

· 指南与共识 ·

精子形态学分析中国专家共识

中国性学会生殖检验分会《精子形态学分析中国专家共识》编写组^{**}

摘要 精子形态学分析一直是生殖检验领域的重点和难点,存在主观性强、质量控制困难、实验室间结果互认度差等问题。为进一步规范精子形态学分析过程,提高精子形态学分析结果的准确性,由中国性学会生殖检验分会发起并组织精子形态学分析领域的专家,在《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第5版、第6版的基础上,结合临床实践及已发表文献,根据我国实情,共同讨论及制定本共识。本共识涉及精子形态学分析内容、精子形态学分析方法和操作流程、正常形态精子判断标准、异常形态精子类型及特定类型畸形精子症、精子形态学评估流程、精子形态学分析的质量控制、精子形态学分析报告内容及精子形态学分析中存在的问题与展望等,旨在为从事生殖医学、男科学及生殖检验专业的医务人员提供参考。

关键词 精子; 形态学分析; 质量控制; 专家共识

doi: 10.3969/j.issn.1008-0848.2023.03.002

指南注册号 IPRP-2022CN387

中图分类号 R321.1

Chinese experts' consensus on sperm morphology analysis

Compiling Group of Chinese Experts' Consensus on Sperm Morphology Analysis from the
Reproductive Testing Branch of China Sexology Association

^{*} Corresponding author: Lu Jinchun. E-mail: 406646227@qq.com; Shi Liang. E-mail: zch198028@163.com

Abstract Sperm morphology analysis has always been the focus and difficulty in the field of reproductive testing, with some problems such as strong subjectivity, difficulty in quality control and poor mutual recognition of the results among laboratories. In order to further standardize the process of sperm morphology analysis and improve the accuracy of analysis results, the Reproductive Testing Branch of China Sexology Association initiated and organized the experts in the field of sperm morphology analysis to jointly discuss and formulate this consensus based on the 5th and 6th editions of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, in combination with the relevant literature published in recent years and clinical practice of China. This consensus covers the contents, methods and procedures of sperm morphology analysis, criteria for normal and abnormal sperm morphology, specific sperm deformities, evaluation process of sperm morphology, and the quality control, report contents, existing problems and prospects of sperm morphology analysis, and is intended to provide reference for medical personnel engaged in reproductive medicine, andrology and reproductive testing.

Key words spermatozoa; morphology analysis; quality control; expert consensus

^{*} 通信作者: 陆金春, E-mail: 406646227@qq.com; 石亮, E-mail: zch198028@163.com

[#] 执笔作者: 石亮(南京大学医学院附属鼓楼医院), 陆金春(东南大学附属中大医院), 程洪波(南京医科大学附属苏州医院/苏州市立医院), 温子娜(四川锦欣西园妇女儿童医院/成都市锦江区妇幼保健院), 杨斯桀(山东大学附属生殖医院), 袁人培(北京大学第三医院)

共识编写组专家成员(按姓氏汉语拼音排序): 安康(广州医科大学附属第三医院)、程洪波(南京医科大学附属苏州医院/苏州市立医院)、黄玲(郴州市第一人民医院)、纪冰(青海省人民医院)、蒋祥龙(江西中医药大学附属生殖医院/江西省人类精子库)、李福平(四川大学华西第二医院)、林典梁(福建医科大学附属福建省妇幼保健院/福建省人类精子库)、刘凯峰(江苏省苏北人民医院/扬州大学附属苏北人民医院)、陆金春(东南大学附属中大医院)、陆影(北京大学第三医院)、石亮(南京大学医学院附属鼓楼医院)、唐正(南华大学附属第一医院)、温子娜(四川锦欣西园妇女儿童医院/成都市锦江区妇幼保健院)、夏欣一(东部战区总医院)、谢晓东(上海交通大学医学院附属第六人民医院)、杨斯桀(山东大学附属生殖医院)、袁人培(北京大学第三医院)、周雪(南京大学医学院附属鼓楼医院)、朱来晴(南京大学医学院附属鼓楼医院)、朱文兵(中南大学基础医学院)

精子形态学分析是评估精子质量和/或男性生育力的重要指标之一。在严格使用精子形态学评判标准的情况下,已经证实正常形态精子百分率与不同的生育力评价的终点指标(妊娠等待时间、体内与体外妊娠率)存在联系^[1-2]。为了能够准确评估男性生育能力,为临床医生的诊断和治疗提供可靠的实验依据,准确的精子形态学分析报告就显得尤为重要。尽管《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》(以下简称“手册”)第5版、第6版提供了精子形态学分析的详细步骤及大量的精子形态学彩图^[2-3],但由于手册依据精子头部和尾部的诸多特征,人为设定临界标准来判断正常和异常精子,因此,精子形态学分析具有主观性,难以标准化。而各实验室采用的精子形态学制片方法和判断标准的不同、技术人员水平的差异使得精子形态学分析的结果在不同实验室互认存在困难。精子形态学分析的规范化培训及室内、室间质控的开展势在必行。为进一步规范精子形态学分析过程,提高精子形态学分析结果的准确性,中国性学会生殖检验分会成立《精子形态学分析中国专家共识》编写组,在手册第5版、第6版的基础上^[2-3],结合我国的实情,编写本共识,以指导临床医疗机构从事生殖检验的技术人员更规范地进行精子形态学分析。

