

第6版
Sixth Edition

世界卫生组织

人类精液检查与处理 实验室手册

WHO laboratory manual for the
examination and processing of
human semen

国家卫生健康委科学技术研究所
四川省人口和计划生育科学研究所
中华医学会生殖医学分会

译

世界卫生组织

第6版
Sixth Edition

人类精液检查与处理 实验室手册

WHO laboratory manual for the
examination and processing of
human semen

国家卫生健康委科学技术研究所
四川省人口和计划生育科学研究所
中华医学会生殖医学分会

译

译者	卢文红	周芳	王晓尉	俞旭君	傅龙龙
	邱实	郭颖	许剑锋	赵海豹	刘美玲
	周善杰	杨镒缸	唐文豪	赵铭佳	
审校	谷翊群	朱伟杰	刘小章	贾孟春	姚康寿
	王治国	熊承良	商学军	曾旭辉	罗宏志
	刘瑜	陆金春			

定稿 刘德一

人民卫生出版社
·北京·

版权所有，侵权必究！

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th edition 英文版由世界卫生组织 2021 年出版。

© 世界卫生组织 2021

世界卫生组织已将本书的中文翻译和出版权授予人民卫生出版社，并由其对中文翻译的质量及忠实度负责。如中文版与英文版有不一致的地方，以英文版为准。

《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第 6 版

© 人民卫生出版社 2023

图书在版编目 (CIP) 数据

世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册 / 世界卫生组织 (WHO) 主编; 卢文红等译. —北京: 人民卫生出版社, 2023.8

ISBN 978-7-117-34821-8

I. ①世… II. ①世…②卢… III. ①人类—精液—医学检验—手册 IV. ①R446.19

中国国家版本馆 CIP 数据核字 (2023) 第 097164 号

人卫智网 www.ipmph.com 医学教育、学术、考试、健康,
购书智慧智能综合服务平台
人卫官网 www.pmph.com 人卫官方资讯发布平台

世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册

Shijie Weisheng Zuzhi Renlei Jingye

Jiancha yu Chuli Shiyanshi Shouce

译者: 卢文红等

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮编: 100021

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印刷:

经销: 新华书店

开本: 787×1092 1/16 印张: 15.5

字数: 387 千字

版次: 2023 年 8 月第 1 版

印次: 2023 年 9 月第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-34821-8

定价: 118.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

质量问题联系电话: 010-59787234 E-mail: zhiliang@pmph.com

数字融合服务电话: 4001118166 E-mail: zengzhi@pmph.com

- 译者**
- 卢文红 国家卫生健康委科学技术研究所
周 芳 国家卫生健康委科学技术研究所（兼翻译秘书）
王晓尉 国家卫生健康委科学技术研究所
俞旭君 四川省人口和计划生育科学研究所
傅龙龙 国家卫生健康委科学技术研究所
邱 实 国家卫生健康委科学技术研究所
郭 颖 国家卫生健康委科学技术研究所
许剑锋 国家卫生健康委科学技术研究所
赵海豹 国家卫生健康委科学技术研究所
刘美玲 国家卫生健康委科学技术研究所
周善杰 北京大学国际医院
杨镒魮 四川大学华西第二医院
唐文豪 北京大学第三医院
赵铭佳 唐山市妇幼保健院
- 审校**
- 谷翊群 国家卫生健康委科学技术研究所
朱伟杰 暨南大学生命科学技术学院
刘小章 四川省人口和计划生育科学研究所
贾孟春 国家卫生健康委科学技术研究所
姚康寿 浙江省妇幼和生殖保健中心
王治国 国家卫生健康委临床检验中心
熊承良 武汉华科生殖医学专科医院 / 华中科技大学同济医学院
商学军 南京大学医学院附属金陵医院 / 东部战区总医院
曾旭辉 南通大学
罗宏志 国家卫生健康委科学技术研究所
刘 瑜 深圳市人民医院
陆金春 东南大学附属中大医院
- 定稿**
- 刘德一 澳大利亚墨尔本大学

序言

获得高质量、循证、负担得起的卫生服务是全民健康覆盖 (universal health coverage, UHC) 的关键,包括性与生殖健康。普及实验室服务,对于确保相关人群能够避免不良的性与生殖健康问题带来的社会经济后果至关重要。

《世界卫生组织人类精液和精子 - 宫颈黏液相互作用实验室检验手册》(WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction) 于 1980 年首次出版,以满足对人类精液标准化检测程序的日益增长需求。该手册后来进行了四次修订(1987 年、1992 年、1999 年和 2010 年),并被翻译成多种语言文字。

该手册是人类精液实验室检查和处理程序及方法的参考文献,旨在保持和维持不同实验室的分析质量和结果的可比性。事实上,在过去的 40 年里,该手册已成为公认的标准,并被世界各地临床和研究实验室广泛使用。

该手册是一本标准手册,不仅适用于精液分析的初学者,也适用于为临床或研究确定精液参数而进行精液处理和检查的所有人员。该手册提供了关于精液检查和临床评估精液制备、专项检测、冷冻保存、精液分析实验室质量控制以及男性不育症研究等实验室检查的重要资料。这些资料对于监测旨在改善男子性与生殖健康的治疗及其他干预措施的效果也是重要的。

该手册的第 6 版将是生育力保健所需实验室程序的最新循证信息的重要来源。此版本含有新增与扩展的关于精液样本制备、感染标志物确定、计算机辅助精子分析以及一些扩展基本检查和前沿性检查分类的章节。

《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第 6 版将有益于旨在改善性与生殖健康的规划,包括生育力保健和可及性(尤其是男性),从而支持各国实现可持续发展目标 3.7 (生殖健康保健服务,包括计划生育服务的普遍可及性)的努力。该手册还将支持实现可持续发展目标 3.8 (全民健康覆盖,包括财务风险保护,以及获得优质基本医疗保健服务)。

世界卫生组织和医院资源规划 (hospital resource planning, HRP) 感谢世界各地对本手册的审查和修订作出贡献的技术专家。

Ian Askew, PhD

世界卫生组织性与生殖健康研究部主任

(包括 UNDP/UNFPA/UNICEF/WHO/ 世界银行人类生殖特别规划)

致谢

本手册由世界卫生组织性与生殖健康研究部(包括联合国开发计划署 / 联合国人口基金会 / 联合国儿童基金会 / 世界卫生组织 / 世界银行人类生殖研究、发展与研究培训特别规划 - HRP)编写出版。对下列参与手册编写、编辑和修订的人员深表谢意。

主编

Dr. Lars Björndahl, MD, PhD

Laboratory medicine

Andrology Laboratory Director

ANOVA, Clinic for Endocrinology, Karolinska University Hospital and Department of Medicine, Huddinge, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

编委会成员

Professor Oleg Apolikhin, MD, PhD

Andrology

Professor and Director, Research Institute of Urology and Interventional Radiology named after N.A. Lopatkin-branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation
Moscow, Russian Federation

Professor Elisabetta Baldi, Doctor in Biology

Laboratory medicine

Associate Professor of Clinical Pathology, Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence

Responsible of the semen cryopreservation centre, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi (AOUC)

Florence, Italy

Professor Christopher L.R. Barratt PhD, DSc, FRSE

Head of Division Systems Medicine, Professor of Reproductive Medicine

School of Medicine, University of Dundee

Dundee, United Kingdom

世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册，第 6 版

Professor Mario Philip R. Festin, MD, MSc, MHPed

Obstetrics-gynaecology, clinical epidemiology, health professions education, family planning
Professor, Department of Obstetrics and Gynecology and Department of Clinical Epidemiology,
College of Medicine, University of the Philippines Manila
Convenor, Philippine Study Group on Reproductive Health, National Institutes of Health,
University of the Philippines
Manila, Philippines
WHO Secretariat Consultant

Dr. Jackson C. Kirkman-Brown, MBE, PhD

Reproductive science, andrology, health care science, fertility
University Reader and Director, Centre for Human Reproductive Science (ChRS), College of
Medical and Dental Sciences, University of Birmingham
HFEA Person Responsible and Science Lead, Birmingham Women's Fertility Centre, Birmingham
Women's and Children's NHS Foundation Trust
Birmingham, United Kingdom

Professor Dolores J. Lamb, MS, PhD, HCLD (ABB)

Andrology/urology, clinical chemistry (National Registry of Clinical Chemistry)
High Complexity Laboratory Director (HCLD, American Board of Bioanalysts)
Dow Professor of Urology
Vice-Chairman for Research (Urology)
James Buchanan Brady Foundation Department of Urology, Director, Center for Reproductive
Genomics, Englander Institute for Precision Medicine
Weill Cornell Medical College
New York, United States of America
American Society for Reproductive Medicine

Dr. Michael Mbizvo, PhD

Andrology and reproductive epidemiology
Professor, Reproductive Health Sciences, University of Zimbabwe
Country Director/Senior Associate, Population Council
Lusaka, Zambia

Prof. Dr. Stefan Schlatt, PhD

Reproductive biology, andrology
University Professor and Director, Centre for Reproductive Medicine and Andrology, University
of Münster, Germany
WHO Collaborating Centre for Research in Male Reproduction

Dr. Igor Toskin, MD, PhD, DSc

Public health, STI, HIV/AIDS, urology, dermatology, epidemiology, sexual and reproductive health
Scientist, Department of Sexual and Reproductive Health and Research
World Health Organization
Geneva, Switzerland
WHO Secretariat

Dr. Christina Wang, MD

Endocrinology, andrology (male reproduction and contraception)
Professor of Medicine, David Geffen School of Medicine, UCLA
Division of Endocrinology, Department of Medicine, Harbor-UCLA Medical Center and the
Lundquist Institute
Torrance California, United States of America

参与人员

Karel Blondeel, MSc, MA

HIV/STI prevention and sexual health
Doctoral student, Department of Medicine and Health Sciences, Ghent University
Ghent, Belgium
WHO Secretariat Consultant

MUDr. Petr Houska

Laboratory medicine
Doctoral student, ANOVA, Clinic for Endocrinology, Karolinska University Hospital and
Department of Medicine, Huddinge, Karolinska Institutet
Stockholm, Sweden

Dr. Stepan Krasnyak, MD

Andrology, urology
Associate Scientist, Department of Andrology and Human Reproduction, Research Institute of
Urology and Interventional Radiology named after N.A. Lopatkin-branch of the National Medical
Research Center of Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation Moscow,
Russian Federation

编写组感谢 Ian Askew、James Kiarie 和 Thabo Matsaseng 在部门会议和讨论中给予的支持。
特别感谢瑞士日内瓦世界卫生组织性与生殖健康研究部助理兼秘书 Mrs. Natalie Narkie
Maurer。

非常感谢 WHO 的 Susan Norris、Rebekah Thomas 和 Ian David Coltart 的支持、建议和协助。
特别感谢 WHO 前工作人员 Dr. Kirsten Vogelsong 对手册前几版的出色记录,为最新版

世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册, 第6版

的修订提供了便利。并感谢手册第5版的主编 Dr. Trevor Cooper 在对新版本延续性很重要的数据和其他事项上提供的帮助。

世界卫生组织性与生殖健康研究部(包括联合国开发计划署 / 联合国人口基金会 / 联合国儿童基金会 / 世界卫生组织 / 世界银行人类生殖研究、发展与研究培训特别规划 - HRP) 感谢所有参与公众审查作出贡献的人员。

另外致谢:

- Dr. Christoph Brenker, 明斯特大学生殖医学和男科学中心博士后科学家(协助制定染色方案, 拍摄证明精子病理的显微照片和插图)

- Dr. Meurig Gallagher, 伯明翰大学系统建模和定量生物医学中心研究员(帮助撰写精子活力和 CASA 部分)

- Dr. Monica Muratori, 佛罗伦萨大学实验和临床医学系研究助理(协助撰写检测精子 DNA 碎片化的 Tunel 实验方法)

- Dr. Sara Marchiani, 佛罗伦萨大学实验和临床医学系研究助理(协助撰写精子染色质状态评估方案)。



Dr. Christina Wang, MD

这是《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》的第 6 版。该手册是过去几年 WHO 网站上下载次数最多的文献之一。

Dr. Christina Wang 自 1980 年第 1 版(当时是《世界卫生组织人类精液和精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册》)以来一直参与该手册的编写工作,并继续作为当前第 6 版编委会的活跃成员。

Dr. Wang 是加州大学洛杉矶分校大卫格芬医学院的医学教授。她就职于该院医学系内分泌科,也是 Harbor-UCLA 医学中心 Lundquist 学院临床和转化科学所的现场主管。

Dr. Wang 是一位国际公认的男性生殖医学和生物医学研究学者,多年来,她一直致力于领导开发安全、有效和可逆的男性激素避孕方法、雄激素替代疗法的优化方案以及针对性腺功能低下男子的新型雄激素替代疗法。除此之外,Dr. Wang 还领导了其他数个有影响力的研究项目和创意计划——从基础研究到临床试验,旨在改善生殖健康结局。

世界卫生组织感谢 Dr. Wang 对制定《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》所有 6 个版本做出的杰出贡献。她的贡献既确保了手册制定中高水平的专业性,又确保了这一重要文献所有版本制定的连续性。

缩略语

ART	assisted reproductive technology	辅助生殖技术
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BWW	Biggers, Whitten and Whittingham	Biggers, Whitten 和 Whittingham 培养液
CASA	computer-aided sperm analysis	计算机辅助精子分析
CASMA	computer aided sperm morphometric assessment	计算机辅助精子形态测量分析
CD45	cluster of determination 45 (pan-leukocyte marker)	抗原决定簇 45 (白细胞共同抗原标志物)
CD46	cluster of determination 46 (acrosomal antigen)	抗原决定簇 46 (顶体抗原)
CMA3	chromomycin A3	色霉素 A3
DGC	density-gradient centrifugation	密度梯度离心
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DNase	desoxyribonuclease	脱氧核糖核酸酶
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	Dulbecco's 磷酸盐缓冲液
DTT	dithiothreitol	二硫苏糖醇
EBSS	Earle's balanced salt solution	Earle's 平衡盐溶液
EDTA	ethylenediamine tetra-acetic acid	乙二胺四乙酸
EQA	external quality assessment	外部质量评估
EQC	external quality control	外部质量控制
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GEYC	glycerol-egg yolk-citrate	甘油 - 卵黄 - 柠檬酸盐
HIV	human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
HPF	high-power field	高倍视野
HSA	human serum albumin	人血白蛋白
HTF	human tubal fluid	人输卵管液
ICSI	intracytoplasmic sperm injection	卵胞质内单精子注射
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IQC	internal quality control	内部质量控制

世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册, 第 6 版

IU	international unit	国际单位
IUI	intrauterine insemination	宫腔内人工授精
IVF	in vitro fertilization	体外受精
NA	numerical aperture	数值孔径
QC	quality control	质量控制
sEBSS	supplemented Earle's balanced salt solution	补充 Earle's 平衡盐溶液
SD	standard deviation	标准差
sDF	sperm DNA Fragmentation	精子 DNA 碎片
SOP	standard operating procedure	标准操作程序
TZI	teratozoospermia index	畸形精子指数
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 手册的适用范围	1
1.2 引言	1
1.3 关于第 6 版	2
1.4 编写手册的方法学	3
第 2 章 基本检查	7
2.1 引言	7
2.2 基本精液检查的时间概要	9
2.3 检查前的步骤	10
2.4 检查中与检查后的步骤	11
2.5 补充资料与评注	51
第 3 章 扩展性检查方法	67
3.1 多重精子缺陷指数	67
3.2 精子 DNA 碎片	70
3.3 遗传和基因组检测	84
3.4 相关的免疫学检测和免疫学方法	86
3.5 白细胞介素评估 - 男性生殖道炎症标志物	93
3.6 精液中未成熟生殖细胞的评估	95
3.7 精子包被抗体的检测	95
3.8 附属性腺功能的生化检测	100
3.9 射精顺序评估	108
第 4 章 前沿性检查	111
4.1 精液氧化应激和活性氧检测	112
4.2 顶体反应检测	114
4.3 精子染色质检测	118
4.4 精子跨膜离子流动和转运	120
4.5 计算机辅助精子分析 (CASA)	123
4.6 新兴技术	126
第 5 章 精子制备技术	128
5.1 引言	128

5.2 总则	129
5.3 简单洗涤	130
5.4 直接上游法	130
5.5 非连续密度梯度法	131
5.6 磁激活细胞分选 (MACS)	132
5.7 制备 HIV 感染者的精液样本	132
5.8 制备睾丸精子和附睾精子	133
5.9 制备逆行射精样本	134
5.10 制备辅助射精样本	134
第 6 章 精子冷冻保存	135
6.1 引言	135
6.2 精子冷冻保存的原因	136
6.3 人类精液冷冻保存的风险评估	137
6.4 精液冷冻保存方案	139
6.5 玻璃化冷冻	143
第 7 章 质量保证和质量控制	146
7.1 男科学实验室质量控制	146
7.2 精液检查中误差的性质	147
7.3 QA 计划	150
7.4 数值的质控图	152
7.5 百分率的质控图	155
7.6 评价 $\bar{X}_{bar}$ 和 S 图	155
7.7 分析和报告检测人员间差异的统计程序	157
7.8 外部质量控制和质量保证	160
7.9 QC 的频率和优先次序	162
7.10 培训	163
第 8 章 附录	167
8.1 精液检查结果的解释	167
8.2 设备与安全性	169
8.3 基本精液检查中显微镜的使用	174
8.4 储备液和培养液	178
8.5 精液分析记录表格模板	184
8.6 质控材料	186
8.7 精液分析的国家外部质量控制计划	194
参考文献	195

表格列表

表 2.1	对足量精液体积进行适当稀释的精子悬液最终体积	15
表 2.2	从重复计数 200 个精子 (总计数 400 个精子), 确定所给出平均值的 2 个百分率之间的可接受差异 (基于 95% 置信区间)	19
表 2.3	重复计数结果之间差异的比较及与结果不确定性的关系	25
表 2.4	根据精子计数计算精子浓度	26
表 2.5	固定和巴氏染色步骤	36
表 2.6	精子形态学分类	39
表 2.7	巴氏染色图 1 中的精子形态学评估	43
表 2.8	巴氏染色图 2 中的精子形态学评估	45
表 2.9	巴氏染色图 3 中的精子形态学评估	47
表 2.10	巴氏染色图 4 中的细胞学评估	51
表 2.11	巴氏染色图 5 中的细胞学评估	51
表 2.12	检查湿片未观察到精子数目的概率	53
表 2.13	离心后未观察到精子数目的概率	53
表 2.14	Shorr 染色图 1 中的精子形态学评估	59
表 2.15	DiffQuik 染色图 1 中的精子形态学评估	61
表 2.16	根据所计数的精子总数对应的整数抽样误差 (%) 和 95% 置信区间范围	63
表 3.1	多重精子缺陷指数的计算	68
表 3.2	生育和不育夫妇中男性的精子缺陷指数	69
表 3.3	健康可育男性精子染色体二倍体的基础水平	86
表 3.4	用于免疫珠试验的精液体积	98
表 3.5	锌测定的推荐标准液	102
表 3.6	果糖测定的推荐标准液	104
表 3.7	α - 葡萄糖苷酶活性测定的推荐标准液	107
表 7.1	质量保证和质量控制术语	148
表 7.2	计算 X_{bar} 图的数值	153
表 7.3	计算 X_{bar} 图警戒限和行动限所需要的系数	153

表 7.4	计算 S 图的警戒限和行动限	155
表 7.5	质控图的基本控制规则	156
表 7.6	3 位技术人员对 5 份质控样品评估的精子浓度 ($\times 10^6/\text{mL}$)	159
表 7.7	用各观察值减去样本均值得到样本离均差	159
表 7.8	计算每位技术人员结果离均差的均值、标准差、均值 / 标准误 ($n =$ 样本个数)	159
表 7.9	计算变异大小的分步骤指导	159
表 7.10	技术人员和质控品双因素方差分析的 F - 检验	160
表 7.11	IQC 程序的主要特性	160
表 7.12	QC 日程	162
表 7.13	QC 检验概要	162
表 7.14	评估精子浓度的变异 (误差) 来源	163
表 7.15	评估精子形态学的变异 (误差) 来源	164
表 7.16	评估精子活力的变异 (误差) 来源	165
表 7.17	评估精子存活率的变异 (误差) 来源	166
表 8.1	Cambell 等发表文献中所纳入的参考人群定义	168
表 8.2	结果分布的数据来源	168
表 8.3	源自夫妇无保护性生活 12 个月内自然妊娠时的男性精液参数分布。 摘自 Campell 等的研究；第 5 个百分位数给出了变异性 (95% 置信 区间)	168
表 8.4	精液分析报告格式模板	184

图片列表

图 2.1	精液中非特异性精子聚集	16
图 2.2	不同程度精子凝集示意图	17
图 2.3	辅助评估精子活力的方法	18
图 2.4	在亮视野显微镜下观察伊红 - 苯胺黑涂片	21
图 2.5	改良 Neubauer 血细胞计数板规则	23
图 2.6	网格内方格的精子计数	23
图 2.7	观察整个盖玻片区域寻找活动精子	28
图 2.8	“理想”形态的精子	32
图 2.9	制备正常精液涂片	34
图 2.10	人类精子一些异常形态的示意图	38
图 2.11	评估人类精子形态的结构化顺序	41
图 2.12	巴氏染色彩图 1	42
图 2.13	巴氏染色彩图 2	44
图 2.14	巴氏染色彩图 3	46
图 2.15	巴氏染色彩图 4	49
图 2.16	巴氏染色彩图 5	50
图 2.17	人精子在低渗透压作用下的特征性形态变化示意图	56
图 2.18	人精子受低渗透压作用后的相差显微镜照片	56
图 2.19	Shorr 染色彩图	58
图 2.20	DiffQuik 染色彩图	60
图 3.1	应用荧光检测精子 DNA 碎片的 TUNEL 玻片试验	71
图 3.2	流式细胞术分析碘化丙啶 (PI) 和绿色荧光	73
图 3.3	有光晕精子 (完整 DNA, 箭头➡) 和无光晕精子 (碎片 DNA, 楔形▲)	79
图 3.4	异常男性 DNA 广泛断裂精子和正常男性未见 DNA 损伤精子的彗星试验 (溴化乙锭染色)	82
图 3.5	显微镜下观察的彗星, 后续用 CASP 软件评估 (尾部 DNA=88%)	82
图 3.6	人精液中过氧化物酶阳性细胞	88

图 3.7	精液中的白细胞	92
图 3.8	两种精液分段收集装置	109
图 3.9	正常四部分分段精液的结果图示法举例, 展示精液体积、精子计数、 前向运动精子、锌和果糖的分布	110
图 4.1	FITC-PNA 染色的顶体完整和已发生顶体反应的活精子和死精子	116
图 4.2	光学显微镜下苯胺蓝阳性 (a) 和苯胺蓝阴性 (b) 精子 (1 000 倍油镜)	119
图 4.3	CMA3 阳性 (a) 和 CMA3 阴性 (b) 精子 (左图)	121
图 4.4	CASA 系统测量变量的标准术语	125
图 4.5	不同 CASA 应用程序的图像示例	127
图 7.1	根据表 7.12 数据绘制的 $\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	154
图 7.2	精子浓度的 S 图	154
图 7.3	前向运动精子百分率的人工分析和 CASA 结果的 Bland-Altman 图	157
图 7.4	精子浓度检测值 Youden 图	158
图 8.1	根据转子半径和旋转速度计算 RCF 的列线图	172
图 8.2	显微镜的部件	175
图 8.3	辅助评估精子活力	188
图 8.4	通过带有网线 (栅格) 的目镜观察	189
图 8.5	监视器上显示的载物台测微尺录像和覆盖在监视器上的绘制栅格	189



第 1 章 绪论

1.1 手册的适用范围.....	1
1.2 引言.....	1
1.3 关于第 6 版.....	2
1.4 编写手册的方法学.....	3

1.1 手册的适用范围

本手册的总体目标是描述精液分析的实验室方法,以促进全世界改善男性生殖功能的评估和男性因素导致生育力低下的治疗。

本手册提供的方法可以用作男科学实验室和任何进行精液检查实验室的标准化操作程序,适用于包括男科学实验室在内的任何进行精液检查实验室。实验室采纳并实际应用本手册第 2 章所描述的基本方法,可以提高实验室精液分析的质量以及不同实验室之间结果的可比性。后续各章节中描述了扩展性检查精液方法 and 研究性试验,适用于需要更多关于精子与男性生殖器官功能信息的技术人员、科学家和临床医生。这类信息可能有助于男性因素所致生育力低下的研究,以及有助于在使用男性避孕方法期间和在男性生殖健康流行病学研究期间对精子参数的监测。

1.2 引言

《WHO 人类精液和精子 - 宫颈黏液相互作用实验室检验手册》于 1980 年首次出版,以满足对人类精液检测程序标准化的日益增加需求。该手册修订了 4 次^[1-5],被广泛阅读并翻译成多种语言文字。在过去的 40 年,该手册成了公认标准,被世界各地的临床和研究实验室广泛应用。这部手册不仅是精液分析初学者的操作指南,而且是所有从事精液处理的人员,以及需要为临床应用与研究或流行病学分析和定义精子参数人员的参考书。

检查精液的重要原因:

- 评估男性生殖功能和生殖道通畅性,以便对生育力低下男性进行适宜的治疗并监测治疗反应;
- 评估不育夫妇的生育潜力,以选择合适的治疗方案;
- 评估男性避孕方法(例如,阻塞性输精管节育术,男性激素避孕和其他潜在方法)的有效性。

对男性的临床评估结合精液分析结果,可以指导临床医生决定如何对生育力低下夫妇

作进一步检查和处理。在第 5 版手册,依据配偶妊娠等待时间在 12 个月或不足 12 个月的男性精液参数特征数据,提供了常用精子检测参数的参考值范围。这些参考值是按临床化学参考值范围计算标准的定义来确定的,因此,这些参考值不能准确划分有生育力和生育力低下男性^[6]。尽管精液和精子的参数并非来自能代表大多数人群的男性的地理区域,但这些参数已在全世界范围内使用。此外,很多已知和未知的女性因素妨碍了仅使用精液参数来预测自然或辅助受精夫妇预后的价值。多个参数的联合使用能使精液检查结果获得更好的预后判断价值^[7-9]。目前的精液检查方法可以提供很多答案,但尚有很多问题需要其他测试来补充解答^[10]。对于个体患者而言,精液分析不可能预测生育力,因为有生育力还是生育力低下是由夫妇双方的生育潜能决定的。

尽管前几版手册取得了成功,但现在看来,先前版本显然没有为实验室技术人员或科学家提供在实验室进行精液检查逐步操作的最佳程序。另外,在过去的十年中,很多用于临床和研究用途的精子检测新方法已经得到验证,也应在手册中进行讨论。出于上述考虑,WHO 在 WHO 秘书处的支持下成立了一个编委会,对手册中描述的所有方法进行审查,以便对这些方法进行认可、修改或更新。当使用手册中描述的方法未获得足够数据或未在多个实验室得到验证时,编委会在评估相关文献后达成了共识意见。此外,对源于假定有生育力男性精液和精子参数结果的分布进行了更新审查,以尽可能纳入所有人群的数据。

由于对精液样本送到实验室进行分析的顺序缺乏明确说明,导致一些实验室使用其他资料描述的方法学。另有一些实验室则开发了自己的版本,仍声称是按照 WHO 手册进行的精液分析^[11]。为了使全世界的精液分析更为容易比较,第 6 版手册描述了多种评估的逐步操作流程和清单,以确保实验室技术人员和科学家易于应用。

1.3 关于第 6 版

第 6 版由三个部分组成:精液检查(第 2、3、4 章)、精子制备及冷冻保存(第 5、6 章),以及质量评估和质量控制(第 7 章)。精液检查程序分为三章:基本检查,这是测定精液参数的可靠常规方法,不仅是男科学实验室,任何开展精液检查的实验室都能遵循;扩展性检查,可以在某些情况下由实验室选择或根据临床医生的特殊要求而使用;前沿性检查,目前不作为生育力低下男性初步评估的常规方法。由于精液培养不在男科学实验室进行,因此仅在精液的无菌采集部分提及。精子制备部分,从射出精液扩展到包括从睾丸和附睾中获得的精子。值得注意的是,新版手册删除了人宫颈黏液试验,因为临床上已不再使用。此新版手册将背景信息和检测原理与操作描述分开,是为精液检查操作人员编写的易于遵循的程序手册。

第 6 版的主要特征概述如下:

- 在精液检查章节中包括了如何进行逐步操作、计算和解释等细节,因此所给出的每种方法学基本上是完整的,尽量减少了与手册其他部分的相互参照。
- **基本检查**
 - 评估精子数目:
 - 简化了精液样本稀释,但每次重复取样应计数 200 个精子。
 - 如第 5 版所建议,实验室对低精子浓度(2×10^6 /mL)精液样本进行精子数目评估是重要的,但报告较低的精子浓度,应注意与计数精子数目少所关联的误

差可能很高。为了改善评估极低精子数目的准确性和精确性,有必要采用该章所描述的补充方法。

- 每次射精的总精子数(精子产出)比精子浓度更有诊断价值,但前提是必须准确测量精液体积。
- 保留了评估无精子症的内容,还包括了离心程序和用于活精子的数种染料,这些作为输精管切除术后或者使用避孕药显著抑制精子生成后检测未经固定液处理样本中精子的方法。
- 评估精子活力:由于快速前向运动精子的存在与否在临床上是重要的^[12],因此,精子活力的分级又被分为快速前向运动、慢速前向运动、非前向运动和不活动(a、b、c或d级)。
- 评估精子形态学:描述了使用结构化顺序方法评估精子形态的程序,并应遵循该程序评估精子形态。在本手册,纳入了更多、质量更好的取自未处理精液样本中被认为正常、临界或异常形态精子的显微照片,并附有对每个精子为何被如此分类的解释。这将有助于培训技术人员一致性地界定精子形态学的细微特征。
- **扩展性检查** 本章作了广泛修订,不仅包括了白细胞、未成熟生殖细胞、抗精子抗体、多重精子缺陷指数和附性腺功能的生化指标检测程序,还包括了检测精子非整倍体、精子遗传学和精子DNA碎片指数的方法。
- **前沿性检查** 这一部分包括了被划分为非常专业化的检测,以及主要为研究用方法和其他新兴技术检测。本部分的内容进行了广泛修订。删除了过时的试验,例如人卵母细胞和人透明带结合试验以及仓鼠卵母细胞穿透试验。第5版有对这些试验的描述。本版中的研究性试验包括活性氧与氧化应激、膜离子通道、顶体反应以及精子染色质的评估。计算机辅助精子分析(computer-aided sperm analysis, CASA)部分作了重写,描述了CASA的原理及其作为研究技术的用途。此外,新兴方法基于精子运动和光的变化,可能成为无需显微镜来检测精子活力的基础。
- 更新了精子制备和精子冷冻保存的内容。
- **质量控制** 本章进行了修订,以使非统计专业人员更容易理解和应用。对精液检查进行严格的质量维护,是稳定分析方法所必需的。内部和外部质量控制程序都应实施。当质量控制结果不满意时,对如何改善实验室的工作情况给出了提示和建议。
- **决定限(Decision limits)比参考范围和参考限更准确** 来自假定可生育男性精液结果分布不足以建立临床上有用的决定限。本章对描述参考人群(配偶妊娠等待时间在12个月或不足12个月的男性)精液特征的数据进行了修订(8.1节)。纳入了以前未报告的和来自更多样化人群的数据,并且这些分析验证了第5版手册中界定的结果分布。人群数据的分布以单侧区间(参考人群数据的极值)表示,尽管这些百分位数并不代表有生育力和生育低下男性之间的明确界限。

1.4 编写手册的方法学

Mario Philip R. Festin 和 Igor Toskin

《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》现在已经是第6版了。第5版手册自

世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册，第 6 版

2010 年出版以来成为 WHO 最受欢迎的出版物之一，即使在最近几年下载量也在稳步增长（2018 年 95 975 次、2019 年 120 803 次、2020 年 132 765 次）。

这不仅是一本男科学实验室使用的标准手册，也在世界范围内被开展精液分析操作的其他实验室和医疗及研究机构广泛使用。截至 2021 年，该手册已被超过 3 000 篇同行评论论文和综述论文引用。该手册在国际大会、科学会议，以及 WHO 合作中心、专业学会和其他学术机构的培训项目中被分发传播。

本次修订过程如下：由 WHO 生殖健康与研究部（RHR）召集手册秘书处，基于第 5 版手册编辑团队的名单，并与本部门合作机构协商后，起草了手册编撰计划，并提出了拟定编辑委员会成员名单。

通过搜寻男科学大会演讲者，复审第 5 版手册的撰稿者，以及筛查全球有关男科学和精液分析的同行评议医学文献，拟定了第 6 版手册的可能撰稿者名单。最终选择的依据包括有精液分析研究和实践的追踪记录、同行评议出版物及国际认可的技术专长，并考虑临床实践和实验室经验之间的平衡。尝试平衡了男科医生、实验室专家、泌尿科医生、科学家、流行病学家等组成人员。

成立了一个由 8 人组成的核心编辑团队，并着手按需要组织更大的撰稿者团队。核心编辑团队的挑选是依据近年来与 RHR 的积极合作经历以及先前有精液手册的编写经验。核心编辑团队根据需要提名更大撰稿者团队的其余成员。对编委会成员和撰稿者不提供酬金或经费。

核心编辑名单确定后，WHO 邀请名单中的人员成为具有特定职责的编委会成员。这些人员提交了他们的简历、个人协议和可能的利益冲突声明，并存档。大多数通信最初是通过电话会议进行，后来在日内瓦或其他地方也召开了面对面会议。

8 人核心编辑团队拟定的任务是：

- 根据需要，建议撰稿者团队的其他成员
- 制定遴选一般撰稿者的标准
- 确定修订或更新的选题
- 设计本版手册内容范围的工作流程

《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第 6 版编委会成员包括：

- Oleg Apolikhin-<https://ecuro.ru/en/node/3485>
- Elisabetta Baldi-<https://www.unifi.it/p-doc2-0-0-A-3f2a3d2a393028.html>
- Christopher Barratt-<https://www.dundee.ac.uk/people/christopher-barratt>
- Lars Björndahl-<https://ki.se/en/people/larsbjor>
- Jackson Kirkman-Brown-<https://www.birmingham.ac.uk/staff/profiles/metabolism-systems/kirkman-brown-jackson.aspx>
- Dolores Lamb-<https://urology.weillcornell.org/dolores-lamb>
- Michael Mbizvo-<https://www.popcouncil.org/research/expert/michael-mbizvo>
- Stefan Schlatt-<https://www.medizin.uni-muenster.de/cera/ceraforschung/experimentelle-und-translazionale-forschung-zum-hoden/arbeitsgruppe/univ-prof-dr-rer-nat-stefan-schlatt-1.html>
- Christina Wang-<https://lundquist.org/christina-chung-lun-wang-md>

在 WHO，本手册的秘书为 Igor Toskin 和 Mario Festin。

为支持编辑团队的高级成员,额外增加了其他成员并被视为撰稿者:

- Petr Houska
- Stephan Kranyaks
- Karel Blondeel

职责范围包括:

- 审查实验操作步骤的说明并归类,以提高技术人员的理解;
- 为插图和照片撰写更清晰的说明;
- 将第5版手册中方框内的文字,恰当地纳入正文,以优化使用方框内的文字;
- 验证并更新第5版手册中的参考标准值。

WHO RHR 秘书处咨询了 WHO 指南审查委员会 (GRC),该委员会决定该出版物是否需要遵循有关指南的编制、审查和批准程序。根据审查,GRC 注意到手册的先前版本已经提到了如何采集和制备精液样本,如何分析样本和解释,包括精子数目、形态、活力和其他特征的参考值,但没有关于是否、何时以及如何治疗异常情况的建议。

如 GRC 提到的,该手册仅设计为实验室检测和检查所要遵循的标准化程序,故未提出临床或医疗建议,这些内容不在手册范围之内。要提醒的是本手册中的结论和信息来源于目前的最佳证据和引用的文献。该手册还必须符合 WHO 的文献开发和出版标准,包括利益冲突声明、外部委员会的管理、WHO 风格、批准程序等。必须与相关的 WHO 不育、避孕管理的现行指南关联。手册应保持其描述操作步骤以及如何为参考值制定地方标准的目标。WHO 从 GRC 得到确认,手册现在的形式不算是指南,将不需要其许可或批准。

此外,WHO 还与实验室标准部 (Laboratory Standards Department) 进行了适当交流,以获得对手册中的内容和操作步骤,尤其是制定标准方面的指导。

WHO 生殖健康和研究部的文献委员会获得了本手册的规划许可,一旦手册完成编写,行政许可准予出版。在本手册编写过程,由评审和讨论产生的其他出版物将由编辑委员会决定并同意。

核心编辑团队确定了关于精液参数影响因素的可能选题。作为本手册准备工作的一部分,对有关特定研究问题的文献进行了回顾。如果讨论到某些问题或选题,则会根据共识或公开投票作出决定。为了推进数据共享、审查和更新的过程,建立了一个电子化平台。编辑团队也对将在第6版手册中纳入、修改或移除的其他选题进行过考虑。就格式、纳入选题、排除选题和时间表作了数项决定。2017—2020 年,举行了一系列电话会议、个人和群组电子邮件交流,以及两次现场会议。

对某些确定选题作了文献回顾。文献回顾支持了编委会处理可能存在某些不确定性的选题,这类选题涉及新近发展的技术或缺缺证据、经验。这些是讨论作出某些重要决定的基础。一些进行了文献回顾的选题包括:

- 评估精子质量更新的方法;
- 影响精子质量的因素:环境因素、药物使用、年龄相关因素、健康相关因素等(作为本手册的一部分或作为单独的综述文章发表)。

制定了每一章和整本手册的时间表,包括:

- 各章的内容大纲
- 初稿提交

- 核心编辑小组审查
- 第二稿提交
- 核心编辑小组审核
- 总编批准
- 主要编辑审查所有章节的一致性
- WHO 内部审查
- 其他男科学或精液分析技术专家的外部审查
- 公众审查(编写 WHO 文献的标准程序之一)
- 在整理和综合所有评论和意见后定稿

来自 WHO 所有 6 个区域的 43 个国家的专家参加了公开审查。

本手册附录描述了在 12 个月内使其配偶妊娠的男性精液检查结果的数值分布(8.1 节)。同时,为了更详细地介绍重新检查和更新参考值分布的工作结果,1 个单独作者组(其中包括一些编委会成员)撰写了 1 篇独立论文,文内说明了附录 8 中展示的重要成果(见下列参考文献)。其他在手册范围之外的选题也将单独发表,包括对新兴技术发展现状的分析结果。

介绍参考值分布的文献:

Campbell MJ, Lotti F, Baldi E, Schlatt S, Festin MPR, Björndahl L, Toskin I, Barratt CLR. Distribution of semen examination results 2020 - A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. *Andrology*. 2021 May;9(3):817-822. doi:10.1111/andr.12983. Epub 2021 Mar 17



第 2 章 基本检查

2.1 引言	7
2.2 基本精液检查的时间概要	9
2.3 检查前的步骤	10
2.4 检查中与检查后的步骤	11
2.5 补充资料与评注	51

基本检查是所有研究人类精液的实验室都应进行的检查。此处描述的技术旨在提供最可靠和最实用的最佳实施组合。尽管可能存在能够得到类似结果的替代技术,但是,使用可比较的方法来实现临床和科研的标准化是必要的。这些方法为男性生殖健康科学的正确发展提供了基础。

“如果要从精液检查结果中获得可靠的信息,必须使用恰当的标准化程序对精液采集和检查的所有方面进行评估。”

2.1 引言

不同于大多数为诊断或治疗随访而检查的人体分泌物,射出精液是一种在排出前不存在于体内的不均匀混合分泌物。精液是由储存在双侧附睾内的浓缩精子悬液,首先在尿道中与前列腺液混合并稀释,随后与精囊液混合而形成^[13]。因此,连续射精的不同部分的组成成分不同。通过比较实施输精管结扎术前、后的精液体积,显示出精液体积中约 90% 由附性腺的分泌液组成^[14],这些附性腺分泌物主要来源于前列腺和精囊腺,少量来源于尿道球腺(Cowper 氏腺体)和附睾。

精液具有两个主要的可量化属性。

- **精子数目**反映睾丸的精子生成量和睾丸后管道系统的通畅性,也反映了附睾和输精管平滑肌收缩将精子主动转运到尿道,以及勃起和射出富含精子的射出精液的效能。射出精液受性兴奋持续时间和质量的影响,并通过神经信号作用在平滑肌细胞(输精管、腺体、膀胱括约肌),以及影响平滑肌细胞控制血液从阴茎勃起组织、横纹球海绵体肌和会阴肌的流入和流出。
 - **各附性腺分泌的液体体积**,反映了附性腺的分泌活性,以及随后平滑肌收缩排空附性腺的状况。这些活动是对性兴奋引起的自主神经刺激的应答,并为射精作准备。
- 精子的基本特征(存活、活力和形态)和精液的液体成分对于精子功能也是重要的。然而,

精子在体内与体外的精液中的这些特征是显著不同的。

作为性交的结果,精液的初始部分是富含精子的前列腺液,可能与延伸至阴道内的宫颈黏液相接触^[15],而这初始部分没有与精液的其他部分有明显接触。与之相反,在实验室场所中,整份精液采集在一个容器里,精子在容器里被束缚在精囊腺所分泌蛋白质形成的胶冻中。在体外,胶冻随后在前列腺蛋白酶的作用下液化,液化期间精液的渗透压升高^[13,16-18]。

有证据表明,精液的总体积和精子数量因取精环境不同而有所变化。在实验室附近房间内、通过手淫取精射入容器的精液体积和精子数量,可能低于在家性交时使用不含杀精剂的避孕套取精^[19]。这种差异可以反映性兴奋程度和持续时间的不同,因为手淫取精所花费的时间也会影响射精量和内容物^[20]。

在特定采集条件下,精液特征参数取决于通常无法改变的因素,诸如睾丸生成精子量、附性腺分泌量和近期患病情况(尤其是发热),以及其他因素,例如禁欲时间,应该记录并在分析结果时予以考虑。

精液特征参数的实验室测定结果取决于如下因素:

- 精液采集是否完整。射精时,射出的初始部分精液主要是富含精子的前列腺液,而后部分的精液则主要是精囊腺液^[13]。因此,取精时丢失富含精子的初始部分,对精液检测结果的影响远大于丢失后部分精液的影响。
- 附性腺的功能。射精时,附性腺的分泌液稀释了浓缩的附睾精子^[21]。由于精子浓度受到其他器官分泌功能的影响,因此,衡量睾丸精子生成量的直接指标不是精子浓度,射出精液中的精子总数(精子浓度×精液体积)才能更好地反映睾丸的精子生成能力^[22]。例如,年轻人和老年人精液的精子浓度可能相同,但精子总数会不同,因为随着年龄增加,精浆体积和总精子生成量减少,至少在一些人群是这种情况^[23]。
- 检查精液时的射精与之前最近一次射精之间的间隔时间(射精禁欲期,即“禁欲时间”,有时笼统地称为性节制)。精子在附睾内蓄积直至充满附睾,然后溢入尿道,随尿液流出^[24,25]。由于附睾一次射精不会完全排空精子^[24],有些精子是以前射精时存留的。这种情况影响了精液中精子老化程度和精子质量^[26]。精子存活率和染色质不受禁欲时间延长的影响^[27,28],除非附睾功能发生障碍^[29]。此外,测定每日精子生成量的广泛研究表明,每天排精,连续2~3d会大量减少附睾内精子的储备^[30,31]。因此,根据临床经验,建议男性在禁欲2~7d后采集精液进行检查,这可能有助于区分正常生育力和生育力低下结果之间的变异性和模糊界限。这种影响的程度难以确定,并且很少予以考虑。

影响精液的主要患者因素包括:

- 睾丸大小,影响每日生成精子的总数,从而间接影响每次射精的精子输出量^[2,32-34]。睾丸体积反映了生精功能的水平,也与精子形态有关^[35]。
- 内分泌状态^[36]。
- 正在服用药物的患者。例如,精子从附睾转运到尿道取决于输精管平滑肌细胞中 α -1受体的激活。使用 α 受体阻滞剂(抗高血压药物和前列腺肥大的对症治疗)或选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)抗抑郁药(例如:舍曲林、氟西汀、阿米替林)治疗可抑制输精管活动^[37]和附性腺排空。

- 补充剂或非处方药物,例如:合成代谢类固醇。

这些易变且很大程度上不可控的因素,导致了众所周知的个体间精液成分的变异^[38,39]。

有证据表明,单次精液检查结果足以确定该男性的不育检查后续步骤^[9]。另一方面,为确定一位男性精液的准确基线,可能需要检查2次或3次精液^[40-44]。

尽管对所有射出精子的测量不能确定少数到达受精部位精子的受精能力,精液分析仍可提供1位男性生殖器官功能状态的基本信息。如果要获得可靠结果——即有效且有用的信息,就必须使用恰当的标准化程序对精液采集和检查的所有方面进行评估。本章所描述的方法是可接受的程序步骤,其构成了精液评估的基本步骤。

2.2 基本精液检查的时间概要

精液基本检查包括如下步骤(在后续章节中有详细说明)^[45,46]。

2.2.1 准备工作——检查前的步骤

检查前的步骤包括:

- 患者信息。
- 样本采集。
- 样本接收。
- 样本初始处理。

2.2.1.1 在开始的5min——样本初始处理

出于实际原因,在样本开始检查前的时段内,适宜通过称重确定精液样本体积。

- 样本接收后,最好在液化前通过称重法测量精液的体积。
- 留出液化时间(通常不超过30min)。

2.2.2 检查步骤

精液检查程序分为两种,一种是在没有引入实验室诱发异常风险的情况下,不能延迟的评估;另一种是在没有实验室异常风险的情况下,可以延迟进行的评估。这样划分程序使得实验室能够在不降低检查质量的情况下,组织起有效的工作流程。

2.2.2.1 精液采集后30~60min

- 评估精液液化情况和精液大体外观。
- 制备湿片,用于观察镜下外观、评估精子活力和确定评估精子浓度所需的稀释倍数。
- 测定精液pH(如果需要)。
- 评估存活率(如果活动精子百分率低)。
- 稀释精液以评估精子浓度。
- 制备用于评估精子形态的精液涂片,并固定涂片。
- 进行混合抗球蛋白反应(mixed antiglobulin reaction, MAR)试验以检测抗精子抗体(如果需要)。

- 评估是否存在白细胞(如果需要)。
- 离心一定体积的精液(如果需要检测生化标记物)。

2.2.2.2 精液采集后 3h 内

- 测定精子浓度(可稍后进行,最好在当天进行)。
- 将样本送至微生物实验室(如果需要)。

2.2.2.3 当天晚些时间或第 2 天

- 染色和检测精液涂片,以评估精子形态。
- 附性腺标记物的生化分析(可选)。

2.2.3 检查后步骤

- 计算结果。
- 提交结果。
- 批准发报告。

2.3 检查前的步骤

本节描述了实际分析前的所有必要步骤。

2.3.1 患者信息

- 应该给予受检者关于采集精液样本的清晰书面和口头指导。临床医生应该给予患者相同的指导。
 - 主要建议通过手淫采集精液。
 - 不建议使用性交中断法采集样本。由于存在精液采集不完整和阴道液及阴道细胞污染样本的风险,仅在特殊情况下使用中断性交法采集样本。
 - 在特殊情况下,可以使用特制用于生育调查的阴茎套采集样本作为替代方法,但是整份精液不能有效用于检查,并且样本可能会因为接触到阴茎的皮肤而受到污染。在一定程度上,阴茎套外面的阴道液和细胞也可能污染样本。由于阴茎套含有杀精剂,不能使用阴茎套采集样本。普通乳胶阴茎套含有干扰精子活力的物质,这类阴茎套不得用于采集精液^[47]。
 - 由于润滑剂可能会污染精液及改变精液性状,应避免使用润滑剂。如果一定要用,必须使用经过验证对精子无毒性的润滑剂。
 - 精液样本采集须完整,且受检者应报告精液样本任何部分的丢失情况。
 - 应禁欲至少 2d 和最多 7d 的时间内,采集精液样本。
 - 避免精液暴露在温度波动的环境中,并且要控制从样本采集到分析之间的时间,建议在靠近实验室的私密房间内采集样本。精液检查最好在样本采集后 30min 内开始,最晚应在 60min 内开始。
 - 可能会出现例外情况,应给予每位受检者各种可能性和风险的合适建议。

- 如果未在实验室附近采集样本,运送时不得使样本温度低于 20℃ 或高于 37℃。
- 如果患者出于任何原因必须在其他地方采集精液,在运送过程中,样本容器应放置在衣服之内并紧贴身体,例如:运送期间放置在腋下,精液样本最好在采集后 30min 内送达实验室,最多不能超过 50min。

2.3.2 采集样本

- 为避免温度大幅度变化影响精子,采集精液前,样本容器应保持在 20~37℃ 的环境温度。
- 样本容器应为洁净、塑料制成的广口容器,并已确认该批次容器对精子无毒(2.5.10 节)。
- 样本容器和手工填写的工作表格必须贴上标识,该标识须用于样本接收和进一步处理程序,以避免样本和工作表格的杂乱产生风险。对样本容器标识的规定要求可以不同。样本容器上的标识可以是受检男性的姓名、身份证号码,以及采集日期和时间,或者是唯一的样本识别号。
- 接收样本时应记录以下信息,并呈现在最终报告(8.5 节):
 - 该受检男性的身份(例如:姓名、出生日期和个人代码),并最好由他确认样本是他自己的;
 - 取精前的禁欲期;
 - 采集样本的日期和时间;
 - 样本的完整性,以及获取样本遇到的任何困难(如果不是在实验室采集样本);
 - 精液体积。
- 适用于某些特定情况的特殊条件:
 - 用于辅助生殖或冷冻保存的样本需要无菌采集(2.5.11 节);
 - 用于微生物分析的样本需要无菌采集(2.5.12 节)。

2.3.3 样本初步处理

- 采集的精液应在没有不必要的延迟的情况下液化,最好在 37℃ 培养箱中液化。如果可能,将样本放在轨道式混匀平台上液化,以促进样本的液化和混匀。
- 开始评估精液外观时,应记录从采集精液到开始检查之间的时间,并将这个时间写在最终报告。最好在采集精液后 30min 内开始评估,最迟不超过采集后 60min。
 - 已液化精液在体外长时间暴露会影响精子质量,例如:影响精子活力和形态。
- 精液可能含有危险的传染性病原体[例如:人类免疫缺陷病毒(HIV)、肝炎病毒或单纯疱疹病毒],故精液应作为生物危害品处理。应严格遵守 8.2 节中描述的安全指南;良好的实验室操作习惯是实验室安全的基础^[48]。

2.4 检查中与检查后的步骤

2.4.1 精液体积的评估

精液体积提供了附性腺分泌功能的相关信息,因此,精确测量精液体积是任何精液评估的基础。精确可靠地测量精液体积,对于计算精子总数、精液中非精子细胞总数和生化标志物总量也是必要的。

2.4.1.1 称重法测量体积

精液体积最好通过称重收集到样本容器中的精液来测量。最好在孵育液化前、接收精液样本容器时进行测量,其他方法会产生较大误差^[51]。

1. 用一个预先称重的容器采集精液,在容器表面和盖子上注明重量。
 - 每个空样本容器的重量可能不同,因此,每个带盖容器需预先单独称重。将样本容器交给患者前,应使用永久性标记笔,将容器重量写在容器表面和盖子上。如果使用标签,例如身份标签,则该标签的重量也应包含在空样本容器的重量中。无菌容器不应该也不需要为称重打开。
2. 称量盛有精液样本的容器。
3. 减去空容器的重量。
4. 根据精液的重量计算出精液体积,假设精液密度为 1g/mL (Auger 等,1995)[据报道,精液密度的变化为 1.03~1.04g/mL^[49]、1.00~1.01g/mL^[50],平均值为 1.01g/mL^[51]]。

2.4.2 外观评估

外观评估包括一些难以精确测量数值的重要观察内容。因此,尽管受制于使用传统的定量方法,这些观察仍有重要的临床意义。

2.4.2.1 精液外观

正常液化精液呈现均质性、淡黄色或灰白色的外观。如果精子浓度非常低,精液可略显透明;精液颜色也可以不同,例如:较长禁欲时间后的精液呈淡黄色,精液中有红细胞时(血精)呈棕红色,当黄疸病人或服用维生素或药物时的精液呈亮黄色。如果精液呈现黏稠、完全透明和无色,可能仅是射精前尿道球腺的分泌液。不同男性在性兴奋期,尿道球腺的分泌量存在差异,在这种情况下,应与患者进行交流,以确定是否发生了性高潮时的射精。

2.4.2.2 液化

精液射到收集容器后很快呈现典型的半固体凝胶或凝胶状的团块。通常在室温下,精液几分钟内就开始液化(变得稀薄),此时精液中可见半固态团块的不均匀混合物。随着继续液化,精液变得更加均质和相当水样化,但仍然比水有更高黏稠度。在液化最后阶段仅存留少量凝集块。

37℃的温度有助于液化。缓慢旋转晃动样本容器也有助于液化完成。如果液化期间未使用摇床(振荡混匀器),则在开始评估液化前,需缓慢晃动容器 15~30s。

在室温下,通常在 15~30min 内精液完全液化。

- 如果液化未在 30min 内完成,应作记录,并在最终报告中注明。可将精液在 37℃ 的温度下继续放置 30min。
- 如果液化在 60min 后仍未完成,也应记录在最终报告中。
- 正常液化的精液可能含有一些不液化的胶冻状颗粒(凝胶状团块),这不表明任何临床意义。然而,黏液丝的存在可能会干扰精液分析,故需在最终报告中注明。

本章最后一部分给出了“液化问题”的进一步说明。

2.4.2.3 精液黏稠度

液化后,精液黏稠度可通过将精液轻轻吸入一个大口径(直径约 1.5mm)的一次性塑料吸管(经验证对精子无毒,如有必要,使用无菌吸管)来评估。使精液借助重力滴下,观察任何黏液丝的长度。

液化正常的精液以不连续的小滴落下。如果黏稠度异常,液滴会形成超过 2cm 的黏丝。

2.4.2.4 精液气味

不同个体识别出人类精液正常气味的能力存在很大差异^[45]。精液中含有强烈尿味或腐败味可能具有重要临床意义。因此,必须在报告中予以注明。

2.4.2.5 精液 pH

精液的 pH 取决于酸性前列腺液和碱性精囊腺液的相对贡献。不能对精液的 pH 进行有效的控制。在体外,精液中的二氧化碳会不断逸出,导致精液 pH 逐渐升高,使得精液 pH 欠缺临床意义。pH 的测定应在统一时间内进行,最好在精液采集后 30min 进行,但无论如何要在射精后 1h 内测量。

对于正常精液样本,应使用测量范围为 6.0~10.0 的 pH 试纸。

1. 充分混匀精液样本。
2. 将 1 滴精液均匀地涂在 pH 试纸上。
3. 等待浸渍区域的颜色变得均匀(<30s)。
4. 与标准条带进行颜色对比,读出 pH。

pH 低于 7.2 可能提示缺乏碱性精囊液,也可能尿液污染所致。

2.4.3 显微镜观察的准备工作

为了获得可靠的显微镜观察结果,检查的小份精液样本必须代表整份精液。已液化的精液仍比水黏稠得多,这使得吸取具有代表性的精液样本进行分析变得非常困难。如果样本没有充分混匀,对 2 份单独取样的分析难以代表整份精液样本,并且精子浓度、活力、存活率和形态学都会显示明显差异。即使已液化精液呈现均质的外观,小份取样的成分也会有很大差异。

2.4.3.1 精液混匀

在取样进行任何评估之前,要在原容器中充分混匀精液样本,但不要操作剧烈,以免产生气泡。在 37℃ 培养箱中的液化过程,可将样本容器放置在振荡混匀器上混匀。也可人工晃动容器约 15~30s 使样本基本混匀(2.4.2.2 节)。

2.4.3.2 代表性取样

虽然已液化精液大体上呈现均质,但在一些小区域内,其精子和分泌物组成会有很大差异。因此必须做以下工作:

- 评估精子浓度时,至少重复取 50 μL 的样本进行稀释。
- 评估精子活力时,至少重复取 10 μL 的样本。

为了减少非代表性取样造成误差的风险,如此重复取样比较是必要的。本手册在每种评估技术内都描述了用作比较的方法。

2.4.3.3 制备湿片

精液彻底混匀后(2.4.3.1 节),直接吸取恰当的精液体积,使精子没有从悬液中沉降的时间。在取出重复精液样本前,再次充分混匀精液。必须对 2 个不同的新鲜制备湿片进行重复精子活力评估(2.5.6 节,湿片制备方法的背景介绍)。

1. 将 10 μL 充分混匀的精液置于洁净的显微镜载玻片上,该载玻片最好预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ (例如,载玻片放在样本培养箱中)。

- 注意避免在盖玻片和载玻片之间形成气泡。

2. 将 22mm $\times$ 22mm 的盖玻片小心地水平放置在样本液滴上面。盖玻片的重量使样本分散开(因此使用 #1½ 的重量盖玻片)。

3. 一旦湿片内的精液不再漂移,立即评估此新鲜制备的湿片。

- 如果在放置盖玻片后 1min 内,精液仍未停止流动,制备 1 张新的湿片。

2.4.4 显微镜下评估

须使用配置了相差光学系统的显微镜,进行新鲜精液未染色制片的所有检查(8.3 节介绍了如何设置显微镜)。

2.4.4.1 低倍镜下观察

精液样本的显微镜初步检查是在总放大倍数为 100 倍(例如,10 倍物镜和 10 倍目镜)下观察样本制片的情况。

显微镜初检可以对样本作一般性观察,能够显示制片中的精子是否分布均匀,是否有可见的黏液丝,以及是否有精子聚集或凝集。如果精子分布不均匀,原因可能是:

- 混匀不充分;
- 黏稠度高;
- 液化不充分;
- 精子聚集成团。

2.4.4.2 高倍镜下观察

精液样本制片应在 200 倍或 400 倍的总放大倍数下观察(20 倍或 40 倍物镜配上 10 倍目镜)。这样可以用于:

- 评估精子活力;
- 确定用于精确评估精子数目所需的精液稀释倍数(2.4.4.3 节);
- 确定所需进一步评估的圆细胞;
- 确定除精子外的细胞(如上皮细胞)或“圆细胞”(白细胞和未成熟生精细胞)。

2.4.4.3 估算精子计数的适当稀释倍数

精确测定精子浓度所需的精液稀释倍数,是根据整个高倍视野下观察到的精子数目估算的。应至少吸取 50 μL 充分混匀的精液,稀释后的精子悬液总体积应至少为 200 μL (2.5.9 节描述了视野区域的计算)。

如果湿片未观察到精子,则检查重复制备的湿片。如果在第 2 张湿片仍没有观察到精子,则按照 2.4.8.8 节进行操作。表 2.1 显示使用足量精液体积,以获得进行适当稀释的精子悬液的最终体积。

表 2.1 对足量精液体积进行适当稀释的精子悬液最终体积

每 400 倍视野的精子数目	每 200 倍视野的精子数目	稀释倍数	精液体积 / μL	固定液体积 / μL
>200	>800	1 : 50 (1+49)	50	2 450
40~200	160~800	1 : 20 (1+19)	50	950
16~40	64~160	1 : 10 (1+9)	50	450
2~15	8~64	1 : 5 (1+4)	50	200
<2	<8	1 : 2 (1+1)	100	100

2.4.4.4 制备稀释精液样本的固定液

例如,制备 1L 含有 0.595mol/L 碳酸氢钠和约 0.14mol/L 福尔马林(甲醛水溶液称为福尔马林)。福尔马林的最终浓度是病理学和细胞学实验室所使用浓度的 1/10。与这些实验室使用福尔马林情况相比,计数池中福尔马林的蒸发量极低。处置福尔马林必须遵守当地法规,但只有在制备低浓度储备溶液,才可能强制要求在通风柜中进行处理。

1. 将 50g 碳酸氢钠(NaHCO_3)溶解在约 500mL 蒸馏水中,添加 10mL 36%~40% 甲醛溶液,并加蒸馏水至 1 000mL。

2. 如果需要,可添加 0.25g 台盼蓝(颜色指数 23859)或 5mL 饱和(>4mg/mL)龙胆紫溶液(颜色指数 42555),以增强精子头的亮度,便于正确加样进计数池。

3. 稀释固定液在 2~8℃可储存达 12 个月。如果溶液中有晶体析出,使用前用 0.45 μm 过滤器过滤。

2.4.4.5 稀释用于精子计数的样本

制动精子需用固定液稀释样本。计数不活动精子比活动精子更容易计数精确。稀释可使样本更像水溶液、并更可靠地把样本加至血细胞计数板,故稀释也是重要的步骤。应取至少 50 μL 精液与稀释固定液混合,以确保可靠的代表性、并有足够的悬液体积以充分混匀样本(固定后可能需要涡旋混匀)。在显微镜初始检查时,估计所用的稀释倍数。

1. 使用空气置换式移液器,将适量稀释固定液加至 2 个稀释小管。
2. 混匀精液样本,不要产生气泡。

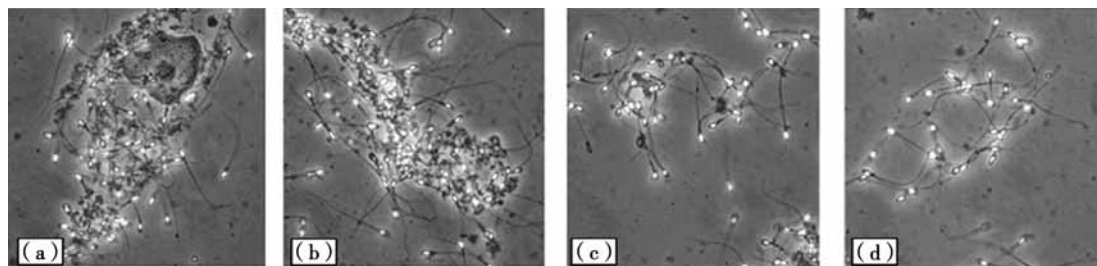
3. 使用正向置换式移液器, 吸取准确体积的精液进行稀释。
4. 擦拭移液器吸头外侧的精液, 注意不要触碰到吸头的开口, 同时确定吸头内没有气泡。
5. 将精液加至稀释固定液, 通过抽吸, 用固定液冲洗移液器吸头。完全压下移液器活塞, 移除移液器吸头内, 并立即旋涡混匀, 以减少形成可见沉淀物的风险, 这些沉淀物会使评估产生误差。
6. 再次充分混匀精液, 并按照以上步骤制备第2个重复稀释样本。

2.4.4.6 评估精子聚丛

必须对2类聚丛精子分别评估。

精子聚集

不活动精子之间、活动精子与黏液丝、非精子细胞或细胞碎片之间黏附在一起, 为非特异性聚集(图2.1)。



Micrographs courtesy of C. Brazil.

图2.1 精液中非特异性精子聚集

精子与上皮细胞(a)、碎片(b)或精子(c、d)聚集。

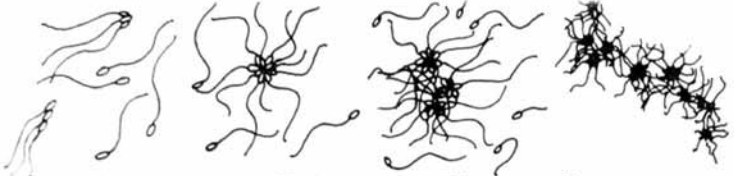
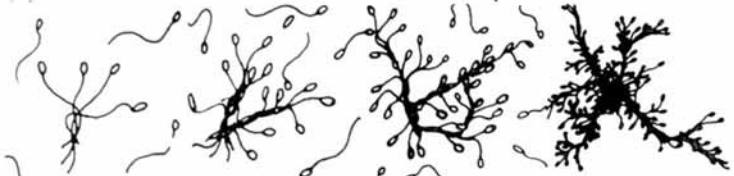
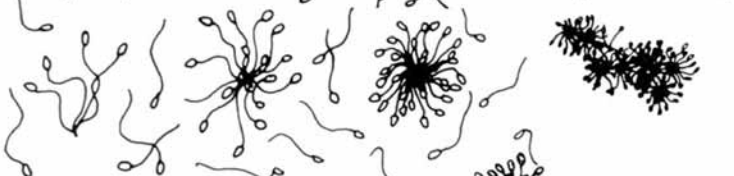
精子凝集

精子凝集特指活动精子以头对头、尾对尾或混合型相互黏附的现象。凝集精子经常呈现活跃的快速摆动, 但是有时精子凝集太严重, 以致其活动受制约。应该记录任何的活动精子通过头、尾、中段黏附在一起的情况。活动精子黏附细胞或碎片, 或不活动精子相互黏附(聚集)不应该记录为凝集。

应当记录主要的凝集类型(反映凝集的程度和黏附部位)^[52](图2.2)。

2.4.5 非精子细胞成分

精液中含有非精子细胞, 其中一些细胞可能有临床意义。非精子细胞包括来源于泌尿生殖道的上皮细胞, 以及白细胞和未成熟生精细胞, 后两者统称为“圆细胞”^[53]。但是, 在1 000倍镜下检查已染色涂片是不能明确地分辨白细胞与未成熟生精细胞(见图2.16、图2.17和3.7节)^[54]。进一步鉴别活性炎症细胞的技术参见相关部分(3.5节)。这些检测的临床价值尚不明确, 故不存在循证限制^[55-57]。另见2.4.8节的描述。

凝集部位	凝集程度			
	1. 零散凝集(每个凝集<10个精子, 有很多自由活动精子)	2. 中等凝集(每个凝集10~50个精子, 有自由活动精子)	3. 大量凝集(每个凝集>50个精子, 仍有一些自由活动精子)	4. 重度凝集(所有的精子凝集, 并且数个凝集又黏附在一起)
A. 头对头				
B. 尾对尾。清晰看到精子头自由活动, 没有凝集				
C. 尾尖对尾尖				
D. 混合(清晰看到头对头和尾对尾凝集)				
E. 缠结(头和尾缠结在一起。由于精子以尾对尾凝集, 不能清晰看到精子头部的凝集)				

Reprinted from Rose et al. (1976) with permission.

图 2.2 不同程度精子凝集示意图

2.4.6 精子活力

精子前向运动的程度与妊娠率相关^[58-60]。精液中前向运动精子总数具有生物学意义。前向运动精子总数=精液中的精子总数×前向运动精子百分率。涉及 CASA 评估精子活力方法见 4.5.1 节的描述。

如果精液在 30min 内完成液化,应开始评估。如果精液在 30min 后没有完全液化,可将精液在 37℃培养箱中再放置 30min,然后再开始评估。精液液化延迟或不液化应在报告中予以注明。

活动精子的速度与温度有关。因此,评估精子活力时需对温度进行标准化控制。通常最容易将温度控制在与体温相近,但显微镜需配置温控载物台,载玻片和盖玻片需预热,精液样本在评估前也预热至 37℃。精液样本在 37℃培养箱中液化容易满足上述条件。由于室温尚

无定义的温度,在室温下评估精子活力会产生较多问题,使得评估精子活力有很大差异。

推荐使用带网格的目镜进行评估(图 2.3),这样容易限定评估区域。这样非常有助于评估每个视野中精子数目多的样本。

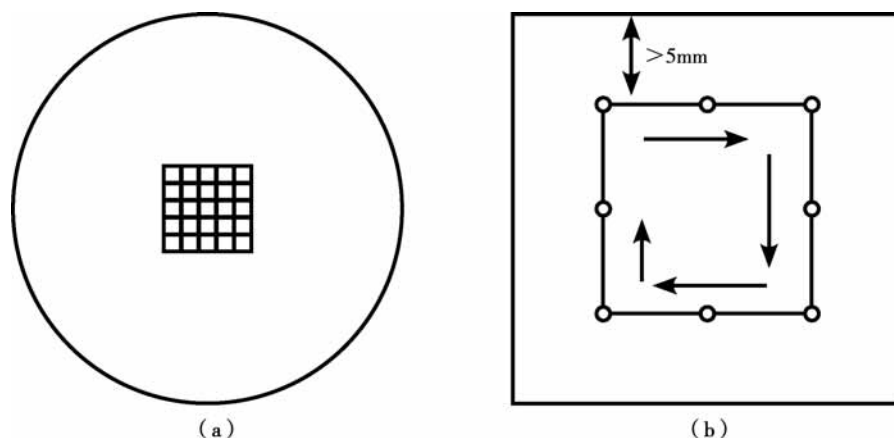


图 2.3 辅助评估精子活力的方法

(a) 目镜网格线可以更容易计数运动和不运动精子。(b) 按顺序选择评估精子活力的视野,视野距离盖玻片边缘至少 5mm。

- 通常开始时先不进行计数,浏览几个视野,以了解精子的分布情况。可在低放大倍数下观察精子的分布(总放大倍数为 100~200 倍)。
- 为防止干燥引起的人为假象影响评估精子活力,避免评估靠近盖玻片边缘(<5mm)区域的精子。
- 应随机选择视野;避免根据看到的精子数目来选择视野。
- 按顺序观察玻片,避免重复观察相同的区域。即使少于 5 个视野已计数超过 200 个精子,也需评估至少 5 个不同的视野。
- 立即开始评估随机观察的视野(不要等待精子游进视野或网格内才开始评估)。
- 评估视野中限定区域内所有精子的活力。根据视野内精子浓度,选择视野或网格的部分区域进行评估。例如,如果精子浓度高,则仅评估网格最上一行的精子;如果精子浓度低,则评估整个网格的精子。
- 按顺序评估精子,首先计数快速前向和慢速前向运动的精子,以避免高估前向运动精子的数目。这样计数的目的是尽快计数网格内的所有前向运动精子;在评估过程中,也要避免计数游进网格的精子。接下来再计数相同网格内的非前向和不活动精子。
- 每张重复湿片评估约 200 个精子。每张重复湿片是分别新鲜制备的。
 - 如果从一个区域计数完所有活力级别的精子之前,已经计到 200 个精子,则要继续计数超过 200 个精子,直到计数完所有活力级别的精子,以避免偏向最先评估的活力级别。
- 比较 2 个重复样本的数值,检查 2 个数值的一致性是否可以接受。如果可以接受,继续计算;如果不能接受,制备新样本再做检测。如果 3 组的重复试片都未能给出可接受的接近结果,则将所有 6 次评估结果的平均值作为结果,并在报告中注明是高度可变评估

结果的平均值(提示非一致性取样可能导致了异常的不确定结果)。

- 对评估精子活力的问题处理,见 7.10.3 节。

2.4.6.1 精子运动分类

推荐采用 4 级活力分类系统对精子活力进行分级。

源自人工评估精子活力和计算机辅助精子分析系统的临床数据表明,识别快速前向运动精子是重要的^[12,61-70]。因此,推荐对精子活力按以下分级(具有近似的速度界限):

- 快速前向运动($\geq 25\text{ }\mu\text{m/s}$):精子运动活跃,呈直线或沿一大圆周运动,在 1s 内从始点至终点的轨迹至少为 $25\text{ }\mu\text{m}$ (或为尾部长度的一半);
- 慢速前向运动($> 5\text{ }\mu\text{m/s}$, $< 25\text{ }\mu\text{m/s}$):精子运动活跃,呈直线或沿一大圆周运动,在 1s 内从始点至终点的轨迹为大于 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、但小于 $25\text{ }\mu\text{m}$ (或至少为一个头长、但小于尾部长度的一半);
- 非前向运动($< 5\text{ }\mu\text{m/s}$):缺乏前向性尾部运动的其他所有运动形式,如以小圆周泳动,尾部动力驱使头部从始点至终点的轨迹为小于 $5\text{ }\mu\text{m}$ (为一个头长);
- 不运动:尾部没有主动运动。

2.4.6.2 重复样本比较与结果计算

- 分别计算 2 个重复样本的 4 种活力级别的百分率(%),以及前向运动与活动精子的百分率。
- 计算 2 个重复样本优势活力级别的平均值(不运动或运动)。
- 计算 2 个重复样本优势活力级别的差异。
- 从表 2.2 确定差异的可接受性(2 个百分率之间的最大差值预期 95% 的样本由于随机原因发生,如果差值大于表 2.2 中的值,则小于 5% 的可能性是由于随机原因造成差异)。
- 如果 2 个百分率之间的差异可以接受,报告每个活力级别百分率的平均值:(a) 快速前向运动;(b) 慢速前向运动;(c) 非前向运动;(d) 不运动。如果差异太大,从精液样本中重新取 2 份新样本,制备 2 张新的湿片,重新评估精子活力。如果 2 个重复样本的差异远大于可接受差异,重复样本的评估不应再多于 2 组。将 6 次评估的平均值作为最终结果,并注明由于重复评估之间的高度可变性,该结果是不确定的。
- 以最接近的整数,报告每种活力级别的平均百分率。
- 4 个活力级别百分率的总和应为 100。如果为 99 或 101,则调整优势活力级别的值,使得总和为 100。如果总和 < 99 或 > 101 ,则必须消除计数或计算的错误。

表 2.2 从重复计数 200 个精子(总共计数 400 个精子),确定所给出平均值的 2 个百分率之间的可接受差异(基于 95% 置信区间)

平均值 / %	1	2~3	4~6	7~9	10~13	14~19	20~27	28~44	45~55	56~72	73~80	81~86	87~90	91~93	94~96	97~98	99
可接受差异	2	3	4	5	6	7	8	9	10	9	8	7	6	5	4	3	2

2.4.7 精子存活率

精子存活率通过检测精子膜的完整性来评价,可以常规检测所有精液样本的存活率,但对于活动精子大于 40% 的样本则不是必须做这项评估。精子活力低的样本,存活试验用以区分不活动死精子与不活动活精子是重要的。精液样本存在高比例的不活动活精子,可能提示精子鞭毛有结构缺陷^[71,72];高百分率的不活动死精子,则可能提示附睾病理^[73,74]或因感染引起免疫反应而造成。

通过染料拒染法(死精子的质膜损伤,允许非透过膜性染料进入膜内染色)或低渗膨胀试验来鉴别细胞膜完整的精子,从而得出活精子百分率。推荐伊红-苯胺黑试验用于诊断用途。本章最后部分描述了可选择的精子存活试验。

精液样本一旦液化,应该立即检测精子存活率,最好在 30min 内评估,任何情况下不能超过 1h,以限制样本脱水或温度变化对精子存活率的有害效应。

2.4.7.1 应用伊红-苯胺黑的精子存活试验

使用苯胺黑一步染色技术,可以提高背景与精子头之间的对比度,使精子头更易辨别。涂片也可以保存用于再次评估、培训和质量控制^[75,76]。

试剂准备

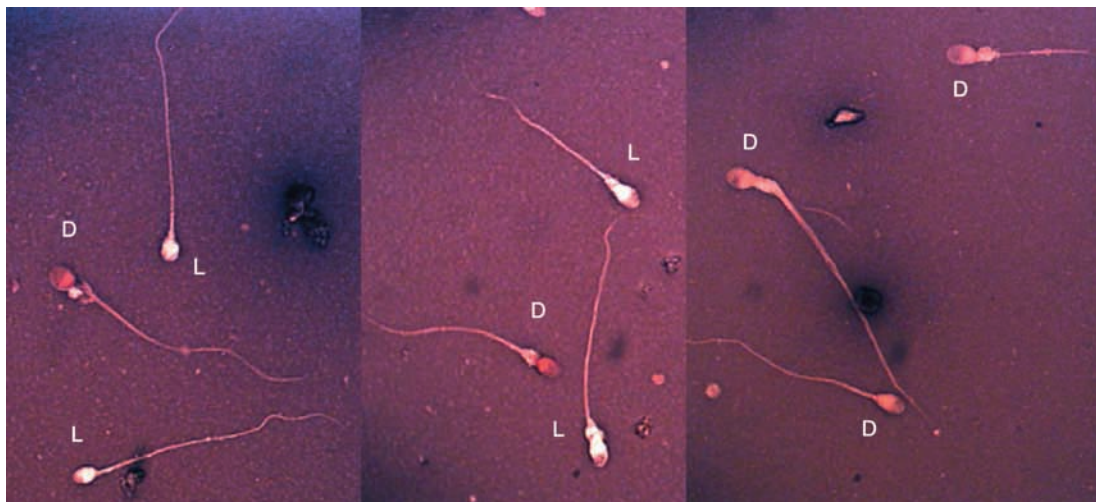
1. 伊红 Y:将 0.67g 伊红 Y(颜色指数 45380)和 0.9g 氯化钠(NaCl)溶解在 100mL 纯水中,稍微加热。
2. 伊红-苯胺黑:将 10g 苯胺黑(颜色指数 50420)加入至 100mL 伊红 Y 溶液中。
3. 将悬液煮沸,然后冷却至室温。
4. 用滤纸(例如 90g/m²)过滤溶液,除去残渣和凝胶状沉淀物,储存在暗色密封玻璃瓶中。

步骤

1. 充分混匀精液样本。
2. 取 50 μ L 精液,与等体积的伊红-苯胺黑溶液混匀(例如,在比色瓷板或试管中),等待 30s。
3. 用悬液在载玻片上制成涂片,空气中干燥。
4. 干燥后立即检查(存在苯胺黑污染物镜的风险),或使用非水性永久封片剂封片后再观察。
5. 用亮视野显微镜在 1 000 倍油镜下检查涂片。
6. 借助实验室计数器,计数染色精子(死精子)和非染色精子(活精子)。
7. 评估至少 200 个精子,以达到可接受的低抽样误差^[77]。
8. 影响评估精子存活率的解决方案,见 7.10.4 节。

评定

1. 苯胺黑形成黑色背景,使淡染的精子更易分辨。
2. 用亮视野显微镜观察,活精子头呈白色,死精子头呈红色或暗粉红色。精子头呈淡粉红色的精子评估为死精子。
3. 如果染色仅限于颈部区域,精子头未被染色,这种情况考虑为“颈部膜渗漏”,这不是



Micrograph courtesy of L. Björndahl.

