

# 世界卫生组织关于人类精液检查和处理的实验室手册

第六版



World Health  
Organization

human  
reproduction  
programme **hrp**  
research for impact  
UNDP·UNFPA·UNICEF·WHO·WORLD BANK



# 世卫组织关于人类精液检查和处理的实验室手册

第六版



世卫组织人类精液检查和处理实验室手册，第六版

ISBN978-92-4-003078-7（电子版） ISBN978-92-4-003079-4（印刷版）

### ©世界卫生组织，2021年

保留了一些权利。本工作可在知识共享属性-非商业sharealike 3.0 IGO许可证 (CCBY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>)。

根据本许可证的条款，您可以复制、重新分发和调整该作品的非商业目的，只要适当地引用该作品，如下所示。在任何使用这项工作时，都不应建议世卫组织赞同任何特定的组织、产品或服务。不允许使用世卫组织的标志。如果你调整了工作，那么你必须许可你的

在相同或同等的知识共享许可证下工作。如果您创建了这项工作的翻译，您应该添加以下免责声明和建议的引文：“这个翻译不是由世界卫生组织（世卫组织）创建的。世卫组织不对本翻译的内容或准确性负责。英文原版应为有约束力的真实版”。

有关许可证下发生的争议的调解应遵循世界知识产权组织的调解规则进行 (<http://www.wipo.int/amc/en/mediation/rules/>)。

**建议引用。**世卫组织人类精液检查和处理实验室手册，第六版。日内瓦：世界卫生组织；2021年。许可证：CCBY-NC-SA 3.0 IGO。

**出版中编目 (CIP) 数据。**CIP数据可在<http://apps.who.int/iris>。

**销售、权利和许可。**若要购买世卫组织的出版物，请参见<http://apps.who.int/bookorders>。要提交关于商业使用的请求和关于权利和许可的查询，请参见<http://www.who.int/about/licensing>。

**第三方材料。**如果您希望重用本作品中属于第三方的材料，如表格、数字或图像，您有责任确定是否需要许可，并获得版权所有者的许可。因侵犯工作中任何第三方拥有的部件而产生的索赔风险完全由用户承担。

**一般免责声明。**本出版物中使用的名称和材料的展示并不意味着任何世卫组织关于任何国家、领土、城市或地区或其当局的法律地位，或关于其边界或边界的界定。地图上的虚线和虚线表示可能还没有完全一致的近似边界线。

提及特定的公司或某些制造商的产品并不意味着它们会得到世卫组织的认可或建议，而不是其他未被提及的类似性质的产品。错误和遗漏除外，专有产品的名称以初始大写字母区分。

世卫组织已采取了所有合理的预防措施，以核实本出版物中所载的信息。然而，已出版的材料的分发没有任何形式的保证，无论是明示的还是暗示的保证。对这些材料的解释和使用的责任在于读者。在任何情况下，世卫组织都不得对其使用所造成的损害负责。

Lushomo平面设计

# 内容

来自世界卫生组织.....	vii
确认.....	二、
本手册中使用的首字母缩写和缩写.....	xii
<b>第一章介绍.....</b>	<b>1</b>
1.1 手册范围.....	1
1.2 介绍.....	1
1.3 第六版.....	2
1.4 编写第六版世卫组织实验室手册的方法 人类精液的检查和处理.....	4
<b>第二章：基本考试.....</b>	<b>9</b>
2.1 介绍.....	9
2.2 基本精液检查的时间大纲.....	12
2.3 检查前程序.....	13
2.4 考试和检查后的程序.....	15
2.5 其他信息和意见.....	64
<b>第三章：延长考试.....</b>	<b>83</b>
3.1 多种精子缺陷的指数.....	83
3.2 精子DNA碎片化.....	86
3.3 遗传和基因组测试.....	105
3.4 与免疫学和免疫学方法相关的试验.....	108
3.5 男性生殖道炎症标志白细胞介素的评估.....	116
3.6 射精过程中未成熟生殖细胞的评估.....	118
3.7 精子抗体涂层的试验.....	119
3.8 附属性腺功能的生化分析.....	125
3.9 射精顺序的评估.....	135
<b>第四章高级考试.....</b>	<b>139</b>
4.1 精液氧化应激和活性氧试验.....	140
4.2 顶体反应的评估.....	144
4.3 精子染色质评价.....	149
4.4 精子中的跨膜离子通量和转运.....	152
4.5 计算机辅助精子分析(CASA).....	155
4.6 新兴技术.....	159
<b>第五章：精子制备技术.....</b>	<b>161</b>
5.1 介绍.....	161
5.2 一般原则.....	163

5.3	简单的洗涤.....	164
5.4	直接游泳.....	165
5.5	不连续密度梯度.....	166
5.6	磁性激活细胞分选(MACS).....	166
5.7	准备感染艾滋病毒的精液样本.....	167
5.8	准备睾丸和附睾精子.....	167
5.9	准备逆行射精样本.....	169
5.10	准备辅助射精样本.....	170

## 第六章：精子的低温保存.....171

6.1	介绍.....	171
6.2	精子低温保存的原因.....	172
6.3	人体精液冷冻保存和储存的风险评估.....	174
6.4	Semen低温保存协议.....	177
6.5	玻璃化.....	182

## 第七章：质量保证和质量控制..... 185

7.1	在男科实验室的质量控制.....	185
7.2	射精检查中错误的性质.....	188
7.3	QA方案.....	190
7.4	数值的质量控制图.....	193
7.5	百分比的QC图表.....	197
7.6	评估 $\bar{X}$ 和S图表.....	197
7.7	分析和报告技术人员之间可变性的统计程序.....	199
7.8	外部质量控制和质量保证.....	204
7.9	质量控制的频率和优先级.....	205
7.10	训练.....	206

## 第八章附录..... 211

8.1	对精液检查结果的解释.....	211
8.2	设备和安全.....	214
8.3	基本射精检查的显微镜检查.....	221
8.4	股票解决方案和媒体.....	226
8.5	精液分析记录表格的模板.....	233
8.6	QC材料.....	235
8.7	国家精液分析的外部质量控制方案.....	246

## 第九章：参考文献.....247

# 表列表

表2.1射精量-稀释精子悬液的充分处理.....	20
表2.2一个给定平均值的两个百分比之间的可接受差异（基于95%置信区间），由200个精子的重复计数（总共计数400个）确定.....	26
表2.3重复计数的差异及与结果不确定性的关系的比较.....	33
表2.4根据精子计数计算精子浓度.....	35
表2.5固定和番木瓜染色步骤.....	47
表2.6精子形态分类.....	51
表2.7纸浆板1.....	56
表2.8木瓜糖浆板2.....	58
表2.9木瓜粘面板3.....	60
表2.10木瓜糖浆板4.....	61
表2.11木瓜糖浆板5.....	61
表2.12扫描湿制剂中未检测到的精子的概率.....	66
表2.13离心后未检测到的精子的概率.....	66
表2.14短板.....	73
表2.15扩散快速板.....	76
表2.16循环抽样误差（%）和95%置信区间限制 计算精子总数.....	78
表3.1多种精子缺陷指标的计算表.....	85
表3.2可生育和不育夫妇的男性精子缺陷指数.....	86
表3.3健康可生育能力男性精子染色体二聚体的基本水平.....	107
表3.4进行免疫珠检测需要使用多少精液.....	122
表3.5锌评价的推荐标准.....	127
表3.6果糖评价的推荐标准.....	130
表3.7评价 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的推荐标准.....	133
表7.1质量保证和质量控制的术语.....	187
表7.2一个X的值的计算值图表.....	194
表7.3X的警告和动作限值计算的必要因素图表.....	195
表7.4S图的警告和动作限制的计算.....	196
表7.5质量控制图表的基本控制规则.....	198
表7.6精子浓度（ $\times 10^6$ 由三名工作人员对五个QC样品进行估计）.....	202
表7.7与从每次观察结果中减去精液样本平均值计算的样本平均值的差异.....	202
表7.8计算出的这些差异的平均值、标准差和平均值/标准误差 每个工作人员（n=样本）.....	202
表7.9计算出的这些差异的平均值、标准差和平均值/标准误差 每个工作人员（n=样本）.....	202
表7.10技术人员和QC样品双向方差的F检验.....	203
表7.11IQC程序的主要特征总结.....	203
表7.12QC的时间表.....	206
表7.13QC试验汇总表.....	206
表7.14评价精子浓度时的变异来源（误差）.....	208
表7.15评估精子形态时的变异来源（误差）.....	209
表7.16在评估精子活力时的变异来源（误差）.....	210
表7.17评价精子活力时的变异来源（误差）.....	210
表8.1坎贝尔等人对参考人群的定义。（5）.....	212
表8.2结果（5）分布的数据来源.....	212
表8.3无保护性交导致活产的男性精液检查结果分布。 坎贝尔等人。（5）；可性的第五百分位数（95%置信区间）.....	213
表8.4精液分析报告表单的示例模板.....	233

# 图的列表

图。2.1精液中精子的非特异性聚集.....	21
图。2.2精子凝集程度示意图.....	22
图。2.3评估精子活力的帮助.....	25
图。2.4亮场光学观察伊红黑胶涂片.....	27
图。2.5纽鲍尔裁决得到改进的血细胞计数仪.....	30
图。2.6在网格方形中计算哪些精子.....	31
图。2.7扫描整个覆盖物中是否存在可运动的精子.....	37
图。2.8形态学上的“理想”精子.....	43
图。2.9准备一个正常的精液涂片.....	44
图。2.10人类精子的某些异常形态的示意图.....	50
图。2.11评估人类精子形态的结构化顺序.....	53
图。2.12纸浆板1.....	55
图。2.13纸浆板2.....	57
图。2.14纸浆板3.....	59
图。2.15纸浆板4.....	62
图。2.16木瓜板5.....	63
图。2.17人类精子的典型形态学变化示意图 受低渗透胁迫的影响.....	70
图。2.18低渗透胁迫下精子相衬显微镜下的照片照片.....	71
图。2.19短板.....	72
图。2.20扩散快速板.....	75
图。3.1TUNEL载玻片DNA片段分析.....	88
图。3.2流式细胞术分析碘化丙啶和绿色荧光.....	90
图。3.3具有（完整DNA、箭头）和无晕（碎片DNA、箭头）的精子.....	98
图。3.4彗星分析的精子从一个异常和广泛的DNA碎片和 正常男性缺乏溴化乙锭染色DNA的DNA损伤.....	102
图。3.5在显微镜下看到的彗星，随后用CASP软件评分（尾部DNA=88%）.....	102
图。3.6人精液中的过氧化物酶阳性细胞.....	110
图。3.7精液中的白细胞.....	115
图。3.8分裂射精收集装置的两个例子.....	136
图。3.9正常四分射精结果的图形示例， 显示体积、精子、渐进性运动、锌和果糖的分布.....	137
图。4.1FITC-pna染色的顶体完整和顶体反应的例子， 活的不活的精子.....	147
图。4.2AB阳性(a)和Ab阴性(b)精子的例子 显微镜检查（×1000，油浸式）.....	150
图。4.3CMA3阳性(a)和CMA3阴性(b)精子的示例（左图）.....	152
图。4.4由CASA系统测量的变量的标准术语.....	157
图。4.5不同CASA应用程序的图形表达式示例.....	160
图。7.1一个X基于表7.1中的数据绘制的图表.....	195
图。7.2精子浓度的S值图.....	197
图。7.3人工和CASA估计的Bland-Altman精子活力进展百分比图.....	200
图。7.4精子浓度估计的尤登图.....	201
图。8.1根据转子半径和转速确定离心力的离线图.....	218
图8.2一个显微镜的切片.....	222
图。8.3评估精子活力的帮助.....	237
图。8.4十字线（红色网格）.....	239
图。8.5查看显示器上的舞台微米的录像图像和绘制的覆盖层.....	239



# 来自世界卫生组织

获得高质量、以循证为基础、负担得起的保健服务是全民健康覆盖(UHC)的关键，包括性健康和生殖健康。普遍获得实验室服务对于确保有关人口能够避免性健康和生殖健康不良造成的不利健康和社会经济后果至关重要。

世卫组织检查人类精液和精子-宫颈黏液相互作用的实验室手册于1980年首次出版，以应对对人类精液检查程序日益标准化的需要。该手册随后被修订了四次（1987年、1992年、1999年和2010年），并被翻译成多种语言。

本手册是对人类精液进行实验室检查和处理的程序和方法的参考文件，旨在维持和维持来自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，该手册已经成为一个公认的标准，并被世界各地的临床和研究实验室广泛使用。

它不仅是为那些新的精液分析的标准手册，但也为所有处理和检查精液，以确定其参数的临床使用或研究的研究。本手册提供了关于精液检查和临床评估准备、专门检测、低温保存、精液分析实验室的质量控制和男性不育调查中的实验室检查的重要信息。这些措施对于监测对治疗的反应和其他旨在改善男性性健康和生殖健康的干预措施也至关重要。

本手册的第六版将是生育护理所需的实验室程序的最新循证信息的基本来源。这个版本有精液样本制备部分，确定感染标记，计算机辅助精子分析，以及基本的扩展和高级类别。

第六版的实验室检查和处理手册将受益项目旨在改善性和生殖健康，包括生育保健和访问，特别是在男性，从而支持国家的努力实现可持续发展目标3.7（普遍获得性和生殖保健服务，包括计划生育）。该手册还将支持实现可持续发展目标3.8（全民医保覆盖，包括财务风险保护，以及获得高质量的基本卫生保健服务）。

世卫组织和HRP要感谢来自世界各地的许多技术专家，他们对本手册的审查和修订作出了贡献。

**伊恩·阿斯克博士**

**性健康和生殖健康与研究部主任，包括开发计划署/UNFPA/儿童基金会/世卫组织/世界银行人类生殖特别方案**

**世界卫生组织**

# 确认

本出版物是由世界卫生组织的性健康和生殖健康和研究部(包括开发计划署/UNFPA/儿童基金会/世卫组织/世界银行人类生殖研究、发展和研究培训特别方案-HRP)编写的。我们非常感谢以下个人参与了本手册的编写、编辑和修订。

## 主编:

拉尔斯·约翰达尔博士，医学博士，实验室医学男科实验室主任

阿诺瓦，卡罗林斯卡大学医院内分泌科诊所，哈丁格，卡罗林斯卡研究所，瑞典斯德哥尔摩，医学系

## 编辑委员会:

**奥列格·奥波利金教授，医学博士，医学博士**

仙女座

俄罗斯联邦卫生部国家放射学医学研究中心以N. a. 洛帕特金分校命名的泌尿科和介入放射科研究所教授和主任  
莫斯科，俄罗斯联邦

**埃丽莎贝塔·巴尔迪教授，生物学博士**

实验室医学

佛罗伦萨大学实验与临床医学系临床病理学副教授  
负责卡雷吉大学的精液冷冻保存中心(AOUC)  
意大利佛罗伦萨

**克里斯托弗·l. r. 巴拉特博士，FRSE**

邓迪大学生殖医学医学院系统医学教授  
英国邓迪

**马里奥·菲利普·费斯汀博士，医学博士，MHPEd**

妇产科、临床流行病学、卫生专业教育、计划生育

菲律宾大学马尼拉分校医学院妇产科和临床流行病学系教授

菲律宾国立卫生研究院，菲律宾生殖卫生研究小组的召集人

菲律宾马尼拉

世卫组织秘书处顾问

**杰克逊c. 柯克曼-布朗博士，英帝国勋章，博士**

生殖科学，男科，卫生保健科学，生育能力

伯明翰大学医学和牙科科学学院人类生殖科学中心(ChRS)的大学读者和主任

伯明翰的HFEA人员负责人和科学负责人，伯明翰妇女生育中心，伯明翰妇女和儿童的NHS基金会信托基金

英国伯明翰

**多洛雷斯J. 兰姆教授，女士，博士，HCLD(ABB)**

雄尿学/泌尿科，临床化学（国家临床化学注册处）高复杂性实验室主任  
(HCLD，美国生物分析家委员会)Dow泌尿外科教授  
研究部副主席（泌尿外科）

詹姆斯·布坎南·布雷迪基金会泌尿系，英格兰精确医学研究所生殖基因组学中心主任

威尔康奈尔医学院

美国生殖医学协会

**迈克尔·米比什沃博士，博士**

男科和生殖流行病学

津巴布韦大学生殖健康科学国家主任/人口理事会生殖健康科学副教授

赞比亚卢萨卡

**教授。斯蒂芬·施拉特博士，博士**

生殖生物学，男科

德国明斯特大学生殖医学和男科中心的大学教授兼主任

世卫组织的男性生殖研究合作中心

**伊戈尔·托斯金博士，医学博士，医学博士，DSc**

公共卫生、性传播感染、艾滋病毒/艾滋病、泌尿科、皮肤病学、流行病学、性健康和生殖健康

世界卫生组织性健康和生殖健康及研究部的科学家

瑞士日内瓦，世卫

组织秘书处

**王博士，医学博士**

加州大学洛杉矶分校大卫·格芬医学院内分泌学、男科（男性生殖和避孕）医学教授

加州大学洛杉矶分校医学中心和昆奎斯特研究所内分泌科

美国加州托伦斯市

**贡献者**

**马萨诸塞州马萨诸塞州马萨诸塞州卡雷尔金底尔市**

艾滋病毒/性传播感染的预防和性健康

比利时根特大学医学与健康科学系的博士学生

世卫组织秘书处顾问

**多博士。Petr豪斯卡**

实验室医学

卡罗林斯卡大学医院内分泌科诊所和卡罗林斯卡学院哈丁格医学院的博士生

瑞典斯德哥尔摩

## 马里兰州斯蒂潘·克拉斯尼亚克博士

泌尿外科仙女座

泌尿学和干预性放射学研究所男科与人类生殖系副科学家。俄罗斯联邦卫生部放射学国家医学研究中心的洛帕特金分会  
莫斯科，俄罗斯联邦

该团队要感谢伊恩·阿斯基瓦、詹姆斯·基里和塔博·马萨森在该部门的会议和讨论中给予的支持。

特别感谢夫人。娜塔莉·纳尔基·毛勒，世界卫生组织性健康和生殖健康与研究部的助理和秘书，瑞士日内瓦。

我们非常感谢苏珊·诺里斯、丽贝卡·托马斯和伊恩·大卫·科尔塔特的支持、建议和帮助。

特别感谢前世卫组织工作人员世界博士。柯尔斯滕·沃格尔松出色地记录了该手册的以前版本，这促进了最新版本的修订，以及该手册的第五版的编辑，Dr. 特雷弗·库珀，帮助数据和其他项目是重要的新版本的连续性。

世界卫生组织性健康和生殖健康和研究部(包括开发计划署/UNFPA/儿童基金会/世卫组织/世界银行人类生殖研究、发展和研究培训特别方案-HRP)想感谢所有参加公众审查的贡献。

额外感谢：

- 博士。克里斯特夫·布伦克，明斯特大学生殖医学和男科中心博士后科学家（为协助染色方案，取显微照片和平板记录精子病理）
- 博士。Meurig加拉格尔，伯明翰大学系统建模和定量生物医学中心研究员（以帮助撰写精子活力和CASA部分）
- 博士。莫妮卡·穆拉托里，佛罗伦萨大学实验和临床医学系研究助理（感谢协助撰写精子DNA碎片的Tunel协议）
- 博士。萨拉·马尔基亚尼，佛罗伦萨大学实验和临床医学系研究助理（以帮助撰写精子染色质状态评估方案）。



王博士，医学博士

这是世界卫生组织人类精液检查和处理手册的第六版。该手册是过去几年在世卫组织网站上下载量最多的文件之一。

博士。克里斯蒂娜王参与手册自1980年第一版（当时它是世卫组织实验室手册检查人类精液和宫颈黏液交互），仍然是目前第六版的一部分，作为手册的编辑委员会的积极成员。

王博士是加州大学洛杉矶分校大卫·格芬医学院的医学教授。她在医学系的内分泌科和港-加州大学洛杉矶分校伦德奎斯特研究所医学中心的临床和转化科学研究所的现场主任。

博士。王是国际公认的男性生殖医学和生物学研究者，多年来她一直致力于开发一种安全、有效、可逆的男性激素避孕方法、男性激素替代疗法的最佳方法和性腺功能减退男性的新雄激素替代方法。除此之外，医学博士。王一直领导了其他几个有影响的研究项目和倡议——从基础研究和临床试验——旨在改善生殖健康成果。

世界卫生组织想感谢医学博士。王为制定世卫组织人类精液检查和加工手册做出了杰出贡献。她的贡献既确保了在编写手册方面具有高水平的技术专业知识和，也确保了这一重要文件的所有版本的制度连续性。

# 本手册中使用的首字母缩写和缩写

<b>ART</b>	辅助生殖技术
<b>BSA</b>	牛血清白蛋白
<b>bww</b>	比格斯, 惠顿和惠廷汉姆
<b>CASA</b>	计算机辅助精子分析
<b>CASMA</b>	计算机辅助精子形态测量评估CD45 测定簇45 (泛白细胞标记物) CD46 测定簇46 (顶体抗原) CMA3 chromomycin A3
<b>dgc</b>	密度梯度离心
<b>DNA</b>	脱氧核糖核酸
<b>DNase</b>	脱氧核糖核酸酶
<b>dpb</b>	杜尔贝科的磷酸盐缓冲盐水
<b>Dtt</b>	二硫苏糖醇
<b>ebss</b>	厄尔的平衡盐溶液EDTA 乙二胺四乙酸EQA 外部质量评估EQC 外部质量控制
<b>菲特克</b>	异硫氰酸荧光素
<b>盖克</b>	glycerol - egg yolk - citrate
<b>艾滋病</b>	人类免疫缺陷病毒
<b>hpf</b>	高功率场
<b>hsa</b>	人血清白蛋白
<b>htf</b>	人输卵管液
<b>icci</b>	胞浆内精子注射
<b>Ig</b>	免疫球蛋白
<b>iqc</b>	内部质量控制
<b>iu</b>	国际单位
<b>iui</b>	宫内授精
<b>体外受精</b>	体外受精
<b>na</b>	数值孔径
<b>QC</b>	质量控制
<b>SEBSS</b>	补充了厄尔的平衡盐溶液
<b>sd</b>	标准差
<b>sDF</b>	精子DNA片段SOP 标准操作程序TZI 黄斑精子症指数
<b>世卫组织</b>	世界卫生组织



# 第一章介绍

1.1 手册范围.....	1
1.2 介绍.....	1
1.3 第六版.....	2
1.4 编写世界卫生组织第六版检查实验室手册的方法 以及人类精液的加工过程.....	4

## 1.1 手册范围

该手册的总体目的是描述射精检查的实验室方法，以有助于全球改善男性生殖功能的评估和男性因素生育能力低下的治疗。

这里提供的方法不仅可以作为男科实验室的标准操作程序，而且可以用于任何进行精液检查的实验室。第2章所述的基本方法在实验室中采用和实践时，可以提高许多实验室的精液检查质量和结果的可比性。后续章节中描述的扩展精液评估方法和研究测试包括给需要关于精子和男性生殖器官功能能力的更多信息的技术人员、科学家和临床医生。这些信息可能有助于调查男性因素的低生育能力，以及在使用男性避孕方法期间监测精子参数和在关于男性生殖健康的流行病学研究中监测精子参数。

## 1.2 介绍

世界卫生组织检查人类精液和精子-宫颈黏液相互作用的实验室手册于1980年首次出版，以应对对人类精液检查程序日益标准化的需要。该手册被修订了四次（1-5），被广泛阅读并翻译成多种语言。事实上，在过去的40年里，该手册成为了一个公认的标准，被世界各地的临床和研究实验室广泛使用。它不仅是那些新的精液分析的程序指南，而且是所有处理精液并需要分析和定义临床实践或临床和流行病学研究的精子参数的参考文本。

精液检查很重要，原因不同：

- 评估男性生殖功能和生殖道通畅，对男性生育低下进行适当治疗，并监测治疗反应；
- 不孕夫妇对生育潜力的评估及适宜治疗方式的选择



- 测量男性避孕措施的效果。输精管闭塞和干预措施，包括激素男性避孕和其他潜在的方法)。

男性的临床评估和精液分析可以指导临床医生确定如何继续进一步的调查和管理低生育能力的夫妇。本手册的前一版提供了通常测量的精子变量的参考范围，基于男性精液参数的特征数据。这些值的分布是根据临床化学中定义的参考范围的标准方法来定义的，但重要的是，它们不能作为可生育和亚生育男性（6）之间的不同限制。虽然精液和精子参数不是来自许多地理区域，允许大多数人群的代表性，但这些值的分布已经在全球范围内使用。此外，许多已知和未知的女性因素阻碍了仅使用精液检查参数来预测自然或辅助受精夫妇的预后的价值。使用多个参数（7-9）可以获得更好的预后价值。目前的精液检查方法可以提供许多答案，但有许多问题需要其他调查（10）对于个别患者，精液分析从来不是生育能力的预后，因为是夫妇的生育潜力将他们定义为可生育或低生育能力。

尽管以前的手册取得了成功，但很明显，以前的版本并没有提供实验室技术人员或科学家在实验室执行一步一步的精液检查程序的最佳格式。此外，在过去的10年里，许多新的基于精子的测试已经被验证用于临床和研究目的，应该在手册中讨论。在这些考虑的促使下，世界卫生组织在秘书处秘书处的支持下设立了一个编辑委员会，以审查手册中所述的所有方法，以便批准、改变或更新这些方法。当使用手册中描述的方法获得足够的数据，或未在多个实验室进行验证时，编辑委员会在评估相关文献后形成了共识立场。此外，对假定可生育男性的精液和精子参数的结果分布进行了最新审查，尽可能包括来自所有人群的数据。

由于缺乏关于将精液样本送到实验室时应进行分析的顺序的明确说明，导致一些实验室使用其他资源中描述的方法。其他实验室开发了自己的版本的这些方法，同时仍然声称执行精液分析根据世界卫生组织手册（11）使全球比较容易，这个新版本的手册因此包括一步一步的程序和检查表，以确保它是实验室技术人员和科学家用户友好的。

## 13 第六版

第六版包括三个部分：精液检查（第2、3、4章）、精子制备和冷冻保存（第5和第6章）以及质量评估和质量控制（第七章）。精液检查程序分为三章：基本检查，这是确定精液变量的可靠常规程序，不仅是男科，而且任何进行精液检查的实验室都可以遵循；扩展分析，在某些情况下可以通过实验室的选择或临床医生的特殊要求使用；以及目前不被视为使用的常规检查





对一个低生育能力的男性的初步评估。由于精液培养不是在男科实验室进行的，这只在无菌精液收集部分中提到。关于精子准备的部分超出了射精，包括从睾丸和附睾中获得的精子。值得注意的是，人类宫颈粘液测试从这个新版本中消除，因为它们不再在临床实践中使用。这个新版本是作为一个易于遵循的程序手册的那些进行精液检查，背景信息和基本原理与程序的描述分开。

这第六版的主要特点概述如下。

- 关于精液检查的章节包括如何逐步进行程序，计算和解释，以便任何给定的方法基本是完整的，与手册的交叉引用其他部分。

- **基本考试**

- **精子数量评估:**

- 精液稀释度已经被简化，但每个重复应该计数200个精子。
    - 重要的是，实验室不会像过去版本中建议的那样，停止评估低浓度（200万/毫升）的精子数量，但报告了较低的浓度，注意到与计算少量精子相关的错误可能非常高。本章中描述的其他方法可能是必要的，以提高非常低的精子数量的准确性和精度。
    - 每次射精的精子总数（精子输出量）比精子浓度有更多的诊断价值，但为此，必须准确地测量精液体积。
    - 评估无精子症的部分被保留，离心程序和使用活精子染色也包括作为检测非固定样本中的精子的方法，用于评估输精管结扎术后的精液或当避孕药显著抑制精子输出时。

- **精子运动评估。**由于快速进行性精子的存在（或缺失），精子活力的分类已经恢复到快速逐渐运动、缓慢运动、非逐渐运动和不运动(a、b、c或d级)是临床上重要的（12）。

- **精子形态评估。**本文描述了使用系统的方法来评估精子形态的程序，并应该遵循它。在这个版本中，包括更多和质量更好的精子显微图从未处理的精液样本被认为正常，边缘或异常，并解释为什么每个精子被分类的方式。这将有助于培训技术人员始终一致地定义精子形态的细微特征。

- **延长考试。**本章进行了广泛的修订，目前不仅包括检测白细胞、未成熟生殖细胞、精子抗体、多个精子缺陷指标、附属器官功能的生化分析的程序，还包括检测精子非整倍体和精子遗传学以及DNA片段的方法。



- **高级考试。**本节包括被归类为非常专业的考试，以及主要是研究方法和其他新兴技术。本章作了广泛的修改。过时的试验，如人类卵母细胞和人类透明带结合和仓鼠卵母细胞渗透试验已被删除。这些测试的描述可从第五版中获得。本版的研究测试包括对活性氧和氧化应激、膜离子通道、顶体反应和精子染色质的评估。计算机辅助精子分析(CASA)已被重写，以描述CASA的原理及其作为一种研究技术的应用。此外，利用精子运动或光变化的新方法可能构成不需要显微镜就测量精子活力的基础。
- 更新了关于精子制备和精子冷冻保存的章节。
- **质量控制。**本章已被修改，便于非统计学家使用。精液检查的严格质量维护是分析方法稳健的必要条件。应实行内部和外部的质量程序。对在质量控制结果不令人满意的时候如何提高实验室性能提出了建议和建议。
- **决策限制比参考范围和参考限制更准确。**假定生育男性的结果分布不足以建立临床有用的决策限制。描述参考人群（伴侣怀孕时间或少于12个月的男性）的精液特征的数据已被修订（第221页第8.1节）。我们纳入了以前没有报道过的数据和来自更多样化的人群，这些分析验证了手册第五版中定义的结果的分布。来自人口的数据分布呈单边间隔（参考人口数据的极端值），尽管这些百分位数并不代表生育和亚生育男性之间的明显限制。

## 14 编写世界卫生组织第六版人体精液检查和处理实验室手册的方法

作者：马里奥·菲利普·R. 费斯蒂恩和伊戈尔·托斯金

*世界卫生组织关于人类精液检查和处理实验室手册现已出版第六版。第五版自2010年出版以来一直是世卫组织最受欢迎的出版物之一，甚至近年来下载量仍在稳步增加（2018年为95975份，2019年为120 803 份，2020年为132 765份）。*

它一直是男科实验室使用的标准手册，但也是全球其他实验室进行精液分析、诊所和研究机构。到2021年，它已经在3000多篇同行评审的论文和评论中被引用。该手册已在国际大会和科学会议以及世卫组织合作中心、专业协会和其他学术机构的培训方案中分发。

对于本修订版，该过程包括以下内容。手册秘书处由世卫组织生殖卫生和研究部(RHR)召集，



根据之前编辑团队的列表，并与部门的合作机构协商。一份拟定编辑委员会成员名单的计划。

下一版的可能贡献者列表来自于对男科会议上的演讲者的扫描，对第五版手册的贡献者的回顾，以及对同行评议的关于男科和精液分析的全球医学文献的扫描。最终选择的基础包括关于精液分析的研究和实践的跟踪记录、同行评审的出版物和国际公认的技术专业知识，并在临床实践和实验室经验之间取得平衡。有人试图获得机器人学家、实验室专家、泌尿科医生、科学家、流行病学家等人之间的平衡。

一个由8人组成的核心编辑团队，在需要的时候组建更大的作家团队。核心编辑团队的选择是基于近年来与该部门的积极合作和以往关于精液手册的经验。核心编辑团队根据需要提名了较大的贡献者团队的其他成员。不向编辑委员会成员或贡献者提供酬金或费用。

一旦核心编辑名单最终确定，世卫组织邀请他们成为编辑委员会的成员，并有具体的职权范围。他们的简历、个别协议和可能发生的利益冲突声明已提交并存档。大多数通信最初将通过电话会议，后来还包括在日内瓦或其他地方举行的面对面会议。

8个核心编辑小组的建议任务是：

- 根据需要，建议加入贡献者团队的其他成员
- 设置选择一般贡献者的标准
- 确定要进行修订或更新的主题
- 设计界定本版本的过程。

世卫组织检查和处理人类精液实验室手册的编辑会成员如下：

- 奥列格·奥波利金-<https://ecuro.ru/en/node/3485>
- Baldi-<https://www.unifi.it/p-doc2-0-0-A-3f2a3d2a393028.html>
- 克里斯托弗·巴拉特<https://www.dundee.ac.uk/people/christopher-barratt>
- 拉尔斯酒吧-<https://ki.se/en/people/larsbjor>
- 杰克逊·柯克曼-布朗  
[www.birmingham.ac.uk/staff/profiles/metabolism-systems/kirkman-brown-jackson.aspx](http://www.birmingham.ac.uk/staff/profiles/metabolism-systems/kirkman-brown-jackson.aspx)
- 多洛雷斯的羔羊-<https://urology.weillcornell.org/dolores-lamb>
- 迈克尔·米比什沃-<https://www.popcouncil.org/research/expert/michael-mbizvo>



• StefanSchlatths: [//www.medizin.uni-muenster.de/cera/cera-forschung/experimentelle-und-translazionale-forschung-zum-hoden/arbeitsgruppe/univ-prof-dr-rer-nat-stefan-schlatt-1.html](http://www.medizin.uni-muenster.de/cera/cera-forschung/experimentelle-und-translazionale-forschung-zum-hoden/arbeitsgruppe/univ-prof-dr-rer-nat-stefan-schlatt-1.html)

• 克里斯蒂娜·王-<https://lundquist.org/christina-chung-lun-wang-md>

在世卫组织的手册秘书处包括伊戈尔·托皮和马里奥嘉年华。

增加了额外的成员，以支持编辑团队的高级成员，并将被认可为贡献者：

- Petr豪斯卡
- StepanKrasnyak
- 服装金发女郎。

其职权范围包括：

- 审查程序的分类和介绍，以提高技术人员之间的理解力；
- 准备一个对插图和照片的更清晰的展示；
- 优化目前插入主文本中的内容，在主文本中的内容的使用；
- 验证和更新上一版本的参考标准值。

世卫组织RHR秘书处咨询了世卫组织指南审查委员会(GRC)的协商，该委员会决定是否需要遵循指南的文件、审查和批准程序。在审查后，GRC指出，该手册的以前版本已经讨论了如何收集和准备标本，如何分析标本和解释，包括数量、形态、运动性和其他特征的参考值。对于是否、何时以及如何治疗异常，没有任何建议。

本手册只提供了进行实验室检测和检查的标准化程序，因此没有提出临床或实践建议，这超出了GRC所提到的本手册的范围。有人建议，手册中的结论和信息仍然基于现有的最佳证据，包括现有的引用。该手册必须符合世卫组织文件编制和出版的标准，包括《利益冲突声明》、外部委员会的管理、世卫组织的风格、审查过程等。它必须与世卫组织目前的不孕症和避孕管理指南联系起来。该手册将保留其描述程序和如何为参考值制定当地标准的目标。世卫组织收到了GRC的确认，即该手册目前的格式不使其成为指南，也不需要其批准或批准。

同样在世卫组织，还与实验室标准部进行了适当的沟通，以指导内容和程序，特别是关于手册中标准的制定。



世卫组织生殖卫生和研究部的文件委员会获得了规划许可，并在文件完成后，在发表前获得了行政许可。在编写手册中审查和讨论的其他出版物将由编辑会决定和同意。

编辑核心团队确定了有关影响精液参数的因素的可能主题。作为该手册准备工作的一部分，对有关具体研究问题的文献进行了回顾。如果讨论了某些问题或主题，则应根据协商一致意见或公开投票作出决定。为方便数据共享、审核和更新的过程，建立了一个电子平台。编辑团队还考虑了从手册的当前版本中包括、修改或删除的其他主题。已就格式、需要纳入的主题、需要排除的主题和时间表作出了几项决定。2017年至2020年，举行了一系列电话会议、个人和团体电子邮件交流，以及两次面对面会议。

需要对某些已确定的主题进行文献综述。这支持了编辑委员会关于可能存在一些不确定性的话题，要么是因为它们是最近的技术发展，要么是由于缺乏证据或经验。这些都是讨论要作出的一些重要决定的基础。其中需要审查的一些主题包括：

- 评估精子质量的较新程序；以及
- 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（作为手册的一部分或作为单独发表的综述论文）。

为每一章和完整的手册准备了时间表。它们包括：

- 概述各章节的内容
- 提交初稿
- 由编辑核心小组进行评审
- 第二份提交草案
- 由编辑核心小组进行评审
- 主编批准
- 由主要编辑审查所有章节的一致性
- 世卫组织内部审查
- 其他男科或精液分析技术专家的外部评审
- 公开审查（作为编制世卫组织文件的标准程序的一部分）
- 在整理和综合所有审查和意见后最终定稿。



来自世界卫生组织所有6个区域的43个国家的专家参加了公开审查。

虽然手册附录描述了伴侣在尝试后12个月内怀孕的男性的结果分布（第211页第8.1节），为了更详细地描述重新检查和更新参考分布的努力，由单独的作者组编写了一篇单独的论文，其中包括编辑委员会的一些成员，并提到了附录8中提到的关键结果（见下文参考文献）。超出本手册范围的其他主题也将单独发表，包括对新兴技术的景观分析。

参考参考值分布文件：

坎贝尔MJ，洛蒂F，巴尔蒂E，施拉特，嘉年华MPR，蟾皮I，巴拉特CLR。精液检查结果分布2020-2010年世界卫生组织精液分析手册数据。男科。2021May；9（3）：817-822. doi：10.1111/andr.12983. Epub20213月17日。





## 第二章： 基本检查

2.1 介绍.....	9
2.2 基本精液检查的时间大纲.....	12
2.3 检查前程序.....	13
2.4 考试和检查后的程序.....	15
2.5 其他信息和意见.....	64

基本检查是指任何调查人类射精的实验室都应该进行的检查。这里描述的技术旨在提供最高可靠性和最实际执行的最佳组合。虽然可能有具有类似结果的替代技术，但必须使用可比较的方法来实现临床和科学的标准化。这种方法为男性生殖保健背后的科学的适当发展提供了基础。

“

如果结果要提供可靠的信息，就必须使用适当的标准化程序来评估射精收集和检查的所有方面。

”

### 2.1 介绍

与大多数其他为诊断或随访治疗而检查的身体分泌物相比，射精是一种异质的混合物，在被排出之前体内不存在。射精是由精子的浓缩悬浮液产生的，储存在配对附睾，混合，并稀释，主要是前列腺液在尿道，然后排空精囊的分泌（13），因此，顺序射精组分不平等组成。比较输精管结扎术前和后射精体积，约90%的体积由附属器官（14）的分泌物组成，主要是前列腺和精囊，小尿道（Cowper）腺和附睾贡献较小。

射精有两个主要的可量化的属性。

- 精子的数量反映了睾丸产生的精子、睾丸后导管系统的通畅、附睾平滑肌收缩和血管扩张体主动运输精子的功效



尿道，勃起和射精效率排出精子的射精。后一个方面受到性唤起持续时间和质量的影响，并通过神经信号影响平滑肌细胞（血管、腺体、膀胱括约肌）以及平滑肌细胞控制血液流出阴茎的勃起组织和小海绵肌和会阴肌肉。

- 由各种附属腺体贡献的液体体积反映了腺体的分泌活动和随后挤压每个腺体的平滑肌收缩。这些活动是对由性唤起引起的自主神经刺激的反应，并作为射精的准备。

精子的性质（它们的活力、运动性和形态）和射精液的组成对精子的功能也很重要。然而，在体内和体外发生的射精液中，精子接触射精液的情况存在显著差异。

由于性交，最初射精中富含精子的前列腺部分很可能接触到延伸到阴道（15）的宫颈粘液，而与射精的其他部分没有任何显著的接触。相比之下，在实验室环境中，整个射精被收集在一个容器中，在那里精子被困在一种由精泡来源的蛋白质发展而成的凝胶中。在体外，这种凝胶随后被前列腺蛋白酶的作用所液化，在此期间，它的渗透压上升（13, 16-18）。

有证据表明，射精的总体积和精子含量因产生射精产生的情况而不同。射精产生的手淫和收集容器在实验室附近的房间可能导致产量低于那些恢复非受精避孕套在家里性交（19）这差异可能反映了不同的性唤起，因为花的时间生产样本通过手淫也影响射精体积和内容（20）。

在给定的收集条件下，射精特征取决于通常不能改变的因素，如睾丸产生精子、附属器官分泌物和最近（特别发热）疾病，以及其他因素，如停止射精，在解释结果时应记录和考虑。

射精特征的实验室测量结果将取决于以下几点。

- 是否收集到一个完全的射精。在射精过程中，排出的第一个部分主要是富含精子的前列腺液，而后面的部分主要是精囊液（13），因此，失去射精的第一个（富含精子的）部分比失去最后一部分对分析结果的影响更大。
- 副性腺的活动，其液体稀释射精时浓缩的附睾精子（21）因此，精子浓度不是直接测量睾丸精子输出，因为它受其他器官分泌功能的影响。因此，射精的精子总数（精子浓度乘以精液体积）更好地反映了产生精子的能力（22）。例如，精子的浓度在





年轻男性和老年人的射精可能是相同的，但总精子数量可能不同，因为精液的体积和总精子输出量都随着年龄的增长而减少，至少在某些种群(23)中是这样。

- 从检查的射精到最近一次射精之间的时间（射精禁欲的时间-“禁欲时间”，有时不太具体地称为性禁欲）。精子在附睾中积累，直到它们装满，然后溢出到尿道并用尿(24,25)冲洗出来；由于附睾从未被一次射精(24)完全排空，一些精子从上次射精时仍然存在。这影响精子的射精(26)精子活力和染色质不受增加长度禁欲(27,28)除非附睾功能干扰(29)此外，广泛的研究来确定精子的日常生产表明，每天2-3天的射精需要耗尽精的附睾存储(30,31)因此，建议，基于临床经验，要求男性收集射精检查2-7天禁欲后可能导致正常和亚生育结果之间的变异和一个模糊的限制。... 这种影响的程度很难确定，也很少被考虑。

影响射精的主要患者因素将包括：

- 睾丸的大小，它影响每天产生的精子总数，从而间接输出每次射精的精子总数(2,32-34)。睾丸的大小反映了生精能力的水平，这也与精子形态(35)有关。
- 内分泌状态(36)
- 他正在服用的药物。例如，精子从附睾到尿道的运输依赖于游离血管中平滑肌细胞中-1受体的激活。使用甲型受体阻滞剂（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)抗抑郁药进行治疗。舍曲林、氟西汀、阿米替林)可抑制输精管运动(37)和辅助性腺排空。
- 补充物或非处方药物，如合成代谢类固醇。

这些可变的和很大程度上无法控制的因素导致了(38,39)个体之间众所周知的精液组成的差异。

有证据表明，一次射精检查的结果足以决定男性(9)不孕症调查的后续步骤。另一方面，为了确定一个人的确切基线，可能有必要检查两次或三次射精(40-44)。

虽然对整个射精精子群体进行的测量不能确定少数到达受精部位的受精能力，但射精分析仍然提供了关于个体生殖器官功能状态的基本信息。如果结果要提供可靠的，即有效和有用的信息，就必须使用适当的标准化程序对射精收集和检查的所有方面进行评估。方法



本章中描述的是构成精液评估的基本步骤。

## 2.2 基本精液检查的时间大纲

基本的精液检查包括以下步骤（这将在随后的章节中详细描述）(45, 46)。

### 2.2.1 准备工作。预检查程序

预检查程序包括：

- 患者信息
- 样本收集
- 样本接收
- 初始样品处理。

#### 2.2.1.1 在前5分钟-初始样品处理

由于实际原因，在预检查前阶段通过称重确定样品量比较方便。

- 按重量测量精液体积，最好可以在收到样品时和液化前进行。
- 允许液化发生的时间（通常不超过30分钟）。

### 2.2.2 检查程序

射精检查的程序分为：在没有引入实验室诱发异常的风险的情况下不能延迟的评估，以及那些可以在以后进行而没有这种风险的评估。这使得实验室能够在不危及检查质量的情况下组织一个有效的工作流程。

#### 2.2.2.1 射精后30到60分钟

- 评估精液的液化和宏观外观。
- 准备一种湿制剂来评估显微镜外观、精子活力和评估精子浓度所需的稀释度。
- 测量精液pH（如有需要）。
- 评估精子活力（如果运动细胞的百分比较低）。
- 制作稀释剂以评估精子浓度。



- 制作涂片以评估精子形态，并固定涂片。
- 进行混合抗精子抗体反应(MAR)试验（如需要）。
- 评估白细胞的存在（如果需要）。
- 离心机精液等分物（如果要检测生化标志物）。