一、精子形态学分析内容

精子形态学分析应包括正常形态精子百分率,头部、颈部和中段、尾部及残留胞质四部分异常精子的计数及百分率,以及有无特定精子畸形等。

二、精子形态学分析方法及操作流程

(一) 精液涂片制备

精子形态学评估的制片包括精液涂片、干燥、固定及染色等步骤。对于不同类型的精液样本,在涂片前可采用不同的方法处理后再涂片。

1. 拉薄涂片法

对于液化正常、精子浓度为 $(2 \sim 50) \times 10^6/\text{mL}$ 的精液标本,一般采用拉薄技术直接涂片:取 $5 \sim 10 \mu\text{L}$ 的精液, 45° 角度,约1 s涂一张玻片。如有必要,可改变角度及拉片时长,以获得更好的涂片质量。当精子浓度低时(如 $< 2 \times 10^6/\text{mL}$),可采用离心的方法,将精子浓缩后再进行拉薄涂片(注意:浓缩后精子浓度不要超过 $50 \times 10^6/\text{mL}$)。当精子浓度过高时($> 50 \times 10^6/\text{mL}$),可采用自身精浆稀释的方法,再进行拉薄涂片(注意:稀释后精子浓度不要超过 $50 \times 10^6/\text{mL}$)。液化不良或黏稠精液样本经过机械混匀或者酶处理后,根据上述精子浓度要求采取相应的措施后进行拉薄

涂片。

拉薄涂片的优点是精液直接涂片,对精子无损伤;不足之处是染色背景较杂,加之精液成分的影响,可能会产生一定的杂质沉淀,从而影响精子形态评估^[4]。

2. 洗涤处理后涂片法

碎片多或黏稠的精液标本以及计算机辅助评估精子形态学分析的精液标本,可采用生理盐水洗涤精液,洗涤精液时的离心速度为 $(600 \sim 800) \times g$ 离心10 min。洗涤后精子悬液的精子浓度根据原始精液精子浓度调整至 $(2 \sim 50) \times 10^6/\text{mL}$,再用巴斯德吸管,将 $5 \sim 10 \mu\text{L}$ 的精子混悬液均匀地涂在载玻片上,避免精子聚集成团或相互重叠。

洗涤处理的目的是减少背景对精子形态分类的影响,可以改善涂片质量。液化正常的精液样本也可采用洗涤处理后涂片的方法。洗涤、离心等操作可能影响精子形态,如使用洗涤处理后涂片法,须在报告中注明。

(二) 涂片干燥、固定及染色

涂片制作完成后,置于室温下空气干燥。涂片干燥以后,即可开始染色。常用的染色方法有巴氏染色法、Shorr染色法或快速染色法(Diff-Quik)等。推荐使用巴氏染色法。用上述染色法,在光学显微镜亮视野下,精子头部的顶体区染成淡蓝色,顶体后区呈深蓝色,中段可能略呈红色,尾部染成蓝色或淡红色。通常位于头部下部或围绕中段的过量残留胞质染成粉红色、红色(巴氏染色)或者橘红色(Shorr染色)。

1. 巴氏染色

可按照试剂盒操作,注意酸性乙醇的脱色时间及次数,脱色时间的长短将显著改变最终的染色强度。如果省去这一步,精子和背景将会变得黑暗。脱色时间或次数增多则会使精子和背景变淡。

巴氏染色技术适用于分析精子形态学和检查未成熟生精细胞及非精子细胞。使用巴氏染色的涂片可以永久保存,以备将来用于室内质量控制。如果储存在阴暗处,涂片可以稳定保存数月甚至数年。巴氏染色的不足之处是程序繁琐,且耗时。

2. Shorr染色

可按照试剂盒操作,注意脱色时间及次数。Shorr染色法可以清晰地显示精子结构,得到与巴氏染色相近的效果。

3. Diff-Quik快速染色

可按照试剂盒操作,注意每一步骤之间均将载玻

片垂直竖立放在吸水纸上,以去除多余的液体。如果涂片的背景染色很深,应取一定量的该精液样本进行洗涤,制备新涂片并染色。洗涤样本可能影响精子形态,必须记录下洗涤程序。

快速染色方法对于需要当天提供分析结果的临床实验室尤为适用。尽管有几种试剂盒报告了相似的染色结果,但也有研究指出,由于检测到的异常精子存在差异,这几种试剂盒需要单独的参考限值^[3,5]。一些快速程序染色的涂片具有较深的背景染色,质量可能低于巴氏染色的涂片。

精子形态学染色方法除以上三种常用染色方法之外,瑞氏染色、瑞-姬染色、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色等方法也有文献报告和使用,这些方法染色后,与上述三种常用染色方法的精子头部的大小可有显著差异^[6],并可能导致正常形态精子百分率结果的差异^[4],故本共识不予推荐。

(三) 封片

精子涂片染色后,封片或不封片均可观察,常规样本可不封片,特殊样本及用于形态学质控的样本建议封片,封片后可长期保存。

使用溶于乙醇的封片剂时,应在涂片上的乙醇未干时滴加封片剂。使用不溶于乙醇的封片剂时,需先对已染色的涂片进行处理:在通风柜中将涂片浸入二甲苯与乙醇的混合溶液(1:1 混合)1 min,再浸入 100% 二甲苯溶液 1 min,将涂片取出滴干 1~2 s 后即可封片^[1]。