图 2.4 在亮视野显微镜下观察伊红 - 苯胺黑涂片

精子头染成红色或暗粉红色的精子(D),判为死精子。精子头呈白色的精子(L),判为活精子。

精子死亡和整个细胞膜破裂的征象信号。这些精子应被评估为活精子。

2.4.7.2 计算

1. 计算活精子百分率。
2. 以最接近的整数,报告活精子的百分率。

2.4.7.3 精子存活率结果的解释

临床方面对活动精子数目很少或没有活动精子的精液样本资料尤为关注。

- 确定不活动的活精子百分率。
 - 从活精子百分率中减去活动精子(快速、慢速和非前向运动精子的总和)百分率,得出不活动的活精子百分率。
 - 不活动的活精子是否在全部精子中占有的比率高出 25%~30% ?

不活动的活精子数目没有确切限制。但是,如果全部精子中高出 25%~30% 是不活动的活精子,遗传性鞭毛障碍可能是原因。因此,通过任何医学治疗都不可能改善精子活力。

2.4.8 精子和其他细胞计数

每次射精的精子总数和精子浓度与妊娠等待时间^[78]和妊娠率^[59,79]存在关联,并且可以预测受孕^[60,80]。但是,尚有必要提供更多有关精子总数与生殖结局相互关系的数据。

精液的精子数目是通过精子浓度和精液体积来计算。对于正常射精,在男性输精管道通畅且禁欲时间短的时候,精子数目与睾丸体积相关^[2,32,34,81]。因此,精子数目可以衡量睾丸产生精子的能力^[82]、男性输精管道畅通的程度,以及性交过程注入女性生殖道的潜在精子数目。

精液中精子浓度与受精率和妊娠率存在关联,但精子浓度受精囊腺和前列腺分泌液体

积的影响^[83],不是衡量睾丸功能的最佳指标。

当表示“精子浓度”(每单位体积的数目)时,不能使用术语“精子密度”(每单位体积的质量)。

2.4.8.1 精子计数概述

- 通过检测湿片,确定最适当的稀释倍数(2.4.4.3 节)。
- 取准确体积的精液和固定液混匀,制备成稀释样本(表 2.1,2.4.4.3 节)。
 - 如果使用正向置换式移液器吸取 50 μL 精液样本并适当地稀释,则只需进行一次稀释^[84,85]。从精子悬液取出的重复样本需进行检查和比较。
- 准备计数池(血细胞计数板)。
- 加样至血细胞计数板的计数池,计数板放置入湿盒,使精子沉降到计数池底部。
- 从湿盒取出计数板后,立即评估精子数目(以避免计数池水分蒸发的副作用)。
- 每个重复样本计数至少 200 个精子。
- 比较 2 个重复样本的计数结果,看其差异的接近程度是否可以接受。如果可以接受,则计算数据;如果不能接受,制备新的稀释样本。
 - 有关精子计数中的问题处理,见表 7.14。
- 计算每 mL 精液中的精子浓度。
- 计算每次射精的精子数目。

2.4.8.2 改良 Neubauer 血细胞计数板

推荐使用改良 Neubauer 血细胞计数板。2.4.4.3 节给出了使用改良 Neubauer 血细胞计数板计数的稀释倍数。其他类型血细胞计数板也可以使用,但如果计数板有不同的网格类型和网格大小,则需要计算其他的稀释倍数。须对使用一次性 Neubauer 血细胞计数板进行验证^[86]。

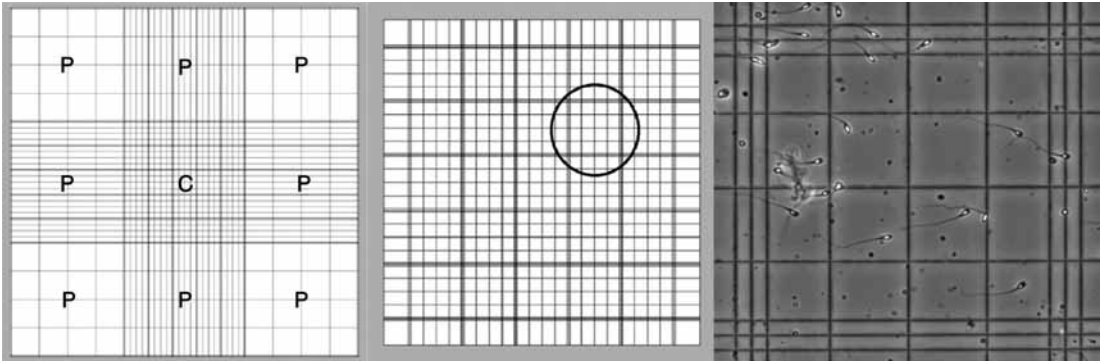
改良 Neubauer 血细胞计数板有 2 个独立计数池,每个计数池由蚀刻在玻璃表面的网格线形成 3mm $\times$ 3mm 的微小网格。特殊厚度的盖玻片(厚度 #4,0.44mm)覆盖在网格上,并由计数池突起的 0.1mm(100 μm)玻璃柱支撑在计数池表面。每个计数区域划分为 9 个 1mm $\times$ 1mm 的网格。图 2.5 用数字表示了这些网格的排列。

依据稀释倍数和要计数的精子数目,用计数池的不同计数区域检测精子浓度。通常使用中央网格计数。当中央网格内的精子数目少于 200 个时,使用 8 个外围网格。

使用血细胞计数板网格计数的原则

- 仅计数完整的精子(有精子头和精子尾)。
 - 如果有很多无头精子的尾部(称之为“大头针状头”精子),或无尾的精子头,应在报告中记录这种情况。它们的浓度可与完整精子的比较来估算(例如,“每 100 个精子中出现 45 个无头精子尾”)。
 - 如果 1 个精子头有不只 1 条尾的精子在所计数精子中超过 1/5(每计数 100 个精子中有 20 个这类精子),则应报告这类精子的相对频率。
- 大方格的边界以 3 条线的中间线表示。

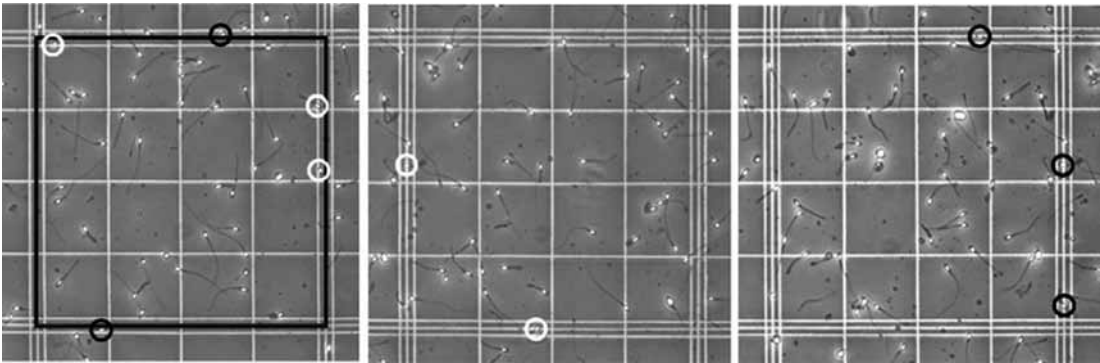
- 是否计数一个精子由精子头的位置决定;精子尾的方位不重要。
 - 计数所有未接触大方格边界(3 条线的中间线)的精子(图 2.6 左图:白色圆圈内的精子,计数)
 - 仅计数精子头与下边界或左边界接触的精子;不计数与上边界或右边界接触的精子(图 2.6 中间图:白色圆圈内的精子,计数;右图:黑色圆圈内的精子,不计数)。



Graphics and micrograph courtesy of L. Björndahl.

图 2.5 改良 Neubauer 血细胞计数板规则

网格区域表示:血细胞计数板的一个计数池内全部 9 个网格(左图),中央网格(C)和 8 个外围网格(P)。中央网格由 25 个大方格(中间图)组成;填充样本后计数池的部分显微镜下照片(右图),显示中央网格 25 个大方格的其中一个大方格(中间图中的画圈的方格)这个大方格用 3 条线作边界,含有 16 个小方格。8 个外围网格的大小与中央网格的相同,但外围网格内的小矩形格的大小与数量则与中央网格不相同。计数池深度为 100 μm , 9 个网格的每个网格的容积是 100nL。



Micrographs courtesy of C. Brazil.

图 2.6 网格内方格的精子计数

3 条线的中间线为方格的边界(黑线,左图)。计数中央方格内的所有精子(白色圆圈)。头部在中线上的精子,只有压在该方格的下边界或左边界(白色圆圈,中间图)时才计数精子,但精子头压在该方格的上边界或右边界(黑色圆圈,右图),则不计数精子。

2.4.8.3 血细胞计数板的准备与加样

1. 将血细胞计数板盖玻片附着在轻微湿润的表面(“计数池玻璃柱”)。

2. 将盖玻片紧压向计数池的支柱, 确保盖玻片紧贴在计数池上。以两层玻璃表面之间的彩虹(多条 Newton 环)证实盖玻片得到正确放置。观察到的线条越多, 则盖玻片盖得越好; 如果仅有 1 或 2 条线条, 则提示盖玻片与支柱不够紧贴, 会导致不正确的计数池深度。确保盖玻片紧贴在支柱上, 且不会因移液器吸头轻触就移动。

3. 以高速涡旋混匀第 1 个精液稀释样本 10s。为避免精子沉降, 立即吸取出一定体积已固定的精子悬液, 充分填满盖玻片覆盖下的一个计数池的全部区域(通常约 10 μ L)。

4. 用移液器吸头小心地轻触一个计数池的盖玻片边缘。

5. 缓慢地按下移液器活塞, 利用毛细作用使精液稀释样本填满计数池。在填充过程中, 不应使盖玻片移动, 计数池不能填充得太满, 也不能使计数池填充不足(填充不足时, 空气占据计数池的部分空间)。

6. 如上所述, 充分混匀第 2 个精液稀释样本, 并立即吸取出一定体积的精子悬液。按上述步骤, 再填充至血细胞计数板的第 2 个计数池。

7. 室温下, 将血细胞计数板水平放在湿盒内(例如, 计数板放在带盖培养皿内的浸透水滤纸之上)至少 10~15min(使精子在 100 μ m 深的计数池内完全沉降), 以防止计数板失去水分。

2.4.8.4 评估计数池内的精子数目

应该评估血细胞计数板 2 个计数池内的精子数目。如果 2 个计数池得出的数值一致性好, 可认为取出的样本可以代表精液样本(2.4.3.2 节)。需要注意的是, 所检查的取样没有观察到精子, 并不一定意味着精液其他部分没有精子。

1. 在相差显微镜 200 倍视野下(或 400 倍, 如果显微镜有相应配置), 观察血细胞计数板。

2. 每个重复样本至少计数 200 个精子, 以达到可接受的低抽样误差。

3. 首先评估改良 Neubauer 血细胞计数板一侧计数池中央网格的左上角大方格中的精子数目。用这个精子数目来确定将计数中央网格内的多少个大方格:

- <10 个精子: 计数整个中央网格(25 个大方格)。
- 10~40 个精子: 计数 10 个大方格。
- >40 个精子: 计数 5 个大方格(例如 4 个角和中心处的大方格)。



注解: 如果预先确定评估的大方格数中计数不到 200 个精子, 则继续计数与先前同样数量的大方格中的精子。如果计数中央网格的全部 25 个大方格没有达到 200 个精子, 则考虑再计数 1~8 个外围网格中的精子(图 2.5)。

4. 计数达到至少 200 个精子, 记下所评估的大方格或网格数。须在血细胞计数板的另一侧计数池中, 计数相同的大方格或网格数。

5. 借助实验室计数器的记录, 计数精子数目。

6. 转到血细胞计数板第 2 个计数池, 并计数与第 1 个重复样本相同的大方格或网格数, 即使这样计数不到 200 个精子。

7. 计算 2 个计数池的精子数目总和与差异。

8. 根据 2.4.8.5 节,确定 2 个重复计数结果之间的差异是否可接受。
- 如果差异可以接受,计算精子浓度(2.4.8.6 节)和每次射精的精子总数(2.4.8.7 节)。
 - 如果差异太大:
 - 首先从重复稀释样本中取样,加到 1 块新的血细胞计数板中,然后进行第 2 次重复计数精子。若计数结果的差异仍太大,进行第 3 次重复计数精子。
 - 如果 3 次重复样本计数后,计数结果的差异仍太大,则计算所有计数结果的平均值。在最终报告中注明该结果有较大不确定性。

2.4.8.5 重复计数结果之间差异的比较

在重复计数结果“总和范围”的列中,找到涵盖已计数精子数目总和的行。如果重复计数结果之间差异小于或等于总和范围右侧列对应的差异限,可接受重复计数的结果,计算最终结果。

表 2.3 的第 3 列,给出了基于观察数目(所评估精子数目)的最终结果的不确定性指标。虽然在观察精子数目少的情况下,重复计数可接受的差异较小,但由于观察数目有限,最终结果仍是不确定的(见 8.6 节)。

表 2.3 重复计数结果之间差异的比较及与结果不确定性的关系

计数结果总和范围	差异限值	基于观察数目最终结果的误差	计数结果总和范围	差异限值	基于观察数目最终结果的误差
969 ~ 1 000	61	3.2%	482 ~ 503	43	4.6%
938 ~ 968	60	3.3%	460 ~ 481	42	4.7%
907 ~ 937	59	3.3%	438 ~ 459	41	4.8%
876 ~ 906	58	3.4%	417 ~ 437	40	4.9%
846 ~ 875	57	3.4%	396 ~ 416	39	5%
817 ~ 845	56	3.5%	376 ~ 395	38	5.2%
788 ~ 816	55	3.6%	357 ~ 375	37	5.3%
760 ~ 787	54	3.6%	338 ~ 356	36	5.4%
732 ~ 759	53	3.7%	319 ~ 337	35	5.6%
704 ~ 731	52	3.8%	301 ~ 318	34	5.8%
678 ~ 703	51	3.8%	284 ~ 300	33	5.9%
651 ~ 677	50	3.9%	267 ~ 283	32	6.1%
625 ~ 650	49	4.0%	251 ~ 266	31	6.3%
600 ~ 624	48	4.1%	235 ~ 250	30	6.5%
576 ~ 599	47	4.2%	219 ~ 234	29	6.8%
551 ~ 575	46	4.3%	206 ~ 218	28	7.0%
528 ~ 550	45	4.4%	190 ~ 205	27	7.3%
504 ~ 527	44	4.5%	176 ~ 189	26	7.5%

续表

计数结果总和范围	差异 限值	基于观察数目最终 结果的误差	计数结果总和范围	差异 限值	基于观察数目最终 结果的误差
163 ~ 175	25	7.8%	38 ~ 43	12	16.2%
150 ~ 162	24	8.2%	32 ~ 37	11	17.7%
138 ~ 149	23	8.5%	27 ~ 31	10	19.2%
126 ~ 137	22	8.9%	22 ~ 36	9	21.3%
115 ~ 125	21	9.3%	17 ~ 21	8	24.3%
105 ~ 114	20	9.8%	13 ~ 16	7	27.7%
94 ~ 104	19	10.3%	10 ~ 12	6	31.6%
85 ~ 93	18	10.8%	7 ~ 9	5	37.8%
76 ~ 84	17	11.5%	5 ~ 6	4	44.7%
67 ~ 75	16	12.2%	3 ~ 4	3	57.7%
59 ~ 66	15	13%	2	2	70.7%
52 ~ 58	14	13.9%	1	1	100%
44 ~ 51	13	15.1%			

2.4.8.6 根据精子计数计算精子浓度(表 2.4)

两个可接受的重复计数之和除以一个系数,该系数由稀释倍数和 2 个计数池评估的大方格或网格的数目决定(如果 3 次重复样本的重复计数结果之间没有充分一致,则取 3 次重复计数结果之和的平均值),从而计算精子浓度。

表 2.4 根据精子计数计算精子浓度

稀释 倍数	每个计数池计数 的大方格数目			每个计数池计数的网格数目							
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9
	相关系数值										
1 : 2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800	900
1 : 5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360
1 : 10	4	8	20	40	60	80	100	120	140	160	180
1 : 20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1 : 50	0.8	1.6	4	8	12	16	20	24	28	32	36



注解:改良 Neubauer 血细胞计数板有 2 个计数池。每个计数池由 9 个(3 × 3)相同大小的网格组成。中央网格由 25 个大方格组成,每个方格由 3 条线包围,而 8 个外围网格则由 16 ~ 20 个矩形格组成。

如果每个计数池计数精子少于 25 个,而且使用 1+1 (1 : 2) 的稀释倍数,精子浓度将 < 55 555/mL^[87]。精子计数结果的估计误差超过 14% (表 2.3) (稀释倍数越高,则精子浓度结果越高,但精子计数结果的估计误差相同,为 > 14%)。报告观察到的精子数目,并注明“计数的精子太少,不能准确测定精子浓度 (< 56 000/mL)”。需要准确评估低精子数目时,见 2.4.8.8 节。

2.4.8.7 计算精子总数

- 由于每次射精的精子总数是衡量睾丸生成精子的能力,以及性交过程注入女性生殖道的潜在精子数目的较好参数,因此,必须计算和报告每次射精的精子总数。精子浓度乘以整份精液体积可以得出精子总数。
- 尽管检测的易变性确实证明使用小数点是合理的,但是,精子总数应以整数 (没有小数位) 的 10^6 精子进行报告。只有在精子数目低于 10×10^6 的情况下,为了在较低的结果范围清晰显示精子数目,使用 1 位小数或许可以接受。

2.4.8.8 低精子数目的样本

如果在 2 张重复湿片中没有观察到精子,可以疑为精液中完全缺乏精子 (无精子症)。虽然一直建议应修改无精子症的定义^[88,89],但是,无精子症仍然是描述射出精液没有精子,而不是作为一种诊断或作为治疗的依据。目前普遍接受的是,无精子症这一术语仅在离心后精液样本沉淀物没有发现精子才可使用^[90]。

然而,应该记住以下几点:

- 离心后沉淀物内能否发现精子取决于离心时间和速度^[91,92],以及所检查沉淀物的量;
- 以 3 000g,离心 15min 不能把样本内所有精子离心形成沉淀团^[93];
- 离心后,精子可能丧失活力^[46],并且精子浓度会被低估^[87]。如果对离心后的样品进行精子计数,应在最终报告中清晰地注明。

当需要评估低精子数目样本时,这些样本的处理方法主要取决于精子存在和精子活力的定性数据是否足够,或是否要求获得准确的精子数目 (见下文“非离心精液样本中活动精子的检查”和“离心样本中不考虑精子活力的精子检查”)。

虽然对样本采用 1+1 (1 : 2) 稀释倍数,并且计数了所有 9 个网格的精子数目,可以粗略估计低精子浓度样本的精子数目,但是,精子数目估计误差是大的。此外,分析低稀释倍数的精液样本,需在显微镜下观察大片视野。仔细检查 2 个计数池可能需要 10~20min,但如果借助荧光染料染色技术,可以快速检测精子^[87]。需要注意的是,由于计数的精子数目少,而且取样体积可能不准确,通过下列几个方法获得的数值应视为估计值。

非离心精液样本中活动精子的检查

当需要检测样本的活动精子时,重要的是确定所使用离心程序是否会损害精子和精子活力,由此会导致错误的结果。如果使用经过离心的样本,实验室须确保相关程序不会损害精子活力或受精能力。

检查湿片估计精子浓度

1. 使用 2 张连续制备的湿片 (2.4.3.3 节)

2. 按顺序逐个视野观察整个盖玻片区域。观察时,从盖玻片的一角开始,沿 x 轴观察到盖玻片的对侧;然后沿 y 轴下移一个视野,并在沿 x 轴观察同样宽度返回。继续以这种 Z 字形方式,对整个样本进行完全和系统的检查(图 2.7)。在移动视野过程中,保持观察玻片。

- 使用 20 倍物镜,以及目镜孔径为 20mm 的 10 倍目镜,显微镜视野的直径约为 1 000μm (2.5.9 节)。故此,每张 22mm × 22mm 盖玻片下,约需检查 484 个视野。

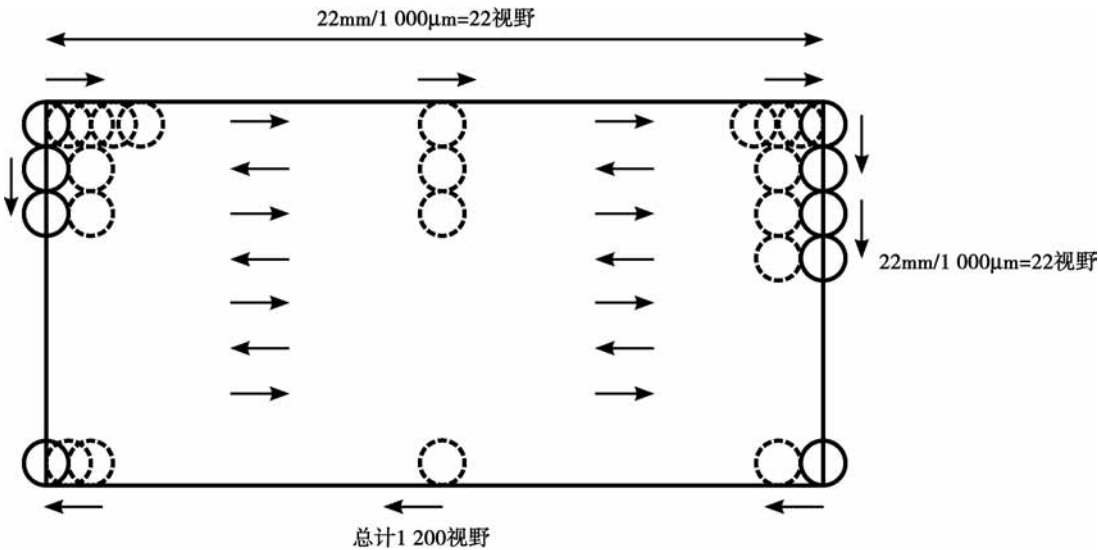


图 2.7 观察整个盖玻片区域寻找活动精子^①
在 200 倍的高倍视野下检查 22 mm × 22 mm 盖玻片。

3. 从 10 μL 或 20 μL 精液样本观察到活动和不活动精子数目,观察到的精子数目乘以精液总体积和系数,可以计算出大约的精子浓度:

N = 观察到的精子数目

Vol = 精液体积 (mL)

Factor = 系数 (检测 10 μL 样本体积时为 100, 20 μL 时为 50)

精子浓度 (精子 / mL) = $N \times Vol \times Factor$

4. 报告中必须说明该精子浓度是近似值,而不是精确值。

5. 检查湿片观察到精子的概率计算,参见 2.5 节。

观察高倍视野估计精子浓度

如果每个 400 倍高倍视野 (HPF) 观察到的精子数目小于 4 个 (例如,约 $<1 \times 10^6/\text{mL}$), 对于生育力低下男性而言,可以报告估计的精子浓度约为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,并在报告中清晰注明这仅是很粗略的精子浓度估计值,还要注明是否观察到活动精子。只有当精子浓度评估的目的是决定进一步的临床研究,或决定一对夫妇接受辅助生殖技术 (ART) 治疗的最适合方案时,才应进行这种不精确的精子浓度估计。这种不精确的精子浓度估计不应用于常规精液分析,尤其不应用于监测潜在男性避孕药的效果和检查精子发生对内分泌刺激的应答。

^① 译者注:图 2.7 配图错误。本手册原文文字描述的是 22mm × 22mm 盖玻片的视野数,正确视野数应为:22mm/1 000 μm = 22 视野,总计 22 × 22=484 视野。

当遇到需计算极低精子浓度或精子总数的情况时,按照 2.4.8.4 节的描述,计数全部 9 个大方格内的精子数目。

用一次性大容量计数池评估精子数目少的样本

使用大容量、100 μm 深的计数池可以提高评估精子浓度的灵敏度^[85]。大容量计数池由 2 个 100 μm 深的计数池组成,每个计数池容积为 25 μL 。为了减少抽样误差,必须至少计数一定的精子数目(最好每个重复样本计数约 200 个,2 个计数池总共至少 400 个)(表 2.16)。

1. 充分混匀精液样本。

2. 取出少量精液样本,如果预计样本的精子数目少,则不需要稀释样本,以易于观察活动精子。如果需作稀释,以稀释倍数 1+1(1:2)加入固定液(2.4.4.4 节)。

样本在初始评估时,每个高倍视野内的精子数目少于 2 个(表 2.1),对这样精子浓度范围内的样本,使用稀释倍数 1+1(1:2)是合适的,在整个计数池中可以观察到约 200 个精子。

3. 如果使用荧光显微镜,应用合适染料如 DAPI 对已“稀释”固定的精子进行染色,有助于分辨精子。

在大容量一次性计数池,每个重复样本计数 200 个精子

- 如果在最初湿片的每个高倍显微视野 4nL 样本中仅观察到 1 个精子,理论上精子浓度为 0.25/nL (250/ μL 或 250 000/mL)。
- 由于大容量计数池的容积为 25 μL ,故计数池内可能有 6 250 个精子。以稀释倍数 1+1(1:2)稀释样本可以降低背景,并且减少精子数目至每个计数池 3 125 个精子,这足以达到可接受的低取样误差。
- 然而,由于计数的精子数目太少,而且取样和取稀释液的体积可能不准确,上述的数值仅是粗略的估计值。

步骤

1. 取上述相关的样本(稀释的或未经稀释的)。
2. 计数板的每个计数池加入 25 μL 稀释样本。
3. 室温下,将计数板水平放置在湿盒内至少 10~15min(例如,放在带盖培养皿内的浸透水滤纸之上),以避免干燥。(如果使用荧光染料,在这段时间内,荧光染料会与精子头结合,并且已制动的精子会沉降到计数池底面上)。
4. 用 250 倍放大倍数检查计数板。
5. 每个重复样本计数至少 200 个精子,以达到可接受的低取样误差(表 2.16)。
6. 按顺序逐个视野检查计数池区域。检查时,从计数池的一角开始,沿 x 轴检查到计数池的对侧;然后沿 y 轴下移一个视野,并在沿 x 轴检查同样宽度返回。继续以这种 Z 字形方式进行检查。在移动视野过程中,保持观察计数池,并继续计数,直到检查至少 200 个精子。
7. 记录评估达到至少 200 个精子时的视野数目。另一个计数池也评估相同的视野数目。
8. 借助实验室计数器的记录,计数精子数目和记录视野数目。
9. 转到第 2 个计数池,如同第 1 个重复样本一样,在相同的视野数(即相同体积)中进行重复计数,即使这样计数未达到 200 个精子。
10. 计算 2 个计数池计数结果的总和与差异。
11. 根据表 2.3 确定差异的可接受性。2 次计数之间的最大差异,预期 95% 的样本仅由于取样误差所致。
12. 如果差异可接受,计算精子浓度。如果差异太大,重新制备 2 个计数池,再次计数。

13. 以2位有效数字报告平均精子浓度。

14. 将精子浓度乘以精液体积(mL),得到每次射精的精子总数。

检查显微视野计算低精子浓度

精液中精子浓度是精子数目(N)除以所评估显微视野总数(n)的体积[视野容积(v)的计算方法见2.5.9节],再乘以稀释倍数。即 $C = (N/n) \times (1/v) \times \text{稀释倍数}$ 。

总放大倍数250倍时,视野体积为80nL(见2.5.9节),并且稀释倍数是1+1(1:2),样本的精子浓度为:

$$C = (N/n) \times (1/80) \times 2 \text{ 精子/nL} = (N/n) \times 1/40 \text{ 个精子/nL} (10^6 \text{ 精子/mL 精液})。$$

总放大倍数400倍时,视野体积为20nL(见2.5.9节),并且稀释倍数是1+1(1:2),样本的精子浓度为:

$$C = (N/n) \times (1/20) \times 2 \text{ 精子/nL} = (N/n) \times 1/10 \text{ 个精子/nL} (10^6 \text{ 精子/mL 精液})。$$

评估了2个计数池的全部区域,精子总数除以2个计数池的总体积(50μL),再乘以稀释倍数^[2],可以计算出每μL的精子浓度(数千个精子/mL精液)。

如果样本未经稀释,则稀释倍数是1。

在100μm深、大容量一次性计数池,每个高倍镜视野观察的体积

- 每个显微视野的精液体积,取决于视野面积(πr^2 ,其中 π 约为3.142, r 为显微视野半径)和计数池深度(此处为100μm)。
- 显微视野的直径可以用镜台测微尺测量,或用目镜孔径的直径除以物镜放大倍数进行估算。
- 显微镜物镜是40倍,10倍目镜的孔径为20mm,则显微视野直径约为500μm(20mm/40)。在这种情况下, $r=250\mu\text{m}$, $r^2=62\,500\mu\text{m}^2$, $\pi r^2=196\,375\mu\text{m}^2$,体积约为19\,637\,500μm³,或约为20nL。
- 显微镜物镜是25倍,10倍目镜的孔径为25mm,则显微视野直径约为1\,000μm(25mm/25)。在这种情况下, $r=500\mu\text{m}$, $r^2=250\,000\mu\text{m}^2$, $\pi r^2=785\,500\mu\text{m}^2$,体积约为78\,550\,000μm³,或约为80nL。

方法的敏感度

如果每个计数池的精子数目少于200个,取样误差将超过5%。当2个计数池计数到精子数目小于400个,按计数到的精子数目报告取样误差。

如果每个计数池的精子数目少于25个,精子浓度会少于2\,000/mL,估计误差超过14%。报告观察到的精子数目,并注明“计数的精子数目太少,不能准确测定精子浓度(<2\,000/mL)”。

须注意的是,在检查的取样中找不到精子,并不意味着在样本其他部分没有精子。

样例

例1

稀释倍数是1+1(1:2),重复样本1在300个视野内观察到210个精子,而重复样本2在300个视野内观察到300个精子。600个视野的2个精子数目之和为510(210+300),两者之差为90(300-210)。根据表2.3,可以看出超出预期的随机误差(44)。故此,摒弃结果,并制备2个新的稀释重复样本。

例2

稀释倍数是1+1(1:2),重复样本1在400个视野内观察到200个精子,而重复样本2

在400个视野内观察到230个精子。800个视野的2个精子数目之和为430(200+230),两者之差为30(230-200)。根据表2.3,可以看出小于随机误差(40)。故此,接受得出的数值。

稀释比例1+1(1:2),样本的精子浓度是 $C=(N/n) \times (2/v)/nL$ 。如果 $v=20nL(\times 400$ 放大倍数), $C=(430/800) \times (2/20)=0.0538$ 精子/ nL ,或者是54000精子/ mL 精液(保留2位有效数字)。

例3

稀释倍数是1+1(1:2),重复样本1在整个计数池内观察到50个精子,而重复样本2在整个计数池内观察到70个精子。2个计数池的2个精子数目之和为120(50+70),两者之差为20(70-50)。根据表2.3,可以看出小于随机误差(21)。故此,接受得出的数值。

稀释倍数是1+1(1:2),并且检测了2个计数池的整个区域(总体积50 μL),样本的精子浓度是 $C=(N/50) \times 2$ 精子/ $\mu L=(120/50) \times 2=4.8$ 精子/ μL ,或者是4800精子/ mL 精液(保留2位有效数字)。由于计数到的精子数目少于400个,根据表2.3,得出120个精子相应的取样误差为9.3%,报告这个取样误差。

例4

稀释倍数是1+1(1:2),重复样本1在整个计数池内观察到20个精子,而重复样本2在整个计数池内观察到18个精子。由于每个计数池的精子数目少于25个,精子浓度会少于2000/ mL 。报告“在样本中观察到38个精子,精子数太少,不能准确测定精子浓度(<2000/ mL)”。

例5

稀释倍数是1+1(1:2),每个重复样本都没有观察到精子。由于每个重复样本观察到的精子数目少于25个,精子浓度会少于2000/ mL 。报告“2个重复样本中未观察到精子,精子数太少,不能准确测定精子浓度(<2000/ mL)。”

计算精子总数

由于每次射精的精子总数可以衡量睾丸生成精子的能力,以及性交过程注入女性生殖道的潜在精子数目,因此,推荐计算和报告每次射精的精子总数。精子浓度乘以整份精液体积可以得出精子总数。

离心样本中不考虑精子活力的精子检测

当任一湿片中都没有观察到精子、且精子活力不重要时,可以离心精液样本,以确定更大样本体积中是否存在精子。

1. 充分混匀精液样本。
2. 取1 mL 精液样本至离心管中,以3000g离心15min。
3. 弃去大部分上清液,并在剩下约50 μL 精浆里重新混匀精子沉淀物。
4. 在1张或2张玻片上,各加入10 μL 沉淀团悬液,制成湿片(2.4.3节)。按照2.4.4节的描述进行检测。

- 在样本中观察到精子提示:
 - 从单侧或双侧睾丸至尿道是通畅的。
 - 精子生成严重不足或精子转运受阻。
- 样本中没有观察到精子提示:
 - 可能完全缺乏精子(无精子症),原因可能如下:
 - 完全没有精子生成,或极低的精子生成量。
 - 双侧睾丸至尿道不通畅。

2.4.9 精子形态学

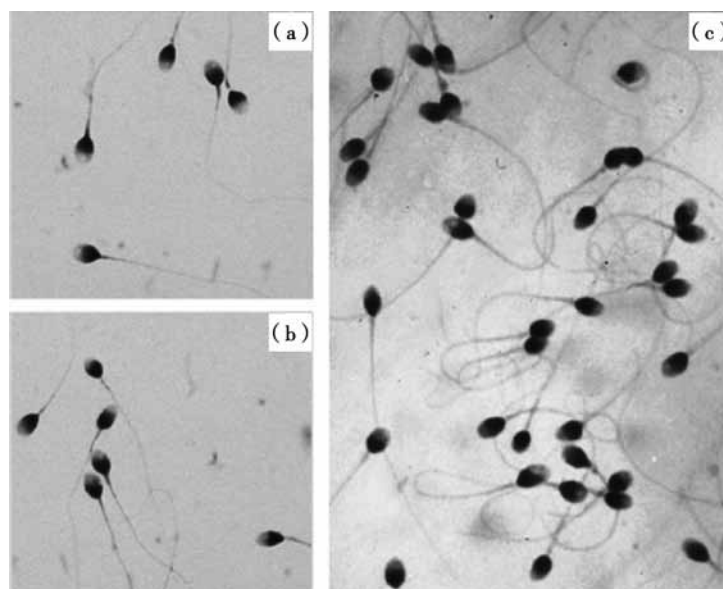
精子形态学评估的价值不仅在于对自然妊娠和 ART 结局有一定预判作用,更可以对男性生殖器官,主要是睾丸和附睾功能的状态提供更多诊断信息。对于评价男性生殖器官而言,仅确定“正常”精子百分率是不充分的。评估精子头、颈 / 中段和尾的特异形态,以及可能存在的异常残留胞质尤为重要。

所有人类精液中都有很多不同形态外观的精子。精子形态的早期定义主要基于兽医学和显微镜观察的经验。

本手册采用的标准,是基于能够穿透宫颈黏液、并与卵透明带结合的精子形态所研究制定的。

“正常”精子一词在某些方面还不明确,会产生一些误解甚至学术争论。“正常”的一种普遍含义是指群体中的一般性特征。这个含义用在人类的“正常精子形态”是不正确的。“正常”的另一种意思是暗示精子或个体没有受疾病影响,但是正常形态并不意味着精子不会有病理学的其他原因(例如:精子尾不活动或 DNA 损伤)。

由于人类精子形态的多样性,造成了评估精子形态的困难。但是,通过观察从女性生殖道,特别是性交后宫颈黏液^[94,95]和卵透明带表面回收的精子^[96,97](图 2.8),有助于定义具备潜在受精能力外观(形态正常的,或较好的,“理想的”或“典型的”)的精子。通过严格使用精子形态的某些标准,已经建立了“正常”形态精子百分率与不同的生育力评价终点指标(妊娠等待时间,体内与体外的妊娠率)之间的关系^[58,96,98-103],这可能有助于预测生育力。



Reproduced from Liu et al. (2003) by permission of the European Society of Human Reproduction and Embryology. (c) Reproduced from Menkveld & Kruger (1990) by permission.

图 2.8 “理想”形态的精子

(a, b) 从体外卵透明带上回收的,经过 Shorr 染色的精子。(c) 从性交后宫颈黏液中回收的,经过巴氏染色的精子。可以观察到这些精子几乎没有头部、中段或主段的缺陷。尾部可能有弯曲但没有锐利的折角。

本部分所描述分类方法的基本依据,是通过鉴定普遍存在于宫颈黏液内具有潜在受精能力的亚群精子来定义典型形态精子,这是有局限性的。有生育力和不育男性的正常形态精子百分率范围可能远低于30%。在区分有生育力和不育的人群时,这将不可避免地产生一个低临界值;在体外受精(IVF)^[99],宫腔内人工授精(IUI)^[101]及自然受孕^[105]的研究中确实显示,正常形态精子的参考限或临界值仅为3%~5%。而且,应该强调的是,在不育与生育力低下男性群体精子形态平均值之间的差值,不意味着这个计算出的“界限值”可用于解释个体男性的精子形态评估结果。为了获得有用的此类界限值,必须确定阳性和阴性预测值。例如,当涉及“正常”(“理想的”或“典型的”)精子百分率时,是很难预测的。例如,对于个体男性而言,为了在统计学上区分出3%“正常”精子形态与5%“正常”精子形态之间的不同,必须由充分培训过的人员评估1500个精子才能得出结果。

与人卵透明带结合的精子也显示出一类形态相似的精子亚群^[103]。

为了在光学显微镜水平更好地理解人类精子形态学,全面复习精子超微结构和功能是有价值的^[106]。

实用的人类精子形态评估包括以下步骤:

- 制备精液涂片(2.4.9.1节);
- 涂片的空气干燥、固定和染色(2.4.9.2节);
- 如果涂片需要长期保存,用盖玻片封片(2.4.9.5节);
- 用油镜在亮视野1000倍放大下检查涂片(2.4.9.6节);
- 评估大约200个精子(2.4.9.6节)。
- 对评估精子形态学的问题处理,见7.10.2节。

2.4.9.1 制备精液涂片

固定剂快速加入精液中会引起精浆蛋白变性,使精子变得模糊,不易观察。精子形态学分析的传统做法是涂片在固定和染色前,采用空气干燥。然而,空气干燥过程也会导致精子形态的假象。精液涂片干燥可能伴有以下问题:

- 精子的大小会改变,干燥、固定和染色后的精子比精液中所见的活精子会变小一些^[107];
- 未成熟精子的头会膨胀(Soler et al., 2000);
- 尽管保留了大量的过量残留胞质,但对渗透压敏感的胞质小滴会丢失^[108,109]。

每份新鲜精液样本应制备2张或更多涂片,以防染色发生问题或载玻片破碎。

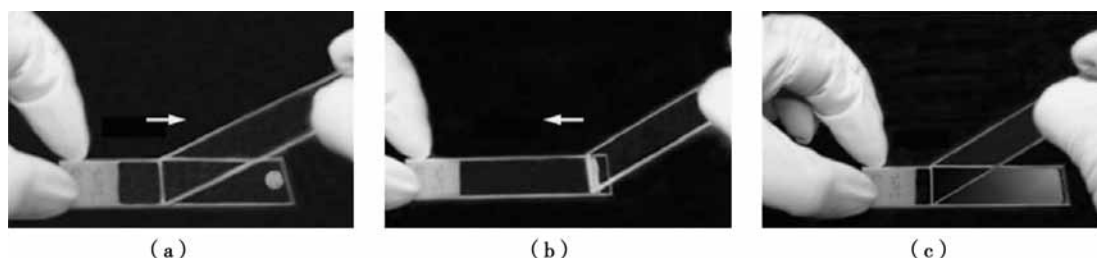
1. 充分混匀精液样本。
2. 快速取样,使精子没有时间从混悬的精液样本中沉降下来。
3. 重复取样前,再次混匀精液标本(第2张涂片是在染色出现问题时作为备用)。

正常特征的精液

在这一步骤,使用拉薄技术,将1滴精液涂在载玻片的整个表面上(图2.9)。

1. 用不掉屑的纸巾或乙醇用力擦干净磨砂载玻片的两面。
2. 在载玻片的磨砂处,标记上2个唯一标识符的鉴识信息,以确保固定、染色或封片不会使标记难以辨认。

3. 根据精子浓度,取5~10 μL的精液滴在载玻片的一端。用第2张载玻片沿第1张载玻片的表面拖拉精液滴(图2.9)。如果用来拖拉的载玻片是非磨砂的,用它的两端可以拖拉制成4张涂片。



Photographs courtesy of C. Brazil.

图 2.9 制备正常精液涂片

体验涂片动作的感觉,以 45° 角放置拉片,移动并接触精液滴(a);沿着载玻片的边缘移动(b);沿着载玻片的长轴,缓慢拖回拉片(约 1s),制成一张涂片(c)。

4. 涂片经空气干燥后,染色见 2.4.9.2 节所描述。

涂片的质量(最低程度的精子相互重叠)取决于:

- 精液体积和精子浓度:精子数目越少,它们相互重叠的可能越小。
- 拉片的角度:角度越小,涂片越薄。
- 拖拉涂片的速度:速度越快,涂片越厚。

开始时,可以用 $10\mu\text{L}$ 精液,以 45° 角,约 1s 涂 1 张载玻片。如果必要,可以改变上述参数,以减少涂片上精子间的相互重叠^[95]。精液黏稠度越低,拉薄效果越好,拉薄技术一般不适用于高度黏稠的精液(图 2.9)。

异常特征的精液

对于精子浓度低($<2 \times 10^6/\text{mL}$),黏稠或碎片多的样本,可能需要不同的制备涂片方法。

精子浓度低的精液样本

如果精子浓度低(例如, $<2 \times 10^6/\text{mL}$),按照下列步骤浓缩样本:

1. 将样本 $600g$ 离心 10min。
2. 除去大部分上清液。
3. 用移液器轻轻吹打,使精子团重新混悬于剩余上清液中。
4. 尽可能获得最高的精子浓度,但不要超过约 $50 \times 10^6/\text{mL}$ 。
5. 按正常精液样本制备涂片(2.4.9.2 节)。



|| 注解:离心可能影响精子形态,离心处理后须在最终报告中予以记录。

黏稠的精液样本

有时精浆高度黏稠,很难制备出好的精液涂片,导致涂片厚而不均。黏稠精液样本可以按液化不良精液样本相同的方法(2.5.2 节)或者使用洗涤方法进行处理。



|| 注解:这些方法可能影响精子形态,使用了这些方法须予以记录。

含有碎片或黏稠的精液样本

精液中存在碎片和大量颗粒物质(例如,在黏稠精液样本中),可使精子头枕在碎片和颗

粒边缘上,导致很难对精子进行分类。此类精液样本可以按下列步骤洗涤。

1. 用 170mM 的生理盐水,稀释少量充分混匀的精液(0.2~0.5mL,取决于精子浓度),以减少精子的渗透压改变。根据射精后精液制备的时间长短,精液渗透压可能会升高到 350~400mOsm/kg。与体液渗透压(290mOsm/kg)等渗的培养液,对于已适应液化精液中较高渗透压的精子会减少低渗休克^[17,18]。
 2. 以 800g,离心 10min。
 3. 吸出大部分上清液。
 4. 用移液器轻轻吹打,使精子团重新混悬于剩余上清液中(通常为 20~40 μ L)。
 5. 用巴斯德氏吸管,将 5~10 μ L 精子悬液均匀地涂在载玻片上(图 2.9b)。
 6. 用相差显微镜,在 400 倍放大视野下检查涂片,确认涂片上精子均匀分布。
 7. 每 400 倍放大视野下,检查至少 40 个精子,没有精子聚集成团或相互重叠。
 8. 按照 2.4.9.2 节所描述的方法,涂片空气干燥,染色。
- 如果玻片上很多精子相互重叠,减少取样量,制备另一张涂片。
 - 如果玻片上的精子过于稀少,增加取样量,再制一张涂片。
 - 洗涤样本可能影响精子形态,进行了洗涤须予以记录。

2.4.9.2 固定和染色

一旦精液涂片空气干燥后,应立即固定并染色,以显衬出精子的细节。由于应用巴氏染色法染色精子及采用 Tygerberg 严格标准分析精子已进行了全面验证和评估,故推荐巴氏染色法应用于染色人类精子,该方法对人类单个精子所有部分染出了最佳的整体可视效果^[95,110-113]。使用其他染色方法要与巴氏染色描述用于人类精子的方法相比较并验证。

使用推荐的染色方法,在显微镜亮视野下,精子头部的顶体区染成淡蓝色,顶体后区染成深蓝色。头部的顶体区和顶体后区、过量残留胞质、中段和主段都被染色。中段可以染出略带红色,尾部染成蓝色或淡红色。过量残留胞质通常位于精子头后部和围绕着中段,一般染成绿色;如果染出淡红色,提示可能是其他异常所致。

巴氏染色法染色其他细胞也有很好的染色效果。本部分描述的巴氏染色技术,有时有助于区分不成熟生殖细胞和非精子细胞(图 2.15 和图 2.16)。常规的染色程序已进行了修改,不再使用乙醚(作为固定剂)或二甲苯(以利于封片)^[114](2.4.9.3 节)。使用巴氏程序染色的染片可以长期保存,以备将来用于培训和内部质量控制。如果储存在阴暗处,染片可以稳定保存数月甚至数年。

本章最后一部分介绍了一些其他常用染色技术:Shorr 染色法和快速染色法。由于巴氏染色法^①现在仍是最好的评估精子形态的技术,故推荐巴氏染色法染色人类精子。对于全球性应用技术,染色方法与评估标准的标准化尤为重要。如果开展科学研究,可以使用其他染色技术,但需与标准技术作恰当评价和验证。

^① 巴氏染色组分的染色剂:商售或见第 8.4.11 节。

2.4.9.3 固定和巴氏染色步骤(表 2.5)

包括以下步骤：

表 2.5 固定和巴氏染色步骤

固定				
	乙醇	95% (v/v)	至少 15min	固定细胞,使细胞脱水
染色				
1	梯度乙醇	80% (v/v) ^①	30s	使固定的涂片逐渐复水,以便水溶性苏木素染色
2	梯度乙醇	50% (v/v)	30s	
3	纯水		30s	涂片完全复水,以便水溶性染料染色
4	苏木素		4min	使细胞核染成蓝色
5	纯水		30s	除去未与细胞核结合的苏木素
6	酸性乙醇 ^②		4~8 次 ^{③,④}	除去与细胞质非特异结合的染料(脱色)
7	纯水		30s	降低酸性,使细胞核恢复蓝色;如果流水返蓝不够,可使用 Scott 氏液返蓝
8	冷流水冲洗		5min	
9	乙醇	50% (v/v)	30s	涂片脱水,以便溶于乙醇的橙黄 G/EA-50 染色
10	乙醇	80% (v/v)	30s	
11	乙醇	95% (v/v)	至少 15min	
12	橙黄 G-6 染液		1min	使细胞质染成粉红色
13	乙醇	95% (v/v)	30s	
14	乙醇	95% (v/v)	30s	
15	乙醇	95% (v/v)	30s	
16	EA-50 染液		1min	使细胞质和核仁染成粉红色
17	乙醇	95% (v/v)	30s	使已染色涂片逐渐脱水,以便使用溶于乙醇的封片剂
18	乙醇	95% (v/v)	30s	
19	乙醇	100%	15s	
20	乙醇	100%	15s	
21	二甲苯			使用不溶于乙醇的封片剂

① 乙醇固定作用导致了细胞脱水。因此,从 95% 乙醇固定步骤中直接取出的涂片,在 80% 乙醇中可能仅需浸 10s,而固定后经空气干燥的涂片须在 50% 乙醇中浸更长时间(2~3min)。

② 酸性乙醇:将 1.0mL 浓盐酸加至 200mL 70% (v/v) 乙醇中。

③ 浸 1 次对应于浸入约 1s。

④ 从第 4 浸开始,继续增加浸在酸性乙醇的秒数,直到出现满意的颜色。由于脱色持续时间会显著改变最终颜色强度,故这一步骤是关键的。如果省略这一步,精子和背景会变暗。增加浸在酸性乙醇的秒数也会使精子和背景变模糊。

精液涂片封片或不封片(用或不用盖玻片)均可观察。已封片的涂片可以长期保存,以便于必要时再次评估,而且可以用于内部质量控制(IQC)。已封片的涂片干燥后的折射率(RI)(1.498~1.55)与玻璃的折射率(1.50~1.58)相似,使用相近折射率(1.515)的油镜,观察效果最好。

2.4.9.4 封片前对已染色精液涂片的处理

- 有两类液体用于封片:溶于乙醇和不溶于乙醇的封片剂。
- 在涂片上的乙醇未干时,直接使用溶于乙醇的封片剂。
 - 如果使用不溶于乙醇的封片剂,将涂片从上述染色程序的第 19 步直接进入以下步骤(在通风柜中操作):
 - 二甲苯^①:乙醇,1+1(1:2) 1min
 - 100% 二甲苯 1min
 - 从二甲苯染色缸中每次取出 1 张涂片,让其滴干 1~2s,封片时,涂片应该十分湿润。

2.4.9.5 已染色精液涂片的封片

- 对染色涂片做了封片,没有污染显微镜物镜的风险。
1. 将盖玻片(24mm×50mm 或 24mm×60mm)放在折叠的纸巾上。
 2. 将封片剂以哑铃形状滴在盖玻片上。
 3. 然后将载玻片,涂布面朝下放置在盖玻片上。
 4. 按压载玻片使封片剂展开。
 5. 使封好的涂片水平放置干燥,盖玻片面朝上,将载玻片放置在干燥架或者吸水纸上,通风橱中过夜。

2.4.9.6 检查已染色涂片

精子形态学分类(表 2.6)

为了对精子形态学进行有用的评估,必须由经过培训的定期参加常规内部质控的实验室人员来执行。为了实验室之间的比较,以及其他中心开展此项技术与建立决定性的需求,充分参与室间质评(EQA)是必要的。这里推荐的分类,是在识别一个精子所有部位异常的基础上,将精子分为理想精子(“精子能够到达受精部位的典型类型”)或者异常精子。为了实施形态学评估,评估精子形态学的人员必须熟悉所有的标准,这意味着即使实验室选择只报告理想或异常精子百分率,内部质控和室间质评必须评价实验室分析人员正确识别精子所有部位异常的能力。在评估正常形态学精子时,应采用以下标准^[95,99,115]。

在光学显微镜下,可以认为精子由头部和尾部组成。尾部与头部连接处、含有线粒体的较厚部分称为中段。其余的尾部由带有长柱^[116]纤维鞘的主段(外周致密纤维包绕着轴丝或纤毛结构)和末段组成。由于末端很难在光学显微镜观察到,因此精子可以被认为包括头

^① 二甲苯对健康有害,不应使用。现在有些替代品,例如:NeoClear。

表 2.6 精子形态学分类

部位	正常 (理想 / 典型) 外观	异常
头	头部应光滑、轮廓规则，大体上呈卵圆形。顶体区清晰可辨，占头部的 40%~70% ^[96] ，顶体区没有大空泡，并且不超过 2 个小空泡、空泡大小不超过头部的 1/5。顶体后区没有空泡	● 顶体区小于正常头部面积的 40% 或大于正常头部面积的 70% ● 长与宽的比例小于 1.5 (圆形) 或大于 2 (延长形) ● 形状: 锥形 (梨形)、不定形、不对称或顶端非卵圆形 ● 空泡占头部面积的 20% 或位于顶体后区 ● 双头 ● 以上缺陷的任何组合
中段	中段应细长、规则，约与头部长度相等。中段主轴应与头部长轴成一条直线	● 形状不规则 ● 细或粗的 ● 非对称或以角度插入头部 ● 锐角弯曲 ● 以上缺陷的任何组合
尾部	主段应沿着其长轴、均一，比中段细，其长约 45 μm (约为头部长度的 10 倍)。尾部可以向自身弯曲贴近，没有显示鞭毛破损的锐利折角	● 锐角弯曲 ● 平滑发卡状弯曲 ● 卷曲 ● 短 (残缺的) ● 不规则宽度 ● 多尾 ● 以上缺陷的任何组合
胞质残留	胞质小滴 (不超过正常头部面积的 1/3) 为正常	● 当残留胞质超过头部面积的 1/3，才认为是异常

部 (和颈部) 和尾部 (中段和主段)。评估一个精子为形态正常时，头部、中段、主段和残留胞质都须是正常的。所有处于临界状态的形态都认为是异常的。

一般地，精子头部形状比确切的大小更为重要 (2.5.16 节)。值得注意的是，异常大的头部是不正常的：二倍体精子具有扁的头部侧面，而且头部面积是理想精子头部面积的 1.6 倍。通过学习辨识整个精子形态的细微变化 (正常 / 处于临界形态的精子头部和尾部；图 2.13、图 2.14 和图 2.15)，才能很好地评估正常精子形态。

精子发生缺陷和一些附睾病理改变常常与畸形精子百分率升高有关联。精子形态缺陷通常是多种缺陷的混合。取决于异常类型，并且可能 DNA 异常，异常精子一般有较低的受精潜能。精子形态缺陷与 DNA 碎片增加^[117]、染色体结构异常率增加^[118]、未成熟染色质^[119]和染色体非整倍性^[120,121]存在关联。因此，虽然精子尾部 (中段和主段) 对于理解男性生殖道也很重要，但更须重视精子头部形态。

残留胞质是人类精子生理功能的正常成分^[122]。残留胞质对渗透压敏感，并且在常规空气干燥过程不能很好地保留残留胞质^[109,123]。残留胞质在已染色涂片中不明显，它们看上去像是中段的小膨胀。用相差显微镜、微分干涉差显微镜和 X 线显微镜对精液、宫颈黏液及培养液中的活精子进行了观察，如果胞质小滴膨胀，其可以沿着中段长轴扩展^[108,124]。过量残留胞质与精子释放过程缺陷产生的异常精子有关。这种异常过量的胞质不应与多量的生

理性残留胞质相混淆,后者可以用显微镜在精液湿片中直接观察到,但在干燥、固定和染色的形态学涂片中则观察不到^[16]。

卷尾(超过 360°,图 2.10)可能提示了附睾功能障碍^[125]。

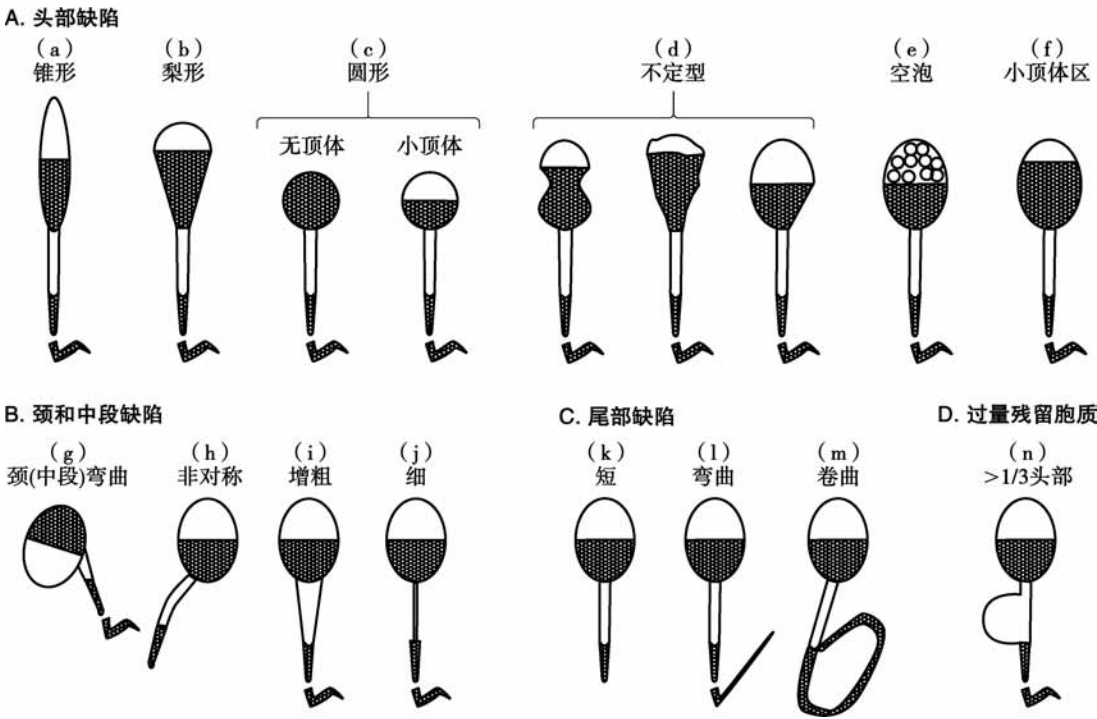


图 2.10 人类精子一些异常形态的示意图

异常精子形态学分类

需评估的类型或区域:

- 头(H%)。
- 颈和中段(NM%)。
- 尾(T%)。
- 过量残留胞质(C%)。

可以使用多键计数器,其中一个键用于正常(理想的,典型的)精子,一个键用于异常精子,另各有一个键记录 4 种异常类型(H,NM,T,C)中的一种类型。通过按住异常精子键的同时,按下在单个精子上观察到的其他异常类型,可使机械计数器能输入并记录多种异常类型。这样操作,每个精子只计数一次,并且一个精子的各种缺陷被单独记录。

- 通过评估 200 个精子,可以获得理想的和异常的精子百分率(这两数之和是 100%),以及每种异常类型的百分率,例如 H%、NM%、T% 和 C%(如果评估正确,后面这些数字之和应超过 100%)。
- 异常精子类型的百分率,可以由某种异常类型的精子总数除以所评估的精子总数获得。这些数据可用于计算畸形精子指数(TZI)(3.2 节)。

其他特定精子缺陷和其他细胞类型的描述

偶尔,很多精子会有一种特定的结构缺陷。例如,顶体可能没有发育,导致“圆头缺陷”

或“圆头精子症”。在精子释放阶段,如果基板未能与顶体对侧极的细胞核附着时,精子头被吸收,在精液中仅见到精子尾部(“大头针状头缺陷”)。由于大头针状头(游离的尾部)不含有染色质或基板前的头部结构,因此这类异常不计数为头部缺陷。精子均显示某一种类型缺陷的患者通常是不育的。虽然有这样的病例罕见,但鉴别缺陷并予以正确报告则是重要的。如果有很多大头针状头或游离的头,可以确定它们相对于精子的发生率(2.5.16节和2.5.17节)。

存在以下情况时,要报告并计算相对于所计数精子的发生率:

- 特定精子缺陷,例如游离的精子头部,大头针状头(游离尾部),缺乏顶体的头。
- 未成熟的生精细胞(图2.15和图2.16)。
- 非精子细胞(图2.15和图2.16)。

如果有很多这样的缺陷或非精子细胞,可以计算它们相对于精子的发生率。

用于评估人类精子形态的结构化顺序

在培训和常规分析时,每个精子按规定顺序评估是有益的^[126]。

精子形态的显微镜评估和结果计算

根据本部分推荐的精子形态评估范例,应该考虑评估所有精子功能区域。不需要区分出所有精子的头部大小、形状的变异或中段和主段的各种缺陷。即使实验室仅报告理想精子百分率,实验室分析人员仍须具备辨识精子所有异常形态的能力。有顺序地选择涂片的几个区域,对每个可评估的精子进行形态分析,以防止有偏差地选择特殊精子。

建议在总放大倍数400倍(亮视野)镜下观察涂片,以获得精子分布与外观、其他细胞和碎片等的总体印象。

使用100倍油镜和至少10倍目镜,在亮视野下对精子形态做仔细评估。用显微镜观察精子的最佳图像,需使用油镜(折射率,RI~1.5)。

1. 从一个显微视野移到另一个显微视野,评估每个视野中所有的精子。

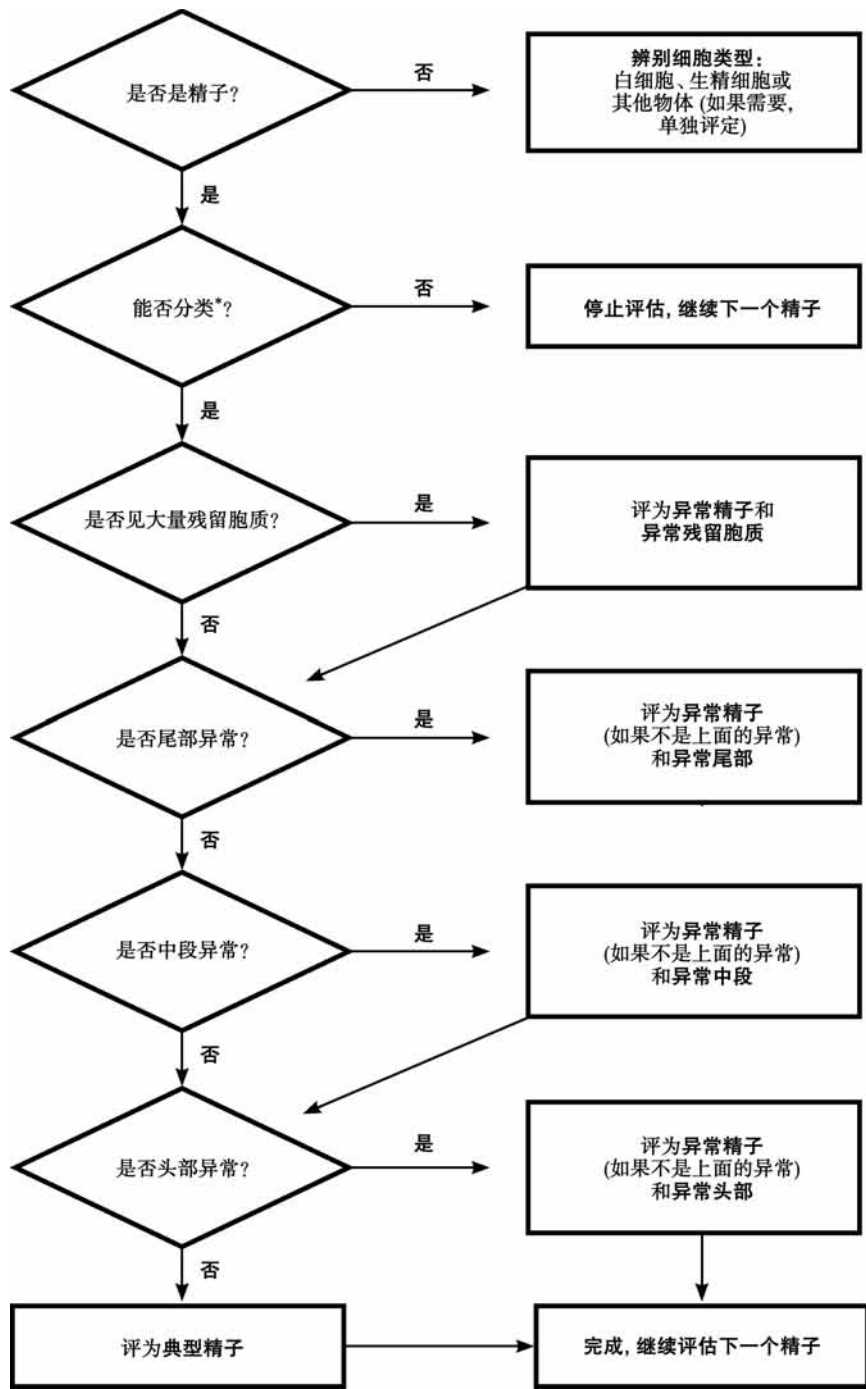
- 仅评估完整的精子(有头有尾的精子)。在计数精子中,不包括未成熟的细胞。如果有头无尾的精子超过20%,应该单独计算并在报告中予以注明。
- 有重叠精子或侧位精子的视野,则不评估。仅在所有视野都存在这样的问题时,才会对这些视野中的精子进行评估,然后在报告中予以补充评注。

2. 评估至少200个精子,以达到可接受的低取样误差。

3. 借助实验室计数器的记录,计数典型或正常精子的数目,以及4种异常类型精子的数目。

4. 计算:

- 典型精子百分率和4种异常类型精子百分率。
- TZI(精子所有异常类型的总数除以异常精子总数,故结果总是在1~4)。TZI表明每个异常精子最多有4种异常:头部、中段、主段和过量残留胞质,可以各有其中的1种异常。
- 5. 以最接近的整数报告典型精子百分率。TZI保留两位小数。



* 完成评估精子头部和尾部,这些精子是清晰可见且没有与其他细胞或物体重叠。

图 2.11 评估人类精子形态的结构化顺序

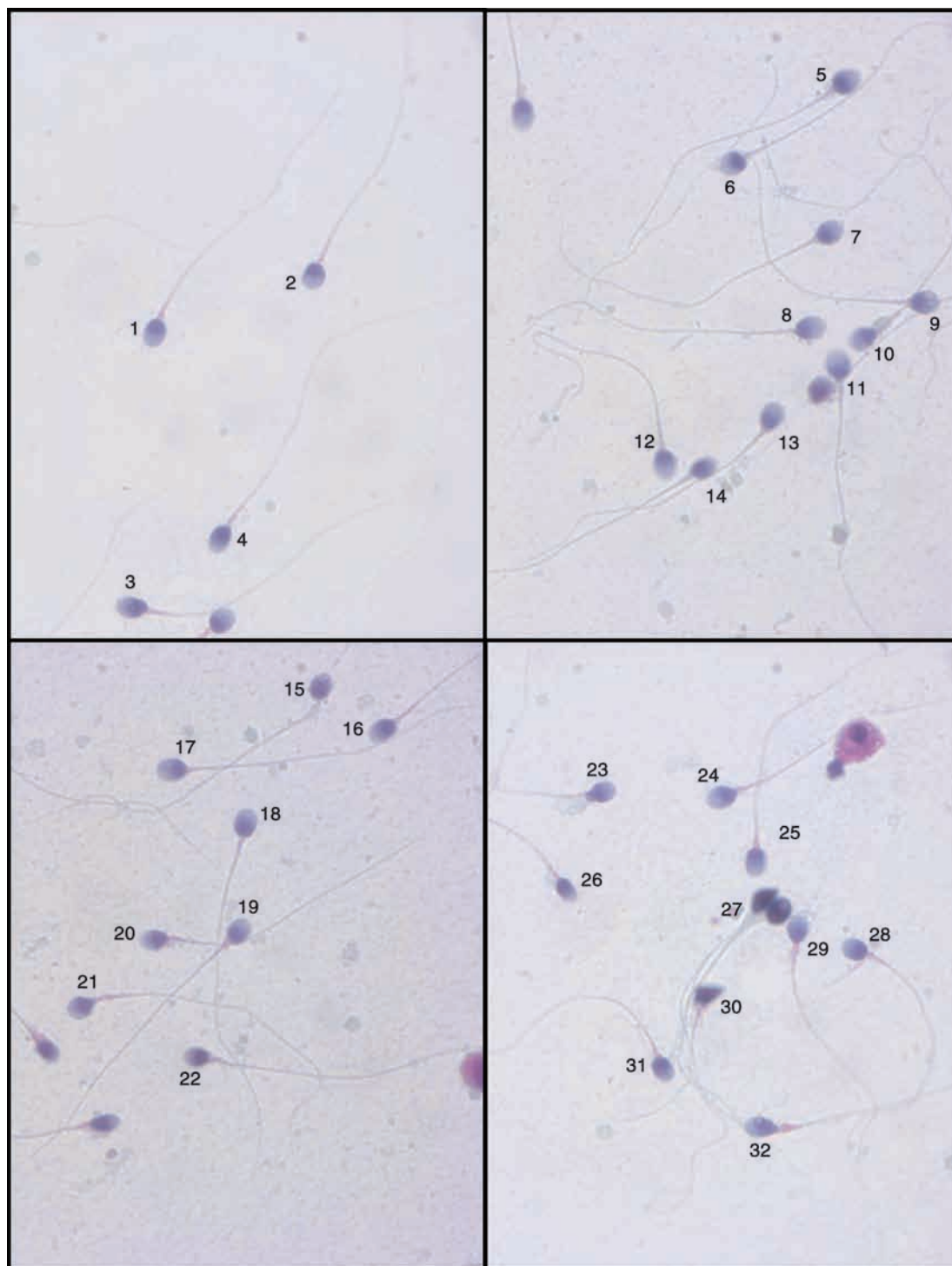


图 2.12 巴氏染色彩图 1

表 2.7 巴氏染色彩图 1 中的精子形态学评估

	头部形状	头部其他评注	中段评注	主段评注	整条精子分类
1	正常		正常	正常	正常
2	异常	不定形	正常	正常	异常
3	异常	不定形	粗	正常	异常
4	异常		正常	正常	异常
5	异常	非卵圆形	粗	正常	异常
6	异常	非卵圆形	正常	正常	异常
7	异常	顶体后区空泡	粗	正常	异常
8	正常		正常	正常	正常
9	异常	空泡	正常	正常	异常
10	异常	非卵圆形	粗	正常	异常
11	异常	非卵圆形	粗	正常	
12	正常		正常	正常	正常
13	异常		粗 / 弯曲	正常	异常
14	异常	小	正常	正常	异常
15	异常		粗	正常	异常
16	异常		正常	NA* ^①	异常
17	正常		正常	正常	正常
18	正常		正常	正常	正常
19	正常		粗	正常	异常
20	异常		粗	正常	异常
21	异常		粗	正常	异常
22	异常		粗	正常	异常
23	异常		粗	NA	异常
24	异常		粗	正常	异常
25	正常		粗	正常	异常
26	异常	锥形	粗	NA	异常
27	异常	非卵圆形	粗	正常	异常
28	正常		粗	正常	正常
29	异常		粗	正常	异常
30	异常	非卵圆形	粗	双	
31	异常		非对称插入	正常	异常
32	异常	非卵圆形 / 顶体后区空泡	正常	正常	异常

^① 译者注:NA 为不能用于评估。

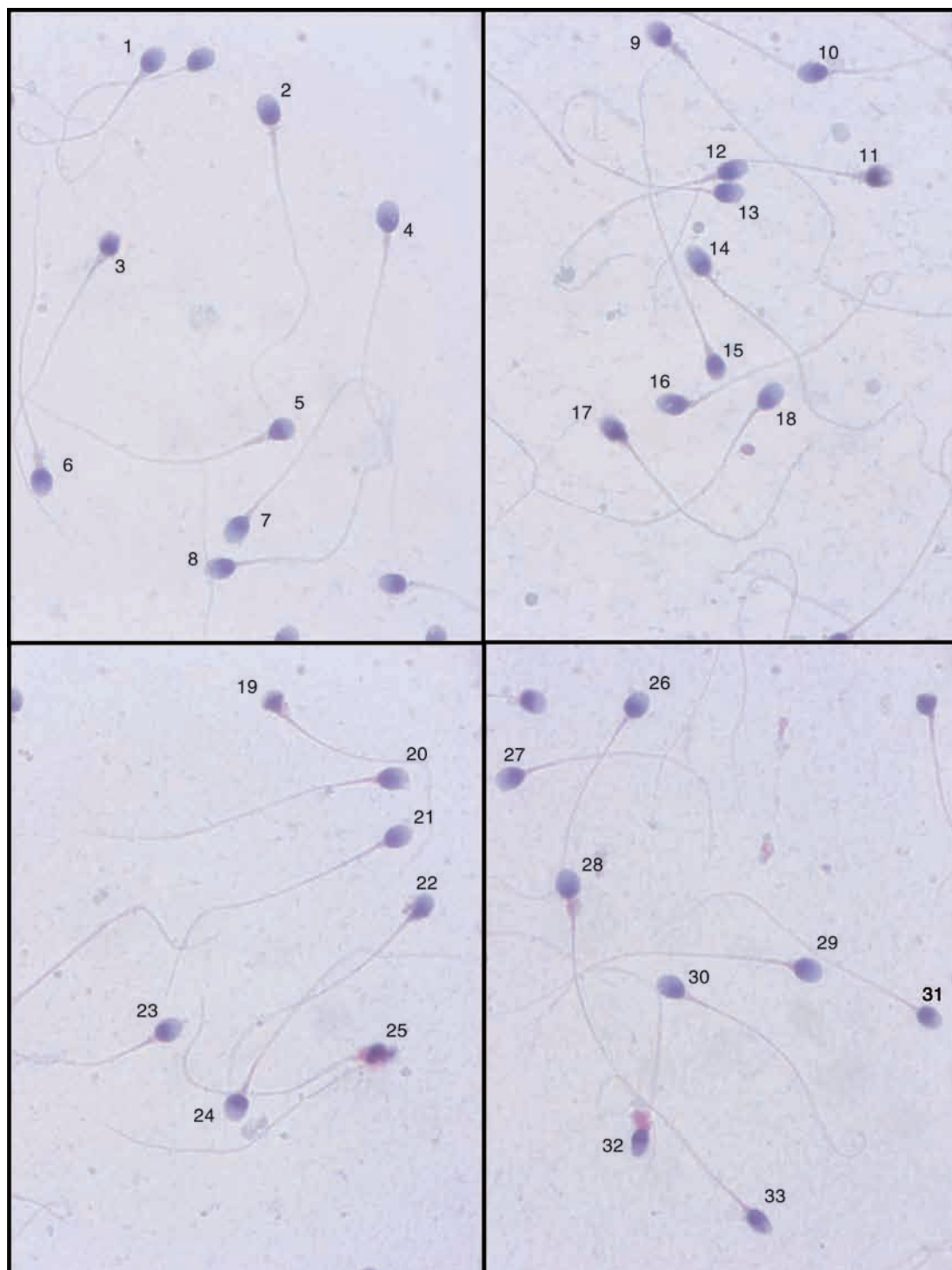


图 2.13 巴氏染色彩图 2

表 2.8 巴氏染色图 2 中的精子形态学评估

	头部形状	头部其他评注	中段评注	主段评注	整条精子分类
1	正常		粗	正常	异常
2	异常		正常	正常	异常
3	异常		粗	正常	异常
4	异常		粗	正常	异常
5	异常		粗	正常	异常
6	正常		粗	正常	异常
7	正常		正常	正常	正常
8	异常		正常	非对称	异常
9	异常		粗	正常	异常
10	异常		正常	NA	异常
11	异常		粗	正常	异常
12	异常		粗	非对称	异常
13	正常		正常	NA	异常
14	异常		正常	正常	异常
15	异常	小	粗 / 非对称插入	正常	异常
16	异常		粗	正常	异常
17	异常		粗	正常	异常
18	正常		正常	正常	正常
19	异常		粗	正常	异常
20	异常		正常	正常	异常
21	正常		正常	正常	正常
22	异常		正常	正常	异常
23	异常		粗	异常	异常
24	异常	过宽	粗	异常	异常
25	异常		粗	正常	异常
26	异常		正常	正常	异常
27	正常		正常	正常	正常
28	异常		粗	正常	异常
29	正常		正常	正常	正常
30	异常	小	正常	正常	
31	异常		正常	正常	异常
32	异常		粗	非对称	异常
33	异常	锥形	粗	正常	异常