### 2.2.2.2 射精后3小时内

- 确定精子浓度（可以晚进行，最好当天进行）。
- 将样品送至微生物学实验室（如有需要）。

### 2.2.2.3 晚些时候，在同一天或第二天

- 染色和评估涂片上的精子形态。
- 辅助腺体标记物的生化分析（可选）。

## 2.2.3 检查后程序

- 计算
- 结果表示
- 批准要发布的结果。

## 2.3 检查前程序

本节介绍在开始实际分析之前的所有必要步骤。

### 2.3.1 患者信息

- 应就收集精液样本给予明确的书面和口头说明。临床医生应该向病人提供同样的信息。
  - 主要的建议是通过手淫来收集射精。
    - 不建议中断性交，仅由于有不完全收集和阴道液和细胞污染的风险而在特殊情况下使用。
    - 特殊避孕套生育调查可能是一个替代在特殊情况下，但整个射精无法检查，和标本可能被接触阴茎的皮肤，在某种程度上也阴道液体和细胞外面的避孕套。避孕性避孕套不能使用，因为



精子剂的存在。普通的乳胶避孕套不能用于精液收集，因为它们含有干扰精子（47）运动的药剂。

- 应避免使用润滑剂，因为它们可能会污染射精并改变其性质。如果绝对必要，必须使用经验证的非精子毒性润滑剂。
- 射精需要完全收集，男性应该报告样本的任何部分的任何损失。
- 射精应在至少2天和最多7天后收集。
- 为了避免精液暴露于温度波动下，并控制收集和分析之间的时间，建议在靠近实验室的私人房间里收集样本。理想情况下，调查应在收集后30分钟内开始，但至少应在60分钟内开始。
  - 当然，个别例外可能是必要的，每个人都应该就可能性和风险提供适当的建议。
  - 如果不在实验室附近收集，运输不得允许样品温度低于20° C或37° C以上。
  - 如果病人因任何原因必须在另一个地方收集射精，标本容器应保持在衣服下靠近身体——例如，在腋窝，最好在收集后30分钟内和至少在收集后50分钟内送到实验室。

### 2.3.2 样本收集

- 在收集射精前，标本容器应保存在20° C~37° C之间，以避免可能影响精子的温度发生较大变化。
- 标本容器应为清洁的大口塑料容器，来自经确认对精子无毒的批次（第67页第2.5.10节）。
- 样品容器以及相应的手工工作表必须标明标识符，结合样品接收程序和进一步处理程序，消除样品和工作表混淆的风险。集装箱标识的法律要求可能有所不同。它可以是该男子的姓名和识别号码，收集的日期和时间，或唯一的样本识别号码。
- 接收样品时应记录以下信息，并提交在最终报告中（第233页第8.5节）：
  - 那个人的身份。姓名、出生日期和个人代码），理想情况下，他确认样本是他自己的；
  - 之前的射精禁欲的时间；
  - 收集的日期和时间；



- 样品的完整性和生产样品的任何困难。如果未在实验室进行收集)；和
- 射精体积。
- 特殊情况适用于某些特殊情况：
  - 辅助生殖或冷冻收集（第68页第2.5.11节）
  - 微生物用无菌收集分析（第68页第2.5.12节）。

### 2.3.3 初始样品处理

- 收集的射精应允许在没有不必要的延迟下液化，最好在37° C的培养箱中，如果可能的话，在轨道混合平台上，以促进样品的液化和混合。
- 从收集到开始射精检查时的时间应在宏观评估开始时记录，并在最终报告中提出。最好在收集后30分钟内开始评估，收集后不超过60分钟。
  - 长期在体外暴露于液化射精液会影响运动和形态等质量。
- 射精液中可能含有危险的传染源。人类免疫缺陷病毒(HIV)、肝炎病毒或单纯疱疹病毒)，因此应作为一种生物危害加以处理。应严格遵守第214页第8.2节所述的安全指南；良好的实验室实践是实验室安全（48）的基础。

## 2.4 考试和检查后的程序

### 2.4.1 射精量评估

精确测量体积在任何射精评估中都是必不可少的，因为它提供了辅助性腺分泌功能的信息。对于计算射精总数、射精中射精中的非精细胞总数和生化标记物的总量，一个可靠的射精量评估也是必要的。

#### 2.4.1.1 按重量计算的体积

体积最好是通过称重已经收集它的容器中的样品来测量的。这优选在接收射精容器进行孵化液化前进行。其他方法也引入了更大的不准确性 (Cooper et al., 2007)。



1. 使用一个预先称重的容器来收集射精，并在容器和盖子上注明重量。
  - 空的样品容器通常有不同的重量，所以每个有盖子的容器应单独预称重。在给患者之前，应用永久标记笔将重量记录在容器及其盖子上。如果使用标签，例如，对于标识标记，它们的权重应该包含在空权重中。无菌容器不应该，也不需要打开。
2. 称重一下带有射精液的血管。
3. 减去空容器的重量。
4. 根据样本重量计算体积，假设精液密度为1g/ml (Augeret al., 1995)。(据报道，精液密度在1.03~1.04g/ml (49)、1.00和1.01g/ml (50)之间，平均为1.01g/ml (51))。

## 2.4.2 宏观评价

宏观评估包括一些重要的观察结果，这些观察结果可能无法以准确的数值进行评估——因此由传统的定量方法控制——但仍然具有重要的临床重要性。

### 2.4.2.1 射精的宏观外观

正常的液化射精具有宏观均匀，奶油/灰白色的外观。如果精子浓度很低，它可能看起来不那么不透明；颜色也可能是不同的。较长时间禁欲后略呈黄色，有红细胞时呈红褐色（血精子症），黄疸或服用某些维生素或药物的患者呈更清晰的黄色。如果射精看起来粘性，完全清晰和无颜色，那么可能只从考伯腺体，男性在觉醒期间产生不同的数量；在这种情况下，这应该与患者讨论，以确定是否发生了高潮相关的射精。

### 2.4.2.2 液化

射精后立即进入收集血管，射精通常是一个半固体凝固块或凝胶状团块。通常在室温下，射精在几分钟内开始液化（变得更薄），此时在液体中会看到半固体块的不均匀混合物。随着液化的继续，射精变得更加均匀，更含水，但仍然比水的粘度高于水。在液化的最后阶段，只剩下小部分凝血。

37° C的温度将有利于液化。此外，样品容器的缓慢旋转运动将有助于完成液化。如果在液化过程中不使用移动托盘（轨道混合器），则必须在开始进行宏观液化评估之前缓慢旋转容器15-30秒。



射精通常在室温下15-30分钟内实现完全液化。

- 如果30分钟内液化，应记录，并在最终报告中注明。射精可以在37° C中再持续30分钟。
- 如果60分钟后液化不完成，这也应包括在最终报告中。
- 正常的液化射精可能含有一些果冻状颗粒（凝胶状体），它们不液化，似乎没有任何临床意义。黏液链的存在可能会干扰射精检查，因此应该在最终报告中注意到。

关于液化问题的更多信息将在本章的最后一部分中提供。

### 24.23 邻接粘度

液化后，射精的粘度可以通过轻轻吸入一个宽孔（直径约1.5mm）的塑料一次性移液管（验证为对精子无毒，如果需要，无菌），使精液通过重力下降，并观察任何线的长度。

正常的液化射精是小的离散下降。如果粘度异常，滴将形成超过2厘米的螺旋纹。

### 24.24 邻接气味

不同个体感知人类射精正常气味的能力有相当大的差异。（45）强烈的尿液气味或腐败的信息具有临床重要性；因此，在报告中注意这一点是很重要的。

### 24.25 邻接pH

射精时的pH取决于酸性前列腺分泌和碱性精囊分泌的相对贡献。在射精中，没有有效的控制液体的pH。在体外，CO<sub>2</sub>会持续损失，这导致了pH的逐渐增加。射精pH的临床价值较低。如果要评估pH，应在统一的时间进行，最好是在收集后30分钟，但无论如何，应在射精后1小时内进行。

对于正常样品，应使用6.0-10.0范围内的pH试条。

1. 将精液样本混合均匀。
2. 将一滴精液均匀地涂抹在pH条上。
3. 等待浸渍区域的颜色变均匀（<30秒）。
4. 将颜色与校准条进行比较，以读取pH。



pH值低于7.2可能表明缺乏碱性精液。这也可能是由于尿液污染。

## 2.4.3 显微镜研究的准备

为了获得可靠的显微镜检查结果，必须使所检查的等分物能够代表整个射精。液化射精的性质仍然比水更粘稠，这使得取一个具有代表性的精液样本进行分析非常成问题。如果样本不能很好地混合，对两个单独的等分物进行分析不太可能代表整个射精，并在精子浓度、活力、活力和形态上显示出显著差异。即使液化射精在宏观上是均匀的，小的等分物也可以有非常不同的组成。

### 24.3.1 邻接混合

在取出一部分精液进行任何评估之前，将样品在原来的容器中好好混合，但不要太强烈地产生气泡。可以通过在37°C培养箱中液化期间将样品容器放置在移动的托盘上来实现混合。在没有轨道混合器的情况下，可以通过大约15-30秒的手动旋转来实现基本的混合（第16页第2.4.2.2节）。

### 24.3.2 代表性抽样

虽然液化射精在宏观上看起来是完全同质的，但仍然可能有小但重要的室与不同组成的精子和分泌物。因此，必须做到：

- 使用至少50μl的重复等分物进行稀释，以评估精子浓度
- 使用至少10μl的复制等分来评估精子活力。

这种重复等分物的比较是必要的，以减少由于非代表性样本造成的错误风险。在每种评估技术下都描述了比较的方法。

### 24.3.3 做湿式准备

射精正确混合后立即（第2.4.3.1节），移除适当的体积，不让精子从悬浮液中沉淀。在去除重复的等分物之前，一定要重新混合精液样本。必须对两种不同的新鲜准备的湿准备进行重复运动评估（背景见第65页的湿准备原则）。

1. 将10μl的混合样品放在干净的显微镜载玻片上，该载玻片最好预热到37°C(例如。在样品培养箱中)。
- 注意避免在覆盖物和滑片之间形成和捕获气泡。





2. 放置一个22mm×22mm的覆盖物，小心地水平滴在水滴上。覆盖物的重量会传播样本（因此请使用#1½重量覆盖物）。
3. 一旦内容物不再漂移，就立即评估新鲜制作的湿式准备工作。
  - 如果在使用盖子后1分钟内没有停止流动，则必须进行新的湿准备。

## 2.4.4 显微镜下的评估

对于新鲜精液未染色准备的所有检查，需要配备相衬光学的光学显微镜（第221页第8.3节关于如何设置显微镜）。

### 2.4.4.1 低倍

对射精等量的初始显微镜检查包括在×100的总放大倍数下扫描制剂（即。×10物镜与×10眼镜的组合）。

这提供了一个样本的概述，以揭示精子是否在制备过程中是均匀地分布的，任何可见的粘液链，以及精子聚集或凝集。如果分布不均匀，原因可能是：

- 混合不足
- 高粘度
- 液化不足
- 精子聚集。

### 2.4.4.2 高倍

然后，该制剂应在×200或×400的总放大倍数下进行评估。×20或×40物镜与×10眼部的组合)。这是允许：

- 精子运动的评估；
- 测定准确评估精子数量所需的稀释度（第2.4.4.3节）；
- 确定圆形细胞，需要进一步评估；
- 测定除精子以外的细胞的存在。或“圆形细胞”（白细胞和未成熟的生殖细胞）。



### 2443 估计对精子计数的适当稀释度

射精中允许准确测量精子浓度所需的稀释度是从在整个高倍显微镜视野中观察到的精子数量来估计的。至少使用50μl混合射精，精子悬液总体积至少为200μl。现场面积的计算见第67页第2.5.9节)。

如果没有观察到精子，检查重复的湿准备。如果在第二种制剂中没有发现精子，则按照第35页2.4.8.8节进行表2.1以确保使用足够体积的射精液，并获得最终体积的稀释精子悬液以充分处理。

表2.1射精量-稀释精子悬液的充分处理

每个×400字段的精子	每个×200字段的精子	稀释剂	邻接 (μl)	纤维化 (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

### 2444 用于稀释射精等分物的固定物

例如，准备1升含有0.595M碳酸氢钠和大约0.14M福尔马林的水溶液（任何甲醛的液体溶液都称为福尔马林）。福尔马林的最终浓度是病理学和细胞学实验室的十分之一。与这种实验室的情况相比，计数室制剂产生的福尔马林蒸发量极低。必须遵守当地有关福尔马林处理的规定，但通风罩可能只在准备低浓度原液时强制处理。

1. 溶解50g碳酸氢钠 (NaHCO<sub>3</sub>) 在大约500毫升蒸馏水中，加入10毫升36-40%甲醛溶液，最终加入1000毫升体积。
2. 如果需要，加入0.25g色酚蓝（颜色指数23859）或5ml饱和(>4mg/ml)龙胆紫（颜色指数42555），突出精子头部，便于计数室适当加载。
3. 在2-8° C存储多达12个月。如果在溶液中形成晶体，则在使用前通过0.45μm的滤波器。

### 2445 稀释剂以评估精子数量

用固定剂稀释是固定精子的必要条件。静止精子比运动精子更容易准确计数。稀释对于创建更水的样品更可靠



加载到血细胞计中。至少应将50 $\mu$ l的精液与稀释液混合，以确保可靠的代表性和足够的悬浮体积，以彻底混合样品（固定后可能发生涡旋）。在初始显微镜检查时估计了适当的稀释度。

1. 使用置换移液管将适当数量的固定剂分配到两个稀释瓶中。
2. 小心地混合精液样本，不产生气泡。
3. 使用阳性置换移液管取一定体积的精液进行稀释。
4. 擦拭移液管尖端外部的精液，小心不要触摸尖端的开口。确定移液管尖端没有气泡。
5. 将精液放入固定液中，通过抽吸和表达固定液冲洗移液管尖端。用柱塞完全按压去除移液管尖端，并立即将稀释液涡旋，以减少形成可见沉淀物的风险，从而使评估不可靠。
6. 再次将精液样品混合，按照上述步骤准备重复稀释。

#### 2446 精子聚集的评估

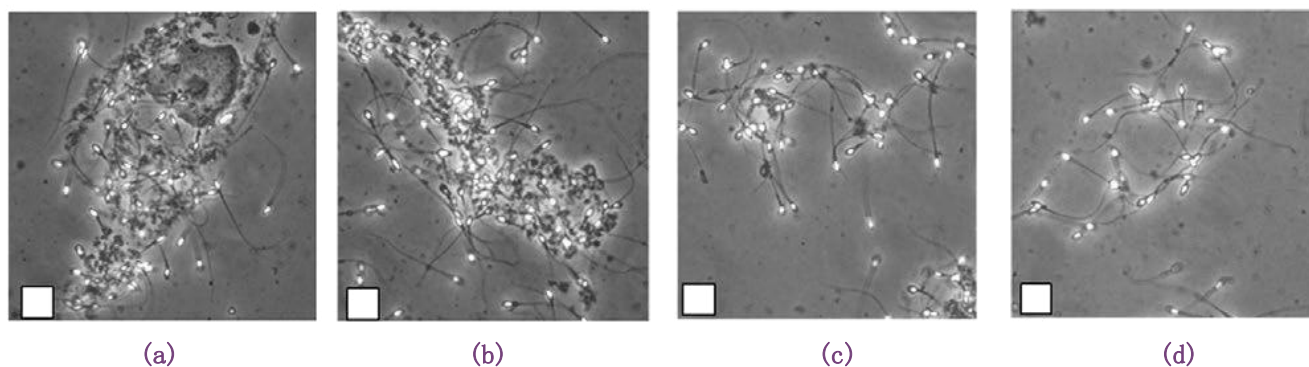
有两种不同类型的精子聚集，必须单独评估。

##### 精子聚集物

静止精子相互附着或运动精子与粘液链、非精子细胞或碎片的粘附被定义为非特异性聚集(图。 2.1)。

图。2.1精液中精子的非特异性聚集

精子与上皮细胞(a)、碎片(b)或精子(c、d)聚集的精子视图。



显微镜提供。



精子凝集素

聚集特别是指运动的精子相互附着，头对头、尾对尾或混合结合。精子的运动通常是剧烈的，带有一个疯狂的摇晃运动，但有时精子是如此的凝集，它们的运动是有限的。任何通过头部、尾巴或中部粘在一起的活动精子都应该被注意到。粘在细胞或碎片上的运动精子或相互粘在一起的静止精子（聚集）不应被视为凝集。

主要的凝集类型（反映附着程度和附着部位应记录(52)。2.2）。

图。2.2精子凝集程度示意图

涉及的部件	凝集程度			
	1. 分离的 (<10精子/凝集体, 许多游离精子)	2. 中等 (10-50个精子/凝集体, 游离精子)	3. 大 (凝集素 >50精子, 一些精子仍然游离)	4. 所有精子凝集, 以及相互连接的凝集素)
A. 头对头				
B. 尾到尾的头可以是自由的, 并清除凝集物				
C. 尾尖到尾尖				
D. 混合物 (清晰的头对头和尾对尾凝集)				
E. 缠尾尾巴纠结。头部不清楚凝集体, 因为它们在尾到尾凝集)				

转载自Rose等人。(1976)经许可。

## 2.45 除精子以外的细胞元素

射精中包含除精子以外的细胞，其中一些可能与临床相关。这些包括泌尿生殖系统的上皮细胞，以及白细胞和未成熟生殖细胞，后两个统称为“圆细胞”（53），然而，不可能区分白细胞和未成熟生殖细胞高度确定（54）检查×1000放大染色涂片（见63页图2.16, 70页图2.17和119页3.7节）。识别活性炎症细胞的进一步技术见（第116页的3.5节）。**这些测试的临床价值尚不清楚，因此不存在基于证据的限制（55-57），请参见第28页的第2.4.8节。**

## 2.46 精子运动

精子运动的程度与妊娠率有关（58-60）。射精过程中逐渐运动的精子总数具有生物学意义。这是通过将射精中的精子总数乘以逐渐运动的细胞的百分比来获得的。涉及计算机辅助精子分析(CASA)的运动性评估方法见第155页的4.5.1节。

如果射精在30分钟内完成液化，则应开始调查。如果30分钟后发生不完全液化，射精可在37°C培养箱中再放置30分钟，然后开始调查。报告中应记录有关液化延迟或故障的信息。

运动精子的速度与温度有关。因此，在运动评估过程中标准化温度是必要的。控制与体温相似的温度通常最容易，但这需要显微镜配备一个温度控制的物体舞台，显微镜载玻片和覆盖物被预热，样品在评估前也被加热到37°C。当样品在37°C培养箱中液化时，这些方面很容易实现。使用室温更有问题，尤其是因为室温没有定义，因此可能会有很大的变化。

带有网格的目镜十字线的使用。建议使其容易限制评估的区域。这对每个领域精子数量较高的样本非常有帮助。

- 总是开始扫描几个领域，以了解精子传播的情况。这可以在较低的放大倍数（100-200×的总放大倍数）下完成。
- 避免评估与覆盖物边缘靠近（<5mm）的区域，以防止干燥的人工制品影响运动性评估。
- 场的选择应该是随机的；避免根据所看到的精子数量来选择场。
- 系统地扫描幻灯片，以避免重复查看同一区域。至少在不到5个领域的统计中，超过200个精子也应该评估5个不同的领域。
- 在随机瞬间开始给定区域的评分（不要等待精子游到区域或网格中开始评分）。



- 评估野外特定区域内所有精子的运动性。根据精子浓度选择要评分的区域或网格的部分
  - i. e. 如果精子浓度较高，只对网格的第一行得分；如果精子浓度较低，则对整个网格进行评分。
- 系统地计数，从快速和缓慢进行的精子开始，以避免高估进行性精子的数量。目标是立即计算网格部分中所有逐渐运动的精子；避免在得分过程中也计算那些游入网格部分的精子。在第二次计数中，对留在网格部分内的非进行性和静止性精子进行计数。
- 评估每个重复大约200个精子；每个重复都是一个单独的，新鲜的湿制剂。
  - 如果在一个区域的所有运动类别得分之前计算200个精子，则必须继续超过200个精子，直到所有类别被计算，以避免对首先得分的运动类别的偏差。
- 比较复制值，以检查它们是否可接受地接近。如果有，请继续计算；如果没有，请准备新的样品。如果三组重复未能给出可接受的接近结果，平均所有六个评估的结果，在报告中评论的结果是平均高度可变的评估（表明不寻常的不确定性可能是不协调的等分的结果）。
  - 有关运动性评估的故障排除，请参见第207页上的第7.10.3节。

#### 24.61 精子运动类别

推荐采用四类运动分级系统。

来自精子活力的手工评估和计算机辅助精子分析的临床数据表明，识别快速进展的精子是很重要的（12, 61-70）。因此，推荐的类别为（具有近似的速度限制）：

- 快速进展（ $25 \mu\text{m}/\text{s}$ ）-精子在线性或大圆中积极运动，覆盖从起点到终点的距离，在1秒内至少 $25 \mu\text{m}$ （或 $\frac{1}{2}$ 尾巴长度）；
- 缓慢进行（5到 $<25 \mu\text{m}/\text{s}$ ）-精子在一秒内以线性或在一个大圆中主动运动，覆盖从起点到终点的距离，5到 $<25 \mu\text{m}$ （或至少一个头长度到小于 $\frac{1}{2}$ 尾长度）；
- 非进行性（ $<5 \mu\text{m}/\text{s}$ ），所有其他没有进展的活跃的尾巴运动模式。在小圆圈中游泳，鞭毛力使小于 $5 \mu\text{m}$ （一个头部长度）从起点到终点；
- 静止的，没有活跃的尾巴活动。



## 2462 重复次数的比较及结果的计算

- 分别计算两种重复的四类运动的比例（%），以及渐进性和运动的比例。
- 然后计算优势组（静止或活动）的两个重复的平均值。
- 计算优势组的重复之间的差异。
- 确定第26页表2.2的差的可接受性(由于随机原因，95%的样本中可能出现的两个百分比之间的最大差异。如果差值大于表中的值，则差值是由随机原因引起的概率小于5%)。
- 如果百分比之间的差异可以接受，则报告每个运动等级的平均百分比：(a)快速进展；(b)缓慢进展；(c)非进展；(d)处于静止状态。如果差异过高，从精液样本中取两份新的等分物，做两种新的制剂，然后重复评估。如果重复的差异大于可接受的差异，则评估不应重复超过两次。6个评估的平均值的最终结果可以作为结果，并评论，由于重复评估之间的高可变性，结果是不确定的。
- 报告每个运动等级的平均百分比。
- 四个成绩的总和应该是100分。如果是99或101，则将优势组的值调整为100之和。如果求和为<99或>101，则必须消除计数或计算错误。

图。2.3评估精子活力的帮助

(a) 目镜十字线使它更容易计算运动和静止的精子。(b) 系统地选择评估精子活力的领域，距离覆盖物的边缘至少5毫米。

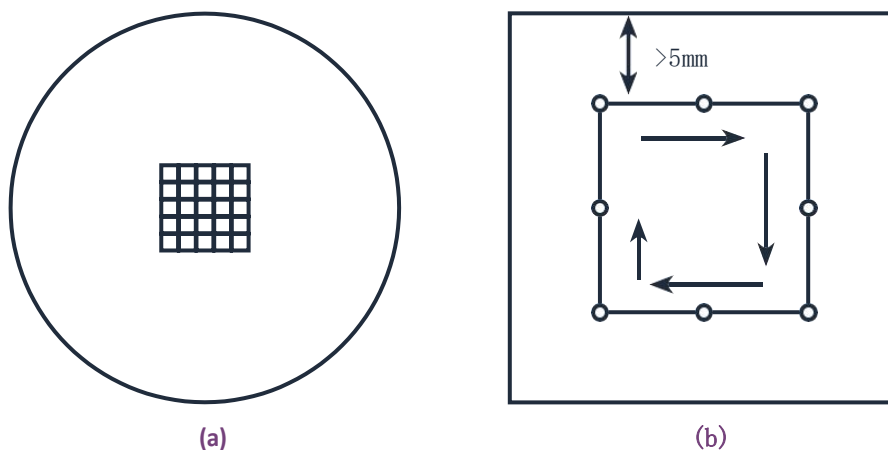


表2. 2一个给定平均值的两个百分比之间的可接受差异（基于95%置信区间），由200个精子的重复计数(总共计数400个)确定

平均 (%)	1	2 -	4 -	7 -	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
可接受的差异	2	3	4	5	6	7	8	9	10	9	8	7	6	5	4	3	2

## 2.4.7 精子活力

精子活力，通过评估细胞膜完整性估计，可以在所有射精上常规确定，但当至少40%的精子运动时是不必要的。在活力较差的样本中，活力测试对于区分静止死亡精子和静止活精子很重要。大量活但不运动的细胞的存在可能表明鞭毛（71, 72）的结构缺陷；高比例的静止细胞和死亡细胞可能表明附睾病理（73, 74）或由感染引起的免疫反应。

活精子的百分比是通过识别那些具有完整细胞膜的细胞、染料细胞排除（质膜损伤，允许进入膜不渗透染色）或低渗肿胀来评估的。诊断使用的诊断试验是伊红黑松试验。替代活力测试将在本节的最后进行描述。

在精液样本液化后，应尽快评估精子活力，最好是在30分钟，但在任何情况下，在射精后1小时内，以限制脱水或温度变化对活力的有害影响。

### 2.4.7.1 伊红黑松活力试验

这种一步染色技术使用黑松香来增加背景和精子头部之间的对比度，这使它们更容易辨别。它还允许存储幻灯片，用于重新评估、培训和质量控制目的（75, 76）。

#### 制备试剂

1. 伊红Y：将0.67g伊红Y（颜色指数45380）和0.9g氯化钠（氯化钠）溶解在100ml纯净水中，并温和加热。
2. 伊红-黑松香：在100ml的伊红Y溶液中加入10g黑松香（颜色指数为50420）。
3. 将悬浮液煮沸，然后冷却到室温。
4. 通过滤纸进行过滤。去除粗和胶状沉淀，并储存在密封的深色玻璃瓶中。



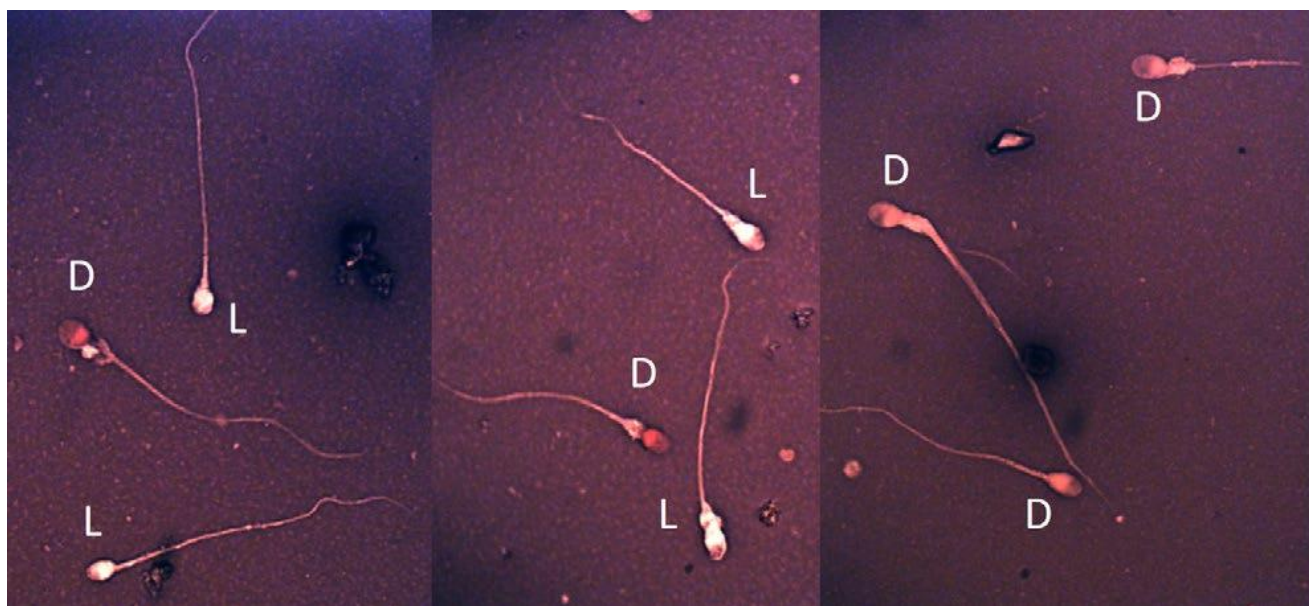


## 程序

1. 将精液样本混合均匀。
2. 取出50 $\mu$ l的精液，与等体积的伊红-黑松香悬液混合。在瓷板或试管中，并等待30秒。
3. 在玻片上涂上，让它在空气中干燥。
4. 干燥后立即检查（有黑胶污染的风险），或在使用永久非水安装介质安装后进行检查。
5. 在 $\times 1000$ 放大和油浸下用亮场光学检查幻灯片。
6. 在实验室计数器的帮助下，测定染色（死亡）或未染色（活）细胞的数量。
7. 评估至少200个精子，以达到一个可接受的低采样误差（77）。
8. 有关活力评估的故障排除，请参见第208页的第7.10.4节。

图。2.4亮场光学观察伊红黑胶涂片

有红色或深粉红色头部的精子被认为是死亡的(D)，而有白色头部的精子(L)被认为是活的。



显微照片由L. Bjorn达尔提供。

## 评分

1. 黑香提供了一个黑暗的背景，这使得更容易辨别微弱染色的精子。
2. 通过亮场光学技术，活精子头部为白色，死亡精子头部呈红色或粉红色。头部有淡淡的粉红色染色的精子动物被评估为死亡。



3. 如果染色仅局限于颈部区域的一部分，而头部区域的其余部分未染色，这被认为是一个“渗漏的颈部膜”，而不是细胞死亡和细胞膜完全解体的迹象。这些细胞应该被评估为活的。

## 24.72 计算

1. 计算活细胞的百分比。
2. 报告生命精子的百分比，四舍五入到最接近的整数。

## 24.73 对有活力的结果的解释

临床上有趣的信息是在很少或没有运动精子的样本中。

- 确定精子存活和静止的精子比例。
  - 从活比例中减去运动比例（快速、缓慢和非进展的和）。
  - 活的静止精子的比例是否占所有精子的25-30%？  
没有确切的限制，但如果超过25-30%的精子存活和静止，遗传纤毛问题可能是原因，因此精子活力不太可能通过任何药物治疗来改善。

## 24.8 计算精子和其他细胞

每次射精的精子总数和精子浓度与妊娠时间（78）和妊娠率（59, 79）相关，是受孕（60, 80）的预测因子，然而，更多的精子总数与生殖结果相关的数据是必要的。

射精中的精子的数量是根据射精的浓度和射精的体积计算出来的。对于正常射精，当男性束畅通无阻，禁欲时间短，精子的数量与睾丸体积（2, 32, 34, 81）因此是衡量睾丸的能力产生精子（82），男性束的开放，可能，精子的数量转移到女性在性交。

射精中精子的浓度虽然与受精和妊娠率有关，但受精囊和前列腺（83）分泌量的影响，不能有效衡量睾丸功能。

当表示精子浓度（单位体积数量）时，不得使用术语“精子密度”（单位体积质量）。



## 24.81 精子计数概述

- 从湿制剂的检查中选择最合适的稀释度（第20页第2.4.4.3节）。
- 通过将射精液和固定液混合准备稀释剂（第20页表2.1；第20页第2.4.4.3节）。
  - 如果用阳性置换移液管取50 $\mu$ l精液并适当稀释，只需要稀释一次（84,85）。精子悬液的复制等分需要检查和比较。
- 准备计数室（血细胞计）。
- 加载血细胞计数仪的腔室，并将其留在一个潮湿的腔室中，让精子沉淀在计数室的底部。
- 从潮湿室去除后立即评估精子数量（以避免计数室蒸发的负面影响）。
- 每个重复至少计算200个精子。
- 比较复制计数，看看它们是否很接近。如果有，请继续计算；如果没有，请准备新的稀释剂。
  - 有关精子计数问题的故障排除，请参见第208页上的表7.14。
- 计算每毫升精子中的浓度。
- 计算每次射精的精子数量。

## 24.82 血细胞计数仪改进了纽鲍尔的裁决

建议使用具有改进的纽鲍尔裁决的血细胞计数室。改进的诺鲍尔血细胞计数室的稀释因子见第20页第2.4.4.3节。可以使用其他血细胞计数室，但如果它们有不同的网格模式和区域，则需要其他计算因素。具有纽鲍尔裁决的一次性血细胞计必须验证（86）。

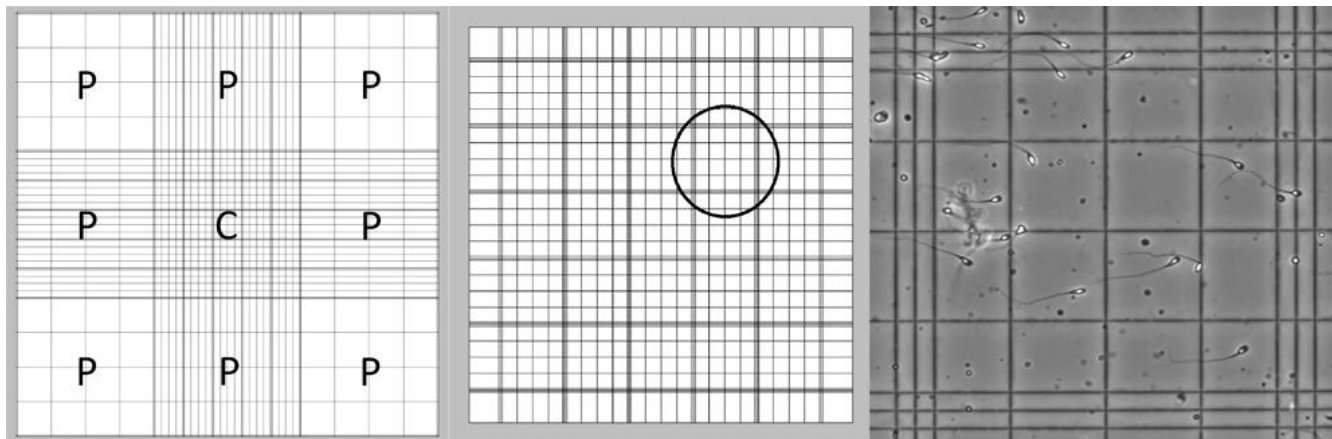
改进的纽鲍尔血细胞计有两个独立的计数室，每个室都有在玻璃表面蚀刻的3毫米 $\times$ 3毫米网格线图案。它带有一个特殊的厚盖板（厚度#4, 0.44mm），位于网格之上，由腔室地板上方0.1mm(100 $\mu$ m)的玻璃柱支撑。每个计数区域被划分为9个1mm $\times$ 1mm的网格。这些网格将由图中所示的数字来表示。2.5。

根据稀释度和精子数量，使用不同的房间区域来确定精子浓度。一般来说，中央网格用于计数。当中央网格中计数精子少于200个精子时，使用8个外围网格。



图。2.5 纽鲍尔裁决得到改进的血细胞计数仪

刻区域图显示：血细胞计（左面板）一个腔室中的所有9个网格，中央网格(C)以及8个外围网格(P)。中央网格由25个大正方形组成（中间面板）组成；以及一个填充房间的显微图（右面板），显示了中央网格的25个正方形(中间圈出的方方形)中的一个，由三线包围，包含16个较小的方方形。8个外围网格的大小与中央网格相同，但较小矩形的大小和数量各不相同。深度为100 $\mu\text{m}$ ，9个网格各容纳100n1。



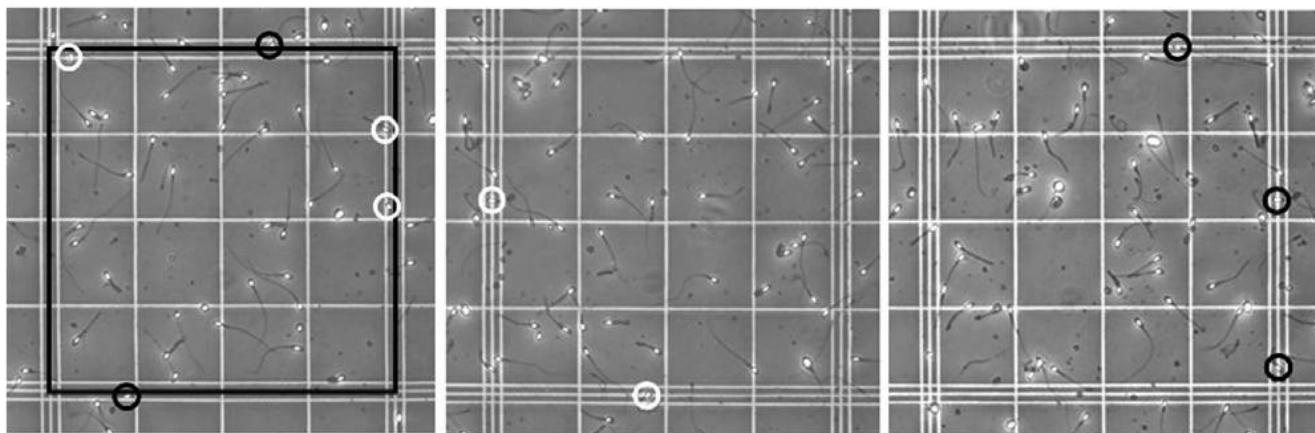
图形和显微照片由L. Bjor恩达尔提供。

#### 血细胞计网格中的计数原理

- 只计算整个精子（有头部和尾巴）。
  - 如果有许多无头精子尾巴（所谓的“针头”精子）或没有尾巴的头，它们的存在应该记录在报告中。其浓度可以被估计为与整个精子的关系（例如，“每100个精子有45条无头尾巴”）。
  - 如果有多个尾巴的精子头部超过五分之一（每100个计数的精子中有20个），则应报告其相对频率。
- 一个大正方形的边界用三个方形的中线表示。
  - 一个精子是否被计数取决于它的头部的位置；它的尾巴的方向并不重要。
    - 对所有未接触大正方形边界(三线中间)的精子进行统计。2.6左面板：白色圆圈-计数)
    - 只计算与下或左边界接触的精子；而不是那些与上或右边界接触的精子。2.6中间面板：白色圆圈计数；右面板为黑色圆圈计数)。

图. 2.6在网格方形中计算哪些精子

这三条线的中间定义了正方形的边界（黑线，左面板）。计算中心正方形内的所有精子（白色圆圈）。只有当精子是正方形的下角或左边界（白色圆圈，中间面板），而如果精子是正方形的上角或右角边界（黑色圆圈，右面板），才会计算。



显微镜提供。

### 2483 准备和装载血细胞计数计室

1. 使血细胞计覆盖的附着表面（“腔室柱”）稍微潮湿。
2. 将盖子牢固地压在计数室柱上，将其固定在计数室上。两个玻璃表面之间的彩虹（多个牛顿环）证实了覆盖物的正确位置。线条越多，配合得越好；只有一到两条线表示玻璃表面不够近，会导致不正确的腔室深度。确保覆盖物牢固，不会用移液管尖端轻轻触摸移动。
3. 通过高速涡旋15秒，彻底混合第一次稀释液。为了避免精子的沉降，立即移除一个足够体积的固定悬浮液，以便在一个计数室上填充盖子下的整个区域（通常约 $10\mu\text{l}$ ）。
4. 小心地触摸移液管尖端与其中一个房间的覆盖物的边缘。
5. 缓慢按下移液管的柱塞，使腔室通过毛细管作用填充。在填充过程中不得移动盖板，并且腔室不应过度填充或填充不足（当空气占据某些腔室区域时）。
6. 混合第二种稀释液，如上所述，并立即去除第二种等分。按照上述步骤加载血细胞计的第二个腔室。
7. 将血细胞计水平储存在室温下至少10-15分钟（以使精子在 $100\mu\text{m}$ 深的腔室中完全沉淀）。在覆盖的培养皿中饱和的滤纸上，以防止干燥。



## 24.84 评估计数室中的精子数量

应在血细胞计数仪的两室中评估精子数量。如果两个值足够一致，所取的等分物可以被视为样品的代表（第18页第2.4.3.2节）。重要的是要记住，检查的精子并不一定意味着射精中没有精子。

1. 在×200放大倍数下（如果显微镜光学允许，或×400），用相位对比光学检查血细胞计。
2. 其目的是在每个重复中计算至少200个精子，以达到一个可接受的低采样误差。
3. 首先评估改进后的纽鲍尔室一侧的中央网格中的左上角的大正方形。使用此数字决定中央网格的多少大方形要评估：

- <10精子：                    计算出整个网格（25个大正方形）
- 10-40个精子：计10个大方块
- >40精子：                    计数5平方(例如。4个角落和中心)。



注：如果在预定数量的大方块中计数少于200个精子，则将计数扩展到上面下一个较大数量的大方块。如果中心网格中的所有25个大正方形都在没有达到200个精子的情况下进行了评估，则也考虑同时计数1-8个外围网格（图2.5）。

4. 记录一下评估要达到至少200个精子的大方块或网格的数量。必须从血细胞计的另一个腔室中计算出相同数量的大方块或网格。
5. 借助实验室计数器来测定精子的数量。
6. 切换到血细胞计的第二个腔室，并对与第一个复制相同数量的正方形或网格进行重复计数，即使这样产生的精子少于200个。
7. 计算这两个数字的总和和差值。
8. 根据第2.4.8.5节确定重复计数之间的差异是否可接受。
  - 如果差异可接受，则计算精子浓度（第34页第2.4.8.6节）和每次射精的精子总数（第35页第2.4.8.7节）。
  - 如果差异过高：
    - 首先从重复稀释和计数中加载一个新的血细胞计。如果差异仍然太高，则计算第三次。
    - 如果在三次重复后差异仍然过高，则计算所有帐户的平均值，并对最终报告中给出的结果增加的不确定性发表评论。



### 24.85 重复计数之间差异的比较

在包含和范围的列中找到包含计算精子之和的行。如果您发现的复制计数之间的差异小于或等于和范围右侧列中的差异的限制，则您可以接受复制评估并计算最终结果。

第三列根据观察到的数量（被评估的精子的数量）给出了最终结果的不确定性。在很少的观察情况下，可以以较小的差异接受重复计数，但由于观察的数量有限，最终结果仍然不太确定（见第234页的8.6节）。

表2.3 重复计数的差异及与结果不确定性的关系的比较

金额范围	限制差	基于观测次数的最终结果的误差
969 - 1000	61	3.2%
938 - 968	60	3.3%
907 - 937	59	3.3%
876 - 906	58	3.4%
846 - 875	57	3.4%
817 - 845	56	3.5%
788 - 816	55	3.6%
760 - 787	54	3.6%
732 - 759	53	3.7%
704 - 731	52	3.8%
678 - 703	51	3.8%
651 - 677	50	3.9%
625 - 650	49	4.0%
600 - 624	48	4.1%
576 - 599	47	4.2%
551 - 575	46	4.3%
528 - 550	45	4.4%
504 - 527	44	4.5%
482 - 503	43	4.6%
460 - 481	42	4.7%
438 - 459	41	4.8%
417 - 437	40	4.9%
396 - 416	39	5.0%
376 - 395	38	5.2%
357 - 375	37	5.3%
338 - 356	36	5.4%
319 - 337	35	5.6%



金额范围	限制差	基于观测次数的最终结果的误差
301 - 318	34	5.8%
284 - 300	33	5.9%
267 - 283	32	6.1%
251 - 266	31	6.3%
235 - 250	30	6.5%
219 - 234	29	6.8%
206 - 218	28	7.0%
190 - 205	27	7.3%
176 - 189	26	7.5%
163 - 175	25	7.8%
150 - 162	24	8.2%
138 - 149	23	8.5%
126 - 137	22	8.9%
115 - 125	21	9.3%
105 - 114	20	9.8%
94 - 104	19	10.3%
85 - 93	18	10.8%
76 - 84	17	11.5%
67 - 75	16	12.2%
59 - 66	15	13.0%
52 - 58	14	13.9%
44 - 51	13	15.1%
38 - 43	12	16.2%
32 - 37	11	17.7%
27 - 31	10	19.2%
22 - 36	9	21.3%
17 - 21	8	24.3%
13 - 16	7	27.7%
10 - 12	6	31.6%
7 - 9	5	37.8%
5 - 6	4	44.7%
3 - 4	3	57.7%
2	2	70.7%
1	1	100.0%

### 24.86 从精子计数中计算精子浓度

两个接受的复制计数的总和除以一个因素，由稀释和大量的广场或网格评估在两个计数室（如果三次尝试没有达到足够的协议复制计数，使用三个总和的平均值）。





表2.4根据精子计数计算精子浓度

稀释剂	大方块的数量 计数在每个房间			在每个房间中计算的网格数								
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9	
	校正因子值											
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：一个改进了纽鲍尔裁决的血细胞计有两个计数室。每个计算室由9个（3×3）个相同大小的网格组成。中央网格由25个大方形组成，每个方形被一条三联体线包围，而8个外围字段各由16-20个矩形组成。

· 如果每个腔室的精子少于25个，如果使用1+1（1：2）稀释，浓度为<55 555精子/ml（87）结果估计误差超过14%（表2.3）（稀释度更高，浓度结果更高，但估计误差同样高，>14%）。报告观察到的精子数量，并评论“统计的精子太少，以准确测定浓度（<56000/ml）”。当需要准确评估低精子数量时，请参见下文第2.4.8.8节。