封片时注意避免产生气泡,封片完成后需抹去载玻片底部的二甲苯(如使用),并在通风柜内将涂片水平晾干,或者放在吸水纸上干燥 24 h。

(四) 显微镜评估及结果计算

有顺序、随机、不重复地选择涂片的几个区域,对每个可评估的精子进行头部、颈部和中段、尾部及残留胞质四部分的形态分析,以防止有偏差地选择特殊的精子。异常精子缺陷类型具有诊断和研究意义。需要将缺陷类型分类,并计数各缺陷类型精子百分数。头部缺陷、颈部和中段缺陷、尾部缺陷分别表示为%H、%NM、%T,过量残留胞质表示为%C^[3]。

开始评估时,建议先用 400 倍放大倍数(光学亮视野)观察涂片的精子分布和外观、有无其他细胞和碎片等,再在 1 000 倍放大倍数的亮视野下利用多键计数器进行详细评估。

注意仅评估完整的精子(有头和尾的精子)。如果无尾精子头的数量在每 100 个精子中有 20 个以上,则应单独计算,并在报告中注明。不应评估重叠的精子

和受其他颗粒干扰观察的精子,只有当所有视野都有这样的问题时,才可评估这类精子,然后在报告中备注。

在每张涂片(重复涂片)上至少评估 200 个精子,每例样本重复评估 2 次,以达到可接受的低抽样误差。

多重形态缺陷指数的计算:畸形精子指数(teratozoospermia index, TZI),即所有四类异常的总和除以异常精子总数,结果在 1.00 和 4.00 之间, TZI 最大值为 4.00,即每个异常精子最多有四类缺陷:头部、颈部和中段、尾部、过量残留胞质。精子畸形指数(sperm deformity index, SDI),即缺陷的数目除以分析精子总数(包括正常精子和异常精子)。

三、正常形态精子判断标准

精子外形包括头部、颈部和中段、尾部。正常形态精子是指头部、颈部和中段、尾部都正常的精子。正常形态精子的判断标准如下(基于巴氏染色):

(一) 精子头部的正常形态

精子头部轮廓光滑,大体呈椭圆形,长 3.7~4.7 μm ,宽 2.5~3.2 μm ,长宽比 1.3~1.8(可以借助目镜测微尺或计算机系统来测量)。顶体区染色可与顶体后区清晰分辨,顶体区体积占头部体积的 40%~70%,顶体区内没有大空泡,小空泡不多于 2 个,空泡体积不超过头部的 20%。顶体后区无空泡。

(二) 精子中段的正常形态

精子中段细长、规则,长 3.3~5.2 μm ,宽 0.5~0.7 μm ,大约与头部长度相等。中段主轴与头部长轴在一条直线上。中段没有锐利折角。

胞质小滴是位于头-颈连接中段的膜相囊泡,对渗透压敏感,是人类精子有生理功能的正常成分。如果胞质小滴膨胀,其可能会沿着中段长轴延伸。在已固定并染色的涂片中,胞质小滴应小于正常精子头部大小的 1/3。

(三) 精子尾部的正常形态

精子尾部比中段细,均一,长约 45 μm ,大约为头部长度的 10 倍。尾部没有锐利折角,无卷曲。

四、异常形态精子类型

人类精子畸形类别多样,某些生精功能缺陷、附睾病变会造成异常形态精子百分率升高。一些实验室仅仅评估正常形态精子的比例,然而有文献报告,形态异常的类型、部位及程度对判断生育力更加重要^[2]。但即使实验室只报告正常形态精子的比例,检验者也必须能够识别所有异常。