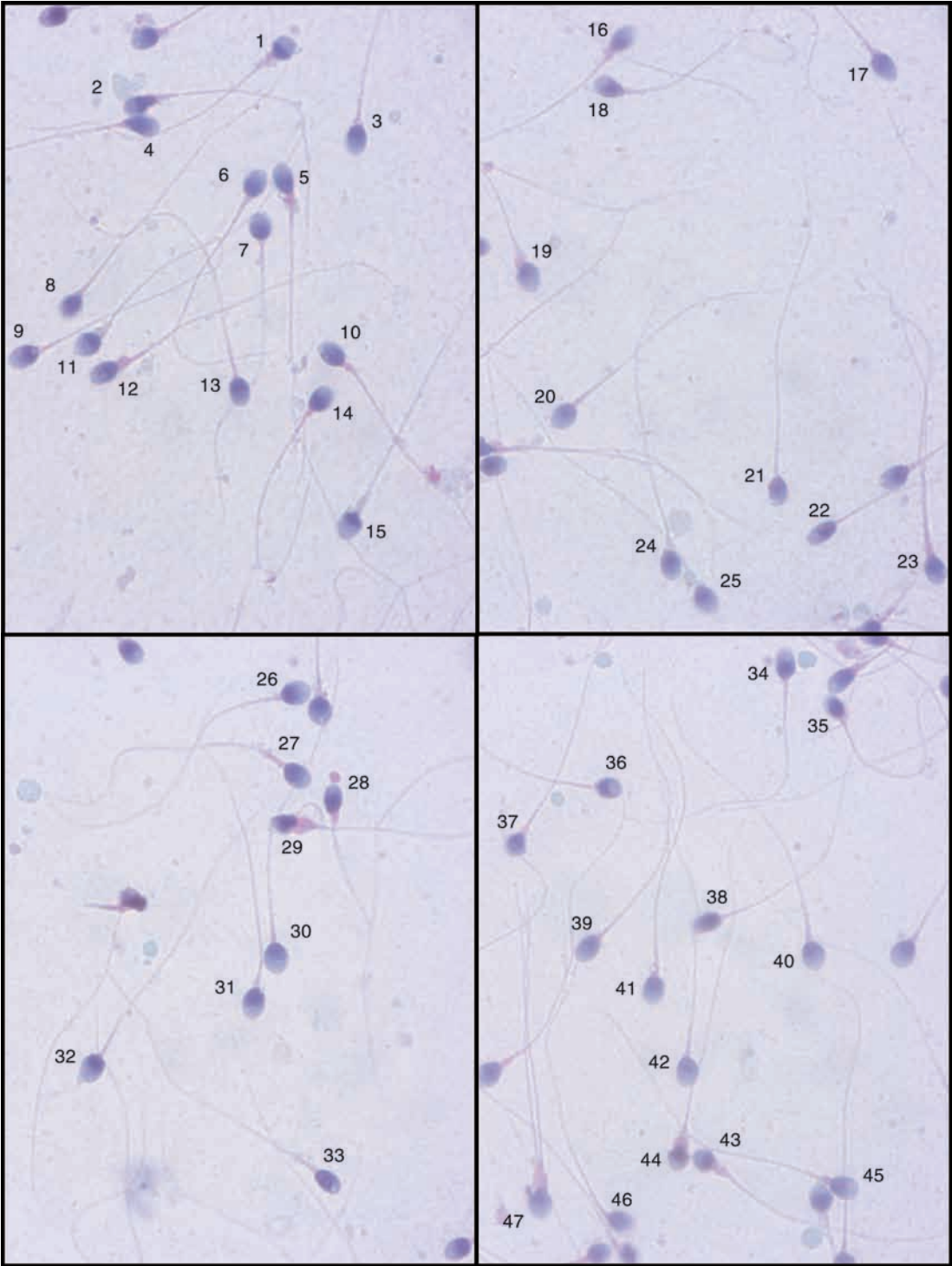


图 2.14 巴氏染色彩图 3

表 2.9 巴氏染色彩图 3 中的精子形态学评估

	头部形状	头部其他评注	中段评注	主段评注	整条精子分类
1	异常		粗	正常	异常
2	异常		粗	弯曲	异常
3	异常		粗 / 非对称插入	NA	异常
4	异常		粗	NA	异常
5	异常		粗	正常	异常
6	正常		正常	正常	正常
7	正常		正常	正常	正常
8	异常	小	正常	正常	异常
9	异常	顶体后区空泡	粗	正常	异常
10	异常		粗	正常	异常
11	异常		粗	正常	异常
12	正常		正常	正常	正常
13	异常		粗	正常	异常
14	正常		粗	正常	异常
15	异常		粗	正常	异常
16	异常		粗	正常	异常
17	异常		正常	正常	异常
18	异常		正常	NA	异常
19	异常		粗	NA	异常
20	正常		正常	正常	正常
21	异常		正常	正常	异常
22	异常	锥形	正常	正常	异常
23	异常		粗	双	异常
24	异常	小	粗	正常	异常
25	异常		粗	正常	异常
26	正常		正常	正常	正常
27	正常		粗	正常	异常
28	异常		粗	弯曲	异常
29	异常	小	粗	正常	异常
30	正常		正常	正常	正常

续表

	头部形状	头部其他评注	中段评注	主段评注	整条精子分类
31	异常		正常	正常	异常
32	正常		正常	正常	正常
33	异常	锥形	正常	正常	异常
34	异常		正常	正常	异常
35	异常	小	粗	正常	异常
36	异常	小	正常	正常	异常
37	异常	小	正常	正常	异常
38	异常		正常	正常	异常
39	异常	锥形	正常	正常	异常
40	正常		正常	正常	正常
41	异常		粗	正常	异常
42	异常		非对称插入	正常	异常
43	异常		粗	正常	异常
44	异常		粗	正常	异常
45	异常		粗	正常	异常
46	异常		正常	正常	异常
47	异常		粗	双	异常

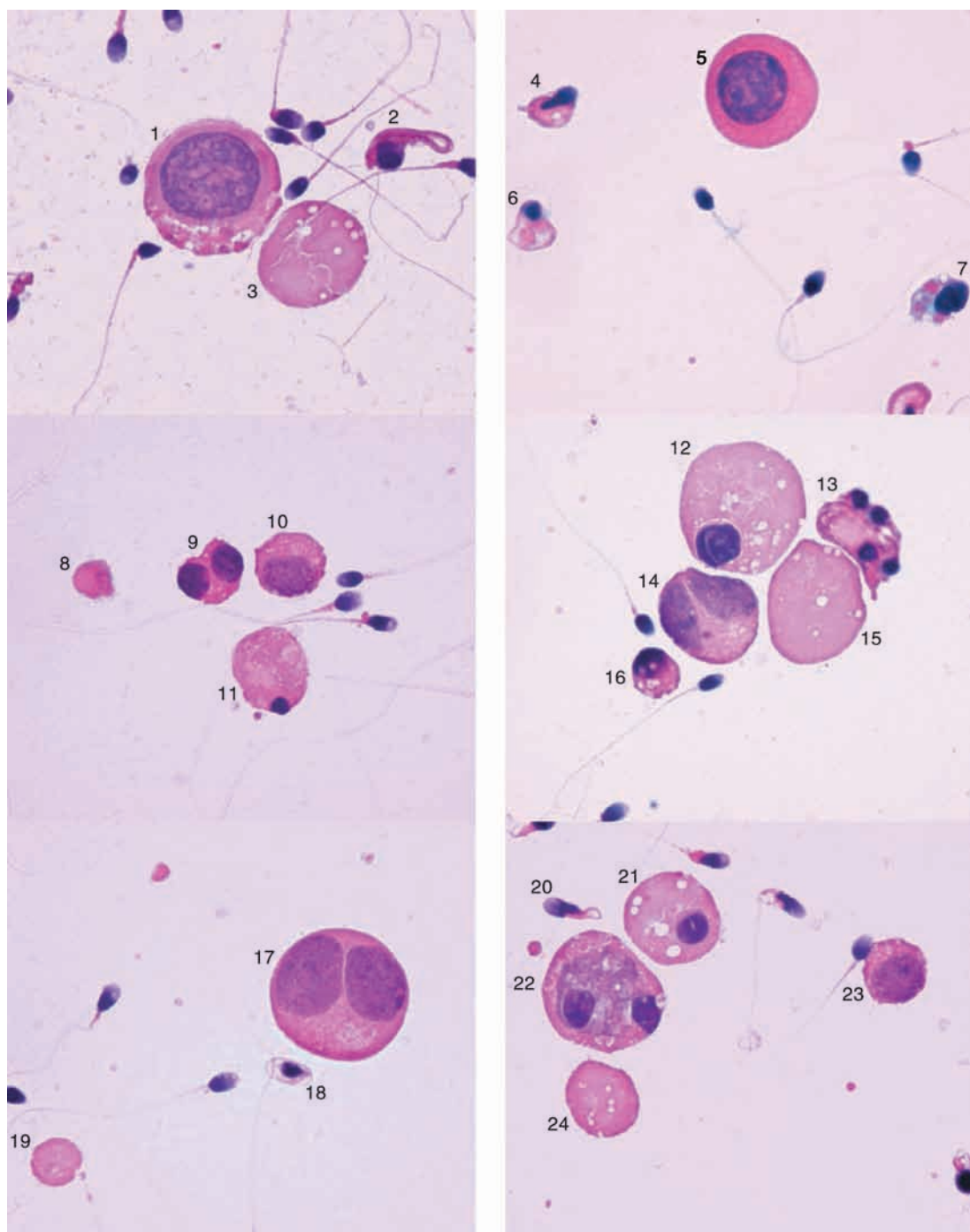


图 2.15 巴氏染色彩图 4

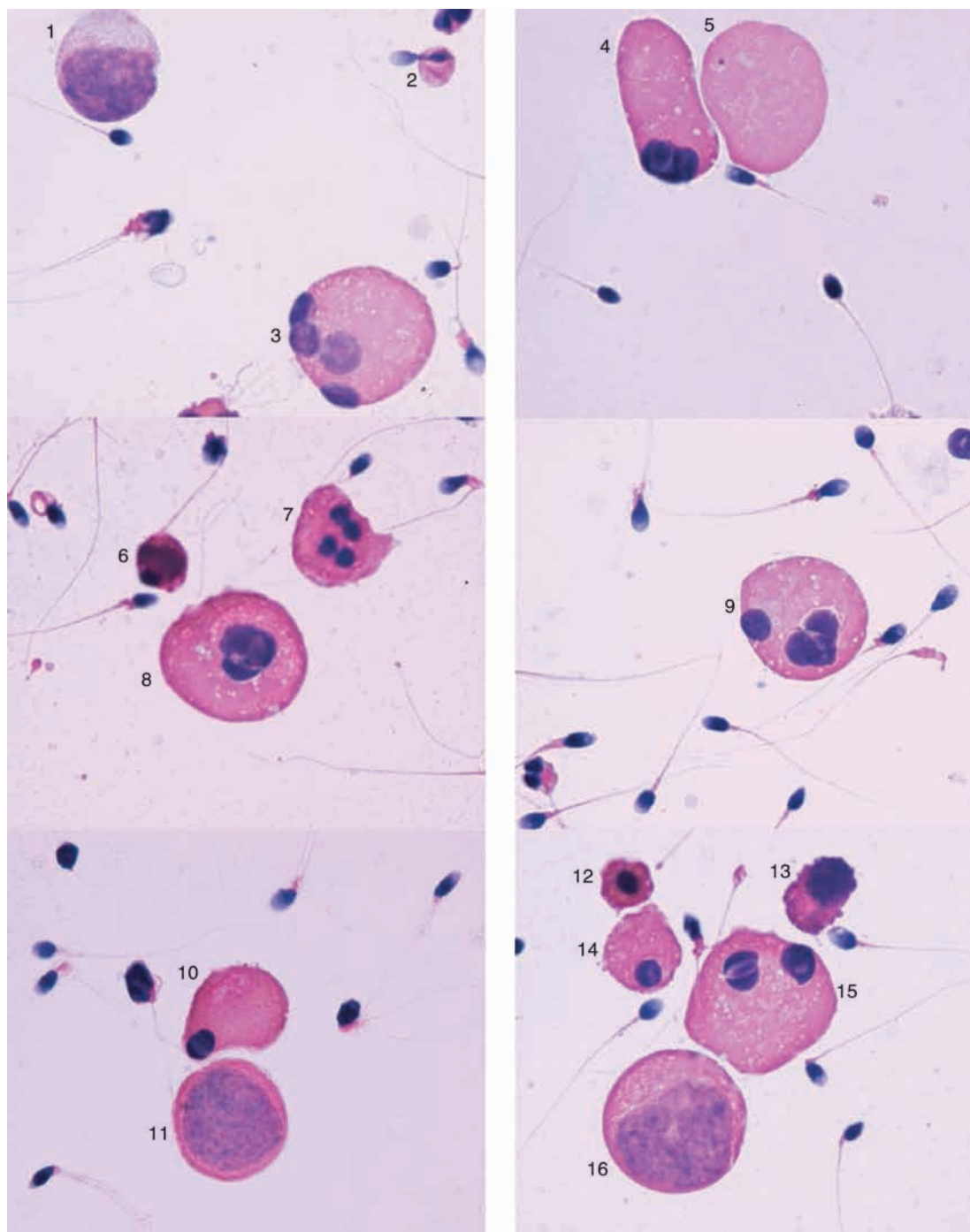


图 2.16 巴氏染色彩图 5

表 2.10 巴氏染色彩图 4 中的细胞学评估

细胞	细胞类型	细胞	细胞类型	细胞	细胞类型
1	巨噬细胞	9	分裂中的精子细胞	17	分裂中的精母细胞
2	异常精子	10	精母细胞	18	异常精子
3	细胞质	11	退化的精子细胞	19	细胞质
4	异常精子	12	精子细胞	20	异常精子
5	精母细胞	13	退化的精子细胞	21	精子细胞
6	异常精子	14	分裂中的精母细胞	22	正在吞噬的巨噬细胞
7	异常精子？在胞质中有松散的精子头？	15	细胞质	23	精母细胞
8	细胞质	16	退化的精子细胞	24	细胞质

表 2.11 巴氏染色彩图 5 中的细胞学评估

细胞	细胞类型	细胞	细胞类型	细胞	细胞类型
1	巨噬细胞	7	退化的精子细胞	13	退化的精子细胞
2	异常精子	8	退化的精子细胞	14	退化的精子细胞
3	(分裂中的)精子细胞	9	退化的精子细胞	15	退化的精子细胞
4	(分裂中的)精子细胞	10	退化的精子细胞	16	巨噬细胞
5	细胞质	11	巨噬细胞		
6	未分类	12	退化的精子细胞		

2.5 补充资料与评注

2.5.1 检测精液体积的背景

- 使用移液管测量精液体积总会丢失 0.3~0.9mL 精液^[50,51,127]。容量移液管内也会有看不见的气泡,导致可能高估精液体积。移液管本身亦损耗一定的精液体积,这不利于低精液体积样本做其他检测项目。
- 低精液体积是射精管阻塞或先天性双侧输精管缺如 (congenital bilateral absence of the vas deferens ,CBAVD)^[128-131] 的特征,在这种情况下,精囊腺也发育不良。
- 低精液体积也可能是采集问题 (丢失了一部分精液)、不完全逆行射精或雄激素缺乏所致。
- 高精液体积可能反映附性腺活动性炎症情况下的活跃分泌。

偶然地,有的精液可能不液化,这使得精液评估变得困难。在这种情况下,需要另行处理,机械混匀或酶消化可能是必要的。

2.5.2 液化问题

- 有时候精液可能不液化,难以进行诊断性精液检查。在这种情况下,机械混匀或酶消化等额外处理可促进精液液化,以便进一步评估样本,但这些处理会影响精浆生化、精子

活力和精子形态,需予以记录。计算精子浓度时,需用培养液稀释精液。应使用正向置换式移液器吸取精液,以尽可能吸取最准确的样本体积。

- 向一些样本加入等体积的生理培养液或 Dulbecco 磷酸盐缓冲液(见 8.4.5 节)后,用加样器反复吹吸,可促使样本液化。但是,添加的培养液会改变精子活力和精子浓度,以及精浆生化标志物。
- 精液反复(6~10 次)缓慢地通过接在注射器上的 18 号钝性针头(内径 0.84mm)或 19 号针头(内径 0.69mm),可降低精液的非均匀状态。但是,由于剪切力可能损伤精子,从而对 DNA 完整性产生副作用^[132],故本项处理不予推荐。
- 应用菠萝蛋白酶如广谱蛋白水解酶(EC 3.4.22.32)消化,有助于促精液液化。但是,这样处理会改变样本的精浆生化标志物和精子活力。

用 Dulbecco 磷酸缓冲液制备 10IU/mL 的菠萝蛋白酶液(见 8.4.5 节)。菠萝蛋白酶很难溶解,但通过搅拌大部分酶会在 15~20min 内溶解。用 10IU/mL 的菠萝蛋白酶液与精液以 1+1(1:2)稀释倍数进行混合,用移液器吸头的尖部搅拌,置 37℃ 孵育 10min。在进一步分析之前充分混匀精液。

2.5.3 黏稠度可选测量方法

- 将一玻璃棒插入样本,提起玻璃棒,观察形成的拉丝长度,这样可以评估样本黏稠度。
- 与不完全液化样本相比,高黏稠精液样本呈现均匀黏性,并且样本的黏稠度不随时间而变化。高黏稠度会妨碍精子活力、精子浓度、精子表面抗体和生化标志物的正确检测。降低精液黏稠度的方法与精液不液化的处理方法相同(2.5.2 节),但该处理影响了精液的多个特征。即使处理可以改善样本黏稠度,但影响了精液检查的结果。

2.5.4 精液 pH

- 如果精液中没有精子,并且精液 $\text{pH} < 7.0$,则可能存在先天性双侧输精管缺如^[129-131,133]。由于精囊腺与输精管有共同胚胎起源,精囊腺也可能缺失或发育不良。
- 对于黏稠的精液样本,使用为测量黏稠液体而设计的 pH 计来测量少量精液样本的 pH ^[134]。

2.5.5 精液样本的混匀

- 可将样本吸入大口径(直径约 1.5mm)的一次性塑料吸管中(必要时无菌),吹吸 10 次,混匀精液样本。须小心操作,不能产生气泡。不要用涡旋振荡器混匀样本,这样混匀会损伤精子。

2.5.6 制备湿片的原则

- 精液体积和盖玻片规格(尺寸和重量)须作调整,以制备出固定深度约 20 μm 的湿片。这样的深度可以让精子自由泳动^[135,136]。由于显微镜的焦距深度不能包括整个湿片深度,因此,湿片深度太大使得精子游进和游出焦点时显现及消失,可能难以观察精子。
- 湿片深度($D, \mu\text{m}$)为样本体积($V, \mu\text{L} = \text{mm}^3$)除以样本扩散面积(A, mm^2): $D = V/A$ 。因此,取 10 μL 体积的精液置于一张洁净的玻璃载玻片上,覆盖 22mm $\times$ 22mm 盖玻片(面积为 484 mm^2),形成一个深度为 20.7 μm 的池。

2.5.6.1 检查湿片未观察到精子数目的概率

如果在 1 张或 2 张湿片中未观察到精子,精液中仍有精子的可能性低,部分原因取决于精液总体积。通过计算 Poisson 分布置信区间的值^[137],可以估计出未观察到的精子数目的概率。这意味着如果在湿片中没有找到精子,预期在整份精液样本找到的精子数目,少于表 2.12 显示的精子数目的概率分别为 95% 和 99.5%。表 2.12 显示了不同精液样本体积与检查 1 张或 2 张 10 μ L 湿片的结果。

表 2.12 检查湿片未观察到精子数目的概率

精液体积 /mL	未观察到的精子数目 (95% 置信区间)		未观察到的精子数目 (99.5% 置信区间)	
	10 μ L	20 μ L	10 μ L	20 μ L
1	300	150	530	265
2	600	300	1 060	530
4	1 200	600	2 120	1 060
8	2 400	1 200	4 240	2 120

2.5.6.2 离心后未观察到精子数目的概率

如果用离心后沉淀团制备的 1 张或 2 张湿片中未观察到精子,精液中仍有精子的可能性低,部分原因取决于精液总体积。通过计算 Poisson 分布置信区间的值^[137],可以估计出未观察到精子数目的概率。这意味着如果在湿片中没有找到精子,预期在整份精液样本找到的精子数目,少于表 2.13 显示的精子数目的概率分别为 95% 和 99.5%。表 2.13 显示了不同精液样本体积与检查 1 张或 2 张 10 μ L 湿片的结果。在表 2.13,通过计算离心后的精子浓度可用精子数 /mL 或精子数 / (50 μ L $\times$ 20) 表示。

表 2.13 离心后未观察到精子数目的概率

精液体积 /mL	未观察到的精子数目 (95% 置信区间)		未观察到的精子数目 (99.5% 置信区间)	
	10 μ L	20 μ L	10 μ L	20 μ L
1	15	8	27	14
2	30	15	53	27
4	60	30	106	53
8	120	60	212	106

2.5.7 精子凝集

- 存在精子凝集不能充分推断免疫学原因导致不育,但提示可能存在抗精子抗体;需要作进一步的检测 (3.7 节)。
- 严重的精子凝集会影响评估精子活力和浓度。

2.5.8 精子计数板

- 精子很容易黏附在玻璃表面。因此,必须彻底清洁计数板。

- 用水和清洁剂清洗血细胞计数板和盖玻片。
- 轻擦网格表面, 除去先前样本的任何残留精子。
- 清洗后用纸巾充分吸干水分, 因为任何干燥的残留物都可能妨碍加样。
- 根据现有的健康与安全法规, 应将可再次使用的计数板和盖玻片浸泡在消毒剂中过夜, 以消除潜在感染原污染的风险(8.2.5 节)。
- 测定精子浓度可使用一次性计数板^[86,138-141], 但这类一次性计数板得出的结果可能与改良 Neubauer 计数板的结果不同。
- 计数板的浅池(一般为 20 μm)是借助毛细作用填充液体, 而液体流动效应可能使精子分布不均匀^[142,143]。这个问题可以纠正^[143], 但不建议处理^[144]。

2.5.9 高倍视野(HPF)的面积与体积

每个显微视野的精液体积, 取决于视野面积(πr^2 , 其中 π 约为 3.142, r 为显微视野半径)和湿片深度(例如, 制备的湿片深度为 20.7 μm)。显微视野的直径可以用镜台测微尺测量, 或用目镜孔径的直径除以物镜放大倍数进行估算。

显微镜物镜是 40 倍, 10 倍目镜的孔径为 20mm, 则显微视野直径约为 500 μm (20mm/40)。在这种情况下, $r=250\mu\text{m}$, $r^2=62\,500\mu\text{m}^2$, $\pi r^2=196\,375\mu\text{m}^2$, 体积约为 4 064 962 μm^3 , 或约为 4nL。

显微镜物镜是 20 倍, 10 倍目镜的孔径为 20mm, 则显微视野直径约为 1 000 μm (20mm/20)。在这种情况下, $r=250\mu\text{m}$, $r^2=250\,000\mu\text{m}^2$, $\pi r^2=785\,500\mu\text{m}^2$, 体积约为 16 259 850 μm^3 , 或约为 16nL。

2.5.10 精液采集容器的毒性试验

选择至少 5 份精子浓度高和活力好的精液样本。射出精液必须收集在已知安全的容器内(对照组), 然后将每份精液样本的一半转到待检测的容器内(试验组)。立即检测精子活力(2.4.6 节), 4h 后再次检测精子活力。4h 是精液在容器内可能暴露时间的 2 倍, 故建议这个时间间隔。应使用原始精液样本, 因其是暴露于待测容器的液体。如果在每个时间点, 对照组与试验组之间的精子活力评估没有差异(配对 t -检验, $P > 0.05$), 则可认为所检测的容器对精子是无毒性的, 符合采集精液的要求。诊断性精液分析使用的其他耗材, 如移液器吸头, 应设计恰当的暴露时间, 检测耗材的毒性效应。

2.5.11 用于辅助生殖和冷冻保存精液的无菌采集

依照用于诊断目的的采集方法来采集精液, 但是样本容器、移液器吸头和混匀用的吸液管必须是无菌的。虽然相关法规可能有不同要求, 但大多规定精子制备程序要减少微生物和其他微粒污染的风险。通常要求有洁净的空间(空气层流过滤装置)和受控的空气质量。

2.5.12 用于微生物分析精液的无菌采集

已充分认识到, 难以从精液的微生物培养中获取有用信息。在这种情况下, 减少非精液来源的微生物污染(例如, 来自皮肤的共栖微生物)尤为重要。样本容器、移液器吸头和混匀用的吸液管必须是无菌的。理想情况下, 做精液任何其他评估前, 取少量精液进行微生物检测。精液样本采集与微生物实验室开始检测之间的时间不应超过 3h。

受检者应该:

- 排尿;
- 用肥皂清洗双手和阴茎, 以减少样本被皮肤共栖微生物污染的风险;

- 冲洗掉肥皂沫；
- 用一次性新毛巾擦干双手和阴茎；
- 精液射入无菌容器。

2.5.13 存活率试验可选方法

2.5.13.1 单用伊红的精子存活率试验

这种方法简单和快速,但制备的湿片不能保存用于质量控制用途,并且需使用负相差显微镜观察出可靠结果。负相差显微镜不常使用,更常见的正相差显微镜难以辨别出淡粉色精子头。

试剂准备

1. 0.9%(w/v)NaCl 溶液:将 0.9g NaCl 溶解在 100mL 纯化水中。
2. 0.5%(w/v)伊红 Y 溶液:将 0.5g 伊红 Y(颜色指数 45 380)溶解在 100mL 0.9% NaCl 中。
- 如果商品化伊红溶液是低渗水溶液,会导致一些精子死亡,从而得出假阳性结果^[75]。如果使用这样的溶液,配制为 170mmol/L 的盐溶液,使测试液的渗透压与精液的渗透压相近^[17]。

步骤

1. 充分混匀精液样本。
2. 取 5 μ L 精液样本和 5 μ L 伊红溶液置于载玻片上,用移液器吸头混合、搅拌玻片上的样本。
3. 覆盖 22mm $\times$ 22mm 盖玻片,静置 30s。
4. 用负相差显微镜,在 200 倍或 400 倍镜下检查玻片。
5. 借助实验室计数器,计数染色精子(死精子)和未染色精子(活精子)的数目。
6. 评估 200 个精子,以达到可接受的低取样误差。
7. 计算活精子百分率。
8. 以最接近的整数报告活精子百分率。

评定

- 活精子头呈白色,死精子头呈红色和暗粉色。
- 如果染色仅限于颈部区域,精子头未被染色,这种情况考虑为“颈部膜渗漏”,这不是精子死亡和整个细胞膜破裂的征象信号。这些精子应被评估为活精子。

2.5.13.2 低渗膨胀存活率试验

作为染料拒染法的替代试验,低渗膨胀试验可以用来评估精子存活率^[145]。当必须避免精子染色的时候,如选择精子进行卵胞质内精子注射(ICSI)时,这种方法是有益的。低渗膨胀试验假设,仅具有完整膜的精子(活精子)会在低渗溶液中膨胀。膜完整的精子在低渗溶液中 5min 内发生膨胀,所有尾部的形状在 30min 内是稳定的^[146]。

- 用于常规诊断,精子孵育 30min。
- 当精子的低渗处理用于治疗用途时,精子孵育 5min。

试剂制备

1. 用于诊断目的的膨胀溶液:将 0.735g 二水柠檬酸钠和 1.351g D-果糖溶解在 100mL 纯水中。
- 将溶液以 1mL 分装,冻存于 -20℃。
2. 拟用于医学辅助生殖的精子(MAR):用适量无菌纯水以 1+1(1:2) 稀释倍数与培养

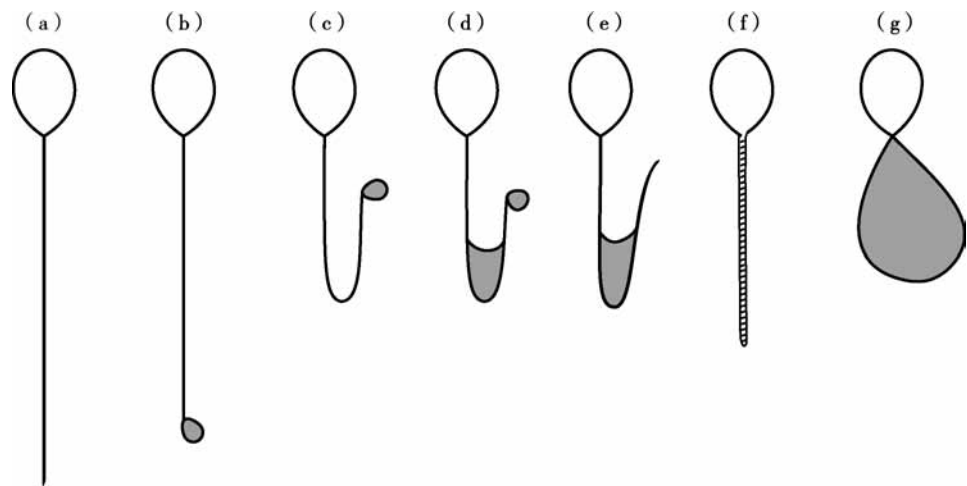
液进行稀释。

步骤

1. 解冻冻存的膨胀液,使用前充分混匀。
2. 取 1mL 膨胀液或 1mL 以 1+1 (1 : 2) 稀释倍数稀释的培养液,置入 1 支加盖的微量离心管中,37℃温热 5min。
3. 充分混匀精液样本。
4. 取 100μL 精液,加入膨胀液中。用移液管轻轻地吸进和排出,混匀样本。
5. 在 37℃孵育精确 5min 或 30min(如上所述),然后取 10μL 样本加到洁净载玻片上,覆盖 22mm × 22mm 盖玻片。
6. 重新混匀精液样本,取出 1 份重复样本与膨胀液混合,如上所述,制备 1 张重复玻片。
7. 用相差显微镜,在 200 倍或 400 倍视野下,检查每张玻片。
8. 借助实验室计数器,计数没有膨胀(死的)和膨胀(活的)精子数目。
9. 每份重复样本评估 200 个精子,以达到可接受的低取样误差。

评定

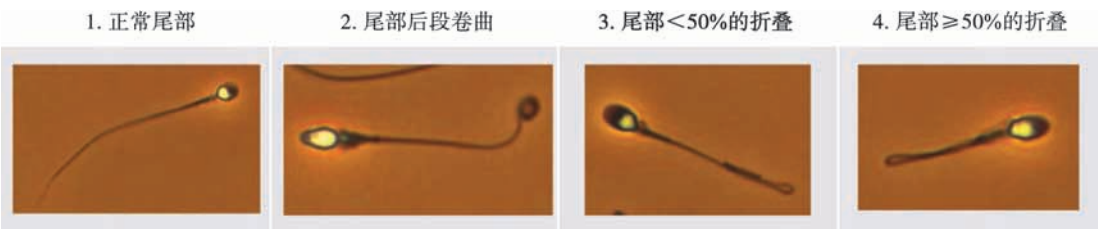
1. 发生膨胀的精子通过精子形状的改变来辨别,如显示精子尾部卷曲(图 2.17)。
2. 通过精子尾部卷曲来辨别活精子;评定所有尾部膨胀类型的精子为活精子。



Reproduced from Jeyendran et al. (1984), with permission.

图 2.17 人精子在低渗透压作用下的特征性形态变化示意图

(a)=未发生改变;(b)~(g)=尾部变化的不同类型。灰色区域表示尾部膨胀



Courtesy of E. Holmes^[147].

图 2.18 人精子受低渗透压作用后的相差显微镜照片

2.5.14 精子形态学染色的备选方法

2.5.14.1 Shorr 染色程序

Shorr 染色可以得到与巴氏染色相近的正常形态精子百分率。然而,至今尚无应用 WHO 手册推荐的严格形态学标准对 Shorr 染色法做过验证和评估^[148]。而且,进行的比较研究也没有得出 Shorr 染色结果与巴氏染色结果是否相同的结论。

试剂

- 1. Harris 苏木精(8.4.11.3 节):与巴氏染色的相同。
- 2. Shorr 溶液:购买商售品,或者按以下步骤配制。将 4g Shorr 粉剂溶解于 220mL 50%(v/v) 的温热乙醇中,冷却后,加入 2.0mL 冰醋酸(在通风橱中操作),并过滤。
- 3. 酸性乙醇:加 25mL 冰醋酸到 75mL 95%(v/v)乙醇中。
- 4. 乙醇胺:加 5mL 25% 氢氧化铵到 95mL 75%(v/v)乙醇中。

已空气干燥精液涂片的固定

将涂片浸入酸性乙醇或 75%(v/v)乙醇中 1h。

已固定精液涂片的染色

按步骤浸入以下溶液中:

- 1. 流动自来水浸 12~15 次^①
- 2. 苏木精 1~2min
- 3. 流动自来水浸 12~15 次
- 4. 乙醇胺浸 10 次
- 5. 流动自来水浸 12~15 次
- 6. 50% 乙醇(v/v) 5min
- 7. Shorr 溶液 3~5min
- 8. 50% 乙醇(v/v) 5min
- 9. 75% 乙醇(v/v) 5min
- 10. 95% 乙醇(v/v) 5min

已染色精液涂片的封片

封片或不封片的已染色精液涂片均可观察精子形态。不过,涂片封片后可用于培训、内部质控及实验室内比较。此外,对染色涂片做了封片,没有污染显微镜物镜的风险。

2.5.14.2 快速染色程序

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。有几种不同的染色方法,尽管有相似的评估结果^[149],但研究指出由于不同染色效果对所检测的异常存在差异,每种方法需要有单独的参考限^[150,151]。一些用快速染色法染的涂片有很深背景,染色质量可能会比巴氏染色的差。更重要的是,经过固定和快速染色后的精子头部尺寸,与巴氏染色后的比较存在差异^[152]。

^① 浸一次相当于大约 1s。

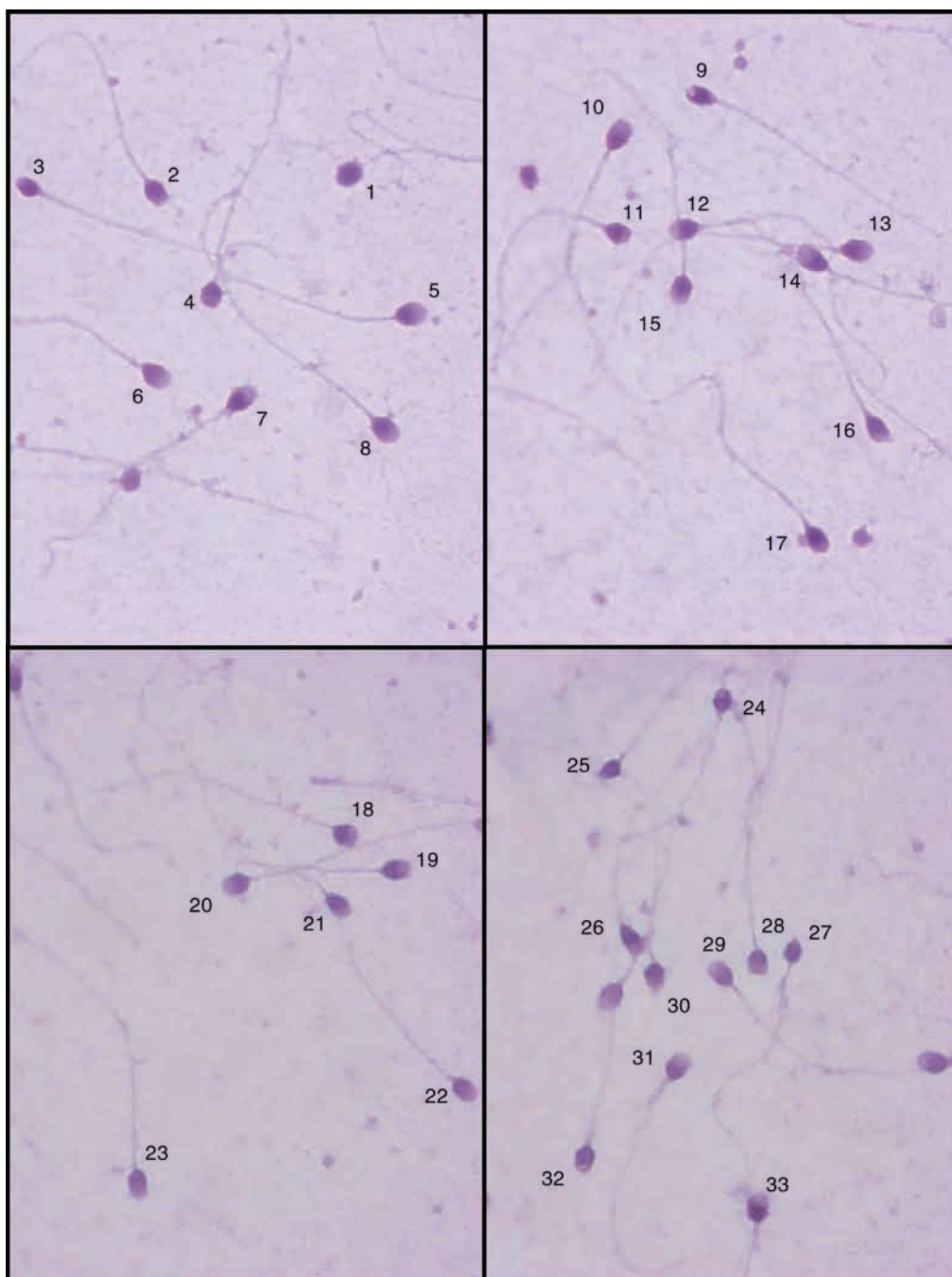


图 2.19 Shorr 染色彩图

表 2.14 Shorr 染色彩图中的精子形态学评估

	头部形状	头部其他评注	中段评注	主段评注	整个精子分类
1	异常	无顶体区	正常	正常	异常
2	异常		正常	正常	异常
3	异常		正常	正常	异常
4	异常		正常	正常	异常
5	正常		正常	正常	正常
6	异常		正常	正常	异常
7	异常		异常	正常	异常
8	异常		正常	正常	异常
9	异常	过长	正常	正常	异常
10	异常		正常	正常	异常
11	异常		正常	正常	异常
12	正常		正常	正常	正常
13	异常		异常	正常	异常
14	异常		正常	正常	异常
15	异常		正常	正常	异常
16	异常		正常	正常	异常
17	异常		正常	正常	异常
18	异常		异常	正常	异常
19	异常		正常	正常	异常
20	正常		正常	正常	正常
21	异常		正常	正常	异常
22	异常		正常	正常	异常
23	异常		正常	正常	异常
24	异常		异常	正常	异常
25	异常		正常	正常	异常
26	异常		正常	正常	异常
27	异常		正常	正常	异常
28	异常		正常	正常	异常
29	正常		正常	正常	正常
30	异常		异常	正常	异常
31	异常		异常	正常	异常
32	异常		异常	正常	异常
33	异常		异常	NA	异常

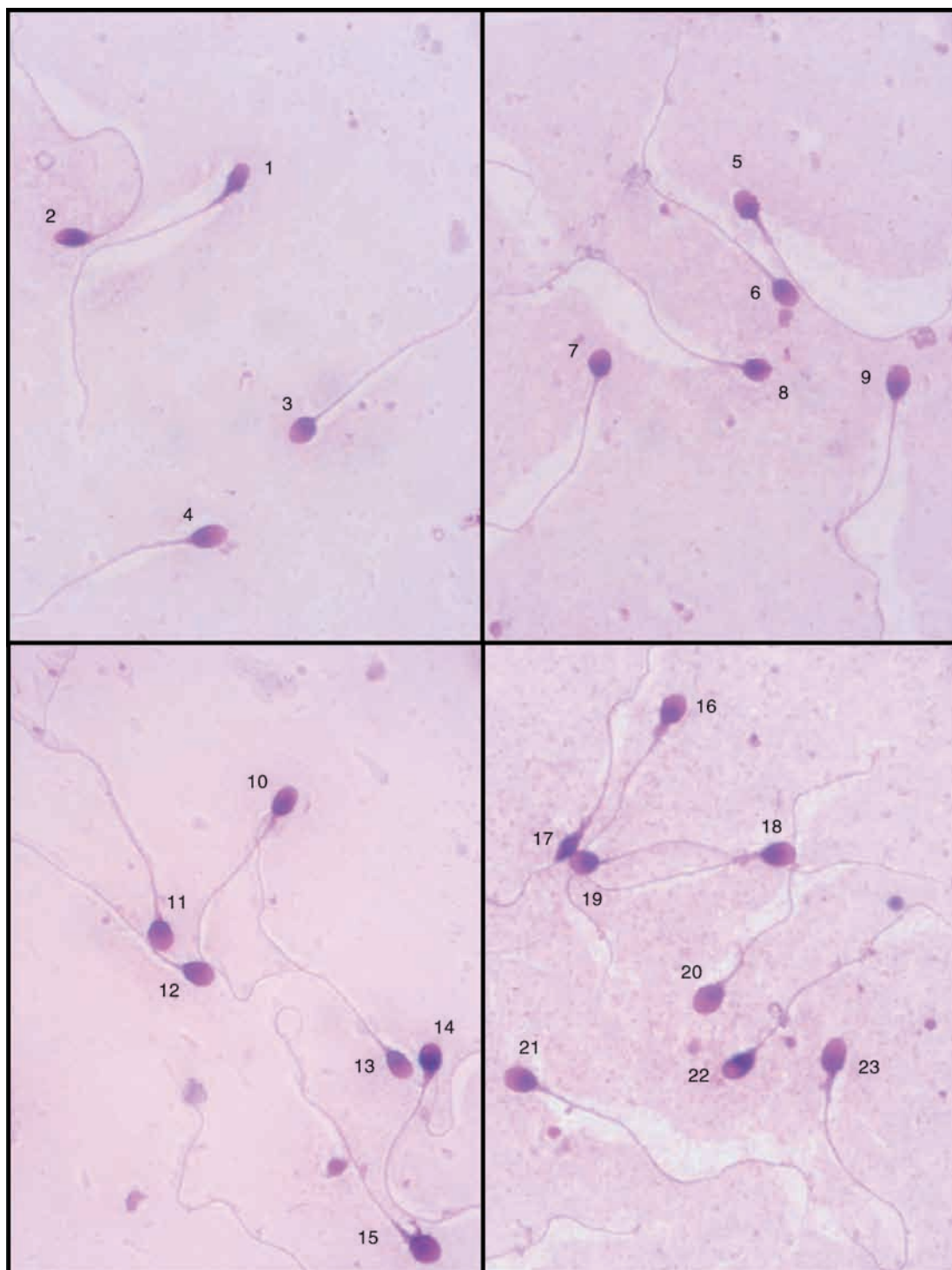


图 2.20 DiffQuik 染色彩图

表 2.15 DiffQuik 染色彩图中的精子形态学评估

	头部形状	头部其他评注	中段评注	主段评注	总体精子分类
1	异常		正常	正常	异常
2	异常		粗	正常	异常
3	正常		正常	正常	正常
4	异常	非卵圆形	正常	正常	异常
5	异常	不定形	粗	正常	异常
6	正常		正常	正常	正常
7	异常	非卵形	正常	正常	异常
8	异常		正常	正常	异常
9	正常		正常	正常	正常
10	异常	非卵形	粗	正常	异常
11	正常		正常	正常	正常
12	正常		正常	正常	正常
13	异常	锥形	正常	正常	异常
14	异常	小	粗	正常	异常
15	正常		粗	正常	异常
16	异常	不定形	粗	正常	异常
17	异常	锥形	粗	正常	异常
18	正常		非对称	正常	异常
19	异常	非卵形	粗	正常	异常
20	正常		正常	正常	正常
21	正常		正常	正常	正常
22	异常		正常	正常	异常
23	异常	非卵形	非对称	正常	异常

试剂

- DiffQuik 快速染色试剂盒
- 固定液:95%(v/v) 甲醇或 1.8mg 三芳基甲烷(triaryl methane)溶解于 1 000mL 95%(v/v) 甲醇。

已空气干燥精液涂片的固定

将涂片浸入三芳基甲烷(triaryl methane)固定液 15s,或者浸入 95% 甲醇溶液 1h。将涂片垂直竖立在吸水纸上,以除去多余的溶液。

已固定精液涂片的染色

将涂片按顺序浸入以下溶液中:

1. 快速染液 1 10s
2. 快速染液 2 5s

3. 流水浸 10~15 次, 去除多余的染剂

上述每一步骤之间, 均将涂片垂直竖立在吸水纸上, 以除去多余的溶液。

已染色精液涂片的封片

封片或不封片的已染色精液涂片均可观察精子形态。不过, 涂片封片后可用于培训、内部质控及实验室内比较。此外, 对染色涂片做了封片, 没有污染显微镜物镜的风险。

2.5.15 统计学考量

2.5.15.1 在改良 Neubauer 血细胞计数板计数池的网格中每个重复样本计数达到 200 个精子

- 如果湿片的每高倍镜视野(HPF)有 10 个精子, 则每 nL 有 2.5 个精子, 中央网格内应有 250 个精子。以 1 : 2 (1 + 1) 稀释精液标本后, 可以降低本底, 并且每个网格内约有 125 个精子; 评估第 2 个网格可增加精子数至大约 250 个, 这样对于可接受的抽样误差是足够的。
- 由于计数的精子很少, 且精液量也不是很精确, 故计算出的精子浓度仅是粗略的估值。在计数池内, 未稀释精液的估测浓度可能是稀释样本得出浓度的 30%~130%。

2.5.15.2 根据所计数的精子总数估计抽样误差和置信区间

- 如果计数精子数目太少, 得出结果会不可靠, 这将影响到临床的诊断和治疗。如果精子用于治疗目的和精子数目少, 出现不确定结果是难以避免的。
- 如果精液量少, 并且计数的精子数目少于建议数目, 所获得结果的准确性就会显著降低。如果每个重复样本计数的精子数目少于 200 个, 按照表 2.16 中给出的值, 报告抽样误差。
- 抽样误差是根据观察次数的结果来预期误差的量度。基于所检测抽取样本中观察到的数目, 95% 置信区间给出了总体真值范围的上限和下限。

2.5.15.3 百分率评估的误差

确定百分率的估值不仅取决于所计数的精子数目(N), 而且取决于一个真实的、但未知的百分率(p) (二项分布)。百分率在 20%~80% 时, 其标准误(SE) 近似值估算为 $\sqrt{[p(100-p)]/N}$ 。在 20%~80% 之外, 则应用更为合适的角度转换(反正弦平方根), $z = \sin^{-1} \sqrt{p/100}$, 其标准差为 $1/(2\sqrt{N})$ 弧度, 也就是说仅取决于所计数的精子数目、而非真正的百分率。

2.5.15.4 重复样本百分率结果的比较

重复样本百分率结果大于可接受差异, 表明存在计数错误或者加样误差, 或者精子未充分混匀, 以及在计数池或载玻片上的精子未随机分布。采用 95% 置信区间的临界值, 大约 5% 的重复样本百分率结果会仅仅由于随机误差而超出限值。本手册中应用了通过计算机计算出的精确的二项式置信区间, 取整数后用以确定假设的概率, 例如: “少于 5%”, 这样是正确的。

表 2.16 根据所计数的精子总数对应的整数抽样误差 (%) 和 95% 置信区间范围

观察数目 /N	抽样误差 /%	95% 置信区间		观察数目 /N	抽样误差 /%	95% 置信区间	
		下限	上限			下限	上限
1	100	0	6	55	13	41	72
2	71	0	7	60	13	46	77
3	58	1	9	65	12	50	83
4	50	1	10	70	12	55	88
5	45	2	12	75	12	59	94
6	41	2	13	80	11	63	100
7	38	3	14	85	11	68	105
8	35	3	16	90	11	72	111
9	33	4	17	95	10	77	116
10	32	5	18	100	10	81	122
15	26	8	25	150	8	127	176
20	22	12	31	200	7	173	230
25	20	16	37	250	6	220	283
30	18	20	43	300	6	267	336
35	17	24	49	350	5	314	389
40	16	29	54	400	5	362	441
45	15	33	60	450	5	409	494
50	14	37	66	500	4	457	546

2.5.15.5 计数足够精子数目的重要性

为减少随机变异的影响,基于观察足够精子数目作评估是非常重要的(最好至少计数 400 个精子,每个重复样本计数大约 200 个精子)(表 2.16)。评估精子数的精确性取决于所计数的精子数目。在泊松(Poisson)分布中,计数的标准误(SE)是计数(N)的平方根 $\sqrt{N}$,精液量中精子数目的 95% 置信区间(CI)约为 $N \pm 1.96 \times \sqrt{N}$ (或 $N \pm$ 大约 $2 \times \sqrt{N}$)。

如果计数 100 个精子,标准误是 $10(\sqrt{100})$,95% 置信区间则是 $80 \sim 120(100 \pm 20$,或 20%)。如果计数 200 个精子,标准误是 $14(\sqrt{200})$,95% 置信区间则是 $172 \sim 228(200 \pm 28$,或 14%)。如果计数 400 个精子,标准误是 $20(\sqrt{400})$,95% 置信区间则是 $360 \sim 440(400 \pm 40$,或 10%)。

须注意的是,切点值为 4% 的理想值时,需要至少评估 1 500 个精子,才能够解释 3% 与 5% 是存在差异。

2.5.15.6 重复计数比较蕴含的统计学原理

独立计数 2 次之间的差异期望值为 0,这种情况下标准误等于 2 次计数总和的平方根。因此,在 95% 置信区间内,仅由于随机误差, $(N1-N2)/[\sqrt{N1+N2}]$ 的值应该 <1.96 。

如果2次计数之间的差异,小于或等于表2.3中所提示该2次计数总和对应的差异,则接受估值,并根据2次计数的平均值计算精子浓度(表2.4)。

如果2次计数之间存在较大差异,则提示计数错误、或加样误差、或精子没有充分混匀,导致在计数池内或载玻片上的精子非随机分布。

如果2次计数之间的差异大于可接受误差,则取消这2次计数的数值,重新制备和评估精液的2个新稀释样本(不能增加评估第3个样本,取这3个数据的平均值,也不能取3个数据中的2个最接近值来计算平均值)。

上述适用于精子和过氧化物酶阳性细胞的计数(3.4.1.1节)。对于CD45阳性细胞(3.4.2节)和未成熟生殖细胞(3.6节),所染色的载玻片应再次评估。

据此95%置信区间临界值,重复样本约有5%仅由于随机误差而超出临界值。

2.5.16 精子测量

介于正常和异常大小之间的精子头,可使用目镜测微尺来分辨。

77个经巴氏染色的精子,其头部按照本手册给出的精子形态学标准分类为正常精子头的尺寸,经应用计算机系统测量(重复测量的变异系数为2%~7%),得到以下数据:头长的中位数为4.1 μm ,95%置信区间为3.7~4.7 μm ;头宽的中位数为2.8 μm ,95%置信区间为2.5~3.2 μm ;长宽比的中位数为1.5,95%置信区间为1.3~1.8。

经巴氏染色的74个精子,中段按照本手册给出的精子形态学标准分类为正常精子中段的尺寸,经应用相同的计算机系统测量,得到以下数据:中段长的中位数为4.0 μm ,95%置信区间为3.3~5.2 μm ;中段宽的中位数为0.6 μm ,95%置信限区间为0.5~0.7 μm 。

2.5.17 样例

2.5.17.1 其他细胞浓度的计算

其他细胞和精子片段(例如,无头的精子尾,无尾的精子头)的浓度,可以通过与精子浓度的关系来计算。如果精子被计数,在同一体积(HPF)内的其他细胞和精子片段的浓度,可以使用以下公式进行计算:

$$C = S \times N_i / N_s$$

其中:

C=其他细胞、精子片段或其他相关成分的浓度

S=所计算的精子浓度

N_i =其他细胞、精子片段或其他相关成分的数目

N_s =与相关成分在同一体积(面积)内,所计数精子的数目

2.5.17.2 正常形态精子百分率和畸形精子指数(teratozoospermia index, TZI)

使用6键计数器分类记录200个精子,12个精子评为正常,188个精子评为异常。在188个异常精子中,其中184个有头部缺陷,102个有中段缺陷,30个有主段缺陷,44个有过量残留胞质。

- 正常形态 $12/200 = 6\%$

- 头部缺陷 $184/200 = 91\%$
- 颈部 / 中段缺陷 $102/200 = 51\%$
- 尾部缺陷 $30/200 = 15\%$
- 过量残留胞质 $44/200 = 22\%$
- $TZI(184+102+30+44)/188 = 1.91$

2.5.17.3 计算形态学涂片中不完整精子或非精子细胞的浓度

C = 其他非精子细胞、细胞碎片或其他成分的浓度

N = 与 200 个精子相同视野内的非精子细胞或精子片段数目

S = 精子浓度 ($10^6/\text{mL}$)

$C = S \times (N/200)$, 单位为 $10^6/\text{mL}$, 可根据此公式计算上述成分的浓度。

2.5.17.4 精子浓度计算样例

例 1

稀释倍数是 $1+1(1:2)$, 重复样本 1 在 2 个网格内观察到 200 个精子, 而重复样本 2 在 2 个网格内观察到 250 个精子。4 个网格中精子数目之和为 $200+250=450$, 两者之差为 $250-200=50$ 。根据表 2.3, 可以看出超出差异限, 即超出仅由随机误差造成的最大差异(41), 故此, 摒弃结果, 并制备 2 个新的重复稀释样本。

例 2

稀释倍数是 $1+1(1:2)$, 重复样本 1 在 3 个网格内观察到 219 个精子, 而重复样本 2 在 3 个网格内观察到 180 个精子。6 个网格中精子数目之和为 $219+180=399$, 两者之差为 $219-180=39$ 。根据表 2.3, 可以看出等于差异限, 即低于仅由随机误差造成的最大差异(39), 故此, 接受得出的数值。

稀释倍数是 $1:2(1+1)$, 样本的精子浓度是 $C=(N/n)/50$ 精子 / nL , 或者是 $(410/6)/50=1.37$ 精子 / nL , 或者是 1.4×10^6 精子 / mL 精液 (保留 2 位有效数字)。

例 3

稀释倍数是 $1+1(1:2)$, 重复样本 1 在全部 9 个网格内观察到 120 个精子, 而重复样本 2 在全部 9 个网格内观察到 140 个精子。18 个网格中的精子数目之和为 $120+140=260$, 两者之差为 $140-120=20$ 。根据表 2.3, 可以看出小于差异限(31), 故此, 接受得出的数值。

稀释倍数是 $1+1(1:2)$, 并且检测了每个计数池的全部 9 个网格 (总体积 $1.8\mu\text{L}$) 时, 样本的精子浓度是 $C=(N/1.8) \times 2$ 精子 / $\mu\text{L} = (260/1.8) \times 2=288.8$ 精子 / μL , 或者是 290×10^3 精子 / mL 精液 (保留两位有效数字)。由于计数到的精子数目少于 400 个, 根据表 2.3, 得出 260 个精子相应的取样误差约为 6.3%, 报告这个抽样误差。

例 4

稀释倍数是 $1:2(1+1)$, 重复样本 1 在全部 9 个网格内观察到 10 个精子, 而重复样本 2 在全部 9 个网格内观察到 8 个精子。由于观察到的精子数目少于 25 个, 精子浓度是低于 56 000 精子 / mL 。报告“在 2 个重复样本中观察到 18 个精子, 精子数太少, 不能准确测定精子浓度 ($<56\,000$ 精子 / mL)”。

例 5

稀释倍数是 1 : 2 (1+1), 2 个计数池都没有观察到精子。由于观察到的精子数目少于 25, 精子浓度是低于 56 000 精子 /mL。报告“在 2 个重复样本中未观察到精子, 精子数太少, 不能准确测定精子浓度 (<56 000 精子 /mL)”。



第 3 章 扩展性检查方法

3.1 多重精子缺陷指数	67
3.2 精子 DNA 碎片	70
3.3 遗传和基因组检测	84
3.4 相关的免疫学检测和免疫学方法	86
3.5 白细胞介素评估 - 男性生殖道炎症标志物	93
3.6 精液中未成熟生殖细胞的评估	95
3.7 精子包被抗体的检测	95
3.8 附属性腺功能的生化检测	100
3.9 射精顺序评估	108

本章所介绍的试验不必作为精液常规分析的方法,但对于诊断或研究的某些情况可能是有价值的。有些出版物基于相关性分析,提示了该试验的用途。但是,为了评价一项试验是否对男性个体有用,即使存在高度相关性,也必须考虑阳性和阴性预期值(阳性或阴性测量结果分别是真实的概率)。

本章遵循推荐的标准试验描述了一些测试。为了使推荐的试验清晰和标准,本章纳入了一些可选择的测试。只要基本检查方法与可选择测试建立起联系,并且得以解释其关系,实验室应用可选择测试来替代所推荐基本检查方法是可行的。

“在临床上,越来越认识到染色体异常和基因突变是多种男性不育症的病因,这些病因导致了精液分析所显示的异常”

3.1 多重精子缺陷指数

形态学异常的精子通常有多种缺陷(头部缺陷、中段或主段缺陷,或这些缺陷的组合)。特别是在研究人类精子发生损伤程度方面^[58,153],各种异常形态发生率的详细检测可能比单一评估正常形态精子百分率更有用。记录形态学正常的精子,以及有头部、中段和主段缺陷的精子,用多重记录系统给出所检测的每个精子的缺陷平均数。

用多重记录系统记录精子头部、中段和主段的每种缺陷,可以得出 3 个指数:

- 畸形精子指数 (teratozoospermia index, TZI)^[104,154] (如第 2 章所推荐);
- 多重异常指数 (multiple anomalies index, MAI)^[58];
- 精子畸形指数 (sperm deformity index, SDI)^[155-157]。

MAI 和 TZI 与体内生育力相关^[58,104],SDI 与体外受精相关^[155]。这些指数对评估某些

暴露或病理状况也是有用的^[153,156,157]。

3.1.1 多重形态缺陷指数的计算

记录精子头部、中段和主段的缺陷,以及过量残留胞质(胞质量大于精子头部面积的 1/3)。可以使用实验室细胞计数器,并将所检测的指数类型对应各个输入键的数码。如果没有计数器,可以用一个简单的记录表。

- TZI 为每个异常精子缺陷的最大值是 4 : 头部、中段和主段缺陷各计数为 1,过量残留胞质也计数为 1。这项分析所采用的形态学标准源自本手册(见“显微镜评估和结果计算”)
- MAI 与 TZI 类似,是每个异常精子的缺陷平均数。所有头部、中段和主段的缺陷都计算在内。这项分析所采用的形态学标准源自文献的方法^[158],并作了修改^[159]。该文献的形态学标准与本手册介绍的形态学标准不同(2.4.9 节)。
- SDI 是缺陷总数除以精子总数(不只是异常精子)。SDI 将多类头部缺陷合并计数为 1,同样把中段和主段缺陷各计数为 1。采用本手册所给出的形态学标准。

表 3.1 给出了上述指数的计算例子,并说明了指数之间的不同。

表 3.1 多重精子缺陷指数的计算

	MAI	TZI	SDI
最大值		4.00	3.00
类别	异常精子	异常精子	所有精子
(A)计数的精子数	200	200	200
正常精子(N)	46	46	46
正常精子(%)	23	23	23
(B)缺陷精子数(200-46)	154	154	154
(1)头部缺陷数(MAI,SDI)或头部缺陷>1的精子数(TZI)	284	154	212
(2)中段缺陷数(MAI)或中段缺陷≥1的精子数(TZI,SDI)	54	52	52
(3)主段缺陷数(MAI)或主段缺陷≥1的精子数(TZI,SDI)	54	46	46
(4)过量残留胞质的精子数	14	14	14
(C)MAI 总缺陷:(1)+(2)+(3) (=C)	392		
(D)TZI,SDI 总缺陷:(1)+(2)+(3)+(4) (=D)		266	324
指数计算	C/B	D/B	D/A
指数值	2.55	1.72	1.62



注解:对 TZI 的这种描述与 Menkveld et al. 的原著^[104]和欧洲人类生殖和胚胎学学会^[12]以及北欧男科学协会手册^[160]中介绍的一致,给出的数值范围是 1.00~4.00。这种描述不同于本手册旧版本^[4],旧版本没有将过量残留胞质分开记录,给出 TZI 的数值范围是 1.00~3.00。

3.1.2 解释

表 3.2 给出的是就诊不育症诊所的男性以及近 3 年内已生育 1 个孩子的男性的 MAI 和 TZI 值。需注意的是,可育男性与生育力低下夫妇的男方之间存在数值重叠,说明正常可育男性与生育力低下男性之间没有明显的数值界限。

应该牢记,评估人类精子形态学并不是仅用于预估自然受精和辅助受精的结局。对精子发生做定量分析,可为精子发生障碍的男性提供进一步信息,其病因可能涉及睾丸应激反应、附睾功能障碍,或者甚至是遗传性精子尾部缺陷。在后一种情况下,任何激素治疗可能都不会成功。应对这样的夫妇进行临床遗传学检查,以明确子代遗传学风险。

生育和不育夫妇中男性的精子缺陷指数差别,故难以应用这些指数来试图区分可育与不育男性群体。Coutten 等使用其他分级系统^[162],综述了精子鞭毛多发形态异常(multiple morphological anomalies of the flagella, MMAF)^[161],显示出精子形态缺陷与影响精子功能的很多遗传缺陷存在关联。

表 3.2 生育和不育夫妇中男性的精子缺陷指数

	不育夫妇		生育夫妇	
	MAI ^a	TZI ^b	MAI ^c	TZI ^b
均数	1.94	1.81	1.58	1.51
标准差	0.37	0.30	0.20	0.20
最小值	1.12	1.26	1.04	1.17
最大值	3.9	2.64	2.38	2.07
百分位数				
5	1.44		1.27	
10	1.51	1.74	1.34	1.33
25	1.67		1.44	
50	1.88	1.81	1.58	1.54
75	2.14		1.72	
90	2.44		1.86	
95	2.65		1.94	
样本数目	4 930	103	994	107

^a Unpublished data from J. Auger, Paris, using Davidusing David^[158], modified by Auger & Eustache (2000)^[159].

^b Menkveld et al. (2001)^[104].

^c Jorgensen et al. (2001)^[163], using David's morphological classification^[158]; modified by Auger & Eustache (2000)^[159].

3.2 精子 DNA 碎片

3.2.1 背景

精子 DNA 损伤是 DNA 正常结构出现了某些化学改变。在这些改变中,精子 DNA 碎片(sDF)以 DNA 单链或双链断裂的形式影响遗传物质,这是精子遗传物质最常见的一种损伤。多个不同过程可以触发 sDF,包括精子发生过程的 DNA 包装缺陷,以及可能与数种病理和环境因素关联的细胞死亡与氧化应激过程^[164-166]。

虽然含有 sDF 的精子受精能力可能不会损伤,但近年发表的多项荟萃分析,显示 sDF 会影响自然生殖和辅助生殖中的胚胎发育、植入和妊娠^[167-170]。研究还表明,精液参数异常男性的精子普遍存在 sDF,而且 sDF 与一些精液参数正常男性的不育有关联。由于 sDF 与精液质量仅有部分关联^[164,171],故此 sDF 可能是男性不育诊断检查中的一项重要附加检测,成为了男科学基础与临床中讨论最多的、最有前途的一种生物标志物。

目前已开发了多种检测 sDF 的方法,这些方法借助于精子染色质来评估 DNA 的断裂状态(例如,发生 DNA 单链或双链断裂)。本部分所描述的方法,在过去 20 年里一直被男科学实验室和辅助生殖实验室广泛应用。

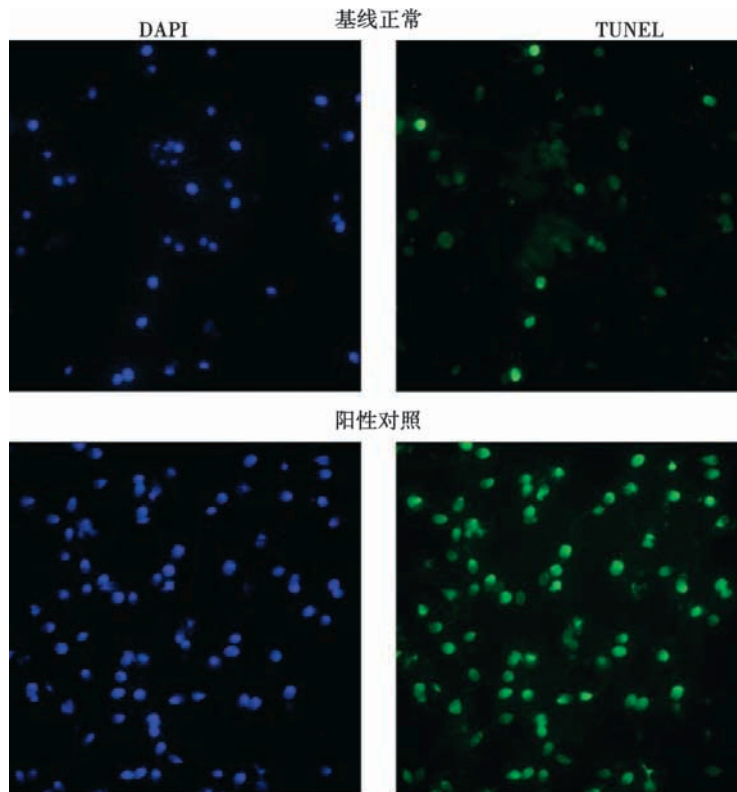
可以用于检测 sDF 的试验,方法学和所评估的损伤类型有很大不同。末端脱氧核苷酸转移酶(dUTP)缺口末端标记(TUNEL)和单细胞凝胶电泳分析(彗星试验)直接检测精子 DNA 单链和/或双链断裂的状况,吖啶橙流式细胞术(AO FCM)和精子染色质扩散试验(SCD)则是评估染色质对酸处理的敏感性。

这些试验的诊断阈值(也称为临界值)对于每种试验及具体操作方法是特异的。应由实施操作的实验室测定并确证恰当的阈值,以供临床应用。为了使数据对个体患者有用,重要的不仅是研究人群中数据的相关性,而且有必要在实际临床实践中评估和验证阳性与阴性预测值数据的有效性。

3.2.2 TUNEL 试验

TUNEL 试验是检测精子 DNA 碎片的一种最常用技术。该试验使用荧光染料或生物素标记的探针标记 DNA 链断裂,并结合使用链霉亲和素-辣根过氧化物酶(streptavidin-HRP)和 HRP 显色底物来检测原位 DNA 链断裂。TUNEL 的原理是用脱氧核苷酸(通常是脱氧尿苷三磷酸,dUTP)标记 DNA 链中的断裂。dUTP 可以直接与荧光染料结合或被生物素标记。

这项试验中,DNA 链断裂的 3'-OH 末端作为引物,在不依赖模板的 DNA 聚合酶(末端脱氧核苷酸转移酶,TDT)催化下,被溴脱氧尿苷(Brd-U)标记^[172]。该方法能够直接检测 DNA 单链和双链断裂,DNA 链断裂位点越多,细胞内掺入的标记就越多。d-UTP 是借助于 TDT 酶添加到游离 3'-OH 末端的底物。所添加的 d-UTP 可以被直接标记,故此作为 DNA 断裂的直接标记物,或者可以利用修饰过的 d-UTP 来放大信号,使标记的抗 d-UTP 抗体可以吸附到 d-UTP 上(d-UTP 和其他脱氧核苷酸都可以用来放大信号)^[173]。



Photos provided by Drs. C. Roman-Montanana and J. Kirkman-Brown.

图 3.1 应用荧光检测精子 DNA 碎片的 TUNEL 玻片试验

上图显示了精子 DNA 损伤的基线水平,被 DAPI 染色的是精子(蓝色),被荧光染色(绿色)的是 DNA 损伤的精子,显示的是损伤的基线水平;下图是阳性对照,显示几乎全部精子(蓝色)都有发出绿色荧光的 DNA 碎片。

多种商售试剂盒提供标记探针和将探针与 DNA 断裂结合所需的 TDT 酶。标记后,被荧光染色精子的百分率可以借助于荧光显微镜或流式细胞仪测定。用生物素标记的探针,则需要链霉亲和素- HRP (辣根过氧化物酶)和 HRP 的显色底物来显示所标记的精子。应用这种方法染色的精子可以在显微镜下观察和评估(图 3.1);然而,对于临床精液样本的高通量评估,TUNEL 可以与流式细胞术联用,这样能够对精液样本中遗传缺陷精子的比率进行定量评估。

应用显微镜评估时,应检测至少 200 个精子。有研究指出,TUNEL 试验每一步骤的改变,可能都会对检测结果有很大影响^[174]。因此,每个实验室对技术进行标准化并确定本实验室的临界值是重要的。

3.2.2.1 主要方法

试剂

- 人输卵管液或 Biggers、Whitten 和 Whittingham 培养液(见附录;HTF、BWW)
- Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(成分见附录;DPBS)

- DPBS 含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA)
- DPBS 含有 0.1% 柠檬酸和 0.1% Triton
- 每周用 DPBS 制备 3.7% 多聚甲醛
- 在 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 含有 1mg/mL BSA 液中, 加入 3~3 000U/mL 微球菌核酸酶或重组脱氧核糖核酸酶 (DNase) I。

步骤

1. 取 1 份含有至少 200 万个精子 (低精子数目样本)、但最好为 1 000 万个精子的精液样本, 用缓冲液 (HTF 或 BWW, 成分见附录; 少于 200 万个精子的样本, 可以使用荧光显微镜评估 TUNEL 阳性精子的百分率) 洗涤, 以 500g 离心 5min, 然后再次洗涤, 离心。少于 200 万个精子的样本, 染色后, TUNEL 阳性精子可以按照 TUNEL 结合荧光显微镜部分描述的方法进行评估。

2. 将精子沉淀团重悬于 500 μ L 多聚甲醛 (3.7%, 每周用 DPBS 新鲜制备), 室温下固定 30min。

3. 用 200 μ L 含有 1% BSA DPBS 洗涤沉淀团 2 次, 每次以 500g 离心 5min。

4. 加入 100 μ L 含有柠檬酸 (0.1%) 和 Triton (0.1%) 的缓冲液, 冰上孵育 4min, 以使精子渗透。

5. 停止渗透: 加入 300 μ L 含有 1% BSA 的 DPBS, 以 500g 离心 5min。

6. 弃去上清液, 用 400 μ L 含 1% BSA 的 DPBS 重悬沉淀团, 分成 2 等份, 分别为阴性对照 (TDT-) 和测试样本 (TDT+)。

7. 阳性对照可能有助于显示该操作程序能够识别碎片化的 DNA。阳性对照方法: 如上所述准备另 1 份精子样本, 渗透后, 在标记前, 将精子样本与微球菌核酸酶或重组 DNase I (3 000~3U/mL 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1mg/mL BSA) 混匀, 15~25 $^{\circ}$ C 放置 10min, 以诱导 DNA 链断裂。

8. 将精子样本分为 3 等份, 离心 (500g 5min), 按照以下方法重悬精子:

TDT-: 仅加入含有标记探针的缓冲液;

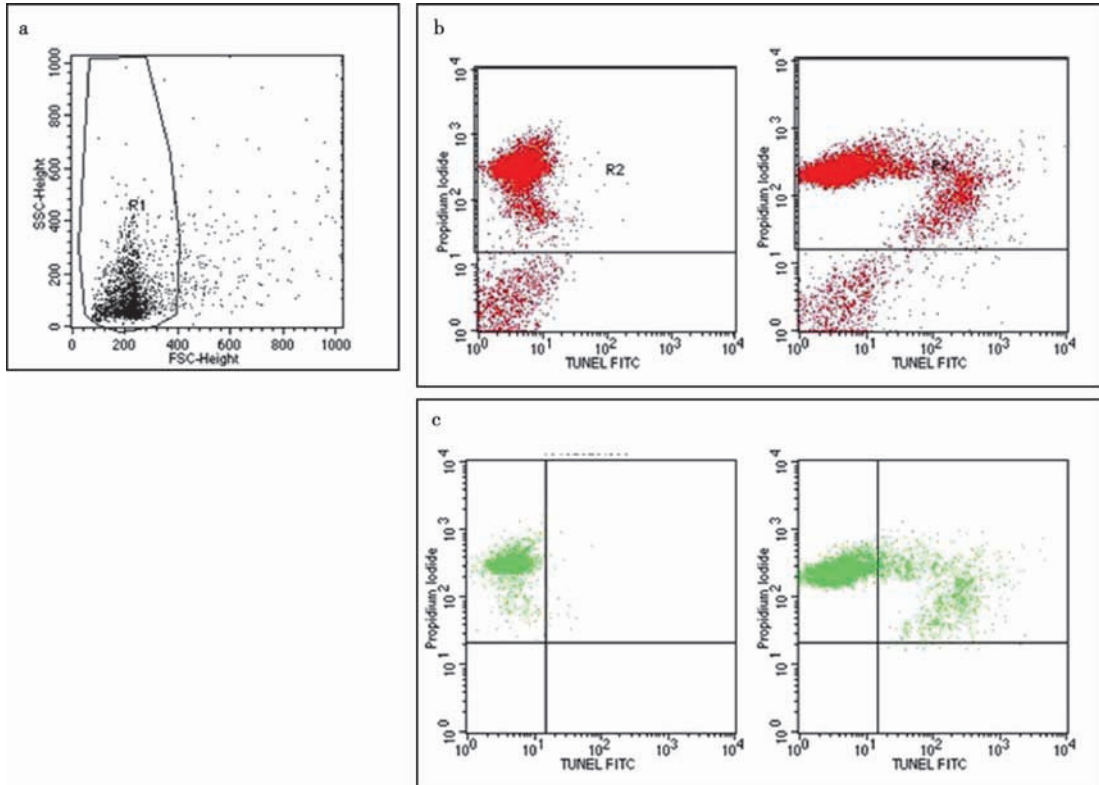
TDT+ 和阳性对照: 加入含有标记探针和 TDT 的缓冲液 (30 个单位或按照不同商品试剂盒的要求)。

9. 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h (荧光探针需避光操作)。

10. 用 200 μ L 含有 1% BSA 的 DPBS 洗涤 2 次, 并在 DPBS 中重新悬浮。最终的 DPBS 体积会有一定差异, 取决于所使用显示标记探针的方法。用显微镜检测时, 应使用小体积 (最多 100 μ L) 让载玻片上有足够数目的精子, 以便在荧光或光学显微镜下观察。分析至少 200 个精子。

11. 使用流式细胞术检测时, 样本洗涤 2 次后, 用 500 μ L DPBS 重新悬浮。用碘化丙啶 (PI, DPBS 中 30 μ g/mL) 染色, 或另一种与 TUNEL 荧光兼容的核染色法染色, 在室温下避光孵育 10min, 以使精子核染色。对于每个样本, 必须在包含精子的区域 [前向光散射 / 侧光散射 (FSC/SSC)] 点图中绘制的火焰状区域 (图 3.2a 中的 R1) 内记录 8 000~10 000 个 PI 阳性粒子^[174], 以排除其他细胞 (如在火焰外的生殖细胞、白细胞) 和精液中存在的干扰物, 包括 PI 阴性物, 如 R1 中可能存在的凋亡小体^[174, 175]。分别用 515~555nm 和 563~607nm 波段探测器, 以显示绿色荧光 (与荧光素结合的核苷酸) 和红色荧光 (PI)。然后绘制 R2 区域, 包括

R1 区域内的所有 PI 阳性精子(图 3.2b,左图和右图)。DNA 碎片荧光阈值(TUNEL 阳性精子)设置在阴性对照中,包括 99% 的 PI 阳性精子(图 3.2c,左图)。然后将该阈值复制到测试样本中(图 3.2c,右图),计算超过阈值的绿色荧光阳性精子和 PI 阳性的百分率,代表带有 DNA 碎片精子的百分率。



Courtesy of Elisabetta Baldi.