#### 24.87 精子总数的计算

- 计算和报告每次射精的精子总数是至关重要的，因为这个参数提供了一个更好的测量睾丸精子的产生和在性交期间转移到雌性的精子的数量。这是通过将精子浓度乘以整个射精的体积来获得的。
- 总精子数量应该报告为一个整数（没有小数位）数百万的精子，除了数字低于1000万，其中一个小数位可能是可以接受的清晰低范围的结果，尽管分析可变性证明使用小数点的位置。

#### 24.88 精子数量低

如果在重复的湿制剂中没有观察到精子，则可以怀疑完全缺乏精子（无精子症）。虽然有人认为该定义应该改变（88,89），但无精子症仍然是对射精结果的描述，而不是诊断或治疗的基础。人们普遍认为，无精子症一词只有在离心样品（90）的沉积物中没有发现精子时才能使用。



但是，应记住：

- 颗粒中是否发现精子取决于离心时间和速度（91, 92）以及检测颗粒的数量；
- 3000g离心15分钟不会使样品（93）中的所有精子成球；和
- 离心后，（46）可能会失去运动，浓度将被低估（87）；如果对离心样品进行了计数，这应该在最终报告中明确说明。

处理这些样本的方式取决于精子的存在和运动的定性数据是否足够或需要准确数量的精子（见检查非离心的精子和离心的样本检测精子不管运动41页需要评估低精子数量）。

虽然如果对所有9个网格进行检查，可以使用1+1（1：2）稀释法获得低精子浓度的粗略估计，但估计误差很高。此外，在显微镜下，稀释的射精分析可以显示大量的背景。扫描大腔室可能需要10-20分钟，但使用荧光染料（87）可以方便地快速检测精子。必须注意的是，通过以下方法获得的值应该被认为是一种估计，因为计算精子的数量太少，而且体积可能不准确。

#### 非离心射精检测运动精子

当检测运动精子是必要的时，确定所使用的离心程序是否会损害精子，损害精子活力，从而导致错误的结果是很重要的。如果使用离心样品，实验室必须确保他们的程序不会损害精子的活力或受精能力。

#### 通过扫描湿式制剂来估计浓度

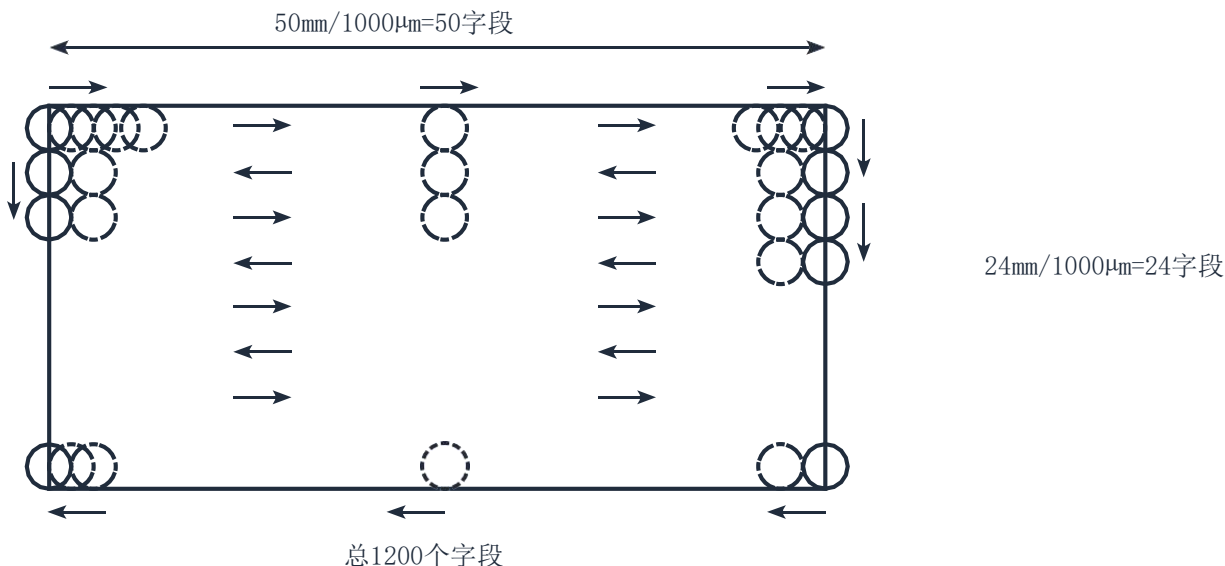
1. 使用两种连续的湿法制剂（第18页上的第2.4.3.3节）。
2. 系统地逐个现场扫描整个覆盖物。从一个角落开始，沿着x轴扫描；然后沿y轴移动一个字段，沿着整个宽度返回扫描。继续以这种曲折的方式对整个样本进行完整和系统的搜索。2.7)。在改变字段的同时继续观察幻灯片。
  - 使用×20物镜和20毫米孔径的×10眼镜，显微镜场的直径约为1000μm（第67页第2.5.9节）。因此，每22毫米×22毫米的覆盖物大约有484个场需要检查。
3. 从10μl或20μl中观察到的运动和静止精子的数量，可以通过将总射精体积乘以观察到的精子数量和一个因素来计算出近似的浓度：  
$$N = \text{观察精子数量} \times V_{ol} = \text{射精体积 (ml)}$$
$$\text{因子 (10}\mu\text{l 检测100, 50检测10}\mu\text{l)} \text{ 浓度 (精子/ml)} = N \times V_{ol} \times \text{因子}$$



4. 该报告必须声明它是一个近似值，而不是一个精确的值。
5. 要计算扫描湿制剂后精子存在的概率，请参见第64页的第2.5节。

图。2.7扫描整个覆盖物中是否存在可运动的精子

这包括在 $\times 200$ 放大倍数下为 $22\text{mm} \times 22\text{mm}$ 覆盖物评估 $22\text{mm}$ 的高功率显微镜场。



#### 基于HPF观测结果的浓度估计

如果每 $\times 400\text{HPF}$ 的精子少于4个(即。大约小于 $1 \times 10^6$ /毫升)，对于男性生育不足可能足以报告估计精子浓度约 $1 \times 10^6$ /毫升，报告清楚地表明，这只是一个非常粗略的估计精子浓度和是否运动的精子。只有当精子浓度的评估是为了决定进一步的临床研究或确定对夫妇的辅助生殖技术(ART)的最佳方式时，才应该进行这种不精确的估计。这种估计不应用于常规的精液分析，特别是用于监测潜在的男性避孕药的效果和对精子发生的内分泌刺激的反应。当计算非常低的精子浓度或每次射精的精子总数时，计算如第32页第2.4.8.4节所述的所有9个大方块。

#### 评估大容量一次性腔室中的低精子数量

使用大体积、 $100\mu\text{m}$ 深的室可以提高浓度评估的敏感度(85)大体积室有两个 $100\mu\text{m}$ 深的室，保持 $25\mu\text{l}$ 。定向放大错误，必须统计临界数量(优选大约200的复制计数总共至少400个)(第78页的表2.16)。

1. 将精液样本混合均匀。
2. 移除等量精液，如果预计精子数量低，那么可能不需要稀释，精子很容易观察精子。如果进行稀释，则用固定剂稀释1+1 (1: 2) (第20页第2.4.4.4节)。



在初始评估时精子少于2的样本的稀释1+1（20页表2.1）适用于精子浓度范围，在整个腔室内产生约200个精子。

3. 如果显微镜上有荧光，那么用适当的染料对“稀释后”的固定精子进行染色，如DAPI可以帮助识别它们。

*在一个大型的一次性房间中，每个重复获得200个精子*

- 如果在初始湿制备中，每HPF只有一个4n1的精子，则理论上每n1有0.25个精子（250/ $\mu$ l或250000/ml）。
- 这个大体积的腔室可以容纳25 $\mu$ l，所以里面会有6 250 个精子。稀释样品1+1（1：2）可以将背景和精子数量减少到3 125，足以产生一个可接受的低采样误差。
- 然而，这个值只能是一个粗略的估计，因为很少有的精子被统计，而且体积可能是不准确的。

*程序*

1. 按上述要求取相关样品（稀释或整齐）。
2. 将载玻片的每个腔室填充25 $\mu$ l的液体。
3. 在室温下在潮湿的房间中水平储存10-15分钟。在覆盖的培养皿中饱和的滤纸上，以防止干燥。（如果使用荧光，染料将与精子头部结合，在此期间固定的细胞沉积在室内地板上）。
4. 在 $\times$ 250的放大倍数下检查幻灯片。
5. 在每个重复中至少计算200个精子，以获得可接受的低采样误差（第78页的表2.16）。
6. 逐场系统地检查一个腔室。从一个角落开始，沿着x轴扫描；然后沿y轴移动一个字段，沿着整个宽度返回扫描。继续以这种曲折的方式前进。在改变字段的同时继续观察幻灯片。继续计数，直到观察到至少200个精子。
7. 记录评估达到至少200个精子的场的数量。相同数量的字段将从另一个腔室中计算出来。
8. 在实验室计数器的帮助下测定精子和场的数量。
9. 切换到第二个腔室，并对与第一个复制相同数量的字段（相同的体积）执行重复计数，即使这样产生的精子少于200个精子。
10. 计算这两个数字的总和和差值。
11. 确定第33页表2.3差异的可接受性——由于抽样误差，95%样本单独出现的两个计数之间的最大差异。



12. 如果差异可接受，则计算其浓度。如果差异过大，做两个新的准备，并重复评估。
13. 将平均精子浓度报告给两个重要的数据。
14. 将精子浓度乘以精液体积 (ml)，得到每次射精的精子总数。

#### 通过现场检查计算低精子浓度

精液中精子浓度为其数量 (N) 除以所检查的显微场总数 (N) 的体积 (其中场的体积 (v) 如第67页第2.5.9节) 乘以稀释度。即  $C = (N/n) \times (1/v) \times \text{稀释因子}$ 。

在总×250放大时，场体积为80nl（第2.5.9节），当稀释1+1（1：2）时，浓度为：

$C = (N/n) \times (1/80) \times 2 \text{ 精子/nl} = (N/n) \times (1/40) \text{ 精子/nl}$ （百万精子/毫升精液）。

在总×400放大时，场体积为20nl（第2.5.9节），当稀释1+1（1：2）时，浓度为：

$C = (N/n) \times (1/20) \times 2 \text{ 精子/nl} = (N/n) \times (1/10) \text{ 精子/nl}$ （百万精子/毫升精液）。

当评估了两室的整个区域时，精子总数除以两室的总体积 (50μl)，乘以稀释因子 (2)，以获得精子/μl（数千/毫升精液）中的浓度。

如果样品未被稀释，则稀释系数为1。

#### 在一个100μm深的大容量一次性腔室中观察到的每个大功率场的体积

- 每个微观视野中的精液体积取决于视野的面积 ( $\pi r^2$ ，其中  $\pi$  约为3.142，r 为微观场的半径) 和腔室的深度 (这里为100μm)。
- 微观场的直径可以用舞台微米来测量，也可以通过将目镜的孔径直径除以物镜的放大倍数来估计。
- 对于×40物镜和孔径为20mm的×10眼部，显微镜场的直径约为500μm (20mm/40)。在本例中， $r=250\mu\text{m}$ ， $r^2 = 62\,500\ \mu\text{m}^2$ ， $\pi r^2 = 196\,375\ \mu\text{m}^2$ ，体积为19\,637\,500  $\mu\text{m}^3$  或约20nl。
- 使用×25物镜和孔径为25mm的×10眼部，显微镜场的直径约为1000μm (25mm/25)。在本例中， $r=500\mu\text{m}$ ， $r^2 = 250\,000\ \mu\text{m}^2$ ， $\pi r^2 = 785\,500\ \mu\text{m}^2$ ，体积为78\,550\,000  $\mu\text{m}^3$  或约80nl。



### 该方法的灵敏度

如果每个室精子少于200个，采样误差超过5%。当在两室中发现的精子少于400个时，报告计数细胞数的采样误差。

如果每个室内少于25个精子，浓度为<2000精子/ml，估计误差为>14%。报告观察到的精子数量，并评论“计数的精子太少，以准确测定浓度(<2000/ml)”。

值得注意的是，未检测的精子并不一定意味着在其他样本中没有精子。

### 已验证的示例示

#### 例1

用1+1 (1: 2) 稀释后，发现复制1在300个视野中含有210个精子，而复制2包含300个领域的300个精子。600个字段中的值(210+300)的总和为510，差值(300-210)为90。从第33页的表2.3中可以看出，这超过了单独使用(44)的预期差异，因此结果被丢弃，并进行了两个新的重复稀释。

#### 示例2

用1+1 (1: 2) 稀释后发现，复制1在400个视野中含有200个精子，而复制2在400个视野中含有230个精子。800个字段中的值(200+230)的总和为430，差值(230-200)为30。从第33页的表2.3可以看出，这比(40)偶然发现的要少，因此值被接受。

样品中精子浓度，1+1 (稀释1: 2) 为  $C = (N/n) \times (2/v)$  精子/nl。如果  $v=20nl$  (×400放大)， $C = (430/800) \times (2/20) = 0.0538$  精子/nl或每毫升精液54 000 精子(至两个显著数字)。

#### 示例3

稀释1+1 (1: 2) 稀释，复制1在整个腔室中含有50个精子，复制2在整个腔室中含有70个精子。两个腔室中的值(50+70)之和为120，差值(70-50)为20。从表2.3中可以看出，这比单独使用(21)偶然发现的要少，因此接受这些值。

当评估两个腔室的整个区域(总计50μl)时，1+1 (1: 2) 稀释的样品浓度为  $C = (N/50) \times 2$  精子每μl =  $(120/50) \times 2 = 4.8$  精子/μl或4 800 精子/毫升精子(至两个重要数字)。由于统计的精子少于400个，报告第33页120个精子的抽样误差见表2.3 (9.3%)。

#### 示例4

稀释1+1 (1: 2) 稀释，复制1在整个腔室中含有20个精子，复制2在整个腔室中含有18个精子。由于每个室中精子少于25个精子，浓度为<2000精子/ml。报告称“样本中有38个精子，无法准确测定浓度(<2000/ml)”。



### 示例5

用1+1（1：2）稀释后，在两个重复中均未发现精子。由于每个室中精子少于25个精子，浓度为 $<2000$ 精子/ml。报告“在重复中没有发现精子，数量太少，无法准确测定浓度（ $<2000$ /ml）”。

### 精子总数的计算

建议计算并报告每次射精的精子总数，因为该参数提供了睾丸精子产生和在性交期间转移到雌性的精子数量的度量。这是通过将精子浓度乘以整个射精的体积来获得的。

检查离心样品检测精子不管运动当没有精子在湿准备和精子的运动状态并不重要，样品可以离心以确定是否有精子存在于一个更大的样本。

1. 将精液样本混合均匀。
2. 取出1毫升的精液，理想的3000g离心15分钟。
3. 分解大部分上清液，将精子球重悬在剩余的约50 $\mu$ l精浆中。
4. 做一个或两个10- $\mu$ l的湿法准备工作（第18页第2.4.3节），并如前所述进行评估（第19页第2.4.4节）。
  - 样本中存在精子表明：
    - 从睾丸到尿道的通道
    - 严重限制精子生产或阻碍精子运输。
  - 精子的缺失表明：
    - 精子完全缺失（精子无精子症），可能是由于没有精子产量或极低
      - 没有从睾丸到尿道的通道。

## 2.4.9 精子形态

人类精子形态评估的价值不仅是关于自发妊娠或抗逆转录病毒治疗结果的预后价值有限，而且更多的是关于男性生殖器官功能状态的诊断信息，主要是睾丸和附睾。对于对男性生殖器官的评价，仅确定“正常”精子的比例是不够的。评估头部、颈部/中部和尾部的特定形态，以及可能存在异常的细胞质残基是很重要的。

所有的人类射精中都含有具有广泛不同形态外观的精子。早期对精子形态的定义主要是基于兽医学和显微镜调查的经验。



这里提出的标准是基于对能够穿透宫颈粘液并与透明带结合的精子形态的研究。

“正常”精子这个词在某些方面是模棱两可的，会导致误解，甚至是学术冲突。“正常”的一个一般含义是在人群中常见的质量。而对于人类的“正常精子形态”则并非如此。另一个意思是，它表明细胞或个体不受疾病的影响，但正常的形态并不意味着精子不能携带其他病理原因(例如。静止的尾巴或受损的DNA)。

人类精子的可变形态使得评估变得困难，但观察从女性生殖道恢复的精子，特别是性交后宫颈黏液(94, 95)和透明带(96, 97)表面的精子(图. 2.8在第43页)，帮助定义了潜在的受精(形态正常或更好的、“理想”或“典型”)精子的外观。通过严格应用精子形态的某些标准，已经建立了“正常”形态的百分比与各种生育终点(妊娠时间、体内和体外妊娠率)之间的关系(58、96、98-103)，这可能有助于生育的预后。

这里描述的分类系统的基本哲学是限制在宫颈内黏液中流行的潜在受精精子亚群的典型特征。可生育和不育男性正常形式的百分比范围可能远低于30%(104)，这将不可避免地产生区分可生育和不能生育人群的低阈值；事实上，在体外受精(IVF)(99)、宫内授精(IUI)(101)和体内生育(105)。此外，应该强调的是，在不育和亚生育男性之间观察到的组平均差异并不自动意味着计算出的“限制”可以用于解释个体男性的结果。... 为了获得有用的限制，必须确定正和负预测值。例如，当它涉及到“正常”(或“理想”或“理想”或“典型”)精子的比例时，这是很困难的。例如，为了在统计上区分男性个体的3%和5%的“正常”形式，必须由训练有素的人员评估1500个精子。

与人类透明带结合的精子也表现出一个形态上相似的精子(103)亚群。

为了在光镜水平上更好地理解人类精子的形态，对精子的超微结构和功能的全面综述具有(106)的价值。

对人类精子形态的实际评价包括以下步骤：

- 准备在载玻片上的射精涂片(第2.4.9.1节)；
- 空气干燥、固定和染色(第46页第2.4.9.2节)；
- 如果要长时间保存，则用盖板安装载玻片(第48页第2.4.9.5节)；
- 在×1000放大下检查亮场光学幻灯片(第48页第2.4.9.6节)；

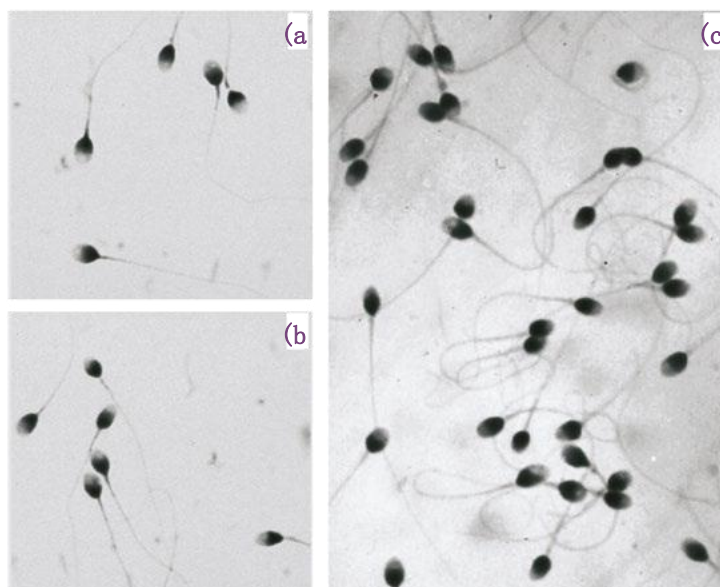




- 评估大约200个精子（第2.4.9.6节）。
  - 有关形态学评估的故障排除，请参见第207页上的第7.10.2节。

### 图. 2.8形态学上的“理想”精子

(a, b) 体外从透明带中恢复的短染色精子。  
 (c) 性交后从宫颈内粘液中恢复的精子。精子头部、中部或主部分很少有缺陷。尾巴可以弯曲，但没有尖锐的角度。(a, b)



由刘等人复制。（2003）经欧洲人类生殖和胚胎学学会许可。（c）经许可由门克维尔德&克鲁格（1990）复制。

#### 24.91 射精涂片的制备

在射精中快速添加固定物不允许充分可视化精子，因为它们被变性的精蛋白所掩盖。对于形态学分析，通常是准备射精涂片，在固定和染色前风干。然而，这种过程导致了形态学上的伪影，因为精液涂片的空气干燥与：

- 精子尺寸的变化：干燥、固定和染色的精子比精液（107）中可见的活精子要小；
- 未成熟精子头部的扩张 (Soler et al., 2000)；和
- 渗透敏感胞质液滴（108, 109），虽然保留了大量过量的胞质。

如果出现染色问题或一张载玻片破裂，应从新鲜的精液样本中制作两次或两次以上的涂片。

1. 将精液样本混合均匀。



2. 立即取出一个样本，让精子没有时间从悬浮液中沉淀。
3. 在去除重复等分物之前将精液样本混合（如果有染色问题，第二次涂片作为储备）。

### 射精

在这个过程中，用羽化技术将相同的精液涂在载玻片的整个表面上。 2.9).

1. 用无衬布的纸巾用力摩擦或用乙醇擦拭来清洁磨砂载玻片的两个表面。
2. 用两个唯一标识符的标识信息标记磨砂部分；确定固定、染色或安装不能使标记难以辨认。
3. 根据精子的浓度，将5-10 $\mu$ l的精液涂抹到载玻片的末端。用第二张幻灯片将精液滴沿着幻灯片表面拉动。2.9)。如果拖动滑片没有磨砂，可以使用滑片两端的边缘制作四种不同的涂片。
4. 允许载玻片在空气中干燥，并按照第46页第2.4.9.2节所述进行染色。

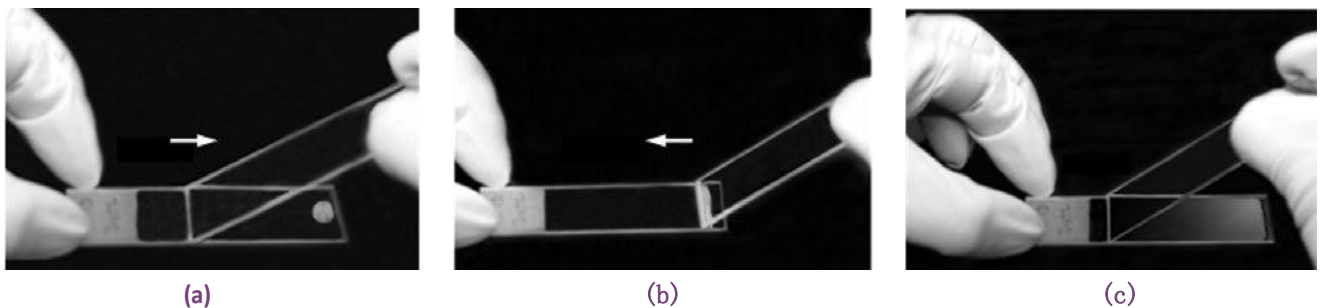
涂片的质量（载玻片上精子的最小重叠）取决于：

- 精液的体积和精子的浓度：精子的数量越少，它们相互重叠的可能性就越小；
- 拖动滑动的角度：角度越小，涂片越薄；
- 涂抹的速度：运动速度越快，涂抹的速度就越薄。

从体积为10 $\mu$ l，角度为45°，涂片约为1秒开始。如果有必要，可以改变这些参数，以减少幻灯片（95）上的精子的重叠。当精液粘度较低时，羽化效果良好，但通常不适合极粘性的精液。2.9)。

图. 2.9准备一个正常的精液涂片

为了获得运动的感觉，将拖动滑动片放置在45°的角度，并将其与等精液(a)接触，精液沿滑动片边缘运行(b)使拖动滑动片沿着滑动片长度缓慢返回（大约1秒）以产生涂片(c)。



照片由巴西石油股份有限公司提供。



### 喷射异常

精子浓度较低(小于 $2 \times 10^6$ 粘性或碎片的样品, 可能需要不同的方法。

#### *具有低精子浓度的射精液*

如果精子的浓度较低。小于 $2 \times 10^6$ , 按如下方法浓缩样品。

1. 600g离心10分钟。
2. 除去大部分的上清液。
3. 通过温和的移液将球重新花在上清的剩余液中。
4. 尽可能获得最高的精子浓度, 不超过约 $50 \times 10^6$ /ml。
5. 作为正常样本处理(第46页第2.4.9.2节)。



注: 这种操作会影响精子形态, 其使用必须记录在最终报告中。

#### *静脉射精*

有时由于精液浆高度粘性, 导致涂片厚度不均匀, 很难制备良好的涂片。粘性样品可以通过与不液化的样品(第64页第2.5.2节)一样进行处理或清洗。



注意: 这些操作可能会影响精子的形态, 并且必须记录它们的使用情况。

#### *碎片堆积或粘性的射精*

碎片和大量的颗粒物(如在粘性样品中)可能导致精子头部躺在边缘, 使其难以分类。这些样品可以清洗, 如下。

1. 使用170mM生理盐水稀释等混合射精(0.2-0.5毫升, 取决于精子浓度), 以减少精子的渗透变化。根据射精准备完成后的多长时间, 射精的渗透压可以增加到350-400mOsm/公斤。与一般身体渗透压等渗的培养基(290mOsm/kg)会对适应液化射精(17, 18)中较高渗透压的精子产生低渗冲击。
2. 800克离心机, 持续10分钟。
3. 分解大部分的上清液。
4. 通过温和的移液法将颗粒重新悬浮在剩余的上清液(通常为20-40 $\mu$ l)中。
5. 用巴斯德移液管将5-10 $\mu$ l的精子悬液扩散在显微镜载玻片上进行涂片(2.9b)。
6. 用 $\times 400$ 放大的相衬光学扫描载玻片, 以确保涂片均匀扩散。



7. 检查每个×400字段至少有40个精子，没有结块或重叠。
8. 允许载玻片在空气中干燥，并按照第2.4.9.2节所述进行染色。
  - 如果有太多的精子在上面的载玻片上重叠，用更小的射精做另一个涂片。
  - 如果精子在载玻片上太稀疏，用更大的射精进行另一次涂片。
  - 这些操作可能会影响精子的形态，并且必须记录它们的使用情况。

### 2.4.9.2 固定和染色

一旦射精涂片被风干，它们应该被固定和染色，以突出精子的细节。建议使用木瓜染色，因为彻底的验证和评估泰格伯格严格标准已经使用这种类型的染色，给最好的整体可见区域的人类精子（95110-113）使用其他染色应该验证与描述的木瓜染色适合人类精子。

采用亮场光学(Kohler照明)中推荐的染色方法，头部在顶体区域染色为浅蓝色，在顶体后区域染色为深蓝色。它染色了头部的顶体和顶体后区域，多余的残留细胞质，中部和主部分。中间可能有一些红色染色，尾部呈蓝色或红色。多余的残留细胞质，通常位于头部后面和中部周围，通常染成绿色；如果是红色，它可以表明其他异常。

木瓜染色也对其他细胞有良好的染色。这里描述的染色技术有时有助于区分未成熟的生殖细胞和非精子细胞(图. 2.15在第62页和图. 2.16页，第63页)。常规程序已修改，不使用乙醚(固定)或二甲苯(安装)(114))(第2.4.9.3节)。使用帕帕尼科拉乌程序染色的载玻片可以永久安装和存储，以便将来用于培训和内部质量控制计划。如果储存在黑暗中，它们应该能稳定数月或数年。

在本章的最后一部分中还描述了一些其他常见的技术：短染色和快速染色。推荐木瓜巴氏染色的原因是它仍然是最好的评价技术。对于全球使用，必须标准化技术和评估标准。其他技术也可以使用，但可以用标准技术进行适当的评估和验证，特别是用于科学研究。



## 24.93 固定和帕帕尼科拉乌染色步骤

这包括以下步骤。

表2.5 固定和番木瓜染色步骤

固定			
乙醇	95% (v/v)	至少15分钟	来固定细胞；它也会使它们脱水
染色			
1 分级乙醇	80% (v/v) <sup>2</sup>	30秒	逐渐将固定涂片重新水合，允许水溶性苏木精染色
2 分级乙醇	50% (v/v)	30秒	
3 纯化水		30秒	以补充干燥的涂片，以允许水溶性染色
4 哈里斯的海马托克林		4分钟	染色染成蓝色
5 纯化水		30秒	去除未结合的核苏木精
6 阳离子乙醇 <sup>3</sup>		4-8台 <sup>4, 5</sup>	从细胞质中去除非特异性结合的染料（去染色）
7 纯化水		30秒	减少酸度，使蓝色回到细胞核；如果自来水不足，可以使用斯科特的溶液
8 运行冷自来水		5分钟	
9 乙醇	50% (v/v)	30秒	
10 乙醇	80% (v/v)	30秒	使涂片脱水，使乙醇脱水可溶性OrangeG/EA-50染色
11 乙醇	95% (v/v)	至少15分钟	
12 G-6橙色染色		1分钟	把细胞质染成粉红色
13 乙醇	95% (v/v)	30秒	
14 乙醇	95% (v/v)	30秒	
15 乙醇	95% (v/v)	30秒	
16 EA-50绿色染色		1分钟	使细胞质和核仁染色呈粉红色
17 乙醇	95% (v/v)	30秒	
18 乙醇	95% (v/v)	30秒	
19 乙醇	100%	15秒	使染色的涂片逐渐脱水，以允许使用乙醇可溶性安装剂
20 乙醇	100%	15秒	
21 二甲苯			允许使用乙醇不溶性安装剂

<sup>1</sup> 木瓜成分污渍：市售或见第229页第8.4.11节。

<sup>2</sup> 乙醇固定会导致细胞脱水。因此，直接从95%乙醇中固定步骤进行染色的涂片在80%乙醇中可能只需要10秒，而固定后风干的涂片在50%乙醇中必须保持更长的时间（2-3分钟）。

<sup>3</sup> 酸性乙醇：将1.0ml浓缩盐酸加入200ml70% (v/v) 乙醇中。

<sup>4</sup> 一次浸泡对应于大约1秒的浸泡。

<sup>5</sup> 开始四次下降，继续直到结果满意。这是一个关键的步骤，因为染色的持续时间显著地改变了最终的染色强度。如果省略这一步，精子和背景将是暗的。增加下降的数量会使精子和背景变暗。

幻灯片可以查看已卸载或安装（没有或附有覆盖物）。安装载灯片允许长期存储，以便在必要时重新评估，并在内部质量控制 (IQC) 程序中使用。干燥后支架（1.498 - 1.55）的折射率 (RI) 与玻璃（1.50 - 1.58）相似，并且最好的光学质量是使用浸没油，它具有相似的 RI（1.515）。

#### 2494 在安装前处理染色的射精涂片

安装液有两种：乙醇可溶性和乙醇不溶性安装剂。

- 使用乙醇溶性安装介质直接涂在乙醇湿润的涂片上。
- 如果使用乙醇不溶性安装介质，直接从上述步骤19到以下步骤（在通风柜中进行）：
  - 二甲苯替代品：<sup>6</sup> 乙醇，1+1（1: 2） 1分钟
    - 100%二甲苯替代品 1分钟
  - 一次从二甲苯替代染色容器中取下一个载玻片，只排水1-2秒，因为安装时二甲苯应该很湿。

#### 2495 安装染色的射精涂片

通过安装染色涂片，没有显微镜物镜污染的风险。

1. 将盖板（24mm×50mm或24mm×60mm）放在折叠好的纸巾上。
2. 将支架作为哑铃形状放置在盖板上。
3. 然后将载玻片，向下涂片，放在覆盖片上。
4. 按下幻灯片，展开支架。
5. 让安装的涂片水平干燥，覆盖物侧面朝上，在载玻片干燥架中或在通风柜中的吸光纸上过夜。

#### 2496 检查染色的准备工作

##### 精子形态的分类

为了帮助评估精子形态，必须由训练有素的实验室人员定期进行IQC。为了进行实验室间的比较，并实施在其他中心制定的技术和决策限制，也必须参与充分的外部质量评估 (EQAs)。这里推荐的分类是精子是理想的

---

<sup>6</sup>二甲苯有健康危害，不应使用。现在有了替代品，比如“新清晰度”。



（“典型的精子能够到达受精部位”）或异常，基于对精子所有位置的异常的识别。为了进行适当的形态学评估，个体必须熟悉所有标准，这意味着即使实验室选择只报告理想或异常精子的比例，IQC和EQA也必须评估正确识别所有部位异常的能力。在评价精子（95, 99, 115）的形态学正常性时，应采用以下标准。

精子动物由头部和尾巴组成。尾巴中与头部相连的部分和包含线粒体的较粗的部分被称为中间部分。尾巴的其余部分由主要部分（轴索或纤毛被外部致密纤维包围的结构）和具有纵向柱(116)和末端的纤维鞘组成。由于很难用光学显微镜来看到末端，因此可以认为细胞由头部（和颈部）和尾部（中间部分和主体部分）组成。为了使精子没有异常，头部、中部、尾部和细胞质残基必须被认为是正常的。所有的边界形式都应被认为是异常的。

一般来说，头部的形状似乎比确切的尺寸更重要（第80页的第2.5.16节）。需要注意的是，异常大的头部是不正常的：二倍体精子存在，侧头面积~是理想精子头部大小的1.6倍。对正常精子形态的评估最好是通过学习识别整个精子形状的细微变化（正常/边缘性精子的头部和尾巴；图。2.13、2.14和2.15）。

精子发生缺陷和一些附睾病理通常与形状异常的精子百分比的增加有关。形态缺陷通常是混合的。异常的精子通常有较低的受精潜能，这取决于异常的类型，也可能有异常的DNA。形态缺陷与增加DNA片段（117），增加结构染色体畸变的发生率(118)，未成熟染色质(119)和非整倍体(120, 121)强调因此给头部的形式，虽然精子尾巴(中间和主要)也是重要的考虑男性生殖道的理解。

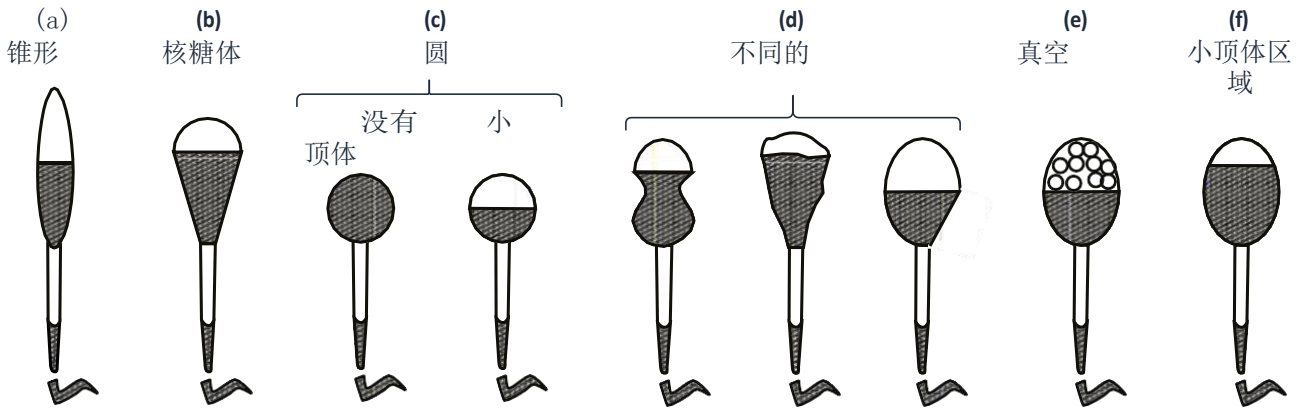
细胞质残基（122）是具有生理功能的人类精子的正常成分。细胞质残基对渗透敏感，在常规空气干燥程序中不能很好地保存。（109, 123）它们在染色制剂中不明显，可能是中间部分的小距离。如果肿胀，它们可能沿着中间部分的长度延伸，通过相位对比、差分干涉对比和x射线显微镜观察精液、宫颈黏液和介质（108, 124）多余残留细胞质与缺陷精子形成过程产生的异常精子有关。这种异常过量的细胞质不应与更多的生理细胞质残基混淆，这些残基可以在射精的直接显微镜下观察到，但在干燥、固定和染色的形态涂片（16）中不能观察到。

卷尾(超过 $360^\circ$ ，图。2.10)可能提示附睾功能障碍（125）。

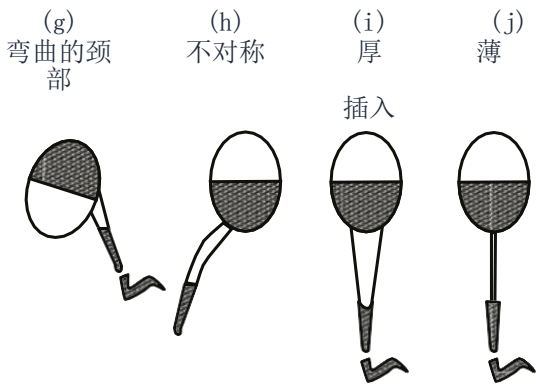


图. 2.10人类精子的某些异常形态的示意图

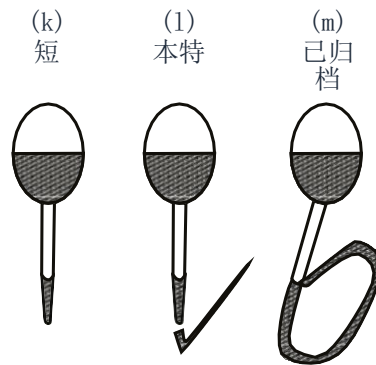
A. 头部缺陷



B. 颈部和中部缺陷



C. 尾缺陷



D. 多余的残余细胞质

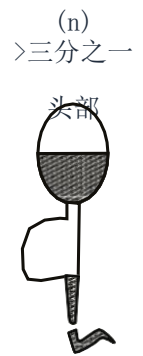




表2.6精子形态分类

位置	正常（理想/典型）外观	异常
头部	头部应光滑，有规则的轮廓，一般呈椭圆形。应有一个明确的顶体区域，占头部区域（96）的40-70%。顶体区域不应该包含较大的区域液泡，不超过两个小液泡，不应超过精子的五分之一头。顶体后区域不应包含任何空泡。	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 顶体小于正常头部面积的40%或大于70%，或</li> <li>• 长宽比小于1.5（圆形）或大于2（细长），或</li> <li>• 形状：梨形（梨形），顶端无定形、不对称或非椭圆形，或</li> <li>• 空泡占头部区域的五分之一以上，或位于顶体后区域，或</li> <li>• 双头，或</li> <li>• 任何组合</li> </ul>
中间件	中间应该细长，规则，与精子头部大致相同。中间部分的主轴应与精子头部的主轴对齐。	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 形状不规则，或</li> <li>• 薄或厚，或</li> <li>• 在头部有不对称的或有角度的插入，或</li> <li>• 急剧弯曲，或</li> <li>• 任何组合</li> </ul>
尾	主体件应沿其长度具有均匀的口径，比中间件更薄，且长约45 $\mu\text{m}$ （约为头部长度的10倍）。如果没有尖锐的角度表明，它可以环回鞭毛断裂。	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 尖锐的弯曲，或</li> <li>• 光滑的发夹弯曲，或</li> <li>• 卷曲，或</li> <li>• 短（断）或</li> <li>• 不规则宽度，或</li> <li>• 多个尾部，或</li> <li>• 任何组合</li> </ul>
细胞质残基	细胞质液滴（不到正常精子头部大小的三分之一）为正常。	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 只有当残留的细胞质超过正常精子头部大小的三分之一时才被认为是异常</li> </ul>

## 精子异常的分类

所感兴趣的类别或区域包括：

- 头（%H）
- 颈部和中部（%NM）
- 尾（%T）
- 多余的残余细胞质（%C）。

可以使用多键计数器，正常（理想、典型），一个异常，四种异常类别（H、NM、T、C）。机械计数器可以用来进入多个异常，通过按下第一个键，同时进入单个观察到的其他异常



精子。通过该操作，每个精子只计算一次，并对每个异常分别评分。

- 从对200个精子的评估中，可以得到理想和异常精子的百分比（两图加起来高达100%），以及每种异常的百分比。%H、%NM、%T和%C（如果评估完成正确，后一个数字的总和应超过100%）。
- 这些异常类别中精子的百分比是通过将该类别中有缺陷的精子总数除以得分的总数得到的。这些数字用于计算畸形精子症指数(TZI)（第86页上的第3.2节）。

#### 其他特定精子缺陷和其他细胞类型的描述

偶尔，许多精子会有特定的结构缺陷。例如，顶体可能无法发育，导致“圆头缺陷”或“球形精子症”。如果在精子形成时，基板不能附着在与顶体另一极的细胞核上，头部就会被吸收，在精液中只发现尾巴（所谓的“针头缺陷”）。针头（游离尾巴）不被视为头部缺陷，因为它们在基板前没有染色质或头部结构。那些精子都显示出这些缺陷之一的患者通常是无菌的。这种病例很少见，但识别和正确报告它们至关重要。如果有许多针头或游离头，就可以确定它们相对于精子的流行率（第2.5.16节和2.5.17节）。

报告相对于精子的存在和流行率：

- 特定的精子缺陷，例如。游离精子头部，针头（游离尾巴），无顶体的头部
- 未成熟的生殖细胞(图。 2.15和2.16)
- 非精子细胞(图。 2.15和2.16)。

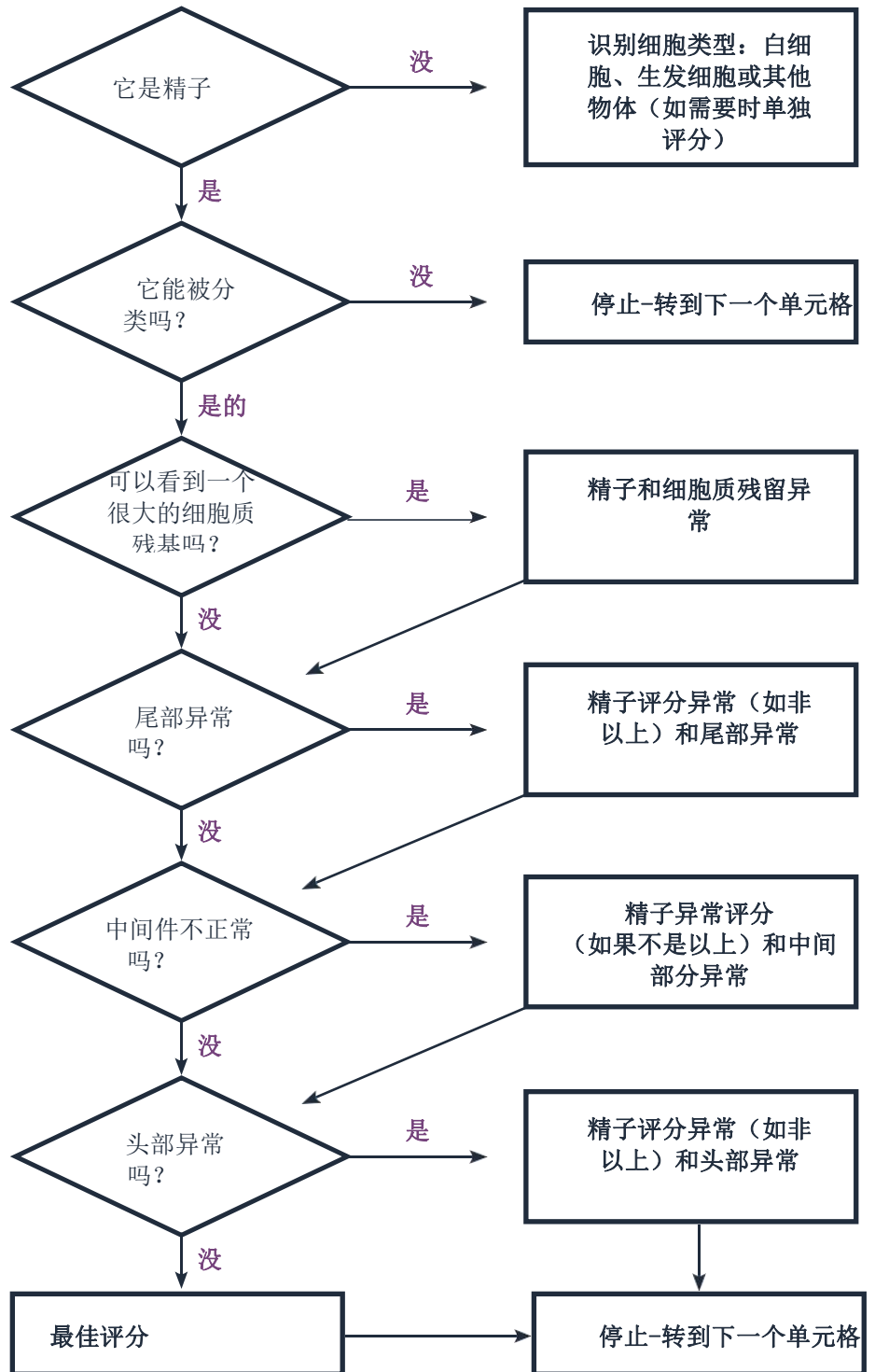
如果有许多这样的缺陷或非精子细胞，它们相对于精子可以确定。

#### 评估人类精子形态的一种结构化顺序

对每个精子进行训练和进行常规分析（126）时的教学顺序评估都是有用的。



图中所示。2.11评估人类精子形态的结构化顺序



\*包括头部和尾部，清晰可见，不与其他细胞或物体重叠

### 显微镜下的评估和结果的计算

根据这里推荐的形态学评估范式，应考虑精子的所有功能区域。没有必要区分头部大小和形状的所有变化，或各种中间件和主要件的缺陷。即使实验室只报告理想精子的比例，实验室的检查员也必须能够识别出所有的异常情况。应对在幻灯片的几个系统选择区域的每个可评估的精子进行形态学评估，以防止对特定精子的有偏选择。