精子畸形的主要的缺陷类型如图 1 所示。

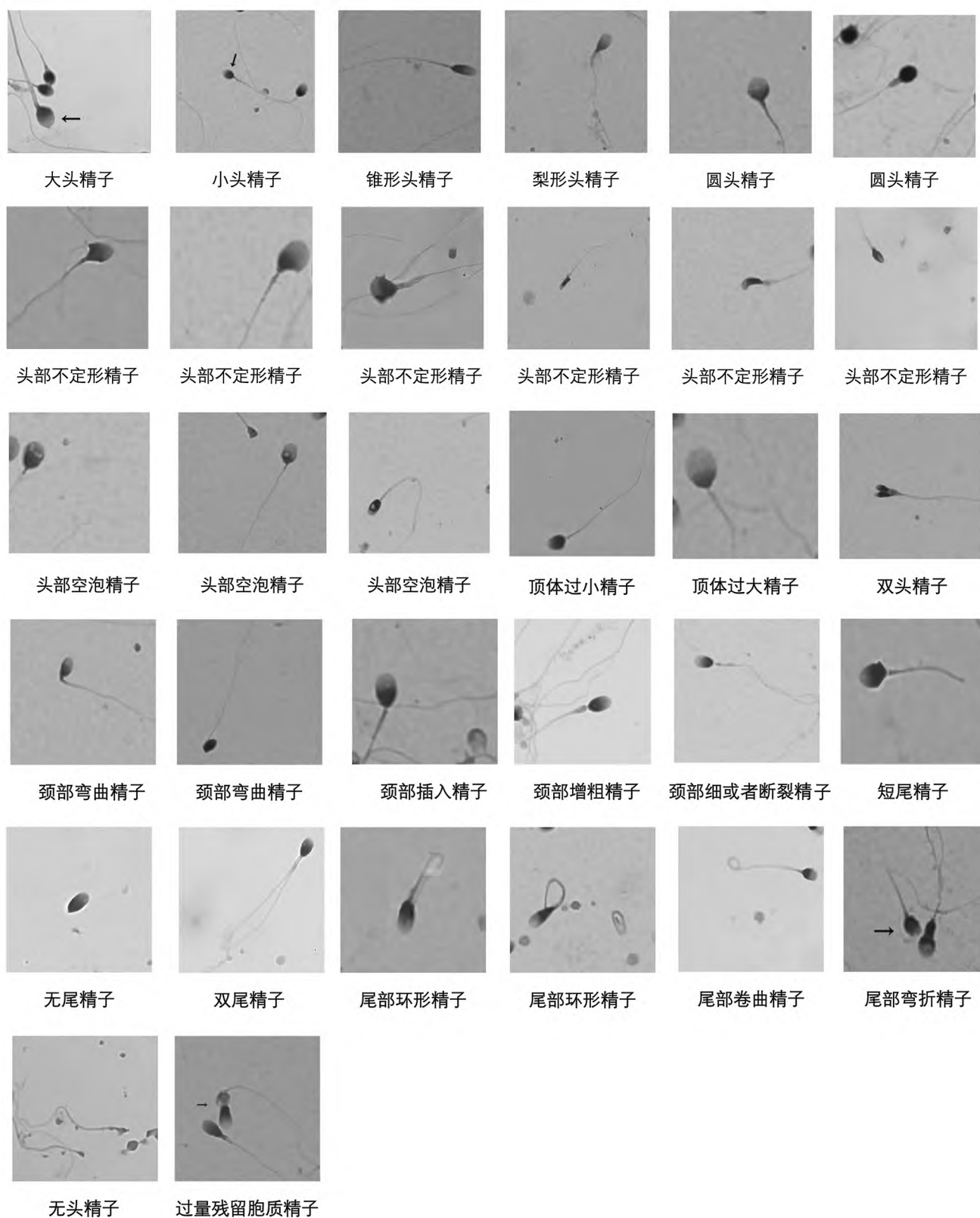


图1 人类精子异常形态示例

(一) 头部缺陷

大头、小头、锥形头、梨形头、圆头、不定形头、有空泡的头(超过2个空泡,或空泡区域占头部20%以上)、顶体后区有空泡、顶体区过小(小于头部的40%)、顶体区过大(大于头部的70%)、双头,或上述缺陷的任何组合。

(二) 颈部和中段缺陷

中段非对称地接在头部、粗或不规则、锐角弯曲、异常细的中段,或上述缺陷的任何组合。

(三) 尾部缺陷

短尾、多尾、断尾、发卡形平滑弯曲、锐角弯曲、宽度不规则、卷曲,或上述缺陷的任何组合。

(四) 过量残留胞质(ERC)

胞质的大小超过精子头部的三分之一,通常伴有

中段的缺陷。

五、特定类型畸形精子症

有时,患者所有或几乎所有的精子呈现一种特定的形态畸形/结构性缺陷(图2),如大头精子症、圆头精子症、无头精子症、鞭毛多发性形态异常等。报告中应详细备注精子缺陷的特定类型。

(一) 大头精子症

大头精子症(macrozoospermia)是一种常染色体隐性遗传病,发生率<1%,患者通常伴随少精子症,其精子几乎全部为四倍体,特征是头部尺寸大于正常精子头部,且不规则,尾部鞭毛数量异常(平均3.6个/头)。目前认为与精子核异常和遗传基因极光激酶C(aurora kinase C, *AURKC*)有关^[7-10]。

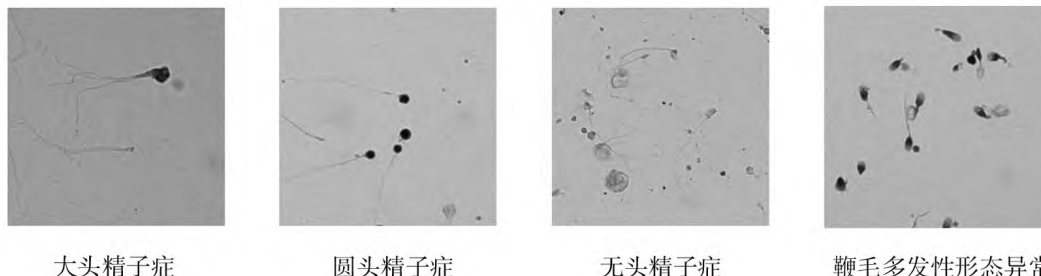


图2 人类精子特定畸形示例

(二) 圆头精子症

圆头精子症(globozoospermia)是畸形精子症里严重致不育、且少见的一种类型,其发生率<0.1%。圆头精子症可分为两类:I型为完全型圆头精子症,精液中精子100%圆头,完全没有顶体^[11-14];II型为部分型圆头精子症,精子中残留部分顶体或伴有其他异常形态^[15-17]。目前圆头精子症的发生机制尚未明确,但普遍认为与常染色体隐性遗传有关,*DPY19L2*(*dpy-19 like 2*)基因突变是圆头精子症最常见(60%~80%)的遗传缺陷致病原因^[13,18]。