图 3.2 流式细胞术分析碘化丙啶(PI)和绿色荧光

图 a, FSC/SSC 点图中典型的火焰形区域包含精子和凋亡小体(R1)。图 b, 绘制了围绕 PI 阳性精子的门(R2), 不包括凋亡小体。图 c, 左: 设置的阴性对照, 包括 99% 的阴性精子。图 c, 右: 测试样本, 其中包含了阴性对照。带有 DNA 碎片的精子百分率位于右上象限。

3.2.2.2 替代 TUNEL 的方法

根据 Darzynkiewicz 等^[176]和 Sharma 等^[173]的方法修改。

试剂

- 磷酸盐缓冲液 (DPBS), pH 7.4
- 1%~3.7% (v/v) 甲醛的 DPBS
- 70% 乙醇, pH 7.4
- TDT 5X 反应缓冲液: 1mol/L 二甲胍酸钾 (或钠), 125mmol/L HCl, pH 6.6, 1.25mg/mL BSA
- Br-dUTP 储存液: 2mmol/L Br-dUTP 溶于 50mM Tris-HCl, pH 7.5
- 12.5 单位的 TDT: 用以下储存缓冲液配制: pH 7.2 的 60mmol/L 磷酸钾, 150mmol/L KCl, 1mmol/L 2- 巯基乙醇和 0.5% Triton X-100, 50% 甘油

- 10mmol/LCoCl₂
- 蒸馏水
- 0.1% Triton X-100 和 5mg/mL BSA 溶解在 DPBS 中
- 异硫氰酸荧光素 (FITC)-(或 Alexa Fluor 488) - 抗 Br-dU 单克隆抗体结合物溶液: 0.1~0.3μg 荧光染料-抗 Br-dU 抗体结合物,溶于 100μL 含有 0.3% Triton X-100 和 1% (w/v) BSA 的 DPBS
- PI 染色液: 5μg/mL PI, 100μg/mL RNase A (不含 DNase) 溶于 DPBS 中。

步骤

1. 将 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个精子悬浮在 0.5mL pH 7.4 的 DPBS 中。
2. 用巴斯德吸管将此精子悬液转移到 5mL 聚丙烯管中,管内有 4.5mL 含 1%~3.7% (v/v) 甲醛的冰冷 DPBS (pH 7.4),将管置于冰上孵育 30~60min。

3. 以 300g 离心 5min, 5mL DPBS 重悬精子沉淀。

4. 再次以 300g 离心 5min, 然后将精子沉淀重悬在 0.5mL 的 DPBS 中。

5. 用巴斯德移液管,将精子悬液转移到盛有 4.5mL 冰冷的 70% 乙醇 (pH 7.4) 的管中。如果有需要或为了操作方便,精子悬液可以在 -20℃ 的乙醇中储存数周。

6. 以 200g 离心 3min 除去乙醇,重悬精子于 5mL DPBS 中。

7. 再次以 300g 离心 5min,将沉淀重悬于 50μL 的溶液,包含:

- 10μL TDT 5 × 反应缓冲液: 1mol/L 二甲砷酸钾 (或钠), 125mmol/L HCl, pH 6.6, 1.25mg/mL BSA
 - 20μL Br-dUTP 储备液: 2mmol/L Br-dUTP 溶于 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.5
 - 0.5μL (12.5 单位) TDT: 用以下储存缓冲液配制: 60mmol/L 磷酸钾, pH 7.2, 150mmol/L KCl, 1mmol/L 2- 巯基乙醇和 0.5% Triton X-100, 50% 甘油
 - 5μL 10mmol/LCoCl₂
 - 33.5μL 蒸馏水。
8. 将该溶液中的细胞在 37℃ 下孵育 40min。

9. 孵育时间结束,加入 1.5mL 冲洗缓冲液: 0.1% Triton X-100 和 5mg/mL BSA 溶解在 DPBS 中,以 300g 离心 5min。

10. 重悬细胞沉淀在 100 μL FITC-(或 Alexa Fluor 488) - 抗 BrdU 单克隆抗体结合物溶液: 0.1~0.3μg 荧光染料偶联的抗 Br-dU 抗体溶解于 100 μL 含有 0.3% Triton X-100 和 1% (w/v) BSA 的 DPBS。

11. 室温孵育 1h。

12. 加入 1mL PI 染色液: 以 DPBS 溶解 5μg/mL PI, 100μg/mL RNase A (不含 DNase) (Sigma)。

13. 室温避光孵育 30min, 或 37℃ 孵育 20min。

3.2.2.3 结果

TUNEL 与流式细胞术联用

用 488nm 蓝色激光通过流式细胞术分析细胞。在 530/520nm 处检测 FITC-(或 Alexa Fluor 488) - 抗 Br-dU 抗体的绿色荧光。在 >600nm 处测量 PI 的红色荧光。

TUNEL 荧光显微镜联用

1. 将已染色样本加在载玻片上,盖上盖玻片。
2. 在镭射荧光显微镜 40 倍物镜下对每份样本,观察至少 500 个精子,进行评分(激发光 460~490nm,发射光>515nm)。
3. 首先计数每个视野内 PI(红色)染色的精子数目。
4. 计数同一个视野内,发出绿色荧光(TUNEL 阳性)的精子数目。
5. 计算 TUNEL 阳性细胞的百分率。

3.2.2.4 临床解释

TUNEL 可以通过多种方式进行检测。基于使用的检测方法,不同的实验室报告了不同的临界值,用于区分健康精液样本与男性不育关联样本之间的差异^[164,173,177-179]。因此,每个实验室都应该基于阳性和阴性预测值,使用恰当对照样本建立本实验室的参考值范围,并且阐明预测值与什么临床表征相关联(例如受孕、流产或其他)。

3.2.2.5 技术要点

- 为了防止方法中的重复洗涤过程导致 DNA 碎片率增高,使用交联剂(如甲醛)进行预固定是检测成功的关键步骤。每次实验必须使用新制备的甲醛。
- 鉴于精子染色质的高度凝聚,一些作者建议在 TUNEL 操作步骤中增加染色质去凝聚步骤,以提高检测的灵敏度。这种方法中,在第 5 步骤之前,样本重悬于解聚液(DPBS 中含 1,4-二硫苏糖醇(DTT) 5mmol/L;肝素 100U/mL 和 0.1% Triton X-100),并在避光室温(25℃)孵育 30min。有关该方法的更多介绍,见 Antonucci 等^[180]。
- 每批次实验都必须包括阳性对照样本和阴性对照样本,以确保结果的一致性。出现阴性结果时,要排除 TDT 活性的丢失、溴脱氧尿苷三磷酸(BrdUTP)的降解以及其他方法学问题。对于阳性对照样本,可以使用 DNase I 消化来诱导 DNA 损伤,方法是将健康捐精者的精子样本加至 100μL DNase I (1mg/mL),37℃孵育 1min。对于阴性精子对照样本,从步骤 7 开始,精子可以在相同的溶液中孵育,但不添加 TDT。将已固定的阳性对照精子样本(已测定了精子 DNA 碎片百分率)和阴性对照精子样本进行分装、存储,以便与将来待分析的样本同批次一起处理。
- 多次离心,可能会导致精子的随机丢失;为了减少精子丢失,建议使用聚丙烯或硅化玻璃管。
- 由于在同一试管中操作所有步骤(包括固定),为了避免精子由于静电而附着到试管表面,在冲洗缓冲液中添加 1% 或 2% 的 BSA 也可减少精子丢失。
- 在吸液过程中留下 50~100μL 上清液,避免精子沉淀团受到扰动,导致不必要离心而丢失精子。
- 孵育必须在潮湿的环境中进行,以防止样本干燥出现人为假象。
- 如果使用直接标记,则反应溶液中包含荧光染料偶联的脱氧核苷酸(0.25nmol/50μL~0.5nmol/50μL)。在这种情况下,在孵育步骤(步骤 8)后,直接用 PI 溶液染色精子(步骤 12),并使用适当的激发波长和发射波长通过流式细胞术进行分析。

- 由于染色液的活性时间很短(4℃下约 24h),因此在进行检测之前,实验准备时间不要超过染色液的活性时间。
- 应尽快分析精子。延迟时间(>1h)将导致精子过度染色和降解。
- 目前还建立了数种结合精子存活检测的改良 TUNEL 方法^[181-183]。

3.2.3 精子染色质扩散试验

3.2.3.1 背景

精子染色质扩散(sperm chromatin dispersion,SCD)试验是一种光学显微镜方法,用于评估精子 DNA 对酸变性的敏感性。SCD 的原理是基于完整 DNA 环在核蛋白变性和提取后会扩展,而 DNA 断裂了,DNA 环不扩展或扩展很小。这项试验依赖于精子完整染色质暴露于酸和裂解液后形成扩散晕的能力;除去染色质的核蛋白后,形成的扩散晕对应于附着在残余核结构上松弛 DNA 环的释放程度。由于断裂后的 DNA 容易变性,会阻止这种扩散。该方法包括三个主要步骤:①将精子包埋在琼脂糖基质中,琼脂糖作为惰性悬浮状底物来显示精子的作用状况;②在酸性 DNA 解旋溶液中孵育,然后裂解;酸性溶液作为 DNA 变性剂,仅在 DNA 损伤时才溶解 DNA 双螺旋;裂解液用于除去核蛋白;③洗涤、在从低到高浓度的乙醇中脱水、染色,在显微镜明场下观察结果^[184,185]。

SCD 检测有商售试剂盒,可提供这项试验所需的全部试剂,以确保这项试验易于技术操作和应用,并为不同的临床实验室提供可重复且一致的结果。

3.2.3.2 主要方法

根据 Fernánde 等^[185,186]的方法修改。

试剂

- 1% 低熔点琼脂糖水溶液
- 0.65% 标准琼脂糖
- DPBS
- 0.08N HCl
- 中和裂解溶液[0.4mol/L Tris,0.8mol/LDTT,1%SDS 和 50mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), pH 7.5],第 2 种中和裂解溶液(0.4mol/L Tris,2mol/L NaCl 和 1% SDS,pH 7.5)
- Tris- 硼酸盐 -EDTA 缓冲液(0.09mol/L Tris- 硼酸盐和 0.002mol/L EDTA,pH 7.5)
- 70% 乙醇,90% 乙醇和 100% 乙醇
- 瑞氏染液与 DPBS(1:1)

步骤

1. 用 DPBS 将原始精液样本的精子浓度调整到 $5 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ /mL。最好使用新鲜精液样本,但直接在液氮中冷冻的精液样本也可以使用。这项试验必须对使用新鲜精子与冷冻精子进行验证。

2. 在 37℃,将精子悬液与 1% 低熔点琼脂糖水溶液混合(琼脂糖终浓度为 0.7%)。

3. 取 50 μ L 混合液,涂布在预先包被有 0.65% 标准琼脂糖且经 80℃ 干燥过的载

玻片上。

4. 用盖玻片(24mm×60mm)盖住上述涂布层,避免产生气泡。
5. 将载玻片水平放置在冷物的表面上,例如放在4℃预冷的金属或玻璃板上。
6. 将放置了载玻片的冷物放入4℃的冰箱中5min,以使琼脂糖凝固。
7. 轻轻滑动取下盖玻片。
8. 立即将载玻片水平浸入装有新鲜酸变性溶液(0.08NHCl)的托盘中,在22℃避光放置7min。
9. 将载玻片转移到装有中和裂解液(0.4mol/L Tris, 0.8mol/L DTT, 1% SDS 和 50mmol/L EDTA, pH 7.5)的托盘中,室温放置10min。
10. 将载玻片转移到第2个中和裂解溶液(0.4mol/L Tris, 2mol/L NaCl 和 1% SDS, pH 7.5)中,室温孵育5min。
11. 将载玻片放置在 Tris- 硼酸盐 -EDTA 缓冲液(0.09mol/L Tris- 硼酸盐和 0.002mol/L EDTA, pH 7.5)中,洗涤2min。
12. 分别在70%、90%和100%乙醇中各浸2min,使精子脱水。
13. 将载玻片水平放置在室温或37℃烘箱中干燥。
14. 在已干燥琼脂糖胶上覆盖一层新鲜染液[瑞氏液与DPBS(1:1)混合]。
15. 保持载玻片水平放置10~15min,不时吹气混匀染液。
16. 弃去染液,用自来水轻轻快速地清洗载玻片,然后空气干燥。
17. 一旦达到所需的着色水平,并且载玻片完全干燥,如果需要,可以使用永久性封固剂封固载玻片。
18. 用光学显微镜,于100倍油镜下观察。建议每个样本观察至少500个精子。

结果

可以按照 Fernández 等的标准,对样本中精子的光晕进行分类^[25]。

- **大:**光晕宽度等于或大于精子核的最小直径
- **中:**光晕大小介于大光晕和小光晕之间
- **小:**光晕宽度等于或小于精子核最小直径的1/3
- **无光晕**
- **无光晕降解:**无光晕,而且精子核呈现不规则或弱染色。这类精子与DNA和蛋白质严重损伤有关结果应以每个类别的百分率表示。含有DNA碎片精子的百分率为小光晕、无光晕和无光晕降解精子之和。

临床解释

SCD 试验有一些临床应用的小规模研究^[187]。对于其他DNA检测,每个实验室都应该基于阳性和阴性预测值,使用恰当对照样本建立本实验室的参考值范围,并且阐明预测值与什么临床表征相关联(例如受孕、流产或其他)。

技术要点

- 为了避免琼脂糖基质内的精子重叠和能够快速评估精子,使用建议的精子浓度悬液是重要的。

- 如果没有仔细控制孵育条件,酸和裂解液的作用可能会导致晕环丢失,从而产生假阳性。
- 干燥后(第13步),已处理的载玻片可以在室温下避光保存在玻片盒中数月,或立即染色。
- 应记录没有尾部的精子核,但不包括在最终结果中。
- 当液体琼脂糖已稳定在37℃时,才将精子悬液与琼脂糖液体相混合,以避免精子热损伤。
- 在处理样本的同时,平行处理已知DNA碎片化水平的对照精子悬液作为内部质量控制。这些质控品可以分装,冻存。

3.2.3.3 替代方法

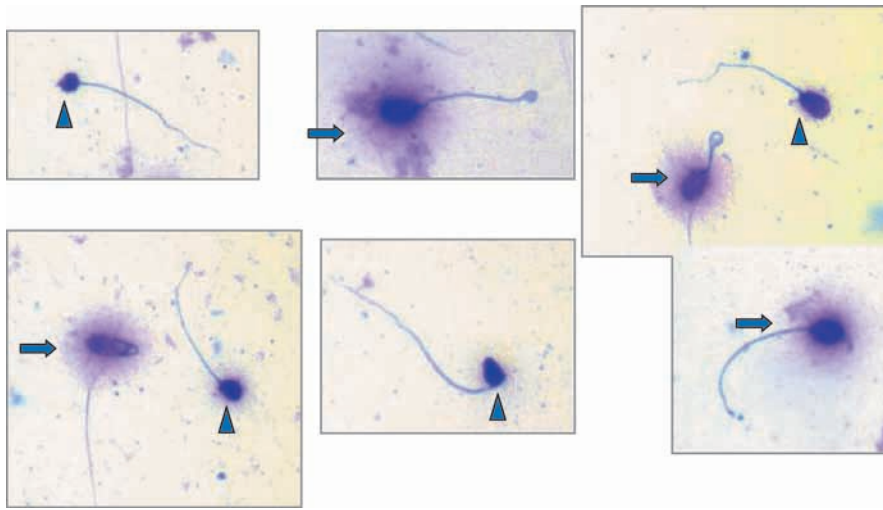
试剂

- 琼脂糖制备:溶解琼脂糖(在95~100℃熔化后),100 μL融化的琼脂糖放置Eppendorf管中
- BWB或HTF
- 新鲜制备的酸变性溶液(0.08N HCl)
- 裂解液 0.4mol/L Tris-HCl,2mol/L NaCl,0.05mol/L EDTA和1% SDS,pH 7.5
- 蒸馏水
- 70%乙醇,90%乙醇和100%乙醇
- 瑞氏缓冲溶液

步骤

1. 用0.65%标准琼脂糖预先包被载玻片,并使其凝固。
2. 在适量体积培养液(HTF,BWB)中稀释精液样本,使精子浓度达到 $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6/\text{mL}$ 。
3. 吸取60 μL稀释后的精液样本(包含至少300 000个精子)至含有融化琼脂糖的Eppendorf管中。充分混匀。此步骤必须在37℃进行。
4. 在室温下,37℃孵育5min,以降低琼脂糖的温度。
5. 取8 μL含有精子的混合液,涂布在预包被的载玻片上,轻轻盖上盖玻片(不要按压)。每张载玻片在2~8℃放置5min。
6. 移除盖玻片需仔细操作。先将盖玻片轻推向一侧,然后小心地水平取下盖玻片。
7. 将载玻片水平浸入装有新鲜的酸变性溶液(0.08N HCl)的托盘中,室温避光7min。
8. 从变性溶液中取出载玻片,在室温下将载玻片浸入25mL裂解溶液(0.4mol/L Tris-HCl,2mol/L NaCl,0.05mol/L EDTA和1% SDS,pH 7.5)中25min。
9. 用蒸馏水清洗载玻片5min,换水1次或2次。
10. 从水中取出载玻片,擦拭背面,将载玻片分别浸入含有70%乙醇(2min)、90%乙醇(2min)和100%乙醇(2min)的载玻片容器中。
11. 让全部载玻片干燥。
12. 直接滴加10~15滴瑞氏缓冲染色液至载玻片上,染色15min,然后用蒸馏水冲洗载玻片。

13. 空气干燥载玻片。在 40 倍物镜的光学显微镜下观察结果。区分有光晕(完整 DNA)的精子,以及如图 3.3 所示没有光晕的精子。计数至少 500 个精子。



Courtesy of Elisabetta Baldi.

图 3.3 有光晕精子(完整 DNA, 箭头➡)和无光晕精子(碎片 DNA, 楔形▲)

3.2.4 彗星试验

3.2.4.1 背景

彗星试验是一种基于断裂 DNA 链在电场作用下的迁移差异来评估单个精子 sDF 的方法,迁移差异取决于 DNA 链的电荷量和大小^[188,189]。这项试验的名称与荧光显微镜下观察到的“彗星”外观有关,这种现象是电泳后从精子头部解离出已染色的解链 DNA 碎片所形成的。

在该试验中,精子被嵌入薄的琼脂糖基质内。在高盐条件下,去垢剂诱导促进了精子的裂解。这种处理除去了核蛋白,产生出类核结构,在碱性条件下类核结构内的双链 DNA 得以解螺旋。在随后的电泳步骤中,断裂的 DNA 链向阳极迁移,产生类似于彗星尾的特征性分散模式。完整的 DNA 形成了彗星头部,断裂的 DNA 碎片则形成了彗星尾部。尾部与头部的相对荧光强度比较可以用来测量精子 DNA 损伤的水平^[190]。

彗星试验测定的原理是基于 DNA 的碱性变性。这项试验有多种不同方法学,以下描述的方法参照 Simon 和 Carrell 的文献^[190]。在该方法中,精子染色质会被 DTT 等解聚,然后使用碱性缓冲液变性。在彗星试验的“碱性”方法中,男科学实验室最常使用 pH≥13 的缓冲液(使用不同 pH 的其他方案的综述,见 Baumgartner^[191]),不耐碱的位点被转化为 DNA 断裂片段。在电泳过程中, DNA 链在凝胶中侧向迁移,形成彗星的尾部。未断裂的 DNA 留在彗星的头部。染色后,在显微镜下能够看到类似彗星的形状。可以对彗星目测评估^[192]或者借助于不同软件评估^[193,194]。每个样本重复制备 2 张玻片,每张玻片评估至少 50 个彗星。也可以应用商售试剂盒和检测软件进行评估。

3.2.4.2 步骤^①

3.2.4.3 试剂

- 分别制备 25mL 0.5% 正常熔点 (NMP) 凝胶 [0.250g NMP 琼脂糖 (0.5% 凝胶) 加入 25mL DPBS] 和 25mL 0.5% 低熔点 (LMP) 琼脂糖在 DPBS 中 [0.125g LMP 琼脂糖 (0.5% 凝胶) 加入 25mL DPBS], 加热融化, 然后分别置于 45℃ 和 37℃ 水浴。
- DPBS
- 250mL Triton X-100
- 裂解液: 0.4mol/L Tris-HCl, 2mol/L NaCl, 0.05mol/L EDTA 和 1% SDS, pH 7.5
- DTT 溶液
- 新鲜的碱性电泳溶液 (60mL 10mol/L NaOH + 10mL 200mmol/L EDTA, 用纯水定容至 2 000mL)
- 中和缓冲液 (8.4.1 节)
- 化学当量的 DNA 染料 (例如溴化乙锭, SYBR Green I 或银染)。



注解: 溴化乙锭是一种诱变和致癌的嵌入染料。SYBR Green I 是一种更安全的嵌入染料。

3.2.4.4 步骤

根据 Simon 和 Carrell^[190] 的方法修改。

1. 在微波炉中加热烧瓶, 以融化琼脂糖。
2. 将 NMP 凝胶置于 45℃ 水浴, 将 LMP 凝胶置于 37℃ 水浴。
3. 小心地吸取 200μL NMP 凝胶涂布于载玻片的磨砂面, 立即盖上盖玻片, 将载玻片放在室温的工作台面上, 使琼脂糖凝固。
4. 用 DPBS 调整精子浓度至 6×10^6 个 /mL。
5. 轻轻取下盖玻片, 避免除去或干扰琼脂糖层。
6. 取 10μL 精子样本悬液 (用 DPBS 调整至 6×10^6 /mL) 加至 0.5mL Eppendorf 管中, 向精子样本悬液加入 75μL 37℃ 孵育的 LMP 凝胶。
7. 充分混匀, 然后用移液管逐滴地滴加至 NMP 琼脂糖凝胶层的顶面。
8. 快速盖上盖玻片, 将载玻片放在室温的工作台面上, 让琼脂糖在室温下固化 15min。
9. 从冰箱中取出裂解液, 加入 250μL Triton X-100 和 22.5mL 裂解储备液, 并在玻片染色缸中充分混匀。
10. 从载玻片上取下盖玻片, 将载玻片浸入 4℃ 的裂解液中 1h。
11. 将载玻片从玻片染色缸中取出, 加入 1.25mL DTT, 倒置染缸以确保缸内液体混匀。然后将载玻片放回玻片染色缸中, 在 4℃ 孵育 30min。
12. 从玻片染色缸中取出载玻片, 加入 1.25mL 的 4mmol/L 二碘水杨酸锂 (LIS), 倒置染缸以确保缸内液体混匀。然后将载玻片放回玻片染色缸中, 室温孵育 90min。

^① 译者注: 3.2.4.2 标题以下原文没有内容, 原文见 3.2.4.4。

13. 取出载玻片,将载玻片垂直放置在纸巾上,靠在支架上,小心地沥干所有剩余的液体。
14. 向水平凝胶电泳槽中注入新鲜的碱性电泳溶液(60mL 10mol/L NaOH + 10mL 200mmol/L EDTA,用纯水定容至 2 000mL)。
15. 将载玻片浸入缓冲液中 20min,然后通过使用 20mL 注射器在槽中添加或减少($\pm 1\sim 20$ mL)缓冲液,在 25V(0.714V/cm)条件下,将电流调节至 300mA 后启动电泳。电泳 10min。
16. 电泳后,如同第 13 步骤一样在纸巾上沥干载玻片,将载玻片放在托盘上,并用中和缓冲液冲洗 3 次,每次 5min。
17. 将载玻片彻底沥干,除去中和缓冲液。用化学当量的 DNA 染料[例如,添加 50 μ L 20mg/mL EtBr(溴化乙锭)]对每张载玻片染色,盖上盖玻片。
18. 使用显微镜观察载玻片,每张载玻片分析 50 个彗星(图 3.4、图 3.5)。

3.2.4.5 结果

使用适当的彗星软件在每张玻片中随机选择前 50 个彗星进行评估。但是,不要计算尾部重叠的彗星。没有头部的彗星应视为含有 100% DNA 损伤的精子。

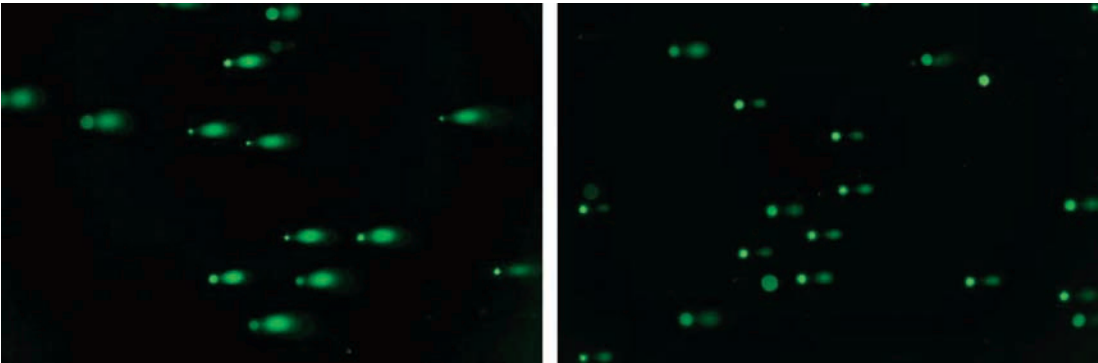
3.2.4.6 临床解释

多项研究报告了使用彗星试验评估 sDF 的诊断阈值。这些阈值彼此有很大不同,并且取决于检测的确切条件以及分析的表型^[195-198]。对于其他 DNA 检测,每个实验室都应该基于阳性和阴性预测值,使用恰当对照样本建立本实验室的参考值范围,并且阐明预测值与什么临床表征相关联(例如受孕、流产或其他)。然而,由于彗星试验涉及多种方法学的步骤,需要高水平的专业知识来解释结果,并且不同实验室之间的参考值存在较大差异,故此彗星试验可能不适合某些实验室使用。

3.2.4.7 技术要点

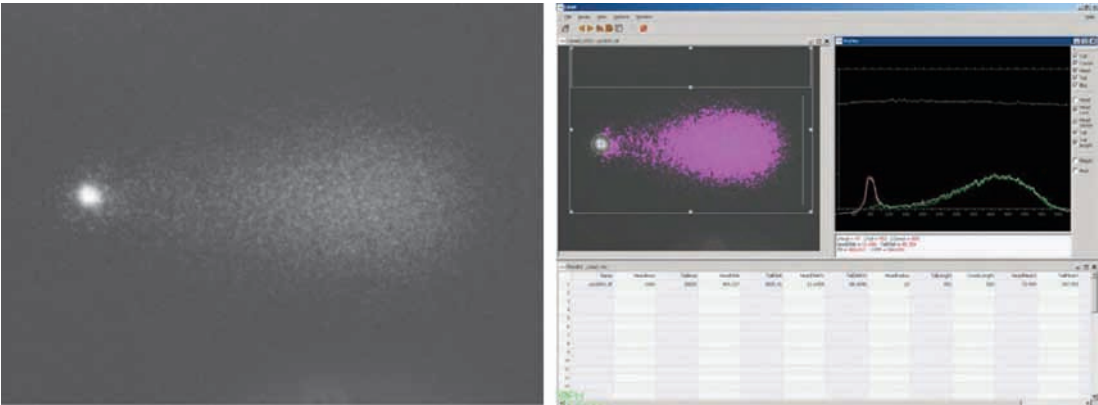
更多的描述见 Simon 和 Carrell^[190]。

- 除非另有说明,所有储存液均应使用双蒸水制备,并在室温下储存。
- 为保持裂解缓冲液的有效性,其存放时间不应超过 1 周。建议根据实际检测的需要,制备小体积的新鲜缓冲液。
- 由于琼脂糖在微波中熔化时,水分从凝胶中蒸发导致浓度升高,因此剩余的琼脂糖最多可使用 5~7d。
- 如果取下盖玻片时凝胶裂开,可以继续实验而不影响测试结果。但是,裂开的凝胶更容易脱落。
- 如果琼脂糖凝胶在后续步骤中脱落,则将 NMP 琼脂糖的浓度从 0.5% 增加到 1%。不要改变 LMP 凝胶的浓度。
- 为充分裂解精子膜,要确保 Triton X-100 在裂解缓冲液中适当混匀,混匀操作要温和,并避免产生泡沫。
- 确保 DTT 和二碘水杨酸锂(LIS)在裂解缓冲液中恰当混匀,以避免检测出现假阴性。
- 如果电泳缓冲液的 pH 没有维持在 13,会降低检测灵敏度。
- 较高浓度的 EtBr 会增加背景染色,导致迁移尾部 DNA 减少了可视性。



Micrograph by Dolores Lamb and Alexander Bolyakov.

图 3.4 异常男性 DNA 广泛断裂精子和正常男性未见 DNA 损伤精子的彗星试验 (溴化乙锭染色)
左图(异常)显示一名男性 DNA 广泛断裂精子的彗星试验结果。异常样本中的精子呈现明亮绿色小斑点(为精子头部)，“彗星尾”是从精子头部放射出的大而弥散的染色。正常男性精子的彗星试验结果与异常男性精子的比较,正常男性精子的头部紧密包裹着 DNA,未见 DNA 碎片,只有小而明亮的精子头部被染色。



Micrograph and analysis by Petr Houska.

图 3.5 显微镜下观察的彗星,后续用 CASP 软件评估(尾部 DNA=88%)

3.2.5 吖啶橙流式细胞术

3.2.5.1 背景

这项检测基于吖啶橙(AO)的特性,当吖啶橙整合入双链 DNA 之间发出绿色荧光,当吖啶橙与单链 DNA 结合发出红色荧光。Evenson^[199]描述的方法可应用于评估新鲜和 / 或冷冻精子样本,方法中仅包括两个主要步骤。在第一步,精子用低 pH (1.2) 的活性剂溶液处理,使精子染色质变性并后续能够染色。在第二步,精子悬液被中和,用含有 AO 的第二溶液染色。

通过流式细胞术收集红色和绿色荧光的数据,并进行数据转换,以测定精子群体中红色荧光的程度,称为 DNA 碎片指数 (DFI)。可以使用任何流式细胞仪软件中对所收集数据进行分析。一些商务分析软件也可用于分析。

3.2.5.2 步骤

试剂

- 低 pH (1.2) 活性剂溶液: 0.08mol/L HCl, 150mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, 用 HCl 和 / 或 NaOH 调节至 pH 1.2。
- AO 染色溶液, 含有 6mg/L 纯化的 AO, 0.1mol/L 柠檬酸, 0.2mol/L Na_2HPO_4 , 1mmol/L EDTA 和 150mmol/L NaCl, 用 NaOH 调 pH 至 6.0。使用铝箔包裹或琥珀色玻璃瓶盛放, 避免溶液受到光照。
- TNE (10mmol/L Tris Cl, 150mmol/L NaCl 和 10mmol/L EDTA, pH 7.4)。
- 准备一个冰盒 (最好有盖子以保持样本避光), 将 AO 染色溶液、TNE 和酸性活性剂溶液放入盒内 (如果评估冷冻样本, 样本必须在冷冻前用 TNE 稀释)。

方法

根据 Evenson, Evenson 和 Jost^[199-201] 的方法修改:

1. 解冻参考样本, 并放入冰盒内 [制备参考样本见 Evenson 和 Jost^[201]]。
2. 启动流式细胞仪, 运行 AO 平衡缓冲液 15min, 然后测量参考样本 (如何测量样本, 见下文), 并将绿色和红色光电倍增管的灵敏度分别调整为 475 和 125。
3. 用 TNE 将样本稀释至 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6/\text{mL}$, 放入冰盒内 (如果测量冷冻样本, 必须先用 TNE 稀释, 然后再在液氮中快速冷冻)。
4. 吸取 200 μL 稀释后的样本到流式细胞仪测试管中, 加入 400 μL 酸性活性剂 (加入活性剂时, 准时启动秒表), 轻轻旋转测试管, 并立即将试管放回冰盒内。
5. 准确计时 30s 后, 加入 1.2mL 染色溶液, 用移液器吸头混匀, 并立即将测试管放回冰盒内。
6. 将测试管放入流式细胞仪中, 在秒表计时 3min 时, 开始收集数据。
7. 用重复样本再次进行上述操作。
8. 让流式细胞仪运行 AO 平衡缓冲液, 开始制备下一个样本 (每批次最多检测 6 个样本, 就需要检测参考样本)。
9. 用参考样本将绿色和红色光电倍增管的灵敏度分别调整为 475 和 125。
10. 以 100~200 个细胞 / 秒的粒子速率分析样本, 每个样本分析 5 000 个精子。
11. 完成全部样本检测后, 用双蒸水冲洗流式细胞仪 10min, 以除去大部分 AO。
12. 按照仪器制造商建议的方案, 清洁流式细胞仪。

结果

为了分析数据, 通过在前向光散射 / 侧向光散射区域中设门来选择精子群。在后续的步骤, 绿色双链 DNA 与红色单链 DNA 荧光细胞图仅用于 AO 阳性细胞设门, 并不包括细胞碎片和缺乏遗传物质的凋亡小体。随后, 对每个 AO 阳性精子, 使用下列公式, 计算绿色荧光到红色荧光的转换 (或 DFI)。

$$\text{DNA 碎片指数 (DFI)} = (\text{红色荧光}) / (\text{红色荧光} + \text{绿色荧光})$$

以直方图表示 DFI 的值。其中, 通过使用参考样本可以在主细胞群的右侧找到中至高的 DFI 值。右侧细胞的百分率代表 AO 阳性粒子的总数, 称为 DFI%, 这是用于临床解释这个试验的参数。DFI 直方图还提供 DFI 的平均值和标准差值。

评估与临床解释

多项研究报告了使用吡啶橙流式细胞术测量的 DFI 诊断阈值^[202,203]。对于其他 DNA 检测,每个实验室都应该基于阳性和阴性预测值,使用恰当对照样本建立本实验室的参考值范围,并且阐明预测值与什么临床表征相关联(例如受孕、流产或其他)。

质量控制

- 必须每天根据参考精子样本设置流式细胞仪。对患者样本(6~10 个样本)进行重复分析后,必须再次使用参考样本重新校准。
- 为确保 AO 与样本测试管平衡,在样本测量前和不同样本之间,AO 平衡缓冲液必须在仪器流体管线中运行约 15min。
- 在评估样本时,如果粒子速率高于 250 个/s,则必须制备新样本,以确保 AO 染料和精子之间的精确平衡。

3.3 遗传和基因组检测

在过去的 15 年里,逐渐清晰显示出有相当比例的男性不育患者具有遗传或基因组方面的原因。在临床上,越来越认识到染色体异常[数目异常、结构异常(包括微缺失与微重复)]和基因突变是多种男性不育症的病因,这些病因导致了精液分析所显示的异常。虽然医学遗传学实验室更常规地开展遗传和基因组测试,但是,有些男科学实验室也进行此类试验。除了精子非整倍体试验,大多数遗传和基因组诊断试验的方法学并非专用于检测与精液有关的缺陷,只有精子非整倍体试验是精子特异性的,描述如下。

3.3.1 精子非整倍体试验

3.3.1.1 背景

非整倍体是指一条或几条染色体的数目多于或少于正常染色体数目。正常情况下,精子是单倍体[22 条常染色体加 1 条性染色体(X,Y)]。非整倍体精子比正常精子多或少了 1 条或多条常染色体和 / 或性染色体。未经筛选的男性不育患者,即使体细胞核型正常,由于减数分裂期的染色体分离异常导致染色体增益(二体)或丢失(缺对染色体),这些男性不育患者的精子非整倍体发生率提高了 10 倍。已公认非整倍体的卵母细胞与母亲增龄存在联系,由此造成非整倍体胚胎增加,导致胚胎丢失。X、Y、13、18 和 21 号染色体的数目变化产生的非整倍体,胎儿能存活但影响出生结局。已充分认识,罗伯逊易位是导致非整倍体精子增加的原因之一。在这些男性,同一精子核内可能积累了染色体数目异常和不平衡的分离产物^[204, 205]。平衡交互易位的男性也有产生非整倍体精子的风险。唐氏综合征患儿的父亲在平衡交互易位携带者中很常见。非整倍体精子增加也与 DNA 碎片水平增加有关^[206]。复发性流产夫妇的男方也是非整倍体精子的主要群体^[207]。非整倍体精子的异常水平最常见于精子发生障碍、少精子症或少弱精子症的男性,以及精子参数正常的复发性流产夫妇的男方。

3.3.1.2 荧光原位杂交

荧光原位杂交是一种评估染色体异常频率的细胞遗传学临床诊断方法。用精子非整

倍体试验检测 X、Y、13、18 和 21 号染色体,因为这些染色体的非整倍体与活产但子代受影响有密切联系 [Klinefelter 综合征 (XXY-XXXXY), Turner 综合征 (XO), Patau (13 三体), Edwards (18 三体) 和唐氏综合征 (21 三体)]。有证据表明,由于其他的非整倍体胚胎是致死性的,故分析全部染色体可以给出最多的信息,但是,这样检测的成本高昂。精子非整倍体试验作为一种筛查工具,其检测结果有助于已蒙受影响夫妇(尤其是复发性流产或辅助生殖技术治疗失败的患者,其次是弱畸精子症和严重少精子症患者)的遗传咨询^[208],在一些情况下,也可帮助夫妇作出更明智的生育决定^[209]。以下的方法学源自 Ryu 等^[210]。

试剂

- SSC 液(从 20 倍 SSC 液稀释得到)[3mol/L NaCl, 0.3mol/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ (二水柠檬酸钠), pH 7.0]。
- 2 倍 SCC 液(从 20 倍 SSC 液稀释得到)。
- 乙醇洗涤液(100% 稀释至 70% 和 80%)。
- 25mmol/L DTT 液。
- 直接标记染色体的 α 卫星特异 DNA 探针(有商售多色 DNA 探针试剂盒)。
- DAPI II (核染色剂, 4,6-二氨基-苯基吡啶)。

步骤

按照 Ryu 等的方法^[210]:

1. 将载玻片放入二甲苯中 5min, 随即放入无水乙醇中 5min, 然后空气干燥, 以除去污渍和油污。
2. 细胞核在甲醇中固定 15min。玻片在 2 倍 SSC 液中孵育, 然后分别在 70%、80% 和 100% 乙醇中洗涤 2min, 空气干燥。
3. 玻片在 37℃ 新配制的 25mmol/L DTT 溶液中孵育 6~8min, 以使精子头解聚和膨胀。室温下玻片立即浸入 2 倍 SSC 液中 3min, 然后分别在 70%、80% 和 100% 乙醇中洗涤、脱水 2min, 空气干燥。
4. 用商售直接标记的染色体特异性的 α 卫星探针(多色 DNA 探针)进行五色荧光原位杂交, 以检测 X、Y、13、18 和 21 号染色体。
5. 将探针混合物密封在玻片上, 然后放入 80℃ 的烤箱中 2~3min, 使细胞 DNA 和探针同时变性。
6. 玻片在 37℃ 放置, 杂交过夜。然后将玻片放入 68℃、0.25 倍 SSC 液(pH 7.0)中洗涤 10s, 再用 1 倍磷酸盐缓冲洗涤液冲洗(多色 DNA 探针)。
7. 用 DAPI II 对细胞核染色。总体杂交效率应 > 97%。

评分标准

- 染色体特异 DNA 探针通过荧光颜色来识别, 对细胞核进行分析, 确定每一种探针是否存在 0、1、2、3 或更多信号。
- 在分析中, 细胞核显示的信号大小不合理或显示的信号出现在核膜外, 不予以分析。
- 以下情况只判定为一个分裂区域: ①两个信号的其中一个信号大小和强度小于另一个同系物的信号; ②两个信号之间的距离小于这两个信号中任何一个信号的直径。以单倍体精子中出现两条和两条以上染色体的精子百分率作为结果予以报告。不计算缺少一条完整染色体的精子。

技术注解

细胞遗传学自动化成像系统提高了精确度和准确度,是一种必要的分析手段。该系统含有一个显微定位器,通过荧光显微镜捕获和旋绕 8 个焦点平面,并按照细胞学的一系列规则进行分析。软件控制着对焦和每个视野的曝光,以捕获多个焦点层,信号强度得到最大化,而且保持了背景低水平噪声^[211]。

统计学计算

对不育组与对照组之间的荧光原位杂交信号分布进行总的比较。连续变量分析采用两样本独立性 *t* 检验,方差不齐的变量采用 Mann-Whitney 秩和检验,连续变量分析以 *P*<0.05 为具有统计学显著性。

精子染色体二体的基础水平

在可育男性中,精子非整倍体的发生率是很低的。在两个不同实验室之间的检测结果相似(表 3.3)。

表 3.3 健康可育男性精子染色体二倍体的基础水平

染色体 #	Templado 等	Neusser 等	染色体 #	Templado 等	Neusser 等
1	0.08	0.16	13	0.12	0.13
2	0.09	0.09	15	0.10	0.10
3	0.20	0.20	16	0.07	0.12
4	0.08	0.10	18	0.06	0.10
6	0.04	0.07	20	0.12	0.12
7	0.06	0.10	21	0.17	0.21
8	0.03	0.18	22	0.47	0.41
9	0.16	0.13	X,Y	0.27	0.21
12	0.14	0.09			

Adapted from Templado et al. and Neusser et al.^[212, 213]

3.4 相关的免疫学检测和免疫学方法

3.4.1 精液中白细胞评估

大多数人类精液中存在白细胞,主要是多形核白细胞(中性粒细胞)^[53,214]。有时可以通过巴氏染色方法,将白细胞与精液涂片的精子细胞和精母细胞区分开来(2.4.9.3 节)。主要基于着色、核的大小及形态的不同来分辨白细胞^[53]。多形核白细胞在形态学上容易与多核精子细胞混淆,但是多形核白细胞染色呈浅蓝色,而精子细胞呈浅红色^[53]。核的大小也有助于鉴别:单核白细胞核大小的波动范围较大,从大约 7 μm 的淋巴细胞、到大于 15 μm 的巨噬细胞。这些大小仅作为参考,因为退化和分裂会影响核的大小。

还有几种技术可以定量测出精液中白细胞的数目。由于过氧化物酶阳性的粒细

胞是精液中主要类型的白细胞,因此常规检测过氧化物酶活性有助于白细胞初筛^[53,215](3.4.1.1节)。

白细胞还可以应用更耗时和更耗费的针对普通白细胞抗原和精子抗原的免疫细胞化学测定技术来鉴别^[98,216](3.4.2节)。

3.4.1.1 使用邻甲苯胺染细胞内过氧化物酶的步骤

该方法快速、价廉,是一种实用的粒细胞初筛方法。

原理

计数人类精液中白细胞的传统方法,是用组织化学方法鉴定粒细胞特有的过氧化物酶(图3.6)。虽然这种技术有相对易于操作的优点,但它不能检测以下情况:

- 已经激活并释放其颗粒的多形核白细胞;
- 其他不含过氧化物酶的白细胞类型,如淋巴细胞、巨噬细胞和单核细胞。

这项试验可用于鉴别多形核白细胞与不含过氧化物酶的多核精子细胞^[53]。以下测定均以 Nahoum & Cardozo^[217]建立的方法为基础。此试验已有商售试剂盒。

试剂

- 67mmol/L, pH 6.0 的磷酸盐缓冲液:将 9.47g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)溶于 1 000mL 纯水中,将 9.08g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)溶于另一 1 000mL 纯水中。然后将一种溶液加到另一种溶液中直至 pH 为 6.0(约 12mL 的 Na_2HPO_4 溶液加到 88mL 的 KH_2PO_4 溶液中)。
- 饱和氯化铵(NH_4Cl)溶液:将 250g NH_4Cl 加到 1 000mL 的纯水中。
- 148mmol/L 的乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)溶液:将 50g/L Na_2EDTA 溶入步骤 1 制备好的磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中。
- 底物:将 2.5mg 邻甲苯胺溶于 10mL 的 0.9%(9g/L)生理盐水中。
- 30%(v/v)过氧化氢(H_2O_2)溶液:购买成品。
- 工作液:往 9mL 邻甲苯胺底物中加入 1mL 饱和 NH_4Cl 溶液、1mL 148mmol/L Na_2EDTA 溶液及 10 μL 30%(v/v) H_2O_2 溶液,充分混匀。该溶液配制后可使用 24h。



注解:国际癌症研究机构(IARC, 1982)已声明,在实际操作过程中应将邻甲苯胺视为对人类有致癌的危险。应采取适当的防护措施(8.2节)。

步骤

1. 充分混匀精液样本(见下面技术要点)。
2. 取 0.1mL 精液并与 0.9mL 工作液混合[1+9(1:10)稀释]。
3. 涡旋振荡精子悬液 10s,并在室温下放置 20~30min。或者使用试管摇动装置持续摇动。
4. 取出重复样本前,再次混匀精液样本,重复样本与工作液混匀。

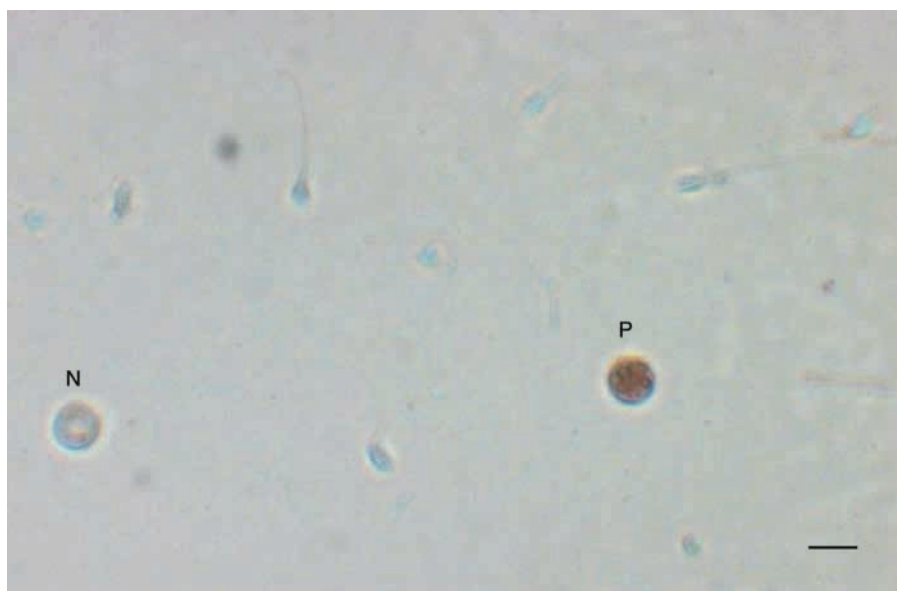
技术要点:充分混匀精液

在取样用于检测之前,应在原容器将精液样本充分混匀,但不必太用力,以避免产生气

泡。使用大口径(直径约 1.5mm)一次性塑料吸管(必要时无菌)反复吹吸 10 次混匀样本。不要用涡旋振荡器高速混匀样本,这样处理会损伤精子。

用血细胞计数板评估过氧化物酶阳性细胞数目

1. 20~30min 后,再次混匀精子悬液,并将 2 份重复样本分别充填计数板两侧的计数池。
2. 室温下将血细胞计数板水平置于湿盒内至少 4min(例如,计数板放在带盖培养皿内的浸透水滤纸之上),以避免干燥,并使细胞沉降。
3. 用放大 200 或 400 倍的相差显微镜检查计数池网格。
4. 每份重复样本计数至少 200 个过氧化物酶阳性细胞,以达到可接受的低取样误差(见表 2.3)。过氧化物酶阳性细胞被染成棕褐色,而过氧化物酶阴性细胞不着色(见图 3.6)。
5. 检查计数池时,逐网格地连续计数至少 200 个过氧化物酶阳性细胞,必须计数完整的网格,不要在网格的中间停止计数。
6. 记录评估达到至少 200 个过氧化物酶阳性细胞的网格数。在血细胞计数板的另一个计数池中也要计数相同的网格数。
7. 借助实验室计数器,计数过氧化物酶阳性细胞数目和网格数目。
8. 转换至血细胞计数板的第 2 个计数池,计数与第 1 个计数池相同的网格数,即使这些网格的过氧化物酶阳性细胞少于 200 个。
9. 计算两次过氧化物酶阳性细胞数的总数及差异。
10. 根据表 2.3 来确定差异的可接受性。该数值显示的是,预期 95% 的样本中仅由于抽样误差所致的两次计数之间的最大差异。
11. 如果差异是可接受的,则可计算浓度。如果差异太大,则制备 2 份新的稀释样本,重新对重复样本评估。
12. 以保留两位有效数字报告过氧化物酶阳性细胞的平均浓度。



Micrograph courtesy of T.G. Cooper.

图 3.6 人精液中过氧化物酶阳性细胞

P:过氧化物酶阳性的粒细胞(棕褐色);N:过氧化物酶阴性的圆细胞。比例尺 10 μ m。

13. 计算每份精液样本的过氧化物酶阳性细胞总数(见“精液中过氧化物酶阳性细胞浓度的计算”)。

精液中过氧化物酶阳性细胞浓度的计算

精液中过氧化物酶阳性细胞浓度等于检测到的细胞数目(N)除以计数重复样本的全部网格数目(n)的容积(这里1个网格的容积为100nL),再乘以稀释因子。

如果以1+9(1:10)稀释,则浓度计算为 $C=(N/n) \times (1/100) \times 10 \text{ 细胞/nL} = (N/n) \times (1/10) \text{ 细胞/nL}$ 。这样过氧化物酶阳性细胞浓度为 $(N/n) \times (1/10) \text{ 细胞/nL} (=10^6 \text{ 细胞/mL})$ 。

当血细胞计数板的每个计数池的所有9个网格全部被评估时,过氧化物酶阳性细胞总数除以两个计数池的容积(1.8 μL),再乘以稀释因子^[10],即可得到每微升的细胞数(10^3 细胞/mL)



注解:这种方法可以用于计算圆细胞浓度,计算时所计数的圆细胞(过氧化物酶阳性和阴性)总数为N。

方法的灵敏度

如果计数池中的过氧化物酶阳性细胞数少于200个,取样误差将超过5%。当2个计数池所有网格中少于400个过氧化物酶阳性细胞时,应报告所计数的细胞数目的取样误差(见表2.3)。

如果每个计数池中所计数的过氧化物酶阳性细胞数少于25个,浓度将 $<277\,000/\text{mL}$;报告评估的过氧化物酶阳性细胞数目,并注明:“细胞数太少,不能准确测定浓度($<277\,000/\text{mL}$)”。检测样本中未观察到过氧化物酶阳性细胞,并不代表着样本其他部分中也不含该种细胞。

样例

例1 用1+9(1:10)稀释,计数池1的9个网格中观察到60个过氧化物酶阳性细胞,而计数池2的9个网格中有90个过氧化物酶阳性细胞。在18个网格中,这两个数值之和(60+90)为150个,这两个数值之差(90-60)为30。从表2.3可见,已超出仅由随机误差造成的预期差异(24),应摒弃结果,重新检测重复样本。

例2 用1+9(1:10)稀释,计数池1的5个网格中观察到204个过氧化物酶阳性细胞,而计数池2的5个网格中有198个过氧化物酶阳性细胞。在10个网格中,这两个数值之和(204+198)为402个,这两个数值之差(204-198)为6。从表2.3可见,小于仅由随机误差造成的预期差异(39)。因此,这组数据可以接受。

根据表2.4,1+9(1:10)稀释,此样本过氧化物酶阳性细胞的浓度为 $C=(N/n) \times (1/10) \text{ 细胞/nL} = (402/10)/10 = 4.02 \text{ 细胞/nL}$,或 $4.0 \times 10^6 \text{ 细胞/mL}$ (保留两位有效数字)。

例3 用1+9(1:10)稀释,计数池1的9个网格中观察到144个过氧化物酶阳性细胞,而计数池2的9个网格中有162个过氧化物酶阳性细胞。在18个网格中,这两个数值之和(144+162)为306个,这两个数值之差(162-144)为18。从表2.3可见,小于仅由随机误差造成的预期差异(34)。因此,这组数据可以接受。

根据表2.4,当评估每个计数池的全部9个网格时,以1+9(1:10)稀释,标本的浓度为 $C=(N/1.8) \times 10/\mu\text{L} = (306/1.8) \times 10 = 1700 \text{ 细胞}/\mu\text{L}$,或 $1.7 \times 10^6 \text{ 细胞/mL}$ (保留两位有效数字)。由于计数少于400个细胞,应报告表2.3中306个细胞所对应的取样误差(约6%)。

例4 用1+9(1:10)稀释,2个计数池中均未观察到过氧化物酶阳性细胞。由于在全部9个网格中计数少于25个过氧化物酶阳性细胞,所以浓度为 $<277\ 000/\text{mL}$;应报告为“样本中未见过氧化物酶阳性细胞。细胞数过少,不能准确测定浓度($<277\ 000/\text{mL}$)”。

3.4.1.2 正常结果和病理结果之间的界限

目前没有基于可育男性精液中过氧化物酶阳性细胞的循证参考值范围。在有更多的证据之前,本手册仍保留将 1.0×10^6 过氧化物酶阳性细胞/ mL 的公议值作为有临床意义的阈值。据此,大于或等于 1.0×10^6 过氧化物酶阳性细胞/ mL 的检测值为异常。以下是涉及本项试验的几个重要评述。

- 精液中过氧化物酶阳性细胞总数可以反映炎症情况的严重性^[215]。过氧化物酶阳性细胞总数可以通过过氧化物酶阳性细胞浓度乘以精液体积得出。
- 已报道可育男性过氧化物酶阳性细胞临界值的变化范围为:PMN 白细胞浓度 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ / mL 或总的白细胞浓度从 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ / mL ^[215]。本手册以前版本取 1×10^6 / mL 作为白细胞精子症的临界值。取决于所检测的终点(endpoint)检测结果(精液质量、IVF结局、有细菌存在、精子对活性氧的反应),有些作者认为这个数值太低^[215],而其他作者认为这个数值太高^[218,219]。
- 精液中白细胞数目过高(白细胞精子症、脓精子症)可能伴有感染和精子质量差。
- 由白细胞导致的精子损伤取决于精液中的白细胞总数和相对于精子数目的白细胞数目。
- 白细胞可能通过氧化应激影响精子活力和DNA完整性(4.1节)。然而,已观察到白细胞浸润的程度是否引起损伤取决于很多因素,仅从一份精液样本难以推测,例如浸润发生的原因、时间、解剖部位,涉及的白细胞类型,以及它们是否处于激活状态^[214,220,221]。

3.4.2 全白细胞(CD45)免疫细胞化学染色

释放颗粒的多形核白细胞,以及不含过氧化物酶的其他种类白细胞如淋巴细胞、巨噬细胞或单核细胞,不能应用检测细胞过氧化物酶的邻甲苯胺实验来评估(3.4.1.1节),但是可以使用免疫细胞化学方法来检测。免疫细胞化学染色比检测过氧化物酶活性耗时和费钱,但是对区分白细胞和生精细胞是有用的。

3.4.2.1 原理

所有类型的人白细胞都有特异性抗原(CD45)的表达,可以使用一种适当的单克隆抗体来检测CD45。可以通过改变第一抗体的种类,使用这种常规方法检测不同类型白细胞如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、B细胞或T细胞,应该是关注的焦点。

3.4.2.2 试剂

- DPBS (Dulbecco's 磷酸盐缓冲液)。
- Tris 盐缓冲液(TBS,8.4节),pH 8.2。
- 盐酸四咪唑(左旋咪唑)1.0mol/L:用10mL蒸馏水溶解2.4g左旋咪唑。

- 底物:在 9.7mL TBS (pH 8.2) 中加入 2mg 萘酚 AS-MX 磷酸盐、0.2mL 二甲基甲酰胺和 0.1mL 的 1.0mol/L 左旋咪唑。即将使用前,加入 10mg 快速红 TR (Fast Red TR) 盐,并过滤 (0.45 μ m 微孔滤器)。
- 固定液:丙酮或丙酮 / 甲醇 / 甲醛的混合液:在 95mL 丙酮中加入 95mL 纯甲醇和 10mL 37% (v/v) 甲醛。
- 第一抗体:抗编码为 CD45 的白细胞共同抗原的小鼠单克隆抗体。
- 第二抗体:兔抗小鼠免疫球蛋白。所用的稀释度取决于抗体的滴度和来源。
- 碱性磷酸酶 - 抗碱性磷酸酶混合物 (APAAP)。
- Harris's 苏木精染色混合液 (作为复染剂)。

3.4.2.3 步骤

制备精液样本

1. 充分混匀精液样本,避免产生气泡。
2. 1 份约 0.5mL 的液化精液与 5 倍体积的 DPBS 混合。
3. 以 500g 离心 5min,除去上清液,并用 5 倍体积的 DPBS 悬浮精子团。
4. 以 500g 离心 5min。
5. 再重复此步骤一次,并用 DPBS 重新悬浮精子团至约 50×10^6 /mL。

制备精子涂片

1. 取 2 份 5 μ L 精子悬液滴在干净载玻片上 (2.4.7.1 节),制备涂片,空气干燥。
2. 空气干燥的细胞在纯丙酮中固定 10min,或者在丙酮 / 甲醇 / 甲醛混合液中固定 90s。
3. 用 TBS 洗涤 2 次,并将玻片的液体排尽。
4. 立即染色玻片,或包裹在铝箔纸内,并储存于 -70 $^{\circ}$ C,等待之后分析。

与抗体孵育

1. 在每张玻片上,用油性笔(划线笔)标出已固定细胞的一个区域(直径约 1cm 的圆圈),用 10 μ L 单克隆一抗覆盖这个区域。
2. 室温下在湿盒内水平放置玻片 30min (例如,放在带盖培养皿内的浸透水滤纸之上),以避免干燥。
3. 用 TBS 洗涤 2 次,并将玻片的液体排尽。
4. 用 10 μ L 二抗覆盖涂片的同一区域,室温下在湿盒内孵育 30min。
5. 用 TBS 洗涤 2 次,并将玻片的液体排去。
6. 加 10 μ L APAAP 在同一区域。
7. 室温下在湿盒内孵育 1h。
8. 用 TBS 洗涤 2 次,并将玻片的液体排尽。
9. 室温下在湿盒内与 10 μ L 萘酚磷酸底物孵育 20min。



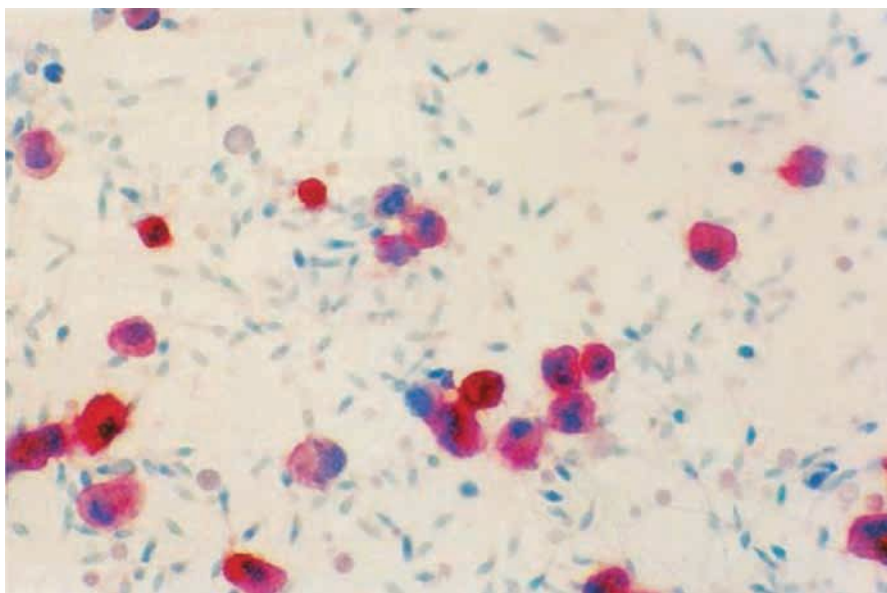
注解: 为了强化反应产物,可以重复使用二抗和 APAAP,每种试剂孵育 15min。

复染和封片

1. 一旦玻片出现微红色,即用 TBS 洗涤。
2. 用苏木精复染几秒;自来水冲洗,并用水性封固液封片(2.4.9 节)。

评估 CD45 阳性细胞数量

1. 用亮视野以 200 或 400 放大倍数检查整个已染色区域。CD45 阳性细胞(白细胞)染成红色(图 3.7)。
2. 在每张重复涂片中,分别计数 CD45 阳性细胞和精子,直到观察至少 200 个精子,以获得可接受的低取样误差(见表 2.3)。
3. 借助实验室计数器,计数 CD45 阳性细胞数目和精子的数目。
4. 用同样方式检查第 2 张涂片(直到计数 200 个精子)。
5. 计算 2 张涂片 CD45 阳性细胞数的总数和差异。
6. 从表 2.4 中确定差异的接受性。每个数值显示,预期发生在 95% 的标本中,仅由于取样误差所致的两次计数之间的最大差异。
7. 如果差异可以接受,计算出细胞浓度(见表 2.4)。如果差异太大,需重复检测双份玻片。
8. 以 2 位有效数字报告 CD45 阳性细胞的平均浓度。
9. CD45 阳性细胞浓度乘以精液体积(mL)得到每份精液样本的 CD45 阳性细胞总数。



Micrograph courtesy of R.J. Aitken.

图 3.7 精液中的白细胞

携带 CD45 的细胞(白细胞)染成红色。

精液中 CD45 阳性细胞浓度的计算

计算 CD45 阳性细胞的浓度与精子浓度相关。如果 N 表示在同样观察视野数中精子数为 400 时的 CD45 阳性细胞数目, S 是精子浓度($10^6/\text{mL}$),那么 CD45 阳性细胞($10^6/\text{mL}$)的浓度(C)可以通过公式 $C = S \times (N/400)$ 进行计算。

样例

例 1

在重复涂片 1, 每 200 个精子有 20 个 CD45 阳性细胞, 而在重复涂片 2, 每 200 个精子有 40 个 CD45 阳性细胞。这两个数值的总和 (20+40) 是 60, 两个数值之差 (40-20) 是 20。从表 2.3 可见, 这个数值超出了仅由随机误差造成的预期差异 (15)。因此, 摒弃此结果, 重新检测。

例 2

在重复涂片 1, 每 200 个精子有 25 个 CD45 阳性细胞, 而在重复涂片 2, 每 200 个精子有 35 个 CD45 阳性细胞。这两个数值的总和 (25+35) 是 60, 两个数值之差 (35-25) 是 10。从表 3.4 可见, 这个数值小于仅由随机误差造成的预期差异 (15)。因此, 接受此结果。

每 400 个精子中有 60 个 CD45 阳性细胞, 精子浓度为 $70 \times 10^6/\text{mL}$, 因此, CD45 阳性细胞的浓度为 $C=S \times (N/400)$ 细胞 /mL = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10.5 \times 10^6$ 细胞 /mL, 或者为 10×10^6 个细胞 /mL (保留两位有效数字)。如果计数细胞少于 400, 报告从表 2.3 给出的 60 个细胞的取样误差 (约 13%)。

3.4.2.4 正常结果和病理结果之间的界限

目前没有可育男性精液中 CD45 阳性细胞的循证参考值。过氧化物酶阳性细胞的公议临界值为 1.0×10^6 个 /mL, 它提示总白细胞的浓度较高, 因为并非所有白细胞都是过氧化物酶阳性的粒细胞。

3.5 白细胞介素评估 - 男性生殖道炎症标志物

3.5.1 背景

男性生殖道 (MGT) 慢性炎症在生育障碍中起着重要作用。生殖道感染 / 炎症男性患者的精液特征表现为高黏稠度和白细胞浓度大于 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 最常见临床症状是慢性盆腔疼痛。男性生殖道感染 / 炎症可通过炎症因子或炎性细胞产生活性氧 (ROS) 的直接效应或改变男性生殖道微环境来损伤精子, 从而损害生育力。

趋化因子是一个小细胞因子大家族, 由亚族 CXC 和 CC 趋化因子所组成。两个亚族由起始两个半胱氨酸的位置来区分: CXC 亚族中的这两个半胱氨酸被一个氨基酸分隔, 而 CC 亚族中的这两个半胱氨酸是相邻的。

趋化因子由单核细胞、活化的 T 淋巴细胞和中性粒细胞等多种细胞类群分泌, 对靶细胞功能起着协同或补充作用。

为了对男性生殖道炎症不育患者做进一步诊断, 男科医生和泌尿科医生可能要求检测精液的细胞因子和趋化因子。多项研究报告了前列腺炎和其他男性生殖道炎症状态下精液的趋化因子和细胞因子的改变。Penna 等应用多重细胞因子和趋化因子芯片, 定量检测了对照组与慢性前列腺炎或慢性盆腔疼痛综合征组的男性精浆中 8 种细胞因子和 9 种趋化因子水平, 表明 IL-8 水平是诊断这两种疾病状态的最佳预测指标, 具有高准确性和高敏感性。

目前已有多种检测血清、血浆和细胞培养上清液中白细胞介素(interleukins, ILs)的商售试剂盒,这些试剂盒很可能适用于检测精液的白细胞介素。

3.5.2 试验方案

原理:使用生物素标记的抗人 IL 抗体,借助于酶联免疫吸附法(ELISA)检测白细胞介素。

3.5.2.1 试剂

- 包被缓冲液:0.1mol/L 碳酸钠,pH 9.5。
- 8.4g NaHCO_3 + 3.56g Na_2CO_3 + 1 000mL 蒸馏水(pH 9.5)。
- PBS 缓冲液,pH 7.0。
- 稀释缓冲液:含 10% 胎牛血清的 DPBS 液,pH 7.0。
- 洗涤缓冲液:含 0.05% 吐温 20 的 DPBS 液。
- 底物溶液:四甲基联苯胺(TMB)和过氧化氢(Sigma T0440,使用前制备)。
- 终止液:1mol/L H_3PO_4 或 2N H_2SO_4 。

3.5.2.2 准备试剂

- 包被液:捕获抗体(抗人 IL 抗体)用包被缓冲液稀释。
- A/B 溶液:50 μL 检测抗体(生物素标记的抗人 IL,用适量稀释缓冲液稀释)+50 μL 酶试剂(链霉亲和素 - 辣根过氧化物酶结合物)+12.4mL 稀释缓冲液。可以使用商售抗人 ILs。

3.5.2.3 步骤

- 第 1 天:在酶标板的每个板孔内加入包被缓冲液稀释的抗 IL 抗体,包被酶标板。覆盖酶标板,置 4℃,孵育过夜。
- 第 2 天:每个板孔内加入 300 μL 洗涤缓冲液,洗涤板孔。共洗涤 3 次。
 - 每个板孔加入 200 μL 稀释缓冲液,室温放置 1h。
 - 弃去板孔内的液体。每个板孔内加入 300 μL 洗涤缓冲液,洗涤板孔。共洗涤 3 次。
 - 在相应的板孔内分别加入 IL 标准溶液(0.1pg/mL、1pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、500pg/mL)或精液样本(某些情况下可能需要稀释),室温放置,孵育 2h。
 - 弃去板孔内的液体。每个板孔内加入 300 μL 洗涤缓冲液,洗涤板孔。共洗涤 5 次。
 - 每个板孔内加入 100 μL A/B 溶液,室温放置,孵育 1h^①。
 - 弃去板孔内的液体。每个板孔内加入 300 μL 洗涤缓冲液,洗涤板孔。共洗涤 7 次,每次洗涤至少 30s。
 - 每个板孔内加入 100 μL 底物溶液,室温放置,避光孵育 30min。
 - 每个板孔内加入 50 μL 终止液。

^① 译者注:原文错误,应为加入 100 μL A/B 溶液,而不是苯胺蓝。

- 在30min内,于450nm和570nm处读取吸光度。从450nm处的吸光度中减去570nm处的吸光度。建立标准曲线,读取每个精液样本的吸收值。

3.6 精液中未成熟生殖细胞的评估

生殖细胞包括圆形精子细胞和精母细胞,但精液很少有精原细胞。可以在染色的精液涂片中检测这些细胞,但细胞退化时,很难将生殖细胞与炎性细胞区分开来。《WHO 人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册》第4版表述,精液中未成熟生殖细胞浓度大于 $6 \times 10^6/\text{mL}$ 为异常^[4]。由于该临界值没有以可靠证据作基础,本手册不再用作参考。

用巴氏染色的精液涂片,通常可以将精子细胞、精母细胞与白细胞区分开来^[53]。鉴别主要基于着色、核的大小与形态、细胞内缺乏过氧化物酶,以及缺乏白细胞特异性抗原。多核精子细胞在形态学上容易与多形核白细胞混淆,但其染色呈浅红色,而多形核白细胞偏蓝色^[53]。圆形精子细胞可以通过对发育中顶体进行特异性染色^[222],或用凝集素、特异性抗体^[216,223]来鉴别。

细胞核的大小也有助于鉴别:精原细胞(精液中罕见)的核约为 $8\mu\text{m}$,精母细胞的核约为 $10\mu\text{m}$,而精子细胞的核约为 $5\mu\text{m}$ 。由于退化和分裂会影响核的大小,故上述细胞核的大小仅供参考。

3.7 精子包被抗体的检测

如果精子显示出凝集(例如,活动精子以头-头、尾-尾或混合的形式相互黏附),存在抗精子抗体是一个可能原因。涉及抗精子抗体的几个重要评注如下。

- 没有出现精子凝集,也可能存在抗精子抗体;同样地,除了抗精子抗体,精子凝集也可以由其他因素引起。
- 仅凭存在抗精子抗体,不足以诊断精子自身免疫。有必要证明抗体严重干扰精子功能;通常可以应用精子-宫颈黏液穿透试验来检测。抗精子抗体能够干扰透明带结合和顶体反应,以及抑制精子穿透宫颈黏液^[224]。

精液中的抗精子抗体几乎都是属于两类免疫球蛋白:IgA和IgG。IgM抗体由于其分子量较大,并且主要是在感染急性期行使功能,故在精液中极少出现。IgA抗体可能比IgG抗体具有更重要的临床意义^[225],不过,逾95%抗精子抗体IgA阳性患者中,IgG也呈阳性。应用相关的筛查试验,可以在精子表面或体液中检测出这两类抗体。

- 精子表面抗体的试验(“直接试验”)。以下介绍两种直接试验:MAR试验[见综述, Bronson et al.^[226,227]]和免疫珠(IB)试验^[228,229]。MAR试验采用新鲜精液样本,而IB试验采用洗涤过的精子。这两种试验的结果并不总是一致^[230-233],但IB试验结果与检测血清抗体的制动试验结果具有很好相关性。IB试验和MAR试验的实验方案有些不同,但这两种试验的精子/微珠制备物均在显微镜下检查。微珠黏附于带有表面结合抗体的活动和不活动精子上;记录黏附有微珠的活动精子百分率。
- 检测没有精子的体液(例如,精浆、血清、溶解的宫颈黏液)中抗精子抗体的试验(间接试验)。在这些试验中疑似含有抗精子抗体的体液经热灭活与稀释后,与洗涤去除了精浆、没有抗体的供者精子相孵育。在待测体液中存在的任何抗精子抗体会特异地结合到

供者精子上,然后采用上述介绍的直接试验来检测精子。由于需要 10min 时间可以观察到混合凝集,为了获得可靠结果,让精子 - 抗体相互作用充足时间是重要的。但是应该注意精子活力会随时间下降,而这些试验取决于有活动精子存在。

- 当 50% 或更多的活动精子结合了抗体,精子穿透宫颈黏液和体内受精能力有显著受抑制的倾向^[224,234]。微珠仅黏附在尾尖,与生育力降低无关,有生育力男性中也存在这种情况^[235]。



注解 1:这里介绍的 MAR 试验有商售试剂盒,但 IB 试验没有商售试剂盒;不过,免疫珠可以在实验室中制备。这两种试验取决于有活动精子存在。如果没有足够的活动精子,应该使用检测精浆或血清的间接试验。



注解 2:不能使用这些试验来检测可以杀死全部精子或严重抑制精子活力的细胞毒性抗体。

3.7.1 混合抗球蛋白反应 (MAR) 试验

MAR 试验是一项廉价的、快速和敏感的筛查试验^[236],但它提供的信息少于直接免疫珠试验(3.7.2 节)。

在 MAR 试验,“桥连”抗体(抗 IgG 或抗 IgA)携带包被了抗体的微珠去与精液中未洗涤精子表面的 IgG 或 IgA 相接触。直接 IgG 和 IgA 的 MAR 试验,是用未经处理的新鲜精液与包被 IgG 或 IgA 的乳胶珠(微珠)或处理过的红细胞相混合。向悬浮液中加入特异性的抗人 IgG 或抗人 IgA。微珠与活动精子之间形成混合凝集,提示精子表面存在 IgG 或 IgA 抗体(微珠之间的凝集作为抗体 - 抗原识别的阳性对照)。

3.7.1.1 步骤

1. 充分混匀精液样本,勿产生气泡。
2. 取 2 份 3.5 μ L 重复精液样本,分别滴在 2 张载玻片上。
3. 在每次直接试验,包括 1 张滴上 3.5 μ L 抗精子抗体阳性精液载玻片和 1 张滴上 3.5 μ L 抗精子抗体阴性精液载玻片作为对照。对照精液应该分别从先前直接 MAR 试验显示有和没有抗精子抗体的男性中获取。另一种方法是通过与已知含有抗体的血清孵育来产生阳性精子。
4. 加 3.5 μ L 包被了 IgG 的乳胶珠(微珠)至每滴待测精液和对照精液中,并用移液器吸头搅匀。
5. 加 3.5 μ L 抗人 IgG 抗血清至每滴精液 - 微珠混合液中,并用移液器吸头搅匀。
6. 在混合液上放置盖玻片(22mm $\times$ 22mm),以使液层深度约为 20 μ m。
7. 室温下在湿盒内水平放置玻片 3min(例如,放在带盖培养皿内的浸透水滤纸之上),以避免干燥。
8. 用相差显微镜 3min 后,在 200 或 400 倍镜下检查湿片。10min 后再检查 1 次。
9. 用包被 IgA 的微珠替代包被 IgG 的微珠,用抗 IgA 抗体替代抗 IgG 抗体,重复上述步骤。

3.7.1.2 评定

如果精子表面有抗精子抗体,乳胶微珠会黏附到精子上。开始时看到,活动精子附着几个或一团微珠颗粒在泳动。后来凝集团变得很大,以致严重抑制精子运动。而没有包被抗体的精子在微珠颗粒之间自由地泳动。

这项试验的目的是测定黏附有微珠的活动精子百分率。出现的一个普遍问题是非前向运动精子靠近微珠,但是没有黏附上去。鉴别微珠是否黏附在精子上,通常用一个小的移液器吸头轻轻地叩击盖玻片来检验:微珠移动与活动精子一致,提示有阳性结合。

1. 仅评估活动精子,并测定黏附有 2 个或 2 个以上乳胶颗粒的活动精子百分率。忽略精子尾尖的结合。
2. 每张重复玻片评估至少 200 个活动精子,以达到可接受的低抽样误差。
3. 计算黏附有乳胶颗粒的活动精子百分率。
4. 记录免疫球蛋白的类型(IgG 或 IgA),以及乳胶颗粒结合到精子的部位(头、中段、主段)。



注解 1: 如果 3min 时,100% 的活动精子结合上微珠,将此数值作为试验结果;不需 10min 后再次计数。



注解 2: 如果 3min 时,小于 100% 的活动精子结合上微珠,10min 后再次对该玻片计数。



注解 3: 如果精子在 10min 时不再活动,取 3min 时的数值作为试验结果。

3.7.1.3 正常结果和病理结果之间的界限

目前没有基于可育男性精液 MAR 试验证据的参考值。抗体结合精子的参考值。与所有临床实验室的诊断试验一样,每个实验室应检测足够大数目的正常可育男性精液样本,以确定抗体结合精子的正常参考范围。

3.7.2 免疫珠试验

目前没有商售免疫珠试验试剂盒,这意味着必须在实验室中使用 CNBr 激活的琼脂糖微珠,根据生产商建议的方案,将抗人 IgG 或 IgA 结合到微珠上,以制备免疫珠。实验室还应进行试验系统在实际应用方面的校验和验证。本部分不描述免疫珠产品的生产与控制。

3.7.2.1 直接免疫珠试验

这项试验比 MAR 试验耗费更多的时间,但它提供了去除精浆中可能遮蔽成分的精子表面抗体的信息。

在直接免疫珠(IB)试验中,将包被共价键结合的抗 IgG 或 IgA 的兔抗人免疫球蛋白的微珠直接与洗涤过的精子相混合。带有抗人 IgG 或 IgA 的微珠结合到活动精子上,提示该精子表面有 IgG 或 IgA 抗体。

试剂

- 1. DPBS-BSA 或 Tyrode's-BSA 液(8.4 节)。
- 2. 缓冲液 I :加 0.3g BSA Cohn 片段 V 至 100mL DPBS 液或 Tyrode's 液中。
- 3. 缓冲液 II :加 5g BSA Cohn 片段 V 至 100mL DPBS 液或 Tyrode's 液中。
- 4. 所有溶液经 0.45 μm 微孔滤器过滤,使用前温热至 25~35℃。

制备免疫珠

- 1. 对于每种类型免疫珠(IgG,IgA),在离心管中分别将 0.2mL 免疫珠储备悬液加至 10mL 缓冲液 I 中。
- 2. 以 500g 或 600g 离心 5~10min。
- 3. 倾倒弃去上清液。
- 4. 用 0.2mL 缓冲液 II ,轻轻地重新悬浮免疫珠。

制备精子

这些试验所需的精液体积由精子浓度和前向运动精子百分率来决定,见表 3.4。

表 3.4 用于免疫珠试验的精液体积

精子浓度 /(10 ⁶ /mL)	前向运动精子百分率 (a+b)/(%)	所需精液体积 /mL
> 50	—	0.2
21~50	> 40	0.4
21~50	< 40 > 10	0.8
10~20	> 40	1.0
10~20	< 40 > 10	2.0
< 10 > 5	> 10	> 2.0

- 1. 充分混匀精液样本。
- 2. 吸取所需的精液体积至离心管,并加缓冲液 I 至 10mL。
- 3. 以 500g 离心 5~10min。
- 4. 倾倒弃去上清液。
- 5. 用 10mL 新鲜缓冲液 I ,轻轻地重新悬浮精子团。
- 6. 再次以 500g 离心 5~10min。
- 7. 倾倒弃去上清液。
- 8. 用 0.2mL 缓冲液 II ,轻轻地重新悬浮精子团。



注解 1:使用的精液体积>1.0mL,需要洗涤 3 次。



注解 2:低前向运动精子百分率(例如,10% 或更低)的精液样本也许不能提供明确的结果。在这种情况下,考虑间接免疫珠试验(7.2.2 节)。

步骤

每次试验应该包括抗精子抗体阳性精子和抗精子抗体阴性精子作为对照。对照精液应该分别取自于带有和不带有抗精子抗体的男性,先前用直接免疫珠试验检测过这些精液。

1. 取 5 μ L 已洗涤的待测定精子悬液,滴在载玻片上。
2. 准备 2 张载玻片,分别滴上 5 μ L 抗精子抗体阳性精子悬液和 5 μ L 抗精子抗体阴性精子悬液。
3. 在每个精子悬液滴的旁边,加 5 μ L 抗 IgG 免疫珠悬液。
4. 用移液器吸头将每份抗 IgG 免疫珠悬液与精子悬液滴充分搅拌均匀。
5. 在混合液滴上放置盖玻片(22mm $\times$ 22mm),以使液层深度约为 20 μ m。
6. 室温下在湿盒内水平放置玻片 3~10min(例如,放在带盖培养皿内浸透水的滤纸之上)。由于孵育期间免疫珠的结合会显著减少,故检测玻片前的等待时间不要超过 10min^[237]。
7. 用相差显微镜,以 200 或 400 放大倍数检查玻片。
8. 评定黏附有 1 个或多个免疫珠的活动精子,如 3.7.1.2 节中的描述。忽略精子尾尖结合的免疫珠。
9. 用抗 IgA 免疫珠悬液重复上述步骤。



■ **注解:**为了保证在 10min 内检测全部的结合,最好错开时间制备玻片。

正常结果和病理结果之间的界限与临床解释

目前没有基于可育男性精液 IB 试验的有抗体结合的精子的循证参考值。与所有临床实验室的诊断试验一样,实验室应使用已使配偶妊娠、精液参数正常男性样本定义和确定该实验室的参考值范围。

依照本手册先前版本,当 50% 或更多的活动精子(前向或非前向)黏附有免疫珠,诊断为免疫性不育症,但所建议的阈值水平是源于一项小样本量的研究^[238]。因此,应谨慎对待特定结果,避免将特定结果过度解读为生育力低下原因。免疫珠仅黏附在尾尖,与生育力受损无关,有生育力男性中也存在这种情况^[235]。

3.7.2.2 间接免疫珠试验

间接免疫珠试验用于检测已热灭活、不含精子的体液(血清、睾网液、精浆或菠萝蛋白酶促溶的宫颈黏液)中的抗精子抗体。在这项试验,将不含精子的体液与洗涤过的供者精子一起孵育,使体液中的抗精子抗体与精子结合。无抗体的供者精子吸附了待测体液中的抗精子抗体,然后用直接免疫珠试验来检测。

试剂

见“直接免疫珠试验”的试剂。

如果检测宫颈黏液,要制备 10IU/mL 菠萝蛋白酶,它是一种广谱的蛋白水解酶(EC 3.4.22.32)。

制备免疫珠

见“制备免疫珠”。

制备供者精子

见“制备精子”。

待测患者体液的准备

1. 如果检测宫颈黏液,用 10IU/mL 菠萝蛋白酶液以 1+1 (1:2) 稀释。用移液器吸头搅匀,在 37℃ 孵育 10min。当宫颈黏液完全液化,以 2 000g 离心 10min。立即取上清液测定,或者置于 -70℃ 冻存。

2. 促溶的宫颈黏液、血清、精浆、睾丸液,置 56℃、热处理 30~45min,灭活体液中的补体。

3. 用缓冲液 II 以 1+4 (1:5) 稀释已热灭活的样本(例如,用 40μL 缓冲液 II 稀释 10μL 待测体液)。

4. 包括已知阳性和阴性的样本用作每次间接试验的对照,例如,先前用间接免疫珠试验检测过的有和没有抗精子抗体的男性血清。已经接受过输精管切除术的男性,如果血清阳性(>50% 的活动精子结合了免疫珠,不包括尾尖的结合),可以作为阳性对照血清的来源。

待测定体液样本与供者精子孵育

1. 将 50μL 已洗涤的供者精子悬液,与 50μL 已按 1+4 (1:5) 稀释的待测定体液相混合。

2. 37℃ 孵育 1h。

3. 以 500g 离心 5~10min。

4. 倾倒弃去上清液。

5. 用 10mL 新鲜缓冲液 I,轻轻地重新悬浮精子团。

6. 再次以 500g 离心 5~10min。

7. 倾倒弃去上清液。

8. 重复上述第 5、6、7 洗涤步骤。

9. 用 0.2mL 缓冲液 II,轻轻地重新悬浮精子团。

步骤

1. 用经体液孵育过的供者精子,按照 3.7.2 节的描述进行免疫珠试验检测。

2. 按照 3.7.2 节的描述,评定和解释试验结果。

3.8 附属性腺功能的生化检测

附属性腺分泌液异常可以导致精液质量降低。附属性腺分泌物可以用来检验附属性腺功能,例如,柠檬酸、锌、谷氨酰转肽酶和酸性磷酸酶反映前列腺功能,果糖和前列腺素反映精囊腺功能,游离左旋肉碱、甘油磷脂酰胆碱(glycero-phosphocholine, GPC)和中性 α-葡萄糖苷酶反映附睾功能。

附属性腺的感染有时会引起标志物分泌量的暂时降低,感染也可能造成分泌腺上皮不可逆的损伤,以致急性感染之后分泌功能仍然低^[239,240]。

- 前列腺的分泌能力。精液中锌、柠檬酸^[241]或者酸性磷酸酶^[242]含量是检测前列腺分泌功能的可靠指标,且这些标志物之间存在很好的相关性。3.8.1 节叙述了锌的分光光度检测法。
- 精囊腺的分泌能力。精液中果糖反映精囊腺的分泌功能。3.8.2 节叙述了果糖的分光光度检测法。
- 附睾的分泌能力。左旋肉碱、GPC 和中性 α-葡萄糖苷酶是临床上使用的附睾标志物。在反映附睾病变方面,中性 α-葡萄糖苷酶比左旋肉碱和 GPC 更加敏感和特异^[240]。精

液中的 α -葡萄糖苷酶有两种同工酶:主要的是中性 α -葡萄糖苷酶,仅源自附睾;少量的是酸性 α -葡萄糖苷酶,主要源自前列腺。3.8.3 节叙述了中性 α -葡萄糖苷酶的简易分光光度检测法。

- 精液中任一附属性腺分泌物的总量反映该腺体的整体分泌功能^[83],标志物浓度乘以精液体积得到总量。

3.8.1 精浆锌的测定

3.8.1.1 背景

锌的分光光度检测法可以购买商售的试剂盒,其适用于各种体液微量锌测定并且方法详细、实用^[243],作为较早商售的检测方法也适用于精液^[244],为使用 96 孔板测定仪而进行了改良,其灵敏度为 $4\mu\text{mol/L}$ ^[245]。当使用分光光度仪的 3mL 或 1mL 比色杯时,可以按比例地调整精液和试剂的体积。在计算结果时需作适当的校正。

3.8.1.2 原理

化合物 2-(5-溴-2-吡啶)-5-(*N*-丙基-*N*-硫代丙氨基)-酚(5-溴-PAPS) [2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulphopropylamino)-phenol, 5-Br-PAPS] 与锌结合,产生颜色变化。

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow 5\text{-Br-PAPS-Zn}$ 复合物,其最大吸收光波长为 552nm。

3.8.1.3 试剂

- 储备液
 - 双蒸馏水,用于下列每个批次,总共需要 400mL
 - 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液, pH 为 9.8, 200mmol/L
 - 例如,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)试剂 C3041:将碳酸盐-碳酸氢盐试剂 13 个小包装溶于 325mL 纯水中。
 - 检测 pH 为 9.8。
 - 4℃储存,保质期至少 3 个月。
 - 5-Br-PAPS, 0.7mmol/L
 - 例如,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)试剂 180017 (Mw 537.3):将 19mg 5-Br-PAPS 溶于 50mL 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中。
 - 4℃储存,保质期至少 3 个月。
 - 柠檬酸钠, 850mmol/L
 - 例如,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)试剂 C3674 (Mw Armitage.1):将 11.0g 柠檬酸钠溶于 50mL 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中。
 - 4℃储存,保质期至少 3 个月。
 - 甲磺酸去铁胺, 205mmol/L
 - 例如,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)试剂 D9533 (Mw 656.8):将 96mg 甲磺酸去铁胺溶于 60mL 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中。
 - 4℃储存,保质期至少 3 个月。

- 水杨醛肟, 29mmol/L
 - 例如, 西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich) 试剂 84172 (Mw 137.1): 将 239mg 水杨醛肟溶于 60mL 纯水中。
 - 4℃储存, 保质期至少 3 个月。
- 锌标准液 (50μmol/L)
 - 准备:
 - 溶解 0.288g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 于 100mL 纯水中 (Zn 浓度 10mmol/L)。
 - 将上述溶液稀释 200 倍得到 50μmol/L 储备液 (0.5mL 上述溶液加至 99.5mL 纯水中)。
 - 充分混匀, 2mL 分装于密封管中, 置 -20℃冻存、保质期长达 1 年。
- 标准曲线: 用纯水稀释 50μmol/L 的锌标准液, 得到另外 4 个标准液: 40、20、10 和 5μmol/L (方法详见表 3.5)。

表 3.5 锌测定的推荐标准液

标准液	对应的精浆锌的浓度 /(mmol/L) ^①	锌标准液 50μmol/L /mL	纯水 /mL
40μmol/L	8	0.8	0.2
20μmol/L	4	0.4	0.6
10μmol/L	2	0.2	0.8
5μmol/L	1	0.1	0.9
0μmol/L	0	0	1.0

- 工作液 (测定当日准备)
 - 溶液 A: 通过混合下列试剂进行制备:
 - 碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液, 7.0mL。
 - 5-Br-PAPS 储备液, 4.0mL。
 - 柠檬酸钠储备液, 4.0mL。
 - 甲磺酸去铁胺储备液, 5.0mL。
 - 最终工作液: 通过混合下列试剂进行制备:
 - 溶液 A, 20mL。
 - 水杨醛肟, 5.0mL。
 - 4~8℃储存, 保质期 1 周。
- 应用于内部质量控制的冻存混合精浆: 参照 3.8.4 节。

3.8.1.4 步骤

第 1~3 步最好与果糖 (3.8.2 节) 和 α-葡萄糖苷酶 (3.8.3 节) 测定相同。第 4 步中的稀释样本 1 最好与果糖测定相同。

^① 正如 3.8.1.4 节叙述的稀释系数为 200。在一篇包含约 45 000 例精液标本的资料中, 超过 99.5% 的标本锌浓度低于 8mmol/L [246.Björndahl L. Prevalence of high zinc concentrations in 45 000 ejaculates - Unpublished data. 2021.]