建议首先测量×400总放大率（亮场光学），以获得精子分布和外观、其他细胞、碎片等的一般印象。

详细的评估是使用×100油浸亮场物镜和至少一个×10目镜来完成的。浸入油对于显微镜下的最佳图像是必不可少的（折射率， $RI \sim 1.5$ ）。

1. 评估每个领域中的所有精子，从一个微观场移动到另一个。

- 只评估完整的精子（那些有头部和尾巴的精子）。在精子计数中不包括未成熟的细胞。如果每100只精子超过20只，没有尾巴的头部应该单独统计，并在报告中指出。

- 不要评估有重叠精子或侧面精子的区域。只有当所有的领域都有这样的问题时，才会评估这些领域中的精子，然后在报告中添加额外的评论。

2. 评估至少200个精子，以达到一个可接受的低采样误差。

3. 在实验室计数器的帮助下，测定这四个区域的典型精子或正常精子的数量和异常。

4. 计算：

- 不同区域典型形态的比例和异常的比例；

- TZI（所有异常之和除以异常精子之和，因此其结果总是在1.00到4.00之间）。TZI每个异常精子最多有4个缺陷：头部、中部和主部分各有一个缺陷，另一个是多余的残留细胞质。

5. 报告典型表单对最近整数的百分比，以及小数位的TZI。



图中所示。2.12纸浆板1

板1

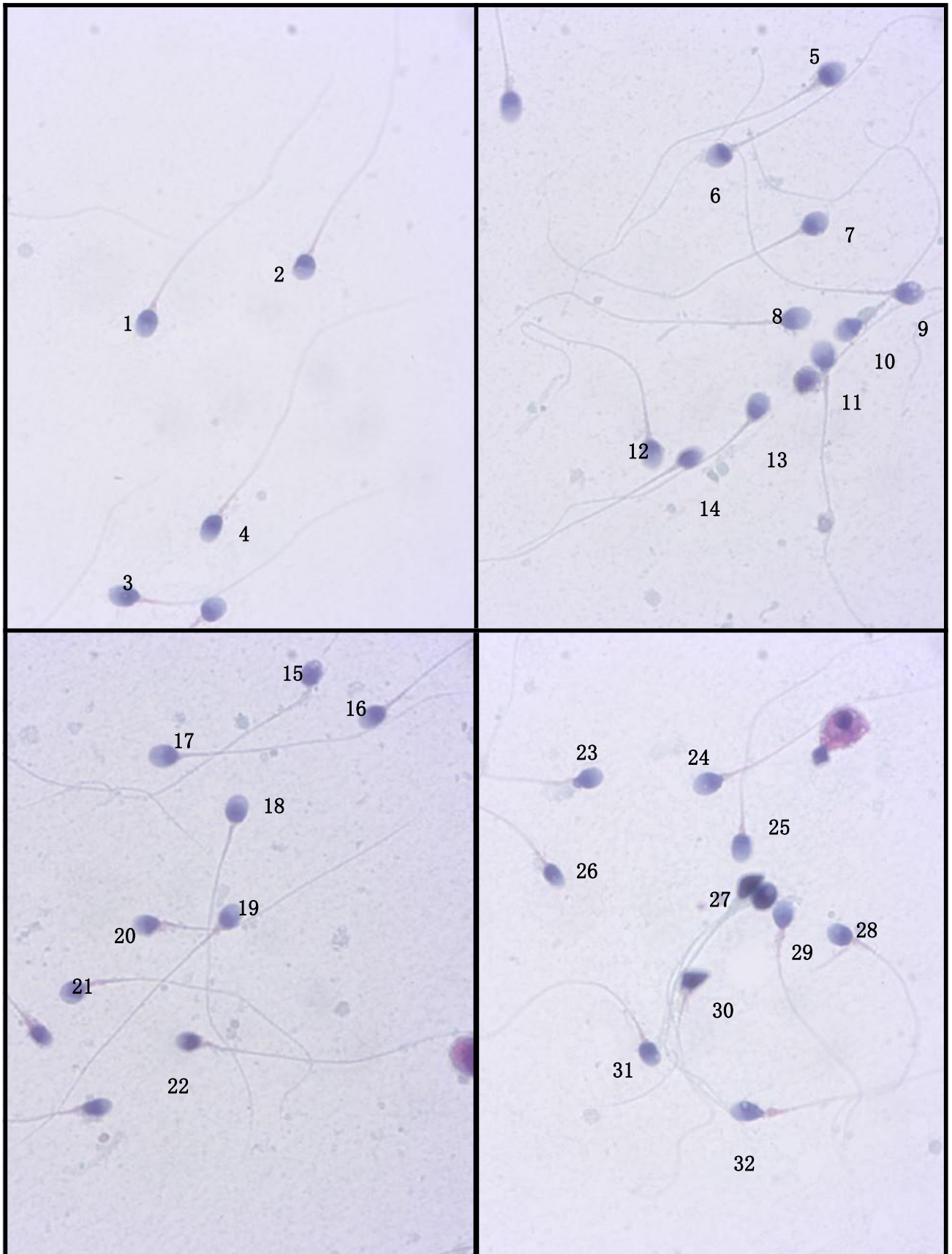


表2.7纸浆板1

	头部形状	其他负责人意见	中间部分评论	主要文章评论	总体精子分类
1	正常		正常	正常	正常
2	异常	无定形	正常	正常	异常
3	异常	无定形	厚	正常	异常
4	异常		正常	正常	异常
5	异常	不是椭圆形的	厚	正常	异常
6	异常	不是椭圆形的	正常	正常	异常
7	异常	PA vac	厚	正常	异常
8	正常		正常	正常	正常
9	异常	vac	正常	正常	异常
10	异常	不是椭圆形的	厚	正常	异常
11	异常	不是椭圆形的	厚	正常	
12	正常		正常	正常	正常
13	异常		thick/bent	正常	异常
14	异常	小	正常	正常	异常
15	异常		厚	正常	异常
16	异常		正常	na	异常
17	正常		正常	正常	正常
18	正常		正常	正常	正常
19	正常		厚	正常	异常
20	异常		厚	正常	异常
21	异常		厚	正常	异常
22	异常		厚	正常	异常
23	异常		厚	na	异常
24	异常		厚	正常	异常
25	正常		厚	正常	异常
26	异常	锥形	厚	na	异常
27	异常	不是椭圆形的	厚	正常	异常
28	正常		厚	正常	正常
29	异常		厚	正常	异常
30	异常	不是椭圆形的	厚	翻了一番	
31	异常		不对称	正常	异常
32	异常	不是椭圆形 /PAvac	正常	正常	异常

图. 2.13纸浆板2

板2

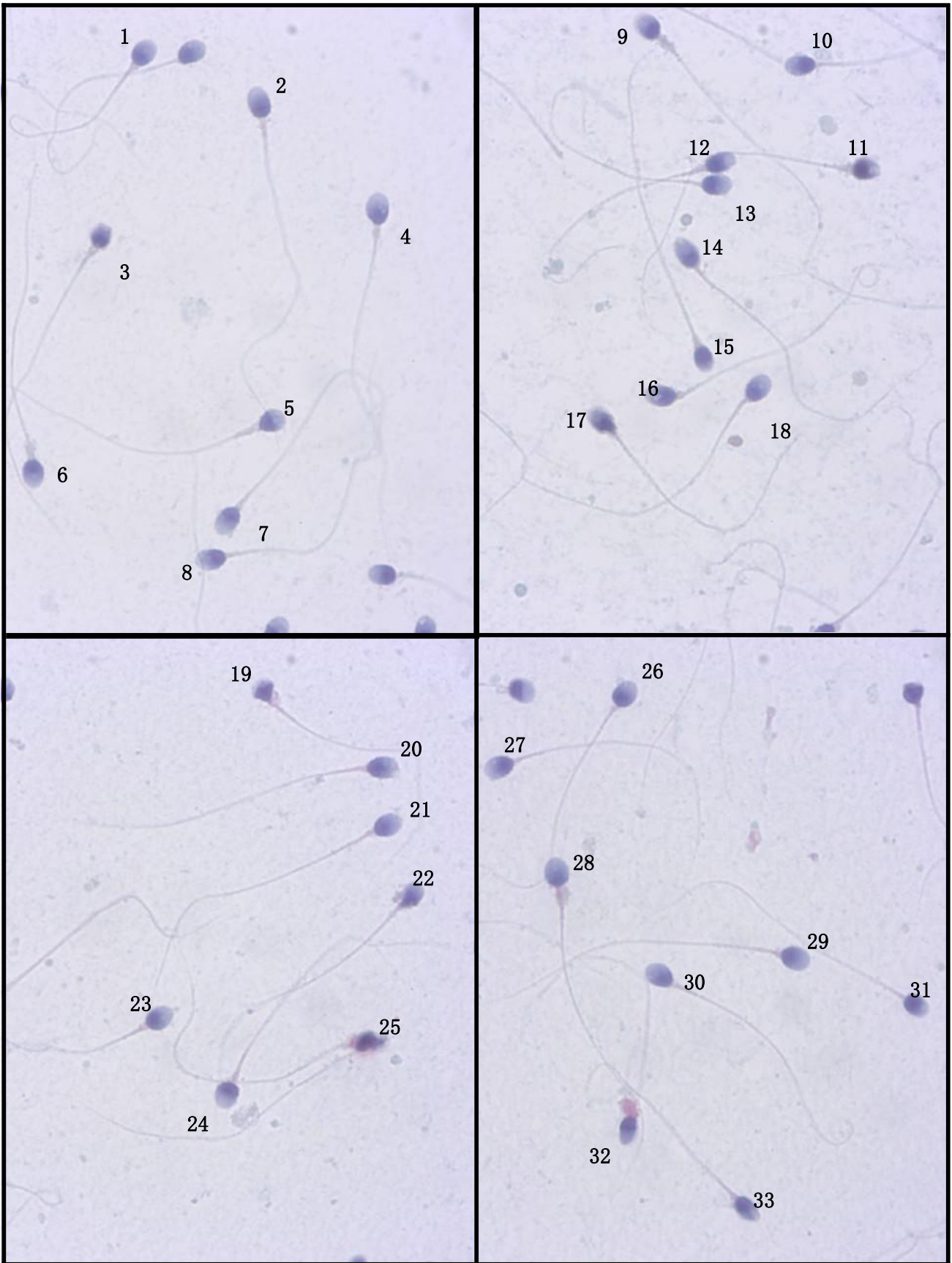


表2.8木瓜糖浆板2

	头部形状	其他负责人意见	中间部分评论	主要文章评论	总体精子分类
1	正常		厚	正常	异常
2	异常		正常	正常	正常
3	异常		厚	正常	异常
4	异常		厚	正常	异常
5	异常		厚	正常	异常
6	正常		厚	正常	异常
7	正常		正常	正常	正常
8	异常		正常	不对称	异常
9	异常		厚	正常	异常
10	异常		正常	na	异常
11	异常		厚	正常	异常
12	异常		厚	不对称	异常
13	正常		正常	na	异常
14	异常		正常	正常	异常
15	异常	小	thick/asymmetrica 1	正常	异常
16	异常		厚	正常	异常
17	异常		厚	正常	异常
18	正常		正常	正常	正常
19	异常		厚	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		厚	异常	异常
24	异常	太宽	厚	异常	异常
25	异常		厚	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		厚	正常	异常
29	正常		正常	正常	正常
30	异常	小	正常	正常	异常
31	异常		正常	正常	异常
32	异常		厚	不对称	异常
33	异常	锥形	厚	正常	异常



图。2.14纸浆板3

板3

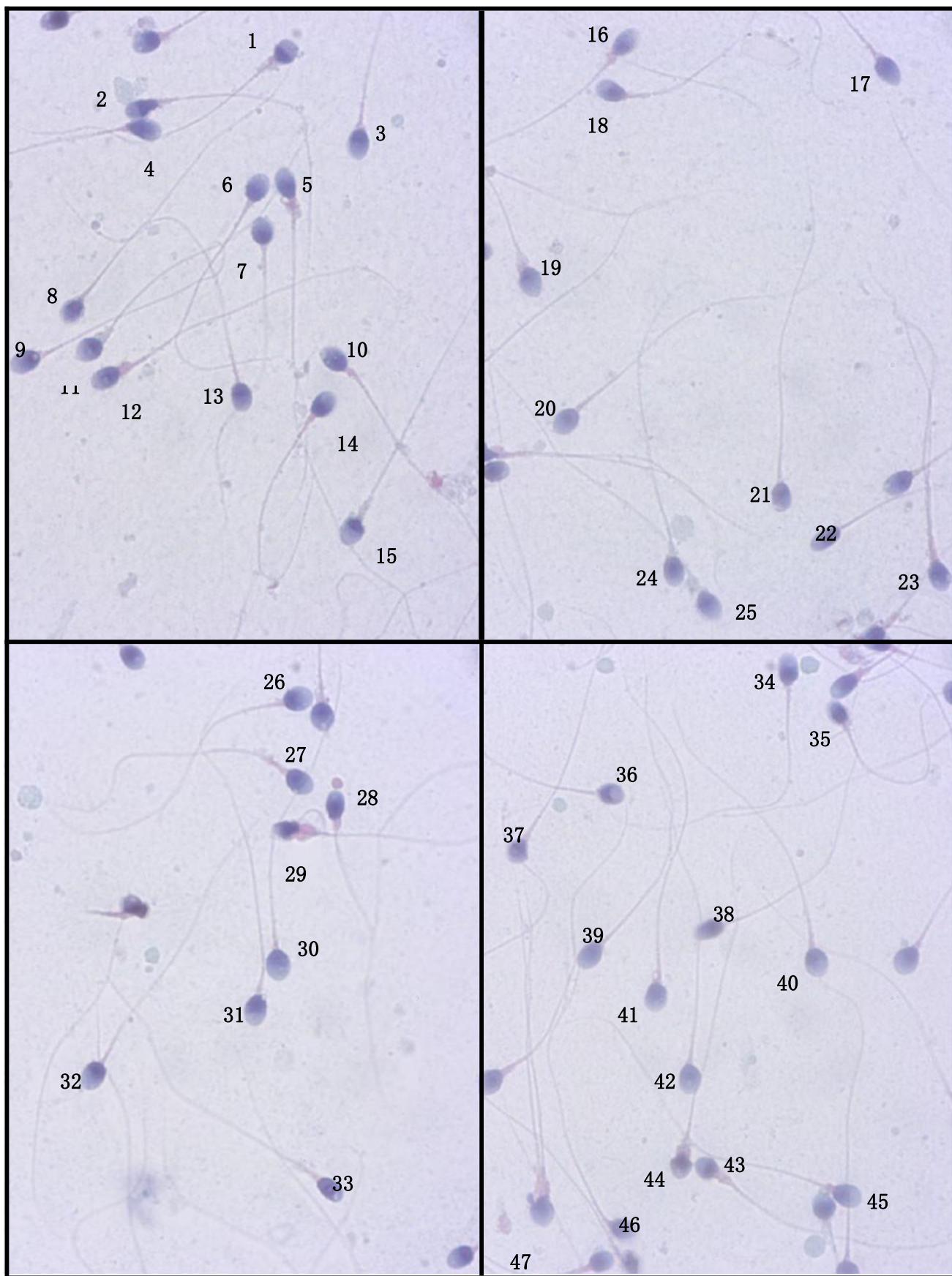


表2.9木瓜粘面板3

	头部形状	其他负责人意见	中间部分评论	主要文章评论	总体精子分类
1	异常		厚	正常	异常
2	异常		厚	弯曲	异常
3	异常		thick/asymmetrica 1	na	异常
4	异常		厚	na	异常
5	异常		厚	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	PA vac	厚	正常	异常
10	异常		厚	正常	异常
11	异常		厚	正常	异常
12	正常		正常	正常	正常
13	异常		厚	正常	异常
14	正常		厚	正常	异常
15	异常		厚	正常	异常
16	异常		厚	正常	异常
17	异常		正常	正常	异常
18	异常		正常	na	异常
19	异常		厚	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		厚	双	异常
24	异常	小	厚	正常	异常
25	异常		厚	正常	异常
26	正常		正常	正常	正常
27	正常		厚	正常	异常
28	异常		厚	弯曲	异常
29	异常	小	厚	正常	异常
30	正常		正常	正常	正常
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

	头部形状	其他负责人意见	中间部分评论	主要文章评论	总体精子分类
35	异常	小	厚	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		厚	正常	异常
42	异常		不对称	正常	异常
43	异常		厚	正常	异常
44	异常		厚	正常	异常
45	异常		厚	正常	异常
46	异常		正常	正常	异常
47	异常		厚	翻了一番	异常

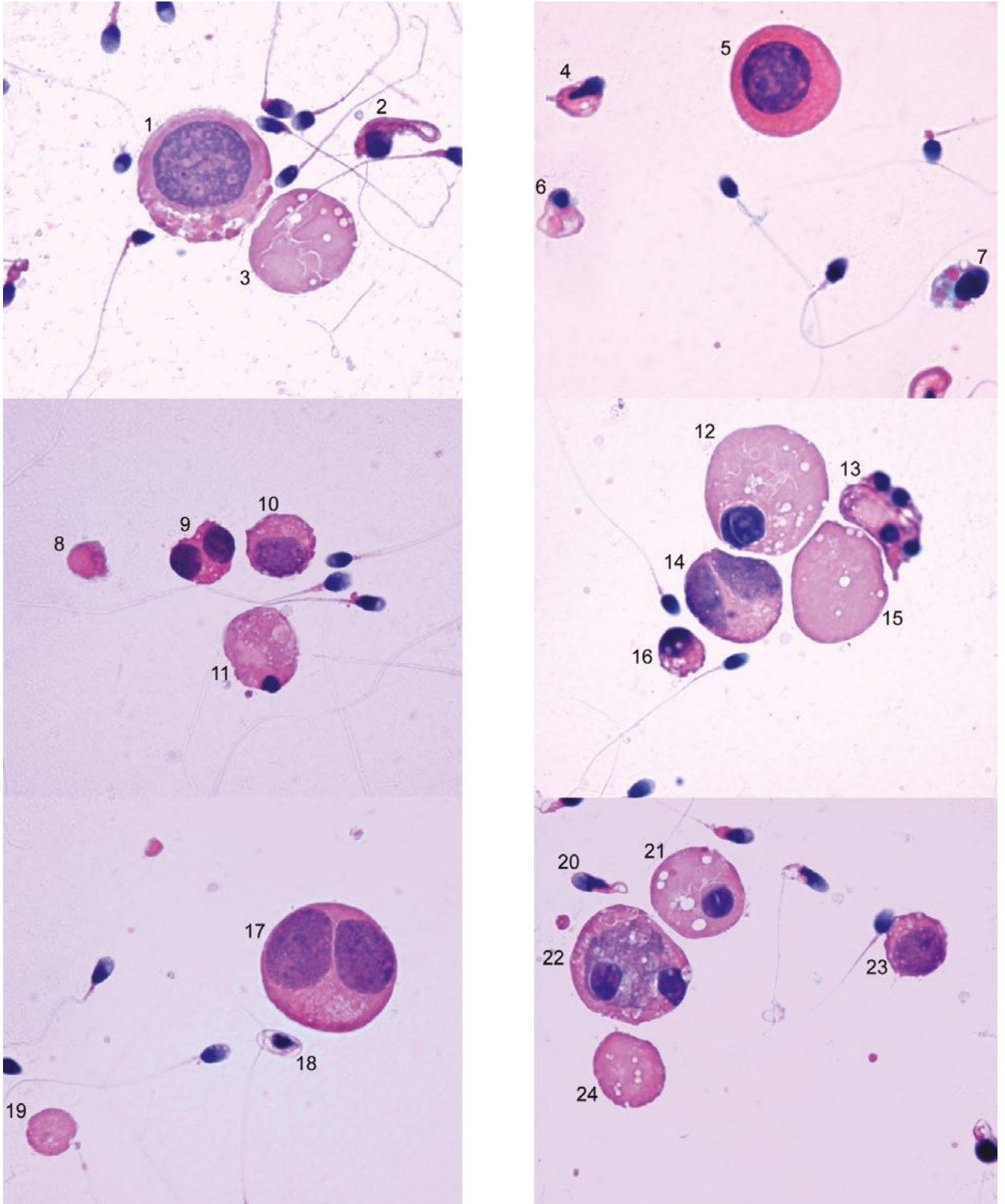
表2.10 木瓜糖浆板4

单元	单元格类型	单元	单元格类型	单元	单元格类型
1	巨噬细胞	9	精子细胞分裂	17	精子细胞分裂
2	精子异常	10	spermatocyte	18	精子异常
3	细胞质	11	去生成精子细胞	19	细胞质
4	精子异常	12	spermatid	20	精子异常
5	spermatocyte	13	去生成精子细胞	21	spermatid
6	精子异常	14	精子细胞分裂	22	吞噬巨噬细胞
7	精子? 细胞质上的头部松动吗?	15	细胞质	23	spermatocyte
8	细胞质	16	去生成精子细胞	24	细胞质

表2.11 木瓜糖浆板5

单元	单元格类型	单元	单元格类型	单元	单元格类型
1	巨噬细胞	7	去生成精子细胞	13	去生成精子细胞
2	精子异常	8	去生成精胺?	14	去生成精子细胞
3	(分隔) 精子细胞	9	去生成精子细胞	15	去生成精子细胞
4	(分隔) 精子细胞	10	去生成精子细胞	16	巨噬细胞
5	细胞质	11	巨噬细胞		
6	不可分类	12	去生成精子细胞		

图。2.15纸浆板4



1. 介绍

2. 基本检查

3. 延长检查  
时间

4. 高级考试

5. 精子制备技术

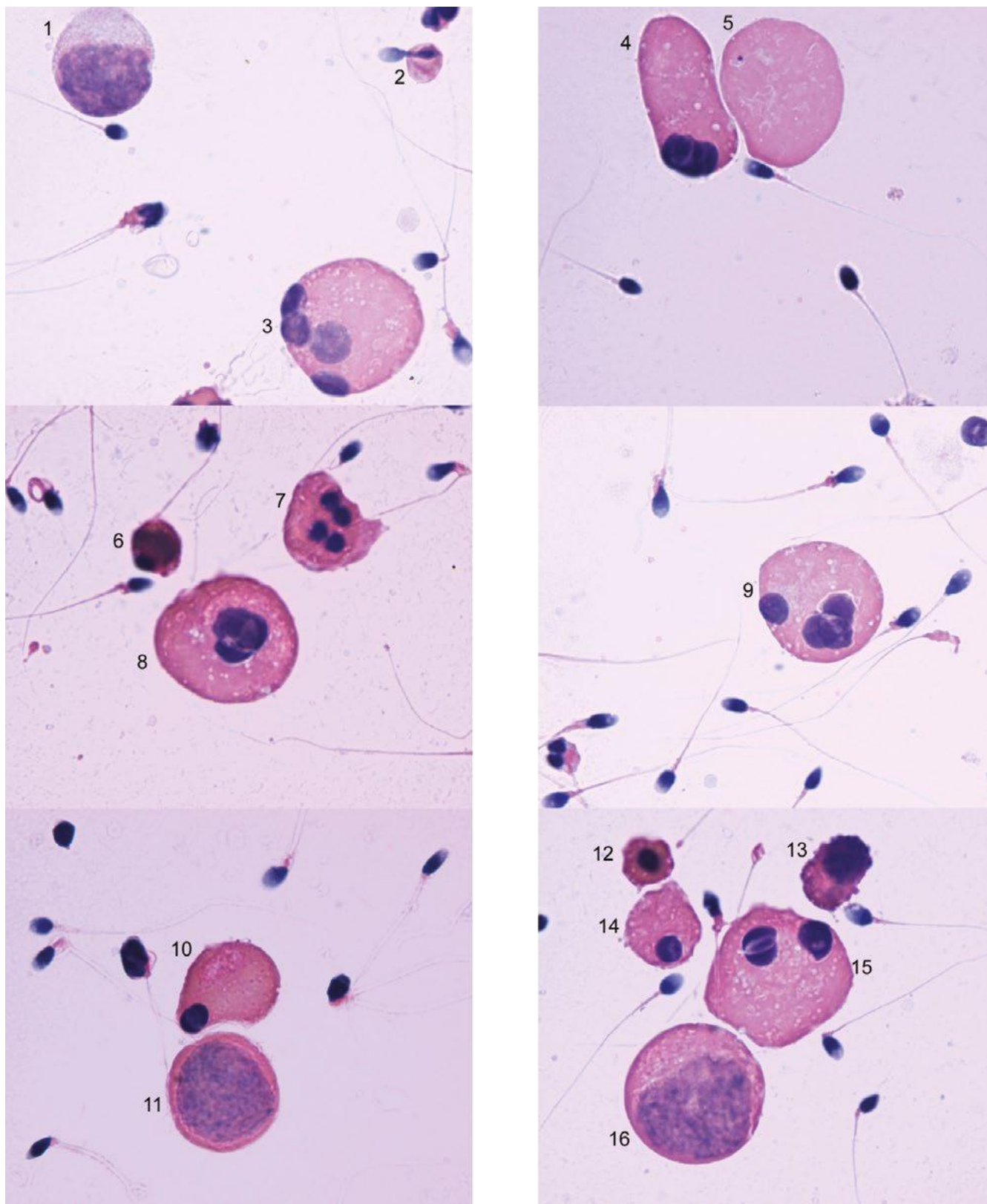
6. 精子的低温保存

7. 质量保证和质量  
控制

8. 附录

9. 参考文献

图。2.16木瓜板5



## 2.5 其他信息和意见

### 2.5.1 射精量评估的背景

- 使用测量移液管测量的体积总是受到0.3-0.9ml（50, 51, 127）损失的影响。体积移液管内也可能有不可见的气泡，导致射精体积高估射精体积。此外，移液管本身的一些体积会损失，这可能会导致其他低体积射精评估的困难。
- 精液容量低是射精管阻塞或先天性双侧输精管缺失 (CBAVD) 的特征（128-131），在这种情况下，精囊也发育不良。
- 精液容量不足也可能是收集问题（部分射精损失）、部分逆行性射精或雄激素缺乏的结果。
- 高精液容量可能反映了附属器官活动性炎症情况下的活性渗出。

### 2.5.2 同性恋问题

- 偶尔的样本可能不会液化，这使得诊断性精液评估几乎不可能进行。在这些情况下，额外的治疗、机械混合或酶消化可能允许进一步的评估，但这些操作将影响精浆生物化学、精子活力和精子形态，并且必须报告它们的使用。在计算精子浓度时，必须考虑到精液与培养基的稀释程度。应使用精液的正移位移液，以获得最好的准确性。
- 一些样品可以通过加入等量的生理介质或杜尔贝科磷酸盐缓冲盐来诱导液化，见第227页第8.4.5节，然后重复温和的移液。然而，添加培养基将改变精子的活力和浓度，以及生化标志物。
- 通过通过连接在注射器上的钝计18（内径0.84mm）或计19（内径0.69mm）针头重复（6-10次）温和通道，可以减少不均匀性。然而，这是不推荐的，因为剪切力可能会损害精子，从而对DNA完整性（132）产生负面影响。
- 菠萝蛋白酶是一种广泛特异性的蛋白水解酶( EC3.4.22.32)，通过其消化可能有助于促进液化，但会改变生化标志物和精子活力。在杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水中制备10IU/ml菠萝蛋白酶（227页第8.4.5节）；难以溶解，但混合后，大部分应在15-20分钟内溶解。用10IU/ml溴蛋白酶稀释精液1+1（1:2），用移液管尖端搅拌，37°C孵育10分钟。在进一步分析之前，先混合样品。



## 2.5.3 替代的粘度评估

- 或者，可以通过在样品中引入玻璃杆并观察杆抽出后形成的螺纹的长度来评估粘度。
- 与部分未液化的样品相比，粘性射精标本表现出均匀的粘性，其一致性不会随时间而变化。高粘度会阻碍对精子活力和浓度的正确评估、抗精子抗体的检测和生化标志物的评估。降低粘度的方法与处理液化问题的方法相同（第64页第2.5.2节），因此会影响射精特性的几个方面。即使这样可以提高粘度，也会影响射精检查的结果。

## 2.5.4 邻接pH

- 如果在无精子的射精中，pH小于7.0，则可能存在先天性双侧输精管缺失（129-131, 133），由于共同的胚胎起源，精囊也可能缺失或发育不良，导致体积小和低pH。
- 对于粘性样品，可以使用设计用于测量粘性溶液（134）的pH测量仪来测量少量射精液的pH。

## 2.5.5 样品混合

- 或者，可以通过将样品吸入10次到宽径（直径约1.5mm）的一次性塑料移液管（必要时无菌）来实现混合。然后必须注意不要引起气泡。不要与涡旋混合器混合，因为这样会损害精子。

## 2.5.6 Wet准备原则

- 射精的体积和封面的尺寸（大小和重量）必须调整给固定的准备深度约20毫米，允许精子自由游泳自由（135, 136）更深的准备可能造成困难，因为显微镜焦点深度不会包括整个准备的深度，使精子出现和消失进入和离开焦点。
- 制备的深度 ( $D\mu\text{m}$ ) 是通过除以样品的体积 ( $V, \mu\text{l}=\text{mm}^3$ ) 根据其分布的面积 ( $A, \text{mm}^2$ ):  $D=V/A$  因此，在干净的玻片上体积10ml，覆盖22mm×22mm (面积484mm<sup>2</sup>) 提供了一个深度为20.7 $\mu\text{m}$ 的腔室。

### 2.5.6.1 从扫描湿式制剂中获得未检测到的精子的概率

如果在一份或两种湿制剂中没有检测到精子，那么射精中仍然存在精子的可能性很低，部分取决于射精的总量。通过计算泊松值的置信区间，可以估计出一定数量的未被检测到的精子的概率



分布 (137) - 即如果在湿准备中没有发现精子，预计在整个射精中少不到表 2.12 所示的精子数量，概率分别为 95% 和 99.5%。该表显示了不同体积和一种或两种 10 μl 湿制剂的检测结果。

表 2.12 扫描湿制剂中未检测到的精子的概率

邻接体积 (ml)	未检测到的精子 (95%置信区间)		未检测到的精子 (99.5%置信区间)	
	10 μl	20 μl	10 μl	20 μl
1	300	150	530	265
2	600	300	1060	530
4	1200	600	2120	1060
8	2400	1200	4240	2120

### 2.5.6 离心后未检测到的精子的概率

如果在离心颗粒的一个或两个湿制剂中没有检测到精子，那么在射精中仍然存在精子的可能性很低，这部分取决于射精的总量。一定数量的未检测精子的概率可以估计通过计算值的泊松分布 (137) ——意味着如果没有发现精子在湿准备，少于表 2.13 所示的精子数量预计在整个射精分别以 95% 和 99.5% 的概率。该表显示了不同体积和一种或两种 10 μl 湿制剂的检测结果。表中离心浓度计算为 1 ml ~ 50 μl (20×)。

表 2.13 离心后未检测到的精子的概率

邻接体积 (ml)	未检测到的精子 (95%置信区间)		未检测到的精子 (99.5%置信区间)	
	10 μl	20 μl	10 μl	20 μl
1	15	8	27	14
2	30	15	53	27
4	60	30	106	53
8	120	60	212	106

### 2.5.7 精子凝集素

- 凝集的存在并不足以推断不孕症的免疫原因，但提示存在抗精子抗体；可能需要进一步的检测（第 119 页第 3.7 节）。
- 严重的凝集会影响到对精子活力和浓度的评估。





## 2.5.8 精子计数室

- 精子动物很容易粘在玻璃表面。因此，彻底的清洁是必要的。
  - 用水和洗涤剂清洗血细胞计数室和盖子。
  - 轻轻摩擦网格表面将去除之前样本中的任何残留的精子。
  - 使用后用组织好好干燥，因为任何干燥的残留物都能抑制加载。
  - 根据现有的健康和安全法规，应抵消被潜在感染剂污染的风险，例如，将可重复使用的房间和覆盖物浸泡在消毒剂中过夜（第219页第8.2.5节）
- 可处置室可用于测定精子浓度（86, 138-141），但它们可能产生与改进的纽鲍尔血细胞计不同的结果。
- 由于流（142, 143）的作用，浅室（通常由毛细血管作用填充的20 $\mu\text{m}$ ）的精子没有均匀的分布，这可能会纠正这个（143），但不建议（144）。

## 2.5.9 高功率显微镜场的面积和体积 (HPF)

在每个微观视野中观察到的精液体积取决于制备的深度和视野的面积（ $\pi r^2$ ，其中  $\pi$  约为3.142， $r$ 为微观场的半径）和腔室的深度（湿制备为20.7 $\mu\text{m}$ ）。微观场的直径可以用舞台微米来测量，也可以通过将目镜的孔径直径除以物镜的放大倍数来估计。

对于 $\times 40$ 物镜和孔径为20mm的 $\times 10$ 眼部，显微镜场的直径约为500 $\mu\text{m}$ （20mm/40）。在本例中， $r=250\mu\text{m}$ ， $r^2= 62\ 500\ \mu\text{m}^2$ ； $\pi r^2= 196\ 375\ \mu\text{m}^2$ ，体积为4 064 962  $\mu\text{m}$ 或约4nl。

使用 $\times 20$ 物镜和孔径为20mm的 $\times 10$ 眼部，显微镜场的直径约为1000 $\mu\text{m}$ （20mm/20）。在本例中， $r=500\mu\text{m}$ ， $r^2= 250\ 000\ \mu\text{m}^2$ ， $\pi r^2= 785\ 500\ \mu\text{m}^2$ ，体积为16 259 850  $\mu\text{m}$ 或约16nl。

## 2.5.10 射精收集血管的毒性试验

选择至少5个精子浓度高、精子活力良好的射精液。射精必须收集在已知的安全容器（控制组）中，然后将一半转移到未知的容器中（测试）中。直接和4小时后评估精子活力（第23页第2.4.6节）。建议使用这个持续时间，因为它是精液暴露在容器中的任何可能时间的两倍。应该使用天然的精液，因为这是相关的暴露的液体。如果对照和测试评估在每个时间点没有差异（通过配对t检验判断 $P>0.05$ ），则可以认为测试容器对精子无毒，并满足精液收集要求。用于诊断性精液分析的其他项目，如移液管尖端，应该测试其效果，并适当考虑暴露时间。



## 2.5.11 无菌收集精液进行辅助生殖和冷冻储存

这是为了进行诊断收集，但要混合的标本容器、移液管尖端和移液管必须是无菌的。法律要求可能会有所不同，但通常需要用于精子制备的程序来减少被微生物和其他颗粒污染的风险。通常需要一个清洁的空间（层流空气罩）和控制空气质量。

## 2.5.12 无菌精液进行微生物分析

众所周知，很难从精液的微生物培养中获得有用的信息。因此，尽量减少来自非精液来源的微生物污染是很重要的。来自皮肤的共生生物)。混合的样品容器、移液管尖端和移液管必须无菌。理想情况下，在对射精进行任何其他评估之前，取等分物进行微生物测试。从收集精液样本到微生物实验室开始调查的时间不得超过3小时。

这个人应该：

- 通过尿液；
- 用肥皂洗手和阴茎，以减少标本被皮肤上的共生生物污染的风险；
- 冲洗掉肥皂；
- 用一条新鲜的一次性毛巾擦干他的手和阴茎；和
- 射精到一个无菌的容器中。

## 2.5.13 替代活力测试

### 2.5.13.1 使用伊红单独进行活力测试

该方法简单快速，但湿准备不能进行质量控制，需要负相对对比光学才能获得可靠的结果。这些光学很难获得，更常见的正相对比使微弱粉红色的头部难以辨别。

制备试剂

1. 0.9% (w/v) 氯化钠：将0.9g氯化钠溶于100ml纯化水中。
  2. 0.5% (w/v) 伊红Y：将0.5g伊红Y（颜色指数45380）溶解于100ml 0.9%氯化钠中。
- 如果一种市售的伊红溶液是一种低渗水溶液，它可以杀死部分精子，并给出假阳性结果（75）。如果使用这样的溶液，使用170mm的生理盐水使其与射精（17）近似等渗。



## 程序

1. 把射精混合得很好。
2. 取出5 $\mu$ l射精，与5 $\mu$ l伊红液结合在显微镜载玻片上。与移液管尖端混合，在载玻片上旋转样品。
3. 立即用22mm $\times$ 22mm的盖子覆盖，离开30秒。
4. 在 $\times$ 200或 $\times$ 400放大倍数下用负相对比光学检查幻玻片。
5. 在实验室计数器的帮助下，测定染色（死亡）和未染色（重要）细胞的数量。
6. 评估200个精子，以达到一个可接受的低采样误差。
7. 计算活细胞的比例。
8. 报告生命精子的百分比到最接近的整数。

## 评分

- 活精子的头部是白色的，死精子的头部被染成红色或粉红色。
- 如果染色仅局限于颈部区域的一部分，而头部区域的其余部分未染色，这被认为是一个“渗漏的颈部膜”，而不是细胞死亡和细胞膜完全解体的迹象。这些细胞应该被评估为活的。

## 25.132 使用低渗透性肿胀法进行的活力试验

作为染料排除的替代方法，低渗透肿胀试验可用于评估活力（145）。这在必须避免精子染色时是有用的，

e. g. 当选择精子进行细胞浆内精子注射 (ICSI) 时。低渗透膨胀试验假定，只有细胞膜完整的细胞（活细胞）才能在低渗溶液中膨胀。细胞膜完整的渗透动物在低渗透培养基中5分钟内膨胀，所有鞭毛形状在30分钟（146）后稳定。

- 使用30分钟的孵育时间进行常规诊断。
- 当精子被处理进行治疗时，使用5分钟孵育。

## 制备试剂

1. 诊断用膨胀溶液：将0.735g柠檬水钠和1.351gd-果糖溶解于100ml纯水中。

- 该溶液的1毫升等分可以在-20 $^{\circ}$  C下冷冻。

2. 对于拟用于医学辅助生殖 (MAR) 的精子，用适当的无菌纯化水稀释培养基，使用1+1 (1: 2)。



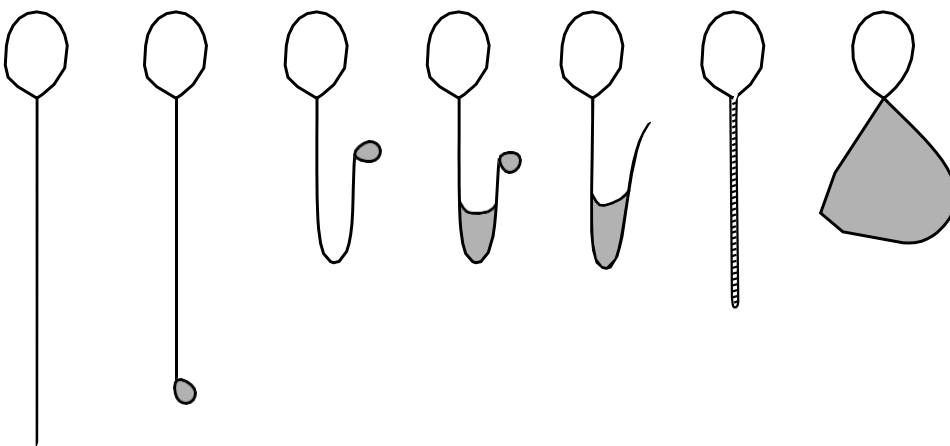
程序

1. 解冻冷冻膨胀液，使用后再使用。
2. 将1ml膨胀液或1ml1+1（1：2）稀释的培养基在封闭的微离心管中以37° C加热5分钟。
3. 把射精混合得很好。
4. 取出100μl的射精，加入肿胀溶液。从移液管中吸出，轻轻混合。
5. 在37° C下孵育5分钟或30分钟（见上文），然后将10μl的样品转移到一个干净的载玻片上，并用22mm×22mm的盖子覆盖。
6. 混合精液样本，移除复制样本，与肿胀溶液混合，并准备复制载玻片，如上所述。
7. 在×200或×400放大倍数下用相位对比光学检查每个幻玻片。
8. 在实验室计数器的帮助下，记录未肿胀（死亡）和肿胀（重要）细胞的数量。
9. 评估每个重复中的200个精子，以达到一个可接受的低采样误差。

评分

1. 肿胀的精子是通过细胞形状的变化来识别的，如尾巴的卷曲所示。 **2.16在 第63页）。**
2. 活细胞的区别是精子尾巴肿胀的证据：将所有形式肿胀的尾巴评分为活精子。

图。 2.17低渗透胁迫下人类精子的典型形态学变化示意图 (a) (b) (c) (d) (e) (f) (g)



(a)=无变化；(b)-(g)=各种类型的尾部变化。尾巴的肿胀由孵化的区域表示。

由Jeyendran等人复制。（1984），经许可。

图。2.18低渗透胁迫下精子相衬显微镜下的照片照片



由E. Holmes (147) 提供。

## 2.5.14 替代的形态学染色技术

### 2.5.14.1 较短的染色

Shorr染色提供了与巴氏染色相似的正常形式百分比，但尚未使用WHO (148) 推荐的严格标准进行验证和评估。此外，进行的比较没有评估Shorr染色是否得到与精子适应的巴氏染色相同的结果。

代理

1. 哈里斯的苏木精（参见第231页的第8.4.11.3节）：与帕帕尼科拉乌染色相同。
2. 短期的解决方案：购买现成的或准备如下。将4gShorr粉末溶解在220m150% (v/v) 乙醇中。冷却，加入2.0毫升冰醋酸（通风柜）和过滤器。
3. 醋酸乙醇：加入75ml冰乙酸至75% (v/v) 乙醇。
4. 氨酰乙醇：将5ml25% (v/v) 氢氧化铵加入95ml75% (v/v) 氢氧化铵。

固定风干的射精涂片

在乙酸乙醇或75% (v/v) 乙醇中浸泡1小时。

染色固定的射精涂片，依次将载玻片浸入：

- |                 |                     |
|-----------------|---------------------|
| 1. 自来水          | 12-15台 <sup>7</sup> |
| 2. 海马托克林        | 1-2分钟               |
| 3. 自来水          | 12-15台              |
| 4. 氨酰乙醇         | 10次下降               |
| 5. 自来水          | 12-15台              |
| 6. 50% (v/v) 乙醇 | 5分钟                 |

<sup>7</sup> 一次浸泡对应于大约1秒的浸泡。



- 7. 较短的染色 3-5分钟
- 8. 50% (v/v) 乙醇 5分钟
- 9. 75% (v/v) 乙醇 5分钟
- 10. 95% (v/v) 乙醇 5分钟后

安装染色的射精涂片

载灯片可以卸载或安装，但安装的载玻片可以用于培训、IQC和实验室内比较。此外，当载玻片安装正确时，显微镜物镜没有被污染的风险。

图。2.19 短板

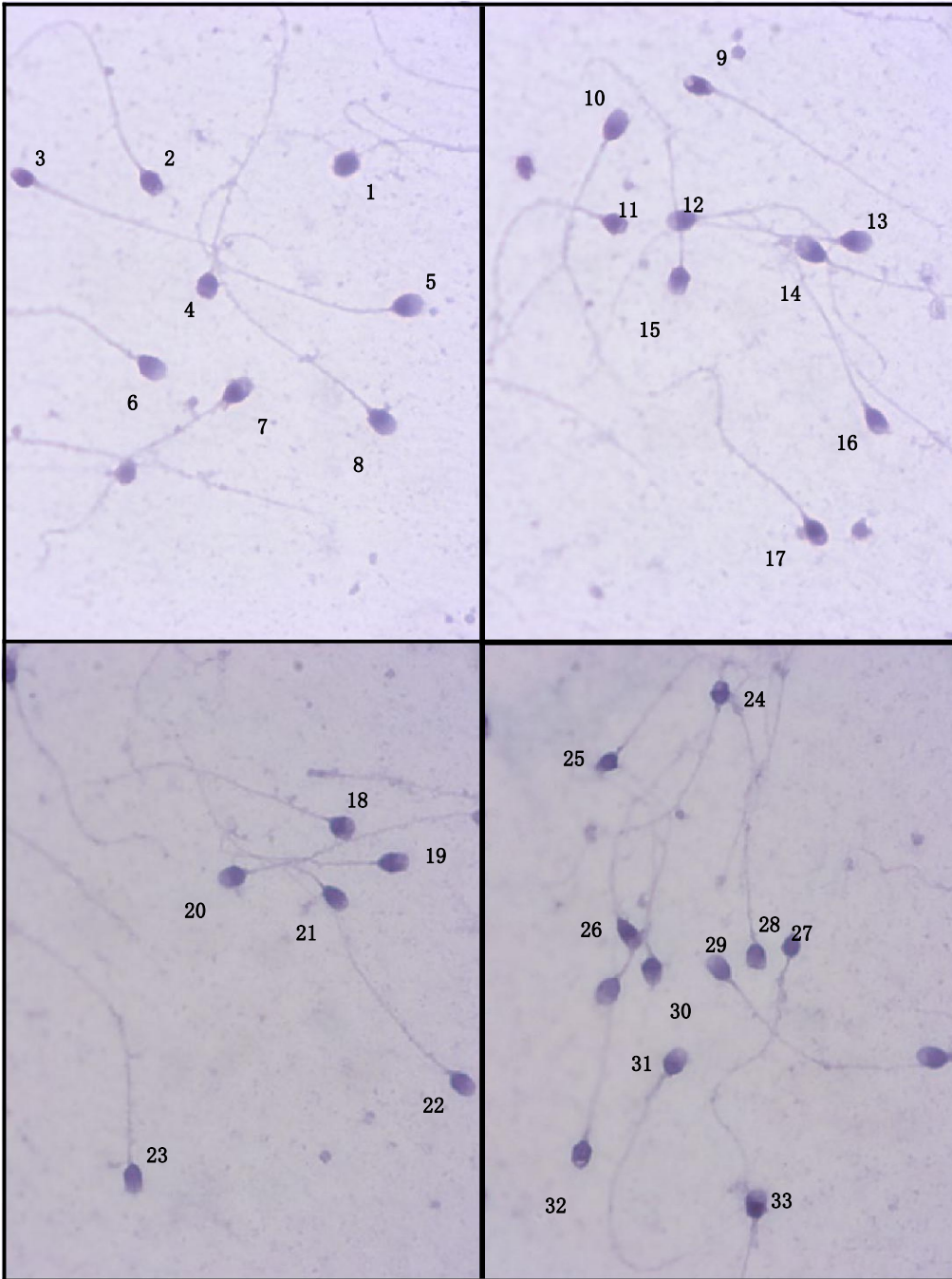


表2.14 短板

	头部形状	其他负责人意见	中间部分评论	主要文章评论	总体精子分类
1	异常	没有顶体	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	太长了	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