(三) 无头精子症

无头精子症(acephalic spermatozoa, AS),也称为断头精子症或大头针样精子症,是男性不育症中最严重的类型之一。临床表现为精液中大量精子头尾分离,有断头的鞭毛、极少的完整精子和无尾的精子头。镜下见大多数断头精子尾部结构正常,中段被质膜包裹。少部分精子尾部有残留的被胞质团包裹的连接段,或呈现中段缺失。部分精子尾部有规则的连接段和中段,或残留的连接段与尾部相连,并被较大的胞质团包裹。有家族发病倾向,病理组织显示为精子发生异常。目前已确定的与男性不育相关的AS基因有

SUN5、*PMFBP1*、*HOOK1*、*BRDT*、*TSGA10*等^[19-23]。

(四) 精子鞭毛多发性形态异常

精子鞭毛多发性形态异常(multiple morphological abnormalities of the sperm flagella, MMAF)在特定类型畸形精子症中较常见,表现为精子运动障碍以及精子尾部鞭毛缺失、过短、不规则或弯曲、卷曲等严重异常。MMAF是一种常染色体隐性遗传病,目前已确定的与男性不育相关的MMAF基因有*DNAH1*、*DNAH2*、*CFAP65*、*CFAP251*、*CFAP43*、*CFAP44*等^[24-33]。

六、人类精子形态学评估流程

见图3。

七、精子形态学分析的质量控制

(一) 精子形态学分析人员的培训与考核

精子形态学分析具有较大的主观性,故严格的培训及考核十分重要。新入职的员工及科室内的轮岗员工需进行培训,即参与精子形态学分析的所有人员均应接受培训。培训内容应包括但不限于手册第5版/第6版理论及图谱培训、科室人员共同阅片培训、特殊精子形态病例分析等,考核内容应包括但不限于正常/异常精子形态特征理论考核、精子涂片/图片分析及与有经验员工的比对等。

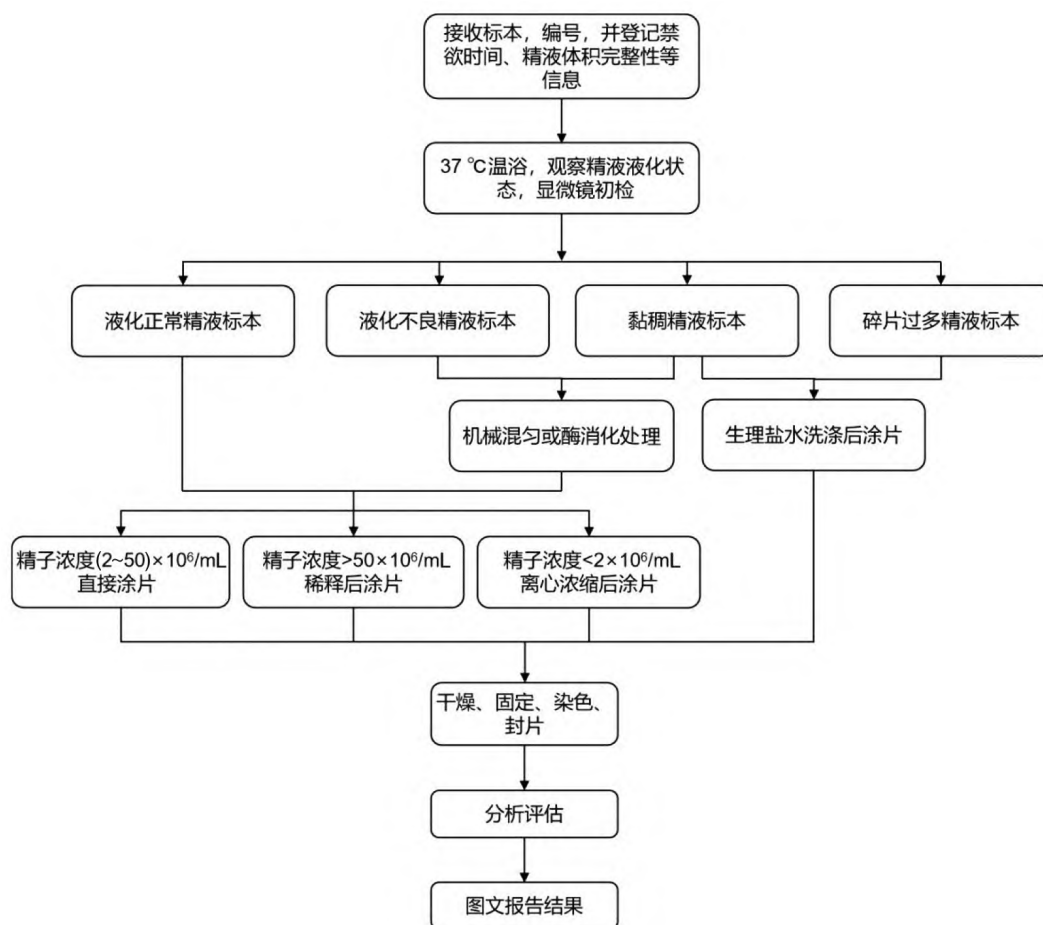


图3 人类精子形态学评估流程

实验室应保存精子形态学分析人员相关教育和专业资质、培训的记录,尤其是精子形态学分析相关的培训考核记录。初入职或离开超过6个月重新返回实验室工作的精子形态学分析人员需进行一段时间的专业知识培训,培训期结束后需与已授权精子形态学分析人员进行比对,可选择临床样本或图片进行,符合率应 $\geq 80\%$ [34]。