1. 精液分析后,余下的精液标本以 3 000g 离心 10~15min,慢慢吸出去精子的精浆,并储存于 -20℃ 直至分析。
2. 解冻去精子的精浆。同时解冻一份用于内部质量控制的混合精浆(3.8.4 节)。
3. 在涡旋器上充分混匀精浆标本。
4. 标本稀释。未稀释精浆需要使用正向置换式移液器稀释以获得准确的精液体积。总共 1:200 稀释是合适的。此处叙述的两步稀释步骤简化了整个生化检测,因为第一步中的稀释样本 1 也可以用于果糖测定。
 - 稀释样本 1:每一例精浆标本按照 1:40(1+39) 稀释,即两支 1.5mL 试管中分别加入 975μL 纯水,再分别加入 25μL 精浆(使用正向置换式移液器),并用涡旋器混匀 5s。准备好的稀释样本也可以用于果糖测定,无须进一步稀释(3.8.2 节)。
 - 稀释样本 2:第一步中的稀释样本 1 按照 1:5(1+4) 稀释,即 400μL 纯水中加入 100μL 上述第一步 1:40 稀释的精浆(最终稀释比例为 1:200)。此步不必使用正向置换式移液器。
5. 重复取双份 40μL 第二步中的精浆稀释样本 2,加至 96 孔板中。包括双份空白(40μL 纯水)和双份 40μL 的每种标准液。
6. 每孔加 200μL 显色液,在 96 孔板振荡器上混匀 5min。
7. 使用 552nm 波长读取结果^[243]。

3.8.1.5 计算

1. 标准液、被测精浆和质控样本均需要减去背景吸光度值(标准液 0 μmol/L)。
2. 通过比较吸光度值,从标准曲线(μmol/L)上读取标本中的锌浓度。
3. 超过最高标准液浓度的结果是极其不寻常的^[246],但并不表明可能发生临床上的异常,测定值可能不准确,可以报告 >8mmol/L,通常不需要重新测定。
4. 结果乘以稀释系数 200 得到未稀释精浆中的锌浓度(mmol/L)。
5. 每一例精浆标本均要计算双份重复测定结果的平均值:
 - 当结果 >1.5mmol/L 时,重复测定结果的一致性应在 10% 之内,即(两个测定值之差 / 两个测定值的平均值) ≤ 10%。如果不符合,新取双份重复精液样本,重新检测。
 - 当结果 ≤ 1.5mmol/L 时,两个测定值之差超过 0.1mmol/L 的任何差异应该被评估以确定:双份重复样本之一的误差是否预示诊断错误的可能性,或者是否差异与临床诊断不相关。如果有关联,新取双份重复精液样本,重新检测。
6. 每次射精中锌的总量(μmol)= 锌的浓度 × 精液体积(mL)。

3.8.1.6 参考下限值

锌的参考下限值是每次射精 2.4μmol^[245](参考 TG Cooper 未发表的资料)。

3.8.2 精浆果糖的测定

3.8.2.1 背景

以下介绍的方法是基于 Karvonen 和 Malm 的方法^[247],为使用 96 孔板测定仪而进行了改良,其灵敏度为 74μmol/L^[240]。当使用分光光度仪的 3mL 或 1mL 比色杯时,可以按比例调整精液和试剂的体积,在计算结果时需作适当的校正。精液中果糖浓度降低是射精管梗

阻、双侧输精管先天性缺如^[130,131,133]、不完全性逆行射精或雄激素缺乏的特征。

3.8.2.2 原理

在热和低 pH 的作用下，果糖与吡啶形成有颜色的复合物，其吸收光波长为 470nm。

3.8.2.3 试剂

可以购买商售试剂盒测定精浆果糖。或者，配制下列试剂。

- 脱蛋白剂 1 (63μmol/L ZnSO₄):溶解 1.8g ZnSO₄·7H₂O 于 100mL 纯水中。
- 脱蛋白剂 2 (1mol/L NaOH):溶解 0.4g NaOH 于 100mL 纯水中。
- 显色剂 (16μmol/L 苯甲酸盐保护剂中含 2μmol/L 吡啶):
 - 溶解 200mg 苯甲酸于 90mL 纯水中,60℃水浴振荡。
 - 将 25mg 吡啶溶解于上述溶液中,加纯水定容至 100mL。
 - 如果溶液中可见颗粒物,则过滤 (0.45μm 孔径滤器)。
 - 4℃储存。
- 果糖标准储备液 (22.4mmol/L):
 - 将 403mg D- 果糖溶解于 100mL 纯水中。
 - 4℃储存,或者分装后 -20℃冻存。
 - 标准曲线:将 2.24mmol/L 果糖标准液加纯水稀释,得到另外 4 个标准液:1.12、0.56、0.28 和 0.14mmol/L (方法详见表 3.6)。

表 3.6 果糖测定的推荐标准液

标准液 /(mmol/L)	对应的精浆果糖的浓度 /(mmol/L) ^①	果糖标准储备液 22.4mmol/L /μL	纯水 /μL
2.24	89.6	100	900
1.12	44.8	50	950
0.56	22.4	25	975
0.28	11.2	12.5	988
0.14	5.6	6.3	994
0.0	0.0	0	1 000

- 应用于内部质量控制的冻存混合精浆:参照 3.8.4 节。

3.8.2.4 步骤

第 1~3 步与锌(3.8.1 节)和 α - 葡萄糖苷酶测定(3.8.3 节)相同,第 4 步最好与锌测定相同。

1. 精液分析后,余下的精液标本以 3 000g 离心 10~15min,慢慢吸出去精子的精浆,并储存于 -20℃直至分析。

^① 正如 3.8.2.4 节叙述的稀释系数为 40。

2. 解冻去精子的精浆。同时解冻一份用于内部质量控制的混合精浆(3.8.4节)。
3. 在涡旋器上充分混匀精浆标本。
4. 稀释:推荐1:40稀释。如果同时进行锌测定,则用于果糖测定的1:40稀释标本需要进一步稀释以用于锌测定。
- 每一例精浆标本的1:40(1+39)稀释:两支1.5mL试管中分别加纯水975 μ L,再分别加精浆25 μ L(使用正向置换式移液器),并用涡旋器混匀5s。
5. 脱蛋白:向200 μ L 1:40min,然后以大约8000g离心5min。
6. 每份标本取100 μ L上清液移入检测管。包括100 μ L每种标准液(包括空白)。
7. 每支检测管中加入100 μ L叫咪试剂并混匀。
8. 每支检测管中加入1mL浓盐酸(HCl,37% v/v),用实验室可塑性自封膜封闭管口,在通风橱内小心地混匀。
9. 50℃水浴中放置20min。混匀,在冰水中冷却15min。
10. 在通风橱内小心地将双份250 μ L检测管中液体移入96孔板中。
11. 使用实验室透明贴膜密封96孔板,以避免分光光度计受酸液的影响。
12. 在470nm波长处读取结果,用水空白调零。

3.8.2.5 计算

1. 标准液、被测精浆和质控样本均需要减去背景吸光度值(标准液0mmol/L^①)。
2. 通过比较吸光度值,从标准曲线(mmol/L)上读取标本中果糖的浓度。
3. 超过最高标准液浓度的结果并不表明可能发生临床上的异常,测定值可能不准确,可以报告>90mmol/L,通常不需要重新测定。
4. 每例标本的结果乘以稀释系数40得到未稀释精浆中果糖的浓度(mmol/L)。
5. 每一例精浆标本均要计算双份重复测定结果的平均值:
- 当结果>10mmol/L时,重复测定结果的一致性应在10%之内,即(两个测定值之差/两个测定值的平均值) $\leq$ 10%。
- 如果不符合,新取双份重复精液样本,重新检测。
- 当结果 $\leq$ 10mmol/L时,两个测定值之差超过0.5mmol/L的任何差异应该被评估以确定:是否双份重复样本之一的误差预示诊断错误的可能性,或者是否差异与临床诊断不相关。如果有关联,新取双份重复精液样本,重新检测。
6. 每次射精中果糖的总量(μ mol)=果糖的浓度 $\times$ 精液体积(mL)。

3.8.2.6 参考下限值

果糖的参考下限值是每次射精13 μ mol^[245](参考TG Cooper未发表的资料)。

3.8.3 精浆中性 α -葡萄糖苷酶的测定

3.8.3.1 背景

精浆中既含有源自附睾的中性 α -葡萄糖苷酶同工酶,也含有源自前列腺的酸性 α -葡

^① 译者注:根据试验步骤和表3.6,此处修正为0mmol/L。

糖苷酶同工酶。后者可以被十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)选择性抑制^[248], 从而可以测定反映附睾功能的中性 α -葡萄糖苷酶。通过使用抑制剂栗精胺(castanospermine)阻断非葡萄糖苷酶相关底物的分解, 可使测定更敏感。以下所介绍的是使用 96 孔板测定仪的方法, 其灵敏度为 1.9mU/mL^[249]。当使用分光光度计 3mL 或 1mL 比色杯时, 可以按比例调整精液和试剂的体积, 在计算结果时需作适当的校正。

3.8.3.2 原理

葡萄糖苷酶将合成的吡喃葡萄糖苷底物转化为对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, PNP), 加入碳酸钠后变为黄色(405nm 波长)。

3.8.3.3 试剂

检测精液中附睾中性 α -葡萄糖苷酶含量有商品化试剂盒。仅推荐使用含有 SDS 和栗精胺的试剂盒测定精液中附睾中性 α -葡萄糖苷酶。或者, 配制下列试剂。

- 缓冲液 1 (0.2mol/L 磷酸盐, pH 6.8):
 - 溶解 4.56g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 于 100mL 纯水中。
 - 溶解 2.72g KH_2PO_4 ^①于另一份 100mL 纯水中。
 - 将两者大约等体积混合, 至 pH 为 6.8。
- 缓冲液 2: 溶解 1g SDS 于 100mL 缓冲液 1 中。SDS 于 4℃ 储存会发生沉淀, 但稍微加温会重新溶解。
- 显色剂 1 (用于终止反应, 0.1mol/L Na_2CO_3): 溶解 6.20g $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ 于 500mL 纯水中。
- 显色剂 2: 溶解 0.1g SDS 于 100mL 显色剂 1 中。
- 底物对硝基苯酚吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenol glucopyranoside, PNPG) (5mg/mL): 溶解 0.1g PNPG 于 20mL 缓冲液 2 中, 置于 50℃ 的加热板上加热并搅拌约 10min, 有些结晶可能仍然不溶解。使用过程中需将溶液保持在 37℃。每次测定需配制新鲜试剂。
- 用于精液空白的葡萄糖苷酶抑制剂(栗精胺, 10mmol/L):
 - 溶解 18.9mg 栗精胺于 10mL 纯水中。
 - 用纯水稀释 10 倍配制成 1mmol/L 的工作液。
 - 约 1mL 分装, -20℃ 冻存。
- 标准曲线:
 - 产物对硝基苯酚的储备液 (PNP 储备液, 5mmol/L):
 - 溶解 69.5mg PNP 于 100mL 纯水中, 必要时加温溶液。
 - 用铝箔包裹或装在棕色玻璃瓶里, 4℃ 避光储存。
 - 每 3 个月配制新鲜的标准液。
 - 制备标准曲线工作液 (200 μ mol/L 工作标准液, 在孵育的最后 1h 内完成): 加 400 μ L PNP 储备液 (5mmol/L) 于 10mL 容量瓶中, 加显色剂 2 定容至 10mL。
 - 使用显色剂 2 稀释 200 μ mol/L 工作标准液, 得到另外 4 个标准液: 160、120、80 和 40 μ mol/L PNP (方法详见表 3.7)。

^① 译者注: 参考英文版 WHO 手册第 5 版 134 页内容, 此处应为 KH_2PO_4 。

表 3.7 α -葡萄糖苷酶活性测定的推荐标准液

最终 PNP 浓度	对应的精液活性 (mIU/mL)	工作标准液 200 μ mol/L / μ L	显色剂 2 / μ L
200 μ mol/L PNP	124	1 000	0
160 μ mol/L PNP	99	800	200
120 μ mol/L PNP	74	600	400
80 μ mol/L PNP	50	400	600
40 μ mol/L PNP	25	200	800
0 μ mol/L PNP	0	0	1 000

- 应用于内部质量控制的冻存混合精浆:参照 3.8.4 节。

3.8.3.4 步骤

第 1~3 步与锌(3.8.1 节)和果糖测定(3.8.2 节)相同。

1. 精液分析后,余下的精液标本以 3 000g 离心 10~15min,慢慢吸出去精子的精浆,并储存于 -20℃ 直至分析。去精子的精浆可与其他精浆标本混合在一起,为将来测定提供一个内部质量控制的标准样本。

2. 解冻去精子的精浆,在涡旋器上充分混匀。同时解冻一份用于内部质量控制的混合精浆。

3. 在涡旋器上充分混匀精浆标本。

4. 使用正向置换式移液器向两支 1.5mL 试管中分别加入 15 μ L 精浆。包括双份重复空白(15 μ L 纯水)和一式 4 份的 15 μ L 混合精浆内部质量控制样本。

5. 向 2 份内部质量控制样本中分别加入 8 μ L 1mmol/L 栗精胺,以提供精浆空白值。

6. 向每支试管中加入约 37℃ 的 100 μ L PNPG 底物溶液。

7. 涡旋混匀每支试管,37℃ 孵育 2h(准确的温度和时间控制至关重要)。

8. 2h 后,向每支试管中加入 1mL 显色剂 1 以终止孵育,并混匀。

9. 分别移取 250 μ L 样本和标准液至 96 孔板中。

10. 60min 内,使用 96 孔板测定仪在 405nm 波长处读取结果,用水空白调零。

3.8.3.5 计算

1. 通过比较吸光度值,从标准曲线上读取标本产生的 PNP 浓度(μ mol/L)。

2. 超过最高标准液浓度的结果并不表明可能发生临床上的异常,测定值可能不准确,可以报告 >124mIU/mL,通常不需要重新测定。

3. 乘以校正系数(0.619 4),得到未稀释精浆中中性葡萄糖苷酶的活性(IU/L)。

4. 每例标本减去栗精胺精浆空白的活性(IU/L),得到校正的(葡萄糖苷酶相关的)活性。

5. 双份重复测定结果的一致性应在 10% 之内,即(两个测定值之差 / 两个测定值的平均值) $\leq$ 10%。如果不一致,或两个不一致的结果预示不同的诊断结果,重新检测。

6. 每次射精中葡萄糖苷酶的总活性(mU) = 校正的葡萄糖苷酶活性 $\times$ 精液体积(mL)。



注解:1 国际单位 (IU) 的葡萄糖苷酶活性定义为: 在 37℃, 每 min 生成 1 μmol 产物 (PNP)。在这项测定中, 经过 120min 反应, 在 1.115mL 总体积中, 从 15 μL 精浆得出的活性。因此, 校正系数 = (1 115/15)/120 = 0.619 4。

3.8.3.6 参考下限值

中性 α-葡萄糖苷酶的参考下限值是每次射精 20mU^[245](参考 TG Cooper 未发表的资料)。一项 1 262 例无精子的输精管切除术后精液与 1 106 例精子总数 >40 × 10⁶/ 一次射精^①的精液比较研究表明, 最佳切点值为每次射精 23.6mU^{② [250]}。研究也提示, 长时间禁欲后收集的输精管切除术后精液中中性 α-葡萄糖苷酶值升高, 特别是伴有锌含量升高的精液, 表明前列腺 α-葡萄糖苷酶可能对测定有影响^[250]。

3.8.4 应用于内部质量控制的混合精浆

在每一批次精液生化测定中, 系统化使用内部质量控制样本是必要的组成部分。离心后 (3 000g, 10~15min) 得到去精子的精浆, 应该于 -20℃ 冻存直至检测。检测后剩余的精浆可以再冷冻, 用来每年一次或两次制备大量的混合精浆样本, 充分混匀后 (磁力搅拌器, 室温) 足量体积分装以用于批量生化检测。质量控制样本装入密封试管, -20℃ 冻存可长达 12 个月。

新批次混合精浆样本与正在使用的质量控制样本平行测定, 每一样本在至少 3 次不同的测定时设置数个双份重复测定, 从而评估批内和批间检测的变异性, 以确定新批次精浆质量控制样本的整体可接受的变异性。

3.9 射精顺序评估

正常的射精顺序对于精子功能、正常受精能力和胚胎发育具有重要生理作用, 正常顺序是指绝大部分精子在最前面的精液部分、主要和前列腺分泌液一起排出, 而精液的后 2/3 以精囊液为主^[251,252]。研究证实, 在最先接触富含锌的前列腺分泌液后, 精子活力、存活力和染色质稳定性得到提升, 然而最先接触碱性、结合锌的精囊液后, 精子特性则发生相反的变化^[13,253-257]。

前列腺炎性病变或者先天性畸形能够导致射精管进入尿道的开口处或附近狭窄[或者称为射精管梗阻 (ejaculatory duct obstruction, EDO)]^[258-265]。狭窄的后果是精子进入尿道延迟, 直到精囊的收缩压足以驱动射精管内容物进入尿道。实验室常规精液检查主要表现为精子活力降低。即使是全部精液的生化测定, 也不能揭示是否精子异常暴露于精囊液。通过精液检查诊断 EDO 的唯一方法是, 分段收集精液并检测其精子含量、活力和生化成分 (分别为前列腺和精囊腺分泌液成分)^[13]。

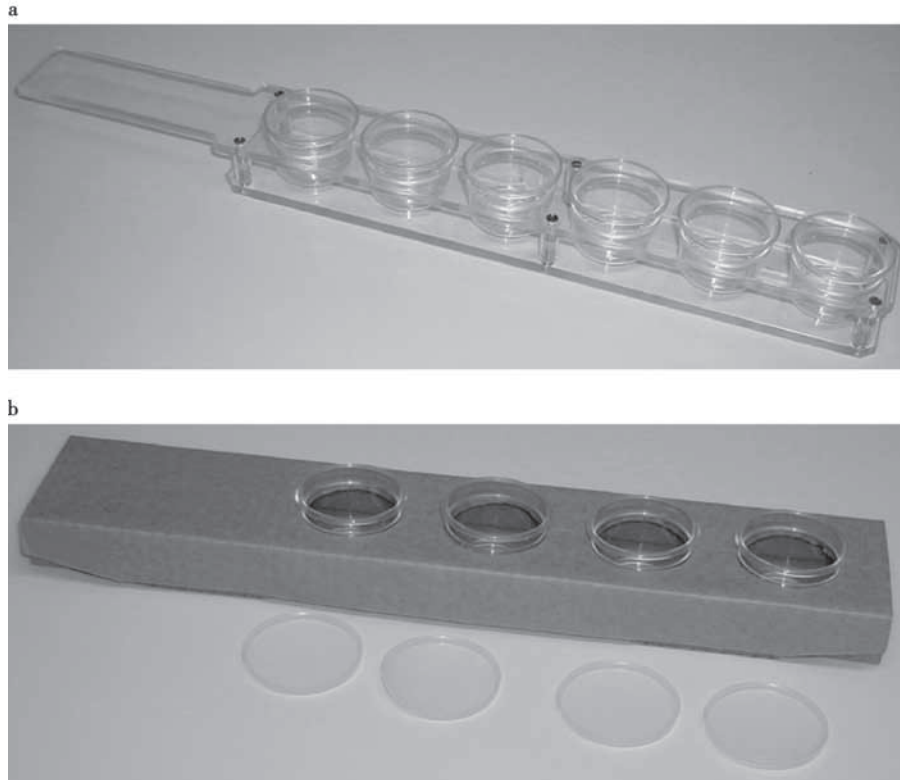
如果射精顺序异常被确诊, 可实施微创外科手术治疗 EDO^[266-272], 也可以通过让患者将全部精液直接收集于精子洗涤液中, 或许可能减少精囊液的负面影响。

① 译者注: 原著 135 页原文为精子数 >40 × 10⁶, 查阅参考文献^[250], 此处修正为精子总数 >40 × 10⁶/ 一次射精。

② 译者注: 原著 135 页原文为 23.1mU, 查阅参考文献^[250], 此处修正为 23.6mU。

3.9.1 除常规精液检查之外的器材(图 3.8)

包括任何一套精液收集装置,其允许患者按照精液射出顺序、分段收集精液。



Reproduced with permission from *A Practical Guide to Practical Laboratory Andrology*, Cambridge University Press^[273].

图 3.8 两种精液分段收集装置

3.9.2 患者步骤

指导患者按照精液射出顺序、分段收集精液,确保患者呈送给实验室的取精杯顺序准确无误。取精杯除粘贴常规识别标签之外,应该按照先后顺序编号。

3.9.3 标本步骤

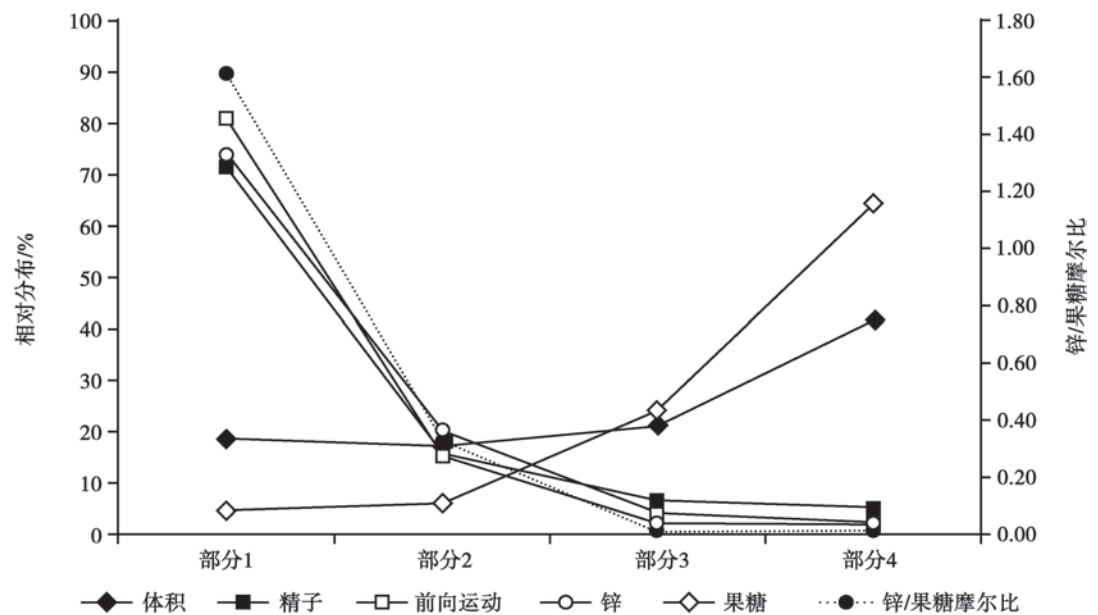
形成凝固或者凝胶状态仅可能发生于精囊腺分泌液为主的部分。前列腺分泌液为主的部分在温度调整至 37℃ 维持 5~10min 后开始检测(测定精子活力)。在 37℃ 下,伴有凝固状态的部分在 30min 内可以液化。缺乏任何前列腺来源的蛋白水解酶的部分,液化过程持续时间可能偏长。

3.9.4 检测

依照完整精液的常规检测方法,进行精液体积、精子计数、活力、锌(前列腺的标志物)和果糖(精囊腺的标志物)的测定。

3.9.5 计算

计算精液体积、精子计数、前向运动精子比例、生化标志物的相对分布,首先计算每一部分的总数,然后计算每一部分的相对分布(图 3.9)。



Reproduced with permission from *A Practical Guide to Practical Laboratory Andrology*, Cambridge University Press^[273].

图 3.9 正常四部分分段精液的结果图示法举例,展示精液体积、精子计数、前向运动精子、锌和果糖的分布

3.9.6 解释

大多数精子预期存在于射精的初始 1/3 部分,其以富含锌的前列腺分泌液为主。如果精囊腺液出现在富含精子的部分,其巨大价值在于表明这是一种可能阻碍精子功能的非生理状况。

鉴定含有良好前向运动精子的精液部分,可能有益于将来实施辅助生殖技术(ART)时精子的选择——一个在 IVF 时代很久以前就已描述的事实^[274]。

另外,在实验室不能测定附属性腺标志物锌和果糖时,通过测定精子计数和前向运动精子的相对分布能够获得有用的信息,以鉴定具有较高受精成功概率精子的可能来源。



第 4 章 前沿性检查

4.1 精液氧化应激和活性氧检测	112
4.2 顶体反应检测	114
4.3 精子染色质检测	118
4.4 精子跨膜离子流动和转运	120
4.5 计算机辅助精子分析 (CASA)	123
4.6 新兴技术	126

男性不育通常是精子数量不足、精子形态异常、精子活力低下或这些因素的组合所造成,这些表型可以借助精液分析准确地识别出来。但是,很多不育患者的精液检查显示完全正常的参数,因此,他们的不育可能是精子功能障碍所致。人类精子功能障碍的潜在机制尚未认识。在女性生殖道内,精子要完成一系列复杂的生理活动,它们必须穿越数厘米的子宫颈,并在这段旅程中受化学与物理信号的诱导,向着卵子位置迁移。此外,精子必须发生超活化运动和顶体胞吐作用,穿透卵子外围的附属物。精子只有在女性生殖道内经历了获能的成熟阶段才得以发挥这些功能作用。然而受精所必需的这些精子功能在传统精液检查中均没有进行评估。

“为深入阐明男性因素不育的生物学基础,目前已经建立了一系列精子功能试验,以评估人类精子要完成受精过程所必需的基本能力。”

为了完善对男性不育的诊断,需要将细胞和分子水平的精子生理学知识转移到临床。此外,鉴于最近文献显示精液参数改变可能与个人健康状况有关,因此,在男性不育领域开展相应研究是非常重要的^[275]。目前还有证据表明,环境污染物在男性不育^[276]以及近数十年观察到的精子数量下降中起着重要作用^[277]。关于受精所需的精子功能是否也是健康状况的反映,以及精子功能是否受到环境污染物的影响,现在知之甚少。随着对调节精子功能分子机制认识的增加,会有助于开发新的诊断试剂。例如,最近数据强调了精子核 DNA 压缩与完整性对人类精子发挥功能性作用的重要性。新证据表明了精子的核 DNA 完整性和染色质组装与生育力存在联系^[278](3.2 节)。

类似地,调节精子功能信号转导途径的研究进展,对开发不育男性精子的诊断试验有着重要意义,而这些试验能够给出精子功能缺陷确切性质的详细信息。为深入阐明男性因素不育的生物学基础,目前已经建立了一系列精子功能试验,以评估人类精子完成受精所必需基本过程的能力,包括精子与卵透明带结合、精子顶体胞吐作用、精子与卵黄膜融合等试验。

一些用于研究的试验,需要将精子从精液中分离或筛选出来。试验操作应尽快完成,至少应在射精后 1h 内完成,以制约精液中非精子的细胞损伤精子。此外,需注意的是,把完整

精液收集到一个样本容器中的传统操作,会导致精子暴露在精囊液等非生理环境中^[251,252](同3.9节)。

4.1 精液氧化应激和活性氧检测

4.1.1 背景

男性生殖道或精浆中氧化还原反应(REDOX)失衡可能损伤生育力的假说已经提出了数十年^[279-283]。目前普遍接受的观点认为,当白细胞产生的活性氧(ROS)在精液中处于高水平时,会对精子产生有害效应(3.4节)。但是,迄今尚无确切证据阐明氧化还原反应与自然妊娠或辅助生殖结局的关系。不过,一般认为氧化应激可能是人类精子功能与妊娠结局的重要调节因素^[284]。由于氧化应激的后果是损伤精子DNA(3.2节),故最常测量精子DNA的损伤,但是还有其他几种研究方法可以更直接地检测抗氧化剂与活性氧的平衡。从临床诊断而言,在有更确切证据显示检测方法 with 诊断存在联系之前,应该谨慎地使用和解释这些检测方法。本部分描述的方案已广泛应用于男科学研究,在一些男科临床诊断和辅助生殖实验室也有使用。检测氧化还原平衡或活性氧的方法,以及检测ROS的类型有多种不同方案。

4.1.2 鲁米诺试验

这项测试基于鲁米诺与自由基作用时可产生化学发光反应。这种反应可以通过光度计测量,并计算每 10^6 精子的相对光单位数(RLU)。

4.1.2.1 步骤

摘自Dias^[285]:

1. 制备100mmol/L鲁米诺(5-氨基-2,3-二氢-1,4-二氮杂萘二酮)储备液:在聚苯乙烯试管中,将177.1mg鲁米诺溶于10mL二甲基亚砜(DMSO)。由于鲁米诺溶液对光敏感,故用锡箔纸包裹试管。鲁米诺溶液在室温下是稳定的,也可以储存在冰箱中。

2. 工作探针溶液:20 μ L鲁米诺储备液加至380 μ L DMSO中,配制成含5mmol/L鲁米诺的DMSO溶液。该溶液配制后立即使用(仅稳定24h),并且必须避免光照。

3. 测量前,精液应充分液化(应少于30min,但按照WHO手册中精液检查方法,不超过1h)。

4. 用分光光度计测量重复样本(作为绝对最小值)。

- 每份精液取390 μ L在试管中与10 μ L工作探针液混匀。涡旋混匀5s,然后分装到至少两个测量管(或酶标板的孔)

5. 所有实验应进行以下步骤:

- 用DPBS或仅是培养液为空白对照
- 用390 μ L DPBS或培养液加入10 μ L工作探针液作为阴性对照
- 阳性对照:同时加入50 μ L过氧化氢(30%)和10 μ L工作探针液,以及
 - 精液(340 μ L)或
 - DPBS或培养液(340 μ L)

6. 应根据仪器类型,按照每个分析样本的等距和顺序进行多次读取数据,并且使用重

复样本重复一次,然后计算平均值。

7. 阳性对照可以通过梯度稀释来评估特定检测批次的检测灵敏度,也可以在出现有意义检测结果时,对给定的试验批次进行确认。

8. 应该用样本均值减去阴性对照均值进行数据常规处理。可以通过除以 $10^6/\text{mL}$ 的精子浓度来换算为每个精子的相对光单位,但目前尚不清楚每个精子的结果是否比每份样本的结果更有意义,因此这两个结果都可以报告。

4.1.2.2 影响结果的问题

- 鲁米诺试验通常不用于体外诊断,仅用于研究。
- 不同的仪器设计(例如,测量不同样本体积),由此产生的校准、灵敏度、测量范围甚至使用单位都有很大差异。
- 由于上述所介绍的仪器与方法学之间差异,以及低质量的预后研究,目前该试验没有一致的参考值。
- 由于剪切力或混合会改变信号,故检测结果对样本处理和测量时间非常敏感。
- 鲁米诺对 pH、温度变化和化学物质干扰非常敏感,而两次射出精液之间的化学物质差异,例如抗坏血酸(减少信号)或含硫醇分子(增加测量值)和其他存在的蛋白质水平通常差异很大。

4.1.3 氧化还原电势检测

这项测试是基于电化学方法直接测量样本的氧化还原平衡。由于组合样本的完整测量需要很少操作,因此能够做到相当程度的标准化,目前这一方法在生育力低下的很多研究得到应用。市场上现在仅有一款受专利保护的仪器。该仪器采用一次性传感器测量,使用时应按照厂商最新的操作流程,本手册对此不予讨论。

4.1.3.1 影响结果的问题

- 本项测试缺乏基于已发表的有力证据,在测试与生殖结局关联的结论性数据出现之前,该测试仍被视为一种研究性试验。
- 精液样本黏稠度和液化不良会影响样本流动性,从而影响填充参比室。
- 对于所有精液样本检测,射精后分析的时间应该标准化。

4.1.4 总抗氧化能力检测

这项测试是用来检测整份精液平衡氧化应激的能力。因此,该测试评估精浆中抗氧化酶和抗氧化体系的能力,以及源于食物的抗氧化剂或其他最终进入精浆的抗氧化剂(不是精子,离心除去了精子)。在该测试,样本中的抗氧化剂抑制 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)中阳离子自由基的氧化^①。该测试已应用于多种体液的检测,并不是只针对精液的测试^[286]。Trolox 是维生素 E(生育酚)的类似物,用来建立标准曲线范围,故该测试通常以 μmol Trolox 当量来表示。该测试用比色计读数,因此需要一个合适的分析仪。

^① 译者注:原文为“2'-azinobis-(3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid”,经查 ABTS 英文全称为“2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)”。

4.1.4.1 步骤

1. 该测试广泛应用于包括生殖系统在内的很多系统,具体检测方法可以从很多供应商的预包装试剂盒中获得。应该按照相应试剂盒的指南进行操作,也可以分别购买单独成分来构建试剂盒。

2. 精液充分液化后,以大于 1 000g 离心 15min,取上清液。取 10 μ L 精浆观察,确定不存在精子。如果有精子,需要再次离心。

3. 上清液可以分装,直接冻存,应用于后续分析,这样可能有利于多批次分析。在任何给定的冻结温度下,实施测量的实验室应对检测结果稳定性进行检查和验证。

4. 在检测前,用于测量的所有试剂应提前置于室温。测量所用的试剂都对光敏感,因此,在实验准备和操作期间,应尽可能减少光照的影响,例如关闭实验室的灯光。

5. 检测样本应该一式两份(取绝对最小值),在 750nm 读取吸光度。

4.1.4.2 影响结果的问题

- 已有一篇数据充分、定义清晰的确切文献指出,实验步骤和试剂可以影响整个系统的结果^[287]。但是,在本试验未得出男性精液参数和活性氧对生育力影响的可靠医学结论之前,该试验仍被视为一种研究性试验。
- 由于仪器与方法学之间差异,以及低质量的预后研究,目前该试验没有循证参考值。
- 由于重复样本和标准品的数目,在合适情况下,应使用酶标仪读取分析结果。

4.2 顶体反应检测

4.2.1 背景

精子顶体结构完整性和顶体胞吐能力是正常受精所必需的。顶体反应是精子在体内靠近卵子时发生的过程,精子必须发生顶体反应才能穿透卵子外围附属物与卵子融合。钙内流是正常顶体反应的起始活动。在畸形精子症和少精子症患者中,尽管一些患者的精液分析结果可能正常,但是他们的精子可能存在顶体结构或者诱发顶体反应能力的缺陷^[288]。

目前已知多种刺激物可以诱发顶体反应,其中透明带结合蛋白^[289]和孕酮^[290]在靠近卵子的浓度高,因此被认为是顶体反应的可能生理诱导剂。其他的刺激物,如钙离子载体可以诱发顶体反应,但其结果与卵透明带诱发的顶体反应没有关联或很少关联^[291]。最近一项荟萃分析显示发生诱导顶体反应的精子百分率与受精率显著相关^[288]。诱发顶体反应后的顶体状态检测,可用荧光标记的凝集素如豌豆凝集素(4.4.1节)、花生凝集素或顶体抗原 CD46 的单克隆抗体^[293],通过显微镜或流式细胞仪^[292]分析结果。使用诱导剂引发钙内流是检测已获能精子发生顶体反应能力的一种试验^[294,295]。然而,将顶体状态检测作为一种临床常规检查,还需要进一步的确认和评估。

本部分描述顶体状态的静态评估和动态诱发顶体反应的操作步骤。

4.2.2 顶体状态评估

4.2.2.1 步骤

检测顶体状态的方法最早由 Cross 开发^[296],在 Mortimer 等显示花生凝集素(FITC-PNA)结合精子顶体外膜的研究基础上^[297],建立了这项试验。后来经 Aitken 等改良^[294],采用低渗膨胀试剂评价活精子的顶体反应(2.5.13.2 节)。该方法简单,并且可以重复和获得很清晰图像(见图 4.1)。建议使用精子制备技术除去白细胞、生精细胞和死精子等污染物,以获得高活力精子。因此,需根据精液样本质量和施行的研究方案,对精液样本进行洗涤(5.3 节)、上游或者密度梯度离心(5.4 节和 5.5 节)处理。

4.2.2.2 试剂

- PSA-FITC:用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的豌豆凝集素(*Pisum sativum* agglutinin, PSA)
- AHL-PNA-FITC:用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的花生凝集素(*Arachis hypogaea*)。
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS), pH 7.4
- 0.9% 氯化钠溶液(9g/L):将 0.9g 氯化钠溶解于 100mL 纯净水中。
- 95%(v/v)乙醇溶液。
- PSA 和 AHL-PNA 储存液:将 2mg PSA-FITC 或 AHL-PNA-FITC 溶解于 4mL DPBS 中,以每管 0.5mL 分装,冻存于 -20℃。
- PSA 工作液:将 0.5mL PSA 储存液稀释于 10mL DPBS 中,储存于 4℃ 备用。可存放 4 周。

4.2.2.3 简单精子洗涤

1. 充分混匀精液样本,取 0.2mL。
2. 用 0.9% 的氯化钠溶液(9g/L)稀释至 10mL。
3. 以 800g 离心 10min。
4. 弃去上清液,仅留下 20~40μL 上清液。
5. 轻柔吹打,将精子沉淀团重悬于留下的上清液中。
6. 重复以上精子洗涤操作步骤。

4.2.2.4 已纯化精子的处理

1. 用培养液将上游(5.4 节)或经过一次密度梯度离心(5.5 节)的精子悬液稀释至 10mL,达到 $10 \times 10^6/\text{mL}$ 的浓度。
2. 以 800g 离心 10min。
3. 弃去上清液,仅留下 20~40μL 上清液。
4. 用低渗膨胀液将精子沉淀团重悬,处理 30min。
5. 以 800g 离心 10min。
6. 弃去上清液,在少量培养液中轻柔吹打,重悬沉淀团。

4.2.2.5 制备精子涂片

1. 取 5 μ L 精子悬液,制成约 1cm 长的精子涂片,共做 2 张重复涂片。
2. 在 400 倍相差显微镜下观察湿涂片。
3. 确保精子均匀分布在玻片上,不聚集。
4. 空气中干燥玻片。
5. 95%(v/v)乙醇固定 30min。
6. 空气中干燥玻片。

4.2.2.6 PSA-FITC 染色

1. 加 10mL PSA-FITC 或 AHL-FITC 工作液到垂直染色缸中。
2. 将已固定并空气干燥的涂片浸入 PSA-FITC 染液中。
3. 4 $^{\circ}$ C,染色 1h 以上。染色时间延长至 18h 并不影响 PSA 结果,但染色时间不足 1h 难以评估玻片。
4. 用纯净水洗涤每张玻片,并且用水溶性封片剂封片(2.4.9.5 节)。

4.2.2.7 评估

用 450~490nm 激发光和合适的双色滤光片组合,在荧光显微镜的 1 000 倍油镜下,观察涂片上精子的荧光状况。

精子分类如下:

- 顶体完整的活精子:精子尾部卷曲,头部一半以上荧光染色明亮且均匀(图 4.1)。
- 已发生顶体反应的活精子:精子尾部卷曲,仅在赤道带出现荧光带,或者整个顶体区没有荧光染色(图 4.1)。

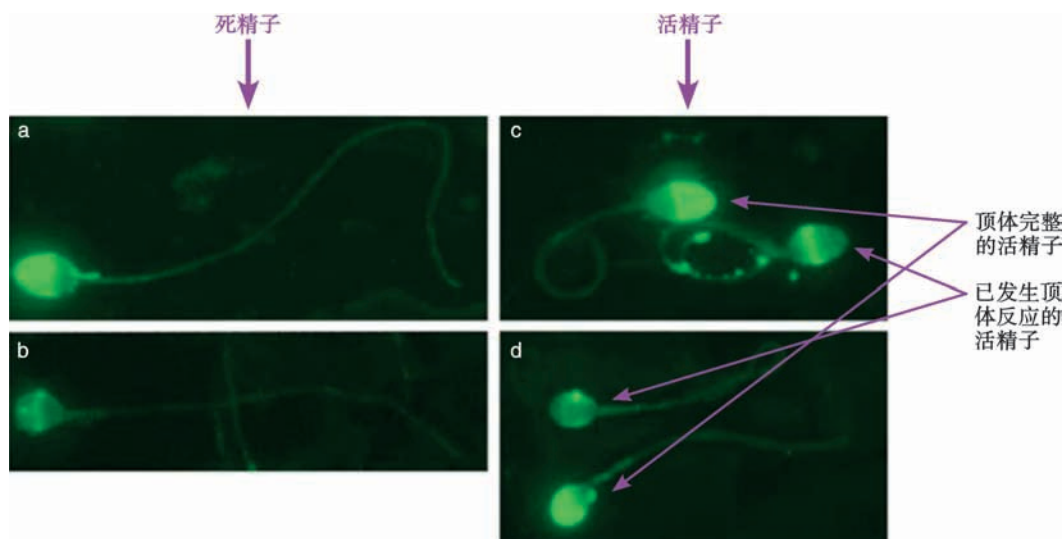


图 4.1 FITC-PNA 染色的顶体完整和已发生顶体反应的活精子和死精子

图示顶体完整精子头的前部(顶体区)荧光染色和已发生顶体反应精子赤道带和顶体后区荧光染色。精子经低渗膨胀处理后尾部卷曲显示精子是活的(同 2.5.13.2 节)。

- 这项试验通常不评价死精子,不过同时检测死精子的百分率可以纠正试验人员之间实施的操作或评估错误。死精子百分率应与原始精液的死精子百分率没有显著差异。

4.2.2.8 已发生顶体反应精子的计数

1. 借助实验室计数器的记录,计数每种顶体类型精子(顶体完整和已发生顶体反应)的数目。
2. 每张重复涂片评估 200 个精子,以达到可接受的低取样误差。
 - 计算 2 张重复涂片已发生顶体反应精子百分率的平均值和差异。
 - 根据表 2.3 来确定差异的可接受性,仅由取样误差导致两个百分率之间的最大差异应在 95% 置信区间内。
 - 如果两个百分率之间的差异是可接受的,报告已发生顶体反应精子的平均百分率。如果差异太大,则重新评估两张涂片。
 - 以最接近的整数报告已发生顶体反应精子百分率。

4.2.3 诱发顶体反应试验

使用钙离子载体(钙离子载体诱发的顶体反应,ARIC)^[298]、孕酮(孕酮诱发的顶体反应,ARPC)^[290]或其他刺激物可以诱发顶体反应。

4.2.3.1 试剂

- 含 3.0% (30g/L) BSA 的 sEBSS 平衡盐溶液(sEBSS,见 8.4 节)。



注解:如果使用孕酮诱导,应使用脱脂或活性炭吸附处理过的血清,以避免其他脂溶性分子(包括激素)污染的效应。

- 二甲基亚砜(DMSO)。
- 钙离子载体 A23187 储备液(浓度为 1mmol/L):将 5.23mg 的 A23187 溶解于 10mL 的 DMSO 中。或者使用 2~10 μ g/mL 孕酮^[299]或其他顶体反应诱导剂^[288]。



注解:可能有法律要求,使用离子载体前应谨慎评估其安全预防措施和风险。

- 70% (v/v) 乙醇。

4.2.3.2 步骤

1. 新鲜精液放置 30~60min,使之完全液化。
2. 每次检测前,配制新鲜的 sEBSS 诱导获能培养液。
3. 培养液使用前应预热至 37 $^{\circ}$ C,最好置于含 5% (v/v) CO₂ 培养箱内预热。
4. 用新鲜的 sEBSS 培养液,通过密度梯度法(DGC) (5.5 节)或上游法除去如白细胞、生精细胞和死精子等污染物,获得高活力精子团。
5. 准备 1 个对照管和 2 个重复检测管,每管约 1mL 精子悬液,内含 1×10^6 个活动精子。

6. 将精子悬液在 37℃, 5% CO₂ 空气培养箱内孵育 3h 诱导获能(拧松管盖, 使气体交换)。如果没有 CO₂ 培养箱, 可以用 HEPES 缓冲培养液(8.4 节), 拧紧管盖, 在 37℃ 孵育。

7. 向 2 个重复检测管中加入 10 μL A23187 储存液(1mmol/L), 使其终浓度为 10 μmol/L。

8. 对照管中加入 10 μL DMSO。

9. 全部管置于 37℃ 孵育 15min。

10. 从每管中取出少量悬液评估精子活力。

11. 后续步骤同精子处理(4.2.2.4 节)

已描述了精子制备过程(4.2.2.5 节和 4.2.2.6 节)、评估(4.2.2.7 节)和计数(4.2.2.8 节)。

4.2.3.3 质量控制

- 每次试验必须有阳性对照样本(精子取自先前对离子载体或孕酮反应良好的男性精液样本)。
- 在新配制的染料应用前, 为确保每批新配制的染料配制适当, 必须用已知阳性反应的质控精子同旧染料一起进行交叉试验。

4.3 精子染色质检测

4.3.1 背景

精子染色质结构稳定性对胚胎发育与质量至关重要, 这可能关系到父本基因组保护和基因组迅速启动活动^[300]。在辅助生殖中, 精子染色质结构紊乱与低受精率有关^[301]。精子染色质结构异常可能引起精子 DNA 损伤, 例如, DNA 压缩错误(如组蛋白被鱼精蛋白异常替换)导致 DNA 双链或单链断裂。精子染色质正常性可以通过测量 DNA 链断裂(3.2 节)、染料结合组蛋白(苯胺蓝)或核酸(色霉素 A3)进行评估, 并用组织学方法或流式细胞术检测。

4.3.2 苯胺蓝试验

苯胺蓝(AB)可以结合组蛋白的赖氨酸残基。苯胺蓝试验能够检测整份精液或筛选的精子[上游或密度梯度离心制备(5.5 节)]中苯胺蓝染色精子的百分率(图 4.2)。

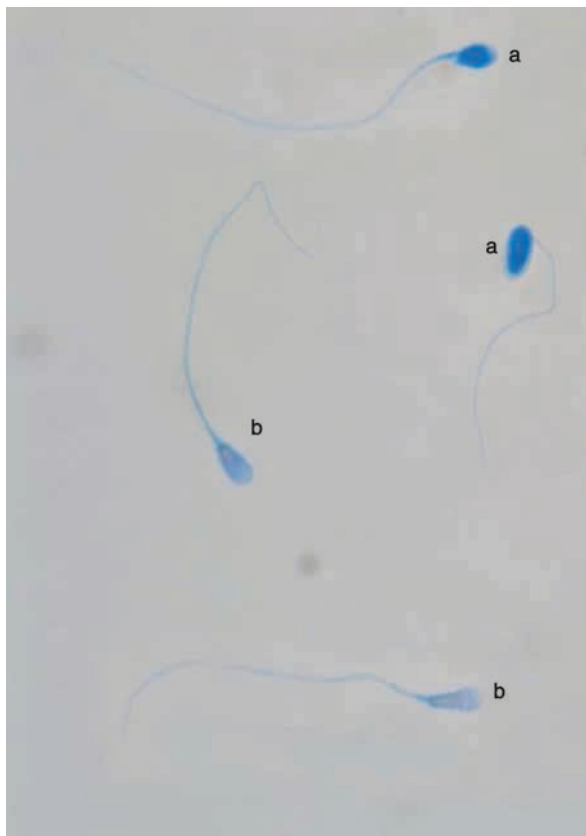
4.3.2.1 试验方案

试剂

- 苯胺蓝(AB)粉末溶于含 4% 冰醋酸(pH 3.5)的水中, 终浓度为 5%。

步骤

1. 取 1×10^6 个精子(如果不够 10^6 个精子, 则不少于 20 万个精子)。
2. 如果是整份精液样本, 可用任何一种精子培养液, 室温下以 500g 离心 5min, 洗涤两次(5.3 节)。如果是筛选的精子, 以 500g 离心 5min, 洗涤一次。
3. 弃去上清液, 取 50 μL 4% 多聚甲醛(终浓度: 20 万个精子/10 μL)加至精子沉淀团, 室温下固定 30min。
4. 取 10 μL 样本液制成玻片, 空气中干燥。
5. 将玻片置于苯胺蓝溶液中, 室温下浸 7min。



From Marchiani et al. [302]

图 4.2 光学显微镜下苯胺蓝阳性(a)和苯胺蓝阴性(b)精子(1 000 倍油镜)

6. 用水洗涤玻片两次,以去除多余的染料。
7. 将玻片置于空气中干燥。
8. 在光学显微镜下,用油镜(100 倍物镜和 10~12.5 倍目镜)观察。评估至少 200 个精子。

4.3.2.2 影响结果的问题

- 样本有时候可能难以评估。特别是在精子凝集的情况下,不容易进行分析。
- 实验观察者决定着评估结果。

4.3.3 色素酶 A3 试验

色素酶 A3 (CMA3) 与鱼精蛋白竞争性结合 DNA 双螺旋的小沟槽。

色素酶 A3 试验能够检测整份精液样本或上游法筛选的精子中 CMA3 染色精子的百分率。

4.3.3.1 试验方案

试剂

1. 制备 CMA3 储备液:

- 制备 McIlvaine 缓冲液(制备 20mL, 室温下储存)。
 - 将 16.47mL 的 0.2mol/L Na_2HPO_4 溶液和 3.53mL 的 0.1mol/L 柠檬酸溶液加在一起。
 - 加入 MgCl_2 , 使其终浓度为 10mmol/L, pH 应为 7.0。
- 将 5mg CMA3 粉末溶解于 10mL McIlvaine 缓冲液中, 得到 $2 \times$ 储存液。CMA3 储存液分装后, 置 -20°C 保存。
- 2. 使用时, 将精液与 McIlvaine 缓冲液以 1:1 等体积混合, 使 CMA3 终浓度为 0.25mg/mL。

步骤

1. 取 1×10^6 个精子(如果不够, 则不少于 40 万个精子)。
- 如果是整份精液样本, 可用任何一种精子培养液, 室温下以 500g 离心 5min, 洗涤两次(5.3 节)。
- 如果是筛选的精子, 以 500g 离心 5min, 洗涤一次。
2. 弃去上清液, 取 50 μL 4% 多聚甲醛(终浓度: 20 万个精子 / 10 μL) 加至精子沉淀团, 室温下固定 30min^①。
3. 取 20 μL 样本, 室温下以 300g 离心 7min。
4. 弃去上清液, 用 DPBS 洗涤一次, 室温下以 300g 离心 7min。
5. 弃去上清液, 加入 100 μL CMA3 溶液(0.25mg/mL), 室温下孵育 20min。
6. 加入 200 μL McIlvaine 缓冲液, 室温下以 300g 离心 7min。
7. 弃去上清液, 将沉淀团用 10 μL McIlvaine 缓冲液重悬, 将重悬液滴在玻片上。
8. 将液滴置于空气中干燥, 加上一滴 DPBS, 覆盖上盖玻片。
9. 用荧光显微镜(激发光波长: 445nm, 发射光波长: 575nm), 在 1 000 倍油镜下观察。评估至少 200 个精子。

4.3.3.2 影响结果的问题

- 样本有时候可能难以评估。特别是在精子凝集或荧光背景的情况下, 不容易进行分析。
- 实验观察者决定着评估结果。

4.4 精子跨膜离子流动和转运

4.4.1 背景

对精子中的离子跨膜流动和转运的功能分析, 可能是寻找诊断工具以更好地了解男性因素不育和男性生殖器官疾病的一个方向。精子定向运动、获能、超活化和顶体胞吐等受精子内 pH(pH_i)、膜电压(V_m)和细胞内 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)变化的精密调控。这些信号事件由独特的、主要是精子特异性离子通道、交换器和转运体的相互作用所介导, 例如, CatSper Ca^{2+} 通道、Slo3 K^+ 通道、 $\text{H}_v 1\text{H}^+$ 通道、 Na^+/H^+ 交换体(sNHE、NHA1、NHA2)、 Ca^{2+} ATP 酶(PMCA4)和 Mg^{2+} 转运体(CNNM2、CNNM4)。不明原因精子功能障碍的很多病例, 可能是由于这些蛋白质中一种或多种的功能缺陷所致。支持这一观点的证据有, 影响 CatSper

^① 译者注: 原文中“40 万个精子 / 10 μL ”错误, 按前述步骤计算应为“终浓度: 20 万个精子 / 10 μL ”。

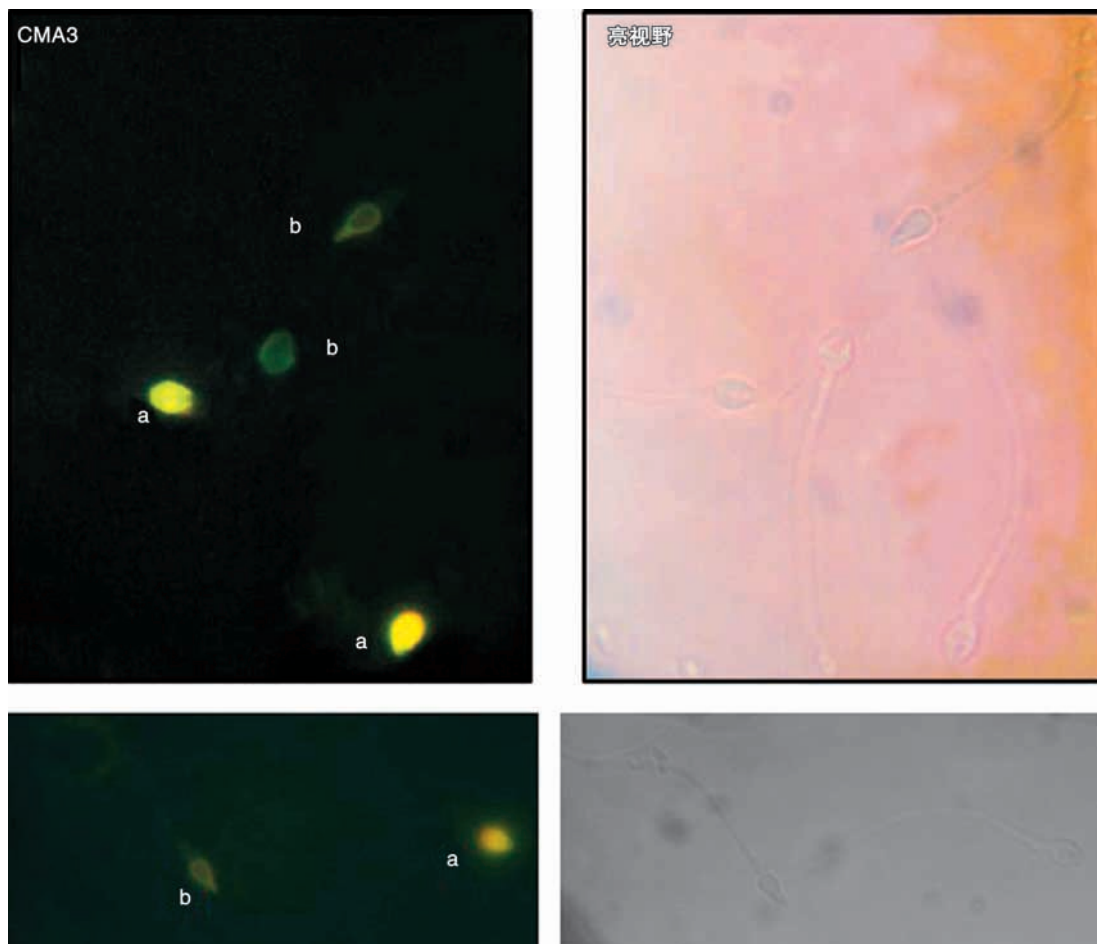


图 4.3 CMA3 阳性(a)和 CMA3 阴性(b)精子(左图)

右图(亮视野下),在同一视野中观察到 CMA3 阴性精子。

引自 Marchiani 等^[303]。

基因功能的遗传异常、CatSper 功能或表达缺陷以及 K^+ 通道功能缺陷与男性不育存在联系^[304]。目前,尚缺乏常规诊断方法来检测患者精子中离子通道、交换器和转运体的功能。然而,在临床研究的体系内,已经建立了试验方案来检测患者精子中(低或中等通量)离子通道的活性。

4.4.2 评估 CatSper 功能的电生理学和动态 Ca^{2+} 荧光测量术

精子特异性、孕酮激活的 CatSper 通道调控 Ca^{2+} 流入鞭毛,从而影响精子泳动。CatSper 功能缺失与男性不育和 IVF 失败有关^[304-307],这表明 CatSper 功能缺失的精子只能应用 ICSI 受精。

CatSper 蛋白在人类精子中的功能可分别通过电生理学和动态 Ca^{2+} 荧光测量术进行研究。活动精子可采用上游法或密度梯度离心法(DGC)纯化。人类精子 CatSper 电流的电生理记录是在无二价阳离子溶液中、全细胞模式下进行的,玻璃电极则置于精子胞质小滴或颈部区域。一旦建立起千兆欧姆(电阻的测量单位, $G\Omega$)封接以及全细胞模式,膜电

压去极化可以诱发典型的 CatSper 电流。CatSper 电流没有明显衰减则提示 CatSper 功能紊乱。

测量 Ca^{2+} 荧光时,精子悬浮液中加入 Ca^{2+} 荧光指示剂(例如 Fura-2 或 Fluo-4),孵育后,离心去除精子外过量的指示剂,并用新鲜缓冲液重悬精子,再通过检测荧光发射强度监测悬液中精子的胞内钙离子浓度,例如,使用荧光板读取器或光谱仪分别在微孔板或比色皿中进行检测。在微孔板或比色皿中加入 CatSper 激动剂(例如孕酮、前列腺素)、缓冲液(阴性对照)和 Ca^{2+} 离子霉素(一种 Ca^{2+} 离子载体,阳性对照)前、后,记录 Ca^{2+} 指示剂所激发出的荧光值。如果加入 CatSper 激动剂未能增加荧光值(代表胞内钙离子浓度),而加入 Ca^{2+} 离子霉素能增加荧光值,则提示 CatSper 功能缺失。最近,应用这项技术检出了 2 例不育患者患有 CatSper 功能缺失。遗传学诊断表明,CatSper 功能缺失导致的不育是由于遗传畸变影响了 *CatSper* 基因所致。值得注意的是,单精子胞内钙离子浓度成像图可用于研究患者精子中 CatSper 的功能,以获得关于单个精子的信息,如应答细胞的比率和细胞亚群的状况。这项研究表明,低生育力患者中常见孕酮敏感性减退,而且孕酮敏感性减退与受精率相关^[308]。

4.4.3 电生理和荧光测量术研究钾离子通道功能

人类精子中 K^+ 通道(如 Slo3)的功能,可分别应用全细胞膜片钳技术及 V_m (膜电位)荧光测量术针对低和中等通量进行研究。Slo3 代表人类精子中的主要 K^+ 通道。Slo3 能被 Ca^{2+} 激活,故可将人类精子的膜电位设定为钙离子浓度依赖的模式。

在全细胞模式进行电生理记录中,使用抑制 CatSper 电流的二价阳离子细胞外溶液和高 K^+ 电极内液,通过膜电位去极化可以诱发典型的 Slo3 电流。这种检测方法检出了数例 K^+ 通道活性异常、静息膜电位去极化、且 IVF 受精率低的患者。

检测精子中 K^+ 通道活性的中等通量筛查法取决于电压敏感荧光指示剂。通过细胞外液与细胞质之间的膜电位依赖性再分配,电压敏感荧光指示剂将激发的荧光强度变化转化为膜电位变化。筛查时,从精液中纯化或稀释的精子与指示剂先一起孵育几分钟,然后分别使用荧光板读取器或分光计,在微孔板或比色皿中记录样本的荧光强度,或使用流式细胞术在单细胞水平上记录荧光量。随后,用 K^+ 离子载体缬氨霉素和含有不同 K^+ 浓度的溶液刺激精子。缬氨霉素使膜电位处于与 K^+ 对应的能斯特(Nernst)电位。因此,荧光强度可以转换为膜电位值,从而可以量化精子的静息膜电位(V_{rest}),即为 K^+ 零点校准。有几项研究使用这种方法测定了精子的静息膜电位,由此间接评估了人类精子中的 K^+ 通道活性,提示精子的静息膜电位与 IVF 受精率之间存在联系。

4.4.4 检测离子转运体和交换器功能(障碍)的方法

迄今为止,尚不具备合理通量、能够检测人类精子中离子转运体和交换器活性的技术。因此,离子转运体和交换器在精子功能障碍中的作用仍未阐明。

4.4.5 小结

在过去十年中,新兴技术已经显示出精子功能与后续受精是由一组独特的、主要是精子特异性的离子通道、转运体和交换器协调控制的。但是,常规精液分析不能检测到这些关键

信号元件的功能障碍。对于这些蛋白质中,大多数尚缺乏蛋白质功能的测试,而且目前检测 CatSper 或 Slo3 功能的技术要求太高,难以在临床实验室实施。因此,为了深入了解精子功能障碍的潜在病理学机制,需要一组可以很好整合到当前精液分析体系中的新颖、易于使用的测试方法。

4.5 计算机辅助精子分析(CASA)

4.5.1 使用 CASA 评估精子活力

4.5.1.1 背景

CASA 系统能够检出和分析活动细胞,很适宜应用于精子动力学分析,由于活动精子百分率的估值取决于测定的不活动精子数目,而细胞碎片有可能与不活动精子相混淆,故 CASA 系统评估活动精子百分率可能是不准确的。

影响 CASA 分析仪性能的因素很多,例如样本制备、帧率、精子浓度和计数池深度^[45,46,136,309,310]。尽管如此,如果遵循适当的程序步骤,还是可以获得可靠和可重复的结果^[309]。应参照 CASA 分析仪的使用指南进行操作^[311,312],所有操作人员都应接受规范 CASA 分析仪使用培训,以及了解这项技术的长处与不足。

在使用 CASA 分析仪获取精子运动参数时,每个样本应分析至少 200 个活动精子的运动轨迹。这意味着需要检测更多的精子。如果要按运动类型对精子分类,或者计划对一份样本中的变量进行其他分析,则需要检测至少 200 个精子,如果可能的话,最好分析 400 个活动精子的运动轨迹。

CASA 分析仪应该与可以进行数据整合和统计学分析的计算机软件相连接。很多运动参数的分布不是正态分布的。因此,中位数而不是平均值更适合作为描述非正态分布资料集中趋势的指标。在进行某些统计学分析之前,可能需要对单项精子参数的测量值进行数据转换。

4.5.1.2 步骤

CASA 系统的每个部件都必须正确安装,以确保最佳的运行。制造商要提供具体参数设置,但用户要验证系统是否正常工作,以保证系统能提供所必需的可靠性和可重复性程度。使用合适的质量控制物质(如录制的视频)是必要的(8.6.2 节)。一些作者在他们的论文中讨论了 CASA 系统^[46,309,312-314]。

4.5.1.3 精子样本的制备

用于 CASA 检测的精子样本应按照第 2 章所描述的方法进行采集和制备。由于人类精子运动对温度变化非常敏感,故 CASA 系统须将样本的温度维持在 37℃。如果未稀释的精液中没有过多碎片或其他杂质,样本可以直接用于评估精子运动特征和精子浓度。基于 CASA 系统的特性,精子浓度在 $2 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6/\text{mL}$ ^[102] 范围的样本,可用 CASA 系统评估精子活力。精子浓度高(例如 $> 50 \times 10^6/\text{mL}$)的样本经常会出现评估误差。精子浓度高的样本应进行稀释,适宜使用源于患者本人的精浆作稀释。精子浓度高的原始精液样本,可以如下

处理:

1. 取一部分精液样本,高速(16 000g 或最大可用转速)离心 6min,以获得不含有精子的精浆。

2. 用纯精浆稀释本人的精液样本,使其浓度低于 $50 \times 10^6/\text{mL}$ 。

需要注意的是,上述处理可能会改变精液的性质由于精子运动参数受流体动力学效应(黏稠度、黏弹性)或其他环境因素所制约,故已稀释样本的精子运动参数可能会发生改变。

使用深度为 $20\mu\text{m}$ 的一次性计数池可获得可靠的精子活力结果,通常要评估两个计数池的精子。应该分析几个具有代表性的视野。准确选择这些视野如何影响结果尚未详细研究。但是,所选择的视野涵盖计数池的各个区域,使用 CASA 系统时,建议每个计数池应至少分析 6 个视野(总共 12 个视野),通常可以得到可靠的结果。如果可能,每个计数池应评估至少 200 个精子的活力。类似的质量控制原则也应用于精子活力的标准评估(2.4.6 节)。样品可立即评估,或对样品记录后分析。对这些记录的分析有助于更好地改善标准化和质量控制程序(8.6.2 节)。

对于应该观察精子多长时间才能获得准确的结果,存在一些分歧,但时间不少于 1s 足够进行基本的 CASA 测量^[46]。观察泳动精子的持续时间会对结果产生显著影响^[315];必须仔细地比较不同观察时长的分析结果。

4.5.1.4 CASA 术语

如图 4.4 所示,使用 CASA 系统测量的一些标准变量如下:

- VCL,曲线速度($\mu\text{m/s}$):在显微镜下,精子头在二维平面中沿精子运动轨迹移动在单位时间内的平均速度。
- VSL,直线速度($\mu\text{m/s}$):沿路径的起始点与终点之间直线运动所计算出的速度。
- VAP,平均路径速度($\mu\text{m/s}$):沿平均路径所计算出单位时间的平均速度。在定义中,平均路径定义为一种平滑曲线路径,它是根据 CASA 系统中嵌入的算法进行计算的;不同的系统中这些算法是不同的,或者使用了不同的采集参数(例如,不同帧率),故不同系统之间的数值可能不具有可比性。
- ALH,头部侧摆幅度(μm):精子头沿平均路径的侧向位移数值。ALH 通常表示为侧向位移的最大值或平均值。由于不同 CASA 系统采用不同的算法计算 ALH,故不同系统之间的数值可能不具有可比性。
- MAD,平均角位移(度):精子沿曲线路径运动时,单位时间的瞬时转向角度的平均绝对值。需注意的是,这并不是测量精子头部指向方向的转弯角度。
- 通过上述五个变量计算得出的其他常用测量值:
 - LIN,直线性:曲线路径的直线程度(直线速度 / 曲线速度);
 - WOB,摆动性:曲线路径关于平均路径摆动幅度的程度(平均路径速度 / 曲线速度);
 - STR,前向性:平均路径的直线程度(直线速度 / 平均路径速度);
 - BCF,交叉频率(Hz):曲线路径与平均路径交叉的平均频率。但是,需注意的是,

BCF 已被证实与鞭毛摆动频率无关^[316];

- D, 分形维数: 平面上曲线“空间填充”特性的定量评估^[310]。

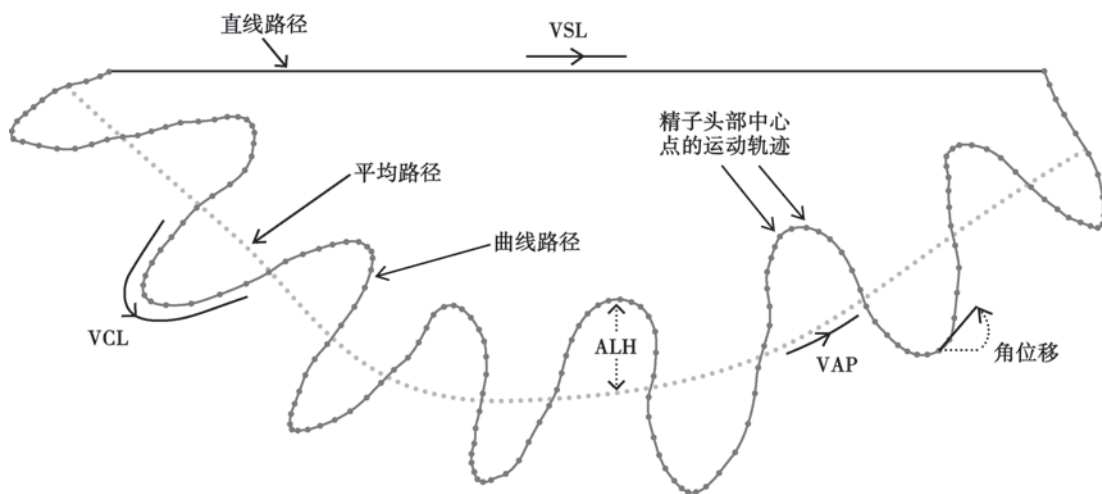


图 4.4 CASA 系统测量变量的标准术语



注解:不同的 CASA 分析仪采用不同的数学算法来计算这些运动变量。所有不同仪器测量结果之间的可比性尚属未知。

4.5.2 使用 CASA 评估精子超活化运动

超活化运动是人类精子通过获能(获得受精能力的过程)表现出来的一种重要生物学现象,其包括精子鞭毛波形摆动的行为改变。超活化运动通常表现为精子鞭毛摆动幅度增加、摆动频率降低,运动轨迹为非前向的侧向偏移^[317]。

超活化精子鞭毛运动的复杂参数很难通过人工分析进行可靠和明确的检定。在这种情况下,为了定量分析单个精子的运动,并评定精子运动的模式,一些作者提出了各种各样的算法,并依赖于计算机系统进行计算。这些分析是基于追踪精子头运动获得数据来进行的^[318,319]。现代计算机能够同步测量数千个精子的动力学参数,并对这些参数进行分类^[320]。直接测量精子鞭毛波形也可应用于更准确理解精子超活化期的动力学参数变化^[321]。

4.5.3 应用 CASA 系统评估精子形态

图像分析具有可使精子形态学评估量化、客观和可重复的优势。现有商售的 CASA 系统可用来定量分析精子头部和中段形态学,甚至还可能分析主段的形态。不过,应用 CASA 系统测量精子活力和运动方式,可以更直接评估影响精子运动的尾部缺陷。使用 CASA 系统进行精子形态学评估依赖于精子染色的高水平标准化和染色质量,由于染色的差异,容易产生评估偏差。出于这个原因,自动显色系统通常是 CASA 的实际配置用于精子形态学分析,以协助消除染色差异。