## 25.142 快速染色

快速染色法在当天需要结果的时候是有用的。几个差异染色集可用，尽管类似的结果已经报道（149），其他研究指出需要单独的参考限制由于差异检测异常（150, 151）一些涂片染色快速程序高背景染色和质量可能低于那些用木瓜染色。更重要的是，固定和染色精子头的大小与固定和染色精子头的大小不同。

代理

- DiffQuik快速染色试剂盒
- 固定剂：95%（v/v）甲醇单独使用，或1.8mg三芳基甲烷溶解于1000ml95%（v/v）甲醇中。

固定风干的射精涂片

将三芳基甲烷固定15秒或单独95%甲醇1小时。将载玻片垂直放置在吸光剂纸上，排出多余的溶液。

染色固定精液涂片，依次将载玻片浸入：

1. 快速染色溶液1            10秒
2. 快速染色溶液2            5秒
3. 运行自来水                蘸酱以去除多余的污渍

每一步，将载玻片垂直放在吸光纸上，排出多余的溶液。安装染色的精液载灯片可以卸载或安装，但安装的载玻片可以用于培训、IQC和实验室内比较。此外，当载玻片安装正确时，显微镜物镜没有被污染的风险。





图。2.20扩散快速板

扩散快速

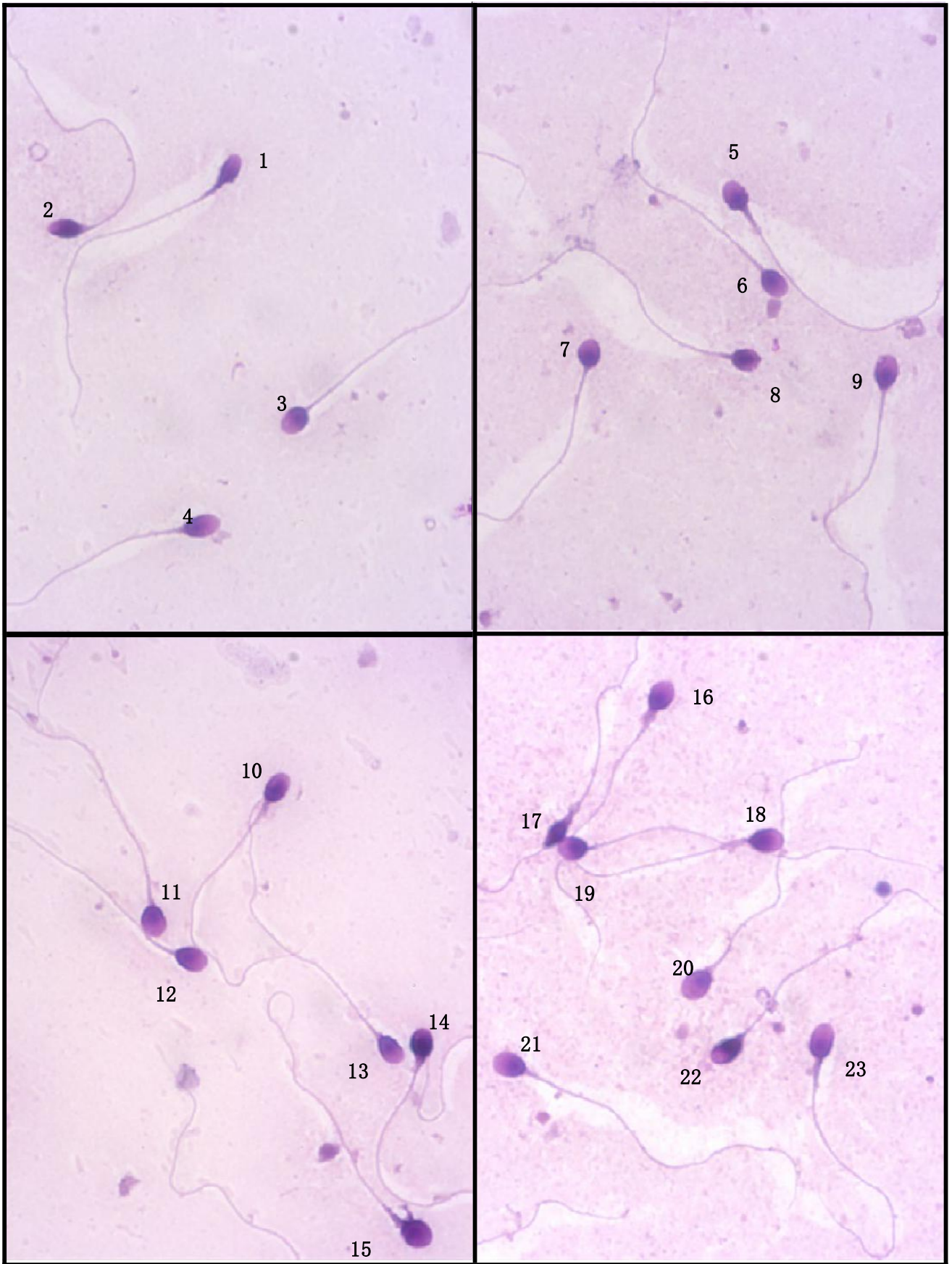


表2. 15扩散快速板

	头部形状	其他负责人意见	中间部分评论	主要文章评论	总体精子分类
1	异常		正常	正常	异常
2	异常		厚	正常	异常
3	正常		正常	正常	正常
4	异常	不是椭圆形的	正常	正常	异常
5	异常	无定形	厚	正常	异常
6	正常		正常	正常	正常
7	异常	不是椭圆形的	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	不是椭圆形的	厚	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	厚	正常	异常
15	正常		厚	正常	异常
16	异常	无定形	厚	正常	异常
17	异常	锥形	厚	正常	异常
18	正常		不对称	正常	异常
19	异常	不是椭圆形的	厚	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	不是椭圆形的	不对称	正常	异常

## 2.5.15 统计学考虑

### 2.5.15.1 在改进的纽鲍尔室的网格中，每个重复获得200个精子

- 如果每HPF湿制剂有10个精子，则会有2.5/n1和250/中央网格。稀释样品1+1（1：2）将背景和精子数量减少到大约125；评估第二个网格将数量增加到大约250，这足以产生一个可接受的抽样误差。
- 这些计算的浓度只是粗略估计，因为精子太少，而且体积也非常不精确。从未稀释的制剂中估计的浓度可以在计数室中来自稀释的样品的浓度的30%到130%之间。

### 2.5.15.2 根据计数的精子总数估计抽样误差和置信限

- 计算过少的精子会产生不确定的结果，这可能会对诊断和治疗产生影响。当精子被用于治疗目的和精子数量较低时，这可能是不可避免的。
- 当精液体积小且精子数量少于推荐值时，所获得的值的精度将显著降低。如果每个重复统计的精子少于200个，则报告如表2.16所示的采样误差。
- 抽样误差是对基于观测次数的结果中预期误差的一种度量。95%置信区间给出了基于观测数量的总体真实值范围的上限和下限。



表2.16根据统计的精子总数，循环抽样误差(%)和95%置信区间限制

观测数(N)	采样错误(%)	95%置信区间限制		观测数(N)	采样错误(%)	95%置信区间限制	
		较低	上			较低	上
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

### 25.153 估计百分比的错误

百分比的估计不仅取决于精子数量(N)，还取决于真实但未知的百分比(p) (二项分布)。对于20到80之间的百分比，近似标准误差(SE)为  $\sqrt{p(100-p)/N}$ 。在这个范围之外，一个更合适的方法是角变换(弧表示平方根)， $z = \arcsin \sqrt{p/100}$ ，标准差为  $1/(2\sqrt{N})$  弧度，这取决于计数的精子数量，而不是真实的百分比。



### 25.154 复制百分比的比较

重复之间的差异大于可接受的，表明存在移液计数错误或错误，或细胞混合得不很好，在腔室或载玻片上非随机分布。对于这些95%置信区间截断值，大约5%的重复将偶然超出限制。精确的二项置信限现在可以由计算机生成，这些限制在本手册中使用，四舍五入以确定假定的概率，e. g. “小于5%”，是正确的。

### 25.155 计算足够数量的精子的重要性

为了减少随机变化的影响，重要的是，评估必须基于足够数量的观察结果（最好是从大约200个重复次数中总共至少400个）（第78页的表2.16）。精子数量估计的精度取决于计数的精子数量。在泊松分布中，计数(N)的SE是其平方根( $\sqrt{N}$ )，精子体积中精子数量的95%置信区间(CI)约为 $N \pm 1.96 \times \sqrt{N}$  (或 $N \pm 2 \times \sqrt{N}$ )。

如果计数100个精子，SE为10 ( $\sqrt{100}$ )，95%CI为80-120 ( $100 \pm 20$ ，或20%)。如果计数200个精子，SE为14 ( $\sqrt{200}$ )，95%CI为172-228 ( $200 \pm 28$ 或14%)。如果计数400个精子，SE为20 ( $\sqrt{400}$ )，和95%可信区间为360-440 ( $400 \pm 40$ 或10%)。

需要注意的是，对于理想形式的临界值为4%，需要评估超过1500个精子才能说明3%和5%是不同的。

### 25.156 重复计数比较背后的统计理论

独立计数之间的差值预计为零，其中SE等于两个计数之和的平方根。因此， $(N_1 - N_2) / (\sqrt{[N_1 + N_2]})$  应该是  $< 1.96$  单独为95%可信区间。

如果给定总和的计数差小于或等于33页表2.3所示的差异，则接受估计，并根据其平均值计算浓度（35页的表2.4）。

较大的差异表明，要么发生了错误计数，要么存在移液错误，要么细胞混合得没有很好，导致在腔室或载玻片上的非随机分布。

当计数之间的差异大于可接受时，丢弃前两个值，准备和评估两种新鲜稀释的精液。（不要计算第三个样本，而是取三个值的平均值，或取两个最接近值的平均值。）

这适用于精子和过氧化物酶阳性细胞的计数（第108页第3.4.1.1节）。对于cd45阳性细胞（第113页第3.4.2节）和未成熟生殖细胞（第118页第3.6节），应对染色制剂进行重新评估。



对于这些95%区间的临界值，大约5%的重复将偶然超出限制。

## 2.5.16 精子措施

目镜微米可能有助于区分正常和异常大小的精子头部。

77个巴帕科拉染色精子的计算机测量变异系数(2-7%)的尺寸如下：中位数长度4.1 $\mu$ m，95%CI3.7-4.7 $\mu$ m；中位数宽度2.8 $\mu$ m，95%CI2.5-3.2 $\mu$ m；中位数长宽比1.5，95%可信区间1.3-1.8。

74个木瓜染色的精子的中间尺寸如下：中位数长度4.0 $\mu$ m，95%CI3.3-5.2 $\mu$ m；中位数宽度0.6 $\mu$ m，95%CI0.5 - 0.7 $\mu$ m。

## 2.5.17 有价值的例子

### 2.5.17.1 计算其他项目的浓度

其他细胞的浓度，例如部分精子（无头尾，无头）可以通过计算精子浓度来计算。如果与精子（HPF相同的体积），可使用以下公式：

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

哪里

C=计算其他细胞、细胞部分或其他感兴趣项目的浓度S=计算精子

浓度

$N_i$ =计数其他单元、单元部件或其他项目的数量

$N_s$ =与需要物品相同体积（区域）中的精子数量。

### 2.5.17.2 精子形态和TZI正常的百分比

在用6键计数器评分的200个精子中，12个精子为正常，188个精子为异常。在188个异常精子中，184个有头部缺陷，102个有中间碎片缺陷，30个有主要碎片缺陷，44个有多余的残留细胞质。



- 正常形式 $12/200=6\%$
- 异常磁头 $184/200=91\%$
- 颈部/中部 $102/200=51\%$
- 异常尾翼 $30/200=15\%$
- 残留百分比 $44/200=22\%$
- TZI  $(184+102+30+44) / 188=1.91$ .

### 25.173 形态学涂片中精子部分或非精子细胞的计算

C=表示其他细胞、细胞部分或其他物品的需要的浓度  
与200个精子相同的非精子细胞或精子部分的=数  
精子的=浓度为每百万毫升  
 $C=S \times (N/200)$  每毫升可以从公式计算。

### 25.174 精子浓度

#### 示例1

用1+1 (1: 2) 稀释, 复制1在2个网格中包含200个精子, 而复制2在2个网格中包含250个精子。在4个网格中, 值(200+250)的和为450, 差值(250-200)为50。从第33页的表2.3可以看出, 这超过了极限差异(41), 这是偶然的, 因此结果被丢弃, 并进行了两个新的重复稀释。

#### 示例2

用1+1 (1: 2) 稀释, 复制1在3个网格中包含219个精子, 而复制2在3个网格中包含180个精子。在6个网格中, 这些值之和(219+180)为399, 差值(219-180)为39。从33页的表2.3可以看出这等于极限差(39), 所以小于单独偶然发现的差, 所以值被接受。

1+1 (1: 2) 稀释后样品中的精子浓度为 $C=(N/n) / 50$ 精子/nl或 $(410/6) / 50=1.37$ 精子/nl或 $1.4 \times 10^6$ 精子/ml精液(至两个显著数字)。

#### 示例3

稀释1+1 (1: 2) 稀释, 复制1在所有9个网格中包含120个精子, 而复制2在所有9个网格中包含140个精子。18个网格中的值之和(120+140)为260, 差值(140-120)为20。从第33页的表2.3可以看出, 这小于极限差(31), 因此接受这些值。



当评估每个腔室的所有9个网格（共 $1.8\mu\text{l}$ ）时，1+1（1：2）稀释的样品中精子浓度为 $C = (21.8) \times 2$ 每 $\mu\text{l} = (260/1.8) 288.8$ 精子 $\times 2 = 288.8$ 精子/ $\mu\text{l}$ ，或 $290 \times 10$ 每毫升精液中的精子（至两个重要数字）。由于计数的精子少于400个精子，报告260个精子的采样误差如表2.3所示（约6.3%）。

#### 示例4

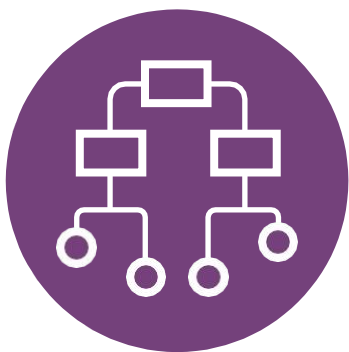
用1+1（1：2）稀释，发现复制1在所有9个网格中都含有10个精子，而复制2在所有9个网格中都含有8个精子。由于在所有9个网格中均发现不到25个精子，浓度为 $<56000/\text{ml}$ ；报告“样本中有18个精子，无法准确测定浓度（ $<56000/\text{ml}$ ）”。

#### 示例5

用1+1（1：2）稀释后，在两个重复中均未发现精子。计数精子少于25个，浓度为 $<56000/\text{ml}$ ；报告“重复未见精子，无法准确测定浓度（ $<56000/\text{ml}$ ）”。







## 第三章： 延长检查时间

3.1 多种精子缺陷的指数.....	83
3.2 精子DNA碎片化.....	86
3.3 遗传和基因组测试.....	105
3.4 与免疫学和 免疫学方法.....	108
3.5 男性白细胞介素标记物的评估 生殖道炎症.....	116
3.6 射精过程中未成熟生殖细胞的评估.....	118
3.7 精子抗体涂层的试验.....	119
3.8 附属性腺功能的生化分析.....	125
3.9 射精顺序的评估.....	135

本章中描述的测试对于常规精液分析是不必要的，但在某些情况下可能用于诊断或研究目的。一些出版物可能表明了基于高相关系数的检验的有效性。然而，即使相关系数很高，要评估检验是否对个体有用，也必须考虑正预测值和负预测值（分别测量正或负结果是真实的概率）。

这里包括的一些测试按照推荐的标准测试进行了描述。为了标准化和明确的建议，本章采用了替代测试。只要建立并解释了与基本检查的关系，实验室就可以考虑使用这种测试来取代建议的基本检查。

“

临床上，越来越多的人认识到，染色体异常和基因突变是各种男性不育的基础，这是在精液分析中看到的许多异常的基础。

”

### 3.1 多种精子缺陷的指数

形态上异常的精子通常有多种缺陷（头部、中部或主部分，或这些缺陷的组合）。详细地评估形态学异常的发生率可能比简单地评估形态学上正常的精子的百分比更有用，特别是



在对人类精子发生损伤程度的研究中，（58, 153）记录形态上正常的精子，以及那些头部、中部和主块异常的精子，在多进入系统中给出了评估的每个精子的平均异常数量。

从多入口系统中头部、中部和主件的详细异常记录中可以得出三个指标：

- 畸形精子症指数(TZI) (104, 154) (如第2章中推荐)；
- 多重异常指数(MAI) (58)；
- 精子畸形指数(SDI) (155-157)。

这些指标与体内生育能力(MAI和TZI) (58, 104) 和体外(SDI) (155)相关，并可能有助于评估某些暴露或病理条件(153, 156, 157)。

### 3.1.1 多种形态缺陷的计算指标

每个异常精子对头部、中部和主块的缺陷以及存在过量的残留细胞质（体积超过精子头部大小的三分之一）进行评分。可以使用实验室单元计数器，输入键的数量适应于正在评估的索引类型。如果计数器不可用，则可以使用一个简单的计分表。

- **TZI每个异常精子最多有4个缺陷：头部、中部和主部分各有一个缺陷，另一个是多余的残留细胞质。本手册给出的形态学标准（参见第54页的显微镜评估和结果计算）。**
- MAI与TZI相似，因为它是基于每个异常精子的平均异常数量。计算中包括所有头部、中部和主要部件异常。用于本分析的形态学标准来自自由（159）修改的(158)，不同于本手册中提供的标准(第41页第2.4.9节)。
- SDI是指缺陷的数量除以精子的总数（而不仅仅是异常的精子）。它包含了几种类别的头部异常，但只为每一个中间件和主要件缺陷。可以使用本手册中给出的形态学标准。

表3.1显示了生成这些索引所涉及的计算示例，以说明它们之间的差异。



表3.1多种精子缺陷指标的计算表

	迈	tzi	SDI
最大值		4.00	3.00
否认者	精子异常	精子异常	所有精子
(A)没有。精子的计数	200	200	200
正常精子(N)	46	46	46
正常精子(%)	23	23	23
(B)没有。有缺陷的精子(200-46)	154	154	154
(1)没有。头部缺陷(MAI、SDI)或具有>1头部缺陷的精子数量(TZI)	284	154	212
(2)没有。中间缺陷(MAI)或具有1个中间缺陷的精子数量(TZI、SDI)	54	52	52
(3)没有。主要件缺陷(MAI)或具有1个主要件缺陷的精子数量(TZI、SDI)	54	46	46
(4)没有。有多余的细胞质残留的精子	14	14	14
(C)总缺陷(1)+(2)+(3) (=C) (MAI)	392		
(D)总缺陷(1)+(2)+(3)+(4) (=D) (TZI、SDI)		266	324
指数计算	C/B	D/B	D/A
索引价值	2.55	1.72	1.62



注：本文对TZI的描述与Menkveld等人的原始论文相一致。(104)和欧洲人类生殖和胚胎学学会(12)和北欧男科协会(160)的手册，它们给出的值在1.00到4.00之间。这与本手册(4)的之前版本的描述不同，其中没有多余的残留细胞质被单独记录，并且给出的TZI值在1.00到3.00之间。解释

### 3.1.2 解释

表3.2给出了在不孕症诊所就诊的男性和在过去三年内有孩子父亲的男性的MAI和TZI的值。应该指出的是，在低生育能力的夫妇中，可生育能力的男性和男性之间存在重叠，这意味着对于这些措施，完全有生育能力和低生育能力的男性之间也没有明显的限制。

然而，应该记住，自发受精或辅助受精的预后并不是评估人类精子形态的唯一用途。定量普通精子产量的男性精子发生障碍提供了进一步的信息，并可能指出睾丸应激、附睾功能障碍，甚至遗传性精子尾巴疾病。在后一种情况下，任何激素刺激都不太可能成功，这对夫妇可以提供临床遗传学调查，以了解后代患疾病的风险。



可育夫妇和不育夫妇的男性伴侣的精子缺陷指数的差异很小，这使得很难使用这些标准来试图用这些指数来区分这些群体。Coutton等（162）回顾的鞭毛(MMAF)（161）的多种形态异常，形态发生缺陷与一系列影响精子功能的遗传缺陷有关。

表3. 2可生育和不育夫妇的男性精子缺陷指数

	不生育的夫妇		铁质夫妇	
	迈 <sup>a</sup>	tzi <sup>b</sup>	迈 <sup>c</sup>	tzi <sup>b</sup>
平均	1.94	1.81	1.58	1.51
标准差	0.37	0.30	0.20	0.20
极小点	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	
N	4 930	103	994	107

未发表的数据来自J. 巴黎，使用David的形态分类（158），由奥杰&尤胡子(2000) (159) 修改。

<sup>b</sup>门克维尔德等人。（2001）(104)。

乔根森等人。（2001）(163)，使用David的形态学分类（158）；由螺旋&小胡(2000) (159) 修改

## 3.2 精子DNA碎片化

### 3.2.1 背景

精子DNA损伤可以定义为DNA正常结构中的任何化学变化。在这些变化中，精子DNA片段 (sDF) 是以单链或双链断裂的形式影响遗传物质的最常见的紊乱之一。SDF可能由不同的过程触发，包括精子发生过程中DNA的包装缺陷、细胞死亡和氧化应激的过程，这些过程可能与几种病理和环境条件有关（164-166）。

虽然含sDF的精子的受精能力可能不会受损，但近年来发表的多项荟萃分析表明，它可能影响自然生殖和辅助生殖的胚胎发育、植入和妊娠（167-170），也知道sDF在射精参数异常的男性中普遍存在，并被认为是与正常精子个体的不孕症有关。由于sDF仅与精液质量（164, 171）部分相关，它可能是男性不育检查的重要补充，成为基础和临床男科中最受讨论、最有前途的生物标志物之一。

已经开发了几种方法来测试sDF，通过进入精子染色质来评估DNA片段的存在。发生单链或双链DNA链断裂)。在过去的20年里，被广泛应用于男科和辅助生殖实验室。

可以用于评估sDF的分析方法在该方法和它们所检测的损伤类型上差异很大。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(Comet)分析直接评估DNA中存在单链或双链断裂，而吡啶橙流式细胞术(AOFCM)和精子染色质分散试验(SCD)检测染色质对酸处理的敏感性。

这些方法的诊断阈值（也称为临界值）将特定于每种检测和执行它的方法。对于临床使用，应由执行实验室确定并验证适当的阈值。对于个体患者的有效性，重要的是不仅要研究人群相关性；需要关于阳性和阴性预测值的数据来评估和验证其在实际临床实践中的有效性。

### 3.2.2 TUNEL 试验

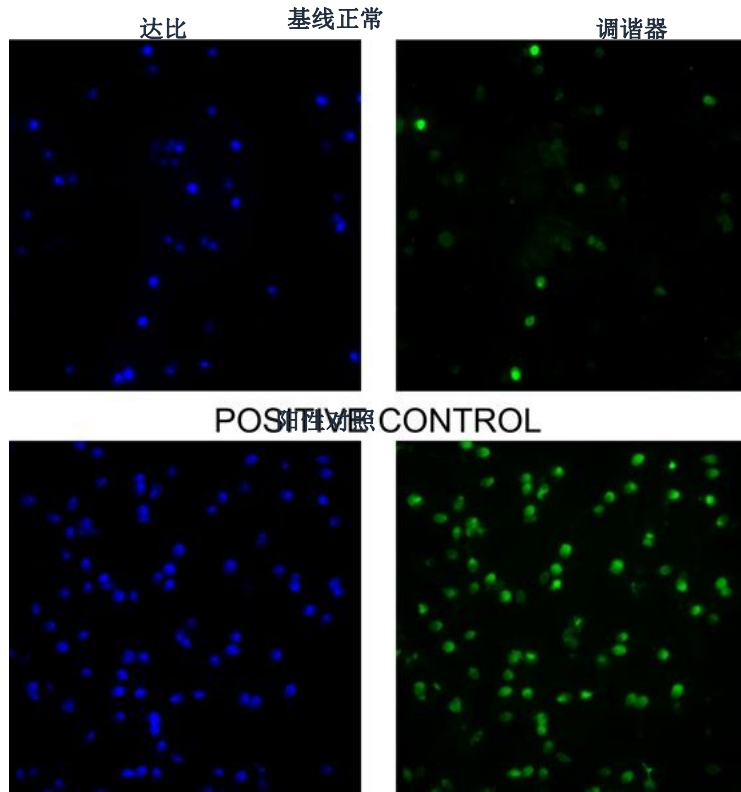
TUNEL检测是评估精子DNA碎片最常见的技术。该方法依赖于通过荧光色素或生物素标记探针原位标记DNA链断裂，与链霉亲和素-HRP（辣根过氧化物酶）和染色体HRP底物一起使用。TUNEL的原理是用脱氧核苷酸（通常是脱氧三磷酸尿苷、dUTP）来标记DNA中存在的断裂。dUTP可以直接偶联到荧光染料上或被生物素标记。

DNA链断裂的3'-OH端作为引物，成为标记在这个过程中与溴脱氧尿苷(Brd-U)反应由模板独立的DNA聚合酶称为末端脱氧核苷酸转移酶(TDT)（172）方法能够直接评估单链和双链断裂，因此越多的DNA链断裂位点存在，越多的标签是合并在一个细胞内。d-UTP是由TDT酶添加到游离的3'-OH端的底物。添加的d-UTP可以直接标记，因此作为DNA断裂的直接标记，或者可以通过使用修饰的d-UTP来放大信号，标记的抗d-UTP抗体可以被吸附（不仅d-UTP还可以使用其他脱氧核苷酸）（173）。



图. 3. 1TUNEL载玻片DNA片段分析

上面的面板显示DAPI染色的精子（蓝色）和荧光染色的DNA（绿色）DNA损伤，显示损伤的基线水平；下面的面板代表阳性对照，几乎所有的精子（蓝色）根据绿色荧光显示DNA片段。



由博士提供的照片。C. 蒙大拿州和布朗。

有几个商业试剂盒提供标记探针和酶TDT探针结合探针所需的DNA断裂。标记后，荧光精子的百分比可以通过荧光显微镜或流式细胞仪测定百分比。在生物素标记的探针中，链霉亲和素-HRP（辣根过氧化物酶）和产生显色的HRP底物对于揭示标记的精子是必需的。用该方法染色的细胞可以在显微镜下观察以进行评价。3. 1)；然而，对于临床精液样本的高通量评估，TUNEL可以与流式细胞术一起使用，这样就可以定量评估精液样本中基因受损细胞的比例。

当使用显微镜时，至少应该对200个精子进行评分。据报道，TUNEL检测的不同步骤的变化可能会极大地影响所获得的措施（174），因此，每个实验室标准化技术并设置自己的临界值是很重要的。

### 3.2.2.1 主要方法

代理

- 人类输卵管液体或较大的，惠顿和惠廷汉姆(见229页附录组成；HTF, BWV)



- 杜尔贝克磷酸盐缓冲盐水（成分见第227页附录；DPBS）
- 含1%牛血清白蛋白(BSA)的DPBS
- DPBS含有0.1%柠檬酸和0.1%柠檬
- 每周用DPBS制备3.7%多聚甲醛
- 300mmTris-HCl、pH微球菌核酸酶3000U/核酸酶-3U/ml酶或重组脱氧核糖核酸酶(DNASE)I。

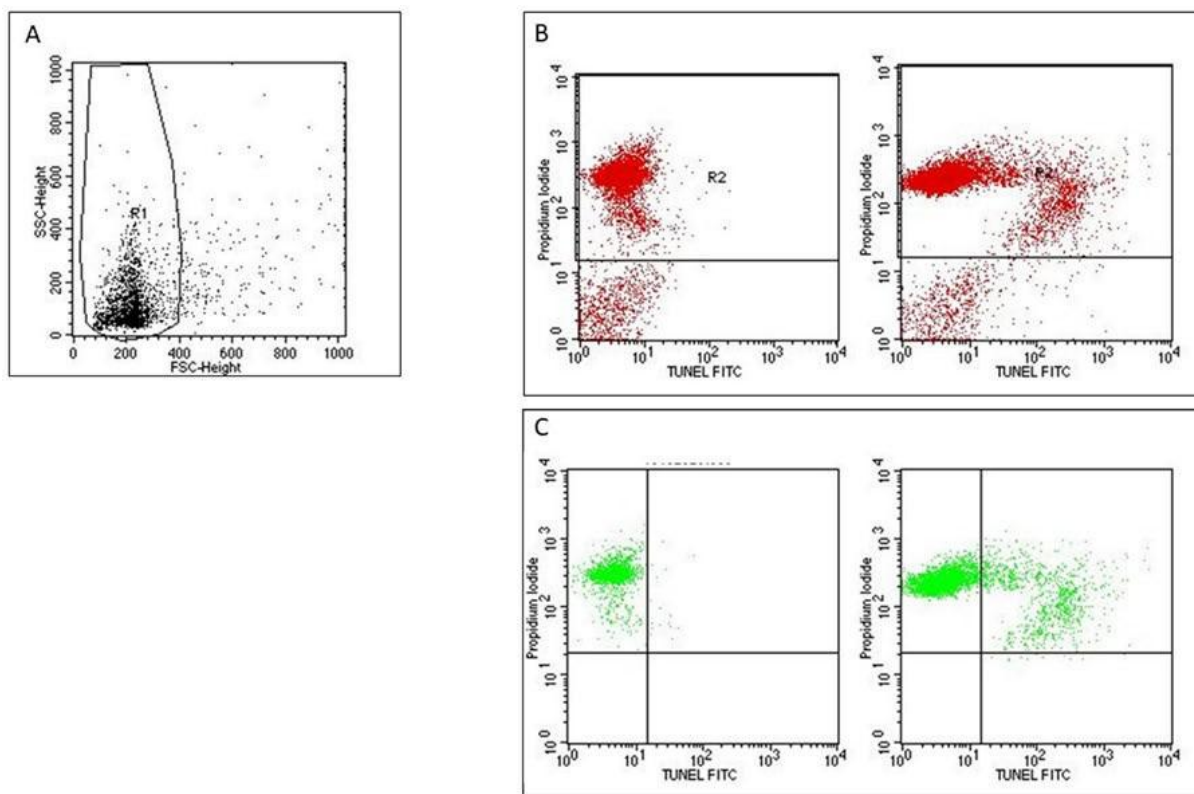
### 程序

1. 等精液，包含至少200万（精子数量低的样本），但最好是1000万个精子，用缓冲液洗涤两次(HTF或BWW，成分见附录；对于200万以下的样品，可以使用荧光显微镜和评估TUNEL阳性精子的百分比)。对于精子数量低于200万的样本，染色程序后，TUNEL阳性精子可以按第92页TUNEL结合荧光显微镜切片进行评分。
2. 小球在500 $\mu$ l多聚甲醛(每周3.7%新鲜DPBS制备)中重悬，室温固定30分钟。
3. 500g离心5分钟，用上述含有1%牛血清白蛋白的200 $\mu$ lDPBS洗涤微球2次。
4. 为渗透精子，加入100 $\mu$ l含柠檬酸(0.1%)和triton(0.1%)的缓冲液，在冰上孵育4分钟。
5. 为停止渗透，加入含有1%牛血清白蛋白的DPBS，500g离心5分钟。
6. 取出上清，用含有1%BSA的DPBS重悬球，分成两个等分，分别为阴性对照(TDT-)和试验样品(TDT+)。
7. 阳性对照可能有助于证明该程序可以识别碎片化的DNA。在这种情况下，应按照上述方法制备另一部分精子，渗透后，与微球菌核酸酶或DNase酶I重组体(3000U/ml-3U/ml在50mmTris-HCl, pH7.5, 1mg/mlBSA)在15-25 $^{\circ}$ C下孵育10分钟，以诱导DNA链断裂。
8. 离心三种等分物(500g后5分钟)，重悬如下：TDT-：仅添加含有标记探针的缓冲液；TDT+和阳性对照：添加含有标记探针和TDT的缓冲液(30个单元或不同商业试剂盒中的其他说明)。
9. 在37 $^{\circ}$ C下孵育(在黑暗中孵育1小时)。
10. 用含有1%BSA的200 $\mu$ lDPBS洗涤2次，然后在DPBS中重悬。最终的DPBS体积取决于显示标记探针的方法。当使用显微镜时，应使用小体积(最大100 $\mu$ l)设置有足够数量精子的玻片，在荧光或光学显微镜下观察。至少应该有200个精子被得分。



- 在流式细胞仪检测，样品应该洗两次，在500u1DPBS重悬，用碘化丙啶染色(PI, 30ug/mlDPBS)或另一个核染色兼容TUNEL的荧光和在黑暗中孵育10分钟在室温下识别有核事件。对于每个样本，必须在包含精子的区域内记录8000-10 000个PI阳性事件(正向光散射/侧光散射(FSC/SSC)绘制的火焰形区域(174)图(图中R1。3.2A)，排除其他细胞(如生殖细胞、火焰外的白细胞)和射精中存在的干扰剂(包括PI阴性事件，如可能存在于R1(174, 175)中的凋亡小体。515-555nm和563-607个波长波段探测器分别显示了绿色荧光(与荧光素结合的核苷酸)和红色荧光(PI事件)。然后绘制一个r2区域，包括r1区域内的所有PI阳性事件(图。3.2B, 左右面板)。在阴性对照中设置了一个DNA片段荧光(TUNEL阳性精子)的阈值，包括99%的PI阳性事件(图。3.2C, 左面板)。然后将这个阈值复制到测试示例中。3.2C, 右面板)计算超过阈值的豌豆绿色荧光阳性事件的百分比，代表DNA片段精子的百分比。

图。3.2流式细胞术分析碘化丙啶和绿色荧光



巴尔地埃里萨贝塔的勇气

在面板A中，包含精子和凋亡的荧光细胞点图中典型的火焰状区域小体(R1)。面板B，绘制了PI阳性事件周围的一个门(R2)，不包括凋亡小体。面板C，左图：设置标记的阴性对照，包括99%的阴性事件。面板C，右：测试样本，其中在阴性对照中设置的标记被翻译。带有DNA片段的精子的百分比位于右上象限。





## 3.2.2.2 替代TUNEL过程

改编自达津凯维奇等人。(176)和Sharma等人。(173)

代理

- 磷酸盐缓冲盐水 (DPBS), pH7.4
- DPBS中的1-3.7% (v/v) 甲醛
- 70%乙醇, pH7.4
- TDT5X反应缓冲液: 1M钾(或钠)碳酸钠, 125mM盐酸, pH6.6, 1.25mg/mlBSA
- Br-dUTP库存溶液: 2mMBr-dUTP在50mMTris-HCl, pH7.5
- 12.5个单位的TDT: 在储存缓冲液中供应: 60mM磷酸钾, pH为7.2, 150mM氯化钾, 1mm<sup>2</sup>-巯基乙醇和0.5%TritonX-100, 50%甘油
- 10mM CoCl<sub>2</sub>
- 倾斜的H<sub>2</sub>O
- 0.1%TritonX-100和5mg/mlBSA溶解在DPBS中
- 荧光素异硫氰酸酯 (FITC)- (或AlexaFluor488) 偶联抗Br-dU单抗溶液: 0.1-0.3μg 荧光偶联抗 Br-dU 抗体, 置在100μl 含0.3%TritonX-100 和1% (w/v) BSA的DPBS中
- PI染色液: 5μg/mlPI, 100μg/mlRNaseA (不含DNase) 的DPBS。协议
  1. 套管1-5×10<sup>6</sup> 精子在0.5mlDPBS, pH7.4中。
  2. 用巴斯德移液管将悬浮液转移到5ml聚丙烯管中, 该管中含有4.5毫升冰冷的1.7%-3.7% (v/v) 甲醛DPBS, pH7.4, 将管在冰上保存30-60分钟。
  3. 300g离心5分钟, 用5mlDPBS重悬精子颗粒。
  4. 再次以300g离心5分钟, 并在0.5mlDPBS中重新悬浮精子颗粒。
  5. 将悬浮液转移到含有4.5毫升冰冷的70%乙醇pH7.4的管中, 然后再次使用巴斯德移液管执行这一步骤。如果有必要或方便, 精子悬浮液可以在-20° C 的乙醇中保存几周。
  6. 200g离心3分钟, 去除乙醇, 并在5mlDPBS中重悬精子。
  7. 再次以300g离心5分钟, 将球重新悬浮在50μl溶液中, 含有:
    - 10μlTDT5X 反应缓冲液: 1M 钾 (或钠) 碳酸盐, 125mM 盐酸, pH6.6, 1.25mg/mlBSA



- 2. 0μl Br-dUTP原液溶液：2mM Br-dUTP在50mM Tris-HCl, pH7.5
  - 0.5μl (12.5个单位) TDT：储存缓冲液：60mM磷酸钾, pH为7.2, 150mM氯化钾, 1mm2-巯基乙醇和0.5% TritonX-100, 50%甘油
  - 5μl的10mm氯化钴
  - 33.5μl蒸馏后的水。
8. 将细胞在37° C的溶液中孵育40分钟。
  9. 孵育时间后，加入1.5ml的冲洗缓冲液：0.1% TritonX-100和在DPBS中溶解的5mg/ml BSA, 300g离心5分钟。
  10. 将细胞颗粒重新悬浮在100μl FITC-(或AlexaFluor488)偶联抗brdu单抗溶液中：0.1-0.3μg荧光偶联抗br-du抗体，在100μl含有0.3% TritonX-100和1%(w/v) BSA的DPBS中。
  11. 室温孵育1小时。
  12. 加入1ml PI染色溶液：5μg/ml PI, 100μg/ml RNaseA(无DNase)(Sigma)。
  13. 室温黑暗孵育30分钟或37° C孵育20分钟。

### 3.2.2.3 结果

#### TUNEL结合流式细胞术

使用488nm激光流式细胞仪分析细胞。测量FITC-(或AlexaFluor488-抗br-du抗体)在530/20nm处的绿色荧光。在>600nm处测量PI的红色荧光。

#### TUNEL耦合到荧光显微镜上

1. 将染色的样品载在载玻片上，并用盖子覆盖。
2. 在荧光显微镜下，在40×物镜下，每个样品至少获得500个精子(激发在460-490nm之间，发射>515nm)。
3. 首先计算PI染色的精子数量(红色)。
4. 计算在同一区域发出绿色荧光(TUNEL阳性)的细胞数量。
5. 计算TUNEL阳性细胞的百分比。

### 3.2.2.4 临床解释

TUNEL可以通过多种方式执行。根据所使用的方案，不同的实验室报告了不同的限制，这些精液被用于区分健康精液样本和与男性不育相关的精液样本(164,

. 173、177-179)因此，每个实验室都应根据阳性和阴性的预测值，使用适当的对照建立自己的参考范围，并明确预测值与什么相关。受孕、流产或其他现象)。

### 3.2.2.5 技术说明

- 为了防止在过程中重复洗涤过程中提取高度碎片的DNA，用甲醛等交联剂预固定是实验成功的关键一步。每一轮实验都必须使用新制备的甲醛。
- 考虑到精子染色质的高浓缩，一些作者建议在TUNEL方案中包含一个染色质去浓缩步骤，以增加检测的敏感性。在该步骤过程中，在步骤5之前，样品重悬在去浓缩溶液(1,4-二硫苏糖醇(DTT)5mm；肝素100U/ml和0.1%TritonX-100在DPBS中)，并在室温(25° C)黑暗中孵育30分钟。有关此过程的更多信息，请参见Antonucci等人。(180)。
- 在每一轮实验中都必须包括阳性和阴性对照，以确保结果的一致性，并丢弃TdT活性的损失、三磷酸溴脱氧尿苷(BrdUTP)的降解以及阴性结果时的其他方法问题。对于阳性精子对照，通过将来自健康供体的样本与100μl的DNaseI(1mg/ml)在37° C下孵育1小时，用DNaseI消化可以诱导DNA损伤。对于阴性精子对照，精子可以在步骤7开始的相同溶液中孵育，但不含TdT。存储这些控制的固定等分物，其中DNA片段百分比之前已经确定，以便将它们与未来要分析的样本批次一起处理。
- 多个离心步骤可能会导致细胞的随机损失；为了尽量减少损失，建议使用聚丙烯或硅化玻璃管。
- 通过在同一管中执行所有步骤(包括固定)，避免细胞静电附着在管表面。在冲洗溶液中加入1%或2%的BSA也可以减少细胞损失。
- 在吸入过程中留下50-100μl的上清液，避免因颗粒紊乱而因不必要的离心而失去细胞。
- 孵化必须在潮湿的环境中进行，以防止人工制品的干燥。
- 如果使用直接标记，荧光偶联的脱氧核苷酸包含在反应溶液中(0.25-0.5nmole/50μl)。在这种情况下，在孵育步骤(步骤8)之后，直接用PI溶液染色精子(步骤12)，并使用所使用的荧光色素的适当的激发和发射波长通过流式细胞仪进行分析。
- 由于染色溶液的活性时间较短(~在4° C时24小时)，在进行检测前准备不超过需要。



- 这些细胞应该尽快进行分析。长时间延迟 (>1小时) 会导致细胞过度染色和降解。
- 改进的TUNEL方法，也包括精子活力评估也被开发出来 (181-183)。

### 3.2.3 精子染色质分散试验

#### 3.2.3.1 背景

精子染色质分散度(SCD)试验是一种评价精子DNA对精子酸变性敏感性的光镜方法。SCD基于的原理是，完整的DNA环在变性和提取核蛋白后膨胀，而当DNA碎片化时，分散不发展或最小。这种方法依赖于完整的精子染色质在暴露于酸和裂解溶液后形成分散晕的能力；这些晕对应于附着在残余核结构上的松弛DNA环，这些环在去除核蛋白后释放。DNA断裂，因为它们容易变性，就阻止了这种分散。该方法包括三个主要步骤：(1)将精子埋入琼脂糖基质中，提供惰性悬浮样底物来操纵细胞；(2)在酸性DNA解溶液中孵育，然后裂解；酸溶液作为DNA变性剂，仅在DNA损伤的情况下溶解DNA双螺旋，裂解溶液用于去除核蛋白；(3)洗涤，增加乙醇浴脱水，并在亮场显微镜(184, 185)下染色可视化。

SCD检测也可作为商业试剂盒，提供检测的所有试剂，以确保其易于应用和技术操作，并在不同的临床实验室提供可重复和一致的结果。

#### 3.2.3.2 主要方法

改编自费尔南德斯等人。(185, 186)

代理

- 1%的低熔点琼脂糖水溶液
- 0.65%标准琼脂糖
- dpb
- 0.08N HCl
- 中和裂解溶液 (0.4MTris、0.8MDTT、1%SDS和50mM乙二胺四乙酸(EDTA)，pH7.5)
- 第二种中和和裂解溶液 (0.4MTris，2M氯化钠和1%SDS，pH7.5)
- 三硼酸盐-EDTA缓冲液 (0.09M三硼酸盐和0.002MEDTA，pH7.5)