实验室应每年组织至少1次精子形态学分析相关的培训及考核,合格率应 $\geq 80\%$ 。实验室应至少每6个月进行一次实验室内人员间比对,可采用至少50个精子图片或5份临床样本涂片,人员间符合率应 $\geq 80\%$ 。

(二) 精子形态学分析标准操作程序

实验室应建立自己的精子形态学分析标准操作程序(SOP),在符合手册的基础上,保持与日常工作一致,使用分析人员容易理解的语言编写,做到“做你所写,写你所做”原则。

与精子形态学分析相关的操作、仪器、质量控制等方面均需建立相应SOP,如制片及染色流程、人工形态

学分析流程及标准、计算机辅助形态分析系统的使用(适用时)、室内质控等。在工作地点可以随时查阅SOP,也可以简易操作卡的形式在工作台上供操作人员快速查阅。形态学分析SOP内容应包括:样本的要求及处理、分析使用的仪器及试剂、正常及异常精子形态判断标准、精子形态学涂片分析流程、参考范围、多重形态缺陷指数计算方法(适用时)、精子涂片的保存及销毁、临床意义等。人员培训及比对也应建立SOP,内容应包括:人员培训的时机、培训内容、考核方法及标准、人员比对的频次、比对方法及判断标准。

实验室应每年对SOP进行回顾评价,当相关标准、实验室环境、仪器设备、试剂等发生改变时,应做相应的修订。

(三) 精子形态学分析全过程的质量控制

1. 分析前质量控制

实验室应给予受检者关于精液样本采集清晰的书面或口头指导。

用于精子形态学分析的样本采集应禁欲至少2

天,最多 7 天,使用手淫法将一次射精的全部样本留取在清洁、广口、无毒的容器内,精液样本在检验前应置于 37 ℃ 的孵育箱或水浴箱中。任何特殊情况如禁欲时间不满足要求、非手淫法采集、样本留取不完整、送检时间过长、送检温度错误等影响精液分析的异常情况,均应记录在报告单中。

2. 分析中质量控制

(1) 精子涂片前应充分混匀样本,快速取样以避免沉降,重复取样前应再次混匀样本。

(2) 精子浓度过低或过高、碎片多、黏稠的精液样本,应处理后再进行涂片。此类特殊处理如离心、洗涤、加液化剂等,可能对精子形态造成影响,应记录在报告单中。

(3) 涂片应充分干燥后再开始染色步骤。

(4) 精子形态学分析应至少评估 200 个精子,有条件的实验室可在另一张重复涂片或同一涂片上,再次评估 200 个精子。

3. 分析后质量控制

分析结果应由有经验的精子形态学分析人员进行审核,应与患者精液常规结果、精液生化结果及历史结果同时对照进行审核,如精液常规结果较好而正常精子形态比例较低,可由有经验的分析人员进行复检,避免由于人员间识别的差异造成结果错误。分析人员应对患者及临床医生提供相关的咨询服务,特殊情况如特殊罕见的精子畸形,应向临床告知,避免漏诊。

4. 室内质控与室间质评

(1) 精子形态学分析的室内质控可采用经空气干燥后的未染色精液涂片作为质控片,随每日患者样本进行染色及阅片,这样可以同时监测染色效果是否合格。当染色效果不佳、不满足正常阅片要求时,应更换染色液。对于人工阅片的实验室,由于人工阅片的主观性会因阅片者对质控片熟悉程度不同而对阅片结果产生偏倚,故有条件的实验室应制备一套质控片,以消除人员因对某些涂片熟悉程度不同而出现结果偏倚的可能性。对于采用计算机辅助精子形态分析系统的实验室,可选择至少正常及异常两个水平的常规样本制成质控片,制备涂片的整个过程应充分混匀精液样本,以减少每张涂片间的差异。

(2) 室内质控的结果应每日记录,当日由有经验的精子形态分析人员对质控结果进行审核,每月进行汇总分析,查找失控或偏倚的原因,对质控过程进行持续改进。

(3) 实验室应每年至少参与 2 次精子形态学的外

部质控计划,按照实验室日常检测方法及流程对外部质控样本进行分析及结果上报,样本应保存至结果回馈后。结果回报后对当次结果进行分析总结,如有失控应分析原因并纠正失控结果。

八、精子形态学分析报告内容

精子形态学分析报告应包含下列信息:(1)患者基本信息,包括年龄、性别、门诊号、临床诊断、样本编号等。(2)精子形态学分析的所有内容信息,包括计数各类精子数目(正常形态精子个数、异常形态精子个数、头部缺陷精子个数、颈部和中段缺陷精子个数、尾部缺陷精子个数、过量残留胞质精子个数)、计算各类精子百分率(正常形态精子百分率、异常形态精子百分率、头部缺陷精子百分率、颈部和中段缺陷精子百分率、尾部缺陷精子百分率、过量残留胞质精子百分率,均保留小数点后一位)、TZI 和 SDI(均保留小数点后两位)。(3)精子形态学分析的正常参考值,主要包括正常形态精子百分率。(4)样本采集时间、检测时间、报告时间等。(5)样本接受者、检测者和核对者信息等,检测者和核对者签名。(6)备注说明或其他陈述性建议,如特定类型畸形精子症的描述“鞭毛多发性形态异常精子多见(比例),建议复查”;严重少精子症的描述“精子浓度低,全片分析多少个精子中可见多少个形态正常精子,相对误差较大,结果供参考”等;隐匿精子症的描述“精子浓度低,经过离心浓缩后全片分析多少个精子中可见多少个形态正常精子,相对误差较大,结果供参考”等。(7)增加形态报告中涵盖的其他内容,如生精细胞、白细胞、红细胞及微生物等,应记录在报告单中,并建议进一步检查。