自动精子形态学分析系统比手工评估在客观性、精确性和可重复性方面具有潜在优势^[95]。自动精子形态学分析系统的精确性和可重复性至少高达 92%^[322],这优于有经验技术

人员的手工评估结果。然而,方法上的不一致,例如:聚焦、光的强度、样本制备和染色等不同^[323,324],以及正确分辨精子头部和精液碎片的技术难度(尤其是低精子浓度时),都可能会影响计算机辅助精子形态测量分析(CASMA)结果的可重复性和准确性^[322,324-326]。自动分析的属性也意味着没有办法弥补样本制备缺陷和人为因素。故此,由精子染色引起的背景阴影的细小差异都可能导致不正确地分类,或者不能识别出精子,从而导致结果的偏差。

同人工评估精子形态学一样,CASMA 必须使用标准化程序和设备,以及进行质量控制,以确保得到可比且可靠的结果。应按照 2.4.9.1 节关于富含碎片或黏稠的精液部分所描述的进行精液处理,以减少 CASMA 录像的背景。如果精子浓度过低($<2 \times 10^6/\text{mL}$),应按照 2.4.9.1 节精子浓度低的精液部分所述,离心浓缩样本。但是,需注意到离心可能影响精子形态,如应用了离心程序须作记录。

两项研究已经报道了 CASMA 结果与生育力评价的终点指标之间的重要关联。Coetzee 等^[327]显示自动分析的正常精子形态结果是预测体外受精率和妊娠率的有意义指标。Garrett 等^[102]发现,精液中具有某种精子头形态特征、能与卵透明带结合的,且具有直线速度(VSL)的精子百分率(“偏好透明带精子”,Z%),与一大组生育力低下夫妇的自然妊娠率显著且独立相关。Z%和VSL与生育力之间的关系似乎是连续的,并且显示没有明确的临界值,高于该值妊娠率也没有进一步增加。确定 CASA 应用于精子形态学分析,还需要对大样本人群中的生育结局以及男性生殖器官功能与疾病进行更多的研究。

自动分析系统对获得额外研究数据(包括精子形态亚群、质膜完整性、精子能量指数)可能是有用的^[328-330],也有助于进行质量控制,但还需要更多研究来证明其对临床用途有裨益。

缺乏实验室内部质量控制(IQC)会导致分析系统与实验室之间出现大量的 CASA 误差。因此,有必要对 CASA 的程序和质量控制进行标准化^[331]。尽管不断出现各种比较研究的结果^[332-337],但仍然没有足够证据显示 CASA 分析可以应用于广泛的临床实践。

4.6 新兴技术

近年来,一直在开发很多新兴技术,这些技术在不久的将来可以显著提高计算机分析的效率和深度。这些技术可以分为使用计算机的计算(算法开发)或工艺技术(整合新设备或功能测试)。

4.6.1 计算机计算的进展

图像处理算法的进步使得计算机比以前能够测量更多数量的精子,而且分析更为详细。如图 4.5a 所示,新系统已被证明能够在比传统 CASA 分析的精子浓度高得多的样本中获取单个精子的运动轨迹^[338,339]。应用 CASA 系统的动力学测量,将精子分为不同的亚群,可以改善对精子活力变化的理解,并且提高监测的水平^[320]。

新技术不只测量精子头的运动,而且还能够自动追踪泳动精子鞭毛波形的轨迹(见图 4.5b)^[316]。为使摆动的精子鞭毛显示清晰和对焦准确,对精子成像需要更为仔细,而追踪精子鞭毛轨迹可以在人类精子研究中对诊断、毒理学和治疗可能性给出多种方案。精子在已知黏稠度液体中的鞭毛摆动可视化,可以测量单条精子消耗的能量,或精子群体消耗能量

的幅度。

除了商用 CASA 系统,现在还开发出几种免费或开放源代码的产品,以促进计算机辅助分析的应用^[316,340]。

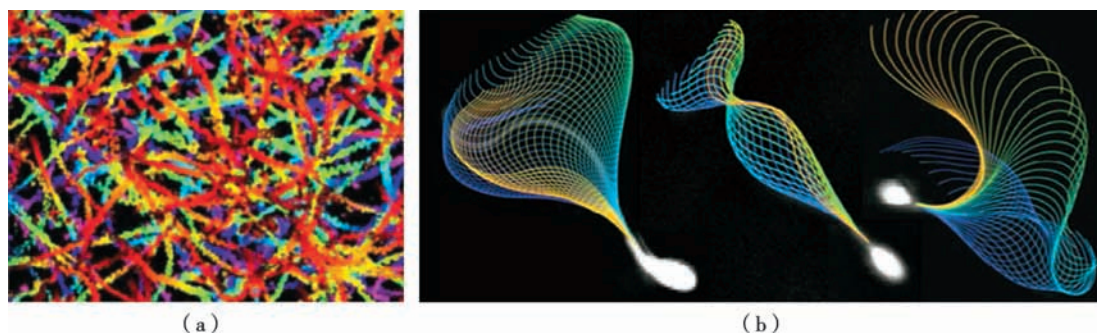


图 4.5 不同 CASA 应用程序的图像示例

(a)在 10 倍物镜下 10s 内一份高度浓缩精子样本的典型彩色编码图像(每条轨迹代表一个活动精子)^[339];

(b)精子的鞭毛摆动波形(从左到右):在低黏稠度培养液,在高黏稠度培养液和在超活化的状态^[316]。



评注: 未经认证的新兴技术需谨慎应用于临床,但是在研究中鼓励使用新兴技术以进一步探究各种问题。

4.6.2 技术进展

CASA 和其他新兴计算技术的发展,越来越多地通过使用其他技术加以补充,以改善质量和方便于诊断。

现有的 CASA 系统,一般是为实验室使用而设计的,通常价格昂贵且难以购买。由于智能手机是可移动,并且配置了高质量的数码照相机,能够容易与显微镜相连接,故智能手机应用于精子分析会有很大的潜力^[341]。目前,基于智能手机开发的设备未能达到全精液分析所需的质量和准确性。但是,此类设备的普遍使用会成为男性早期寻求适当医疗咨询、检查和病因疗法的有用手段。未经认证的新兴技术需谨慎应用于临床,但是在研究中鼓励使用新兴技术以进一步探究各种问题。



第 5 章 精子制备技术

5.1 引言	128
5.2 总则	129
5.3 简单洗涤	130
5.4 直接上游法	130
5.5 非连续密度梯度法	131
5.6 磁激活细胞分选 (MACS)	132
5.7 制备 HIV 感染者的精液样本	132
5.8 制备睾丸精子和附睾精子	133
5.9 制备逆行射精样本	134
5.10 制备辅助射精样本	134

5.1 引言

5.1.1 基本原理

在很多情况下,需要将精子从精浆中分离出来,例如,用于精子功能的诊断性与研究性测试、培养液成分效应的评价,以及辅助生殖技术(ART)的精子获取。考虑精子制备技术用于辅助生殖技术的前提是确保良好精子质量和消除不利于受精的因素。如果进行精子功能检测,在精液射出后 1h 内将精子从精浆中分离出来是关键,可以减少精浆中非精子细胞对精子的损害^[284],以及减少射出精液在体外由于渗透压升高导致的不良效应^[147,342]。

“理想的精子制备技术应能获取具有良好功能和维持 DNA 原状的精子群,这些精子不会由于精液中精子和白细胞产生 ROS 而导致其功能损伤。”

虽然与 Tyrode's 溶液 (Overstreet et al., 1980) 相比,精浆混合物中的某些成分似乎有助于精子穿透宫颈黏液,但由于精浆中存在“去能因子”^[343],精囊液对精子活力、存活和精子 DNA 保护有很大负效应^[13,265]。此外,在实施 ART 例如 IUI 或 IVF 时,自然屏障被绕过,精浆的一些成分会妨碍妊娠。从人精液中分离精子并进行处理,最终制备出含高比率形态正常的活动精子,而且所制备精子的 DNA 损伤少,不含碎片、非生殖细胞及死精子,这对于临床应用和预后阈值研究都是重要的。

5.1.1.1 制备方法的选择

精子制备方法的选择取决于精液样本的性质^[344,345]及其用途。用于辅助生殖包括 IVF 的精子制备技术,必须获得 DNA 损伤最小的精子群^[346]。理想的精子制备技术应能获取具

有良好功能和维持 DNA 原状的精子群^[347],这些精子不会由于精液中精子和白细胞产生 ROS 而导致其功能损伤^[348,349]。回收的精子应具备施行 ART 接受范围内的合适形态及运动功能。建议用培养液稀释精液并离心,以制备 IUI 使用的正常精子悬液^[345,350],而考虑选择的制备方法同样取决于使用的指征或目的。例如,直接上游法反映了精子上游到培养液的能力,因此有助于选择活动精子。研究表明,以单链或双链 DNA 损伤为特征的 DNA 碎片化与 ART 生育结局呈负相关^[346,351,352](3.2 节)。尽管沉淀团上游法涉及离心,可能会影响其他的精子功能参数^[353,354],但直接上游法和沉淀团上游法都显著降低了精子总 DNA 碎片率。直接上游法常用于精液参数基本正常的样本,而在严重少精子症、畸形精子症或弱精子症的情况下,则选择密度梯度法更好,因为收获精子量大,故可能回收的活动精子总数更高。密度梯度离心法也可根据单个样本的具体特点来优化处理方法:可减少梯度液的总体积,以减少精子迁移的距离,最大限度地回收活动精子。对于黏稠度高的精液样本可增加离心时间。

为获得可后续使用的精子沉淀团,每个实验室都应该确定所需的离心力和离心时间。当精子数目极低时,为了尽量回收最多的精子数目,可能需要改变离心力和离心时间。对推荐的离心力和离心时间作出改变时,需要经严格的实验论证才可临床应用。最合适的精子制备方法,可以通过测试所制备精子的功能来确定,例如检测精子活力(2.4.6 节)和精子存活(2.4.7 节)。

5.1.1.2 精子从精浆中分离的效率与感染性微生物的处理

精子优选技术的效率通常用精子绝对数目、活动精子总数或形态正常的活动精子回收率来表示。上游法对活动精子的回收率($<20\%$)一般低于密度梯度离心法(DGC)的回收率($>20\%$),并且两种方法制备的最终精子悬液中精浆成分污染的程度也不同。用前列腺分泌的锌作为可溶性精浆成分标志物,已证实锌从精浆向上层上游液的扩散呈时间依赖性^[355]。上游法制备的精子悬液中的锌浓度高于密度梯度离心法制备液中的锌浓度。

精液样本可能含有危害性的感染性病原体,技术人员应该将精液视为生物危害物而极其小心地进行处理。除了清除劣质精子(包括不活动精子),精子制备技术还应除去其他细胞,例如白细胞和细菌^[356],以及有毒或生物活性物质^[357]。精子制备技术在清除精液感染性病原体方面并不能完全有效(5.7 节)。应该严格遵守 8.2 节中概述的安全指南。良好实验室操作规范(good laboratory practice, GLP)是实验室安全的基础^[48,357]。

5.2 总则

以下部分介绍一些可应用的精子制备技术。在这些方法中,推荐的培养液为含有蛋白质和缓冲成分的平衡盐溶液,这种溶液适合于精子的处理。对于辅助生殖技术项目而言,例如 ICSI、IVF 和人工授精,所用的人血白蛋白必须高度纯化,且无病毒、细菌和朊病毒污染^①。目前,这种特殊用途的白蛋白已经商品化。若用于诊断,则可使用较便宜的 BSA(8.4 节)。如果培养箱内仅为大气及 37℃ 环境条件,培养液应具有缓冲能力(8.4.1 节),这样可确保培养液 pH 适宜精子存活。选择哪种缓冲液取决于精子处理后的最终用途,例如,用于精子功能检测时,一般要使用有助于精子获能的培养液,其中通常含有碳酸氢钠(25mmol/L)。

^① 译者注:原文中“prior”一词错误,应为“prion”翻译为朊病毒。

用于 ART 的精液应以无菌方式采集(2.5.12 节)。当制备精子用于治疗用途时,采用无菌技术和材料是重要的。



注解:虽然培养液可以在实验室制备,但应注意溶液的性能和安全性无法被精确控制。通常在条件允许下,ART 所用的培养液应是商业化生产的,并且经过了检测和批准用于临床治疗。

下面提供了可以制备或购买的多种培养液,但不是推荐这些培养液在 ART 的治疗中应用。

5.3 简单洗涤

对于质量好的精液样本,简单的洗涤程序可高效回收精子,但不能清除精液中的碎片或白细胞。

5.3.1 试剂

- BWB、EBSS、sEBSS、HTF(已有商品化试剂,或见 8.4 节)或其他专用并经过恰当测试的商售培养液,其中首选添加人血白蛋白(HSA)或血清,见以下的描述。
- HSA,高度纯化,不含病毒、细菌、朊病毒污染和内毒素等。
- HSA 的用量:50mL 培养液中添加 300mg HSA,1.5mg 丙酮酸钠,0.18mL 乳酸钠[60%(v/v)糖浆液],100mg 碳酸氢钠。
- 如有需要,添加血清(例如,加入所述的非专用培养液):46mL 培养液中添加 4mL 热灭活(56℃ 20min)的患者血清,1.5mg 丙酮酸钠,0.18mL 乳酸钠[60%(v/v)糖浆液],100mg 碳酸氢钠。

5.3.2 程序

1. 充分混匀精液样本。
2. 用 1 体积培养液 +1 体积精液进行样本稀释(1:2),以便移除精浆。
3. 将已稀释的悬液转移到多个离心管中,最好每管不超过 3mL。
4. 以 300~500g 离心 5~10min。
5. 小心吸取并丢弃上清液。
6. 加入 1mL 培养液,轻柔吹打,重悬精子沉淀团。
7. 以 300~500g 离心 3~5min。
8. 小心吸取并丢弃上清液。
9. 根据使用目的(如人工授精)添加适量的培养液,轻柔吹打,重悬精子沉淀团。

可通过使用较少的离心管但增加每管的精液体积来减少洗涤的次数。如果这样做,离心力和离心时间必须相应增加,例如,以 500~600g 离心 8~10min,以确保精子完全沉淀成团。注意离心力会随半径和转速(r/min)而变化(离心力的计算见第 8.2.2)。

5.4 直接上游法

利用精子从精浆上游到培养液中的能力来优选精子,这种方法称为“上游法”。在施行

上游法前,精液最好不要稀释和离心,以减少对精子膜的过氧化损伤^[348]。直接上游法是从精液中分离活动精子的首选方法^[45,46]。操作时,可以将培养液加到液化精液上方,也可以将液化精液加到培养液下方,活动的精子就会游到培养液里。这种方法回收的精子数目比洗涤法的少,但由于是依靠精子的活力进行优选,因此适用于精液中活动精子百分率低下的情况,例如进行 ICSI 和 IVF 时使用。

5.4.1 试剂

- BWB,EBSS 或 sEBSS(8.4 节),添加 HSA(首选)或血清,见以下描述。
- HSA,高度纯化,不含病毒、细菌、朊病毒和内毒素等。
- HSA 的用量:50mL 培养液中添加 300mg HSA,1.5mg 丙酮酸钠,0.18mL 乳酸钠[60%(v/v)糖浆液],100mg 碳酸氢钠。
- 血清的用量:46mL 培养液中添加 4mL 热灭活(56℃ 20min)的患者血清,1.5mg 丙酮酸钠,0.18mL 乳酸钠[60%(v/v)糖浆液],100mg 碳酸氢钠。

5.4.2 程序

1. 充分混匀精液样本。
2. 取 1mL 精液置于 15mL 无菌锥形离心管中,在精液上方轻缓加入 1.2mL 培养液形成液层。或者是将精液小心地加在培养液的下方。
3. 将离心管倾斜 45°,以增加精液—培养液界面的表面积,37℃孵育 1h。
4. 轻轻将试管竖直,吸取最上层 1mL 培养液,其内含有高活力的精子。
5. 用 1.5~2.0mL 培养液稀释。
6. 以 300~500g 离心 5min,弃上清液。
7. 用 0.5mL 培养液重悬精子沉淀团,检测精子浓度、精子总活力和前向运动活力(2.4.6 节和 2.4.8 节)。
8. 制备好的精子悬液可直接用于治疗或研究用途。

5.5 非连续密度梯度法

非连续密度梯度法是一种有效和适用性强的方法,能为 ART 收集高质量精子。该方法能获得良好的活动精子,并且不含其他类型细胞和碎片。这种方法比上游技术更易于标准化,因此结果更稳定,常用于 IVF 和 ICSI 中的精子回收与制备。

这种方法是将精液放置于由硅烷包被的胶体二氧化硅构成的密度梯度液的上方进行离心,细胞由于密度不同而被分离。应用最广泛的是一种简单的两步非连续密度梯度法。应按照生产商的使用说明来使用(见 3.1 节)。用密度梯度离心法(DGC)通常可获得部分活力很好的精子,不含碎片、污染性白细胞、非生殖细胞和退化生殖细胞。

很多商售的产品可用于制作适合于精液处理的密度梯度液。对推荐程序的任何改动都必须有循证基础。大部分密度梯度液含有相对高分子量的成分,鉴于这些分子固有的低渗透压特性,使用时,常与女性生殖道液体等渗的培养液进行配制。

5.5.1 试剂和程序

如上述讨论,按照生产商的使用说明进行制备和使用。由于梯度液易受微生物污染,如果制备了大量的梯度液,则应留意。如果在显微镜下观察到梯度液受污染,则必须将梯度液丢弃。

5.6 磁激活细胞分选(MACS)

辅助生殖技术的实际应用,尤其是获取精子用于助孕的需要(例如,因男性不育进行 ICSI),促使发展了一些补充方法,以优化获取具有功能的精子,并且这些方法不会对精子 DNA 造成显著损伤。

一项 Cochrane 系统评价^[358]显示,MACS 与由透明质酸结合(HA-ICSI)或其他精子选择技术相比较,在临床妊娠率或活产率方面未见差异。此外,观察到使用密度梯度离心法后精子 DNA 碎片增多,导致采用 IVF/ICSI 夫妇受孕概率降低^[354]。

5.6.1 通过 MACS 回收精子的试剂和仪器

- 改良 HTF 的 HEPES 缓冲液
- Annexin V- 偶联微球或微珠
- Annexin V 微珠试剂盒 [Miltenyi Biotec, Huburn, CA, USA; MACS Good Manufacturing Practice (GMP)Annexin V Kit, MiltenyiBiotec, Germany]
- 分选柱或磁珠适配器 (Mini MACS, MiltenyiBiotec)
- Eppendorf 管 (1.5mL)
- 离心机
- 培养箱

5.6.2 程序

1. 使用本方法时,先洗涤精子除去精浆(洗涤精子或者在使用密度梯度离心法之前进行),得到的精子样本悬浮在 0.5mL 改良 HTF 的 HEPES 缓冲液中。

2. 离心上述精子悬液,向精子沉淀团加入 80 μ L 结合缓冲液和 20 μ L Annexin V- 偶联微球(这两种试剂由 Annexin V Microbead kit 提供, MillenyBiotec, Huburn, CA, USA),重悬精子沉淀团,然后置室温 15min。

3. 加入 400 μ L 结合缓冲液于步骤 2 的混合液中,然后放入分选柱,未被 Annexin V 标记的(存活的)精子可通过分选柱。

4. 按照所描述的方法^[359],回收和处理未被标记的精子。

5.7 制备 HIV 感染者的精液样本

如果精液中有人类免疫缺陷病毒(HIV),在精浆和非精子细胞里可检出游离的病毒 RNA 和前病毒 DNA。一项系统评价和荟萃分析的结果显示^[360],来自 HIV 单阳夫妇的 3 994 名妇女,采用洗涤精子进行了 11 585 个 ART 周期,56.3% 获得临床妊娠,且在没有血浆病毒抑制的

情况下未发生 HIV 血清转为阳性。由于 HIV 受体(CD4,CCR5,CXCR4)只在非精子细胞表达,所以使用密度梯度离心法后再使用上游法,这样组合两种方法来制备精子被推荐为防止女性未感染但配偶受感染的一种措施^[361,362],但也有其他经过验证的方法^[363]。这种组合方法是通过密度梯度离心法除去病毒感染的非精子细胞和精浆(位于密度梯度液的上清液中),再用上游法获得无 HIV 感染的活动精子(位于密度梯度液的沉淀中)。制备好的精子样本,在使用前应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)进行检测,确认无 HIV 后才能用于 ART。虽然到目前为止的结果令人鼓舞,但是还没有足够的证据显示通过精子制备可消除 HIV 感染风险。



注解:这种技术只能在安全设施里进行,以最大限度地降低无 HIV 感染的样本受到交叉污染的风险^[364]。近期证据^[365-368]显示,HIV 单阳夫妇,在病毒得到抑制的情况下很少或没有将 HIV 传播给配偶。

5.8 制备睾丸精子和附睾精子

从睾丸组织和附睾中获取的精子需要经过特殊的处理。一般而言,附睾穿刺取精的适应证是梗阻性无精子症而非睾丸生精功能低下,因此,相对而言能获得较多的精子用于治疗目的。附睾穿刺抽吸所获得样本中红细胞和非精子细胞的污染通常极少,附睾活动精子的分离和优选相对简单。如果穿刺抽吸获得了大量的附睾精子,密度梯度离心法是一种有效的制备精子手段(5.4 节)。但如果精子数目较少,则进行简单洗涤(5.3 节)。

睾丸精子可用开放式活检(使用或不使用显微取精术)或经皮穿刺活检来获取。睾丸样本不可避免被非生殖细胞和大量红细胞污染,因此需要额外的措施分离获得洁净的精子。为了分离附着在精曲小管上的长形精子细胞(“睾丸精子”),需要采用酶学或机械方法。由于从睾丸获取的精子数目少、精子活力差,睾丸精子制备只是用于 ICSI。

5.8.1 酶学方法

1. 将睾丸组织与胶原酶孵育(例如:每 mL 培养液含 0.8mg 的 1A 型溶组织梭菌),37℃ 下 1.5~2h,每 30min 涡旋振荡一次。



注解:酶可能会损伤精子,如需使用,使用的酶应适合治疗用途。

2. 以 100g 离心 10min,然后检查精子沉淀团。

5.8.2 机械方法

1. 用玻璃盖片将睾丸组织在培养液里压碎,直到产生离散的组织匀浆。
2. 也可将细注射针(一次性结核菌素注射器所附带的)折弯成平行于培养皿底部的形状,从精曲小管剥离精子。

5.8.3 处理精子悬液用于 ICSI

1. 加入 1.5mL 培养液洗涤精子样本。
2. 以 300g 离心 8~10min。
3. 弃去上清液,用 0.5mL 新鲜培养液重悬精子沉淀团。
4. 评估沉淀团中精子的活力和数目(一些样本的精子数目很少,需要用更少的培养液

重悬精子)。

5. 取 5~10 μ L 培养液滴于培养皿中。
6. 用 CO₂ 预平衡过的矿物油覆盖。
7. 在培养液中加入 5~10 μ L 的精子悬液。
8. 用 ICSI 注射针小心吸取培养液和矿物油交界面上的活动精子。
9. 转移精子到一种黏稠溶液滴中, 例如: 聚乙烯吡咯烷酮 [7%~10% (100g/L)]。

5.9 制备逆行射精样本

一些男性射精时精液进入膀胱, 导致无精液症或无明显射出液。这种情况可通过检查性高潮后尿液样本中是否有精子来证实。假如不能采用药物治疗或治疗不成功, 可以从尿液中回收精子。例如, 口服碳酸氢钠碱化尿液, 将增加进入尿液精子保持其运动特性的机会^[369]。

5.9.1 未预先进行碱化处理的精子收集

在实验室, 应该告知患者:

- 排尿, 但不完全排空膀胱;
- 手淫法射精, 将精液射入样本容器中 (适用于部分逆行射精患者)^①;
- 性高潮后再次排尿至另一个装有培养液的容器中 (进一步碱化尿液)。

5.9.2 预先进行碱化处理的精子收集

在收集精液前 1~2h, 饮用含氯化钠和碳酸氢钠的水可以碱化尿液。还可以联合使用 α -1-受体激动剂治疗。

在实验室, 应该告知患者:

- 手淫法射精, 将精液射入样本容器中 (适用于部分逆行射精患者);
- 性高潮后排尿至另一个容器中 (容量至少 500mL)。

5.9.3 正常射精精液和性高潮后尿液的分析

射出的精液 (如果有) 和尿液都应进行分析。由于尿液体积大, 通常需要离心浓缩样本 (500g, 8min)。浓缩后的逆行射精样本和顺行射精的精液 (如果有的话), 都能用密度梯度离心法得到有效的处理 (5.5 节)。

5.10 制备辅助射精样本

有些男子罹患射精障碍或不能射精, 可通过直接震动刺激阴茎或经直肠电刺激附性腺来采集精液。脊髓损伤患者排出的精液通常精子浓度高、精子活力低, 以及伴有红细胞和白细胞污染。电诱导射精获得的样本用密度梯度离心法可得到最有效的处理 (5.5 节)。不管用什么制备方法, 这些类型的精液通常有大量不活动精子。

^① 括号中内容是译者添加, 便于理解。下同。



第 6 章 精子冷冻保存

6.1 引言	135
6.2 精子冷冻保存的原因	136
6.3 人类精液冷冻保存的风险评估	137
6.4 精液冷冻保存方案	139
6.5 玻璃化冷冻	143

6.1 引言

精子冷冻保存是很多精液分析实验室的一部分重要工作,特别是与不育症临床有联系的实验室。

人类精子低温生物学的历史始于 20 世纪 40 年代末期。在当时,发现了甘油保护精子免受冷冻损伤,由此导致了应用 -79°C 干冰冻存人精子^[370-372]。嗣后,液氮应用于精液冷冻保存。随着商业性精子库或协调性国家服务机构的建立,精液冷冻保存在很多国家得以迅速发展^[373-377]。

“冷冻 - 复苏后的细胞存活,很大程度上取决于细胞内冰晶形成的最小化。”

目前,结合不同的冷冻保护剂和冷冻程序,冷冻保存有多种方案。冷冻 - 复苏后的细胞存活,很大程度上取决于最少细胞内冰晶形成的最小化。应用适当的冷冻保护剂及控制降温与复温速率,可以使细胞内形成冰晶的水分最小化^[378-380]。如果精子在 -130°C (玻璃化转变的温度)之上经历时间过长,特别是在复苏过程中,随着细胞内潜在损害性冰晶的生长,可能发生重结晶。冷冻保护剂分为两类:渗透性保护剂,例如二甲基亚砷(DMSO)和甘油;非渗透性保护剂,例如白蛋白、葡聚糖和卵黄柠檬酸盐。

人精子可以耐受一定范围内的降温和复温速率。精子对初始阶段迅速降温(冷休克)引起的损害不很敏感,可能源于脂质双层饱和和脂肪酸膜的高流动性^[381],也可能是精子含水量低(约 50%)的特性,使精子比其他细胞更能耐受冷冻保存造成的损伤。然而,冷冻保存确实对人精子功能有不良效应,特别是降低精子活力。研究显示,冷冻保存后的精子活动率会减少 50.6%~30.3%^[382]。优化冷冻保存程序可使冷冻损伤降至最低。

应用捐精者冷冻精液进行人工授精的妊娠率,通常与复苏后的精子质量、授精时机特别是与受精因素如年龄、以前使用捐精者精液人工授精的妊娠情况,以及排卵、子宫输卵管疾患等有关^[383]。如果精液在合适条件下冻存,精子质量不会随时间推移而发生明显的下降,已使用冷冻保存逾 28 年的精液使妇女受精和诞生孩子^[384,385]。对一些特殊精液样本(例如

精液中有大量白细胞),建议筛选高活力精子(第 5 章),采用高活力精子冷冻保存可能获得较好的复苏率^[386]。

6.2 精子冷冻保存的原因

人类精液冷冻保存库有两个广泛应用领域:用于个体自己将来使用(自精 ART)和捐精者精液储存(供精 ART)。

根据一些国家的相关指南^[371],可有多种原因对精子进行冷冻保存以备将来使用。特别是美国临床肿瘤学会的指南阐明,医疗保健提供者应该一直为所有育龄期接受癌症治疗的青春期后男性提供精子冷冻保存服务,这是此类患者将来获得后代的唯一有效方法^[387]。应告知男性患者,在开始化疗或放射治疗后收集的精子可能存在较高的潜在遗传损伤风险,应该在化疗或放射治疗开始前冷冻保存精子。对一些具体样本,可能需要改良冷冻保存的程序(6.2.2 节)。

目前数据没有显示在辅助生殖项目中,使用冷冻精子或新鲜精子在治疗结局方面有任何显著差异^[388-390],但需注意,有数据显示冷冻保存后增加了精子 DNA 碎片率^[391]。

6.2.1 精子捐献

已知或假定有生育力的健康捐精者的精液可以冷冻保存,以备将来使用。在很多国家,捐精者的精子必须有 6 个月的检疫期,以便对捐精者做性传播感染病原体的检测,以确定捐精者精液中不含 HIV 等微生物。按照一些国家的指南和法规,临床或精子库可以招募捐精者,并且匿名或实名使用捐精者的精子。捐精者的精子可以用于人工授精、IUI、IVF 或 ICSI,例如:

- 对没有适合做 ICSI 的活精子或长形精子细胞的不育男性的配偶,治疗失败或治疗费用太高的患者;
- 避免遗传性疾病传给子代;
- 反复流产之后,而使用捐精者精子受精可能获得成功妊娠;
- 在某些国家允许的情况下,希望怀孕但没有男性配偶的妇女。
应该遵循国家及地方有关遗传筛查和感染筛查的法规。

6.2.2 生育力保存

男性在接受可能损伤其生育力的手术,或暴露于可能危害其生育力的风险因素之前,可以取出精液进行储存。例如:

- 输精管切除术(以防将来配偶改变或希望生育更多孩子);
- 可能永久性损伤精子发生的细胞毒性药物治疗或放射治疗^[387];
- 从事危险职业的现役人员,例如,在某些国家允许死亡后生育的现役军人,或者可能发生生殖器损伤的人员;
- 从男性改为女性的变性成年人和青少年^[392];
- 睾丸损伤[在睾丸取精(TESE)后的某些情况下发生损伤]^[393]。



注解 1: 为保存生育力或治疗不育症,最好应储存可进行 10 次或 10 次以上授精的足量正常样本,以确保获得更大的妊娠机会。



注解 2: 由于每个卵母细胞的 ICSI 只需要一个精子,因此,任何活精子的冷冻保存都是值得的。



注解 3: 男性在接受可能丧失生育力手术前,进行精液采集和储存通常具有显著的心理意义,因为这能够给予精液储存者未来做父亲的希望。对于即将接受烷化剂治疗或放射治疗的患者,由于治疗会造成精子遗传物质产生突变的风险,必须在治疗开始前采集精液。应该为所有需要接受化疗或放射治疗的患者包括青少年^[394],尽可能地提供精子储存的服务。

6.2.3 不育症治疗

可以冷冻保存精子,以便在 IUI、IVF 或 ICSI 治疗中使用本人的精子。例如以下情况:

- 严重少精子症或精液中间歇存在活动精子(以备 ICSI 应用)^[395],或者克氏综合征(处于青春期的)患者能够采集到其精液时^[396];
- 不育症的非持续性治疗,例如生殖管道梗阻的手术治疗,或下丘脑-垂体性腺机能减退症的促性腺激素治疗;
- 需要以特殊方式采集精液,例如脊髓损伤患者的辅助射精,逆行射精患者从尿液中收集精子,或从生殖管道手术中获取精子;
- 辅助生殖治疗当天不能提供新鲜精液的患者。例如:
 - 人工授精治疗当天不能亲临辅助生殖实验室的男性,或由于心理原因精液采集困难的男性;
 - 非梗阻性无精子症,需要睾丸取精的男性;*
 - 脊髓损伤,需要睾丸取精的男性;*
 - 梗阻性无精子症的男性,在接受输精管吻合术或输精管-附睾吻合术时,采用显微附睾取精术或睾丸取精术获得精子用于生育力保存;*

* 应按照 6.4.2 节所描述的操作步骤,对这类患者的精子进行冷冻保存。

更多的关注是,在严重男性因素不育的夫妇中,使用配偶精子行辅助生殖治疗比使用捐精者精子更会失败^[397]。

6.2.4 最大限度降低传染性疾病的传播

感染了 HIV 的男性,通过抗逆转录病毒治疗控制病情后,可以将检测不到病毒载量的精液样本冷冻保存,用于 IUI、IVF 或者 ICSI,以尝试使配偶妊娠,同时降低配偶感染 HIV 的危险。类似的,血清检测显示乙型或丙型肝炎呈阳性的男性,想要冷冻保存其精子,应该检测精液样本的病毒载量,精液样本检测不到病毒载量才能冷冻保存。

6.3 人类精液冷冻保存的风险评估

人类精子冷冻保存和后续储存是非常复杂的过程,这给实验室工作人员带来了特殊责

任和潜在负担。在评估精液冷冻保存和储存的风险时,应考虑到以下事项:

6.3.1 资源

- 液氮罐、样本和储藏室的物理安全性,以减少因失窃或火灾造成的损失,以及避免冷冻麦管、安瓿和冷冻管、液氮罐失效和液氮供应不足的问题。
- 拟用设备的适用性。
- 液氮的安全系统和清除系统。
- 当液氮水平低于或温度高于某个阈值时,储存罐应发出警报。警报级别的设置应确保在紧急情况发生前报警,并应连接到呼叫中心然后通知精子库工作人员。

6.3.2 工作人员的安全与防护

- 精子库内应常备个人防护设备。如有可能,精子库内应同时有两个人在场;否则,应在进入精子库前告知库外的人员。
- 建议安装监测空气中低氧含量的警报系统,以及相关的纠错措施。

6.3.3 交叉污染的风险

为了减少储存时样本之间存在传染性病原体交叉污染的风险[例如,通过冷冻保存容器传播 HIV,或者乙肝(HBV)或丙肝(HCV)病毒],须考虑以下事项:

- 储存容器的类型:冷冻小瓶或麦管,密封麦管的方法(加热或聚合物封堵),以及使用的套管(套在麦管外面的套管);
- 储存容器的性质:液氮液相罐或气相罐;
- 高风险样本(已知含有或怀疑含有病毒的样本)的存储方案和方法。在这样的情况下,建议对每种病毒阳性样本使用单独的液氮罐,在某些地区必须这样做;
- 为每位患者单独进行冷冻保存操作,并在每个冷冻程序结束时对所有物体表面进行消毒。

如果不能确保上述预防措施,可以采取其他预防措施来避免或限制污染:

- 液氮灭菌以防止污染。当采用玻璃化冷冻时,样本是直接浸入液氮中,液氮灭菌是有益的^[398];
- 定期用无菌液氮重新填充液氮真空瓶或储存罐,并每年对冷冻罐进行清洁;
- 在复温前,对冷冻样本做净化处理;
- 按以下方式(或根据国家法规)入库时对所有男性进行病毒和性传播疾病病原体的检测:
 - HIV1 型和 2 型(使用核酸检测,也要检测 O 亚型抗体);
 - HBV 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)检测,乙型肝炎核心抗原(抗-HBc)的总抗体(IgG 和 IgM),以及 HBV 或包括 HBV 组合的核酸检测;
 - HCV 使用抗体和核酸检测;
 - 梅毒螺旋体(即梅毒);
 - 沙眼衣原体(使用针对无症状性低流行人群设计的检测方法);
 - 淋病奈瑟菌(使用针对无症状性低流行人群设计的检测方法);
 - 人类 T 淋巴细胞病毒(HTLV),使用抗 HTLV I / II 的 I 型和 II 型抗体;

- 巨细胞病毒(CMV),使用抗CMV(总的IgG和IgM)抗体。



■ **注解:** 对于捐精志愿者,根据国家的法律法规,需要做其他的检测。

6.3.4 冷冻样本的安全性

- 为了减少全部精液样本丢失的风险,将样本分装储存在多个液氮罐和/或不同的位置。
- 每个步骤都要双重核对样本的身份信息。
- 使用防脱落的标签和识别代码。
- 对使用的耗材和储存的样本要有定期自查程序。
- 长时间使用后,储存罐可能被污染。因此,应该定期使用不与铝或钢发生反应的溶液对储存罐进行清洁,建议每年至少清洁一次储存罐。
- 所有储存罐都应装有低液位传感器警报,以监测罐内温度和液氮液位。传感器应连接到警报器,以提醒实验室相关责任人。

来源:参考文献^[364,377,399,400]。



注解 1: 与液相罐储存相比,气相液氮罐储存能够减少交叉污染的风险。然而,在气相液氮储存罐中,温度梯度变化大,具体取决于容器形状、样本加载和样本容器类型。如果使用气相罐储存,须确保样本位于专为气相储存而设计的容器中,并且该容器是符合国际医疗器械标准的。



注解 2: 用于液氮储存的安全性麦管,须用可热封的离子树脂制成(高安全性麦管)。以保证在-196℃低温下维持其抗漏、防菌、防病毒污染及抗机械磨损性能^[364,377,400]。

6.4 精液冷冻保存方案

现有几种可用的精子冷冻及精子库管理方案^[377]。一些冷冻保护剂也有商品化的产品。冷冻保护剂分为渗透性(其中甘油是应用最广泛的)或穿透性和非渗透性(如糖分子和卵黄)保护剂。含或不含卵黄的冷冻保护剂(作为精液的添加剂)均可使用^[377]。常用的甘油-卵黄-柠檬酸盐(GEYC)冷冻保护剂,以及程控冷冻或液氮蒸汽冷冻程序的详细介绍如下。

考虑到冷冻保存的精子用于生成胚胎,根据国际药品生产质量管理规范指南,如果可能,所有步骤应处于A级防护下,在分级房间(至少D级)内进行。如果低于这个标准,应记录冷冻保存的方法和环境;但是,如果冷冻保存的方法和环境是合法的,则低于上述标准不能作为拒绝执行精子冻存的理由。

6.4.1 标准程序

6.4.1.1 制备 GEYC 冷冻保护剂



注解: 虽然冷冻保护剂可以在实验室制备,但需要注意的是,冷冻保护剂的性能和安全性不能精准控制。通常情况下,经过认证和批准使用的商售冷冻保护剂,可以用于治疗用途。由于鸡饲料或环境可能存在污染物,因此,基于卵黄的冷冻保护剂安全性尤其是个问题。下面描述的程序难以在一个合适水平做到标准化,以用于当地实验室的辅助生育治疗。

制备 GEYC

1. 称量 1.5g 葡萄糖和 1.3g 二水柠檬酸三钠,加入消毒的纯净水至 65mL。
 2. 加入 15mL 甘油,完全混匀。
 3. 加入 1.3g 甘氨酸,完全溶解后用 0.45 μm 微孔滤器过滤。
 4. 加入 20mL 新鲜卵黄(最好从不含特定病原体的鸡蛋中获得):清洗鸡蛋,去壳,刺破卵膜,用注射器吸取卵黄(每只鸡蛋可获得约 10mL 卵黄)。
 5. 所制成的悬浮液,置 56℃ 水浴中 40min,偶尔搅拌。
 6. 检测溶液的 pH。如果 pH 在 6.8~7.2 范围之外,丢弃溶液重新制备,以防加入了不正确的试剂成分或剂量。
 7. 细菌培养可在这一环节进行,以检测溶液是否无菌。
 8. 精子毒性试验也可在此环节进行。
 9. 在超净台中将溶液以 2mL 分装,在 -70℃ 储存。
 10. 在 3 个月之内使用。
- 也有类似 GEYC 的商售冷冻保护剂。

6.4.1.2 将冷冻保护剂加入精液

1. 解冻冷冻保护剂,复温至室温并混匀。初始复温至 37℃ 可能是有益的。
2. 高浓度的甘油对精子有害。加入冷冻保护剂与精液混合时,需要特别小心。
3. 将 1 份体积 GEYC 加到 2 份体积精液中,逐滴加入并转动混合液,或用移液器轻轻上下吹吸,或分 5 次逐步加入并轻柔混匀,室温下操作过程大约在 10min 以上。
4. 加入所有的 GEYC 冷冻保护液后,混合液在 30~35℃ 孵育 5min。

6.4.1.3 将精液-GEYC 混合液装入麦管

1. 0.5mL 塑料麦管由于其热传导性能好并易于储存而较为常用。塑料冷冻小瓶可以储存更多的精液-GEYC 混合液。
2. 将精液-GEYC 混合液吸入 0.5mL 塑料麦管或装入冷冻小瓶。有些商售麦管带有一次的“填充头”,可以防止精液直接污染麦管的末端。可在麦管末端连接一个带有三通管或转换器的真空抽吸装置来装填麦管。一直装填麦管,至麦管中的液体充满接触到脱脂棉塞,这样可以防止移除吸力时麦管被排空。

6.4.1.4 密封充填有精液-GEYC 混合液的麦管

1. 在容器边缘轻轻磕打麦管,使麦管进液端留出 1cm 空气段。如果使用带填充头的麦

管,可以自动实现这个步骤。

2. 用热封仪热封麦管的两端。

3. 擦干麦管的外部,然后用 70%(v/v)乙醇或其他微生物去污剂消毒。

4. 确保麦管标记上正确的患者/捐精志愿者的详细信息,确保在冷冻之前麦管的两端被正确封堵(6.4.3 节)。

6.4.1.5 使用程控冷冻仪降温冷却和冷冻精液

程控冷冻仪能够控制液氮蒸汽注入冷冻室的速率。

1. 把麦管或冷冻小瓶放入程控冷冻仪中,按照厂商的操作指南启动程序。

2. 常用的麦管降温程序是:从 20℃到-6℃,每分钟降温 1.5℃;然后每分钟降温 6℃,直到-100℃。整个过程大约需要 40min。在麦管移入液氮前,麦管可以留置在-100℃冷冻室中至 30min。

3. 也可以使用其他更复杂的程序,这主要取决于每个实验室的经验^[401]。

6.4.1.6 精液的人工降温和冷冻

与程控仪冷冻相比,人工方法较不易控制也难以标准化,但仍能取得适宜的效果。人工程序有多种方案可供选择。

1. 把麦管置于冰箱冷冻室(-20℃)中 30min,然后放在干冰(-79℃)上 30min,最后置入液氮(-196℃)中。

2. 麦管可以从-20℃冰箱冷冻室移到另一个冰箱的-70℃冷冻室,或放入一个提篮或小筒内,置于小液氮罐颈部液氮蒸汽与空气的混合气相中,温度从-80℃到-100℃,放置 10~15min,然后置入液氮中。也可以在大液氮罐的液面上方 10~20cm 处放置支架,麦管留置 1h 以上,利用液氮上方的温度梯度而逐渐降温。

6.4.1.7 液氮蒸汽快速冷冻

人工的液氮蒸汽快速冷冻也可以获得合适的结果。

1. 将麦管放置在液氮液面上约 10cm(-80℃)的液氮蒸汽中,留置 8~10min,以进行初始慢速冷冻。为了使这一过程标准化,可采用适宜放置麦管或冷冻小瓶的商售漂浮支架或漂浮盒,使麦管和液氮液面之间保持固定的距离。

2. 然后立即将麦管浸入液氮中。

6.4.1.8 冷冻精液的储存

1. 将多支麦管放入塑料储存管(例如:小储存管,带孔支架或者麦管盒)内,然后再置于较大的储存筒中。

2. 将放置了麦管的储存筒置于液氮真空瓶或液氮罐中。

6.4.1.9 冷冻精液的运输

冷冻精液可以使用商售的可吸附液氮的低温运输罐进行干式运输。由于液氮蒸发,运输罐内只可以维持适当低温数天至数周,具体情况取决于运输罐的大小。



■ 注解: 确保液氮和人类生物样本的运输符合地方、国家和国际法规。

6.4.1.10 冷冻精液的解冻

1. 冷冻精液应用之前,从液氮罐或液氮蒸汽罐中取出所需数量的麦管或冷冻小瓶,并立即置于 37℃ (在培养箱中解冻,或更好的方法是放在干热板上接触解冻,这样在两次使用之间易于除污)。

2. 完全解冻后,用无菌剪刀剪去麦管末端,连接授精装置(为治疗用),或排出麦管内精液,检测解冻后精子活力(为检查冷冻过程)。

3. 解冻的精液加入培养液后,500g 离心 10min,除去冷冻保护剂。弃去上清液后,再用培养液稀释精子团至恰当体积^[402]。

如果患者决定放弃他们冷冻储存的精液,应有见证人在场,见证取出样本并确认无误,然后再销毁麦管和 / 或冷冻小瓶。

6.4.2 少精子症和手术取精样本的改良冷冻方案

仅有很少活动精子的精液、生殖管道中或睾丸组织活检获得的精子悬液都可以储存,用于后续 ICSI 治疗。

- 如果要冷冻保存的精子数目很少,取决于样本的具体情况,需使用个性化的冷冻保存方案。
 - 商售的特殊载体可用于少量精子甚至单精子的冷冻保存,不过,有些类型的载体需要借助于显微操作^[403]。按照厂商的建议,这类载体装入精子后,需置于冻存管内,再放到液氮中储存。
 - 如果没有此类精子载体,建议使用微量精液体积的冷冻保存方案。
- 含有精子的附睾或睾丸抽吸液,以及用上游法或密度梯度离心法从整份精液中筛选的精子悬液(5.4 节和 5.5 节),在含有 Hepes 缓冲系统和人血清白蛋白(4mg/mL)的精子制备液中重悬为精子悬液,加入 Tyrode's -葡萄糖 - 甘油(TGG)冷冻保护剂进行冷冻保存,或者使用商售冷冻保护剂,则按照厂商介绍进行操作。
- 含有精子的完整睾丸组织须冷冻保存以备未来应用,需要建立特殊的冷冻方案。

6.4.2.1 改良的冷冻保护剂(TGG)

1. 40mL 无菌 Tyrode's 液中加入 5mL 无菌人血白蛋白储备液(100mg/mL),0.9g 葡萄糖和 5mL 甘油。0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2. 以 2mL 分装,在-70℃储存。

见 6.4.1.1 节的注解,在实验室制备冷冻保护剂。

6.4.2.2 程序

1. 如果样本体积大于 2.0mL,并且活动精子很少,在室温下以 1 500g 离心 5min。
2. 弃去上清液,留存大约 1.0mL 重新悬浮精子。测定活动精子(PR+NP)百分率,如果活动精子数目非常少,则评估整张玻片的活动精子数目。
3. 解冻 2mL TGG 或实验用卵黄缓冲液(TYB)。

4. 将1体积TGG或者TYB逐滴加1体积制备好的精液中,混匀。

5. 装入麦管或冷冻小瓶,如上述步骤进行冷冻。冷冻后的麦管装入小储存管。如果麦管未装满小储存管,需要给小储存管加盖,以防冷冻储存时麦管从小储存管内飘出来。

6.4.3 麦管/冷冻小瓶的标记与记录

必须采用一个防脱落编码系统将麦管或冷冻小瓶分类标记。为保持供精者匿名,所有实验室数据记录表和计算机数据库管理系统均使用编码。将密钥与捐赠者身份资料分开,单独安全存放。可采用的编码系统有多种,关键点是能赋予每位捐精者或精子保存者一个独有的代码。对客户或患者而言,重要的是识别每支麦管或冷冻小瓶所对应的保存者姓名、出生日期、医院编号、储存日期以及国家法律规定的其他任何要求。下面的编码系统可以满足所需条件。

- 每一位新匿名捐精者被分派一个由两个字母组成的代码(AA、AB、AC、BA、BB等,直到ZZ,之后便需要更换一种新的编码方式)。
- 三字母的编码系统用于患者和已知的捐精者:AAA、AAB等。
- 取自一位特定捐精者的每份样本代码标识为其个人信息代码后添加数字。例如,个人信息代码为BT的捐精者第8次捐精,标记为BT-8。
- 使用不脱色的黑色标记笔,在每一支麦管或冷冻小瓶上写下字母代码和样本编号。或者打印出有患者姓名、出生日期和储存日期的标签。该标签必须是专门设计可在液氮中使用的。应当考虑选择的标签是否会随着时间推移会受损。
- 存放麦管的小储存管(或代替品)也应标记清晰的代码和样本编码,应该仅包含当时患者的样本信息。
- 对存放多个样本和小储存管的大储存筒进行颜色编码,有利于快速识别样本。
- 随着冷冻储存精子的使用,数据库中麦管或冷冻小瓶的数量记录要相应地调整。



注解: 凡涉及捐精者或患者样本的身份确认、样本接收、麦管的制备和标记、液氮罐中的放置以及麦管的解冻使用和废弃等操作,都应该有两人的双重核对,并将见证检查证据记录在实验报告中。在任何情况下,一名技术员最好每次只处理一份精液样本。

在精液样本储存和从精子库转运到接收机构期间,所有精液样本都应有识别码。

6.5 玻璃化冷冻

新证据表明,玻璃化冷冻是冻存精子的一种有价值方法^[404]。该方法的原理是小体积样本与无污染物的液氮直接接触实现超快速冷冻,这样可以防止冰晶形成并减少渗透性损伤。麦管玻璃化冷冻(无菌玻璃化冷冻)可以使用封闭系统,这样不需要无菌液氮。渗透性和非渗透性添加剂联合应用,可以对整份精液或选择的精子进行玻璃化冷冻,也可用于单个或少量精子的玻璃化冷冻保存^[405]。但是,玻璃化冷冻与传统冷冻方法相比,玻璃化冷冻获得更好的冻后精子参数的证据不多^[406]。因此,精子玻璃化冷冻应考虑为一种实验性方案。

6.5.1.1 直接玻璃化冷冻方案

使用“开放式”装置的玻璃化冷冻,样本直接暴露于液氮,这样会带来额外的污染风险。一般情况下,建议使用无菌液氮。玻璃化冷冻过程也可能对操作者存在危险,操作者应始终使用恰当的防护装备。

材料

- 冷冻保护剂。
- 无菌液氮。
- 盛放液氮的容器。
- 用于收集玻璃化小球粒的小过滤网。
- 冷冻管。

方法 (from Isachenko et al. [404])

1. 用等体积的添加剂^①稀释后,使用一次性容器,将精液逐滴快速直接滴入无污染物的液氮中。

2. 然后用小过滤网收集已在液氮中形成的玻璃化微球,并将玻璃化微球转入冷冻小瓶内,立即置于液氮中储存。

6.5.1.2 麦管的玻璃化冷冻方案

麦管内的玻璃化冷冻(无菌玻璃化)方法采用封闭系统,用两个麦管(一个套在另一个里面),完全密封,不与液氮直接接触避免了污染;可以施行含有精子数目多的较大液体体积(100 μ L)的玻璃化冷冻^[404, 407, 408]。这个方法对操作者的危害小。

材料

- 0.5mL 和 0.25mL 的麦管。
- 玻璃化冷冻保护剂。
- 盛放液氮的容器。
- 10mL 锥形管。
- 温热的培养液。

方法

1. 制备 1mL 玻璃化冷冻液:

- 精子洗涤液或 HTF:0.495mL。
- 溶于水的 0.5mol/L 蔗糖(例如 MP Biomedicals, 目录 . 152584):0.495mL。
- 葡聚糖血清添加物(例如 IrvineScientific, 目录 . 9301):0.010mL。

2. 按照精子参数和当地实验室操作方案,采用经上游法或密度梯度离心法筛选出的精子(不含精浆)。

3. 回收筛选的精子后,对精子计数,然后离心浓缩精子(300g, 离心 8~10min),完全去除上清液;加入适当体积的玻璃化冷冻液,重悬沉淀的精子团(计算如下):

- 每支麦管(0.25mL)玻璃化冷冻的悬液体积:100 μ L。
- 每支麦管的精子浓度: $0.1 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$ 个精子。

例如:

回收精子:总数 15×10^6 个精子

^① 添加剂类型、冷冻保护剂温度,以及精子暴露在冷冻保护剂中的时间是关键,可以影响该方法的冷冻效果。

冷冻保存目标: 3×10^6 个精子 / $100 \mu\text{L}$ (每支麦管的容积)

$1\text{mL} = 30 \times 10^6$ 个精子

X 容积 = 15×10^6 个精子被回收

因此, $X = 0.5\text{mL}$ 玻璃化冷冻液 (含 0.5mL 玻璃化冷冻液, 用于 5 支 $100 \mu\text{L}$ 的麦管, 每支麦管含有 3×10^6 个精子)。

4. 仅在冷冻前才立即将精子团与玻璃化冷冻液 (室温) 相混合。不建议将精子长时间暴露于玻璃化冷冻液。

5. 须将 0.25mL 麦管剪去原始长度的 $2/3$ 。然后水平放置, 使用移液器将分装的 $100 \mu\text{L}$ 混合液从开口端加入麦管内。后续步骤也必须确保麦管水平位置, 以使混合液不丢失。

6. 将 0.25mL 麦管导入 0.5mL 麦管后, 将其两端热封。借助镊子将麦管处于水平位, 并立即浸入液氮中 5s , 然后储存在液氮中。

玻璃化冷冻后复温程序

1. 制备温热的培养液。

2. 在预热至 $42 \sim 43^\circ\text{C}$ 的培养液中, 解冻麦管或冷冻小瓶中的内容物。



第 7 章 质量保证和质量控制

7.1 男科学实验室质量控制	146
7.2 精液检查中误差的性质	147
7.3 QA 计划	150
7.4 数值的质控图	152
7.5 百分率的质控图	155
7.6 评价 $\bar{X}$ 和 S 图	155
7.7 分析和报告检测人员间差异的统计程序	157
7.8 外部质量控制和质量保证	160
7.9 QC 的频率和优先次序	162
7.10 培训	163

质量保证(QA)是实验室为使用者即临床医生及患者提供可靠服务的基础。质量控制(QC)是确定评估实验室是否提供可靠结果的一套工具。QA 不仅与分析有关,而且具有更广泛的概念。QA 包括实验室提供稳健可靠服务的所有程序。因此,QA 包括很多方面内容,例如:患者与转诊医生共享信息的程序,接受转诊的标准,结果的分发,以及实验室各方面差错和投诉的处理。

“精液检查特殊复杂且程序难以标准化,这可能导致不同实验室对精子计数、活力和形态学的评估存在很大差异。”

7.1 男科学实验室质量控制

精液检查特殊复杂且程序难以标准化,这可能导致不同实验室对精子计数、活力和形态学的评估存在很大差异^[9, 409-413]。这种差异可以通过制定标准化程序和 QC 措施来解决,后者可以检测和纠正系统误差,减少结果的技术变异。对于医学实验室,通用国际标准 ISO15189^[357] 可确定实验室质量管理程序,并为认证机构对实验室的认证提供支持。作为 ISO15189 标准的补充,一项基于与本世界卫生组织手册相同原则的基本精液检查的正式标准,已由国际标准化组织 (ISO) 于 2021 年颁布。

实验室的 QA 涉及对实验室服务和设施的各个方面进行系统监测和评估,以使该计划最大限度地达到既定质量标准的可能性。

相关定义如下。

- **实验室目标(性能标准):**特定服务所需的性能水平,通常可通过时间和数量来衡量。它

说明了实验室预期可提供的服务。

- **指标:**一个衡量与实验室目标直接相关的服务情况的变量。它具体说明了确定目标是否实现需测量的内容。
- **质量改进:**一种分析性能、并应用系统性努力来改进性能的结构化方法。
- **内部质量控制(IQC):**测量实验室结果的可变性。IQC 对于检测总体随机变异(精密度),以及不同技术人员分析结果之间的系统和随机差异是有意义的(7.3.2 节)。
- **外部质量控制(EQC):**不同实验室之间对一项或多项测量的比较。EQC 对于检测系统变异和评估准确度是有意义的。它也被称为能力验证(PF),或者外部质量评价或保证(EQA)。

只有诊断过程的每个环节质量都是最佳时,才能实现实验室质量计划的预期效益。

正如本手册(第2章)中所述,实验室的QC行动始于准确且可控的评估程序的实施。除了技术方面,还必须关注相关人员的资质-性能监控。

所有进行精液分析的实验室都需要实施QA计划(7.3节),该计划描述了方法和程序的目标,以确保结果可靠,即准确和精密。由于广泛的法律认证程序,有些国家/地区的法律已经要求实施QA和EQA计划。在其他一些国家,健康保险系统要求标准化。然而,有些地区因可用资源和能力所限可能无法实施全套程序,应该由内部或尽可能由外部QC或QA程序来监控基础或标准的常规程序。基础的常规程序(第2章)包括精子计数或浓度、形态和活力的基本参数。本手册提供了实验室QC过程更详细的实际处理方法和深入描述^[414]。

7.2 精液检查中误差的性质

本节详细介绍了如何针对源于技术人员因素的变异进行质量控制(生物学变异主要在第2和第3章中讨论)。

QC程序的管理需要了解测量误差的来源和大小。任何测量都有一定程度的误差,其大小可以用具有上限和下限的置信区间来描述。QC程序的目的是最大限度地减少这些变异,否则可能导致患者医疗和管理方面的错误。IQC更关注测量的不精密度(变异性);EQA更注重实验室评估的准确度(正确性)。这些质量活动将使结果更可靠、更真实、更有益于临床医生和研究人员,并且对患者医疗和管理更安全。

7.2.1 允许变异(可接受的随机误差)

总会有某种水平或程度的允许变异,表示为测量值的可接受范围(在范围的下限和上限内)。此范围通常是由置信区间(CI)的计算来定义。CI是一个统计计算范围,最常用的是95% CI,其中“95%”的意思是,在统计上,95%真值很可能在这个区间内。根据检测次数的不同,95%的CI通常接近约 ± 2 倍标准差(SD)。SD是表示重复测量围绕均值变异的度量。例如,比较高浓度和低浓度之间的变异性,可使用变异系数(CV)。CV的计算方法是SD除以均值,通常以百分数表示[需注意的,当平均值接近于零时,CV将非常高(SD几乎除以零),并且实际上毫无意义]。

当范围的上下限较窄时,可认为该测量是精密的。范围窄是重复测量之间差异小的结果。如果分析得出的结果接近真值,则结果是准确的(或正确)。准确度被描述为测量结果与真实结果之间的差值。

误差分为随机误差和系统误差。

7.2.1.1 随机误差

随机误差给出偏离预期真值的结果——时高、时低。随机误差常由结果判读或取样过程中的变异产生，可以通过同一观察者使用同一设备对同一样本的重复测量来评估，或所有计数人员使用所有曾用于该样本测量的实验室设备来评估。期望这些值之间不应有太大差异。

7.2.1.2 系统误差

系统误差也被称为“偏倚”，很难被发现。系统误差导致错误的结果，通常是连续低或连续高。它们来源于始终在一个方向上影响结果的因素，但并不明确增加重复评估同一精液样本的变异性。因此，系统误差不会通过重复测量检测出来。

7.2.2 统计学抽样误差

即使精液样本经充分混匀，精子在精液、固定液或培养液中的分布仍然有随机变异。由于从技术上和实际情况来说不可能计数整份精液中的全部精子，人工或计算机辅助分析都只能选取部分样本来代表整份样本的一部分。问题是从射出精液（或精子悬液）中取出的部分样本对整份精液的代表性如何。通过选择一定体积（用于评估浓度）或一定数量的精子（用于对活力分级、形态或存活率进行分类）产生的抽样变异是一种随机误差，通常称为（统计）抽样误差。这方面的一些常用术语见表 7.1。

表 7.1 质量保证和质量控制术语

准确度	检测结果与真值间的一致程度（或结果的正确程度）
指定值	对真值的估计值（通常来源于许多实验室结果的平均值）（靶值、公议值、约定真值）
偏倚	检测结果与指定值的偏差；始终相同方向的可重复不准确度（系统误差）
二项式分布	一种用于描述只有两种互斥结果事件的理论分布。例如活动 / 不活动，存活 / 非存活
Bland-Altman 图	一种描述一系列配对测量值差值相对于其均值的散点图（x 轴：均值；y 轴：差值）
常见原因变异	影响研究过程中所有个体值的一种自然变异的来源
95% 置信区间	根据观测数据计算得到的区间，真值就包含在 95% 的重复测量值中（计算公式为 $X_{\text{bar}} \pm 1.96 \times SE$ 或 $N \pm 1.96 \times \sqrt{N}$ 计数）
公议值	见指定值
约定真值	见指定值
质控图	一种时间序列图，显示一系列单独的测量值，以及中心线和控制限
控制限	检测过程中源于单纯常见原因的最大允许变异。变异超过控制限，则表明有特殊原因影响检测过程
累积和图	显示与靶值的累积偏离的一种图，是偏倚和漂移的早期预警工具
漂移	测量值连续的微小改变，将导致准确度随时间的改变
外部质量评价（EQA）	由外部机构执行的、对某地不同实验室间检测结果进行比较，有助于发现检测的系统变化、评估检测的准确度

续表

良好实验室规范 (GLP)	该准则提供了实验室研究的计划制定、执行、监控、记录、报告和归档等方面的框架
在控	当所有值都在预期控制限内,过程处于控制之中
内部质量控制	测量实验室内部程序变异性的质量检验过程。该过程用于评价日常操作的精密度。有助于发现随机变异(评价精密度)
ISO	国际标准化组织 (www.iso.org),一个制订国际标准(包括实验室质量标准)的组织
生产的质控样品	商品化的样品,根据生产指南进行制备和分析(检测)
失控	测量值超过预期的控制限,或虽在控制限内但显示了显著趋势,表明过程失控。凡失控的过程都必须进行评估
PDCA	计划—执行—检查—处理 (Shewhart 循环)
Possion 分布	一种用于建立计算模型的理论分布
精密度	重复测量结果间的一致程度。通常以不精密度表示(漂移;批内、批间、期间、批次、检测或实验室的变异);精密度的测量不受偏倚的影响(见抽样误差)
能力验证	外部质量评价的一种形式,即外部组织对来自不同实验室的结果进行比较,并在达到设定性能(质量)水平时颁发证书
随机误差	见抽样误差(精密度误差)
S 图	测量值的标准差对时间所作的一种质控图,用于监控过程的一致性和测量的精密度
抽样误差	计数有限数量的精子相关的误差(与计数的精子数的平方根成反比)。抽样误差(%SE)是某个计数量的标准误($\sqrt{N}$),以计数的百分数表示 $[100 \times (\sqrt{N}/N)]$
Shewhart 循环	见 PDCA
特殊原因变异	是指较大的、非连续性的或无法预测的变异来源,仅影响研究过程的一些个体值(随机变异)
标准操作规程 (SOP)	应遵循的操作步骤和方法的指导性文件
统计学抽样误差	见抽样误差
系统误差	见偏倚
靶值	见指定值
变异	多个检测结果之间的差异。变异(误差)的原因可能是常见的或特殊的
$\bar{X}$ 图	测量值的均值对时间所作的质控图,用于监测过程的变异性、检测与靶值的差异(评估准确度)
Youden 图	一个样本的测定值对另一个样本的测定值所绘制的图

7.2.3 最小化统计学抽样误差

测量整份样本是不可能的。另一种选择是在大量重复样本中检查较小部分、具有代表性的部分样本。这将过于耗费时间和精力,故同样是不可行。因此,需要在获得统计的精确度(结果的可靠性)和实现它所需的实际时间和努力之间取得平衡。为了在工作量和结果可靠性之间达到可接受的平衡,本手册中关于精液基本检查的建议包括了若干条款(第2章)。

- 进行精子浓度评估制备稀释精液时,使用正向置换型移液器正确地吸取精液;
- 为使精子浓度评估可信,应稀释(固定精子)和计算计数池体积(经评估的精确体积);

- 通过重复评估并比较精子浓度和活动力,来降低代表性较差的等份样品造成的随机误差的风险;
- 制备足够深度的湿片,对精子运动无损害;
- 评估足够数量的精子(活力和浓度 400 个精子;存活率和形态 200 个精子),以减少精子随机分布的影响。

确定实验室的统计抽样误差时,通常以置信区间表示,一般设置在 95% 的水平(上下限)。这意味着,仅因偶然变异致使正确的结果不在“可接受范围”内可能性为 5%。如果一个正确的结果因此被拒绝,将会进行不必要的重复评估。其基本原理是大多数被拒绝的结果可能是由于抽样误差造成的。在很多情况下,不必要的重复评估的频率是可以接受的。对于某些情况,可以选择更宽的范围(例如 2.6 倍或 3 倍标准差,而不是通常的 2 倍)来减少不必要重复评估的频率(分别为大约 1% 和 0.2%,而不是 5%),但必须考虑为此接受更多误差增加的风险。

7.3 QA 计划

ISO15189 提供了实验室质量管理的详细信息^[357]。遵守标准并取得可接受结果的一个重要方面是制定和执行一个持续的 QA 计划。QA 计划对实验室提供的数据和服务质量和适宜性定期进行监测和评估,通常包括管理、执行、统计分析以及预防和纠正措施。QA 计划可以使用持续监测,这不仅能发现和纠正问题,而且能够实施有助于防止这些问题发生的措施。QA 计划应在包括标准操作程序(SOPs)的质量手册中描述,这是实验室使用的不同过程和方法的一套详细说明。与这些说明相关的是一些表格和文件,如转诊单、实验室工作记录报表以及给患者和转诊医生的信息册等。质量手册描述的是实验室的组织结构,其中具体列举了不同岗位(职责描述)所需要的技能(培训),检验人员和监督人员之间的会议安排、继续教育计划以及员工的发展和培训计划。

7.3.1 实验室操作手册

手册中应描述实验室中常规执行的程序。所有实验室技术人员都应严格遵循已成文的 SOPs。SOPs 应是实验室技术人员内部培训和服务的一部分,且可为非常规程序或那些没有得到可接受结果的问题排除过程的重要参考。

必要的文件应包括转诊单、患者告知程序、患者预约时间表、标本收集单、检测性能报告、分析结果报告、质量检测程序、新实验室人员培训、检测、设备的监测和维护、质控图的使用及在质控图上的数值提示出现问题时(失控的检测)应遵循的处理程序,以及对试验结果的解释。SOPs 应涵盖用于核查设备正常运转的所有操作程序,包括操作的例行检查、校准日程和记录,以及对诸如显微镜、离心机、移液器、天平、冰柜、冰箱和急救设备(如洗眼器和淋浴)等科研设备维护保养的文件。基本的方法是应使用核查表或监测工具保存每个设备的日志簿,其中记录所有的调试和校准活动。如果实验操作开始出现失控结果,这些记录会有帮助的。

7.3.2 内部质量控制

内部质量控制(IQC)监控精密度,或如何获得可重复的结果(最小化随机误差)。因此,借助于观察那些超出既定控制限的结果,可以提示检测何时可能存在缺陷或问题。执行的

QC 程序取决于要监测或控制的评估。涉及稀释、加样或重复使用计数池或具有多个步骤的评估,需要定期或更频繁地检测,而对固定的玻片或视频的评估,因其产生误差的步骤较少,而不必频繁检查。

实施 IQC 的一个实际方法是将 IQC 程序和 IQC 样本纳入实验室的常规工作量中,并使用 QC 图监控这些程序的结果。这样,IQC 成为实验室常规工作的一部分,并按照既定的本地或区域标准进行。重要的是将质控样本作为实验室常规工作的一部分,而不要特殊对待。用于监测人员之间(指一个人评估同一类型质控品的一致性)和技术员之间(指两个或更多人评估或解释同一标本评估的一致性)变异,可以购买商品化质控品或在实验室制备。两种方式各有利弊。

7.3.2.1 购买的 QC 样品

一些可获得的商品化 IQC 样品提供了靶值,所获得的产品最好还建立了可接受性能的允许限。商品化 IQC 样品的优点是可以评估准确度和精密度。实验室中精液分析结果的变异可以与那些可溯源质控品的变异进行比较。如果采用这些质控样品,实验室应建立起自己的质控图用于评估精密度,并应采用生产商所推荐的范围来评价准确度^[415],或者个别中心甚至可以实行更严格值的水平。购买 IQC 样品的缺点是成本高,而且不能普遍获得。样品在运输和储存期间的稳定性也应予以考虑。需注意的是,如果提供商品化 IQC 样品,应知道生产商所给靶值的获得方式(多次分析、计算机辅助精子分析、公议值、修正均值等)。

7.3.2.2 实验室制备的 QC 样品

实验室制备 IQC 样品的优点是成本降低、局部通用性强,而且样品可根据实验室的特殊需要而专门制备。此外,这些样品不会被认为与常规样品不同。可制备大量覆盖较宽结果范围的样品,并长期储存。它们的缺点是靶值未知,这可能会导致长期系统的系统偏倚或误差。建议或要求,备有平均值范围(例如,精子浓度 $50 \times 10^6/\text{mL}$)和临界值范围(例如:精子浓度 $<15 \times 10^6/\text{mL}$)的质控样品。对样品的重复测量可以产生接近该样品真值的均值。

7.3.2.3 储存的样品(购买或实验室制备)

储存的精液样本可以用于评估精子浓度和精子形态的 IQC 计划。优点是靶值是已知的(购买的质控品),或已提供(由 EQC 计划),或经多次评估计算(实验室自制质控品),由此可以通过重复测量检查出系统误差。

精子浓度

可以稀释并储存不同浓度的精液标本。所存储样品可以包括很宽范围,从理想到很差或难以评估的样品。请参阅 8.6.3 节,了解有关制备和储存非凝集精子悬液用于测量精子浓度 QC 的说明。

精子形态学和存活率

精子形态学评价,可使用空气干燥的精液涂片、固定后的精液涂片或经固定和染色的精液涂片(2.4.9.1 节)等作为质控品;而对于存活率检测,可使用伊红-苯胺黑染色涂片(2.4.7 节)等作为质控品。应该选取实验室的常规精液样本涂片,并对涂片掩盖标识及分析(参阅 2.4.9.6 节的精子形态学分类部分)。选择好、中、差三类精液制备 QC 样品。质控片可以重复

使用,但要经常评估其质量。最好使用有较宽范围的质控片,以消除在评估过程中检测人员因对某些涂片熟悉、不够严谨的可能性而出现偏倚的结果。

关于如何制备精子形态学评估的 QC 片,参阅 8.6.4 节。如果涂片制备和储存得当,可以保持稳定数月甚至数年。在质控片更替批次的过渡时期,可以以旧换新或新旧重叠使用。

精子活力

从医疗机构、EQA 分发或专门制作的录像磁带、CD 或 DVD 或共享媒体平台上录制的视频标本,可用于 QC。录像的放大倍数和分辨率要与实际标本分析时显微镜观察的一致。所有日常分析中所用的摄像机和显示屏采用的是与视频录像时相同的放大倍数和对比度,这样也可增加录像资料用于 QC 的有效性。

如何制作精子活力测量的 QC 视频录像,见 8.6.2 节。

7.3.2.4 新鲜的 QC 样品(实验室制备)

IQC 的一个简单方法是将同一份精液样本分装成等份后交给一名或多名检测人员进行重复地读数或测量。重复评估应该以日常精液分析同样的方式进行。这种质控形式可以应用于精子浓度、形态和存活率的评估,并且在一定程度也应用于精子活力的评估(见下文)。鉴于凝集和聚集评估的主观性、混合抗球蛋白反应的变异性^[416],加之需要活精子和阳性对照,使得这些试验的质控存在难度。

新鲜精液样本的精子活力测量的 IQC 存在特殊问题,由于精子活力随时间而下降,因此内部质控时需要所有检测人员在第一时间、且基本上同时进行评估。标本采集一段时间或很久之后,样本的测量结果将会降低。载玻片和盖玻片制备的活力样片,精子活力仅能稳定几分钟,因此只要在射精后的时间和温度上没有太大的差异,便可使用精子活力稳定达 30min 的固定深度的计数池进行评估。使用桥联显微镜或连接到一个或多个显示器的有摄像机的显微镜,允许几个检测人员同时评估同一样本的同一视野。这在初始培训中特别有帮助。可以将醋酸纤维素网格覆盖在监视器上模拟镜下活力分析中目镜上的网格(8.6.2 节)。

使用 CASA 系统的实验室应该遵循生产商的质量控制程序。通常做法是重播录存的已标记了以某种泳动速度的活动精子影像。

7.4 数值的质控图

本节描述了显示和分析数值的方法,主要针对“连续数据”(主要是精子计数)。对于比值,必须使用稍微不同的方法。

质控图的制作和解读是实验室 QA 不可或缺的一部分。为了获得良好有序和易于理解的 QC 数据展示,有一些图表可以采用。不同的质控图有不同的优点,应根据准确度、精密度或误差等问题的性质和可获得的材料来选择。如果实验室缺乏统计和结果解释能力,则必须寻求外部能力的帮助,以确保能够使用连续的 QA 系统对实验室标准进行监控。统计学基础理论和计算可能很复杂,但图表本身很容易理解和解释。

7.4.1 X_{bar} 图

X_{bar} 图主要是设计用来发现那些极端偏离靶值的实验结果或全方位增加的结果变异。连续测量相同样本可检测出系统误差。对同一样本重复测量,用均值对时间或所检查的测

试悬液作图。因为该程序要求有已知真值或靶值,而储存样本的真值或靶值可由生产商(购买的样本)或 EQA 计划提供或评估(对质控品的多次评估),故而须采用储存样本。

X_{bar} 图是一种 Shewhart 图,用于监控恒定数量测试样品重复分析获得的平均值。例如,由所有工作人员完成 10 个 IQC 质控品(全部来自同一批质控品)的精子计数。计算所有人员对每个质控品评估结果的均值。然后用 10 个质控品的平均值绘制质控图(图 7.1)。计算靶值(X_{bar} , 均值的平均值)、警戒限和行动限(表 7.2)。控制限基于评估的变异和执行评估的人数,并用 X_{bar} 上限和下限表示。

4 名男科学家(A-D)对同一批 IQC 制品的 10 个质控样品所评估的精子浓度。警戒限(A_2)和行动限(A_3)见表 7.3。

表 7.2 计算 X_{bar} 图的数值

	质控样品									
人员	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	38	35	40	34	38	36	44	43	39	43
B	42	36	42	40	40	40	43	43	46	40
C	38	43	40	51	38	33	39	45	35	39
D	34	36	36	37	36	39	42	43	46	34
均值	38.0	37.5	39.5	40.5	38.0	37.0	42.0	43.5	41.5	39.0
标准差	3.27	3.70	2.52	7.42	1.63	3.16	2.16	1.00	5.45	3.74
X_{bar}	39.7									
S	3.40									
警戒					X_{bar}	A_2	S_{bar}			
上限	43.3	$X_{\text{bar}} + (A_2 \times S_{\text{bar}})$			39.7	1.085	3.40			
下限	36.0	$X_{\text{bar}} - (A_2 \times S_{\text{bar}})$			39.7	1.085	3.40			
行动					X_{bar}	A_3	S_{bar}			
上限	45.2	$X_{\text{bar}} + (A_3 \times S_{\text{bar}})$			39.7	1.628	3.40			
下限	34.1	$X_{\text{bar}} - (A_3 \times S_{\text{bar}})$			39.7	1.628	3.40			

表 7.3 计算 X_{bar} 图警戒限和行动限所需要的系数

技术人员数 /n	警戒限 / A_2	行动限 / A_3	技术人员数 /n	警戒限 / A_2	行动限 / A_3
2	1.772	2.659	7	0.788	1.182
3	1.303	1.954	8	0.733	1.099
4	1.085	1.628	9	0.688	1.032
5	0.952	1.427	10	0.650	0.975
6	0.858	1.287			

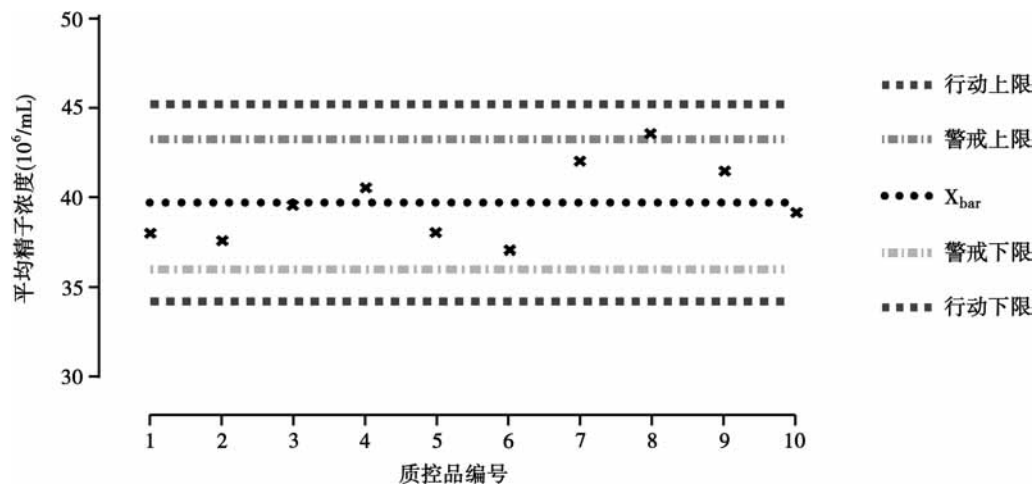


图 7.1 根据表 7.12 数据绘制的 $\bar{X}_{\text{bar}}$ 图

在检出技术人员是否产生高度可变的结果方面, $\bar{X}_{\text{bar}}$ 图没有 S 图敏感(7.4.2 节)

7.4.2 S 图

S 图用于检查是否由于检测人员造成了高度变异的结果。对样品进行重复测量,并用每个质控样品对检测结果的标准差作图。由于 QC 样品全部来源于同一个混合的储存样品,预计每个样品之间没有差异。因此,检测人员之间的任何显著性差异,将提示是某个或多个人员在评估时存在系统性偏倚。