- 70%、90%和100%的乙醇
- Wright解决方案（1：1）。

#### 程序

1. 将原精液样品的浓度调整至 $5-10 \times 10^6$  精子/毫升与DPBS。新鲜样品，但可以使用直接液氮冷冻的样品。该检测方法必须对新鲜和冷冻的精子进行验证。
2. 将精子悬液与1%低熔点琼脂糖水溶液（获得0.7%的最终琼脂糖浓度）在37的琼脂糖 $^{\circ}\text{C}$ 混合。
3. 将混合液移入50 $\mu\text{l}$ ，在80 $^{\circ}\text{C}$ 下预涂覆0.65%标准琼脂糖的玻璃片上。
4. 用盖板（24mm $\times$ 60mm），避免捕获气泡。
5. 将滑动片水平放置在寒冷的表面上。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下预冷的金属或玻璃板。
6. 将载玻片放入4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中5分钟，使琼脂糖凝固。
7. 轻轻滑动盖子。
8. 立即将载玻片水平浸泡在含有新鲜酸变性溶液（0.08N盐酸）溶液的托盘中，在22 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗中浸泡7分钟。
9. 将载玻片转移到含有中和和裂解溶液（0.4MTris、0.8MDTT、1%SDS和50mMEDTA、pH7.5）的托盘中，在室温下放置10分钟。
10. 将载玻片放在第二种中和和裂解溶液（0.4MTris，2M氯化钠和1%SDS，pH7.5）中，在室温下孵育5分钟。
11. 小心地用三硼酸盐-edta缓冲液（0.09M三硼酸盐和0.002MEDTA，pH7.5），持续2分钟。
12. 用70%、90%和100%的乙醇连续溶液脱水细胞，每次2分钟。
13. 将滑玻片在室温下或在37 $^{\circ}\text{C}$ 的烤箱中水平干燥。
14. 用一层新鲜染料溶液（含DPBS（1：1）的Wright溶液）覆盖干燥的微凝胶。
15. 保持滑动水平10-15分钟，不时吹动。
16. 分解染料溶液，用自来水轻轻清洗滑片，然后风干。
17. 一旦达到所需的颜色水平，并且载玻片完全干燥，则可以安装在永久安装介质中。



18. 使用100×的浸入式油物镜，用光学显微镜检查样品。建议每个样本至少研究500个精子。

#### 结果

样品中的精子晕可以根据费尔南德斯等人的标准进行分类。(25):

- 大：光晕宽度类似或大于岩芯的小直径
- 中等：晕大小介于大晕和小晕的尺寸之间
- 小：光晕宽度类似于或小于核心小直径的三分之一
- 无晕
- 没有晕退化的：那些没有晕，核心不规则或弱染色的。这类物质与影响DNA和蛋白质化合物的严重损伤有关。

结果应用每个类别的百分比表示。有DNA碎片化的精子的百分比是那些有小晕、没有晕和没有晕降解的精子的总和。

#### 临床解释

SCD测试有一系列的小型研究，希望检查其临床应用，包括(187)对于其他DNA测试，每个实验室都应该建立自己的参考范围使用适当的控制，基于正面和负面的预测值，并明确的预测值相关(例如。受孕、流产或其他现象)。

#### 技术说明

- 使用具有推荐细胞浓度的精子悬液，必须避免琼脂糖基质内的精子细胞重叠，并促进快速评分。
- 如果不仔细控制培养条件，光晕可能会因酸和裂解溶液的作用而丢失，从而产生假阳性。
- 干燥后(步骤13)后，处理过的载玻片可以在室温黑暗下保存在档案箱中几个月或立即染色。
- 缺乏尾巴的细胞核应该被记录下来，但不包括在最终结果中。
- 将细胞悬液与稳定在37°C时的液体琼脂糖混合，以避免细胞受到热损伤。
- 与样本平行，处理一个已知DNA片段水平的对照精子悬浮液作为内部对照。这些对照样品可以用等分物冷冻。



## 3.2.3.3 替代方法

## 代理

- 琼脂糖制备：溶解琼脂糖 (95–100° C 熔化后)，将 100 μl 融化的琼脂糖放入埃彭多夫管中
- **BWW 或 HTF**
- 新制备的酸变性溶液 (0.08N 盐酸)
- 裂解溶液 Tris-HCl 0.4M, 氯化钠 2M, EDTA 0.05M 和 1% SDS, pH 7.5
- 倾斜的 H<sub>2</sub>O
- 70% 乙醇, 90% 乙醇 和 100% 乙醇
- 赖特的缓冲液解决方案。

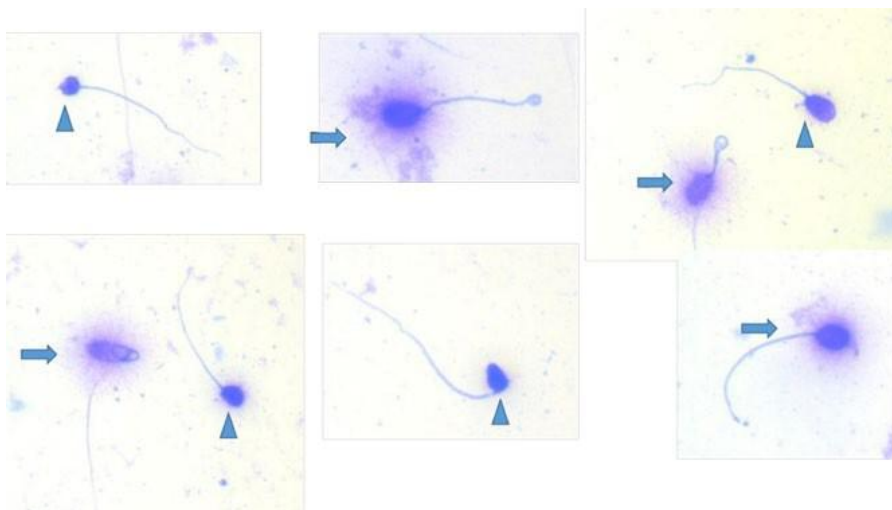
## 程序

1. 用 0.65% 标准琼脂糖预冲玻片，使其凝固。
2. 将精液样品稀释在适当的培养基中 (HTF, BWW)，达到 500–2000–2000 万精子/毫升的浓度。
3. 在含有融化的琼脂糖的埃本多夫管中分配 60 μl 的稀释的精液样本 (其中含有至少 30 万个精子)。混合良好。此步骤必须在 37° C 下执行。
4. 在室温下，37° C 孵育 5 分钟，以降低琼脂糖的温度。
5. 将 8 μl 含有精子的混合物放在预涂层的载玻片上，轻轻地用载玻片盖住 (不按压)。将每张幻灯片在 2–8° C 下放置 5 分钟。
6. 小心拆下滑动盖，向一侧推，然后水平小心拆卸。
7. 用新鲜制备的酸变性溶液 (0.08N 盐酸) 将载玻片水平浸泡在托盘中，在室温黑暗中浸泡 7 分钟。
8. 将变性液中取出载玻片，在 25ml 裂解液 (Tris-HCl 0.4M、氯化钠 2M、EDTA 0.05M 和 1% SDS, pH 7.5) 中浸泡 25 分钟。
9. 用蒸馏水冲洗载玻片 5 分钟，更新一两次。
10. 将载玻片从水中除去，擦拭载玻片背面，放入含 70% 乙醇 (2 分钟)，90% 乙醇 (2 分钟)，最后 100% 乙醇 (2 分钟)。
11. 让所有的幻灯片都干燥。



12. 用10-15滴染色液直接滴在载玻片上染色，等待15分钟后用蒸馏水冲洗载玻片。
13. 晾干载玻片，在40×镜头的光学显微镜下观察。区分具有晕(完整DNA)的精子与具有小或没有晕的精子。3.3. 至少500个精子。

图. 3.3具有（完整DNA、箭头）和无晕（碎片DNA、箭头）的精子



巴尔地埃里萨贝塔的勇气

### 3.2.4 彗星试验

#### 3.2.4.1 背景

彗星分析是一种方法来评估sDF在个人精子基于不同的破碎的DNA链的迁移下电场的影晌取决于电荷和大小链（188, 189）测试的名称与“彗星”出现在荧光显微镜下染色解开的DNA片段脱离精子头部电泳运动。

在这种方法中，精子被嵌入薄琼脂糖基质中，在高盐条件下促进决定诱导的裂解。这种处理去除核蛋白，允许产生类核结构，在碱性条件下允许类核内的双链DNA解开。在随后的电泳步骤中，断裂的DNA链向阳极迁移，产生类似于彗星尾巴的特征色散模式。完整的DNA构成了彗星的头部，而碎片的DNA构成了彗星的尾巴。最后一个元素与头部的相对荧光可以作为DNA损伤（190）水平的测量。

彗星实验的原理是DNA的碱性变性。该检测方法存在于许多不同的变体中；这里提出的程序已经由西蒙发表





和卡雷尔（190）。对于这种方法中的精子，染色质然后被去浓缩。用DTT变性，然后用碱性缓冲液变性。在pH13的“碱性”彗星试验中，男科实验室最常用的（关于使用不同pH的其他方案的pH的回顾，见鲍姆加特纳（191），碱不定位点被转化为DNA断裂。在电泳过程中，DNA链在凝胶中向侧面移动，形成彗星的尾巴。没有断裂的DNA仍然留在彗星的头部。染色后，在显微镜下可以看到彗星状的物体。彗星的评分可以在视觉上（192）或在不同的评分软件（193, 194）的帮助下完成。每张重复的幻灯片至少要得分50颗彗星。也提供商业工具包和检测软件。

### 3.242 程序

### 3.243 代理

- 准备25毫升0.5%正常熔点 (NMP) 凝胶 (0.250克NMP琼脂糖 (0.5%凝胶) 到25毫升DPBS) 和0.5%低熔点 (LMP) 琼脂糖DPBS (0.125克LMP琼脂糖 (0.5%凝胶) 到25毫升DPBS)，融化加热，分别放在45° C和37° C水浴。
- dpb
- 250毫升TritonX-100
- 裂解溶液Tris-HCl 0.4M，氯化钠2M，EDTA 0.05M和1%SDS，pH7.5
- DTT解决方案
- 新鲜碱性电泳溶液 (60ml 10M氢氧化钠+10ml 200mMEDTA，纯水取2000ml)
- 中和缓冲区（请参见第226页上的第8.4.1节）
- 化学计量DNA染料。溴化乙锭，SYBR绿色I或银染色）。



注：溴化乙锭是一种致诱变和致癌的插入染料。SBYRGreenI是一种更安全的插入染料。

### 3.244 程序

改编自Simon和卡雷尔的（190）：

1. 用微波炉加热烧瓶以融化琼脂糖。
2. 将NMP凝胶放在45° C水浴中，将LMP凝胶放在37° C水浴中。
3. 小心地将200μl的NMP凝胶移到载玻片的磨砂侧，立即用盖子盖住，在室温下放在长凳上，使琼脂糖凝固。
4. 调整精子浓度至 $6 \times 10^6$  使用DPBS精子/ml。
5. 非常轻轻地移除覆盖物，以避免移除或干扰琼脂糖层。



6. 放置10 $\mu$ l的精子样本(调整到 $6 \times 10^6$ /ml使用DPBS)加入0.5ml埃本多夫管中，在精子中加入37 $^{\circ}$ C孵育的75 $\mu$ lLMP凝胶。
7. 彻底混合，用移液管在NMP琼脂糖凝胶层上逐滴滴。
8. 用盖子快速盖住，在室温下放在长凳上，使琼脂糖在室温下固化15分钟。
9. 从冰箱中取出裂解溶液，加入250 $\mu$ l的TritonX-100和22.5毫升的裂解原液，并在科普林瓶中彻底混合。
10. 从载玻片上取下盖子，将载玻片在4 $^{\circ}$ C的裂解溶液中浸泡1小时。
11. 将载玻片从科普蛋白罐中取出，加入1.25mlDTT，倒置确保混合，然后将载玻片返回科普蛋白罐中，在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。
12. 将载玻片从科普蛋白罐中取出，加入1.25ml4mM二碘水杨酸锂(LIS)，倒置确保混合，然后将载玻片放到科普蛋白罐中，室温孵育90分钟。
13. 取下载玻片，小心地垂直放在纸巾上排出剩余的液体。
14. 用水平凝胶电泳罐填充新鲜碱性电泳溶液(60ml10M氢氧化钠+10ml200mMEDTA，纯水体积2000ml)。
15. 将载玻片浸泡在缓冲液中20分钟，通过使用20ml注射器加入或去除( $\pm$ 1-20ml)缓冲液，施加25V(0.714V/cm)调整至300mA的电流开始电泳。电泳10分钟。
16. 电泳后，像以前一样将载玻片放在纸巾上，放在托盘上，用三次更换的中和缓冲液，各冲洗5分钟。
17. 彻底沥干载玻片，去除中和缓冲液，并用化学计量的DNA染料染色。在每张幻灯片上添加50 $\mu$ l20mg/mlEtBr)，并盖。
18. 使用显微镜查看载玻片，并分析每张载玻片的50颗彗星(图3.4；3.5)。

### 3.2.4.5 结果

使用适当的彗星软件对每张幻灯片中随机选择的前50个彗星进行评分。然而，不要计算有重叠尾巴的彗星。没有头部的彗星应该被认为是含有100%DNA损伤的精子。



### 3.2.4.6 临床解释

一些研究已经报道了在使用彗星试验进行评估时，sDF的诊断阈值。这些限制差别很大，取决于分析的确切条件下运行和表型调查（195-198）对于其他DNA测试，每个实验室应该建立自己的参考范围使用适当的控制，基于积极和消极的预测值，并清楚的预测值相关（例如，受孕、流产或其他现象）。然而，由于彗星分析涉及多个方法步骤，需要高水平的专业知识来解释结果，并且具有重要的实验室间变异水平，它的使用可能不适合某些实验室。

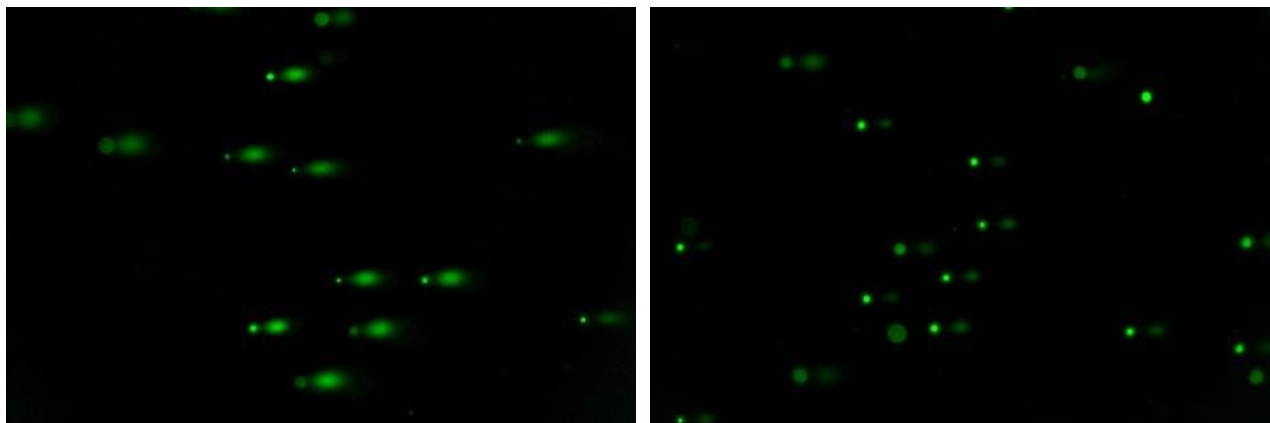
### 3.2.4.7 技术说明

有关更多细节，请参见西蒙和卡雷尔（190）。

- 除非另有说明，所有原液都应用双蒸馏水配制，并在室温下保存。
- 为保持裂解缓冲液的有效性，其储存时间不应超过一周。建议根据目前的需要配制少量的新鲜的缓冲液。
- 由于琼脂糖在微波中融化过程中凝胶中的水蒸发，琼脂糖可以在浓度增加前5-7天使用。
- 如果凝胶在去除盖板时出现裂纹，则可以在不影响试验结果的情况下继续试验。然而，破裂的凝胶更容易滑出。
- 如果琼脂糖凝胶在方案的后续步骤中滑动，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。
- 为了充分裂解精子膜，通过在避免泡沫形成的同时提供温和的运动，确保TritonX-100在裂解缓冲液中的适当混合。
- 确保DTT和二碘水杨酸锂(LIS)在裂解缓冲液中适当混合，以避免假阴性。
- 如果电泳缓冲液不保持在pH13，该方法的灵敏度将会降低。
- 较高浓度的EtBr会增加背景染色，导致迁移的尾部DNA的可见性降低。



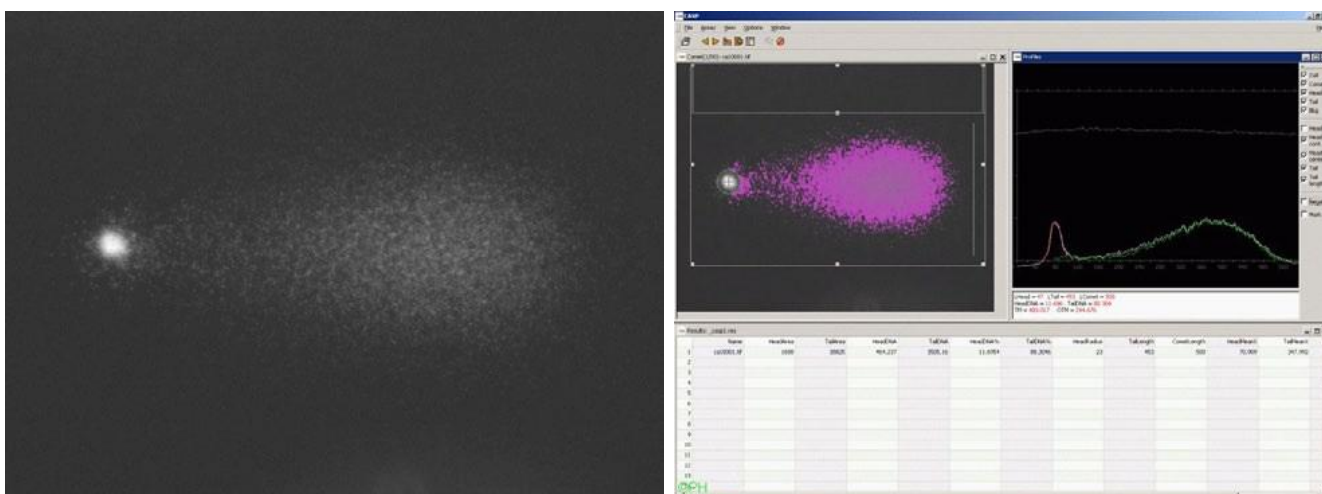
图. 3.4彗星分析来自一个异常的精子与广泛的DNA碎片和缺乏可见的DNA损伤的正常男性用溴化乙锭染色



由多洛雷斯·兰姆和亚历山大·博利亚科夫拍摄。

左面板（异常）描述了一个具有广泛DNA碎片的男性的彗星检测结果。异常样本中的精子显示出明亮的小绿色斑点（即精子头部），“彗星尾”是从精子头部辐射出来的大的、更弥漫性的染色。当与正常男性相比，DNA紧密地包裹在精子头部时，没有看到DNA片段，只有小的明亮的精子头部被染色。

图. 3.5在显微镜下看到的彗星，随后用CASP软件评分（尾部DNA=88%）



由PetrHouska制作的显微照片和分析

### 3.2.5 吡啶橙流式细胞术

#### 3.2.5.1 背景

该方法基于吡啶橙(AO)的独特特性，在插入双链DNA时发出绿色荧光，在与单链DNA相关时发出红色荧光。Evenson（199）描述的当前版本可以用于评估新鲜和/或冷冻样品和

只包括两个主要的方法学步骤。在第一步中，用精子的低pH（1.2）洗涤剂溶液处理，以变性其染色质并允许其随后的后续染色。在第二步中，精子悬液被中和，用含有A0的第二溶液对细胞染色。

通过流式细胞术收集红色和绿色荧光的数据，并进行转换，以确定精子群体中红色荧光的程度，称为DNA片段指数(DFI)。对收集到的数据的分析可以在任何流式细胞术软件中进行。商业分析软件也可用的。

### 3.2.5.2程序

#### 代理

- 低pH值（1.2）洗涤剂溶液：0.08M盐酸，150mM氯化钠，0.1%TritonX-100，用盐酸和/或氢氧化钠调整至pH1.2
- A0染色液中含有纯化的6mg/LA0、0.1M柠檬酸、0.2M磷酸氢二钠、1mMEDTA二钠和150mM氯化钠的溶液，用氢氧化钠调整至pH6.0。使用铝箔或琥珀色玻璃保护溶液免受光照。
- TNE(10TrisCl, 150氯化钠和10EDTA, pH7.4)
- 准备一个冰箱（最好盖上盖子使样品保持在黑暗中），并将A0染色溶液、TNE和酸洗涤剂溶液放入室内(如果评估冷冻样品，样品在冷冻前必须用TNE稀释)。

#### 方法学

改编自Evenson和Jost（199-201）：

1. 解冻参考样品并将其放入冰箱中(有关如何准备参考样品，请参阅Evenson和Jost（201）)。
2. 启动流式细胞仪，运行A0平衡缓冲液15分钟，然后测量参考样品（如何测量样品，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. 稀释样品到 $1-2 \times 10^6$ /ml用TNE放在冰箱中(如果测量冷冻样品，必须用TNE稀释，然后在LN中快速冷冻<sub>2</sub>)。
4. 将200 $\mu$ l稀释后的样品移液管加入试管进行流式细胞术，加入400 $\mu$ l酸性洗涤剂（加入洗涤剂时立即启动秒表），轻轻旋转，并将试管立即放回冰箱。
5. 精确30秒后，加入1.2ml染色溶液，与移液管尖端混合，立即将试管放回冰箱中。
6. 将试管放入流式细胞仪，3分钟后开始在秒表上采集数据。
7. 重复此过程。
8. 让平衡缓冲液在流式细胞仪中流动，并开始准备下一个样品（最多可以批处理6个样品来测量参考样品）。



9. 使用参考样品将绿色和红色光电倍增管的灵敏度分别调整为475和125。
10. 以每秒100-200个细胞的事件速率分析每个样本的5000个精子。
11. 在对所有样品进行评估后，用双蒸馏水冲洗流式细胞仪10分钟，以去除大部分AO。
12. 按照仪器制造商建议的方案清洗流式细胞仪。

### 结果

为了分析数据，通过在前向光散射/侧光散射区域应用一个门来选择精子种群。在随后的步骤中，绿色双链DNA和红色单链DNA荧光细胞图仅用于锁定ao阳性细胞，并从分析的细胞碎片和缺乏遗传物质的凋亡小体中减去。相应地，使用以下公式计算每个ao阳性精子中绿色荧光向红色荧光或DFI的变化：

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

在另一步中，DFI的值用直方图表示，其中，通过使用参考样本，可以在主细胞群的右侧找到中到高DFI的值。右侧细胞的百分比，代表ao阳性事件的总数，被称为%DFI，这是用于临床解释该试验的参数。DFI直方图还提供了DFI的平均值和标准差值。

### 评分和临床解释

一些研究已经报道了吖啶橙流式细胞术测量的DFI诊断阈值（202, 203）对于其他DNA检测，每个实验室都应该根据适当的对照建立自己的预测值的参考范围，并清楚预测值相关（例如，受孕、流产或其他现象）。

### 质量控制

- 流式细胞仪必须每天根据参考精子样本设置，在对患者样本（6-10个样本）进行重复分析后，必须再次与参考样本进行重新校准。
- 为了确保AO与样品管的平衡，AO平衡缓冲液必须在样品测量前和不同样品之间通过仪器流控线运行~15分钟。
- 在评估样本时，如果事件率超过250个事件/秒，则必须准备一个新的样本，以确保AO染料与精子之间的精确平衡。



## 3.3 遗传和基因组测试

在过去的15年里，越来越明显的是，男性不育的相当大比例有遗传或基因组基础。临床上，人们越来越意识到，染色体异常（数量、结构，（包括微缺失和微复制]）和基因突变是各种男性不育的基础，这是在精液分析中看到的许多异常的基础。一些男科实验室进行遗传和基因组检测，尽管这些检测在医学遗传学实验室更常规地进行。大多数基因和基因组诊断测试的方法并不是针对精子相关缺陷的，除了在精子非整倍体测试中，测试精子的方法是独特的，如下描述。

### 3.3.1 精子非整倍体试验

#### 3.3.1.1 背景

非整倍体是指存在通常染色体数目以上或低于一个或几条染色体。通常精子具有一个染色体的单倍体补体（22个常染色体和1个性染色体（X、Y））。在一个非整倍体精子中，有一个或多个常染色体和/或性染色体的丢失或获得。未被选择的不育男性即使在正常的体细胞核型中也表现出精子染色体非整倍体的发生率增加了10倍，这是由于减数分裂期间染色体分离问题导致染色体的增加（二倍）或丢失（零倍）。非整倍体卵母细胞随着母体的衰老而被广泛识别，并产生非整倍体胚胎，导致丢失。唯一与存活但受影响的出生相一致的非整倍体是由于13、18、21、X和Y染色体数量的变化。罗伯逊易位是导致非整倍体精子水平增加的著名原因之一。在这些男性中，可能存在数字染色体异常的积累和不平衡分离产物，（204, 205）具有平衡相互易位的男性也存在风险。... 唐氏综合症的父亲构成优势平衡互惠易位载体（204）增加精子非整倍体也与增加DNA碎片（206）其他主要个体是那些男性伴侣与复发怀孕损失（207）异常水平的非整倍体精子最常见的男性精子发生失败，少精子症或少弱精子症，和正常精子男性伴侣反复流产的夫妇。

#### 3.3.1.2 荧光原位杂交技术

荧光原位杂交是一种评估细胞遗传学染色体异常频率的临床诊断方法。染色体X、Y、13、18和21在精子非整倍体测试中被测量，因为这些染色体中的非整倍体与可存活但受影响的后代（克兰费尔特综合征[XXY-XXXXY]、特纳综合征[XO]、帕道[13三体]、爱德华兹[18三体]和唐氏综合征[21三体]）相关。可以说，最有信息的可能是分析所有的染色体，因为其他非整倍体是胚胎致命的，但这种方法成本高昂。作为一种筛选工具，精子非整倍体检测的结果有助于受影响夫妇（208）（特别是反复流产或既往抗逆转录病毒治疗失败的患者，在较小程度上，弱畸精子症和严重少精子症的患者）的遗传咨询



在某些情况下，允许夫妇做出有教育的生殖决定（209）。下面提供的方法改编自Ryu等人。（210）。

#### 代理

SSC(从20×SSC稀释) (3 M氯化钠, 0.3M柠檬酸三钠2H<sub>2</sub>O, pH7.0)

2×SCC (20×鳞状CC稀释)

乙醇洗涤液 (100%, 稀释至70%和80%)

•25mM DTT

直接标记的染色体特异性alpha卫星探针(多色DNA探针试剂盒)

DAPIII (核反染色剂, 4,6-二氨基2-苯林多尔)。

#### 程序

Ryu等人认为。（210）:

1. 将载玻片连续放入二甲苯5分钟，乙醇5分钟，然后风干，去除污渍和油。
2. 然后在甲醇中固定15分钟。载玻片在2×SSC中孵育，然后通过三次乙醇洗涤（70%、80%和100%）2分钟，然后风干。
3. 然后将载玻片在25mMDTT溶液中以新鲜的37° C孵育6-8分钟，使精子头部脱密和膨胀。载玻片立即放置在2×SSC中，室温下3分钟，然后在三次乙醇洗涤中脱水，然后风干。
4. 五种荧光原位杂交检测染色体X、Y染色体、13染色体、18染色体和21染色体，采用直接标记的染色体特异性alpha卫星探针(多色DNA探针)。
5. 将探针混合物密封在载玻片上，然后放在80的° C烤箱中2-3分钟，以使细胞DNA和探针同时变性。
6. 在37° C下过夜杂交后，载玻片用0.25×SSC(pH7.0)在68° C下洗涤10秒，并用1×磷酸盐缓冲液洗涤剂(多色DNA探针)冲洗。
7. 采用DAPIII溶液。总体杂交效率应为>。97%。

#### 评分标准

染色体特异性探针通过颜色识别，并分析三个探针中的零、一个、两个或三个或多个信号的存在。

包含意外大小或似乎在核膜外的信号的细胞核被从分析中排除。





如果：（1）两个信号的大小和强度小于其他同源物信号的大小和强度，则认为信号表示一个分裂域；（2）两个信号之间的距离小于两个信号的直径。结果报告为在一个单倍体精子中具有二组体或更多（两条或更多染色体）的精子的百分比。单体精子（缺失整个染色体）不被统计。

#### 技术说明

自动细胞遗传学成像系统提高了精度和准确性，是必要的。它们包括一个微定位器和根据一系列细胞学规则的分析，其中8个聚焦平面被捕获并卷积为荧光显微镜。软件控制的聚焦和曝光允许捕获多个聚焦层，信号强度最大化，低水平的背景噪声保持（211）。

#### 统计计算

综合比较了不育组和对照组之间的荧光原位杂交信号的分布。连续变量的分析采用双样本独立t检验。对于方差不相等的变量，采用曼恩-惠特尼秩和检验。将统计学意义定义为 $P < 0.05$ 进行连续分析。

#### 精子染色体二聚体的基础水平

精子非整倍体的发生率在可生育的男性中很罕见。进行该检测的不同实验室之间的结果相似（表3.3）。

表3.3健康可生育能力男性精子染色体二聚体的基本水平

染色体#	Templado等。	Neusser等人。	染色体#	Templado等。	Neusser等人。
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			

改编自Templado等人。和Neusser等人。(212, 213)



## 3.4 与免疫学和免疫学方法相关的试验

### 3.4.1 精液中白细胞的评估

白细胞，主要是多形核白细胞（中性粒细胞），存在于大多数人类射精（53, 214）中，在巴巴氏程序染色的精液涂片中，它们有时可以与精子细胞和精母细胞分化（第47页第2.4.9.3节）。分化是基于染色颜色的差异，和核大小和形状（53）多形核白细胞很容易混淆形态与多核精子细胞，但染色蓝色，与粉红色的精子细胞（53）核大小也有助于识别：单核细胞核表现出广泛的变化，从大约7 $\mu$ m淋巴细胞到巨噬细胞超过15 $\mu$ m巨噬细胞。... 这些大小只是指导方针，因为变性和分裂会影响细胞核的大小。

还有其他几种技术来定量精液中的白细胞数量。由于过氧化物酶阳性粒细胞是精液中白细胞的主要形式，常规过氧化物酶活性测定可作为初始筛选技术（53, 215）（见第3.4.1.1节。以下）。

白细胞可以通过针对普通白细胞和精子抗原（98, 216）进行更耗时和昂贵的免疫细胞化学分析来进一步分化（第113页第3.4.2节）。

#### 3.4.1.1 用邻甲苯胺染色细胞过氧化物酶

这种测试是快速和廉价的，是一个有用的初步筛查粒细胞。原则  
传统上，人类精液中的白细胞是使用组织化学方法进行计数的  
鉴定过氧化物酶的程序，该酶是粒细胞的特征（图. 3.6）。这种技术的优点是  
相对容易执行，但它不检测到：

释放其颗粒的活化多态性；或

其他类型的白细胞，如淋巴细胞、巨噬细胞和单核细胞，不含过氧化物酶。

该测试可用于区分多形核白细胞和多核精子细胞，这是无过氧化物酶的（53）。下面的测试是基于Nahoum和卡多佐（217），该测试的商业试剂盒。...

#### 代理

磷酸盐缓冲液，67mmol/L，pH6.0：溶解9.47g磷酸氢钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ）在1000毫升纯化的 $\text{H}_2\text{O}$ 和9.08g磷酸二氢钾（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ）在1000毫升纯化的 $\text{H}_2\text{O}$ 。将一种溶液加入到另一种溶液中（大约12毫升 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 到8ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ），直到pH为6.0。

饱和氯化铵（ $\text{NH}_4\text{Cl}$ ）溶液：添加250g $\text{NH}_4\text{Cl}$ 到1000ml纯化的 $\text{H}_2\text{O}$



148mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )：在 50g/L 中溶解于步骤 1 中制备的磷酸盐缓冲液 (pH6.0)

底物：将 2.5mg 邻甲苯胺溶解于 10ml 0.9% (9g/L) 生理盐水中

BUR 过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% (五)：购买

工作溶液：在 9ml 邻甲苯胺溶液中，加入 1ml 饱和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液，1ml 148mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  和 10 $\mu\text{l}$  为 30% (v/v) 过氧化氢，混合良好。该溶液可在制备后的 24 小时内使用。



注：国际癌症研究机构 (IARC, 1982 年) 指出，出于实际目的，正甲苯胺应被视为对人类有致癌风险。采取适当的预防措施 (第 214 页上的第 8.2 节)。

#### 程序

1. 充分混合精液样品 (见以下技术说明)。
2. 取出 0.1ml 的同等精液，并与 0.9ml 的工作溶液 (稀释 1+9 (1:10)) 混合。
3. 轻轻将精子悬液旋转 10 秒，室温孵育 20-30 分钟。或者，用管式摇动系统连续摇晃。
4. 在去除重复样本之前混合精液样本，并与上述工作溶液混合。

#### 技术说明：精液

在取出一部分精液进行评估之前，将样品在原来的容器中好好混合，但不要太强烈地产生气泡。这可以通过将样品吸入 10 次 (直径约 1.5mm) 一次性塑料移液管 (必要时无菌) 来实现。不要与涡机高速混合，因为这样会损害精子。

#### 评估血细胞计室过氧化物酶阳性细胞数量

1. 20-30 分钟后，再次混合精子悬液，用其中一个复制制剂填充血细胞计的两侧。
2. 在室温下将血细胞计数仪在潮湿的室内水平保存至少 4 分钟。在有盖的培养皿中饱和的滤纸上)，以防止干燥并让细胞沉淀。
3. 在  $\times 200$  或  $\times 400$  的放大倍数下，用相位对比光学的网格检查腔室网格。
4. 在每个重复中至少计数 200 个过氧化物酶阳性细胞，以达到可接受的低采样误差 (第 33 页的表 2.3)。过氧化物酶阳性细胞染成棕色，而过氧化物酶阴性细胞未染色 (图. 3.6)。
5. 检查一个室，一个网格，继续计数，直到观察到至少 200 个过氧化物阳性细胞并检查一个完整的网格。计数必须通过完整的网格来完成；不要停止在网格的中间。



6. 记录评估达到至少200个过氧化物酶阳性细胞的网格数量。相同数量的网格将从另一个房间的血细胞计计算。
7. 借助实验室计数器来测定过氧化物酶阳性细胞和网格的数量。
8. 切换到血细胞计的第二个腔室，并在与第一个复制相同数量的网格上执行重复计数，即使这产生少于200个过氧化物酶阳性细胞。
9. 计算两种过氧化物酶阳性细胞的总和和差值。
10. 确定第33页表2.3差异的可接受性，即由于抽样误差，95%的样本预计会出现两个计数之间的最大差异。
11. 如果差异可接受，则计算其浓度。如果差异过高，准备两种新的稀释剂，并重复重复计数估计。
12. 报告过氧化物酶阳性细胞的平均浓度为两个显著的数字。
13. 计算每次射精时过氧化物酶阳性细胞的总数  
**过氧化物酶阳性细胞浓度的计算，第111页。**

图。3.6人精液中的过氧化物酶阳性细胞



一个过氧化物酶阳性的粒细胞(P)（棕色）和一个过氧化物酶阴性的圆形细胞(N)。比例尺10 $\mu$ m。

显微照片由T. G. 库珀提供。



### 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的浓度为其数量(N)除以重复检测的网格总数(n)的体积(其中网格的体积为100n1),乘以稀释因子。

对于1+9(1:10)稀释,浓度为 $C = (N/n) \times (1/100) = (N/n) \times (1/10) \times 10$ 个细胞。因此,(N/n)除以10,得到每n1中过氧化物酶阳性细胞(每毫升=百万细胞)的浓度。

当所有9个网格在每个室的血细胞计,过氧化物酶阳性细胞的总数可以除以两个室的总体积(1.8 $\mu$ l),乘以稀释因子(10),获得每 $\mu$ l细胞浓度(千细胞每毫升)。



注:当该程序计数圆形细胞总数时,可用于计算圆形细胞浓度(过氧化物酶阳性和在计算中用于N)。

### 该方法的灵敏度

如果室内过氧化物酶阳性细胞少于200个,采样误差将超过5%。当在两室的所有网格中发现不到400个过氧化物酶阳性细胞时,报告计数细胞数的采样误差(第33页的表2.3)。

如果在每个腔室中计数少于25个过氧化物酶阳性细胞,则其浓度将为<277000个细胞/ml。报告观察到的过氧化物酶阳性细胞的数量,并评论为“细胞太少,无法准确测定浓度(<277000/ml)”。在检测的相同样本中没有过氧化物酶阳性细胞并不一定意味着在其他样本中没有它们。

### 有价值的例子

#### 示例1

稀释1+9(1:10)稀释,复制1在9个网格中包含60个过氧化物酶阳性细胞,而复制2在9个网格中包含90个过氧化物酶阳性细胞。在18个网格中,这些值(60+90)之和为150,差值(90-60)为30。从表中显示的内容2.3在第33页,这被认为超过了单独的(24)预期的差异,因此结果被丢弃,并进行新的重复。

#### 示例2

稀释1+9(1:10)后,复制1在5个网格中包含204个过氧化物酶阳性细胞,而复制2在5个网格中包含198个过氧化物酶阳性细胞。在10个网格中,各值之和(204+198)为402,差值(204-198)为6。从第33页的表2.3可以看出,这比(39)偶然发现的要少,因此值被接受。

样品中过氧化物酶阳性细胞的浓度根据第35页的表2.4计算;对于1+9(1:10)稀释, $C = (N/n) / 10$ 细胞/n1或 $(402/10) / 10 = 4.02$ 细胞/n1,或 $4.0 \times 10^6$ 每毫升的细胞(到两个重要的数字)。

#### 示例3

稀释1+9(1:10)后,复制1在9个网格中包含144个过氧化物酶阳性细胞,而复制2在9个网格中包含162个过氧化物酶阳性细胞。金额



的值（144+162）在18个网格中为306，差值（162-144）为18。从第33页的表2.3可以看出，这比（34）偶然发现的要少，因此值被接受。

当在每个腔室中评估所有9个网格时，样品的浓度，进行1+9（1：10）稀释，使用第35页的表2.4， $C=1.7 \times 10$ 每毫升的细胞到两个重要的数字。由于计数少于400个细胞，报告了表2.3中306个细胞的采样误差（约6%）。

#### 示例4

用1+9（1：10）稀释后，在两个复制中均未发现过氧化物酶阳性细胞。由于在所有9个网格中发现不到25个过氧化物酶阳性细胞，浓度为 $<277\ 000$ ；报告“样本中没有发现过氧化物酶阳性细胞。细胞太少，无法准确测定浓度（ $<277000/\text{ml}$ ）”。

### 3.4.1.2在正常和病理结果之间的限制

目前还没有可生育男性精液中过氧化物酶阳性细胞的循证参考范围。在等待其他证据之前，本手册保留的共识值为 $1.0 \times 10$ 每毫升过氧化物酶阳性细胞作为临床意义的阈值。因此，值大于或等于 $1.0 \times 10$ 每毫升过氧化物酶阳性细胞被认为是异常的。与此测试相关的是几个重要的问题。

射精中过氧化物酶阳性细胞的总数可能反映了炎症条件（215）的严重程度。

过氧化物酶阳性细胞的数量是通过将过氧化物酶阳性细胞的浓度乘以精液体积来获得的。

可生育男性过氧化物酶阳性细胞的临界值从 $0.5 \times 10$ 不等<sup>a</sup>- $1.0 \times 10$ 多形核白细胞/毫升或来自 $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$ 总白细胞/ml（215）接种取 $1 \times 10$ 白细胞/毫升作为白细胞精子症的阈值。一些人发现这个值的（215）过低，而另一些人则认为它的（218, 219）过高，这取决于检测的终点（精液质量、体外受精结果、细菌的存在、精子对活性氧的反应）。

射精中白细胞过多（白细胞精子症、脓性精子症）可能与感染和精子质量差有关。

白细胞依赖性的精子损伤取决于射精中的白细胞总数和相对于精子数量的白细胞数量。

白细胞可以通过氧化攻击损害精子的活力和DNA的完整性（第140页的第4.1节）。然而，是否观察到的白细胞浸润的水平是损害取决于因素不可能推断从精液样本，如原因，浸润的时间和解剖位置，以及白细胞的性质，他们是否在一个激活状态（214, 220, 221）。



### 3.4.2 泛白细胞（CD45）免疫细胞化学染色

释放颗粒的多形核白细胞，以及其他种类的白细胞，如淋巴细胞、巨噬细胞或单核细胞，不能通过细胞过氧化物酶检测到（第108页第3.4.1.1节），但可以通过免疫细胞化学方法检测到。免疫细胞化学染色比评估粒细胞过氧化物酶活性更昂贵和耗时，但对区分白细胞和生殖细胞很有用。

#### 3421 原则

所有类型的人类白细胞都表达一种特异性抗原（CD45），可以用适当的单克隆抗体检测到。通过改变一抗的性质，这种一般程序可以适用于检测不同类型的白细胞，如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、b细胞或t细胞，如果它们是感兴趣的焦点。

#### 3422 代理

##### •DPBS

##### 三种缓冲盐水（TBS-参见第225页第8.4节），pH8.2

盐酸四聚咪唑（左旋咪唑）1.0mol/L：将2.4g左旋咪唑溶解于10ml纯化水中

底物：向9.7mlTBS（pH8.2）加入2mg萘酚AS-MX磷酸、0.2ml二甲基甲酰胺和0.1ml1.0mol/L左旋咪唑。就在使用前，加入10mg的快速红色TR盐和过滤器（0.45μm孔径）。

固定剂：丙酮单独使用或丙酮/甲醇/甲醛：至95ml丙酮中加入95ml无水甲醇和10ml13%（v/v）甲醛

一抗：针对常见白细胞抗原的小鼠单克隆抗体，编码CD45

二抗：抗小鼠兔免疫球蛋白。使用的稀释将取决于抗体滴度和来源。

碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶复合物（APAAP）

Harris的苏木精染色混合物（作为反染色）。

#### 3423 程序

##### 准备射精

1. 将精液样品充分混合均匀，而不产生气泡。
2. 将大约0.5毫升与5体积的DPBS混合。



3. 500g离心5分钟，取出上清液，悬浮以5倍于DPBS体积的精子球。

4. 500克离心机，持续5分钟。

5. 再次重复此步骤，并将DPBS中的颗粒重新悬浮到大约 $50 \times 10^6$  每毫升精子。

#### 准备射精涂片

1. 在5- $\mu$ l等分悬浮液的清洁玻片（第26页第2.4.7.1节）上重复涂片，然后风干。

2. 将风干的细胞在绝对丙酮中固定10分钟，或在丙酮/乙醇/甲醛中固定90秒。

3. 用TBS清洗两次，然后允许排水。

4. 然后，载玻片可以立即染色或用铝箔包裹，并存储在 $-70^\circ\text{C}$ ，以供以后分析。

#### 与抗体孵育

1. 在每张载玻片上，用油脂笔铅笔（划界笔）标记一个固定细胞区域（直径约1厘米的圆），并用10 $\mu$ l的一单克隆抗体覆盖该区域。

2. 在室温下在潮湿的房间中水平放置30分钟。在覆盖的培养皿中饱和的滤纸上），以防止干燥。

3. 用TBS清洗载玻片两次，然后进行引流。

4. 用10 $\mu$ l二抗覆盖涂片，在室温潮湿的室内孵育30分钟。

5. 用TBS清洗两次，然后允许排水。

6. 在同一区域添加10 $\mu$ l的APAAP。

7. 在室温下潮湿的室内孵育1小时。

8. 用TBS洗涤两次，然后允许排水。

9. 与10 $\mu$ l磷酸萘酚底物在室温下孵育20分钟。



注：为了强化反应产物，可以重复用二抗和APAAP染色，每种试剂的孵育期为15分钟。

#### 反染色和安装

1. 一旦载玻片变成红色，就用TBS清洗。

2. 用苏木精反染色几秒钟；用自来水清洗，然后安装在水溶液安装介质中（第41页第2.4.9节）。

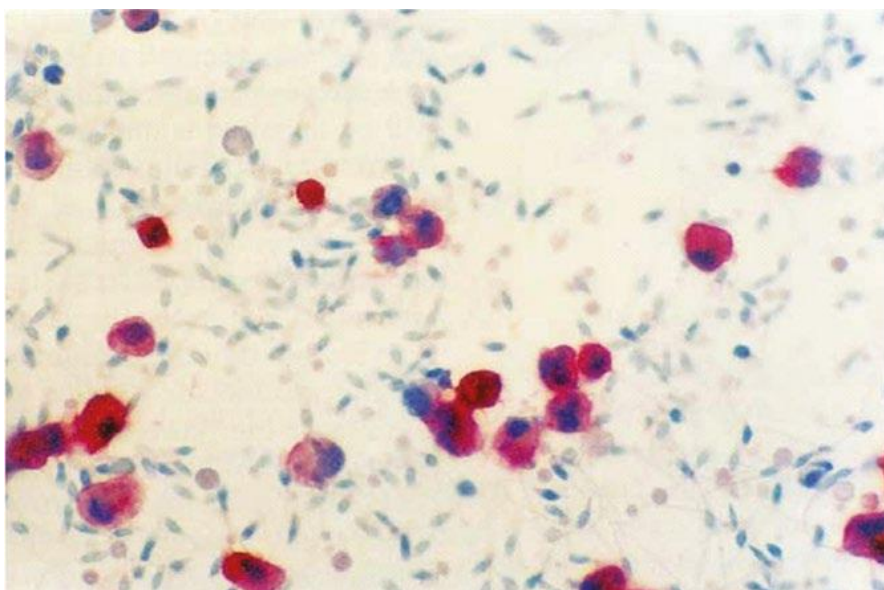




## 评估cd45阳性细胞数量

1. 在 $\times 200$ 或 $\times 400$ 的放大倍数下，用亮场光学技术检查载玻片的整个染色区域。cd45阳性细胞（白细胞）染为红色。 3. 7).
2. 分别对cd45阳性细胞和精子进行评分，直到每个重复中观察到至少200个精子，以达到可接受的低采样误差（第33页的表2. 3）。
3. 利用实验室计数器定量测定cd45阳性细胞和精子的数量。
4. 以同样的方法评估第二次涂片（直到计算出200个精子）。
5. 计算cd45阳性细胞的两个计数的总和和差异。
6. 确定第33页表2. 3差异的可接受性，即由于抽样误差，95%的样本预计会出现两个计数之间的最大差异。
7. 如果差异可接受，则计算浓度（第35页上的表2. 4）。如果差异过高，则重复重新评估幻灯片。
8. 报告cd45阳性细胞的平均浓度为两个显著的数据。
9. 将cd45阳性细胞的浓度乘以精液体积(ml)，得到每次射精时cd45阳性细胞的总数。

