduktionsmedizin 16, 155-167, Springer Verlag 2000

T. Diemer, M. Ludwig, P. Huwe, DB Hales, W. Weidner (2000): Influence of urogenital infection on sperm function. Current Opinion in Urology, 10, 39-44

W. Weidner, T. Diemer, P. Huwe, H. Rainer, M. Ludwig (2002): The role of Chlamydia trachomatis in prostatitis. Int J of Antimicrobial Agents 19, 466-470

9.4 Buchkapitel

P. Huwe, W. Weidner (Herausgeber D. Hauri, P. Jaeger) Checkliste Urologie (2000): Kapitel Infektiologie, Thieme Verlag, S. 185-212

P. Huwe, W. Weidner (Herausgeber D. Hauri, P. Jaeger) Checkliste Urologie (2000): Kapitel Operative Eingriffe bei entzündlichen Erkrankungen, Thieme Verlag, S. 365/371/381/399/407/410/416