与 $\bar{X}_{\text{bar}}$ 图相比,图 7.2 绘制的是评估 10 份精子质控样品的 SD 值。靶值是评估所有精子质控样品的平均 SD,在本例为 $3.40 \times 10^6/\text{mL}$ 。与 $\bar{X}_{\text{bar}}$ 一样,在 S 图中添加了控制限。但警戒限和行动限的计算方式与 $\bar{X}_{\text{bar}}$ 图不同(表 7.4)。低于 S 图下限的结果提示变异很小,可能表明技术人员之间的一致性水平确有改善,最坏的情况或是对数据进行了不当操控。

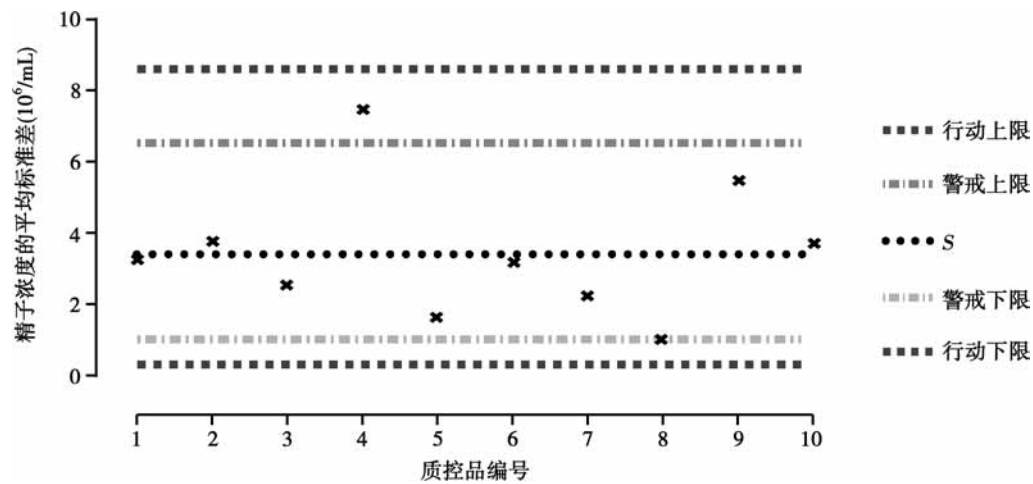


图 7.2 精子浓度的 S 图

表 7.4 计算 S 图的警戒限和行动限

S 图控制限和技术人员数				
技术人员数 n	行动下限 $/S_{0.999}$	警戒下限 $/S_{0.975}$	警戒上限 $/S_{0.025}$	行动上限 $/S_{0.001}$
2	0.002	0.039	2.809	4.124
3	0.036	0.18	2.167	2.966
4	0.098	0.291	1.916	2.527
5	0.160	0.370	1.776	2.286
6	0.215	0.428	1.684	2.129
7	0.263	0.473	1.618	2.017
8	0.303	0.509	1.567	1.932
9	0.338	0.539	1.527	1.864
10	0.368	0.563	1.495	1.809
警戒	$\times 10^6/\text{mL}$			n
上限	6.51	$S \times s_{0.025}$		4
下限	0.99	$S \times s_{0.975}$		4
行动				
上限	8.59	$S \times s_{0.001}$		4
下限	0.33	$S \times s_{0.999}$		4

7.5 百分率的质控图

与连续数据或数字数据的 QC 相比,分类和分级的结果必须使用不同的方法来计算控制限。当精子被分成两个或以上类别时(如正常或异常形态,四个活力级别,存活或死亡),每一类别的百分率估值的标准误取决于其实际但未知的百分率及所计数的精子数量(N)。百分率靶值(p)是按照重复评估相同测试样本的平均值计算的。百分率为 20%~80% 时,其标准误(变异性)近似值估算为 $\sqrt{[p(100-p)]/N}$ 。详细资料参见 Kuster et al.^[417]。当技术人员评估结果的 SD 接近这些值时,平均 SD、 S_{bar} 可能由于技术人员之间的额外变异将超过 2.5%。在这种情况下,目标应是降低 S_{bar} 。

7.6 评价 X_{bar} 和 S 图

由于 X_{bar} 和 S 图可以让我们对实验室提供的服务质量有深入的了解,为此遵从 X_{bar} 和 S 图是很重要的。此外, X_{bar} 和 S 图经常为很多机构对实验室进行认证提供依据。

实验室技术人员和管理人员应一起检查质控图。由于质量结果是一个团队在对实验室性能评估与讨论的基础上努力的结果,为此,技术人员和管理者最好在定期质量会议上共同复查分析质控图。如果质控值不可接受,则应对整个程序进行系统的评估,以确定变异的可能来源。

7.6.1 如何识别失控值

已有监控程序质量控制的基本指南。应根据这些指南检查质控图,并在有指征时采取措施。有各种可提示实验方法失控的质控规则,最重要的见表 7.5。在实际应用中,第一个和最后一个规则被广泛接受。第一个规则(一个结果超出行动限)是最简单的规则,其可能提示这个过程出现突然的大偏移。最后一个规则(8 个连续的点在均值线的一侧)很受使用者青睐,因为应用简单,且对第一个规则未发现的逐渐变化或趋势敏感。

如果质控样品的结果是“被拒绝”,所警示不同类型误差(随机或系统)的敏感性(报告检测真值和正确值的能力)应能引导去追查可能的原因(表 7.5)。实验室主管应定期审核质控结果。

表 7.5 质控图的基本控制规则

控制规则	提示的误差
一个结果在行动限外	随机误差
3 点中的 2 点超出行动限	系统误差
5 点中的 4 点超出警戒限	系统误差
连续 2 个结果均高于警戒上限或均低于警戒下限	系统误差
连续 2 个结果一个高于警戒上限,一个低于警戒下限	随机误差
8 个连续结果,都高于或均低于均值	系统误差

7.6.2 失控的原因

整个团队必须仔细评估来自 QC 程序的信号,以识别可能导致失控值的任何误差。可能的误差(带示例)包括:

- 样品混匀不充分(常见于黏稠和凝集样品);
- 检测人员的压力(如取样不稳定或记录错误);
- 技术差(如制片时或计数池加样时操作疏忽)(7.10 节);
- 培训不充分(如在精子计数、正常形态学分类、精子存活率检测时粉红色与白色精子头或卷尾的评估、检测活动精子等过程中的系统误差;或一贯性计算错误所致偏倚)(7.10 节);
- 仪器的变化(如:磨损或未校准的自动移液器会降低取样和稀释过程的可重复性;对焦错位的显微镜会降低视觉清晰度,并妨碍对存活率和形态学的正确评估;不准确的天平或量筒)(8.6.5 节);
- 质控样品变质(基于标准化原则);
- 仪器设备尤其是加样器和计数池的更换;
- 程序或实验室环境改变。

7.6.3 对失控值的反应

当结果超出控制限,应记录可能的原因和所采取的纠正措施。如果问题不明显,应重新分析质控品,核查第一个结果是否异常。如果质控结果仍超出控制限,在做进一步分析前,

必须找到并纠正误差的原因或来源。程序如下：

1. 制作整个检测过程逐步的详细流程图。SOP 和表 7.14 至表 7.17 有助于完成此过程。
2. 通过该流程图,识别可能出现变异的位置,推断可能的原因,并制订降低变异的计划。
3. 收集更多的数据,制作新的质控图,检查分析质控图,以确定该变异程度是否可接受。找出问题、生成和检验假设、重新评估程序,这一系列过程被称为计划、执行、检查、处理 (PDCA) 循环。

7.7 分析和报告检测人员间差异的统计程序

基于新鲜精液样本评估的质控程序与储存样品的程序相似,质控程序可以评估技术人员自身和之间的可变性。虽然质控程序相似,但也存在不同之处。分析新鲜精液样本时真值未知,所以不能使用 $\bar{X}$ 图,也不能估计系统误差(技术人员偏倚)。在这种情况下,主要的 QC 程序是评估用于技术人员之间可变性的 S 图,以及每 5~10 个 QC 样品后,可用双因素方差分析 (ANOVA) 评估技术人员之间系统差异。

7.7.1 两个或两个以上技术人员之间结果比较

- 可以使用以下几种方法比较两个或两个以上技术人员之间的结果。
- 用两个估计值的差值,对应的均值作图^[418]。比较两个技术人员对同一精液样本精子浓度的估计值,应得到一个与图 7.3 类似的图形。在 Bland-Altman 图中,两个评估的均值绘制在 x 轴上,差值在 y 轴上。理想情况下,所有评估均应集中在 y 轴上 0 附近。一般系统误差是由偏离 0 差异水平和差异所揭示的。在图 7.3 中,0.6% 的平均差值表明偏倚较小,但变异 (SD 7.6%) 大于理论抽样误差 (<5%)。亦有证据表明,CASA 方法检测值与人工分析检测值相比,高 60% 以上^[102]。

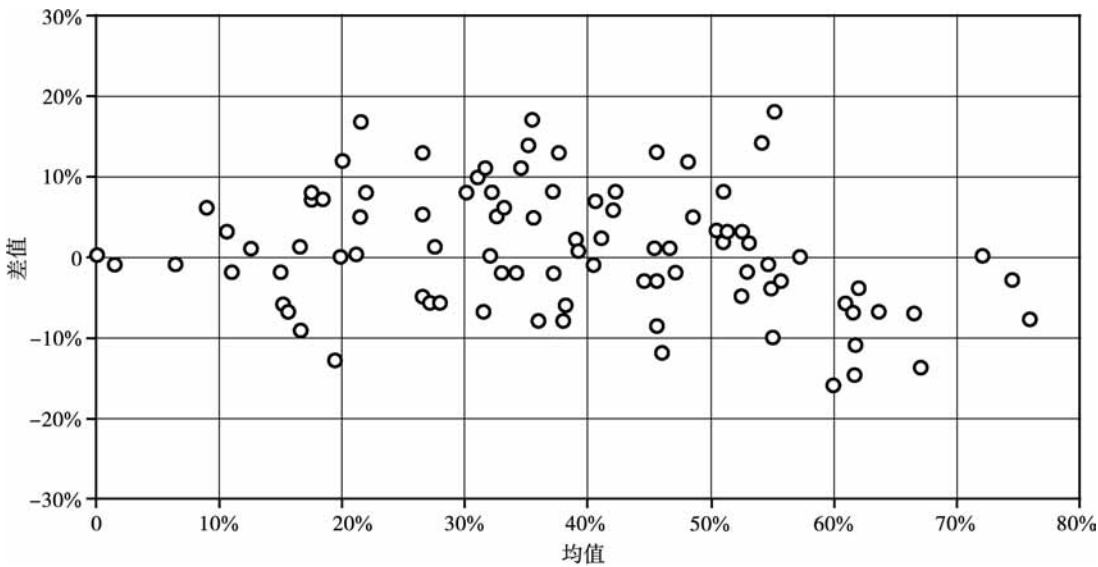


图 7.3 前向运动精子百分率的人工分析和 CASA 结果的 Bland-Altman 图

此图是两种方法(人工和 CASA)分析结果之间的差值(y 轴)对应于其均值 $[(人工 + CASA)/2]$ (x 轴)作图。

- 计算差值(配对比较)的均值和 SD。由于两名技术人员分析的是同一样本,所以理想情况下,均值之间的差值应为 0。因为使用配对 t 检验,任何非零的显著差异都提示了两名技术人员评估之间的偏倚(系统差异)。
- 用两个不同样品的结果互相作图(Youden 图)。每个技术人员分别检查两份不同样本的精子浓度,然后将几个技术人员的测量结果进行比较,应得到与图 7.4 类似的图形。对于每个技术人员(IQC)或每个中心(EQC),将两个样本的检测结果互相对应作图。图中水平的点线和垂直的点线分别表示有经验人员(IQC)或参考实验室(EQC)结果的 95% 置信区间。检测值应落在由这些线交叉形成的靶值窗口区域内。图中当一个样本的值落在正确范围内,但另一个样本值不在(标记为 1 区域;一个是正确的,另一个是不正确的),提示存在随机误差。当两个样本值均高(右上象限,标记为 2 区域;两个值均高)或均低(左下象限,标记为 2 区域;两个值均低),则提示存在系统误差。若一个样本的值过低,而另一个过高,最有可能是随机误差所致(标记为 3 区域)。

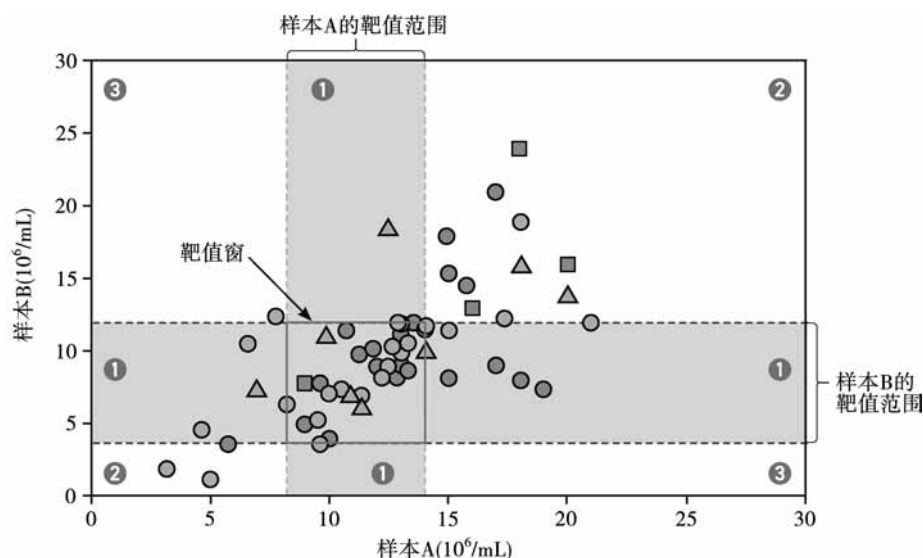


图 7.4 精子浓度检测值 Youden 图

12 个检测人员对两个样本(A、B)的分析结果各自互相对应作图。每名技术人员(或实验室,EQC)的结果可以用不同的符号及颜色表示。象限中标记为 2 区域的结果可能是存在系统误差,而象限标记为 1 和 3 区域的结果可能存在随机误差。

- 双因素方差分析。该技术在很多统计学教科书上都有描述^[419,420],也有对技术人员之间差异的显著性进行统计学检验的统计学软件包。与上面的配对比较一样,理想情况下所有技术人员检测结果的差异应该为 0。因此,计算每个技术人员所测每个样本的离均差,然后得出每个技术人员离均差的均值和标准差。若差值的绝对值大于均值上下 3 个标准误,则指示有偏倚。

技术人员之间差异的正式统计学检验是以双因素 ANOVA 表的 F 检验为基础,可从很多统计学程序直接获得。大于约 2.5 标准误的平均差不可能仅由随机误差导致(<1.2%),而且很可能是真实的或实际的。无论技术人员之间的差异是否显著,均须核查人员的均值或平均差,以确定哪些差异大于预期值。并非所有计算机软件包都提供技术人员间差异的标准误,有可能需要单独计算。技术人员个人之间的重大差异,应促使审查所有程序,以确

定如何改善一致性。

下一节中的样例说明了如何直接计算技术人员精子浓度检测值间差值的标准误,评估这些标准误是否大于预期的单独随机误差的标准误。当直接从观察值进行计算时,要保留足够的小数位数,以避免舍入误差。

7.7.1.1 评估技术人员间的系统差异:样例

表 7.6 3 位技术人员对 5 份质控样品评估的精子浓度 (× 10⁶/mL)

样品	1	2	3	4	5
A	108	45	100	50	92
B	103	47	102	50	96
C	104	46	89	41	88
样品均值	105.0	46.0	97.0	47.0	92.0

表 7.7 用各观察值减去样本均值得到样本离均差

样本	1	2	3	4	5
A	3.0	-1.0	3.0	3.0	0.0
B	-2.0	1.0	5.0	3.0	4.0
C	-1.0	0.0	-8.0	-6.0	-4.0

表 7.8 计算每位技术人员结果离均差的均值、标准差、均值 / 标准误 (n= 样本个数)

	均值	标准差	均值 / 标准误	标准误
	$m_j = \sum_i d_{ij} / n$	$s_j = \sqrt{[\sum_i d_{ij}^2 / (n-1)]}$	$[m_j / se(m_j)]$	$se(m_j)$
A	1.600	1.949	1.836	0.871
B	2.200	2.775	1.773	1.241
C	-3.800	3.347	-2.539	1.497

检测人员 C 的离均差均值为 $-3.8 \times 10^6/\text{mL}$ 。为了评估这种低估的程度是否符合随机误差,必须进行一系列计算(表 7.9)。

表 7.9 计算变异大小的分步骤指导

分步指导:计算变异的大小	计算	结果	单位
第一个 SD ² 的总和(表 7.8 的 SD)	$1.949^2 + 2.775^2 + 3.347^2$	22.702	
总和除以 2(3 位技术人员-1)	$22.702 / (3-1)$	11.351	
开方以获得均方根误差	$\sqrt{11.351}$	3.369	$\times 10^6/\text{mL}$
计算个人差异的标准误和均方根误差(3 个人、5 个样本)	$3.369 \times \sqrt{[(1-1/3)/5]}$	1.230	$\times 10^6/\text{mL}$
将 3 倍标准误与 C 的离均差绝对值进行比较	$3.8 > 3 \times 1.230$ $3.8 > 3.691$	Error!	

技术人员之间差异的正式统计学检验是基于 F - 检验。使用上述精子浓度数据的 ANOVA 结果见表 7.10。因为来源于不同的新鲜精液样本，质控品间的差异非常大 ($P < 0.001$)。技术人员之间差异的 F - 检验 ($F=4.81$, 自由度是 2 和 8, $P=0.042$) 在 0.05 水平差异显著, 提示这些差异大于单纯随机误差引起的变异。

表 7.10 技术人员和质控品双因素方差分析的 F - 检验

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
QC 样品	9 807.6	4	2 451.90	216.03	<0.001
技术人员	109.2	2	54.60	4.81	0.042
误差	90.8	8	11.35		
总计	10 007.6	14			

QC 主要程序汇总于表 7.11。

表 7.11 IQC 程序的主要特性

程序	检测的误差	QC 材料	技术人员数量
$\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	偏倚、总的变异、准确度	储存样品	一位, 多位
S 图	偏倚 / 精密度	储存 / 新鲜样品	多位
双因素方差分析	偏倚 / 精密度	储存 / 新鲜样品	多位
Bland-Altman 图	偏倚 / 精密度	储存 / 新鲜样品	两位
配对检验	偏倚 / 精密度	储存 / 新鲜样品	两位
Youden 图	偏倚 / 精密度	储存 / 新鲜样品	多位

7.7.2 月均值的监控

虽然主要的 IQC 程序是基于评价检测人员自身和之间差异, 但也可以通过监控精液分析结果的趋势获得额外信息。

可每隔一段时间(如 1 个月)将该时间段内所有被检患者每个变量的均值制作成 $\bar{X}_{\text{bar}}$ 图, 并分别以 2 个和 3 个标准误在均值上下两端设置警戒限和行动限。各时间段内原始观察值的标准差除以精液分析次数的平方根即为标准误, 或直接从均值分布估算标准误。控制限的设置应至少采用 6 个月的观察值, 并定期修改。每个均值应至少来自 20 个结果, 小型实验室可能要汇总 1 个多月的结果。方法的完善包括监控参数正常患者的月均值和使用累积和 (CUSUM) 图来快速检测任何与均值的系统性偏离^[42]。

偏离预期值可能源于患者的不同特性(被检男性的时间依赖性改变、对相同男性进行重复测量的次数改变、不同类型不育症男性转诊模式的改变)或技术因素(技术人员的改变、实验室用品的改变、季节温度的变化, 设备、操作人员间的差异等)。

7.8 外部质量控制和质量保证

外部质量控制 (EQC) 是监测分析结果的完整质控程序不可或缺的一部分, 而外部质

量保证(EQA)则监控与收集和报告数据有关的所有实验室程序,以确保实验室过程在控。EQC 允许实验室将其结果与其他实验室的相同检测进行比较,也能以一种在单个实验室无法实现的规模对不同方法进行评价和比较。

EQC 和 IQC 都很重要,它们是互补的过程,两者应该兼顾。如果质控样本未被充分掩盖或选择,EQC 可能会显示 IQC 中不明显的准确度问题。EQC 优点是一个实验室可以监测其所用方法准确度和稳定性^[422]。然而,EQC 样本明显来自外部或不同的基质,很容易以特殊的方式处理;应该避免这种情况,尽可能使其与常规样本用同样的方式处理。

EQC 包括同行比较和能力验证计划。在 EQC 程序中,将假定完全相同的标本分发给所有参与的实验室进行分析^[423]。实验室将他们的结果提交给某中心机构,在那里对数据的离群值进行检查并计算均值和标准差,以对参与实验室的运作情况作出评价。

7.8.1 EQC 结果的评估

EQC 计划可为实验室提供有关本实验室和其他参与实验室使用相同或不同方法检测指定分析物的结果信息。需要明确的是指定靶值的来源:来源于准确测量、用血细胞计数板多次进行精子浓度的计数、计算机辅助分析精子活力、来源于一组控制良好的参考实验室、还是所有参与中心的修正均值。EQC 结果常用图形表示,如直方图,可快速、直观地呈现结果。如果几次 EQC 使用的是同一质控样品,那么实验室对该样品检测结果的偏倚和变异也应报告。

当提供两份样品进行分析时,用两份样品的检测结果分别作为 x 轴和 y 轴绘制成 Youden 图(见图 7.4)。通过各个标记值的散点分布,可以清楚地看出各中心的评估差异程度。其他资料也可以在图中直观显示,例如用不同颜色或符号表示不同方法(计数板、染色或评估标准)或不同中心。

在发出两个以上样本时,可以得到各方面的偏倚(与指定值的差值),包括:

- 偏倚指数评分(BIS):偏倚除以选定的变异系数 $\times 100$,该值可正可负;
- 变异指数评分(VIS):与偏倚指数评分(BIS)相似,但该值永远是正值;
- 平均运行 BIS 或平均连续 VIS 得分(MRBIS,MRVIS):这有助于确定趋势。

MRBIS 和 MRVIS 均低,表明结果接近指定值;MRBIS 低但 MRVIS 高,可能提示存在随机误差;MRBIS 和 MRVIS 均高,提示存在系统误差。以成功/失败或分等级的形式报告结果,对实验室检查和认证是有用的。

监控性能的简单方法是将实验室每个参数的结果(y 轴上)对相应的靶值(x 轴上)作图。如此可清晰地显示实验室检测值与同一线的接近程度。另外也可以用 Bland-Altman 图(见图 7.3)来显示检测值与靶值的偏离程度。

7.8.2 对失控结果的反应

从 EQC 计划得到的基本信息涉及实验室及实验室方法的偏移或准确度。实验室期望 EQC 计划的结局是保持或改善所用方法的准确度^[422]。EQC 方案中,结果持续高于或低于指定值或均值的实验室必须重新评估其方法。EQC 结果变异大,通常与 IQC 结果变异大有关,且提示从一个样本到另一个样本的评估程序存在不一致性。需要仔细重新评估技术步骤,以确保其与手册推荐相一致。

恰当的措施包括已讨论的 IQC 程序(7.6.3 节),例如:对技术人员的培训、重新检测样本

等。表 7.14 至表 7.17 也指出了精液分析中变异的可能来源。实验室之间的研究人员交流通常是有帮助的,技术人员去 EQC 结果好的实验室接受培训会益处。从 EQC 结果好的实验室请来顾问,常能找出改进的方法以提高重复性。

7.9 QC 的频率和优先次序

QC 样本应该常规定期分析。分析的频率可依据国家或当地建议来确定,也可以遵照实验室许可规则或认证机构授权的规定,最低的 QC 频率由国家监管机构确定。QC 频率可能受实验室分析的标本数量影响。有些管理条例可能要求 QC 样本每天都要随患者精子浓度评估一起进行,否则,1%~5% 的样本需用于 IQC。

QC 样本应用于:

- 监控新老员工;
- 每当引入新的实验室设备、用品、程序以及新批次 IQC 样品时;
- 作为常规或定期维护计划的可能部分。

表 7.12 列出的是 QC 日程安排的一般性指南,在实际操作中,QC 日程要根据实验室的业务量来安排。表 7.13 给出的是不同 QC 方案的优先次序;对资金有限的实验室,有些程序会不可行。

表 7.12 QC 日程

总是	样本内部结果监测和相关性
每周 / 月	不同检测人员的重复测量值的分析
每月 / 季	分析均值
每季 / 6 个月	参加 EQC
6 个月 / 年	校准加样器、计数池和其他设备

表 7.13 QC 检验概要

参数	材料	靶值	准确度倚倚	精密度	优先排序
浓度	新鲜 IQC 样品	未知		S 图, 双因素方差分析	1
	储存 IQC 样品	已知	$\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	S 图	3
	EQC 样品	已知	$\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	S 图	2
形态	新鲜 IQC 样品	未知		S 图, 双因素方差分析	1
	储存 IQC 样品	已知	$\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	S 图	3
	EQC 样品	已知	$\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	S 图	2
活力	新鲜 IQC 样品	未知		S 图, 双因素方差分析	1
	储存 IQC 样品	已知	$\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	S 图	3
	EQC 样品	已知	$\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	S 图	2
存活率	新鲜 IQC 样品	未知		S 图, 双因素方差分析	1
	储存 IQC 样品	已知	$\bar{X}_{\text{bar}}$ 图	S 图	3
	EQC 样品	已知	X 图	S 图	2

7.10 培训

当培训技术人员、引入新方法或修改现有分析方法时,都可使用与 QC 相似的方法。技术人员培训应该包括了解下列方法。

7.10.1 评估精子浓度遇到问题时的实用建议

- 核查混匀和稀释过程、计数池网格的计数和计算过程。列出程序的步骤清单会有帮助。
- 计数池加样放置 10~15min 内分析样本,如果不使用湿盒,超过 10~15min 后,蒸发对计数池内精子的位置有显著影响。
- 两个技术人员应使用桥联显微镜或带有摄像头和显示器的显微镜一起进行检测,比较稀释、加样和计数过程。两人应计数同一个计数池,比较计数排或网格的结果,以发现差异的来源。
- 在计数和培训环节中使用桥联显微镜,或用有网格的目镜检查精子,以确定是否应将那些压线的精子计数在内。
- 参照表 7.14。

表 7.14 评估精子浓度的变异(误差)来源

程序	预防措施	控制
分析前(标本收集和处理时)		
稀释前没有充分混匀精液样本	培训,SOP	重复稀释
稀释误差(如,假设 1:20 稀释成 1+20,而事实上应该是 1+19)	培训,SOP	IQC
移液器未校准(如调到 100 μ L 但实际加了 95 μ L 或 110 μ L)	设备维护,SOP	重复稀释,IQC,EQC
使用不适当的移液器(如使用了空气置换型而非正向式置换型移液器)	培训,SOP	重复稀释,IQC,EQC
使用很少精液体积进行稀释,这带来了不具代表性的取样高风险	培训,SOP	重复稀释,IQC,EQC
将精液加到稀释液之前,没有擦净移液器吸头外面残留的精液	培训,SOP	IQC
分析(被检样本的测量结果)		
计数池没有擦净和干燥	培训,SOP	重复评价
不正确地组装或填充计数池(如计数池支架上有灰尘颗粒有可能改变计数池的高度)	培训,SOP	重复评价
精液混匀与取样稀释之间时间间隔过长(精液中的精子立即开始沉降)	培训,SOP	重复稀释和评价
涡旋混匀稀释样本与将样本加到计数池之间,时间间隔过长(稀释的精子立即开始沉降)	培训,SOP	重新稀释和评价
没有正确地清洁或校准显微镜;放大倍数不合适	培训,SOP,设备维护	IQC 和 EQC
加样后没有等待足够的时间就进行分析(沉降时间不足)	培训,SOP	重复评价,IQC,EQC

续表

程序	预防措施	控制
血细胞计数池在精子沉降过程中没有水平放置,或没有放置在湿润环境中	培训,SOP	重复评价,IQC,EQC
错误地识别精子(例如将碎片计为精子,或漏计难以识别的精子)	培训,SOP	IQC,EQC
计数了网格中太少排或太多排(即不正确计算);一排没有计数完就停止	培训,SOP	IQC,EQC
计数精子过少,导致了高抽样误差	培训,SOP	IQC,EQC
计数网格边线上精子的计数标准不一致(如果上下左右边线上的精子都计数,则会高估精子浓度)	培训,SOP	IQC,EQC
多键计数器故障	设备维护	IQC,EQC
计算或修正稀释度上的数学错误	培训,SOP	IQC,EQC
使用了毛细管充填式计数池(加样时精子分布不均匀)	培训,SOP	IQC,EQC

7.10.2 精子形态学分析遇到问题时的实用建议

- 遵循本手册中的指导原则:研究每个精子的显微图像和相应的评注。
- 使用结构化评估,强调每次都要检查每个精子的所有四个结构区的重要性(见图 2.10)。
- 特别注意临界形态的精子;它们应该归类为异常。
- 进行精子形态评定和培训时,使用桥联显微镜或带摄像头和显示器的显微镜。
- 参见表 7.15。

表 7.15 评估精子形态学的变异(误差)来源

程序	预防措施	控制
没有正确地清洁或校准显微镜;放大倍数不合适	培训,SOP,设备维护	IQC,EQC
分析操作前培训不充分	培训	IQC,EQC
无明确指导原则的主观操作	培训,SOP	IQC,EQC
同行对分类系统的微妙影响(分析过程中可能引起变化)	培训	IQC(质控图)
制备涂片时精液未充分混匀	培训,SOP	IQC
涂片质量差(过薄或过厚)	培训,SOP	IQC
染色技术差(过浅、过深或背景染色过重)	培训,SOP	IQC
评估玻片边缘的精子	培训,SOP	IQC
试图评估非扁平精子或重叠精子	培训,SOP	IQC
未评估视野内的全部精子,而是选择精子进行分析	培训,SOP	IQC
染色片因时间过久而褪色(如储存的 IQC 样本)	培训,SOP	IQC(质控图)
分析后(关联于检测结果的手工和电子报告)		
计算百分率错误,没有 $\times 100$	培训,SOP	IQC,EQC
多键计数器故障	设备维护	IQC,EQ

7.10.3 精子活力分析遇到问题时的实用建议

- 制备好玻片要立即分析。只有在任何漂移停止后才阅读,以减少总活力的偏倚。
- 随机选择视野,而不要刻意选择活动精子数高或低的视野。要做到这一点,在选定视野之前,避免通过目镜寻找视野。
- 不要等活动精子进入视野再开始计数。
- 快速分析;一次只计数网格的一小部分(取决于精子浓度)。
- 用较短时间计数网格的一个区域,避免将评估过程游进计数区域的精子计数在内。
- 分两个阶段计数前向、非前向和不活动的精子。如果技术上有问题,则颠倒计数顺序。
- 参见表 7.16。

表 7.16 评估精子活力的变异(误差)来源

程序	预防措施	控制
取样前精液样本混匀不恰当	培训,SOP	重复取样和评估,IQC
玻片制备好至分析等待时间过长(精子很快丧失活动力)	培训,SOP	重复取样和评估,IQC
热板温度不合适(如过高的温度会杀死精子)	培训,SOP,设备维护	IQC
没有正确地清洁或校准显微镜;放大倍数不合适	培训,SOP,设备维护	IQC,EQC
缺乏目镜网格作为指导	维护	IQC(质控图)
分析靠近盖玻片边缘的精子(盖玻片外缘 5mm 内的精子运动迟缓或死亡)	培训,SOP	重复评估,IQC
评估速度过慢(评估过程中其他精子游入计数区域)	培训,SOP	IQC
多键计数器故障	设备维护	IQC,EQC
计算百分率错误,没有 $\times 100$	培训,SOP	IQC,EQC
主观偏倚(持续过高或过低的活动率)	培训,SOP	IQC,EQC
能降低活力的准备程序(如温度变化、过度混匀、毒素污染)	SOP	IQC
非随机选择分析的视野。分析延迟(如等待活动精子游进视野或网格内再计数)	培训,SOP	IQC,EQC

7.10.4 精子存活率分析遇到问题时的实用建议

- 尤其要注意区分红色和粉色(死亡)、白色(存活)的精子头(精子头淡粉红染色者应评估为存活)。如果染色仅限于颈部某个区域而头部其他区域未着色,可考虑为“颈部质膜出现裂隙”,并非精子死亡和质膜完全破裂的特征。
- 使用推荐伊红 - 苯胺黑染色方法(2.4.7 节)。
- 参见表 7.17。

表 7.17 评估精子存活率的变异(误差)来源

程序	预防措施	控制
没有正确地清洁或校准显微镜,放大倍数不合适	培训,SOP,设备维护	IQC,EQC
染色不当:有些配方造成低渗透压环境,可杀死精子	培训,SOP	与活力比较
放置过久才染色	培训,SOP	与活力比较
如果没有立即封片,涂片干燥后复水将使所有精子着色	培训,SOP	与活力比较
高估存活精子(如把头轻微粉染的精子认作存活精子)	培训,SOP	IQC,EQC
将仅限于颈部粉染的精子计数为死精子	培训,SOP	IQC,EQC



第 8 章 附录

8.1 精液检查结果的解释	167
8.2 设备与安全性	169
8.3 基本精液检查中显微镜的使用	174
8.4 储备液和培养液	178
8.5 精液分析记录表格模板	184
8.6 质控材料	186
8.7 精液分析的国家外部质量控制计划	194

8.1 精液检查结果的解释

本手册不作为男性不育症临床治疗方案决策的指南。尽管如此,每个实验室都有责任提供有助于解释结果的资料,其中最受重视的是区分出生育与不育的资料。本手册的前 4 版提供了传统的公议值界限。在第 5 版手册中,对 12 个月内使其配偶自然怀孕的男性精液检查结果的数值分布进行了统计,其中第 5 个百分位数值通常被解释为生育和不育男性之间的准确的参考值界限。因此,有必要拓宽对精液检查结果内涵的解释。

8.1.1 妊娠等待时间(TTP)为一年或不足一年的夫妇中男性精液检查结果分布

本手册对第 5 版手册^[424]的数据做了进一步评估,并补充了来自 12 个国家^[5]约 3 500 名男性的数据(表 8.1、表 8.2 和表 8.3)。从全世界不同地理区域收集数据是一项巨大的成就。同样值得注意的是,本手册中的数据分布与 2010 年手册的没有差异。本手册对新数据合并更为严格,力图只采纳最可靠的数据。因此,表 8.2 中的数据提供了关于自然怀孕时间在一年内($TTP \leq 12$ 个月)的夫妇中男性精液检查结果分布的信息。低于第 5 个百分位数代表了参考人群中只有 5% 的男性精液检查结果在该水平之下。这可有助于解释不同个体患者的检查结果。

需要谨慎解释精液检查结果,避免过度解读。参考人群的定义允许存在一定程度的不一致。夫妇无保护性生活 12 个月内未自然妊娠($TTP > 12$ 个月)的男性定义为不育。这意味着参考人群中不包括那些夫妇 TTP 超过 12 个月的男性。然而,尽管精液有些问题,一些幸运的夫妻还是在一年内自然怀孕了。此外,还有一些精液检查结果完全正常的男性,因为女性因素而被归于不育人群。上述情况表明了将连续变量的生育力采用二分法归类的不足^[425],也已认识到有生育力男性与不育男性的精液检查结果之间有很大的重叠^[6,8,426,427]。

Campbell 等使用的数据^[5]可免费获取,可以由调查人员进行审查,并在适当时进行添加和重新分析。

表 8.1 Cambell 等发表文献^[5]中所纳入的参考人群定义^[5]

纳入标准	排除标准
● 配偶自然受孕,经确认 TTP≤12 个月 ● 禁欲时间 2~7d ● 实验室技术标准: ● 符合 WHO 2010 手册标准并依照 Björndahl、Barratt、Mortimer 和 Jouannet 文献^[428]所述操作 ● 具有内部质控 ● 具有外部质控	● 正在不育症门诊就诊或在接受生育力评估的男性

表 8.2 结果分布的数据来源^[5]

研究来源		
国家	洲	受试者数量
WHO 2010 手册包含数据		
澳大利亚	大洋洲	206
挪威	欧洲	82
美国	美洲	487
丹麦,芬兰,法国,英国	欧洲	826
丹麦	欧洲	199
WHO 2010 手册后新增数据		
中国	亚洲	1 200
埃及	非洲	240
希腊	欧洲	76
伊朗	亚洲	168
意大利	欧洲	105

表 8.2 显示了每项研究中的受试者总数,符合数据汇总的纳入和排除标准。

表 8.3 源自夫妇无保护性生活 12 个月内自然妊娠时的男性精液参数分布。
摘自 Campell 等的研究^[5];第 5 个百分位数给出了变异性(95% 置信区间)

	N	百分位数									
		2.5	5	95% 置信区间	10	25	50	75	90	95	97.5
精液体积 /mL	3 586	1.0	1.4	(1.3~1.5)	1.8	2.3	3.0	4.2	5.5	6.2	6.9
精子浓度 (10 ⁶ /mL)	3 587	11	16	(15~18)	22	36	66	110	166	208	254
精子总数 (10 ⁶ /一次射精)	3 584	29	39	(35~40)	58	108	210	363	561	701	865
总活力 (PR+NP,%)	3 488	35	42	(40~43)	47	55	64	73	83	90	92
前向运动精子百分率(PR,%)	3 389	24	30	(29~31)	36	45	55	63	71	77	81
非前向运动精子百分率 (NP,%)	3 387	1	1	(1~1)	2	4	8	15	26	32	38
不活动精子百分率 (IM,%)	2 800	15	20	(19~20)	23	30	37	45	53	58	65
存活率 /%	1 337	45	54	(50~56)	60	69	78	88	95	97	98
正常形态率 /%	3 335	3	4	(3.9~4.0)	5	8	14	23	32	39	45

8.1.2 评价精液检查结果的其他方法

8.1.2.1 多参数综合解释

为了对体内和体外受精的活产率作一般性预测,建议对精液检查结果进行多参数综合性解释^[7-9,427]。但用于多参数综合解释的组合参考值范围尚未确定。

8.1.2.2 决定限

男性不育症是由很多已知和未知原因造成的,这意味着需要对不育夫妇中的男性进行更好的诊断评估。精液检查可用于诸如如下疾病的诊断和治疗,如用于内分泌检查和内分泌治疗的随访、进行如 Klinefelter 综合征、Y 染色体微缺失、染色体易位与倒位、囊性纤维化突变和纤毛运动障碍等基因筛查的患者选择。需要为此类检验制定临床应用的决定限。

决定限基于临床和统计学两方面的考虑,这些考虑是某种诊断或治疗干预的需要^[429,430]。

8.1.3 基于精液检查结果的男性生育力研究的注意事项

来源于参考人群中男性较低的第5个百分位数(表8.3)数据,并不能用于界定男性有无生育力。

8.2 设备与安全性

8.2.1 男科学实验室所需的基本配置

以下所列是男科学实验室开展本手册中介绍的基本试验所需要的用品和设备。

如果需要寻求下列用品和设备来源方面的协助,可以查阅本手册引用的或者别处查阅到的已发表科研文献。

8.2.1.1 通用设备和用品

- 托盘天平(用于称量精液收集容器)
- 表面不渗透的试验台
- 容器:
 - 用于丢弃尖锐锋利物品
 - 用于装有害废弃物
- 《实验室生物安全手册》^[48]
- 低温冰箱(-20℃)
- 消毒剂或次氯酸钠,用纯净水稀释成 0.1%(v/v)和 1%(v/v)
- 消毒皂或抗菌皮肤清洁剂
- 一次性手套
- 眼部清洗液
- 急救箱

世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册, 第 6 版

- 通风橱,用于存放和操作有毒试剂、化学品或染料
- 冰箱
- 淋浴器

8.2.1.2 用于精液基本检查的设备和用品

- 离心机:
 - 台式离心机,能达到 300~500g(用于常规处理精液和尿液),1 000g(用于测定精液标记物)和 2 000g(用于处理黏稠精液样本)。离心桶应可密封,以尽量降低气溶胶传播风险。
 - 高速离心机,能达到 3 000g(用于处理疑似无精子样本)或 16 000g(用于得到无精子的精浆)。离心桶应可密封,以尽量降低气溶胶传播风险。
- 稀释用的小瓶
- 滤纸,90g/m²(用于过滤染液)
- 血细胞计数板:改良 Neubauer 计数板或替代品,池深 100μm,厚盖玻片(厚度 4 号,为 0.44mm)
- 培养箱(37℃)
- 实验用薄膜:自封式可塑型
- 实验室多键计数器(6 键或 9 键的)
- 显微镜载玻片:
 - 带磨砂面或粗糙书写面和盖玻片(厚度 1.5 号,为 0.16~0.19mm)
 - 普通载玻片,用于在另一块载玻片上把一滴精液推展做成涂片
- 笔/铅笔:
 - 在载玻片磨砂处写字用;HB 型软性铅笔(美国等级为 2)适用
 - 永久性记号笔
- pH 试纸(范围:6~10)
- 相差显微镜(用于估算精子浓度、活力、形态学)和以下附件(附录 8.3 节):
 - 10×、20×(或 25×)、40×(或 63×)正相差物镜,100×油镜
 - 10×(或 12.5×)宽视野目镜
 - 目镜刻度尺(用于精子活力浏览视野区域的判定)
 - 镜台测微尺(用于精子形态学测量)
 - 保温载物台(可选,但强烈推荐;用于测量精子运动速度)
- 移液器和吸头:
 - 带乳胶头的巴斯德滴管或一次性塑料移液管或自动移液器,用于混匀精液
 - 空气置换式移液器
 - 量程为 10~100μL 的正向置换式移液器
- 精液分析结果登记表(附录 8.5 节)
- 样本混匀器:
 - 用于混匀精液的水平振荡器或旋转轮(可选)
 - 用于稀释精液的涡旋混匀器

- 精液采集容器：
 - 有盖的一次性广口容器
 - 瓷片或硼硅胶玻璃材料的滴试板(用于伊红 - 苯胺黑试验)
- 不掉屑的纸巾

8.2.1.3 可选设备

- 用于称量化学品的分析天平
- 冷冻保存设备(可选)
- 避孕套,不含杀精剂,无毒性(可选)
- 荧光显微镜和物镜(可选;用于高灵敏度精子浓度测量、检测精子顶体反应试验)
- 培养箱(37℃),可控制 CO₂% (v/v) (可选)
- 光度计[可选;用于检测活性氧(ROS)]
- 含蜡 / 油性钢笔 / 铅笔(定界笔), (可选;用于在载玻片上圈定抗体溶液的区域)
- pH (ISFET) 电极(可选;用于黏稠精液样本)
- 显微镜设备
- 40× 负相差物镜(可选;用于伊红存活率试验)
- 显微检测对位片 (England Finder) (带网格的载玻片;可选;用于 QC 评定)
- 96 孔板封口胶带(可选;用于果糖测定)
- 玻片盒,一次性使用(可选;用于 QC 样品制备);
- 分光光度计(可选;用于精液生化分析)
- 镜台测微尺(用于测量精子形态学)
- 定时器(可选;用于 QC 样本制备)
- 台式保温板(可选;用于分析精子活力时预热载玻片)
- CASA 仪(可选)

8.2.1.4 所需化学试剂

- 巴氏染色剂(推荐)
- 抗体(可选,用于检测白细胞 CD45)
- 防泡沫剂(可选;用于 QC 样本制备)
- 细胞过氧化物酶检测试剂盒(可选)
- 冷冻保护剂(可选)
- 密度梯度液(可选,用于制备精子)
- 果糖分析试剂盒(可选)
- 中性 α - 葡萄糖苷酶检测试剂盒(可选)
- 矿物油(可选)
- 快速染色试剂盒(可选;用于分析精子形态学)
- 蜡(熔点为 48~66℃) (可选)
- 锌检测试剂盒(可选)

8.2.2 离心力的计算

离心过程中作用于精子的力(相对离心力,RCF)取决于旋转速度(N , 每分钟的转数, r/min)和从转子中心到测力点(通常是离心管底部)之间的距离(半径, R , cm)。根据以下公式计算 RCF: $1.118 \times 10^{-5} \times R \times N^2$ 。例如,转子半径为 $8.6cm$,离心速率为 $5\,000r/min$,将产生 $2\,404g$ 的力;转子半径为 $13.5cm$,离心速率为 $3\,900r/min$,将产生 $2\,296g$ 的力。图 8.1 是根据转子半径和旋转速度计算 RCF 的列线图。

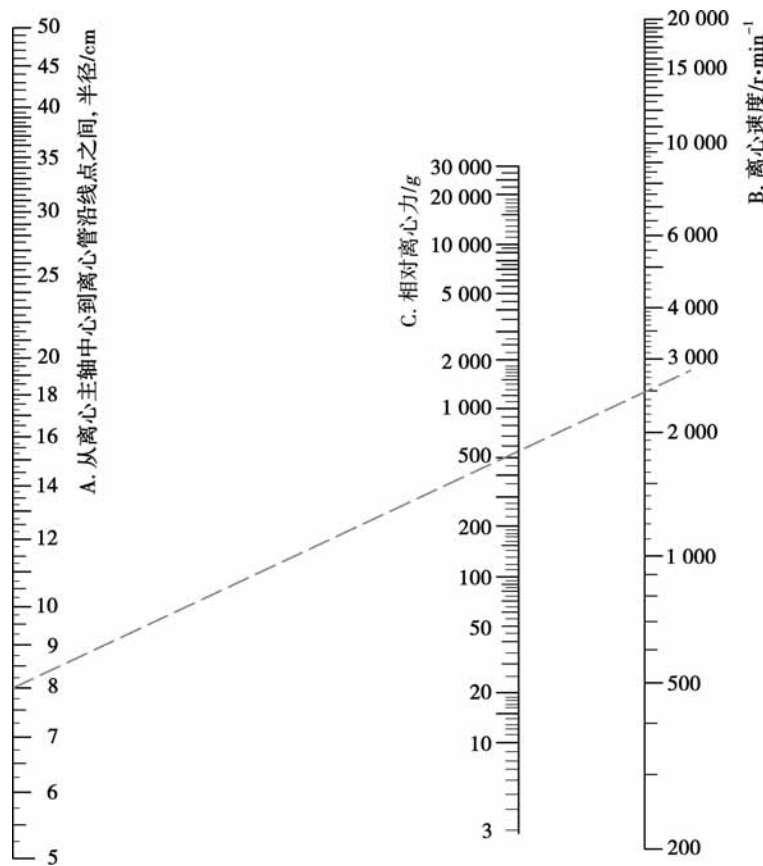


图 8.1 根据转子半径和旋转速度计算 RCF 的列线图

用一条直线连接转子半径(cm ,左轴)和旋转速度(r/min ,右轴)贯穿 RCF 所在的中轴,交点为相应的 RCF。
如图例,半径 $8cm$,转速 $2\,500r/min$ 得到的 RCF 大约是 $550g$ (计算值是 $559g$)。

8.2.3 男科学实验室潜在的生物危害

人的体液(例如精液)是潜在的传染源,应该特别小心操作和丢弃。对于男科学实验室而言,最严重的感染性微生物是精液可能存在的 HIV、乙型肝炎和丙型肝炎病毒(HBV 和 HCV)。实验室人员应将所有生物样本都视为具有潜在传染性,在操作时采取恰当的防范措施。

8.2.4 实验室人员的安全操作规程

- 常规建议:凡接触人体样本的实验室人员都应接种乙型肝炎疫苗。

- 任何人不得在男科学实验室进食、吸烟、化妆或存放食物。
- 不允许用嘴吹吸移液管。应使用机械移液器进行液体的操作。
- 实验室所有人员在实验室内应穿着实验服(专用于实验室工作的外套、一次性工作服或其他着装),并在离开时脱下。实验室人员应佩戴一次性手套(橡胶、乳胶或乙烯树脂材质,有或无润滑粉),尤其是在操作新鲜或冷冻精液、精浆或其他生物样本,以及任何接触过这些样本的容器时。当工作人员离开实验室或使用电话、电脑时,必须摘下并丢弃手套。手套不能重复使用。
- 实验室人员应经常洗手,尤其是离开实验室之前、处理样本之后以及脱下实验服和手套之后。
- 实验室人员应采取预防措施,防止由那些可能被精液污染的尖锐器械造成的意外伤害,并且避免精液接触到裸露的皮肤、破口、擦伤或病变部位。
- 应采取防范措施,并在必要时清除精液、血液或尿液样品的溢漏。
- 所有使用过的尖锐物品(针头、刀片等)应放进一个有标记的容器内。该容器不等完全装满就应加以密封,并以处理实验室其他危险品同样的方式处置。
- 所有潜在的危险品(手套、精液容器)应收集到一起,以适当方式处置。
- 所有实验室人员在可能产生气溶胶或飞沫的操作时,应戴面罩或医用口罩,例如用敞口容器涡旋混匀或离心时,不要强行排出移液管内最后残留的精液样本,因为这样可能造成飞沫或气溶胶。
- 在必要时候,例如:在使用液氮时(8.2.6节),实验室成员应穿戴安全防护眼镜、隔温手套、冷冻防护服和高帮防护鞋。重要是需要提供实验人员尺码合适的防护用品。

8.2.5 实验室仪器的安全使用规程

已经接触过精液或其他生物样本的工作台和非一次性容器,应灭菌或消毒。必须实施以下操作。

8.2.5.1 完成分析后,每天日常工作

- 用消毒剂清洗工作台面,例如:0.1%(1g/L)次氯酸钠或类似的消毒剂,处理至少1h(或过夜),然后用清水冲洗。
- 把计数板和盖玻片浸泡在0.1%(1g/L)次氯酸钠或类似消毒剂中过夜处理。用清水冲洗掉消毒液即可。

8.2.5.2 样本溢洒后的处理

- 如果装样本容器的外面被污染了,要用消毒剂清洗,例如:用0.1%(1g/L)次氯酸钠或类似消毒剂,然后用清水冲洗。
- 溢洒发生后,立即用消毒剂清洗工作台,例如:用1.0%(10g/L)次氯酸钠或类似消毒剂,处理至少4h后,再用清水冲掉消毒剂。

8.2.5.3 热灭活精液收集管内的 HIV

必要时,可用以下方法对精液收集容器内的 HIV 进行热灭活:

- 在170℃ (340°F)干热消毒至少2h时。加热前用铝箔纸包裹容器,待冷却后再取出。

- 在 121℃ (250°F)、101kPa (15psi 或 1 个标准大气压) 以上, 蒸汽灭菌 (高压蒸汽灭菌至少 20min)。
- 持续沸腾 20~30min。

8.2.6 操作液氮时的安全措施

- 液氮是危险品, 操作时总要谨慎。只能用经认证的液氮罐装储液氮, 不要试图把罐口密封。使用持物钳夹取浸在液氮中的物品。
- 使用面罩或防护眼镜保护眼睛, 或隔温手套保护双手, 穿戴冷冻防护服保护身体, 穿收口鞋保护脚部。这些防护用品必须适合实验人员的尺码。
- 当液氮溢洒时会在表面完全铺开, 因此会冷却大片区域。通常在室温下柔软的物体遇液氮会变得又硬又脆。
- 极低的温度会造成严重损伤。液氮溅到皮肤上会造成灼伤样损伤。液氮蒸汽也极冷, 脆弱的组织 (例如眼组织) 即使短暂暴露于液氮蒸汽也会受到损伤, 但短暂暴露于液氮蒸汽可能不影响脸部或手部皮肤。
- 避开沸腾和飞溅的液氮和液氮蒸汽。往热的容器里加液氮或将物品置入液氮时, 总会发生沸腾和飞溅。因此这些操作要缓慢, 尽量减少沸腾和飞溅。
- 避免触摸未隔温防护的导管。身体任何未加保护的部位绝不能接触盛装液氮的导管或容器。极冷的金属会快速粘住皮肤, 若试图分开, 会撕裂皮肉。
- 在通风良好的区域工作。少量液氮就能产生大量的气体 (室温下, 气态液氮体积是液态的 700 倍)。如果在密闭房间内液氮气体蒸发, 会使空气中的氧气百分比含量减低, 有窒息的危险。存放液氮的房间应安装氧探测器, 当氧含量低于 17% (v/v) 时, 氧探测器会发出警报。
- 只能使用专门用于液氮冷冻的试管或麦管。操作时要时刻小心, 因为当它们复温时也可能发生爆炸。
- 所有参与涉及液氮的低温操作的工作人员都应接受相关培训。对于该区域的负责人, 也应该接受来自外部机构或液氮设备供应商的相关培训。

8.3 基本精液检查中显微镜的使用

8.3.1 背景

对于特殊的显微镜, 最好的资料来源是制造商提供的使用手册。手册应包括所有部件的图解。如果没有这样的手册, 可以从互联网上获得显微镜的安装和使用资料。

推荐使用相差显微镜进行本手册所描述的精液评估。显微镜最好是双筒 (有两个目镜), 带有相差聚光镜, 并应配置 10×、20× (或 25×) 和 40× (或 63×) 的相差物镜 (用于常规分析、评估精子活力、计数精子和非精子细胞), 以及 100× 的亮视野油镜 (用于评估精子形态和精子存活)。

- 不同物镜的质量和价格相差很大。价格越高的物镜所呈现的图像越清晰, 但质量稍差的物镜也可应用。应考虑到, 使用高质量目镜, 实验室观察工作对个人眼睛造成的疲劳少一些。
- 目镜刻度尺 (十字线、格子线、目镜测微尺) 是带有已知尺寸刻度, 通常是 5mm 或 10mm 或不同形式格子线的玻璃圆片。一些目镜上固定安装了刻度尺, 另一些目镜需要拆卸而插入活动的刻度尺。目镜刻度尺的直径规格各有不同, 应准确地与目镜的孔径匹配。

目镜刻度尺可以用载物台的测微尺校准,以测量精子大小,也可以在评估精子活力中用于限定视野区域。图 2.4 和图 8.4 显示的是 5mm × 5mm 的网格,这一尺寸适合于在 × 20 和 × 40 放大倍数下进行精子活力分析。有些技术人员更愿意用 10mm × 10mm 的网格来评估精子浓度或精子形态。

- 载物台测微尺是一种表面刻有刻度的改良显微镜载玻片,通常把 1mm 细分为 10μm 的等份。载物台测微尺可用于校准目镜测微尺或标线网格,也可用于测量距离,例如用于分析精子活力(见图 8.5)。

下面所描述的步骤,可以确保得到最好的显微镜图像。如果光路正确地对齐和调校,图像会清晰透亮,并且不会造成眼睛疲劳。当使用新显微镜或图像质量差时,需要按照以下步骤操作。

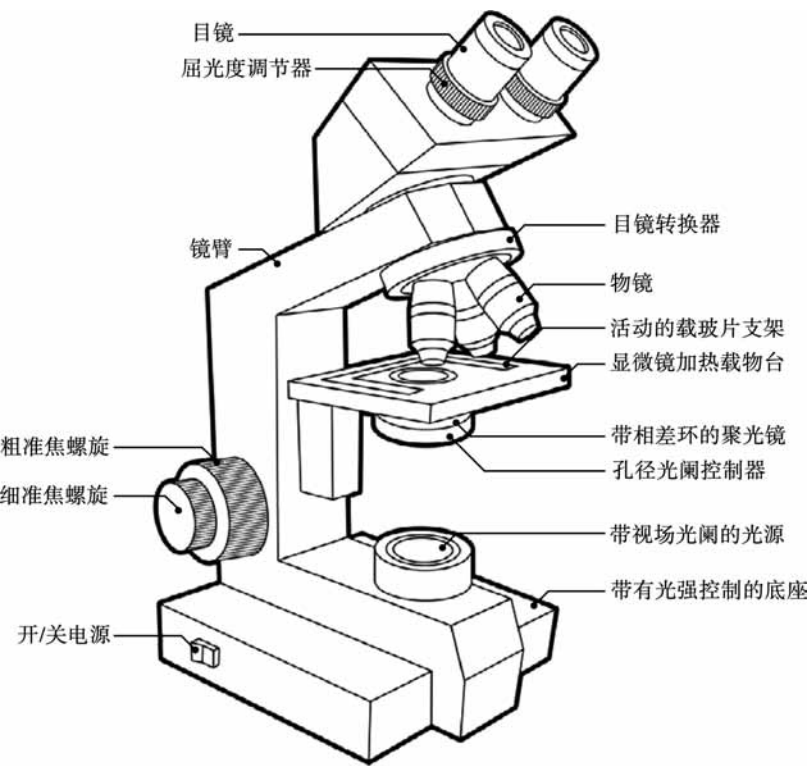


图 8.2 显微镜的部件

8.3.1.1 物镜

每个显微镜的镜头都有规格信息,例如:

UPlanFI	PlanApo	Plan Neofluor	Plan	S Fluor
20 × /0.80 imm corr	40 × /0.75 Ph2	100 × /1.35 oil iris	100 × /1.25 oil Ph3	20 × /0.75 ∞ /0.17
160/0.17	∞ /0.17	∞ /-	∞ /0.17 WD 1.0	

Plan:平面透镜,形成一个平面视野,所观察的物体都位于焦距上

Apo:复消色差透镜,高度纠正色(像)差

F、Fl、FL、Neofluor、Fluo、Fluotar、UV、S-Fluor:可透过紫外光并用于荧光显微镜的透镜

100×、63×、40×等:透镜的放大倍数

0.30、0.50、0.80、1.30、1.40等:透镜的数值孔径(NA),表示透镜对光的聚集能力。NA与光的波长共同决定分辨率(两个分开的目标之间的最小可辨距离)。选用最大的NA以获得最高分辨率。

Ph、Ph1、Ph2、Ph3、NP、N:提示带有相差环的透镜。Ph表示正相差环,NP或N表示负相差环。Ph1、Ph2和Ph3每种透镜所用聚光器上的相位孔不同。正相差光能够观察细胞内结构(用于制备湿片和评估精子活力),而负相差光在暗背景下产生白色图像(用于制备湿片评估精子存活或CASA)。

Imm, immersion, oil, W:提示透镜在使用时需要在物体和镜头之间有液体,通常是油、水(W)或甘油,可显示更清晰的图像(如果没有标注,透镜就是“干用”,使用时不应加液体)。

Iris:提示该透镜带有一个齿环控制的可变光圈。

Corr:提示透镜有带细齿的校正环,供使用不同折射率的浸入介质。

160, ∞:目镜与物镜之间的距离或管长,通常是160mm,但大多数现代的透镜可以是无穷大(∞)。

0.17, -:物镜要求的盖玻片厚度。大多数情况用1.5号(厚度0.16~0.19mm)盖玻片。血细胞计数板需要4号(厚度0.44mm)盖玻片。“-”表示盖玻片厚度不重要,或者浸液可以直接加到载玻片上。

WD:工作距离,即当样本清晰聚焦时,从物镜的前透镜到最近的盖玻片表面的距离。WD通常随着放大倍数和NA的增加而减小,透镜按工作距离分为标准(NWD,最长5mm)、长(LWD,5.25~9.75mm)、加长(ELWD,10~14mm)和超长(SLWD,15~30mm)。一些显微镜用改良Neubauer计数板时,可能需要LWD透镜。

折射率:当光通过一种介质时的相位阻滞程度。真空的折射率(RI, η)是1.0000,空气的折射率约为1.0(1.0008),水是1.33,甘油是1.47,大多数浸镜油是1.515。封片剂干燥后的折射率RI(1.488~1.55)接近于玻璃(1.50~1.58)。

8.3.2 显微镜的调节

8.3.2.1 样本的放置和载物台测微尺的正确聚焦

1. 将10 μ L精液置于显微镜的载玻片上,盖上22mm×22mm的盖玻片(厚度编号1.5, 0.17mm),置于载物台上。也可以用载物台测微尺代替精液涂片,来调节显微镜。

2. 打开光源,调节亮度到最大的对比度,使眼睛观察起来时舒适。



注解:如果显微镜是三目镜(即有第三个目镜可以连接相机进行照相或视频记录),会有一个光偏转旋钮,通常位于目镜的右侧。这个旋钮可能有三种设置:一种是让所有光线进入目镜;一种是让所有光线进入照相机;第三是将一半的光线偏转到目镜,另一半偏转到照相机。

3. 选择 $10\times$ 正相差物镜。旋转聚光器轮,对应到所选物镜的倍数。

8.3.2.2 调整目镜

通过推拉目镜调整两个目镜之间的距离,调整到适合自己眼睛的位置。

8.3.2.3 图像聚焦

1. 旋转粗准焦螺旋,使载物台尽可能靠近 $20\times$ 或 $40\times$ 物镜。为避免压碎物镜和载玻片,调节时从前面或侧面观察物镜和载物台,而不是通过目镜观察。使用粗准焦螺旋调节载物台的高度,直至载玻片几乎与物镜接触。需注意的是,必须以旋转粗准焦螺旋的方式来降低载物台远离物镜。

2. 两眼通过目镜边观察边缓慢旋转粗准焦螺旋,使载物台慢慢离开物镜,直到样本接近聚焦点。再用细准焦螺旋调整达到最清晰的图像。



■ **注解:** 如果焦距很难调节,尝试用载玻片磨砂端调焦,以接近正确的焦距面。

8.3.2.4 目镜聚焦

有些显微镜的两个目镜可以独立调焦。还有些显微镜的一个目镜是固定焦距,另一个可调焦。

1. 可调节的目镜通常会标有“+ / 0 / -”。在开始调节之前,先将目镜调到“0”。
2. 如果一个目镜是固定的,只从固定的目镜中观察(闭上或遮住另一只眼睛)。
3. 用细准焦螺旋对样本图像进行对焦。观察静止目标如死精子、灰尘颗粒或载物台的测微尺网格有助于对焦。
4. 用另一只眼睛通过可调节的目镜进行聚焦时,闭上或遮住固定目镜上的另一只眼睛。把目镜根基部带细齿的圈向“+”或“-”旋转直到焦距适合你的眼睛。

8.3.2.5 调光源聚光器的焦距

1. 关闭视野光圈(在显微镜基底部的光源上方)。
2. 使用聚光器左侧或右侧的小旋钮升高或降低聚光器,直到光圈的边界尽可能清晰,光形成的圆环小而清晰。当聚光器在最顶部位置时,一般能达到这一要求。随着聚光器的聚焦,光影像的边缘可能会从蓝变红(色差),聚光器的边缘将有轻微的模糊。光线可能在也可能不在中心位置。



■ **注解:** 如果视野光孔没有可调光圈,可把一个尖锐的东西(如铅笔尖)放在光源上进行调焦。

8.3.2.6 校正聚光器中心

1. 用聚光器的居中旋钮把视野光圈居中。通常在聚光器下方有两个旋钮(通常带细齿

边),斜对着正面或侧面。

2. 一旦光影居中,打开视野光圈,让光刚好充满视野。不要把视野光圈开到超过这个位点。

3. 关闭聚光器孔径,直至炫光消失。

8.3.2.7 相位环的调节

这个操作要用对中望远镜,可从显微镜制造厂得到。

1. 先看一下聚光器上相应物镜所需的相位环位置。

2. 取下一个目镜,换上对中望远镜。眼睛看着对中望远镜,同时一手握住其基底部不动,另一只手旋转其顶部,在镜下聚焦对中望远镜的环,直到两个环清晰对焦:一个是暗环(相位环),一个是亮环(光环)。

3. 旋转相差聚光器上的相位调节旋钮,使两个环同轴。相位调节旋钮通常位于聚光器的背面。

4. 用显微镜目镜替换下对中望远镜。

8.3.2.8 荧光显微镜

精子用 Hoechst 33342 染料染色后(3.1 节),要在荧光显微镜下进行精子核计数,顶体反应也要在荧光显微镜下检测 FITC 标记的植物凝集素(4.2.2 节)。Hoechst 33342 染料和 FITC 激发光谱的最大值分别为 346nm 和 494nm,相应的发射光谱最大值为 460nm 和 520nm。需要荧光透镜(8.3.1 节)。每款荧光显微镜可选购必要的分色镜和吸收滤色镜组件,用于特定标记染料的测定。

8.4 储备液和培养液

对于所有溶液,体外精子功能测试需要用纯净水(蒸馏水、双蒸水或去离子水)(对于用于辅助生殖技术的培养液,应使用培养级的水)。在本手册中,不推荐使用 Ham's F10 培养液,因为其对精子和精子功能有负效应,并可能与检测试剂发生反应^[431]。

处理精子时,培养液的 pH(通常为 7.4)和渗透压是重要的。

8.4.1 培养液 pH 的缓冲作用

可以通过使用缓冲物质,例如最常使用是 HEPES [4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸],或标准的 25mmol/L 碳酸氢盐缓冲系统,调节培养液的 pH。碳酸氢盐缓冲系统与活组织中的酸碱平衡机制相同:即二氧化碳(CO₂)与水(H₂O)反应形成碳酸(H₂CO₃),然后迅速解离形成碳酸氢根离子(HCO₃⁻)和一个氢离子(H⁺),平衡反应如下:



当用正确的 CO₂ 百分率平衡时,向培养液中添加 25mmol/L 碳酸氢盐可以固定和缓冲培养液的 pH。

应注意的是,获得 pH 7.4 的正确 CO₂ 百分率取决于 CO₂ 分压,因此,最显著的影响来自

海拔的变化,随海平面以上的距离不同而改变。经常使用的 5% CO_2 仅是海平面水平,应进行 CO_2 分压的局部调整(补偿)(通过调整 CO_2 百分率)以达到正确的 pH ^[432]。

8.4.2 培养液的制备与渗透压

培养液的容量渗透浓度^①或重量渗透浓度^②对任何细胞行为都是重要的。因此,如果任何培养液都是实验室配制而不是商业采购,则渗透压是必须考虑的关键因素。对于购买的任何商售培养液,也应始终满足要求或特定的渗透压。

精子培养液(低渗膨胀测试溶液除外)的标准渗透压范围为 280~295mOsm(毫渗摩尔)。为了达到这一渗透压,缓慢加入过量的无水氯化钠,直至达到正确的渗透压,再定容到最终的体积。首选渗透压计测量渗透压。如果没有渗透压计,“最好定容到 1 000mL”,可以尽可能接近正确的渗透压。

然而,必须牢记的是,在样本容器中收集的精液待液化,渗透压会迅速增加直至液化。体外的精子可适应增加的渗透压,这意味着精子适应的接触渗透压为 280~290mOsm 的培养液后,会导致精子的低渗休克,从而降低精子活力和 DGC 的产量^[147]。

8.4.3 化学品 / 培养液组分的规格

下面指定了化学品及其购买时最常见的水合物的规格。例如 CaCl_2 , 有不同的水合物可使用(即无水氯化钙、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。如果使用不同的水合物,则必须相应地调整称量的重量,以达到正确的摩尔浓度。同样重要的是,这些化学品中很多都具有吸湿性,因此正确储存很重要,并且应留意保质期,否则会导致培养液浓度产生偏差。

预计用于这些测定的化学品,极少为细胞培养级。

列出的很多培养液需要添加血清。诊断用培养液,通常建议使用 BSA(组分 V),其通常为干粉状的,是一种更便宜、稳定且广泛使用的人血清替代品。对于一些测试,例如检测顶体反应,测试是评估精子功能效应时,使用的血清应不含脂肪酸或用木炭脱脂,以提高批内一致性,并且应避免激素等的污染。常规进行这些检测的实验室应进行批间测试。

如果精子被用于治疗时,则应始终使用供体内用的经过筛选的人血清(通常以液体形式提供)。必须遵守相关的储存和限制条件。

配方中含有酚红的培养液,这种添加剂作为简单有用的 pH 指示剂,有助于肉眼识别主要的 pH 变化。如果用于荧光检测,通常建议不用酚红,因为酚红会增加精子和培养液的背景荧光。

8.4.4 Biggers, Whitten 和 Whittingham (BWW)

8.4.4.1 BWW 储备液^[433]

1. 将 5.54g 氯化钠(NaCl), 0.356g 氯化钾(KCl), 0.294g 七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.250g 二水氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 和 0.162g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 加到 1 000mL 纯水中。

2. 用 1mol/L 氢氧化钠(NaOH)调节 pH 至 7.4。

① 注:每体积溶剂产生渗透效应的溶质粒子。

② 注:每质量溶剂产生渗透效应的溶质粒子。当溶剂是水时,容量渗透浓度和重量渗透浓度基本相同。

3. 每 1 000mL 加 1.0mL (0.04%, 0.4g/L) 酚红。

此溶液在 4℃ 下可储存数周。

8.4.4.2 BWW 工作液

使用当天配制:

1. 在 100mL 储备液中添加 210mg 碳酸氢钠(NaHCO_3), 100mg D-葡萄糖, 0.37mL 60%(v/v) 的乳酸钠液, 3mg 丙酮酸钠, 350mg 牛血清白蛋白(Fraction V), 1 000U 青霉素和 10mg 硫酸链霉素。
2. 使用前在含 5%(v/v) CO_2 、95%(v/v) 空气的环境中加热至 37℃。
3. 在空气中孵育时: 加入 20mmol/L 的 HEPES (钠盐: 5.21g/L), 并把 NaHCO_3 降至 10mmol/L^[28]。

8.4.5 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (DPBS)

1. Dulbecco's 葡萄糖-PBS: 将 0.2g 氯化钾 (KCl), 0.2g 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4), 0.1g 六水氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 8.0g 氯化钠 (NaCl), 2.16g 七水磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 和 1.00g D-葡萄糖加到 750mL 纯水中。
 2. 将 0.132g 二水氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶于 10mL 纯水中, 边搅拌边缓慢加入上述溶液中。
 3. 用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.4。
 4. 用纯水定容至 1 000mL。
- 如果需要, 使用前每 100mL 溶液中加入 0.3g 牛血清白蛋白 (Fraction V)。

8.4.6 Earle's 平衡盐溶液 (EBSS)

1. 将 6.8g 氯化钠 (NaCl), 2.2g 碳酸氢钠 (NaHCO_3), 0.14g 一水磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.4g 氯化钾 (KCl), 0.20g 七水硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 和 1.0g D-葡萄糖加到 750mL 纯水中。
2. 在上述溶液中溶解 0.23g 氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 边慢慢搅拌边加入。
3. 用 1mol/L 盐酸 (HCl) 或 1mol/L 氢氧化钠 (NaOH) 调节 pH 至 7.4。
4. 用纯水定容至 1 000mL。
5. 在空气中孵育时: 加入 20mmol/L HEPES (钠盐: 5.21g/L), 并把 NaHCO_3 降至 10mmol/L^[432]。

8.4.7 改良的 Earle's 平衡盐溶液 (sEBSS)

1. 将 6.8g 氯化钠 (NaCl), 2.2g 碳酸氢钠 (NaHCO_3), 0.14g 一水磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.4g 氯化钾 (KCl), 0.20g 七水硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 和 1.0g D-葡萄糖加到 750mL 纯水中。
2. 在上述溶液中溶解 0.23g 氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 边搅拌边加入。
3. 添加 3g 牛血清白蛋白 (Fraction V)。
4. 添加 0.30g 丙酮酸钠。
5. 添加乳酸钠 (通常为钠盐, D, L-乳酸糖浆) 至终浓度为 19mmol/L。
6. 用纯水定容至 1 000mL。

8.4.8 人类输卵管液 (HTF)

原始配方来自 Quinn 等^[434]:

1. 将 5.931g 氯化钠(NaCl), 0.35g 氯化钾(KCl), 0.05g 七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.05g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 2.1g 碳酸氢钠(NaHCO_3), 0.5g D-葡萄糖, 0.036g 丙酮酸钠, 0.3g 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和 4.0g DL-乳酸钠[60% (v/v) 糖浆]^① 加到 750mL 纯水中。
2. 在 1mL 上述培养液中加入 10 μg 酚红、100U 青霉素和 50 μg 硫酸链霉素。
3. 用 1mol/L 盐酸(HCl)调节 pH 至 7.4。
4. 用纯水定容至 1 000mL。
5. 在空气中孵育时: 加入 20mmol/L 的 HEPES (钠盐: 5.21g/L), 并把 NaHCO_3 降至 10mmol/L。

8.4.9 Tris 缓冲液 (TBS)

1. 将 6.055g Tris 碱和 8.52g 氯化钠(NaCl)加到 750mL 纯水中。
2. 用 1mol/L 盐酸(HCl)调节 pH 至 8.2。
3. 用纯水定容至 1 000mL。

8.4.10 Tyrode's 溶液

1. 将 0.2g 无水氯化钙(CaCl_2), 0.2g 氯化钾(KCl), 0.05g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4), 0.2g 六水氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 8.0g 氯化钠(NaCl), 1.0g 碳酸氢钠(NaHCO_3)和 1.0g D-葡萄糖加到 750mL 纯水中。
2. 用 1mol/L 盐酸(HCl)或 1mol/L 氢氧化钠(NaOH)调节 pH 至 7.4。
3. 用纯水定容至 1 000mL。
4. 如果需要, 使用前每 100mL 加入 0.3g BSA (Fraction V)。

8.4.11 巴氏染液

可从市场上买到满意的染色液, 也可实验室自制。



■ 注解: 在配制不同浓度的乙醇之前, 要检查纯水的酸度。pH 应为 7.0。

8.4.11.1 EA-36 (与 EA-50 等效)

组成成分

- | | |
|---------------------------|-------|
| ● 伊红 Y (颜色指数 45380) | 10g |
| ● 苯胺棕 Y (颜色指数 21000) | 10g |
| ● 亮绿 SF, 浅黄色 (颜色指数 42095) | 10g |
| ● 纯水 | 300mL |

^① 一些出版物使用乳酸钙作为乳酸的来源^[29]。

- 95%(v/v)乙醇 2000 mL
- 磷钨酸 4g
- 水饱和碳酸锂(>1.3g/100mL) 0.5mL

储备溶液

按照下列方法分别配制每种染料的 10%(100g/L)溶液:

1. 100mL 纯水中溶解 10g 伊红 Y。
2. 100mL 纯水中溶解 10g 苯胺棕 Y。
3. 100mL 纯水中溶解 10g 亮绿 SF。

配制

1. 配制 2L 染色液,如下混合上述储备液:

- 50mL 伊红 Y
 - 10mL 苯胺棕 Y
 - 12.5mL 亮绿 SF
2. 用 95%(v/v)乙醇定容至 2 000mL。
 3. 加入 4g 磷钨酸。
 4. 加入 0.5mL 饱和碳酸锂溶液。
 5. 充分混匀,置于深棕色瓶中,拧紧瓶盖室温下保存。



|| 注解 1: 此溶液在 2~3 个月内稳定。



|| 注解 2: 使用前用 0.45μm 滤器过滤。

8.4.11.2 橙黄 G6

组成成分

- 橙黄 G 结晶(颜色指数 16230) 10g
- 纯水 100mL
- 95%(v/v)乙醇 1000 mL
- 磷钨酸 0.15g

储备液 1 号[橙黄 G6,10%(100g/L)溶液]

1. 100mL 纯水中溶解 10g 橙黄 G 结晶。
2. 充分摇匀。于深棕色或用铝箔纸包裹的带塞试剂瓶中室温保存。使用前 1 周配制。

储备液 2 号(橙黄 G6,0.5% 溶液)

1. 将 950mL 95%(v/v)的乙醇加入至 50mL 储备液 1 号。
2. 加 0.15g 磷钨酸。
3. 充分混匀。室温下储存于深棕色或铝箔纸包裹的带塞试剂瓶中。



■ 注解 1: 使用之前过滤。



■ 注解 2: 溶液在 2~3 个月内稳定。

8.4.11.3 无乙酸的 Harris's 苏木精

组成成分

- 苏木精(深色结晶;颜色指数 75290)
- 95%(v/v)乙醇
- 十二水硫酸铝铵[$\text{AlNH}_4(\text{S}_4\text{O}_2) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$]
- 氧化汞(HgO)

配制

1. 在 1 600mL 纯水中加入 160g 硫酸铝铵,加热溶解。
2. 在 80mL 95%(v/v)乙醇中溶解 8g 苏木精。
3. 把苏木精溶液加入硫酸铝铵溶液中。
4. 混合溶液加热至 95℃。
5. 从加热器上拿开后,边搅拌边缓慢加入 6g 氧化汞。



■ 注解: 溶液颜色应为深紫色。

6. 立即将容器插入冷的水浴中。
7. 溶液变冷后过滤。
8. 储存在深棕色或用铝箔纸包裹的试剂瓶中于室温保存。
9. 放置 48h 后再使用。
10. 使用前根据所需用量,用等量的纯水稀释。
11. 再次过滤。

8.4.11.4 Scott's 自来水替代液



■ 注解: 当用普通自来水对细胞核的返蓝不充分时,再用 Scott's 溶液;使用时应经常换液,如漂洗 20~25 张载玻片之后。

组成成分

- 3.5g 碳酸氢钠(NaHCO_3)
- 20.0g 七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 几粒麝香草酚结晶(作为防腐剂)
- 1 000mL 纯水

8.4.11.5 酸性乙醇溶液

组成成分

- 300mL 99.5%(v/v)的乙醇

- 2.0mL 浓盐酸 (HCl)
- 100mL 纯水

8.5 精液分析记录表格模板(表 8.4)

以下所提供的样本记录表格作为一个模板,可用于记录按本手册阐述方法进行精液分析的观察结果。可以对表格加以改编,以包括更多的衍生变量,成为原始资料的结果大集合。为便于追溯,应记录哪个工作人员执行了从接待患者到检查,再到检查后计算和报告结果的整个程序的哪一部分。

样本记录表格有多列栏目,用于记录不同时间进行精液分析的结果,方便显示系列精液样本分析的结果。表格内的某些部分可以增加额外的空白,以便记录不能被编码的评论和观察结果。在可用和适用的情况下,在方括号中给出了决定限。