图中。3. 7精液中的白细胞



cd45细胞（白细胞）染为红色。显微照片由

R. J. 艾特肯提供。



### 浓度计算

计算cd45阳性细胞相对于精子的浓度。如果N是与400个精子相同数量的CD45阳性细胞的数量，而S是以数百万计的精子浓度，则可以根据公式  $C=S \times (N/400)$  计算出以数百万计的CD45阳性细胞的浓度(C)。

### 有价值的例子

#### 示例1

在复制1中，每200个精子有20个cd45阳性细胞，而在复制2中，每200个精子有40个cd45阳性细胞。各值(20+40)之和为60，差值(40-20)为20。从第33页的表2.3可以看出，这超过了仅(15)单独预期的差异，因此结果被丢弃，并进行新的评估。

#### 示例2

在复制1中，每200个精子有25个cd45阳性细胞，而在复制2中，每200个精子有35个cd45阳性细胞。数值(25+35)之和为60，差值(35-25)为10。从第122页的表3.4可以看出，这比(15)偶然发现的要小，因此值被接受。

每400个精子中有60个cd45阳性细胞，精子浓度为  $70 \times 10^6$  cd45阳性细胞浓度为  $C=S \times (N/400)$  细胞/ml =  $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10.5 \times 10^6$  细胞/毫升，或  $10 \times 10^6$  细胞/毫升到两个重要的数字。由于计数少于400个细胞，因此报告了第33页表2.3中给出的60个细胞的采样误差(约13%)。

### 3.4.2.4在正常和病理结果之间的限制

目前还没有可生育男性精液中cd45阳性细胞的循证参考值。共识阈值为  $1.0 \times 10^6$  过氧化物酶阳性细胞的细胞/ml意味着总白细胞的浓度更高，因为并不是所有的白细胞都是过氧化物酶阳性的粒细胞。

## 3.5 男性生殖道炎症标志白细胞介素的评估

### 3.5.1 背景

男性生殖道的慢性炎症性疾病(MGT)在生育障碍中起着重要的作用。MGT感染/炎症患者的射精特征是白细胞存在超过100万/ml和粘度增加，而患者报告的最常见的临床症状是慢性盆腔疼痛。MGT感染/炎症可能通过炎症细胞产生的炎症介质或活性氧(ROS)的直接作用或通过改变MGT微环境来破坏精子，从而损害生育能力。

趋化因子是一个由CXC和CC趋化因子两个亚家族组成的小细胞因子的大家族，它们是根据前两个半胱氨酸的位置来区分的：在CXC中被一个氨基酸分开，在CC中相邻。



趋化因子由多种细胞类型产生，包括单核细胞、活化的T淋巴细胞和中性粒细胞，并协同或附加作用于靶细胞的功能。

雄激素学家和泌尿学家可能需要评估精液中的趋化因子和细胞因子，以加深受MGT炎症状态影响的不育男性的诊断程序。有一些研究报道了前列腺炎和其他MGT炎症状态中精液细胞因子和趋化因子的改变。Penna等人。通过多重细胞因子和趋化因子阵列对对照组和有慢性前列腺炎或慢性盆腔疼痛综合征症状的男性的8种细胞因子和9种趋化因子的精浆水平进行定量。他们发现IL-8水平是诊断这两种情况的最佳预测因子，具有较高的准确性和敏感性。几种测定血清、血浆和细胞培养上清中白细胞介素(ILs)的试剂盒已市售，并且很容易用于精液。

### 3.5.2 协议

原理：采用生物素化的抗人IL抗体，采用ELISA法测定IL。

#### 3.5.2.1 代理

涂层缓冲液：0.1M碳酸钠，pH9.5

•8.4g  $\text{NaHCO}_3$ +3.56g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ +1L蒸馏后的 $\text{H}_2\text{O}$ (pH9.5)

PBS缓冲区pH7

稀释缓冲液：DPBS与10%胎牛血清，pH7

洗涤缓冲液：DPBS与0.05%的温度20

底物溶液：四甲基苯并胺(TMB)和过氧化氢(SigmaT0440, 准备使用)

停止液：1M $\text{H}_2\text{PO}_4$ 或2N $\text{H}_2\text{SO}_4$ 所以;

#### 3.5.2.2 试剂的制备

涂层溶液：捕获抗体、抗人IL(用涂层缓冲液稀释)

溶液A/B：50 $\mu\text{l}$ 检测抗体(生物素化的抗人IL用稀释缓冲液适当稀释)+50 $\mu\text{l}$ 酶试剂(链霉亲和素-辣根过氧化物酶偶联物)+12.4ml稀释缓冲液。商业抗人智能电路可以使用。

#### 3.5.2.3 程序

第1天：在每孔的涂层缓冲液中加入抗i1抗体，覆盖平板，覆盖平板，4°C孵育过夜。



12月2日：

用300 $\mu$ l的洗涤缓冲液清洗盘子三次。

加入200 $\mu$ l的稀释缓冲液，在室温下放置1小时。

倒板，用300 $\mu$ l的洗涤缓冲液再次洗涤三次。

加入IL标准溶液（0.1-1.10-10-100-500pg/ml）或精液样品（某些情况下可能需要稀释），在室温下孵育2小时。

倒平板，用300 $\mu$ l洗涤缓冲液洗涤5次。

加入100 $\mu$ l苯胺蓝(AB)溶液，室温孵育1小时。

倒平板，用300 $\mu$ l洗涤缓冲液洗涤7次，每次至少等待30秒。

加入100 $\mu$ l底物溶液，室温黑暗孵育30分钟。

加入50 $\mu$ l的停止溶液。

在30分钟内读取450nm和570nm处的吸光度。从450nm减到570nm处的吸光度。建立一条标准曲线，读取每个精液样本的吸光度值。

### 3.6 射精过程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，但很少有精原细胞。它们可以在染色的精液涂片中检测到，但当细胞退化时可能很难与炎症细胞区分开来。世界卫生组织检查人类精液和精子宫颈黏液相互作用的实验室手册第四版指出，>600万个未成熟生殖细胞/ml是异常的（4），这不再作为参考，因为对于这一临界值没有找到确凿的证据基础。

在使用帕巴尼氏程序染色的精液涂片中，精子细胞和精母细胞有时可以与白细胞区分。（53）鉴定可以基于染色颜色、核大小和形状、在细胞内没有过氧化物酶和缺乏白细胞特异性抗原。多核精子细胞很容易在形态上与多形核白细胞混淆，但染色粉红色，与更蓝色的多形核白细胞（53）圆形精子细胞可以使用染色的顶体（222），凝集素或特异性抗体（216, 223）。

核的大小也可能有助于识别：精原细胞（在精液中很少见）的核约为8 $\mu$ m，而精母细胞的核约为10 $\mu$ m，精子细胞的核约为5 $\mu$ m。这些大小只是指导方针，因为变性和分裂会影响细胞核的大小。



### 3.7 精子抗体涂层的试验

如果精子出现凝集。运动精子以头对头、尾对尾或混合方式粘)，精子抗体的存在可能是需要研究的原因之一。关于抗体的几个重要评论都是相关的。

精子抗体可以在没有精子凝集的情况下存在；同样，精子凝集也可以由精子抗体以外的因素引起。

仅仅存在精子抗体并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；传统上是通过精子-粘液渗透试验来完成的。抗体还可以干扰带结合和顶体反应。抗精子抗体(ASAB)的存在也会损害精子通过宫颈黏液(224)的运输。

精液中的ASAB几乎完全属于两种免疫球蛋白类：IgA和IgG。IgM抗体由于其体积较大，在感染急性期起主要功能，很少在精液中发现。IgA抗体可能比IgG抗体(225)具有更重要的临床重要性，但超过95%的IgA精子抗体病例也有IgG阳性。这两类细胞都可以在精子细胞或生物液体中检测到。

精子抗体试验(“直接试验”)：这里描述了两种直接试验：混合抗球蛋白反应(MAR)试验(综述，见Bronson等人。(226, 227)和免疫球(IB)检测(228, 229)。MAR测试在新鲜的精液样本上进行，而IB测试使用洗涤过的精子。这两种试验的结果并不总是一致的(230-233)，但IB试验的结果与检测血清中抗体的固定化试验的结果有很好的相关性。IB和MAR测试的实验方案各不相同，但对于精子/珠子的制备都是使用显微镜进行检查的。珠粘附在具有表面结合抗体的运动和静止精子；记录有结合珠的运动精子的百分比。

无精子液中ASAB的测试。精浆、血清和溶解性宫颈黏液(“间接”测试)：在这些测试中，怀疑含有ASAB的稀释热灭活液与未含精液的无抗体供体精子孵育。可疑液体中的任何ASAB都将与供体精子特别结合，然后在直接测试中进行评估，如上所述。为了得到可靠的结果，允许足够的时间是很重要的，因为可能需要10分钟才能使混合凝集可见。然而，应该记住的是，精子的活力会随着时间的推移而下降，而测试取决于运动精子的存在。

当50%或更多的运动精子有抗体与其(224, 234)结合时，精子对宫颈黏液的渗透和体内受精往往明显受损。仅限于尾尖的颗粒结合与生育能力受损无关，可存在于可育男性(235)中。



注1：这里描述的MAR测试在商业上有，而IB测试没有；然而，IB可以在实验室进行。两者都取决于运动精子的存在。如果运动精子不足，必须对精浆或血清进行间接检测。





注2: 杀死所有精子或严重损害精子活力的细胞毒性抗体不能用这些检测方法检测到。

### 3.7.1 混合抗球蛋白反应试验

MAR测试是一种廉价、快速和敏感的筛查试验（236），但它提供的信息比直接IB测试要少（第121页第3.7.2节）。

在MAR测试中，使用一种“桥接”抗体（抗Igg或抗Iga）将抗体包覆的珠子在表面含有IgG或IgA的精液中与未洗涤的精子接触。直接IgG和IgAMAR测试是通过将新鲜、未处理的精液与乳胶颗粒（珠子）或涂有人IgG或IgA的红细胞混合进行的。在悬浮液中添加一种单特异性的抗人Igg或抗人IgA。颗粒和运动精子之间混合凝集物的形成表明精子上存在IgG或IgA抗体。（珠子之间的凝集作为抗体-抗原识别的阳性对照）。

#### 3.7.1.1 程序

1. 将精液样品充分混合均匀，而不产生气泡。
2. 取出3.5 $\mu$ l的精液，放在单独的显微镜载玻片上。
3. 在每个直接试验中，包括1张3.5 $\mu$ lASAB阳性精液片和3.5 $\mu$ lASAB阴性精液片作为对照。这些精液应该分别来自有和没有ASAB的男性，如之前的直接MAR测试所示。或者，通过在已知含有抗体的血清中孵育，也可以产生阳性精子。
4. 在每滴试液中加入3.5 $\mu$ l igg涂层乳胶颗粒（珠子），用移液管尖端搅拌混合。
5. 在每个精液-珠状混合物中加入3.5 $\mu$ l抗人IgG的抗血清，用移液管尖端搅拌混合。
6. 用盖板(22mm $\times$ 22mm)覆盖悬架，以提供约20 $\mu$ m的深度。
7. 在室温下在潮湿的室内水平保存3分钟。在覆盖的培养皿中饱和的滤纸上)，以防止干燥。
8. 3分钟后用 $\times$ 200或 $\times$ 400放大的相位对比光学和10分钟后再次检查湿准备。
9. 使用IgA代替Igg包被珠和抗IgA而不是抗Igg抗体重复该程序。



### 3.7.12 评分

如果精子的表面有抗体，乳胶珠就会粘附在它们上面。运动的精子最初会被看到与几个甚至一组粒子一起移动。最终，凝集体变得如此巨大，以至于精子的运动受到严重限制。没有涂层抗体的精子可以在颗粒之间自由游动。

该实验的目的是确定附着有珠子的运动精子的百分比。一个常见的问题发生在靠近珠子但不附着非进展性精子上。珠子是否被结合通常可以通过用一个小移液管尖端轻轻敲击盖物来验证：珠子与活性精子的运动表明正结合。

1. 只评分运动精子，并确定带有两个或两个以上乳胶颗粒附着的运动精子的百分比。忽略尾尖结合。
2. 在每个重复中至少评估200个可运动的精子，以达到一个可接受的低采样误差。
3. 计算附着有粒子的运动精子的百分比。
4. 记录类别（IgG或IgA）以及乳胶颗粒与精子的结合的部位（头部、中部、主体部分）。



注1：若100%活动精子3分钟时有珠结合，为试验结果，10分钟不要再读。



注2：如果少于100%的运动精子在3分钟时被珠状结合，则在10分钟时再次读取幻灯片。



注3：如果精子在10分钟时静止状态，则以3分钟时的值为结果。

### 3.7.13 正常和病理结果之间的限制

目前，在可生育男性精子的MAR测试中，还没有抗体结合精子的循证参考值。与所有的临床实验室诊断测试一样，每个实验室都应该通过测试足够多的正常生育男性来确定其正常参考范围。

## 3.7.2 免疫珠试验

目前还没有商业IB测试，这意味着必须在实验室使用cnbr激活的琼脂糖珠将抗人IgG或IgA与珠结合。测试系统功能的验证和验证也应由实验室进行。这里没有描述免疫珠生产的生产和控制。



### 3.7.2.1 直接免疫珠试验

该检测方法比MAR试验更耗时，但提供了关于精子抗体的信息，这些抗体已从精浆中可能的掩蔽成分中移除。

在直接IB试验中，涂有共价结合的兔抗IgG或IgA的抗人免疫球蛋白的珠子直接与洗涤过的精子混合。与抗人IgG或IgA的珠子与运动精子的结合表明精子表面存在IgG或IgA抗体。

代理

#### 1. DPBS-BSA或Tyrode的BSA解决方案（第225页第8.4节）

2. 缓冲液1：在100ml DPBS或Tyrode培养基中加入0.3g Coho分数VBSA

3. 缓冲液2：在100ml的DPBSVBSA中加入5g DPBS或Tyrode培养基

4. 0.4方案通过5μm过滤器过滤，使用前加热至25-35° C。

准备免疫珠

1. 对于每种免疫珠类型(IgG、IgA)，在单独的离心管中加入0.2ml原珠悬液到10ml缓冲液1中。

2. 500克或600克离心5-10分钟。

3. 从洗过的免疫珠中去除上清。

4. 在0.2ml的缓冲液2中轻轻地重悬珠子。

准备精子

这些测定所需的射精量由精子浓度和活力确定，如表3.4所示。

表3.4 进行免疫珠检测需要使用多少精液

精子浓度 (10 <sup>6</sup> /ml)	逐渐运动的精子的比例 (a+b) (%)	需要的射精量(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. 把射精混合得很好。

2. 将所需数量的射精转移到离心管中，用缓冲液1配制多达10毫升。





3. 500克离心机，持续5-10分钟。
4. 除去洗过的精子的上清。
5. 在10ml新鲜缓冲液中轻轻重悬精子颗粒1。
6. 500克离心5-10分钟。
7. 分解并丢弃上清液。
8. 在0.2ml的缓冲液2中轻轻地重悬精子颗粒。



注1：超过1.0毫升的等分液需要三次清洗。



注2：具有进行性运动的精子比例较低的样本。10%或以下)可能不能提供明确的结果。在这种情况下，请考虑间接IB测试（第124页上的第3.7.2.2节）。

#### 程序

每次试验均应以ASAB阳性精子和ASAB阴性精子作为对照。精液应该分别来自有和没有ASAB的男性，正如在之前的直接IB测试中检测到的那样。

1. 将5 $\mu$ l的洗过的精子悬液放在显微镜载玻片上进行测试。
2. 分别制备5 $\mu$ lASAB阳性精子和5 $\mu$ lASAB阴性精子。
3. 在每个精子滴旁加入5 $\mu$ l抗igg免疫珠悬液。
4. 用移液管尖端搅拌，将每个抗igg免疫珠和精子液滴混合在一起。
5. 在混合液滴上放置一个22mm $\times$ 22mm的覆盖液，以提供大约20 $\mu$ m的深度。
6. 在室温下在潮湿的室内水平保存3-10分钟。在有盖的培养皿中的水饱和滤纸上)。不要等待超过10分钟才能评估载玻片，因为免疫珠结合在孵育（237）期间显著减少。
7. 在 $\times$ 200或 $\times$ 400放大倍数下用相位对比光学检查载玻片。
8. 只评分有一个或多个珠子结合的运动精子，如第121页第3.7.1.2节所述，忽略尾尖结合。
9. 使用抗iga免疫珠悬液重复该程序。



注：为了确保在10分钟内评估所有绑定，最好错开幻灯片的准备工作。



### 临床解释和正常结果和病理结果之间的限制

目前，在对可育男性精液进行的IB测试中，还没有关于抗体结合精子的循证参考限制。与所有的临床诊断实验室测试一样，实验室应该使用精液参数正常的经妊娠证明的男性来定义和验证其自己的参考范围。

根据以前版本的手册，免疫不孕的诊断是当50%或以上的运动精子（进步和非进步）粘附颗粒，但建议阈值水平的发现是从一个小研究(238) 谨慎因此应该行使过度解释一个特定的结果是生育不足的原因。仅限于尾尖的颗粒结合与生育能力受损无关，可存在于可育男性（235）中。

### 3.7.2.2 间接免疫珠试验

间接IB试验用于检测热灭活、无精子液（血清、睾丸液、精浆或溴蛋白酶溶解的宫颈粘液）中的ASAB。在这项实验中，无精子的体液与洗过的供体精子孵育，以使存在的ASAB与精子结合。无抗体供体的精子吸收了被测试液体中存在的ASAB，然后按照直接IB测试进行评估。

#### 代理

请参见第122页的直接IB测试的试剂部分。

如果要检测宫颈粘液，制备10IU/ml菠萝蛋白酶，一种广泛特异性的蛋白水解酶(EC3.4.22.32)。

#### 准备免疫珠

请参见第122页的免疫球的准备部分。

#### 准备供体精子

请参见第122页的精子准备部分。

#### 准备待测试的病人材料

1. 如果检测宫颈粘液，用10IU/ml溴蛋白酶稀释1+1（1：2），用移液管尖端搅拌，37° C孵育10分钟。液化完成后，2000g离心10分钟。立即用上清液进行检测，或在-70° C下冷冻。
2. 通过在56° C加热30-45分钟，灭活溶解的宫颈粘液、血清、精浆或睾丸液中的任何补体。
3. 用缓冲液2稀释热灭活的样品1+4（1：5）。10μl的体液，用40μl的缓冲液2进行测试。
4. 包括已知的阳性和阴性样本，例如。在间接IB试验中检测到的男性血清分别为有ASAB和无ASAB，作为每个间接检测中的对照。输精管结扎术的男性如果阳性可以作为血清来源（>50%精子珠子结合，不包括尾尖结合）。



将供体精子与待测材料进行孵育

1. 将50 $\mu$ l洗涤过的供体精子悬液与50 $\mu$ l的1+4（1：5）稀释液混合以进行测试。
2. 37° C孵育1小时。
3. 500克离心机，持续5-10分钟。
4. 分解并丢弃上清液。
5. 在10ml新鲜缓冲液中轻轻重悬精子颗粒1。
6. 500克离心5-10分钟。
7. 分解并丢弃上清液。
8. 重复上述清洗步骤5、6和7。
9. 在0.2ml的缓冲液2中轻轻地重悬精子颗粒。

程序

1. 对孵育的供体精子进行如第123页所述的IB测试。
2. 按照第123页和第124页所述的方法进行评分和解释测试。

### 3.8 附属性腺功能的生化分析

精液质量不良可能是由于副腺分泌物异常所致。来自副腺体的分泌可以被测量来评估腺体的功能。前列腺的柠檬酸、锌、谷氨酰胺转氨酶和酸性磷酸酶；精囊的果糖和前列腺素；附睾的游离1-肉碱、甘油磷酸胆碱(GPC)和中性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶。

任何一个腺体的感染有时都会导致标志物分泌的暂时减少。感染也会对分泌性上皮细胞造成不可逆的损伤，因此，即使在急性感染后，分泌物仍可能保持低（239, 240）。

前列腺的分泌能力。精液中锌、柠檬酸（241）或酸磷酸酶（242）的量是衡量前列腺分泌的可靠指标，这些标记物之间有很好的相关性。锌的分光光度法测定方法见第126页的第3.8.1节。

精囊的分泌能力。精液中的果糖反映了精囊的分泌功能。第129页第3.8.2节描述了其估计的分光光度方法。

附睾的分泌能力。1-肉碱、GPC和中性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶是临床使用的附睾标志物。中性 $\alpha$ -肉糖苷酶已被证明比1-肉碱和GPC（240）对附睾疾病更具特异性和敏感性。射精中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶有两种亚型：主要的中性形式仅来源于附睾，而次要的酸性形式主要来自



前列腺。中性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的简单分光光度法测定中性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的分光光度法见132页。

射精中任何附属腺分泌的总含量反映了该腺（83）的整体分泌功能。总含量由标记物浓度乘以精液体积得到。

### 3.8.1 射精液中锌的测定

#### 3.8.1.1 背景

可能有商业套包。本文给出了一种评估各种液体中微量锌的方法（243）它可以作为早期的精液商业分析（244），使用灵敏度为96孔板阅读器，灵敏度为 $4\mu\text{mol/L}$ （245）。精液和试剂的体积可以用3ml或1ml的试管按比例调整分光光度计。在计算结果时，必须进行适当的修正。

#### 3.8.1.2 原则

化合物 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulphopropylamino)-phenol (5-Br-PAPS) 与锌结合，产生颜色的变化。

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow 5\text{-Br-PAPS-Zn}$  配合物，吸收最大波长为552nm的光。

#### 3.8.1.3 代理

##### SUB股票解决方案

SUB双蒸馏 $\text{H}_2\text{O}$ -对于以下每批：总共需要400毫升

碳酸碳酸氢盐缓冲液，pH9.8, 200mmol/L

- E. g. C3041：将13粒胶囊溶于325ml净化水中，检查pH是否为9.8。
- 在+4° C储存；保质期至少为3个月。

•5-Br-PAPS, 0.7mmol/L

- E. g. Sigma-Oldrich180017 (Mw537.3)：19毫克在50毫升碳酸盐碳酸氢盐缓冲液中
- 在+4° C储存；保质期至少为3个月。

柠檬酸钠，850mmol/L

- E. g. Sigma-OldrichC3674 (Mw258.1)：11.0g在50ml碳酸盐碳酸氢盐缓冲液中
- 在+4° C储存；保质期至少为3个月。

甲磺酸去铁胺，205mmol/L

- E. g. 西格玛-奥尔德里奇D9533 (M656.8)：96mg，60毫升碳酸盐碳酸氢盐缓冲液中，储存在+4° C；保质期至少3个月。



- Salicylaldoxime, 29mmol/L
  - E. g. 西格玛-奥尔德里奇84172(M137.1): 239mg在60毫升净化水中
  - 储存在+4° C; 保质期至少3个月。

锌标准品 (50 $\mu$ mol/L)

SBAR准备:

- 溶解0.288gZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O在100ml纯化水中(锌浓度为10mmol/L)。
- 稀释这200 $\times$ (加入0.5ml至99.5ml的纯化水), 获得50 $\mu$ mol/L的原液。
- 搅拌均匀, 在-20° C下冷冻, 在2毫升的密封管中保存1年。

标准曲线: 用纯水稀释50 $\mu$ mol/L锌标准, 得到40、20、10、5 $\mu$ mol/L的另外4个标准:

表3. 5锌评价的推荐标准

标准	相应的 <sup>8</sup> 至精锌 (mM)	锌标准品50 $\mu$ mol/L (毫升)	纯化水
40 $\mu$ mol/L	8	0.8	0.2
20 $\mu$ mol/L	4	0.4	0.6
10 $\mu$ mol/L	2	0.2	0.8
5 $\mu$ mol/L	1	0.1	0.9
0 $\mu$ mol/L	0	0	1.0

工作溶液 (在测定当天准备)

溶液A: 混合制备: 碳酸碳酸氢盐缓冲

- 液, 7.0ml5-Br-PAPS原液, 4.0ml
- 柠檬酸钠原液, 4.0ml
- 甲磺酸去铁氧胺原液, 5.0毫升

最终工作溶液: 混合配制: 溶液A, 20ml

- Salicylaldoxime, 5ml
- 在+4-8° C的保质期为1周

精浆冷冻内部质量控制池: 见第135页第3.8.4节。

<sup>8</sup> 稀释因子 $\times$ 200, 如第3.9.1节所述。在大约45 000 次射精的材料中, 超过99.5%的锌浓度低于8mM(246. Bjorndahl L. 在45000次射精中高锌浓度的流行率-未发表的数据。 2021.)。



### 3.8.14 程序

步骤1-3优选与果糖评估（129页3.8.2节）和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶（132页3.8.3节）一起进行；此外，步骤4中的稀释1也优选与果糖评估一起进行。

1. 将精液分析在3000g下进行10-15分钟后剩余的精液样品离心，以 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存无精子精液直至分析。
2. 解冻无精子的精浆。同时解冻同样混合的精浆以进行内部质量控制（第135页第3.8.4节）。
3. 将精等离子体样品在涡旋混合器上好好混合。
4. 稀释程序。稀释精液需要使用正移液管来获得正确的精液体积。总的来说，稀释一点半是合适的。这里描述的两步步骤简化了整个生化分析，因为在第一步中使用的稀释剂也可以用于果糖的测定。

稀释1：每个精液样品稀释1：40（1+39）：稀释至纯化的975 $\mu\text{l}$  $\text{H}_2\text{O}$ 在两个1.5ml的管中，加入25 $\mu\text{l}$ 精液（正移液管），通过涡旋混合5秒。所制备的稀释剂也可用于果糖评估（第129页的第3.8.2节），而无需进一步稀释。

稀释2：将第一次稀释1：5（1+4）稀释至400 $\mu\text{l}$ 纯化的 $\text{H}_2\text{O}$ ，加入上述步骤1：40的100 $\mu\text{l}$ 稀释精液（最终稀释1：200）。本步骤中不需要正移液管。

5. 将步骤2的40 $\mu\text{l}$ 等份稀释精液样本添加到96孔板中。包括重复的空白（40 $\mu\text{l}$ 的纯化水）和每个标准品的40- $\mu\text{l}$ 的重复。
6. 每孔中加入200 $\mu\text{l}$ 彩色试剂，在96孔板摇瓶上混合5分钟。
7. 读取552nm波长（243）的板。

### 3.8.15 计算

1. 从标准品、测试精浆和对照组中减去背景吸光度值（标准0 $\mu\text{mol/L}$ ）。
2. 通过比较吸光度值，从标准曲线（ $\mu\text{mol/L}$ ）中读取样品中锌的浓度。
3. 高于最高标准的结果是非常不寻常的（246），并不表明可能的临床疾病——该值可能不准确，可以报道为 $>8\text{mmol/L}$ ，通常不需要重新检测。
4. 将稀释结果乘以稀释系数200，得到未稀释精浆中锌（ $\text{mmol/L}$ ）的浓度。



5. 对于每个精液样本，计算两个重复的平均值：

对于结果 $>1.5\text{mmol/L}$ ，重复的一致性应在10%以内，即。（估计之差/估计平均值）10%。如果不这样，对两种新的精液重复分析。

对于结果 $1.5\text{mmol/L}$ ，应评估任何超过 $0.1\text{mmol/L}$ 的差异，以确定任何一个重复中的错误是否表明存在诊断错误的可能性，或该差异是否与临床无关。如果有必要，对两种新的精液重复分析。

6. 将浓度乘以精液体积(ml)，得到射精的总锌含量( $\mu\text{mol}$ )。

### 3.816 参考下限

锌的参考下限是每射精（245） $2.4\mu\text{mol}$  (TGCooper未发表的数据)。

## 3.8.2 射精过程中果糖的测量

### 3.821 背景

下面描述的方法是基于Karvonen和Malm（247），修改用于96孔板阅读器，灵敏度为 $74\mu\text{mol/L}$ （240）精液和试剂的体积可以使用3ml或1ml刀具按比例调整分光光度计。在计算结果时，必须进行适当的修正。精液中低果糖是射精管梗阻、双侧先天性输精管（130, 131, 133）缺失、部分逆行射精或雄激素缺乏的特征。

### 3.822 原则

在热和低pH的影响下，果糖与脲性形成彩色复合物，吸收波长为470nm的光。

### 3.823 代理

一种估计精液中果糖的试剂盒正在市售。或者，准备以下试剂。

**脱蛋白剂1** ( $63\mu\text{mol/LZnSO}_4$ )：溶解1.8gznso47h2o在100ml纯化水中

**脱蛋白剂2** ( $1\text{mol/L}$ 氢氧化钠)：将0.4g氢氧化钠溶解于100ml纯化水中

**彩色试剂** (脲 $2\mu\text{mol/L}$ 苯甲酸盐防腐剂 $16\mu\text{mol/L}$ )：

用 $60^\circ\text{C}$ 的水浴摇晃苯甲酸，将200mg的苯甲酸溶解在90ml的净化水中。



世界卫生组织人类精液检查和处理实验室手册，第六版

- 溶解25毫克的情剂，用纯水配制100毫升。
- 如果溶液中存在颗粒迹象，则过滤（0.45 $\mu$ m孔径）。
- 存储在+4° C。

果糖标准原液（22.4mmol/L）：

将403毫克的d-果糖溶解在100毫升的纯化水中。

储存在4° C或冷冻（-20° C）。

标准曲线：用纯水稀释2.24mmol/L标准，得到1.12、0.56、0.28和0.14mmol/L的另外4个标准：

表3.6果糖评价的推荐标准

标准 (mmol/L)	相应的 <sup>9</sup> 至精果糖 (mmol/L)	半乳糖标准 22.4mmol/L( $\mu$ l)	纯化水 ( $\mu$ l)
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	1000

精浆冷冻内部质量控制池：见第135页第3.8.4节。

### 3.8.24 程序

对于步骤1-3，该步骤可以与锌（第126页第3.8.1节）和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶（第132页第3.8.3节）评估相同，最好步骤4与锌评估相同。

1. 将精液分析在3000g下进行10-15分钟后剩余的精液样品离心，以-20° C保存无精子精液直至分析。
2. 解冻无精子的精浆。同时解冻同样混合的精浆以进行内部质量控制（第135页第3.8.4节）。
3. 将精等离子体样品在涡旋混合器上好好混合。
4. 稀释度：建议的稀释度为1：40。如果与锌评估相结合，可以从果糖测定所需的1：40进行进一步的锌测量：

<sup>9</sup> 稀释因子 $\times$ 40，如第3.8.2.4节所述



每个精浆样品稀释1:40 (1+39)：稀释至975 $\mu$ l纯化的H<sub>2</sub>在两个1.5ml的管中，加入25 $\mu$ l精液（正移液管），通过涡旋混合5秒。

5. 脱蛋白：至1:40稀释样品的200 $\mu$ l，加入50 $\mu$ l的63 $\mu$ mol/L ZnSO<sub>4</sub>和50 $\mu$ l的0.1mol/L氢氧化钠和混合。在室温下静置15分钟，然后以约8000g离心5分钟。

6. 将每个样品的100 $\mu$ l的上清液转移到试管中。包括每个标准的100- $\mu$ l等分部分（包括空白部分）。

7. 每管加入100 $\mu$ l脲试剂并混合。

8. 在每个样品中加入1毫升浓缩（37%v/v）盐酸（盐酸），用自密封的可塑实验室膜覆盖，并在通风柜中小心混合。

9. 在水浴中以50° C加热20分钟。用冰水混合并冷却15分钟。

10. 小心地将250 $\mu$ l复制转移到通风柜中的96孔板上。

11. 用粘合剂实验室膜密封96孔板，以保护分光光度计免受酸的影响。

12. 读取470nm波长的板，使用水空白设置零。

### 3.825 计算

1. 从标准品、测试精浆和对照组中减去背景吸光度值（标准0 $\mu$ mol/L）。

2. 通过比较吸光度值，从标准曲线(mmol/L)中读取样品中果糖的浓度。

3. 高于最高标准的结果并不表明可能的临床疾病——这些值可能不准确，可以报告为>90mmol/L，通常不需要重新检测。

4. 将每个样品的结果乘以稀释因子40，得到未稀释的精浆中果糖(mmol/L)的浓度。

5. 对每个精浆，计算两次重复的平均值：

对于结果>10mmol/L，重复的一致性应在10%以内，即。估计数/估计数的平均值之间的差异为10%。  $\leq$

如果不这样，对两种新的精液重复分析。

对于结果10mmol/L，应评估任何超过0.5mmol/L的差异，以确定任何一个重复中的错误是否表明存在诊断错误的可能性，或该差异是否与临床无关。如果有必要，对两种新的精液重复分析。



6. 将浓度乘以精液体积(ml)，得到射精的总果糖含量( $\mu\text{mol}$ )。

### 3.826 参考下限

果糖的参考下限是每次射精(245)  $13\mu\text{mol}$  (以及TGCooper未发表的数据)。

## 3.8.3 射精过程中中性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的测定

### 3.8.3.1 背景

精浆中既含有一种起源于附睾的中性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶同工酶，也含有一种由前列腺贡献的酸性同工酶。后者可以被十二烷基硫酸钠(SDS) (248) 选择性地抑制，以允许测量中性的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶，这反映了附睾的功能。通过使用抑制剂蓖麻精胺，考虑到非葡萄糖苷酶相关的底物分解，使检测方法更加敏感。下面描述的方法用于96孔板阅读器，灵敏度为 $1.9\text{mU/ml}$  (249) 精液和试剂的体积可以按比例调整为3ml或1ml刀具的分光光度计。在计算结果时，必须进行适当的修正。

### 3.8.3.2 原则

葡萄糖苷酶将合成的葡萄糖糖苷底物转化为对硝基苯酚，加入碳酸钠后变成黄色(波长405nm)。

### 3.8.3.3 代理

一种用于估计精液中附睾中性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的试剂盒已市售。只推荐包括SDS和蓖麻精胺在内的试剂盒用于测量精液中的该酶。或者，准备以下试剂。

缓冲液1 (0.2mol/L磷酸盐, pH6.8) :

溶解4.56克的 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 在100毫升纯化水中。

溶解2.72克的 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 在一个单独的100毫升的纯化水中。

混合每个大约相等的体积，直到pH为6.8。

缓冲液2: 将1gSDS溶解在100ml缓冲液1中。SDS会在 $+4^\circ\text{C}$ 储存时沉淀，但在温和和加热时重新溶解。

着色试剂1 (为停止反应, 0.1mol/L碳酸钠) : 溶解6.20g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 在500毫升的H中 $\text{O}_2$ 。



彩色试剂2：用0.1gSDS溶解在100ml彩色试剂1中。

底物对硝基苯酚葡萄糖基乙醇苷 (PNPG) (5 mg/ml)：将0.1gPNPG溶解在20ml缓冲液2中，在约50° C的热板上加热，搅拌约10分钟。一些晶体可能仍然不溶解。溶液在使用期间应保持在37° C。为每种检测方法做一个新鲜的溶液。

精液空白的葡萄糖苷酶抑制剂（蓖麻精胺，10mmol/L）：

将18.9mg蓖麻胺溶解于10ml纯水中。

在纯化水中稀释10倍，得到1mmol/L的工作溶液。

在-20° C处冷冻大约1ml的等分物。

BUR标准曲线

产品对硝基苯酚 (PNP) (5mmol/L)：

- 将69.5mgPNP溶解于100ml纯水中，必要时加热溶液。
- 存储在+4° C在黑暗中的铝箔覆盖或棕色玻璃瓶。每3个月配制一次一个新的标准解决方案。

为标准曲线（在孵育的最后一小时内）准备工作溶液（200 $\mu$ mol/L工作标准）：将400 $\mu$ l的5mmol/L原液-PNP放入10毫升容量瓶中，用彩色试剂2配制多达10毫升。

用彩色试剂2稀释200 $\mu$ mol/L工作标准，以增加160、120、80和40 $\mu$ mol/LPNP的标准：

表3.7评价 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的推荐标准

最终PNP浓度	对应于精液活性 (mIU/ml)	工作解决方案 200 $\mu$ mol/L ( $\mu$ l)	颜色试剂2 ( $\mu$ l)
200 $\mu$ mol/LPNP	124	1000	0
160 $\mu$ mol/LPNP	99	800	200
120 $\mu$ mol/LPNP	74	600	400
80 $\mu$ mol/LPNP	50	400	600
40 $\mu$ mol/LPNP	25	200	800
0 $\mu$ mol/LPNP	0	0	1000

精浆冷冻内部质量控制池：见第135页第3.8.4节。



### 3.8.3.4 程序

步骤1-3可以与锌（第126页第3.8.1节）和果糖（第129页第3.8.2节）的评估相同。

1. 离心在3000g下分析10-15分钟后剩余的精液样本。在-20精液° C分解并储存无精子精液浆直到分析。无精子精浆可以与其他样本汇集，以提供一个质量控制池作为未来分析的内部标准。
2. 解冻无精子精等离子体，在涡旋混合器上混合。也解冻少量的精浆以进行内部质量控制。
3. 将精等离子体样品在涡旋混合器上好好混合。
4. 使用正移位移液管将15 $\mu$ l精液放入两个1.5ml的管中。包括重复空白(15 $\mu$ l水)和精液池的4个15 $\mu$ l内部质量控制样本。
5. 在两个内部质量控制样品中加入8 $\mu$ l的1mmol/L蓖麻精胺，提供精浆空白值。
6. 在每个管中加入约37° C的100 $\mu$ lPNPG底物溶液。
7. 每根管旋转，在37° C孵育2小时（确切的温度和时间控制是至关重要的）。
8. 2小时后加入1ml着色试剂1停止孵育，并混合。
9. 将250 $\mu$ l的样品和标准品转移到96孔板上。
10. 在60分钟内在96孔板405nm波长的阅读器中读取板，使用水空白设置为零。

### 3.8.3.5 计算

1. 通过比较吸光度值，从标准曲线( $\mu$ mol/L)中读取样品产生的PNP浓度。
2. 高于最高标准的结果并不表明可能存在临床疾病——该值可能不准确，可以报告为>124mIU/ml，而且通常不需要重新检测。
3. 乘以校正因子（0.6194），得到未稀释精浆（IU/L）中中性葡萄糖苷酶的活性。
4. 从每个样品中减去蓖麻精胺精浆空白物的活性（IU/L），以获得校正后的（葡萄糖苷酶相关）活性。
5. 复制品应在10%范围内达成一致。估计差/估计平均值10%）。如果他们不一致，如果两种不同的结果表明不同的诊断结果，则重复试验。



6. 将校正后的活性乘以精液体积 (ml)，以获得射精时的葡萄糖苷酶活性 (mU)。



注：葡萄糖苷酶活性的一个国际单位 (IU) 定义为在 37° C 下每分钟生产 1 个  $\mu\text{mol}$  产物 (PNP)。在该实验中，活性来自 15  $\mu\text{l}$  精液，120 分钟后总体积为 1.115 ml，因此校正因子为  $(1115/15)/120=0.6194$ 。

### 3.8.3.6 参考限制

中性  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的参考下限是 20 mU/射精 (245) (以及 TG Cooper 未发表的数据)。比较 1962 年无精管结扎术后射精和 1106 年射精与 >4000 万精子，最好的截止是 23.1 毫米/射精 (250) 也有迹象表明输精管结精后射精收集长时间戒烟可以高值中性  $\alpha$ -葡萄糖苷酶，特别是在射精高含量的锌，表明前列腺  $\alpha$ -葡萄糖苷酶可能相互作用分析 (250)。

## 3.8.4 精浆液池

精液生物化学评估的一个必要组成部分是系统地使用 IQC 样本。离心后获得的无精子精浆 (3000g 10-15 分钟) 应在 -20° C 下保存，直到评估。分析后的剩余精浆可以再旋转，每年一次或两次用于制造大量的混合精浆，在彻底混合后 (磁性搅拌器，室温)，以足够的体积作为生物化学分析批大小。QC 样品可在 -20° C 下保存在密封试管中长达 12 个月。

新的精液池与正在进行的 QC 样本在每个分析物的至少三种不同的分析中重复运行。因此，评估了检测内和检测间的变异性，并确定了新的精浆 QC 批次的总可接受的变异性。

## 3.9 射精顺序的评估

正常射精序列对精子功能、正常受精能力和胚胎发育具有生理意义。正常序列意味着绝大多数精子在第一个射精部分排出，主要是前列腺分泌，而后三分之二的射精由精囊液 (251, 252) 精子活力、生存和染色质稳定性促进初级接触富锌前列腺分泌，而精子主要接触碱性、锌结合精囊液则相反 (13, 253-257)。

前列腺的炎症过程或先天性畸形可导致射精管开口或附近的狭窄 (或射精管阻塞-edo) (258-265) 狭窄的影响是延迟精子进入尿道，直到精囊收缩的压力迫使射精管的内容物进入尿道。常规精液检查的实验室结果主要是运动能力差。



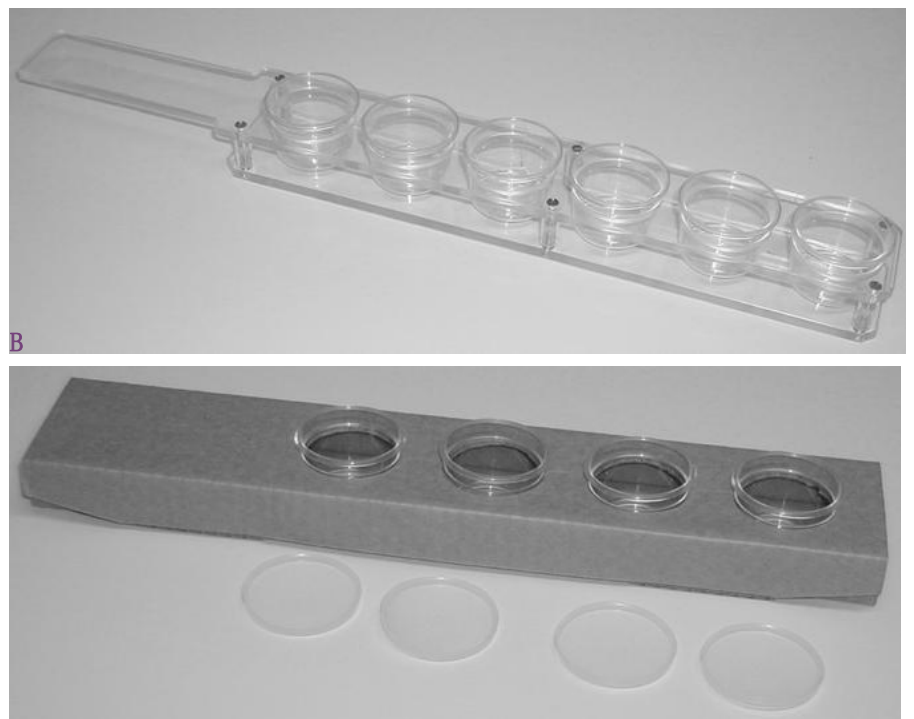
甚至对整个射精的生化评估也不能揭示精子是否异常暴露于精泡液。通过精液检查诊断EDO的唯一方法是收集单个射精分数，检查精子含量、活力和生化组成（分别为前列腺和精囊分泌物）(13)。