九、精子形态学分析中存在的问题与展望

手册对精子形态学分析的流程、判断标准等做出了详细的说明,但是精子形态学检测结果受到多种因素影响,包括:制片技术水平不同、染色方法不同、技术人员对形态判断标准把握不同等。因此,精子形态学分析操作标准化是首要任务,此任务的完成主要依靠培训来实现。

目前,在精子形态学分析过程的各环节仍存在一些争议问题,如在制片过程中,精液样本是否需要洗涤,离心操作或生理盐水是否对精子形态分析结果有影响;高浓度精子($>50 \times 10^6/\text{mL}$)检测前按要求稀释调整精子浓度时使用自身精浆还是生理盐水进行稀释;低浓度精子($<2 \times 10^6/\text{mL}$)是否需要离心浓缩后进行检测,那么离心后的精子在形态学上会发生哪些变化。精子形态学所使用的正常参考数值来自染色过程

中对巴氏染色精子的测量,那么在使用其他染色方法进行检测时使用该数值判断是否合理^[6]。手工检测方法在显微镜下观察精子依靠测量工具对精子头部大小进行测量,按要求需要测量 200 个精子,但实际工作中很难对每个精子测量,而大多依靠经验对头部尺寸进行判断,那么这种方法得到的结果和通过实际测量得到的结果之间产生的差异是否可以被接受。以上问题不同实验室可能会根据自身情况做出不同处理,未来希望将这些存在争议的问题细分处理后形成更加细化的操作流程。

精子形态学人工分析作为传统的精子形态检测手段是目前大多数实验室采用的方法,随着计算机软件系统的开发和计算机运算能力的提高,一些计算机辅助精子形态评估(computer-aided sperm morphometric assessment, CASMA)软件应用于精子形态学分析。据中国性学会生殖检验分会 2020 年对全国部分精液检测实验室的统计分析显示,已有 18.67% 的实验室采用计算机辅助分析结合人工复核的方式进行精子形态学分析^[35]。这表明有部分实验室对计算机辅助图像采集和分析结果准确性的认可,同时结合人工复核也说明在计算机辅助判断过程中有部分结果与人工判断相比较有不足之处。目前,有些厂家可以提供 CASMA 的分析设备,但是分析软件识别能力、图像采集清晰度、计算机运算能力、自动化程度各有不同,所以不同设备之间存在差别可造成检测结果的差异,导致部分实验室对 CASMA 分析结果产生疑问。CASMA 使用中遇到的问题还需要进行更多研究并不断完善。

在过去几十年,本领域相关专家不断推动精子形态学检测的标准化,在专家的推动下,各实验室技术人员得到培训,建立了标准化的检测流程并且逐步进行了规范,各检测质控机构在全国范围开展实验室室间质评工作使精子形态学检测在全国有序开展。精子形态学检测相关工作在未来的发展过程中应继续保持这种严谨的模式,同时随着各种技术的发展和运用,如:全卷积神经网络(fully convolutional networks, FCN)模型技术在精子形态学检测领域的应用结合高分辨率成像系统的使用,会使精子形态学检测更加智能且准确^[36];基于无染色精子形态学检测的研究可以省去精子形态学检测的染色过程^[37];精子超微结构改变与精子功能缺失之间关系的研究,会使检测结果在评估患者生育能力和预测辅助生育结局方面更具参考意义^[38]。甚至在经过对精子进行无损伤的形态学检测后,选择形态及超微结构正常的精子用于卵细胞质内单精子注射

(intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 等辅助生殖技术^[38],成为提高辅助生殖技术成功率的有效手段,使精子形态学检测在不育症的诊疗和评估辅助生殖技术结局等方面成为重要指标之一。

致谢:衷心感谢中国性学会生殖检验分会全体委员对本共识的审阅与修订

参 考 文 献

- 1 陆金春,李铮,夏术阶. 中国男性生育力规范化评估. 北京:中国医药科技出版社,2018
- 2 World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010
- 3 World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva: World Health Organization, 2021
- 4 陆金春. 精子形态学分析的标准化与质量控制. 临床检验杂志 2012; 30(10): 834-836, 841
- 5 Coetzee K, Kruger TF, Vandendael A, *et al.* Comparison of two staining and evaluation methods used for computerized human sperm morphology evaluations. *Andrologia* 1997; 29(3): 133-135
- 6 Xu YH, Lu JC, Tang SS. Effects of six kinds of sperm staining methods on human sperm size and evaluation of their staining effects. *J Clin Lab Anal* 2022; 36: e24794
- 7 Carmignac V, Dupont JM, Fierro RC, *et al.* Diagnostic genetic screening for assisted reproductive technologies patients with macrozoospermia. *Andrology* 2017; 5(2): 370-380
- 8 Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, *et al.* Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000; 6(1): 93-105
- 9 Ghedir H, Gribaa M, Mamai O, *et al.* Macrozoospermia: screening for the homozygous c. 144delC mutation in AURKC gene in infertile men and estimation of its heterozygosity frequency in the Tunisian population. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32(11): 1651-1658
- 10 Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977; 26(2): 111-118
- 11 韩丹,朱复希,张静静,等. 1 例圆头精子症患者获临床妊娠并文献复习. 中华男科学杂志 2016; 22(2): 186-188
- 12 沙艳伟,宋岳强,韩斌. 圆头精子症研究进展. 中华男科