表 8.4 精液分析报告格式模板

患者姓名	日期	
出生日期,其他的 ID	样本 ID	
转诊诊所 / 临床医生 / 转诊日期		
患者信息	禁欲天数	
收集	是否在实验室? Y/N	
完整收集?	Y/N; 如果否, 丢失了哪一部分?	
收集时间	小时 : 分钟	
如果未在实验室收集, 样本运送时间?	小时 : 分钟	
过去6个月内是否有严重感染 / 炎症性疾病?		
是否有严重或慢性疾病的药物治疗?		
精液体积 /mL	净重	
开始分析时间	小时 : 分钟	
分析结束时间	小时 : 分钟	
精液—肉眼检查		
外观(1. 正常;2. 异常)		
黏稠度(1. 正常;2. 异常)		
液化[1. 正常;2. 异常(min)]		
处理(例如,促进液化)		
精液—显微镜检查		
聚集(0. 无;1. 一些;2. 大量)		
凝集		
pH		

续表

精子数目		
总数 (10^6 /一次射精)		
浓度 (10^6 /mL)		
计数小于 400 个精子的误差 (%)		
活力		
快速前向运动 (a) (%)		
慢速前向运动 (b) (%)		
非前向运动 (c) (%)		
不活动 (d) (%)		
总活力 (a+b+c) (%)		
总前向活力 (a+b)		
存活率		
存活率 (当活动精子 < 40%) (% , 存活精子)		
形态		
正常形态 (%) (典型的或理想的精子)		
头部异常 (%)		
中段异常 (%)		
尾部异常 (%)		
过量残留胞质 (%)		
畸形精子指数 (TZI)		
非精子细胞		
过氧化物酶阳性细胞, 浓度 (10^6 /mL)		
附性腺功能		
锌 (μmol / 每次射精) (≥ 2.4)		
果糖 (μmol / 每次射精) (≥ 13)		
α -葡萄糖苷酶 (中性) (mU/ 一次射精) (≥ 20)		
任何其他评注		
检查结果审核者		

8.6 质控材料

8.6.1 用于质量控制的精液样本制备

理想的质量控制样本,应该是实验室检测的所有精液样本的典型代表。如果仅分析少数几个质量控制样本,这些样本应该与实验室的主要检测活动最具相关性。例如,在不育症服务机构的实验室,应该选择那些有临床意义的质量控制样本的范围(精子浓度 $15 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6/\text{mL}$,前向运动精子百分率 30%~50%,正常形态精子百分率低于 5%)。

- 将合并的精液样本分装后可以冻存或加防腐剂,保存于 4℃,用于定期分析精子浓度(8.6.3 节)。
- 冷冻保存后的精子不能很好存活,因此不能用作分析精子活力和精子抗体试验的内部和外部质量控制样本。
- 与日常评估精子活力相同分辨率和放大率的视频剪辑,可以通过已有的媒体(如 DVD、CD、闪存)或通过从互联网上可用的资源流来发布。对于后者,重要的是带宽和允许连接足够的分辨率和放大率进行连续下载。
- 图像和视频剪辑可以用于评估精子形态学。
- 视频录像可特别用于评估精子活力和精子形态学的培训,但只是辅助而不能替代对精液样本的重复评估。
- 经过染色的精液涂片可用于精子形态学质量控制。固定过的涂片可贮存起来用于监测染色情况。经过染色的涂片可能会随时间而褪色,具体取决于固定和染色的质量。但是,按照本手册提供的方法进行巴氏染色并在室温避光贮存的涂片,其稳定性可长达数月,甚至数年。
- 抗精子抗体阳性的血清可以用于间接免疫珠试验的质量控制,但不推荐用于直接免疫珠试验。

8.6.2 制作视频录像用于分析精子活力的内部质量控制

本方案描述了如何制作视频录像,用于精子活力人工评估过程的质量控制。

- 记录至少 5 个视野,用以模拟精液分析过程中分析精子活力时的多视野评估,并且需要有至少 400 个精子可供评估。
- 视频录像应该包括来自几个不同精液样本的图像,涵盖常规精液分析中所见的各种活力类型。
- 录像带中可以仅包括来自少数几个精液标本的 5 个视野。在有些情况下则可能需要更复杂的记录,例如用于实验室间或多中心研究的标准化。在这种情况下,要使用更多的精液样本,并且在整个录像带中有些样本可能是随机反复使用的。反复使用的样本可评估不同检测人员之间的检测准确性。

8.6.2.1 其他设备

除了用于评估精子活力的常规设备外,用于质量控制的录像制作,还需要从高质量相差显微镜中能够观看到视频片段,并使用合适软件进行编辑,使得在使用或不使用校准分划板

的情况下,可以对记录的样本进行单独的视野采集和标记编号。

8.6.2.2 步骤

1. 如果可以同时得到多个精液样本,整个视频录像可一次制作完成;除此以外,可以在有合适精液样本时录制。

2. 如果评估精子活力是在 37℃ 进行的,录制也应该在同样的温度下进行。同理,如果评估精子活力是在室温下进行的,录制也应该在室温下进行。



注解: 如果录制是在 37℃ 进行的,应该打开载物台加热器,使之至少在使用前 10min 达到一个稳定的温度。

3. 制作录像时,要录制至少 10 个视野,以确保记录了 400 个来自 5 份不同精液样本的精子。

4. 对于精子浓度低的样本,可能有必要记录 10 个以上视野,才能有足够数量的精子用于评估。视频录制 10 个视野将会耗费数分钟。

5. 无论是用有盖玻片的载玻片,还是用固定深度为 20μm 的计数池进行分析,均可制作视频录像。



注解 1: 与带有盖玻片的载玻片相比,使用一次性计数池的玻璃片能使精子活力稳定更长时间。这样可允许记录同一制片的 10 个(或更多)视野。



注解 2: 当使用带有盖玻片的载玻片时,在视频录制过程中可能有必要用到多张玻片,以避免精子活力随时间延长而显著下降。

6. 确定几份具有不同精子活力值的精液样本。

7. 在视频录像中每个样本都应该有自己特有的编码。编码可以是简单地标记每个样本,也可以标记每个样本的每个视野。例如,第 1 个样本标记可以在第 1 个视野开始时进行,在第 2 个样本出现之前不需要进行其他标记。也可以标记每个独立视野,例如将第 1 个样本的第 1 个视野标记为 01-01,第 1 个样本的第 2 个视野标记为 01-02 等等。这种更为细致的标记体系有助于检测人员在分析时进行追踪定位。



注解 1: 对不同的视野或不同的样本进行视频记录时,期间留有短空白片段非常有用。有助于检测人员辨认新片段的开始。



注解 2: 在记录当中获得空白片段最便捷的方法是遮蔽光源。



注解 3: 留置空白片段也可以在暂停视频录像机前进行,应当使用的是“暂停”键,而不是“停止”键,因为“停止”键可能使录像带产生噪声干扰。

8. 在可用于录制样本的放大倍数下,录制 10s 载物台测微尺的影像。该放大倍数下,在监视器上显示的图像应该与在光学显微镜下分析时所见的相似。载物台测微尺的图像是对该放大倍数的永久记录,这样在录像带分析或 CASA 设备校准时,就可以对覆盖在屏幕上的醋酸膜栅格进行校准。

9. 对第 1 个样本的编码图像录制 5~7s。录制即将结束时遮蔽光源 3s,留下空白片段作为标记;然后暂停录制。

10. 确定用于录制的第 1 个精液样本。将 10 μ L 充分均匀的精液置于一个载玻片上,覆盖 22mm $\times$ 22mm 的盖玻片,或将 7 μ L 充分均匀的精液加入一个计数池。静置样本几秒(如果需要,在 37 $^{\circ}$ C 条件下进行操作),直至液体停止流动。按照图 8.3 所示的模式记录 10 个(或更多)视野。当用于 CASA 的质量控制时,精子浓度不应超过 50 $\times$ 10⁶/mL;必须使用同一份样本的精浆对精子浓度高的样本进行稀释。

11. 选择靠近盖玻片或计数池左上角的区域为第一个视野,边距至少 5mm。对该视野录制 15s,尽量保持显微镜和载物台稳定。15s 后录制一个时长为 3s 的空白片段,然后暂停录制。如果要对单个视野进行编码,则改变编号并录制仅含有该编码数字的图像 5~7s。

12. 按照图 8.3 所示的模式,在玻片上或计数池中定位第 2 个活动视野,并录制该视野 15s。同样,15s 后录制一个时长为 3s 的空白片段,暂停录制。若需要,改变编号来标识第 3 个视野。以这样的方式继续录制,直至采集到总共至少 400 个精子(10 个或更多视野,取决于精子浓度)。最后一个视野和一个时长为 3s 的空白片段录制完毕后,停止录制。

13. 制备第 2 个样本。录制样本 2 的编码图像 5~7s,然后录制一个时长为 3s 的空白片段。

14. 根据上述步骤录制第 2 个样本,记录 10 个或更多的视野,每次 15s,每个视野录制完毕后录制一个空白片段,最后一个视野录制结束后也要录制一段空白片段。

15. 重复这一步骤进行视频录像,直至达到所希望的样本数目。

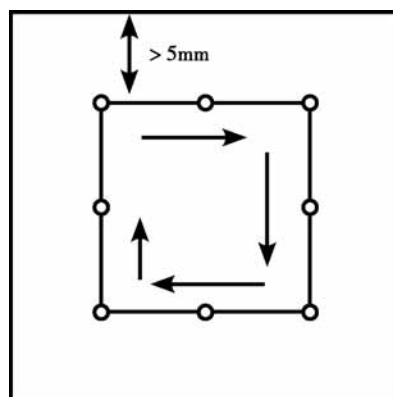


图 8.3 辅助评估精子活力

按顺序扫描视野,视频记录精子活力,扫描视野距离盖玻片边缘至少 5mm。



注解 1: 如果想要制作包括随机反复使用样本的较复杂 IQC 精子活力视频录像,则需要第 2 台摄像机或配备特殊视频编辑软件的计算机。



注解 2: 在后面这种情况下,每个样本都应当单独进行视频记录,并且只对视野进行标记,而不用记录样本号,因为在录制过程中样本号可能会因为样本被反复使用而改变。



注解 3: 如果有一台配备视频编辑软件的计算机,可以对每个样本的图像进行数字化及随意组合。

8.6.2.3 视频录像的分析

1. 在分析视频录像时,将一个醋酯膜栅格覆盖在视频监视器上,如下所示。这样可以模拟用显微镜分析时目镜中的栅格(图 8.4)。

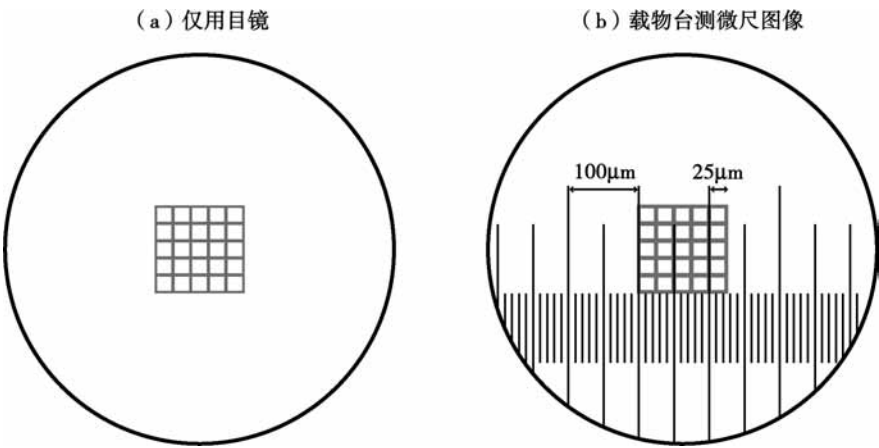


图 8.4 通过带有网线(栅格)的目镜观察

2. 将载物台测微尺安置在显微镜载物台上,使用分析精子活力用的放大倍数。通过带有网线的目镜观察(图 8.4),用载物台测微尺测量栅格部分的尺寸。在这个例子中,栅格为 $125\mu\text{m} \times 125\mu\text{m}$,每个正方形为 $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ 。记录这些测量结果。

3. 通过视频监视器放映录像,在出现测微尺图像时暂停(图 8.5a)。

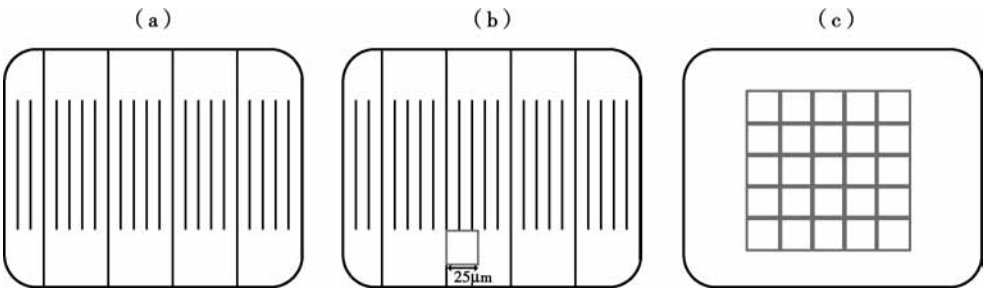


图 8.5 监视器上显示的载物台测微尺录像和覆盖在监视器上的绘制栅格

4. 将一张醋酸薄膜覆盖在屏幕上并绘制一个正方形,大小如同上述目镜栅格中的一个正方形(图 8.5b)。

5. 完成整个目镜栅格图的绘制(25 个正方形)(图 8.5c)。

6. 为了分析视频录像,将醋酸栅格膜固定在视频监视器上。应该在栅格线覆盖的标准化区域(例如最上面两排或中间三排)进行分析。

7. 每个录制区段重复评估 200 个精子,对其进行评分。

8.6.3 制备稀释精液用于评估精子浓度的内部质量控制

8.6.3.1 总则

- 精子浓度测定程序中的一些步骤,可以用实验室制备的稀释过的贮存精液样本进行监测。
- IQC 样本应该代表实验室常规精液分析时所见到的各种精子浓度样本。
- 用防腐剂稀释精液,分装于贮存小瓶中冷藏,用于以后的精子计数。小瓶应进行气密性验证,并确认精子不会黏附在内壁上。
- 制备悬液时应注意彻底混匀样本,确保由同一样本制备的分装小瓶中精子浓度完全相同。这样在计数 IQC 样本时所出现的差异就可以归咎于计数过程的问题。
- 在使用血细胞计数板评估精子浓度前,需再次稀释冻存的 IQC 样本,采用实验室常规计数过程中的最终稀释倍数。这样可以确保背景中的杂质和其他非精子细胞的浓度与常规评估中所见类似。例如,如果最初用等体积的防腐剂稀释精液,要额外进行 1+9 (1:10) 的稀释,最终得到 1:20 的终浓度。
- 如果希望冻存低浓度的精子样本,首选低浓度精液样本,而不是用高浓度的精液样本进行大量稀释。这样可以确保本底与常规精液分析时所见相似。
- 上游精子制备物中不包含杂质、无尾精子头和细胞碎片等常规精液分析中所见的污染物,最好仅用于监测进行过类似筛选的精子悬液的计数。
- 用于 IQC 的精子悬液的一次制备量,取决于检测人员的人数和分析频度。
- 冷藏的稀释精液,其稳定性可保持至少 4 个月。

8.6.3.2 试剂

可使用以下两种防腐剂中的任何一种,如下所示。这类溶液可能会受到污染,应定期丢弃和更新。

- 甲醛溶液[(10%, v/v) 甲醛]:将 10mL 37% (v/v) 的甲醛加到 27mL 纯水中。
- 抗凝液 (APSiS)^[141]:向 100mL 纯水中加入 1.0g 牛血清白蛋白 (BSA), 2.0g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 0.90g 氯化钠 (NaCl), 0.1mL Triton X-100 和 0.004mL 有机硅消泡剂。充分混匀后,用孔径为 0.45 μ m 的滤器过滤消除杂质。贮存于 4℃。



|| 注解: 叠氮钠 (0.10g) 加至 APSiS 中可产生溶液毒性。出于安全考虑,不予推荐。

8.6.3.3 其他耗材

除了用于评估精子浓度的常规仪器以外,制备质量控制样本还需要:

- 冷冻管或其他利于贮存且管盖紧密的小管。
- 用于标记试管的永久性标记笔。

8.6.3.4 步骤

1. 确定一些浓度与期望值近似的精液样本。所需保存精液的体积取决于实验室的需求;可以冻存所得到的整份精液,也可以稀释成 4mL 不同浓度的精子悬液。
2. 采集精液后尽可能用防腐剂稀释。如果使用 APSIS 稀释和保存,稀释前放置时间越长,稀释后形成结晶的概率就越大。这些结晶可能干扰向计数池中加样和计数精子。
3. 将所需体积的精液移至 15mL 离心管中。每毫升精液加入 100 μ L 10%(v/v)的甲醛溶液、10 μ L 3mol/L 的叠氮化物或 1mL APSIS。
4. 在所有拟贮存样本的小瓶上标明明确的信息和制备日期。应该打开瓶盖或顶盖,并将小瓶置于试管架上,以便快速、便捷地分装。
5. 稀释保存的精液在整个分装过程中一定要充分混匀,以确保所有小瓶中含有同样浓度的精子。混匀后即使耽搁很短时间也可能使精子重新沉淀,从而改变分装样本中的精子浓度。确保持续混匀的一种方法是,将装有稀释精液的离心管置于试管架上,然后一手持塑料移液管不断混匀精液,用另一只手手持移液管吸出等份精液。
6. 每个小瓶的容积应该为 0.5~1.0mL,具体取决于实验室的需要。以 0.5mL 为单位贮存样本,每个小瓶中的贮存样本可以用于计数多次。
7. 将拟保存的精子悬液分装到所有小瓶后,即刻拧紧瓶盖。可用实验室自封膜封住瓶盖,这取决于所用小瓶的类型。如果使用的是冷冻管,就不必了。
8. 重复上述整个过程制备其余的精液样本。
9. 将小瓶贮存于 4℃。



注解: 应该在 IQC 溶液制备后测定其浓度,而不应当根据原始的精子浓度推测。保存的精子悬液制备完成后,在需要评估时取用 1 小瓶。可以按照 7.7 节描述的步骤将结果做成曲线图。所有计数均需使用该实验室常用的计数方法进行。以下部分介绍使用血细胞计数板进行计数的步骤。

8.6.3.5 使用贮存的 IQC 样本

- 在计数前,保存的溶液必须进一步稀释;稀释倍数取决于已用的保存液。
- 用甲醛溶液和叠氮化合物保存的精液,初始稀释倍数小,因此可以忽略不计。保存在 APSIS 中的精液初始稀释 2 倍[即 1+1(1:2)],这在计算终浓度时必须考虑进去。
- 用 APSIS 稀释的精子悬液,其原始精子浓度若超过 $25 \times 10^6/\text{mL}$,计数的时候最好进一步进行 1+9(1:10)的稀释。可以通过向 450 μ L 纯水中加入 50 μ L 保存的精子悬液来达到这一稀释度,这样可使得最终精液的稀释倍数为 1:20。不要用 APSIS 作为稀释液,因为那样会干扰精子在血细胞计数池的网格上沉降。
- 为了进行下面的步骤,所有的移液器都应该预设到所需加样体积,并装上一个洁净的吸头,以便于混匀后即刻快速吸取等份溶液。
- 应在一个稀释小瓶中加入适量水备用(如上所述,加 450 μ L 水进行 1:10 稀释)。应将精液贮存瓶置于涡旋振荡器上,以最大速度充分混匀瓶中的内容物大约 30s,然后吸出

50 μ L,加入装有纯水的稀释瓶中。然后将稀释瓶置于涡旋振荡器上,以最大速度混匀20s。向血细胞计数池中加入10 μ L悬液,按2.4.8节所描述的方法计数精子。

- 如果制备保存精液所使用的原始精液样本的精子浓度低,应该对稀释倍数进行相应调整。例如,如果原始精子浓度为 $4 \times 10^6 \sim 25 \times 10^6/\text{mL}$,要在实验室中达到最终1:5的稀释倍数,AP_{SIS}保存的精液进一步以2:5稀释[2+3,因为精液已经用AP_{SIS}1+1(1:2)稀释过了],这可以通过用75 μ L纯水稀释50 μ L冷藏精液来达到上述稀释倍数。
- 在冰箱中贮存的冷藏精子悬液可稳定至少4个月,届时应制备新的精子悬液。最好有一个重叠期,其间新旧制备物都可以使用,用于对过渡期进行监测。

8.6.4 精子形态学评估内部质量控制涂片的制备

8.6.4.1 总则

- 可以在实验室里制备涂片,用于形态学染色和分析时的内部质量控制。
- 可以用几个不同的精液样本,每个样本制备多张涂片,代表实验室常规形态学评估时所见的一系列精子形态。
- 涂片可以固定并贮存,以备监测染色和分析程序。
- 用于形态学分析程序的质量控制时,染色的涂片可单独使用或重复使用。
- 重复使用可确定检测人员自身操作的准确性。这些质量控制涂片也可用于实验室内部不同检测人员之间检测结果的比较,或不同实验室之间分析结果的比较。
- 经过巴氏染色并封片的涂片在室温条件下避光贮存,其稳定性可以保持数月,甚至数年。
- 在涂片制备的整个过程中必须充分混匀精液,以确保从一个特定精液样本制备所得的所有涂片是完全一致的。这样可以假设在分析过程中发现的任何较大变化都来自被监测的过程(即形态学分析过程),而不是由于在制片过程中没有充分混匀精液所致。

8.6.4.2 步骤

1. 将精液从样本容器移入一个容量为15mL离心管,以便在制片过程中可以更容易也更彻底地混匀精液。

2. 用不掉屑的纸巾用力擦拭带磨砂端的玻片,以清洁玻片的两面。

3. 用HB(2号)铅笔在磨砂面上标记识别信息(例如标识号和日期)。用铅笔所做的标记在整个涂片固定和巴氏染色过程中都会完好保留,而用钢笔和某些永久标记笔所做的墨水标记则会脱落。

4. 在移液器上安装一个洁净的吸头,并将移液器定容为10 μ L(或实验室用于制备形态学涂片时使用的常规容量)。

5. 在整个过程中必须充分混匀精液,以确保所有的涂片尽量一致。混匀后,即使移液前的短暂耽搁也会使精子重新沉降,而使加载在玻片上的精子数目发生改变。

6. 用大吸头(直径约1.5mm)反复吹打样本10次,使样本在离心管中充分混匀。吸头要预先平衡至样本温度。吹打要有力,足以混匀精液,但不要过于用力,以免产生气泡。

7. 混匀后立即将10 μ L精液加至一张已清洁玻片的光滑端,不要耽搁,避免精子沉降。重要的是立即涂片,不要让精液滴在玻片上停留超过数秒。

8. 采用拉片法(2.13.2 节)在玻片表面制成涂片。在此过程中,用另一张玻片的边缘沿着玻片表面拖拉精液滴。确保这张玻片将精液“拉”至整个玻片表面,不要用玻片从后面“推”精液。一定注意不要把涂片制得太厚,否则精子会重叠或成团及背景染色太深。在玻片上精子分散开取决于精液体积和精子浓度、拖动玻片的角度(角度越小,涂片越薄)^[435]和速度(动作越快,涂片越厚)^[436]。

9. 重复步骤 6~8 完成其他玻片的制备。每次混匀后仅制备一张玻片,确保在每次取样前精子不会沉降。如果混匀后停留超过数秒,须再次混匀后取样。

10. 技术熟练后,可以在每次混匀后制备 2 张或 3 张涂片。应当在混匀后立刻完成所有取样,尽快在几秒内完成 2 张或 3 张涂片。

8.6.5 设备校准

- 移液器、计数板和其他仪器应当每隔 6 个月或每年校准一次。

8.6.5.1 天平

- 应该定期使用内部校准器校正天平,以及在实验室定期维护时进行外部校准。
- 通过称量外部标准砝码来校准天平(例如,1、2、5 和 10g 砝码,其范围涵盖一系列精液重量)。
- 重复测量 10 次,并计算均值、SD 和变异系数(CV)($=100 \times \text{SD} / \text{均值}$)。检查准确度。标称重量是否处于测定所得均值的 2SD 之内?

8.6.5.2 移液器

- 通过吸取纯水至刻度线,并将其置于扣除皮重的称量盘来校准。
- 假设水的密度为 1g/mL,根据吸取水的重量计算预期体积。



注解: 水的密度会随着温度升高而下降^[437]。20℃时为 0.998 2g/mL,30℃时为 0.995 6g/mL,40℃时为 0.992 2g/mL。但用于校准时,假设为 1.0g/mL 是可以的。

- 重复测量 10 次,并计算均值、SD 和 CV($=100 \times \text{SD} / \text{均值}$)。
- 检查准确度。标称体积是否处于测定所得均值的 2SD 之内?

8.6.5.3 计数池的深度

- 使用显微镜细焦点游标尺(Vernier scale)测量计数池的深度。首先聚焦于计数池的网格,然后聚焦到盖玻片底面的墨水印上。计数两点之间刻度数。
- 重复计数 10 次,并计算均值、SD 和 CV($=100 \times \text{SD} / \text{均值}$)。
- 检查准确度。标称深度是否处于测定所得均值的 2SD 之内?

8.6.5.4 恒温箱

- 应当使用温度计来核查恒温箱和加温载物台的温度。温度计也要定期校准。
- 应当通过恒温箱的数字显示装置每天查看 CO₂ 混合气体,或通过其他气体分析系统进

行周检或月检,以及在维护时进行气体采样检查。

8.6.5.5 pH 试纸

- 应当用已知 pH 的标准液进行定标。

8.6.5.6 其他设备

- 其他实验室仪器(如 pH 计等)和试剂也应当根据标准每隔 3~6 个月核查一次。

8.7 精液分析的国家外部质量控制计划

全球男科学领域的一些科学协会和组织,为建立和维持有效的精液分析 EQC 计划提供支持,可以与之联系以获取更多信息。这些支持来自各个层面。一些组织与关联公司合作,提供正式的计划。这些计划提供必需的培训和材料,以满足不同国家或地区的法律要求。通常,这些课程和计划在各自的国家或地区得到认可。其他组织提供精液分析特定方面的培训或对特定程序的实际见解。世界卫生组织与这些项目中的任何一个都没有联系。



参考文献

1. Belsey M, Eliasson R, Gallegos AJ, Moghissi KS, Paulsen CA, Prasad AMN. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Singapore: Press Concern; 1980.
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interactions. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1987. 67 p.
3. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1992. 107 p.
4. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999. 128 p.
5. Campbell MJ, Lotti F, Baldi E, Schlatt S, Festin MP, Björndahl L et al. Distribution of Semen Examination Results 2020 - a follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. Andrology. 2021.
6. Björndahl L. What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. Hum Fertil (Camb). 2011;14(3):179-86.
7. Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Duleba AJ. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. Int J Androl. 2008;31(5):499-507.
8. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med. 2001;345(19):1388-93.
9. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. Hum Reprod Update. 2017;23(6):660-80.
10. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. Fertil Steril. 2014;102(6):1502-7.

11. Nieschlag E, Pock T, Hellenkemper B. External quality of semen analysis reveals low compliance with the WHO guidelines. *J Reproduktionsmed Endokrinol_Online*. 2017;14(6):306-10.
12. Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum Reprod*. 2011;26(12):3207-12.
13. Björndahl L, Kvist U. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(4):440-8.
14. Weiske WH. Pregnancy caused by sperm from vasa efferentia. *Fertil Steril*. 1994;62(3):642-3.
15. Sobrero AJ, Macleod J. The immediate postcoital test. *Fertil Steril*. 1962;13:184-9.
16. Cooper TG, Barfield JP, Yeung CH. Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *Int J Androl*. 2005;28(1):58-60.
17. Holmes E, Björndahl L, Kvist U. Post-ejaculatory increase in human semen osmolality in vitro. *Andrologia*. 2019:e13311.
18. Holmes E, Björndahl L, Kvist U. Possible factors influencing post-ejaculatory changes of the osmolality of human semen in vitro. *Andrologia*. 2019:e13443.
19. Zavos PM, Goodpasture JC. Clinical improvements of specific seminal deficiencies via intercourse with a seminal collection device versus masturbation. *Fertil Steril*. 1989;51(1):190-3.
20. Pound N, Javed MH, Ruberto C, Shaikh MA, Del Valle AP. Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology & behavior*. 2002;76(4-5):685-9.
21. Eliasson R. Basic semen analysis. In: Matson P, editor. *Current Topics in Andrology*. Perth: Ladybrook Publishing; 2003. p. 35-89.
22. Amann RP. Evaluating spermatogenesis using semen: the biology of emission tells why reporting total sperm per sample is important, and why reporting only number of sperm per milliliter is irrational. *J Androl*. 2009;30(6):623-5.
23. Ng KK, Donat R, Chan L, Lalak A, Di Pierro I, Handelsman DJ. Sperm output of older men. *Hum Reprod*. 2004;19(8):1811-5.
24. Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum Reprod*. 1993;8(8):1251-8.

25. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84(4):833-42.
26. Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics. *Clin Reprod Fertil*. 1982;1(4):273-85.
27. Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation II. Spermatozoal vitality and storage. *Clin Reprod Fertil*. 1982;1(4):287-93.
28. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril*. 2004;82(1):57-65.
29. Correa-Perez JR. Intrasubject abstinence and quality of sperm. *Fertil Steril*. 2005;83(5):1588-9; author reply 9-90.
30. Amann RP, Howards SS. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J Urol*. 1980;124(2):211-5.
31. Amann RP. Considerations in evaluating human spermatogenesis on the basis of total sperm per ejaculate. *J Androl*. 2009;30(6):626-41.
32. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl*. 1984;7(5):369-82.
33. Behre HM, Bergmann M, Simoni M, Tuttelmann F. Primary Testicular Failure. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
34. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jorgensen N, Andersson AM, Krarup T et al. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod*. 2000;15(2):366-72.
35. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:107.
36. Santi D, Corona G. Primary and Secondary Hypogonadism. In: Simoni M, Huhtaniemi I, editors. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. 2. London: Springer International Publishing; 2017. p. 687-747.
37. Medina P, Segarra G, Ballester R, Chuan P, Domenech C, Vila JM et al. Effects of antidepressants in adrenergic neurotransmission of human vas deferens. *Urology*. 2000;55(4):592-7.
38. Baker HW, Kovacs GT. Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean. *Int J Androl*. 1985;8(6):421-6.

世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册，第6版

39. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod.* 2003;18(10):2082-8.
40. Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM. Variation of semen measures within normal men. *Fertil Steril.* 1985;44(3):396-400.
41. Berman NG, Wang C, Paulsen CA. Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data. *J Androl.* 1996;17(1):68-73.
42. Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril.* 2004;82(2):358-66.
43. Castilla JA, Alvarez C, Aguilar J, Gonzalez-Varea C, Gonzalvo MC, Martinez L. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Hum Reprod.* 2006;21(4):847-51.
44. Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril.* 2006;85(1):128-34.
45. Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology.* Oxford: Oxford University Press; 1994. 393 p.
46. Mortimer D. Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review.* 1994;3:97-111.
47. Jones DM, Kovacs GT, Harrison L, Jennings MG, Baker HW. Immobilization of sperm by condoms and their components. *Clin Reprod Fertil.* 1986;4(6):367-72.
48. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*, 3rd edition. Geneva 2004.
49. Huggins C, Scott WW, Heinen JH. Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. *Am J Physiol.* 1942;136(3):467-73.
50. Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB et al. Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl.* 2004;25(4):635-44.
51. Cooper TG, Brazil C, Swan SH, Overstreet JW. Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *J Androl.* 2007;28(1):1-4.
52. Rose NR, Hjort T, Rümke P, Harper MJK, Vyazov O. Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa. *Clin Exp Immunol.* 1976;23(2):175-99.

53. Johannisson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Hum Reprod Update*. 2000;6(4):404-12.
54. Freund M. Standards for the rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int J Fertil*. 1966;11(1):97-180.
55. Jue JS, Ramasamy R. Significance of positive semen culture in relation to male infertility and the assisted reproductive technology process. *Transl Androl Urol*. 2017;6(5):916-22.
56. Micillo A, Vassallo MR, Cordeschi G, D'Andrea S, Necozione S, Francavilla F et al. Semen leukocytes and oxidative-dependent DNA damage of spermatozoa in male partners of subfertile couples with no symptoms of genital tract infection. *Andrology*. 2016;4(5):808-15.
57. Palermo GD, Neri QV, Cozzubbo T, Cheung S, Pereira N, Rosenwaks Z. Shedding Light on the Nature of Seminal Round Cells. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151640.
58. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl*. 1988;11(5):379-94.
59. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl*. 2000;21(1):145-53.
60. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod*. 2000;15(7):1562-7.
61. Aitken RJ, Sutton M, Warner P, Richardson DW. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J Reprod Fertil*. 1985;73(2):441-9.
62. Mortimer D, Pandya IJ, Sawers RS. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil*. 1986;78(1):93-102.
63. Comhaire FH, Vermeulen L, Hinting A, Schoonjans F. Accuracy of sperm characteristics in predicting the in vitro fertilizing capacity of semen. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1988;5(6):326-31.
64. Barratt CL, McLeod ID, Dunphy BC, Cooke ID. Prognostic value of two putative sperm function tests: hypo-osmotic swelling and bovine sperm mucus penetration test (Penetrak). *Hum Reprod*. 1992;7(9):1240-4.
65. Irvine DS, Aitken RJ. Predictive value of in-vitro sperm function tests in the context of an AID service. *Hum Reprod*. 1986;1(8):539-45.

66. Bollendorf A, Check JH, Lurie D. Evaluation of the effect of the absence of sperm with rapid and linear progressive motility on subsequent pregnancy rates following intrauterine insemination or in vitro fertilization. *J Androl.* 1996;17(5):550-7.
67. Sifer C, Sasportes T, Barraud V, Poncelet C, Rudant J, Porcher R et al. World Health Organization grade 'a' motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2769-75.
68. Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, Vannin AS, Englert Y. A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3103-7.
69. Björndahl L. The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl.* 2010;12(1):33-5.
70. Eliasson R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian J Androl.* 2010;12(1):26-32.
71. Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol.* 1975;66(2):225-32.
72. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update.* 2003;9(5):405-28.
73. Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HW, de Kretser DM. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil Steril.* 1988;49(6):1052-8.
74. Correa-Perez JR, Fernandez-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necropermia. *Fertil Steril.* 2004;81(4):1148-50.
75. Björndahl L, Soderlund I, Johansson S, Mohammadi M, Pourian MR, Kvist U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *J Androl.* 2004;25(5):671-8.
76. Björndahl L, Soderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod.* 2003;18(4):813-6.
77. Mortimer D. A technical note on the assessment of human sperm vitality using eosin-nigrosin staining. *Reprod Biomed Online.* 2020;40(6):851-5.

78. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod.* 2002;17(2):503-15.
79. World Health Organization. Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility: Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril.* 1996;65(4):821-9.
80. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet.* 1998;352(9135):1172-7.
81. Behre HM, Yeung CH, Holstein AF, Weinbauer GF, Gassner C, Nieschlag E. Diagnosis of Male Infertility and Hypogonadism. In: Nieschlag E, Behre HM, editors. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction.* second ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag; 2000. p. 90-121.
82. MacLeod J, Wang Y. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertil Steril.* 1979;31(2):103-16.
83. Eliasson R. Analysis of semen. In: Behrman SJ, Kistner RW, editors. *Progress in Infertility.* Boston: Little, Brown and Co; 1975. p. 691-713.
84. Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology.* Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
85. Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human reproduction (Oxford, England).* 1986;1(5):299-303.
86. Kirkman-Brown J, Björndahl L. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis. *Fertil Steril.* 2009;91(2):627-31.
87. Cooper TG, Hellenkemper B, Jonckheere J, Callewaert N, Grootenhuis AJ, Kersemaekers WM et al. Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *J Androl.* 2006;27(4):483-90.
88. Ezech UI, Moore HM. Redefining azoospermia and its implications. *Fertil Steril.* 2001;75(1):213-4.
89. Sharif K. Reclassification of azoospermia: the time has come? *Hum Reprod.* 2000;15(2):237-8.
90. Eliasson R. Analysis of semen. In: Burger HG, De Kretser DM, editors. *The Testis.* New York: Raven Press; 1981. p. 381-99.
91. Lindsay KS, Floyd I, Swan R. Classification of azoospermic samples. *Lancet.* 1995;345(8965):1642.

92. Jaffe TM, Kim ED, Hoekstra TH, Lipshultz LI. Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *J Urol.* 1998;159(5):1548-50.
93. Corea M, Campagnone J, Sigman M. The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. *Fertil Steril.* 2005;83(4):920-2.
94. Fredricsson B, Bjork G. Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil Steril.* 1977;28(8):841-5.
95. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod.* 1990;5(5):586-92.
96. Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 1991;30(4):346-52.
97. Liu DY, Baker HW. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil.* 1992;94(1):71-84.
98. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, Demirakca T, Tilgen W, Runnebaum B. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum Reprod.* 1996;11(1):139-46.
99. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update.* 1998;4(1):73-82.
100. Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ, Oehninger S. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia.* 1995;27(3):143-8.
101. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update.* 2001;7(5):495-500.
102. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1643-9.
103. Liu DY, Garrett C, Baker HW. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod.* 2003;18(11):2382-9.
104. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod.* 2001;16(6):1165-71.

105. van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol Obstet Invest.* 2005;59(2):86-91.
106. Mortimer D. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol Hum Reprod.* 2018;24(12):567-92.
107. Katz DF, Overstreet JW, Samuels SJ, Niswander PW, Bloom TD, Lewis EL. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J Androl.* 1986;7(4):203-10.
108. Abraham-Peskir JV, Chantler E, Uggerhoj E, Fedder J. Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Hum Reprod.* 2002;17(2):375-82.
109. Cooper TG, Yeung CH, Fetic S, Sobhani A, Nieschlag E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2283-8.
110. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988;49(1):112-7.
111. Zollner U, Schleyer M, Steck T. Evaluation of a cut-off value for normal sperm morphology using strict criteria to predict fertilization after conventional in-vitro fertilization and embryo transfer in asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 1996;11(10):2155-61.
112. Franken DR, Barendsen R, Kruger TF. A continuous quality control program for strict sperm morphology. *Fertil Steril.* 2000;74(4):721-4.
113. Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(10):432-8.
114. Kvist U, Björndahl L. Manual on Basic Semen Analysis 2002. Heineman MJ, editor. Oxford: Oxford Academic; 2002 2002-06-15. 24 p.
115. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1118-23.
116. Inaba K, Mizuno K. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod Med Biol.* 2016;15(2):77-94.
117. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000;15(4):830-9.

118. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod.* 1996;11(9):1942-6.
119. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia.* 1988;20(3):211-7.
120. Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod.* 2002;17(5):1292-8.
121. Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L et al. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod.* 2003;69(2):535-9.
122. Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions. *J Androl.* 2001;22(2):192-205.
123. Chantler E, Abraham-Peskir JV. Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia.* 2004;36(2):87-93.
124. Fetic S, Yeung CH, Sonntag B, Nieschlag E, Cooper TG. Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl.* 2006;27(2):294-301.
125. Pelfrey RJ, Overstreet JW, Lewis EL. Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal. *Fertil Steril.* 1982;38(1):112-4.
126. Rothmann SA, Bort AM, Quigley J, Pillow R. Sperm morphology classification: a rational method for schemes adopted by the world health organization. *Methods Mol Biol.* 2013;927:27-37.
127. Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T et al. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod.* 2006;21(3):760-5.
128. de la Taille A, Rigot JM, Mahe P, Gervais R, Dumur V, Lemaitre L et al. [Correlation of genitourinary abnormalities, spermiogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens]. *Prog Urol.* 1998;8(3):370-6.
129. Weiske WH, Salzler N, Schroeder-Printzen I, Weidner W. Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia.* 2000;32(1):13-8.
130. Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Mieusset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril.* 2000;74(6):1164-74.

131. von Eckardstein S, Cooper TG, Rutscha K, Meschede D, Horst J, Nieschlag E. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2000;73(6):1226-31.
132. Kussler AP, Pimentel AM, Alcoba DD, Liu IP, Brum IS, Capp E et al. Mechanical processing of hyperviscous semen specimens can negatively affect sperm DNA fragmentation. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(4):737-42.
133. de la Taille A, Rigot JM, Mahe P, Vankemmel O, Gervais R, Dumur V et al. Correlation between genito-urinary anomalies, semen analysis and CFTR genotype in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Br J Urol*. 1998;81(4):614-9.
134. Haugen TB, Grotmol T. pH of human semen. *Int J Androl*. 1998;21(2):105-8.
135. Le Lannou D, Griveau JF, Le Pichon JP, Quero JC. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Hum Reprod*. 1992;7(10):1417-21.
136. Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod*. 1998;13(3):611-9.
137. Motulsky H. *Intuitive biostatistics*. New York: Oxford University Press; 1995.
138. Seaman EK, Goluboff E, BarChama N, Fisch H. Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertil Steril*. 1996;66(4):662-5.
139. Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril*. 1997;68(2):340-5.
140. Björndahl L, Magnusson K, Holmberg R. Validation of Cellvision Disposable 100 Micrometer Hemocytometer With Improved Neubauer Ruling. *Andrology*. 2018;6(S1).
141. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C et al. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl*. 2004;25(4):645-56.
142. Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J Androl*. 2005;26(1):115-22.
143. Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *J Androl*. 2005;26(1):107-14.

144. Björndahl L, Barratt CL. Semen analysis: setting standards for the measurement of sperm numbers. *J Androl.* 2005;26(1):11.
145. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984;70(1):219-28.
146. Hossain AM, Rizk B, Barik S, Huff C, Thorneycroft IH. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod.* 1998;13(6):1578-83.
147. Holmes E. On osmolality and sperm function during processing for assisted reproduction [Academic]. Stockholm, Sweden: Karolinska Institutet; 2020.
148. Meschede D, Keck C, Zander M, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *Int J Androl.* 1993;16(6):362-9.
149. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl.* 1987;18(3):275-7.
150. Coetzee K, Kruger TF, Vandendael A, de Villiers A, Lombard CJ. Comparison of two staining and evaluation methods used for computerized human sperm morphology evaluations. *Andrologia.* 1997;29(3):133-5.
151. Oral E, Yetis O, Elibol F, Senol H, Irez T, Aksu FM. Assessment of human sperm morphology by strict criteria: comparison of wet preparation versus stained with the modified Diff-Quik method. *Arch Androl.* 2002;48(4):307-14.
152. Maree L, du Plessis SS, Menkveld R, van der Horst G. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Hum Reprod.* 2010;25(6):1369-82.
153. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod.* 2001;16(12):2710-7.
154. Menkveld RK, T.F. Basic Semen Analysis. In: Acosta AA, editor. Human spermatozoa in assisted reproduction. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990. p. 68-84.
155. Aziz N, Buchan I, Taylor C, Kingsland CR, Lewis-Jones I. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 1996;66(6):1000-8.

156. Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ, Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril*. 2004;82(3):621-7.
157. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ, Jr. et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril*. 2004;81(2):349-54.
158. David G, Czyglik F, Mayaux MJ, Schwartz D. The success of A.I.D. and semen characteristics: study on 1489 cycles and 192 ejaculates. *Int J Androl*. 1980;3(6):613-9.
159. Auger JE, F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologia*. 2000;10:358-73.
160. ESHRE/NAFA. Manual on basic semen analysis (ESHRE Monographs #2). Oxford: Oxford University Press; 2002.
161. Wang WL, Tu CF, Tan YQ. Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new? *Asian J Androl*. 2020;22(3):236-45.
162. Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update*. 2015;21(4):455-85.
163. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod*. 2001;16(5):1012-9.
164. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Cambi M, Lotti F, Natali I et al. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertil Steril*. 2015;104(3):582-90 e4.
165. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Baldi E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1166:75-85.
166. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1027-36.
167. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2012;27(10):2908-17.
168. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165125.
169. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl*. 2017;19(1):80-90.

170. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2019;38(6):951-60.
171. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil*. 2014;15(1):2-14.
172. Robbins DJ, Coleman MS. Initiator role of double stranded DNA in terminal transferase catalyzed polymerization reactions. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(7):2943-57.
173. Sharma R, Masaki J, Agarwal A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. *Methods Mol Biol*. 2013;927:121-36.
174. Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C et al. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2010;31(4):336-45.
175. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Guido C, Forti G, Baldi E. Critical aspects of detection of sperm DNA fragmentation by TUNEL/flow cytometry. *Syst Biol Reprod Med*. 2010;56(4):277-85.
176. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 2008;44(3):250-4.
177. Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Ballesca JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A*. 2007;71(12):1011-8.
178. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005;20(12):3446-51.
179. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1921-7.
180. Antonucci N, Manes S, Corradetti B, Manicardi GC, Borini A, Bizzaro D. A novel in vitro sperm head decondensation protocol for rapid flow cytometric measurement of deoxyribonucleic acid content. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1857-61.
181. Mitchell LA, De Iuliis GN, Aitken RJ. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl*. 2011;34(1):2-13.
182. Ribeiro SC, Muratori M, De Geyter M, De Geyter C. TUNEL labeling with BrdUTP/anti-BrdUTP greatly underestimates the level of sperm DNA fragmentation in semen evaluation. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181802.

183. Muratori M, Pellegrino G, Mangone G, Azzari C, Lotti F, Tarozzi N et al. DNA Fragmentation in Viable and Non-Viable Spermatozoa Discriminates Fertile and Subfertile Subjects with Similar Accuracy. *J Clin Med*. 2020;9(5).
184. Martinez MG, Sanchez-Martin P, Dorado-Silva M, Fernandez JL, Girones E, Johnston SD et al. Magnetic-activated cell sorting is not completely effective at reducing sperm DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(12):2215-21.
185. Fernandez JL, Cajigal D, Lopez-Fernandez C, Gosalvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol*. 2011;682:291-301.
186. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24(1):59-66.
187. Gosalvez J, Rodriguez-Predreira M, Mosquera A, Lopez-Fernandez C, Esteves SC, Agarwal A et al. Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test. *Andrologia*. 2014;46(6):602-9.
188. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*. 1996;363(2):89-96.
189. McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE et al. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res*. 1997;375(2):93-104.
190. Simon L, Carrell DT. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol Biol*. 2013;927:137-46.
191. Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol*. 2009;25(1):81-98.
192. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*. 1997;375(2):183-93.
193. Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res*. 2003;534(1-2):15-20.
194. Gonzalez JE, Romero I, Barquinero JF, Garcia O. Automatic analysis of silver-stained comets by CellProfiler software. *Mutat Res*. 2012;748(1-2):60-4.
195. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(6):724-34.

196. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*. 2013;1(5):715-22.
197. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Corrigendum to "Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility". *Clin Exp Reprod Med*. 2019;46(4):211.
198. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med*. 2019;46(1):14-21.
199. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA(R)). *Methods Mol Biol*. 2013;927:147-64.
200. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*. 2000;22(2-3):169-89.
201. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. *Curr Protoc Cytom*. 2001;Chapter 7:Unit 7 13.
202. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14(4):1039-49.
203. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl*. 2010;33(1):e221-7.
204. Godo A, Blanco J, Vidal F, Sandalinas M, Garcia-Guixé E, Anton E. Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in spermatozoa from Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(1):79-88.
205. Wang BN, B.; Tang, D.; Li, R.; Liu, X.; Song, J.; Wang, W.; Liu, Z. . Analysis of Meiotic Segregation Patterns and Interchromosomal Effects in Sperm from 13 Robertsonian Translocations. *Balkan J Med Genet* 2017;20(1):43-50.
206. Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod*. 2013;28(6):1707-15.
207. Ramasamy R, Scovell JM, Kovac JR, Cook PJ, Lamb DJ, Lipshultz LI. Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2015;103(4):906-9 e1.

208. Kohn TP, Kohn JR, Darilek S, Ramasamy R, Lipshultz L. Genetic counseling for men with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure due to abnormal sperm chromosomal aneuploidy. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(5):571-6.
209. Ramasamy R, Besada S, Lamb DJ. Fluorescent in situ hybridization of human sperm: diagnostics, indications, and therapeutic implications. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1534-9.
210. Ryu HM, Lin WW, Lamb DJ, Chuang W, Lipshultz LI, Bischoff FZ. Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology: implication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2001;76(5):879-83.
211. Ioannou D, Fortun J, Tempest HG. Meiotic nondisjunction and sperm aneuploidy in humans. *Reproduction.* 2019;157(1):R15-R31.
212. Neusser M, Rogenhofer N, Durl S, Ochsenkuhn R, Trottman M, Jurinovic V et al. Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril.* 2015;104(5):1130-7 e1-10.
213. Templado C, Uroz L, Estop A. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(10):634-43.
214. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril.* 1993;60(6):1069-75.
215. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1143-57.
216. Homyk M, Anderson DJ, Wolff H, Herr JC. Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. *Fertil Steril.* 1990;53(2):323-30.
217. Nahoum CR, Cardozo D. Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostrate-vesicular fluid. *Fertil Steril.* 1980;34(1):68-9.
218. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl.* 2001;22(4):575-83.
219. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 2003;35(5):271-8.
220. Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod.* 1995;10(7):1736-9.

221. Rossi AG, Aitken RJ. Interactions between leukocytes and the male reproductive system. The unanswered questions. *Adv Exp Med Biol.* 1997;424:245-52.
222. Couture M, Ulstein M, Leonard J, Paulsen CA. Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. *Andrologia.* 1976;8(1):61-6.
223. Ezeh UI, Martin M, Cooke ID, Moore HD. Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3061-5.
224. Barbonetti A, Castellini C, D'Andrea S, Cordeschi G, Santucci R, Francavilla S et al. Prevalence of anti-sperm antibodies and relationship of degree of sperm auto-immunization to semen parameters and post-coital test outcome: a retrospective analysis of over 10 000 men. *Hum Reprod.* 2019;34(5):834-41.
225. Kremer J, Jager S. Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon with special regard to immunoglobulin class and antigen-reactive sites. *Int J Androl.* 1980;3(2):143-52.
226. Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D. Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil Steril.* 1984;42(2):171-83.
227. Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D, Witkin SS. Detection of spontaneously occurring sperm-directed antibodies in infertile couples by immunobead binding and enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann N Y Acad Sci.* 1984;438:504-7.
228. Bronson RA. Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Arch Androl.* 1982;9:61.
229. Clarke GN. Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. . In: Bratanov K, editor. *Immunology of Reproduction.* Blgarian: Bulgarian Academy of Sciences Press; 1982. p. 462-85.
230. Hellstrom WJ, Samuels SJ, Waits AB, Overstreet JW. A comparison of the usefulness of SpermMar and immunobead tests for the detection of antisperm antibodies. *Fertil Steril.* 1989;52(6):1027-31.
231. Scarselli G, Livi C, Chelo E, Dubini V, Pellegrini S. Approach to immunological male infertility: a comparison between MAR test and direct immunobead test. *Acta Eur Fertil.* 1987;18(1):55-7.
232. MacMillan RA, Baker HW. Comparison of latex and polyacrylamide beads for detecting sperm antibodies. *Clin Reprod Fertil.* 1987;5(4):203-9.
233. Meinertz H, Bronson R. Detection of antisperm antibodies on the surface of motile spermatozoa. Comparison of the immunobead binding technique (IBT) and the mixed antiglobulin reaction (MAR). *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1988;18(4):120-3.

234. Abshagen K, Behre HM, Cooper TG, Nieschlag E. Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertil Steril*. 1998;70(2):355-6.
235. Chiu WW, Chamley LW. Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertil Steril*. 2004;82(3):529-35.
236. Rajah SV, Parslow JM, Howell RJ, Hendry WF. Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males. *Fertil Steril*. 1992;57(6):1300-3.
237. Gould JE, Brazil CK, Overstreet JW. Sperm-immunobead binding decreases with in vitro incubation. *Fertil Steril*. 1994;62(1):167-71.
238. Barratt CL, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID. The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Hum Reprod*. 1992;7(1):95-8.
239. von der Kammer H, Scheit KH, Weidner W, Cooper TG. The evaluation of markers of prostatic function. *Urol Res*. 1991;19(6):343-7.
240. Cooper TG, Weidner W, Nieschlag E. The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl*. 1990;13(5):329-36.
241. Moellering H, Gruber W. Determination of citrate with citrate lyase. *Anal Biochem*. 1966;17(3):369-76.
242. Heite HJ, Wetterauer W. [Acid phosphatase in seminal fluid--method of estimation and diagnostic significance]. *Andrologia*. 1979;11(2):113-22.
243. Wang J, Niu Y, Zhang C, Chen Y. A micro-plate colorimetric assay for rapid determination of trace zinc in animal feed, pet food and drinking water by ion masking and statistical partitioning correction. *Food Chem*. 2018;245:337-45.
244. Johnsen O, Eliasson R. Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *Int J Androl*. 1987;10(2):435-40.
245. Cooper TG, Jockenhovel F, Nieschlag E. Variations in semen parameters from fathers. *Hum Reprod*. 1991;6(6):859-66.
246. Björndahl L. Prevalence of high zinc concentrations in 45,000 ejaculates - Unpublished data. 2021.
247. Karvonen MJ, Malm M. Colorimetric determination of fructose with indol. *Scand J Clin Lab Invest*. 1955;7(4):305-7.

248. Paquin R, Chapdelaine P, Dube JY, Tremblay RR. Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal alpha-1,4-glucosidase. *J Androl.* 1984;5(4):277-82.
249. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jockenhovel F, Nieschlag E. Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of alpha-glucosidase in seminal plasma. *Int J Androl.* 1990;13(4):297-305.
250. Björndahl L, Magnusson K, Larsson Chatziantonis M, Holmberg R, Flanagan J. When is a vasectomy successful? Laboratory aspects. *Andrology.* 2019;7, Suppl 1:96-97.
251. MacLeod J, Hotchkiss RS. The Distribution of Spermatozoa and of Certain Chemical Constituents in the Human Ejaculate. *J Urol.* 1942;48(2):225-9.
252. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril.* 1951;2(3):187-204.
253. Björndahl L, Kvist U. Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *Int J Androl.* 1990;13(3):232-7.
254. Kvist U, Kjellberg S, Björndahl L, Soufir JC, Arver S. Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *Int J Androl.* 1990;13(4):245-52.
255. Björndahl L, Kjellberg S, Kvist U. Ejaculatory sequence in men with low sperm chromatin-zinc. *Int J Androl.* 1991;14(3):174-8.
256. Lindholmer C. Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculate. *Fertil Steril.* 1973;24(7):521-6.
257. Lundquist F. Aspects of the biochemistry of human semen. . *Acta Physiol Scand.* 1949;19, Suppl 66:1-108.
258. Beiswanger JC, Deaton JL, Jarow JP. Partial ejaculatory duct obstruction causing early demise of sperm. *Urology.* 1998;51(1):125-7.
259. Eisenberg ML, Walsh TJ, Garcia MM, Shinohara K, Turek PJ. Ejaculatory duct manometry in normal men and in patients with ejaculatory duct obstruction. *J Urol.* 2008;180(1):255-60; discussion 60.
260. Fisch H, Kang YM, Johnson CW, Goluboff ET. Ejaculatory duct obstruction. *Curr Opin Urol.* 2002;12(6):509-15.
261. Lotti F, Corona G, Cocci A, Cipriani S, Baldi E, Degl'Innocenti S et al. The prevalence of midline prostatic cysts and the relationship between cyst size and semen parameters among infertile and fertile men. *Hum Reprod.* 2018;33(11):2023-34.

262. Nagler HM, Rotman M, Zoltan E, Fisch H. The natural history of partial ejaculatory duct obstruction. *J Urol*. 2002;167(1):253-4.
263. Onur MR, Orhan I, Firdolas F, Onur R, Kocakoc E. Clinical and radiological evaluation of ejaculatory duct obstruction. *Arch Androl*. 2007;53(4):179-86.
264. Smith JF, Walsh TJ, Turek PJ. Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North Am*. 2008;35(2):221-7, viii.
265. Turek PJ, Magana JO, Lipshultz LI. Semen parameters before and after transurethral surgery for ejaculatory duct obstruction. *J Urol*. 1996;155(4):1291-3.
266. Avellino GJ, Lipshultz LI, Sigman M, Hwang K. Transurethral resection of the ejaculatory ducts: etiology of obstruction and surgical treatment options. *Fertil Steril*. 2019;111(3):427-43.
267. Chan PTK, Aube M. Infertility due to ejaculatory duct obstruction can be surgically corrected-a forgotten lesson in male reproductive urology. *Fertil Steril*. 2018;110(7):1275-6.
268. El-Assmy A, El-Tholoth H, Abouelkheir RT, Abou-El-Ghar ME. Transurethral resection of ejaculatory duct in infertile men: outcome and predictors of success. *Int Urol Nephrol*. 2012;44(6):1623-30.
269. Halpern JA, Brannigan RE, Schlegel PN. Fertility-enhancing male reproductive surgery: glimpses into the past and thoughts for the future. *Fertil Steril*. 2019;112(3):426-37.
270. Kadioglu A, Cayan S, Tefekli A, Orhan I, Engin G, Turek PJ. Does response to treatment of ejaculatory duct obstruction in infertile men vary with pathology? *Fertil Steril*. 2001;76(1):138-42.
271. McQuaid JW, Tanrikut C. Ejaculatory duct obstruction: current diagnosis and treatment. *Curr Urol Rep*. 2013;14(4):291-7.
272. Fisch H, Lambert SM, Goluboff ET. Management of ejaculatory duct obstruction: etiology, diagnosis, and treatment. *World J Urol*. 2006;24(6):604-10.
273. Mortimer D, Björndahl L, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. A practical guide to basic laboratory andrology. 1st ed. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; In Press.
274. Amelar RD, Hotchkiss RS. The Split Ejaculate: Its Use in the Management of Male Infertility. *Fertil Steril*. 1965;16:46-60.
275. Eisenberg ML, Li S, Behr B, Pera RR, Cullen MR. Relationship between semen production and medical comorbidity. *Fertil Steril*. 2015;103(1):66-71.

276. Selvaraju V, Baskaran S, Agarwal A, Henkel R. Environmental contaminants and male infertility: Effects and mechanisms. *Andrologia*. 2020:e13646.
277. Levine H, Jorgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. 2017;23(6):646-59.
278. Muratori M, De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2019;33(1):117-26.
279. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*. 1979;31(5):531-7.
280. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*. 1987;8(5):338-48.
281. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987;81(2):459-69.
282. Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2017;9:420-47.
283. O'Flaherty C, Matsushita-Fournier D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol Reprod*. 2017;97(4):577-85.
284. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction*. 2020;159(4):R189-R201.
285. Dias TR. Measurement of Reactive Oxygen Species in Semen Samples Using Chemiluminescence. *Methods Mol Biol*. 2021;2202:103-9.
286. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ. A new method for measuring antioxidant activity. *Biochem Soc Trans*. 1993;21(2):95S.
287. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic Res*. 1997;26(3):195-9.
288. Xu F, Guo G, Zhu W, Fan L. Human sperm acrosome function assays are predictive of fertilization rate in vitro: a retrospective cohort study and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):81.

289. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17(3):156-61.
290. Tamburrino L, Marchiani S, Muratori M, Luconi M, Baldi E. Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;516:110952.
291. Liu DY, Baker HW. Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertil Steril.* 1996;66(2):312-5.
292. Fierro R, Foliguet B, Grignon G, Daniel M, Bene MC, Faure GC et al. Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch Androl.* 1996;36(3):187-96.
293. Cross N. Methods for evaluating the acrosomal status of human sperm. In: Fenichel P, Parinaud J, editors. Human sperm acrosome reaction. Colloques INSERM. Paris: John Libbey Eurotext; 1995. p. 277-85.
294. Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG. Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J Androl.* 1993;14(2):132-41.
295. Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget.* 2017;8(2):3600-27.
296. Cross N. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research.* 1986;15 213-26.
297. Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil.* 1987;81(1):127-35.
298. Pember S, Jequier A, Yovich J. A Test of the Human Sperm Acrosome Reaction Following Ionophore Challenge Relationship to Fertility and Other Seminal Parameters. *Journal of andrology.* 1991;12:98-103.
299. Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Fuzzi B et al. Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1996;11(8):1661-7.
300. Björndahl L, Kvist U. A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Syst Biol Reprod Med.* 2011;57(1-2):86-92.
301. Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(11):1953-68.

302. Marchiani S, Tamburrino L, Benini F, Fanfani L, Dolce R, Rastrelli G et al. Chromatin Protamination and Catsper Expression in Spermatozoa Predict Clinical Outcomes after Assisted Reproduction Programs. *Sci Rep*. 2017;7(1):15122.
303. Marchiani S, Tamburrino L, Olivito B, Betti L, Azzari C, Forti G et al. Characterization and sorting of flow cytometric populations in human semen. *Andrology*. 2014;2(3):394-401.
304. Smith JF, Syritsyna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y et al. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca^{2+} channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(17):6823-8.
305. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 2001;413(6856):603-9.
306. Brown SG, Publicover SJ, Barratt CLR, Martins da Silva SJ. Human sperm ion channel (dys)function: implications for fertilization. *Hum Reprod Update*. 2019;25(6):758-76.
307. Luo T, Chen HY, Zou QX, Wang T, Cheng YM, Wang HF et al. A novel copy number variation in CATSPER2 causes idiopathic male infertility with normal semen parameters. *Hum Reprod*. 2019;34(3):414-23.
308. Kelly MC, Brown SG, Costello SM, Ramalingam M, Drew E, Publicover SJ et al. Single-cell analysis of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signalling in sub-fertile men: characteristics and relation to fertilization outcome. *Hum Reprod*. 2018;33(6):1023-33.
309. Davis RO, Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl*. 1992;13(1):81-6.
310. Mortimer D, Mortimer S, editors. Routine application of CASA in human clinical andrology and ART laboratories. 13th International Symposium on Spermatology; 2018; Stockholm New York: Springer; 2021.
311. Mortimer D, Aitken RJ, Mortimer ST, Pacey AA. Workshop report: clinical CASA--the quest for consensus. *Reproduction, fertility, and development*. 1995;7(4):951-9.
312. ESHRE Special Interest Group in Andrology. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. 1998 Jan. Report No.: 0268-1161 (Print) Contract No.: 13.
313. Freour T, Jean M, Mirallie S, Barriere P. Computer-assisted sperm analysis parameters in young fertile sperm donors and relationship with age. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58(2):102-6.
314. Yuan P, Zhang Z, Luo C, Quan S, Chu Q, Zhao S. [Computer-assisted sperm analysis for assessing sperm mobility parameters in in vitro fertilization]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2013;33(3):448-50.

315. Cupples G, Gallagher MT, Smith AU, Kirkman-Brown J, editors. Heads and tails. Requirements for informative and robust computational measures of sperm motility. 13th International Symposium on Spermatology; 2018; Stockholm. New York: Springer; 2021.
316. Gallagher MT, Cupples G, Ooi EH, Kirkman-Brown JC, Smith DJ. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Hum Reprod.* 2019;34(7):1173-85.
317. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update.* 1997;3(5):403-39.
318. Zhu JJ, Pacey AA, Barratt CL, Cooke ID. Computer-assisted measurement of hyperactivation in human spermatozoa: differences between European and American versions of the Hamilton-Thorn motility analyser. *Hum Reprod.* 1994;9(3):456-62.
319. Mortimer D, Mortimer ST. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods Mol Biol.* 2013;927:77-87.
320. Goodson SG, White S, Stevans AM, Bhat S, Kao CY, Jaworski S et al. CASAnova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns. *Biol Reprod.* 2017;97(5):698-708.
321. Ooi EH, Smith DJ, Gadelha H, Gaffney EA, Kirkman-Brown J. The mechanics of hyperactivation in adhered human sperm. *R Soc Open Sci.* 2014;1(2):140230.
322. Garrett C, Baker HW. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1306-17.
323. Lacquet FA, Kruger TF, Du Toit TC, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, De Villiers A et al. Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology. *Arch Androl.* 1996;36(2):133-8.
324. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, de Villiers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia.* 1997;29(1):1-7.
325. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia.* 1999;31(3):163-8.
326. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ, Shaughnessy D, Oehninger S, Ozgur K et al. Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertil Steril.* 1999;71(1):80-4.

327. Coetzee K, de Villiers A, Kruger TF, Lombard CJ. Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS). *Fertil Steril*. 1999;71(2):222-5.
328. An LM, Ma JH, Li WW, Xia XY, Huang YF, Wang WB. [Flow cytometry for evaluation of sperm plasma membrane integrity in varicocele patients]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2011;17(11):984-8.
329. Isobe T. New method to estimate the possibility of natural pregnancy using computer-assisted sperm analysis. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58(6):339-47.
330. Yaniz JL, Vicente-Fiel S, Soler C, Recreo P, Carretero T, Bono A et al. Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in men. *Asian J Androl*. 2016;18(6):819-23.
331. Lu JC, Huang YF, Lu NQ. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia*. 2014;46(4):329-38.
332. Vested A, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, Thulstrup AM, Kristensen SL, Toft G. A comparison of conventional and computer-assisted semen analysis (CRISMAS software) using samples from 166 young Danish men. *Asian J Androl*. 2011;13(3):453-8.
333. Hu YA, Lu JC, Shao Y, Huang YF, Lu NQ. Comparison of the semen analysis results obtained from two branded computer-aided sperm analysis systems. *Andrologia*. 2013;45(5):315-8.
334. Dearing C, Jayasena C, Lindsay K. Can the Sperm Class Analyser (SCA) CASA-Mot system for human sperm motility analysis reduce imprecision and operator subjectivity and improve semen analysis? *Hum Fertil (Camb)*. 2019:1-11.
335. Dearing CG, Kilburn S, Lindsay KS. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Hum Fertil (Camb)*. 2014;17(1):37-44.
336. Kose M, Sokmensuer LK, Demir A, Bozdog G, Gunalp S. Manual versus computer-automated semen analysis. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2014;41(6):662-4.
337. Lammers J, Splingart C, Barriere P, Jean M, Freour T. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(1):35-43.
338. Urbano LF, Masson P, VerMilyea M, Kam M. Automatic Tracking and Motility Analysis of Human Sperm in Time-Lapse Images. *IEEE Trans Med Imaging*. 2017;36(3):792-801.
339. Wei SY, Chao HH, Huang HP, Hsu CF, Li SH, Hsu L. A collective tracking method for preliminary sperm analysis. *Biomed Eng Online*. 2019;18(1):112.

340. Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad M. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology*. 2015;84(8):1367-77.
341. Kobori Y, Pfanner P, Prins GS, Niederberger C. Novel device for male infertility screening with single-ball lens microscope and smartphone. *Fertil Steril*. 2016;106(3):574-8.
342. Holmes E, Bjorndahl L, Kvist U. Hypotonic challenge reduces human sperm motility through coiling and folding of the tail. *Andrologia*. 2020:e13859.
343. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2139-46.
344. Canale D, Giorgi PM, Gasperini M, Pucci E, Barletta D, Gasperi M et al. Inter and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different techniques: layering, swimup from pellet and percoll. *J Endocrinol Invest*. 1994;17(9):729-32.
345. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl*. 2012;14(2):260-9.
346. Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(6):765-70.
347. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:108.
348. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*. 1988;9(6):367-76.
349. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*. 1992;57(2):409-16.
350. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(4):Cd004507.
351. Simon L, Emery B, Carrell DT. Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1166:87-105.
352. Jayaraman V, Upadhy D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(6):557-63.

353. Aitken RJ, Finnie JM, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Kuczera L et al. Potential importance of transition metals in the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2136-47.
354. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C et al. Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques: A Possible New Male Predictive Parameter of Pregnancy? *Medicine (Baltimore).* 2016;95(20):e3624.
355. Björndahl L, Mohammadieh M, Pourian M, Soderlund I, Kvist U. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *J Androl.* 2005;26(2):170-3.
356. Oseguera-Lopez I, Ruiz-Diaz S, Ramos-Ibeas P, Perez-Cerezales S. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:298.
357. International Standards Organization. ISO 15189:2012 Medical Laboratories – Requirements for Quality and Competence. Geneva 2012.
358. Lepine S, McDowell S, Searle LM, Kroon B, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;7:CD010461.
359. Bucar S, Goncalves A, Rocha E, Barros A, Sousa M, Sa R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(1):147-54.
360. Zafer M, Horvath H, Mmeje O, van der Poel S, Semprini AE, Rutherford G et al. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2016;105(3):645-55 e2.
361. Gilling-Smith C, Nicopoullos JD, Semprini AE, Frodsham LC. HIV and reproductive care--a review of current practice. *BJOG.* 2006;113(8):869-78.
362. Savasi V, Ferrazzi E, Lanzani C, Oneta M, Parrilla B, Persico T. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Hum Reprod.* 2007;22(3):772-7.
363. Fourie JM, Loskutoff N, Huyser C. Semen decontamination for the elimination of seminal HIV-1. *Reprod Biomed Online.* 2015;30(3):296-302.
364. Gilling-Smith C, Emiliani S, Almeida P, Liesnard C, Englert Y. Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1433-8.

365. Loutfy MR, Wu W, Letchumanan M, Bondy L, Antoniou T, Margolese S et al. Systematic review of HIV transmission between heterosexual serodiscordant couples where the HIV-positive partner is fully suppressed on antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2013;8(2):e55747.
366. LeMessurier J, Traversy G, Varsaneux O, Weekes M, Avey MT, Niragira O et al. Risk of sexual transmission of human immunodeficiency virus with antiretroviral therapy, suppressed viral load and condom use: a systematic review. *CMAJ*. 2018;190(46):E1350-E60.
367. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, van Lunzen J et al. Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *JAMA*. 2016;316(2):171-81.
368. Del Romero J, Rio I, Castilla J, Baza B, Paredes V, Vera M et al. Absence of transmission from HIV-infected individuals with HAART to their heterosexual serodiscordant partners. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(10):666-72.
369. Mahadevan M, Leeton JF, Trounson AO. Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation. *Fertil Steril*. 1981;36(2):243-7.
370. Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril*. 1954;5(6):520-9.
371. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*. 1953;172(4382):767-8.
372. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949;164(4172):666.
373. Clarke GN, Bourne H, Hill P, Johnston WI, Speirs A, McBain JC et al. Artificial insemination and in-vitro fertilization using donor spermatozoa: a report on 15 years of experience. *Hum Reprod*. 1997;12(4):722-6.
374. David G, Czyglik F, Mayaux MJ, Martin-Boyce A, Schwartz D. Artificial insemination with frozen sperm: protocol, method of analysis and results for 1188 women. *Br J Obstet Gynaecol*. 1980;87(11):1022-8.
375. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*. 2002;57(1):303-26.
376. Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK. Conception with Human Spermatozoa Frozen by Nitrogen Vapor Technic. *Fertil Steril*. 1964;15:501-4.
377. Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(2):134-51.

378. Keel BA, Webster BW. Semen cryopreservation methodology and results. In: Barratt CLR, Cooke ID, editors. Donor insemination. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 71-96.
379. Sherman JK. Cryopreservation of human semen. In: Keel BA, Webster BW, editors. CRC handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. Boca Raton: CRC Press 1990. p. 229-59.
380. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, fertility, and development*. 1995;7(4):871-91.
381. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reproduction, fertility, and development*. 2003;15(7-8):377-81.
382. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):202-6.
383. Guan HT, Zheng Y, Wang JJ, Meng TQ, Xia W, Hu SH et al. Relationship between donor sperm parameters and pregnancy outcome after intrauterine insemination: analysis of 2821 cycles in 1355 couples. *Andrologia*. 2016;48(1):29-36.
384. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2006;86(3):721-2.
385. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril*. 2005;84(4):1017.
386. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(1):1-12.
387. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS et al. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(19):1994-2001.
388. Corona G, Minhas S, Giwercman A, Bettocchi C, Dinkelman-Smit M, Dohle G et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2019;25(6):733-57.
389. Kuczyński W, Dhont M, Grygoruk C, Grochowski D, Wołczyński S, Szamatowicz M. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa--a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2109-13.
390. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Ramsay JW. Does the cause of obstructive azoospermia affect the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *BJU Int*. 2004;93(9):1282-6.

391. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):327-39.
392. Li K, Rodriguez D, Gabrielsen JS, Centola GM, Tanrikut C. Sperm cryopreservation of transgender individuals: trends and findings in the past decade. *Andrology*. 2018;6(6):860-4.
393. Starmer BZ, Baird A, Lucky MA. Considerations in fertility preservation in cases of testicular trauma. *BJU Int*. 2018;121(3):466-71.
394. Kamischke A, Jürgens H, Hertle L, Berdel WE, Nieschlag E. Cryopreservation of Sperm From Adolescents and Adults With Malignancies. *J Androl*. 2004;25(4):586-92.
395. Bourne H, Richings N, Liu DY, Clarke GN, Harari O, Baker HW. Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Reproduction, fertility, and development*. 1995;7(2):177-83.
396. Hawksworth DJ, Szafran AA, Jordan PW, Dobs AS, Herati AS. Infertility in Patients With Klinefelter Syndrome: Optimal Timing for Sperm and Testicular Tissue Cryopreservation. *Rev Urol*. 2018;20(2):56-62.
397. Kirkman-Brown JC, Martins MV. 'Genes versus children': if the goal is parenthood, are we using the optimal approach? *Hum Reprod*. 2020;35(1):5-11.
398. Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil Steril*. 2012;98(4):870-5.
399. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*. 1995;346(8968):137-40.
400. Tomlinson M. Managing risk associated with cryopreservation. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1751-6.
401. Perez-Sanchez F, Cooper TG, Yeung CH, al. e. Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. *Int J Androl*. 1994;17(3):115-20.
402. Machen GL, Harris SE, Bird ET, Brown ML, Ingalsbe DA, East MM et al. Utilization of cryopreserved sperm cells based on the indication for storage. *Investig Clin Urol*. 2018;59(3):177-81.
403. Liu S, Li F. Cryopreservation of single-sperm: where are we today? *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):41.

404. Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko E. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology*. 2017;5(6):1055-63.
405. Berkovitz A, Miller N, Silberman M, Belenky M, Itsykson P. A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device. *Hum Reprod*. 2018;33(11):1975-83.
406. Li YX, Zhou L, Lv MQ, Ge P, Liu YC, Zhou DX. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;233:84-92.
407. Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J. V., Isachenko, V., & Isachenko, E. Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86 °C. *Andrologia*. 2012; 44(6):433-435.
408. Schulz, M., Risopatrón, J., Uribe, P., Isachenko, E., Isachenko, V., & Sánchez, R. Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology*. 2020;8(6):1642-1650.
409. Cooper TG, Atkinson AD, Nieschlag E. Experience with external quality control in spermatology. *Hum Reprod*. 1999;14(3):765-9.
410. Cooper TG, Björndahl L, Vreeburg J, Nieschlag E. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int J Androl*. 2002;25(5):306-11.
411. Matson PL. External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Hum Reprod*. 1995;10(3):620-5.
412. Mortimer D, Björndahl L, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. A practical guide to basic laboratory andrology. 1st ed. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; In Press.
413. Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril*. 1990;54(2):308-14.
414. Mortimer ST, Mortimer D. Quality and Risk Management in the IVF Laboratory. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2015:402.
415. Westgard JO. Foreword to the second edition. In: Westgard JO, editor. Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories. Madison, WI, USA: QC Publishing; 2002.
416. Bohring C, Krause W. The intra- and inter-assay variation of the indirect mixed antiglobulin reaction test: is a quality control suitable? *Hum Reprod*. 1999;14(7):1802-5.
417. Kuster CE, Singer RS, Althouse GC. Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology*. 2004;61(4):691-703.

418. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1(8476):307-10.
419. Armitage P, Berry G, Matthews J. Statistical methods in medical research. Oxford: Blackwell Science; 2002:826
420. Motulsky H. Intuitive Biostatistics - A nonmathematical guide to statistical thinking. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2017:608
421. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo W.B. SAUNDERS COMPANY 1999:1917
422. Plaut DA, Westgard JOW. DC external quality assessment. In: Westgard JO, editor. Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories. Madison, WI, USA: QC Publishing; 2002. p. 125-63.
423. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press; 1989.
424. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.
425. Ford WC. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl*. 2010;12(1):59-63.
426. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *The Journal of urology*. 1951;66(3):436-49.
427. Boyd JC. Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian J Androl*. 2010;12(1):83-90.
428. Björndahl L, Barratt CL, Mortimer D, Jouannet P. 'How to count sperm properly': checklist for acceptability of studies based on human semen analysis. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2016;31(2):227-32.
429. Ozarda Y, Sikaris K, Streichert T, Macri J, intervals ICoR, Decision L. Distinguishing reference intervals and clinical decision limits - A review by the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55(6):420-31.
430. Ceriotti F, Henny J. "Are my Laboratory Results Normal?" Considerations to be Made Concerning Reference Intervals and Decision Limits. *EJIFCC*. 2008;19(2):106-14.
431. Gomez E, Aitken J. Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1996;65(4):880-2.

432. Mortimer D, Mortimer ST. Essential features in media development for spermatozoa, oocytes and embryos. In: Quinn P, editor. Culture Media, Solutions and Systems in Human ART. Cambridge: Cambridge University Press; 2014. p. 47-67.
433. Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG. The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, editor. Methods in Mammalian Embryology. San Francisco, CA, USA: Freeman; 1971. p. 86-116.
434. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*. 1985;44(4):493-8.
435. Hotchkiss RS. Fertility in man. London: William Heineman Medical Books; 1945.
436. Eliasson R. Standards for investigation of human semen. *Andrologia*. 1971;3:49-64.
437. Lentner C. Geigy scientific tables. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition. Basle: Ciba-Geigy Ltd; 1981:50.