- 学杂志 2011; 17(1): 59-62
- 13 吴秋月, 李娜, 夏欣一, 等. DPY19L2 基因与圆头精子症研究进展. 中华男科学杂志 2012; 18(11): 1028-1031
- 14 Singh G. Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int J Fertil* 1992; 37(2): 99-102
- 15 Oud MS, Okutman O, Hendricks LJ, *et al.* Exome sequencing reveals novel causes as well as new candidate genes for human globozoospermia. *Hum Reprod* 2020; 35(1): 240-252
- 16 Dam AH, Ramos L, Dijkman HB, *et al.* Morphology of partial globozoospermia. *J Androl* 2011; 32(2): 199-206
- 17 Modarres P, Tavalaei M, Ghaedi K, *et al.* An overview of the globozoospermia as a multigenic identified syndrome. *Int J Fertil* 2019; 12(4): 273-277
- 18 Guo Y, Jiang J, Zhang H, *et al.* Proteomic analysis of Dpy19l2-deficient human globozoospermia reveals multiple molecular defects. *Proteomics Clin Appl* 2019; 13(6): e1900007
- 19 Zhu F, Wang F, Yang X, *et al.* Biallelic SUN5 mutations cause autosomal-recessive acephalic spermatozoa syndrome. *Am J Hum Genet* 2016; 99(4): 942-949
- 20 Chen H, Zhu Y, Zhu Z, *et al.* Detection of heterozygous mutation in hook microtubule-tethering protein 1 in three patients with decapitated and decaudated spermatozoa syndrome. *J Med Genet* 2018; 55(3): 150-157
- 21 Ye Y, Wei X, Sha Y, *et al.* Loss-of-function mutation in TSGA10 causes acephalic spermatozoa phenotype in human. *Mol Genet Genomic Med* 2020; 8(7): e1284
- 22 Zhu F, Liu C, Wang F, *et al.* Mutations in PMFBP1 cause acephalic spermatozoa syndrome. *Am J Hum Genet* 2018; 103(2): 188-199
- 23 Li L, Sha Y, Wang X, *et al.* Whole-exome sequencing identified a homozygous BRDT mutation in a patient with acephalic spermatozoa. *Oncotarget* 2017; 8(12): 19914-19922
- 24 Tang S, Wang X, Li W, *et al.* Biallelic mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet* 2017; 100(6): 854-864
- 25 Li W, Wu H, Li F, *et al.* Biallelic mutations in CFAP65 cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in humans and mice. *J Med Genet* 2020; 57(2): 89-95
- 26 Wang W, Tu C, Nie H, *et al.* Biallelic mutations in CFAP65 lead to severe asthenoteratospermia due to acrosome hypoplasia and flagellum malformations. *J Med Genet* 2019; 56(11): 750-757
- 27 Li W, He X, Yang S, *et al.* Biallelic mutations of CFAP251 cause sperm flagellar defects and human male infertility. *J Hum Genet* 2019; 64(1): 49-54
- 28 蒋川, 张学广, 王翔, 等. CFAP65 基因突变导致精子鞭毛多发形态异常的遗传学初步研究. 中华男科学杂志 2021; 27(7): 595-602
- 29 Li Y, Sha Y, Wang X, *et al.* DNAH2 is a novel candidate gene associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Clin Genet* 2019; 95(5): 590-600
- 30 Ben KM, Coutton C, Zouari R, *et al.* Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet* 2014; 94(1): 95-104
- 31 Zhang X, Shen Y, Wang X, *et al.* A novel homozygous CFAP65 mutation in humans causes male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Clin Genet* 2019; 96(6): 541-548
- 32 Sha YW, Wang X, Su ZY, *et al.* Patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella harbouring CFAP44 or CFAP43 mutations have a good pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Andrologia* 2019; 51(1): e13151
- 33 Wang J, Zhang C, Tang H, *et al.* Successful results of intracytoplasmic sperm injection of a Chinese patient with multiple morphological abnormalities of sperm flagella caused by a novel splicing mutation in CFAP251. *Front Genet* 2021; 12: 783-790
- 34 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02-A001 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求; CNAS-CL02-A001. 北京: 中国标准出版社, 2021
- 35 伍细言, 黄玲, 彭新华, 等. 我国生殖检验现状的初步调查. 临床检验杂志 2021; 39(4): 247-251
- 36 Shelhamer E, Long J, Darrell T. Fully convolutional networks for semantic segmentation. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 2017; 39(4): 640-651
- 37 Nissen MS, Krause O, Almstrup K, *et al.* Convolutional neural networks for segmentation and object detection of human semen. *Scandinavian Conference on Image Analysis* 2017; 397-406
- 38 Malgorzata K, Depa-Martynow M, Butowska W, *et al.* Human spermatozoa ultrastructure assessment in the infertility treatment by assisted reproduction technique. *Arch Androl* 2007; 53(6): 297-302