如果诊断出射精序列紊乱，就有微创手术技术来治疗EDO（266-272），也可以通过让男性将整个射精直接收集到精子洗涤液中来减少精泡液的负面影响。

### 3.9.1 设备—除了常规的射精检查

这包括任何一套射精收集装置，允许病人按照排出射精分数的顺序收集射精分数。

图。3.8分裂射精收集装置的两个例子A



经实用实验室男科实用指南许可转载，剑桥大学出版社（273）

### 3.9.2 患者程序

患者被指示按照排出射精分数的顺序收集射精分数，当小瓶提交给实验室时与患者确认。除了瓶的常规标识标签外，瓶应按顺序编号。



### 3.9.3 样品程序

凝血物或凝胶的形成只可能发生在以精泡分泌为主的部分。在将温度调节至37° C（用于评估运动性）后，可以开始对以前列腺分泌为主的组分进行检查。含凝血剂的组分在37° C下可在30分钟内溶解。缺乏任何前列腺来源的蛋白酶的组分可以抵抗更长时间的液化。

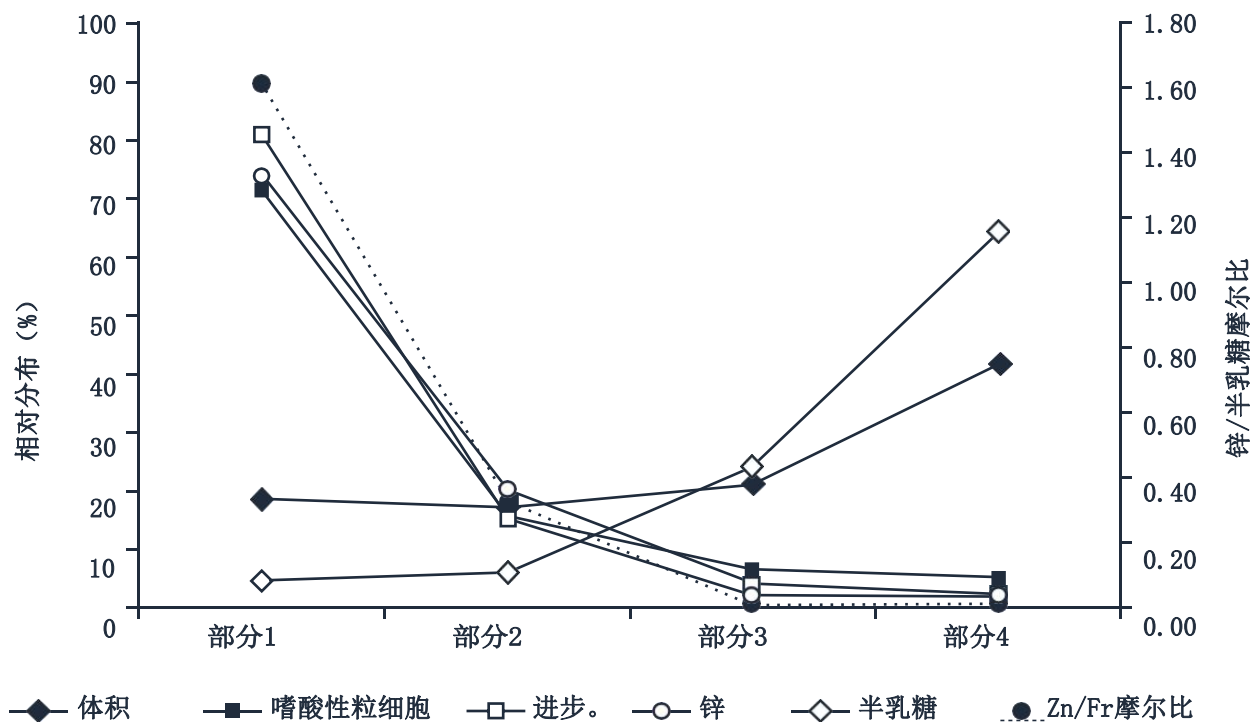
### 3.9.4 检查

根据整个射精的常规检查，对体积、锌、精子数量、活力、前列腺标记物)和果糖（精囊标记物）进行评估。

### 3.9.5 计算

计算体积、精子的相对分布、进展性精子的比例和生化标志物的相对分布。首先计算每个组分的总数，然后计算每个组分的相对分布。 3.9)。

图。3.9正常四分射精结果的图形表示例子，显示体积、精子、进行性运动、锌和果糖的分布



经实用实验室男科实用指南许可转载，剑桥大学出版社 (273)



### 3.9.6解释

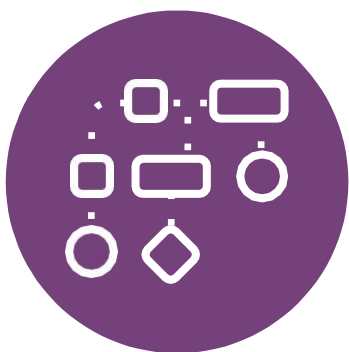
大部分精子预计是在射精的前三分之一，主要是富含锌的前列腺分泌物。精囊液在富含精子的部分中的大量贡献表明，一种非生理情况可能会阻碍精子的功能能力。

识别具有良好进行性运动的射精部分有助于未来选择抗逆转录病毒治疗的精子——这一事实早在试管受精（274）时代之前就已经描述过了。

此外，对于无法确定副腺标记物锌和果糖的实验室，可以通过评估精子的相对分布和渐进性运动来获得有用的信息，以确定具有更高受精成功概率的精子可能来源。







## 第四章： 高级考试

4.1 精液氧化应激和活性氧物种测试.....	140
4.2 顶体反应的评估.....	144
4.3 精子染色质评价.....	149
4.4 精子中的跨膜离子通量和转运.....	152
4.5 计算机辅助精子分析 (casa).....	155
4.6 新兴技术.....	159

男性不育通常是由于精子产生不足、精子形态异常、精子活力受损或其组合。这种表型可以通过精液分析忠实地识别出来。然而，在许多患者中，不孕症主要是由于精子的功能障碍，其中射精检查产生的参数看起来完全正常。人类精子功能障碍的机制仍是个谜。人类精子必须在女性生殖道内完成一系列要求很高的任务，它们必须覆盖几厘米的距离，在那里它们可能会通过化学和物理线索来定位卵子。此外，精子必须经历顶体的胞吐作用和过度激活的运动，才能突破卵子的保护法衣。精子在一个被称为获能的成熟过程中，只在女性生殖道内获得大多数这些技能。虽然对受精至关重要，但这些精子的功能都没有在经典的射精检查中得到评估。

“

为了更深入地了解男性因素不育的生物学基础，已经开发了一系列的功能测试，旨在评估人类精子满足对受孕至关重要的基本过程的能力。

”

为了缩小这一诊断差距，需要将分子和细胞精子生理学的知识转移到临床。此外，实施男性不育领域的研究是最重要的，鉴于最近的文献证明精液参数的改变可能与个人的一般健康（275）此外，目前有证据表明环境污染物扮演重要角色，以及精子数量下降在过去几十年（277）。关于精子是否需要发挥功能



受精也反映了一般的健康状况，以及它们是否受到环境污染物的影响。随着我们对调节精子功能的分子机制的知识的增加，开发新的诊断测试的机会也会增加。例如，最近的数据强调了核DNA压缩和完整性在决定人类精子功能能力方面的重要性。新出现的证据表明，精子和生育（278）的DNA完整性和染色质组织之间存在联系（第86页第3.2节）。

同样，我们对调节精子功能的信号转导途径的理解的进展将对诊断测试的发展产生影响，从而能够产生关于不育男性精子缺陷过程的精确性质的详细信息。获得更深入的见解男性因素不育的生物学基础，一系列功能测试已经开发旨在评估人类精子的能力完成基本过程概念——结合透明带，顶体胞吐作用，与卵母细胞的卵黄膜融合。

一些用于研究目的的测试要求将精子从精液中分离/选择。这种程序应尽快进行，并至少在射精后1小时内进行，以限制非精子细胞对精子的任何损害。此外，必须记住的是，将整个射精收集到一个标本容器中的经典方法会导致对暴露在精囊液（251, 252）等非生理环境下的精子进行调查（参见第135页第3.9节）。

## 4.1 精液氧化应激和活性氧试验

### 4.1.1 背景

几十年来，还原氧化反应（氧化还原）在男性通道或精分泌物内可能对生育有害的假设（279-283）人们普遍认为白细胞产生的活性氧（ROS）是精液中有害的影响（第108页第3.4节）。．．然而，目前还没有一项具有里程碑意义的研究，有决定性的证据证明某种测试或氧化还原和自然或辅助受孕结果之间的关系。然而，人们普遍认为氧化应激可能是一个重要的调节器的人类精子功能和概念结果（284）氧化应激的结果是精子DNA损伤（86页3.2节），这是最常见的结果测量，但其他一些研究方法，可以用来更直接地检查抗氧化剂和ROS的平衡。从临床诊断的角度来看，这组分析方法只能谨慎使用和解释，直到存在更决定性的诊断相关性证据。本文提出的程序已广泛应用于男科研究，以及一些男科临床诊断和辅助生殖实验室。可用于评估氧化还原平衡或ROS的测定方法在它们所检测的方法和ROS的类型上都不同。



## 4.12 铝醇

该方法是基于鲁米诺醇与自由基反应时的化学发光反应。这种响应可以通过亮度测量和计算每百万精子的相对光单位数 (RLU) 来测量。

### 4.12.1 程序

改编自Dias (285) :

1. 在聚苯乙烯管中制备重量177.1mg鲁米诺中的100mM鲁米诺（5-胺-2,3-二氢-1,4-邻苯二甲嗪二酮1）10ml二甲亚砜 (DMSO) 原液。用铝箔包裹管子，因为这种溶液很感光。该溶液在室温下应稳定，但也可以冷藏储存。
2. 工作“探针”溶液：5mM鲁米诺在DMSO-通过稀释20 $\mu$ l的鲁米诺原溶液在380 $\mu$ lDMSO。应在使用前立即准备好（仅稳定24小时）。它必须不发光。
3. 测量前应允许射精液化（不到30分钟，但根据WHO核心射精检查方法，不超过1小时）。
4. 亮度测量值应一式两份（作为绝对最低值）。

对于每一次射精，将390 $\mu$ l射精与10 $\mu$ l工作“探针”溶液混合制备单管。涡旋混合5秒，然后至少重复测量管（或板中的井）。

5. 在所有检测集中，应有：

DPBS或媒体的空白

390 $\mu$ lDPBS或介质+10 $\mu$ l“探针”的阴性对照

阳性对照，均添加50 $\mu$ l过氧化氢（30%）+10 $\mu$ l“探针”：

射精（340 $\mu$ l）或

DPBS或媒体（340 $\mu$ l）。

6. 数据应通过一些读取，按每个分析物的顺序等间隔，然后重复一次，根据仪器的类型，并计算平均值。
7. 阳性对照可以通过稀释系列来评估特定环境下检测的敏感性，并确认在任何给定的检测集中都会检测到有意义的结果。



8. 数据通过从平均负对照中减去样本的平均结果进行归一化。这可以通过每毫升以数百万计的精子浓度来修正为每个精子，但目前还不清楚每个精子的结果是否比每个样本更有意义，所以两个结果都可以引用。

#### 4.1.2.2 问题

发光计通常不被认可用于体外诊断，仅用于研究。

仪器的设计（如样品的体积），因此校准、灵敏度、动态范围，甚至使用的单位差异很大。

由于描述的机器和方法之间的差异以及预后研究质量较低，没有一致的参考值。

剪切力/混合会改变信号，因此结果对样品的处理和测量的时间非常敏感。

鲁米诺醇对pH、温度变化和化学物质的干扰很敏感，这些干扰通常在射精之间有所不同，如抗坏血酸（减少信号）或含硫分子（增加结果）和其他蛋白质水平。

#### 4.1.3 氧化还原电位

该方法是基于用电化学方法直接测量样品的氧化还原平衡。作为一种组合样本的集成测量，需要最小的操作，因此是相当标准化的，它是目前的许多低生育能力研究的主题。目前市场上只有一台机器有专利保护。它使用一次性传感器进行测量。在使用时，应使用制造商的最新协议，这超出了本手册的讨论。

#### 4.1.3.1 问题

目前缺乏已发表的强有力的证据基础；在与生殖结果相关的结论性数据出现之前，它目前仍被认为是一种研究测试。

样品的粘度和低液化可能会阻碍样品的流动，从而阻碍参考室的填充。

对于所有的精液测定，射精后的分析时间应标准化。

#### 4.1.4 总抗氧化能力

这种方法旨在评估整个射精平衡任何氧化应激的能力。因此，这是在测量精浆中的抗氧化酶和系统的能力，以及任何抗氧化剂来自



或最终进入精浆的食物（但不是精子；这些通过离心去除）。在实验中，抗氧化剂抑制自由基阳离子对2' 叠氮基（3-乙基苯噻唑啉磺酸）(ABTS)的氧化。它被开发用于许多体液，因此不是精液特异性的（286）Trolox，一种维生素E（生育酚）的类似物，用于创建一个标准范围，所以分析通常用Trolox等量的微摩尔表示。该方法被解读为准色法，因此需要一个适当的分析仪。

#### 4.141 程序

1. 由于它在生育能力之外的许多系统中普遍使用，该检测方法可以从许多供应商作为预包装的试剂盒获得。应遵循相关套件的说明。也可以从单独购买的单独组成成分中构建试剂包。
2. 射精应被允许完全液化，然后离心 >1000g，持续15分钟。然后可以清除透明的精浆。可以检查 $\mu$ l的血浆以确认没有精子。如果有精子，再离心。
3. 清晰的精浆可以同时引用并直接冷冻以供以后的分析。这可能有利于允许批处理的分析。结果在任何给定的冷冻温度下的稳定性都应由进行试验的实验室进行检查和验证。
4. 在准备分析测量时，所有成分都应提前进入室温。检测成分都是对光敏感的，所以在设置和执行检测时，应该尽可能最小化，比如关闭实验室灯。
5. 测量结果应一式两份（作为绝对最低值）。吸光度在750nm处读取。

#### 4.142 问题

有一个强大的，坚实的，明确定义的文献分析过程和代理可以影响结果跨系统（287），但在使用这个分析得出医学结论围绕男性精液参数和ROS对生育能力的影响，目前仍被视为一个研究测试，直到决定性的数据与生殖结果出现。

由于机器和方法之间的差异，预后证据质量低，没有基于证据的参考限制。

理想情况下，由于重复的数量和标准，检测方法是在酶标仪中读取的。



## 4.2 顶体反应的评估

### 4.2.1 背景

顶体结构的完整性和经历顶体胞吐的能力对正常生育是必要的。顶体反应是在体内发生在卵母细胞附近的一个过程，它必须在精子穿透卵母细胞法衣并与卵母细胞融合之前发生。钙内流被认为是正常顶体反应的起始事件。在畸精子症和少精子症的情况下，一些患者的射精检查结果可能正常，但精子可能在顶体结构或对顶体反应（288）刺激的反应能力上发生改变。

已知有几种刺激会引起顶体反应。其中，透明带蛋白（289）和黄体酮（290）在卵母细胞附近的浓度升高，被认为可能是顶体反应的生理诱导物。其他刺激，如钙离子载体，将诱导顶体反应，但结果不是或更少相关那些从透明带诱导顶体反应（291）最近荟萃分析（288）显示了显著相关的顶体反应精子的比例后诱导刺激受精率。顶体反应诱导后的顶体状态可以通过显微镜或流式细胞术和荧光标记凝集素（292）评估，如顶体（豌豆凝集素）（第152页第4.4.1节）或顶体（花生凝集素），或抗顶体抗原CD46（293）单克隆抗体使用顶体反应诱导剂诱导钙内流是测试活性精子进行顶体反应（294, 295）能力的一种方法，然而，在检测顶体状态之前，需要进一步的验证和评估。

在这里，我们将描述静态评估顶体状态和动态的，诱导的顶体反应的程序。

### 4.2.2 顶体状态评估

#### 4.2.2.1 程序

该方法最初是由Cross（296）基于Mortimer等人的研究开发的。（297）证明了Arachea（花生）凝集素（FITC-PNA）与精子的外顶体膜结合。随后，用Aitken（294）对该方法进行了改进，引入低渗透膨胀试剂（第69页第2.5.13.2节），以评估仅在活精子中的顶体反应。该过程简单，可重复性，并产生非常清晰的图像（图4.1第147页）。最好使用不受白细胞、生殖细胞和死精子等污染物影响的高度运动的精子制剂。因此，根据样品的质量和要遵循的研究方案，应清洗样品（第164页第5.3节）或游泳或密度梯度准备（第165页第5.4节和第166页的第5.5节）。



### 4.2.2.2 代理

用异硫氰酸荧光素(FITC) (P硫氰酸荧光素) 标记的唾液凝集素 (PSA-FITC)

用异硫氰酸荧光素标记的凝集素(FITC) (AHLPA-FITC)

•DPBS, pH7.4

0.9% (9g/L) 氯化钠: 将0.9g氯化钠溶解于100ml纯化水中

12月95% (v/v) 乙醇

PSA和AHLPA原液: 在4mgDPBS中稀释PSA-FITC或AHLPA-FITC, 在-20° C的0.5ml等分中保存

PSA工作液: 将0.5mlPSA原液稀释入10mlDPBS, 4° C保存。这个解决方案可以稳定长达4周。

### 4.2.2.3 精子的简单清洗

1. 将精液样品混合, 取出约0.2毫升。
2. 用0.9% (9g/L) 生理盐水稀释至10ml。
3. 800克离心机, 持续10分钟。
4. 提示并丢弃除20-40 $\mu$ l的上清液外的所有内容。
5. 通过温和的移液法将精子颗粒重新花回到剩余的上清液中。
6. 重复清洗程序。

### 4.2.2.4 处理纯化的精子制剂

1. 稀释游泳 (第165页第5.4节) 或一次清洗的密度梯度制剂 (第166页第5.5节) 至10ml, 以获得1000万/ml浓度。
2. 800克离心机, 持续10分钟。
3. 提示并丢弃除20-40 $\mu$ l的上清液外的所有内容。
4. 将精子颗粒在低渗透肿胀缓冲液中重新悬浮30分钟。
5. 800克离心机, 持续10分钟。
6. 取上清, 丢弃上清, 轻轻移液重新加入少量缓冲液中。



#### 4.2.2.5 准备涂片

1. 准备约1厘米长、约5 $\mu$ l悬浮液的复制精子涂片。
2. 用相衬显微镜（ $\times 400$ ）检查湿式涂片。
3. 确保精子均匀分布在载玻片上而不结块。
4. 允许空气干燥。
5. 在95%（v/v）乙醇中固定30分钟。
6. 允许空气干燥。

#### 4.2.2.6 与PSA-FITC染色

1. 将10ml PSA-FITC或AHL-FITC工作溶液倒入垂直染色罐中。
2. 将固定和风干的载玻片浸泡在PSA-FITC染色中。
3. 允许在4 $^{\circ}$  C下染色超过1小时。较长时间的染色时间-长达18小时-不会影响PSA结果。如果短时间不到1小时，就会让幻灯片很难得分。
4. 用纯化的水清洗每个载玻片，并安装在水溶性介质中（第48页第2.4.9.5节）。

#### 4.2.2.7 评分

在 $\times 1000$ 放大下观察荧光光学，在450-490nm激发下油浸泡和合适的二向色和滤光片组合，观察519nm的发射峰。

将精子分类如下：

活的顶体完整：尾巴卷曲的精子，其中超过一半的头部发出明亮和均匀的荧光。4.1)；和

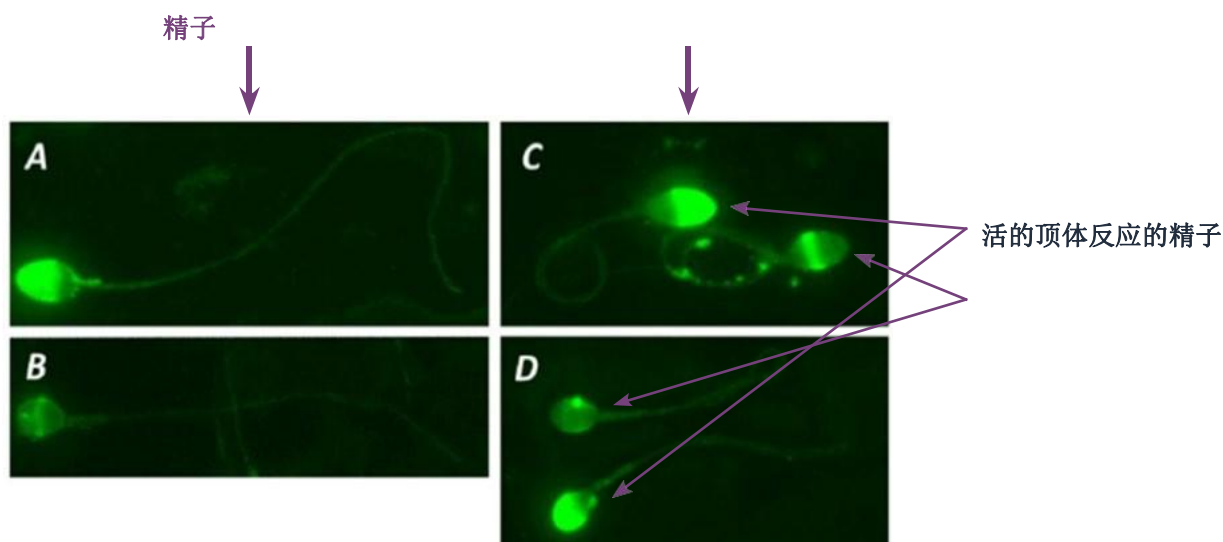
活的顶体反应：尾巴卷曲的精子在赤道段只有一条荧光带，或者在顶体区域根本没有荧光染色。4.1)。

通常在该实验中不对死亡精子进行评分，但监测死亡细胞的百分比可以对执行该实验的个体之间在评分/处理中的任何错误进行故障排除。死亡细胞的百分比预计与原始精液没有显著差异。





图。4. 1FITC-pna染色的顶体完整和顶体反应、可存活和不可存活的精子的例子 活



顶体完整的精子，近端头部染色，和顶体反应的精子，染色的赤道带或顶体后区域。卷尾表示HOS手术后的精子活力（也见第69页的第2.5.13.2节）。

#### 4.2.2.8 计算与顶体反应的精子

1. 在实验室计数器的帮助下，测量每个顶体类别的数量（顶体完整和顶体反应）。
2. 评估每个重复中的200个精子，以达到一个可接受的低采样误差。

计算复制切片中顶体反应精子的两个百分比的平均值和差异。

确定第33页表2.3差异的可接受性，即由于抽样误差，95%的样本预计会出现两个计数之间的最大差异。

如果这些百分比之间的差异是可以接受的，则报告顶体反应精子的平均百分比。如果差异过高，请重新评估这两张幻灯片。

报告顶体反应精子的最接近总数的百分比。

#### 4.2.3 诱导顶体反应试验

腺体反应可以通过使用离子载体(离子载体挑战后的腺体反应，ARIC) (298) 或使用孕酮(孕酮挑战后的腺体反应，ARPC) (290) 或其他刺激来诱导。



### 4.2.3.1 代理

补充Earle的平衡盐溶液（sEBSS-见第225页第8.4节）含有3.0%（30g/L）BSA

注：如果进行孕酮诱导，应使用释放/木炭剥离血清，以避免其他脂溶性分子（包括激素）污染的影响。

SUB二甲基亚砜(DMSO)

· 离子载体A23187, 1mmol/L原溶液：溶解5.23mgA23187在10mlDMSO、孕酮2-10μg/ml（299）或其他顶体反应诱导剂（288）注意：可能存在有关安全预防措施的法律要求，在使用离子载体前应仔细评估风险。

12月70%（v/v）乙醇。

### 4.2.3.2 程序

1. 精液30-60分钟使新鲜精液完全液化。
2. 为每种试验制备新鲜的sEBSS容量诱导培养基。
3. 使用前将培养基加热至37° C，最好在5%（v/v）CO<sub>2</sub>在空气培养箱中。
4. 通过密度梯度离心(DGC)（第166页第5.5节）或使用新鲜的sEBSS培养基游泳，准备一个高度运动的无白细胞、生殖细胞和死亡精子等污染物的精子群。
5. 准备对照和复制实验管，每个管含有约1ml悬浮液， $1 \times 10^6$  运动精子。
6. 将精子悬液在5%（v/v）CO<sub>2</sub>的37° C气氛中孵育3小时<sub>2</sub>在空气中诱导电容（松开管的盖以允许气体交换）。如果一个CO<sub>2</sub>培养箱不可用，使用HEPES缓冲介质（第225页第8.4节），盖紧试管，在空气中以37° C孵育。
7. 在复制实验管中加入10μl的A23187原液(1mmol/L)，最终浓度为10μmol/L。
8. 向控制管中加入10μl的DMSO。
9. 将所有试管在37° C下孵育15分钟。
10. 从每根管子中取出一个小块，以确定运动性。
11. 下一步是关于准备好的精子（第145页的第4.2.2.4节）。

工艺（第4.2.2.5节和第4.2.2.6节）、分数（第4.2.2.7节）和计数（第4.2.2.8节）。



### 4.2.3.3 质量控制

每次进行测试时，都应该进行一个阳性对照样本（来自其精子先前对离子载体或孕酮反应良好的男性的精液）。

每次准备一批新染色时，使用已知反应的阳性对照精子，与旧染色进行交叉试验，以确保染色制作正确。

## 4.3 精子染色质评价

### 4.3.1 背景

精子染色质结构的稳定性对胚胎的发育和质量至关重要，这可能是由于父系基因组（300）的保护和快速可用性。精子染色质的稳定性的障碍与低受精在辅助生殖（301）异常精子染色质结构可能导致精子DNA损伤，如双或单DNA链断裂，由于错误的DNA压缩（即用原蛋白替代组蛋白的异常）。精子染色质的正常性可以通过评估DNA链断裂（第86页第3.2节）来评估，也可以通过与组蛋白（苯胺蓝）或核酸（铬霉素A3）结合的染料来评估，并通过组织学或流式细胞术进行评估。

### 4.3.2 苯胺蓝色评估

苯胺蓝（AB）与组蛋白的赖氨酸残基结合。用AB染色的精子百分比可以在整个精液中进行评估，也可以在选择的精子（游动或密度梯度准备（见第166页第5.5节））中进行评估。

#### 4.3.2.1 协议

##### 代理

AB粉溶解在含有4%冰醋酸（pH3.5）的水中，最终浓度为5%。

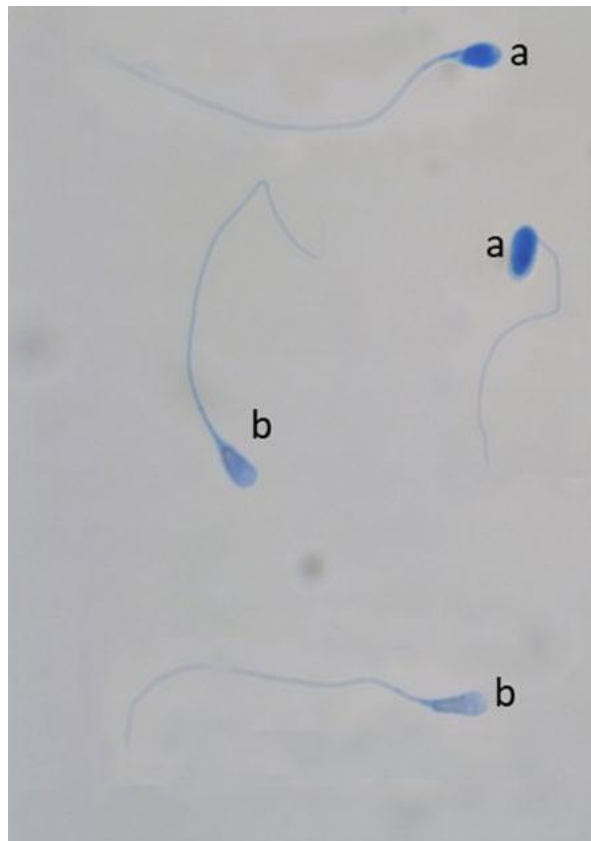
##### 程序

1. 取 $1 \times 10^6$  精子（不少于20万个精子，如果没有100万个精子）。
2. 对于整个精液，在任何精子培养基中清洗精子两次（第164页第5.3节）（室温下500g离心5分钟）。如果选择精子，500g离心一次5分钟。
3. 取出上清液，固定在50 $\mu$ l 14%多聚甲醛（最终浓度：200 000 精子/10 $\mu$ l）中，室温下固定30分钟。
4. 放置一个10 $\mu$ l的样品滴，让风干。
5. 将载玻片在AB溶液中室温浸泡7分钟。



6. 用水冲洗载玻片两次，以消除过量的染料。
7. 让滑动空气干燥。
8. 在光学显微镜下进行油浸评估（ $\times 100$ 物镜和 $\times 10-12.5$ 眼部放大倍数）。至少应该有200个精子被得分。

图。4.2光学显微镜（ $\times 100$ ）和ab阴性(b)精子的例子（1000，油浸）



来自Marchiani等人。(302)

#### 4.3.2.2 问题

在某些情况下，评分可能会很困难。特别是，在精子凝集的情况下，可能会遇到困难。

评分依赖于操作员。

#### 4.3.3 色霉素A3评估

染色霉素A3(CMA3)与原乙酰胺竞争与DNA螺旋的小凹槽的结合。用CMA3染色的精子的百分比可以在整个精液或通过游动选择的精子中进行评估。

### 4.3.3.1 协议

#### 代理

##### 1. 准备CMA3的原液:

准备McIlvaine缓冲液 (20ml, 可室温保存):

加入16.47ml钠溶液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.2M和3.53ml的柠檬酸溶液0.1M10。

SUB添加 $\text{MgCl}_2$ 最终浓度达到10毫米。pH应该是7.0。

将5mgCMA3粉放入10ml迈克尔万因缓冲液中, 得到2×原液。CMA3原液可储存在-20° C。

##### 2. 使用时, 稀释mcilvane缓冲液中1:1等分, 获得CMA3的最终浓度为0.25mg/ml。

#### 程序

##### 1. 取 $1 \times 10^6$ 精子 (不少于40万个精子, 如果没有100万个精子)。

对于整个精液, 在任何精子培养基中清洗精子两次 (第164页第5.3节), 并在室温下以500g离心5分钟。

如果选择精子, 500g离心一次5分钟。

##### 2. 取出上清液, 在50 $\mu$ l4%多聚甲醛 (最终浓度: 400 000 精子/10 $\mu$ l) 中固定30分钟。

##### 3. 取20 $\mu$ l样品, 室温下300g离心7分钟。

##### 4. 取出上清液, 在室温下300g离心1分钟, 用DPBS洗涤7分钟。

##### 5. 取出上清液, 加入100 $\mu$ lCMA3溶液 (0.25mg/ml), 室温孵育20分钟。

##### 6. 加入200 $\mu$ lMcilvaine缓冲液, 室温下300g离心7分钟。

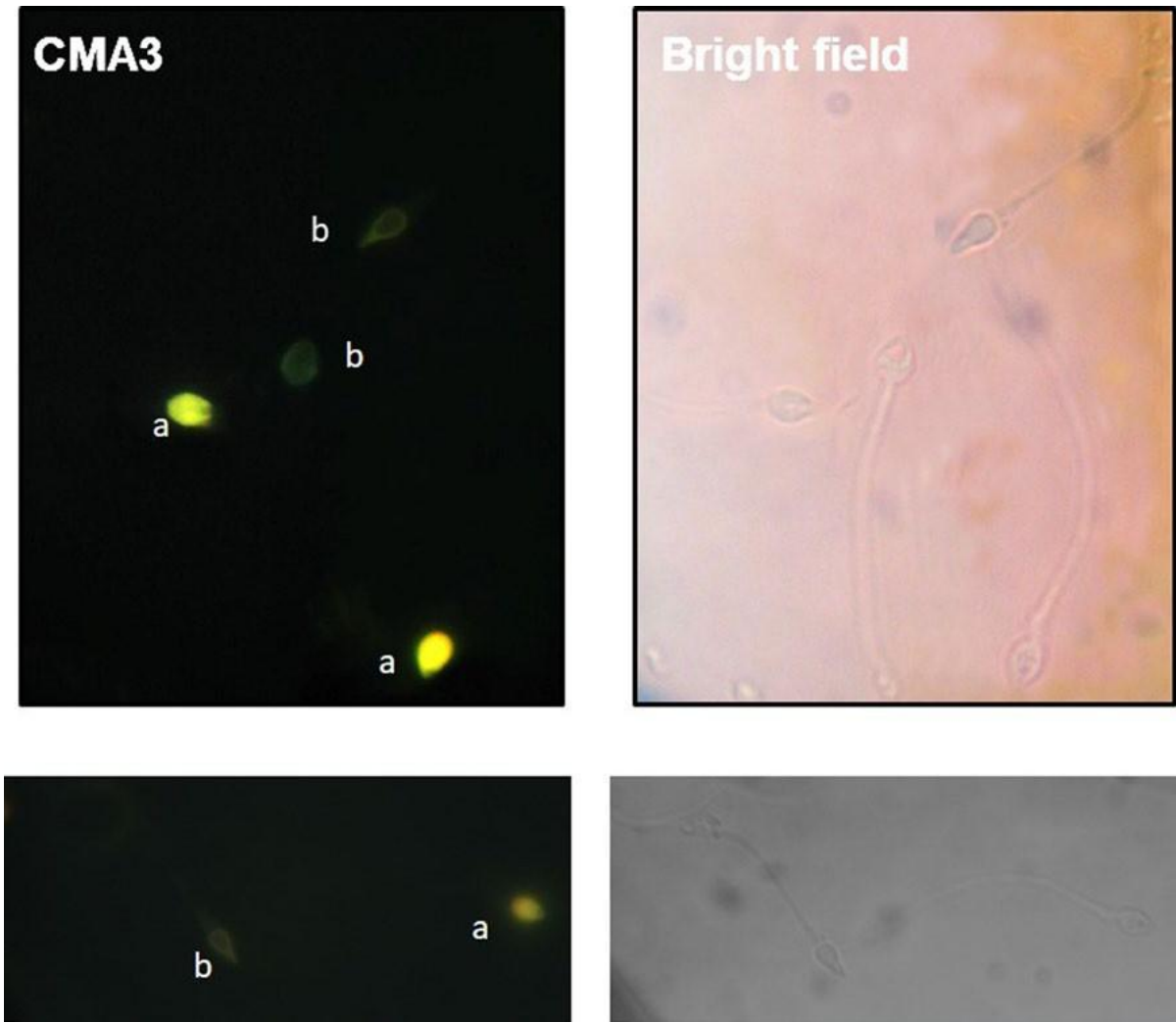
##### 7. 弃上清, 在10 $\mu$ lMcIlvane缓冲液中重悬颗粒并放在载玻片上。

##### 8. 让水滴风干, 加一滴DPBS, 在上面盖上盖子。

##### 9. 用荧光显微镜 (激发波长445nm, 发射波长575nm) 读取。至少应该有200个精子被得分。



图。4. 3CMA3阳性(a)和CMA3阴性(b)精子的示例（左图）



在右面板（明亮视野）中，可以在同一视野中看到cma3阴性精子的存在。改编自马尔基亚尼等人。(303)

#### 4.3.3.2 问题

在某些情况下，评分可能会很困难。特别是，在精子凝集或有荧光背景的情况下可能会遇到困难。

评分依赖于操作员。

## 4.4 精子中的跨膜离子通量和转运

### 4.4.1 背景

精子跨膜离子通量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障碍的一条前进途径。导航，



获能、过度活化和顶体胞外作用是由细胞内pH(pH)、膜电压(V)和细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度([Ca<sup>2+</sup>])。这些信号事件是由独特的,主要是精子特异性的离子通道,交换器和转运体的相互作用介导的。铜钙通道,Slc3K通道,H<sub>1</sub>H通道,Na/H交换器(sNHE、NHA1、NHA2)、Ca<sup>2+</sup>ATP酶(PMCA4)和Mg转运体(CNNM2,CNNM4)。许多尚未解释的精子功能障碍的病例可能是由于这些蛋白质中的一种或多个蛋白质的功能缺陷。支持这一观点的是,影响CatSper基因的基因畸变、CatSper功能或表达缺陷以及K<sup>+</sup>通道功能缺陷与男性不育(304)有关,缺乏评估患者精子中离子通道、交换器和转运体功能的常规诊断程序。然而,已经在临床研究的框架内研究(低到中等吞吐量)患者精子中离子通道的活性。

#### 4.4.2电生理学和动力学钙荧光法评估CatSper的功能

精子特异性的、孕酮激活的CatSper通道控制着钙的流入进入鞭毛,从而影响游泳行为。CatSper功能的丧失与男性不育和体外受精失败有关(304-307),这表明CatSper功能失调的精子只能使用ICSI受精。

CatSper在人类精子中的功能可以分别通过电生理学和动力学Ca<sup>2+</sup>荧光法来研究。运动精子通过游泳程序或DGC进行纯化。来自人类精子的CatSper电流的电生理记录是在全细胞结构中缺乏二价离子的溶液中的,玻璃电极位于细胞质液滴或颈部区域。一旦建立了千兆欧(电阻,GΩ的测量方法)密封和全电池结构,膜电压的去极化就可以引起典型的一价CatSper电流。这些电流缺乏显著的衰减表明CatSper功能障碍。

Ca<sup>2+</sup>荧光法,悬浮精子装载荧光钙指示染料(例如,Fura-2或Fluo-4)。为了去除装载后多余的细胞外指示剂,精子离心沉淀,在新鲜缓冲液中重悬]通过指标的荧光发射来监测悬浮精子的含量。分别使用荧光板滴度仪或光谱仪或比色仪。钙发出的荧光在注射CatSper激动剂前后记录指示剂。孕酮、前列腺素)、缓冲液(阴性对照)和钙离子载体离子霉素(阳性对照)进入孔或比色皿。CatSper激动剂(s)失败,而不是离子霉素,未能增加荧光,即。[Ca<sup>2+</sup>],表明CatSper功能的丧失。直到最近,该技术还发现了两名遭受CatSper功能丧失的不育患者。遗传诊断显示,CatSper功能的丧失,因此,不孕不育是由于影响CatSper基因的基因畸变。值得注意的是,还有单个精子]成像被用于研究患者精子中的CatSper,以获得关于单个精子的信息,例如。反应细胞的比例和亚群的存在。这一发现表明,对孕酮的敏感性降低在低生育能力患者中很常见,并与受精率(308)相关。



### 4.4.3 用电生理法和荧光法研究K的功能通道

K的功能通道，即。Slo3，在人类精子中可以用低和使用全细胞膜片钳记录和V荧光法，分别。Slo3表示主K人类精子中的通道。它被钙激活了因此，将人类精子的膜电位设置在a [Ca]依赖时尚。

在电生理全细胞记录中，使用含有二价离子的细胞外溶液来抑制CatSper电流和aK膜电压的去极化可以引起典型的Slo3电流。这种方法导致发现了几个K异常的患者体外受精中的通道活性和去极化静息膜电位以及低受精率。

一种中通量的筛选方法来评估K精子中的通道活性依赖于电压敏感的荧光指标。这些指标报告V随着其荧光发射的变化而变化。由一个V细胞外培养基和细胞质之间依赖的再分配。为了筛选，从射精中纯化或稀释的精子与指示器一起孵育几分钟。然后，分别使用荧光平板阅读仪或光谱仪在微量滴度板或比色皿中记录荧光，或使用流式细胞术在单细胞水平上记录荧光。随后，精子受到K的挑战-离子载体缬氨酸霉素和含有不同钾的溶液浓度。缬氨酸霉素将膜电位设置为各自的K-Nernst潜力。因此，荧光可以转换为Vm值，允许定量精子的静息膜电位(V<sub>h</sub>)，称为K零点校准。一些研究使用这种方法来确定V因此，间接地K在人类精子中的-通道活性表明了V以及试管受精过程中的受精率。

### 4.4.4 检测离子转运体和交换器（不良）功能的方法

到目前为止，还没有技术以合理的通量评估人类精子中离子交换器和转运体的活性。因此，它们在精子功能障碍中的作用仍然难以捉摸。

### 4.4.5 摘要

在过去的十年里，新的和新兴的技术已经证明了精子的功能——因此受精——是由一组独特的精子特异性离子通道、转运体和交换器协调的。然而，这些关键信号成分的功能障碍不能通过常规的精液分析来检测到。对于大多数这些蛋白质，缺乏功能测试，目前评估CatSper或Slo3功能的技术要求太高，无法在临床实验室中实施。因此，为了进一步深入了解精子功能障碍的病理机制，需要一套新颖的、易于使用的测试方法，适合于无缝集成到当前的精液分析的框架中。





## 4.5 计算机辅助精子分析(CASA)

### 4.5.1 使用CASA来评估精子的活力

#### 4.5.1.1 背景

CASA系统最适合用于精子的运动学分析，因为它们可以检测和分析有运动的细胞。对运动性百分比的估计可能是不可靠的，因为它们依赖于确定静止精子的数量，而碎片可能与静止精子相混淆。

影响CASA仪器性能的因素有很多。... 样品制备、帧率、精子浓度和计数室深度(45, 46, 136, 309, 310)然而，如果按照适当的程序遵循(309)关于使用CASA(311, 312)的指南，则可以获得可靠和可重复的结果，所有工作人员都应在使用CASA设备和技术的优缺点方面进行适当的培训。

在使用CASA获得运动参数时，应该分析每个样本至少200个运动精子的轨迹。这意味着还需要检测到更多的精子。如果精子按运动类型进行分类，或者计划对标本内的变异进行其他分析，至少200条，如果可能，400条需要运动精子。

CASA仪器应与允许进行数据组织和统计分析的计算机软件相连。许多运动参数的分布不是高斯分布的；因此，作为每个变量的中心趋势的总结，中位数而不是平均值更合适。在进行某些统计分析之前，可能需要对单个精子的测量值进行数学转换。

#### 4.5.1.2 程序

每个CASA单元必须正确安装，以确保最佳运行。制造商指出了特定的设置，但用户应该验证该工具是否在工作，以提供必要程度的可靠性和可再现性。使用合适的质量控制材料，如录像记录，是必要的(第235页上的第8.6.2节)。一些作者在他们的作品中讨论了CASA系统(46、309、312-314)。

#### 4.5.1.3 精子样品制备

CASA的精子样本应按照第2章所述进行收集和制备。CASA系统必须将样品保持在稳定的37°C，因为人类精子的运动对温度变化非常敏感。如果没有过量的碎片或其他污染物，就可以在未稀释的射精中评估运动性和精子浓度的特征。精子浓度可以在 $2 \times 10^6$ 的样本上计算出精子活力 $\%/\text{ml}$ 至 $50 \times 10^6/\text{ml}$ (102)，取决于CASA系统。错误经常发生在精子浓度较高的样本中。大于 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 。这些样品应被稀释，最好是来自同一病人的精液进行稀释。如果这是对生精液的分析：



1. 高速将部分精子样本（高达16000克或最大可用）离心6分钟，以获得无精子的精液。
2. 用纯精液稀释天然精液样品，使其浓度达到 $50 \times 10^6$ 以下/ml。

需要注意的是，这仍然可能会改变精液的性质；因此，受流体动力学效应（粘度、粘弹性）或其他环境因素控制的运动参数可能会受到改变。

深度为 $20\mu\text{m}$ 的一次性计数室可提供可靠的运动结果，通常应对两个计数室进行评分。应该分析几个具有代表性的视野。这些领域的确切选择如何影响结果尚未得到详细的研究。然而，视场应该跨越房间的区域，系统建议每个房间至少分析6个视场（总共12个视场）通常会得到可靠的结果。如果可能的话，在每个腔室中至少应该评估200个可活动的精子。类似的QC原则被用作运动性的标准评估（第23页上的第2.4.6节）。样品可以立即或在记录后进行分析。记录分析有助于更好的标准化和QC程序（第235页第8.6.2节）。

对于观察精子多久才能获得准确的结果，存在一些分歧，但至少1秒对于基本的CASA测量就足够了（46）对游泳细胞的观察时间可以对结果（315）产生重大影响；不同长度之间的分析之间的比较必须小心。

#### 45.14 CASA术语

用CASA系统测量的一些标准变量，如图所示。4.4，分别是：

VCL，沿曲线路径的速度（ $\mu\text{m/s}$ ）：精子头部沿着显微镜下精子追踪的路径移动的时间平均速度；

VSL，沿直线路径的速度（ $\mu\text{m/s}$ ）：沿路径的第一个点和最后一个点之间的直线计算的速度；

VAP，沿平均路径的速度（ $\mu\text{m/s}$ ）：沿平均路径计算的时间平均速度。这被定义为一个平滑的弯曲路径，根据嵌入在CASA系统中的算法计算；这些算法在不同的系统中是不同的，所以系统之间的值可能无法比较，或者有不同的采集参数，如帧率。

ALH，头部横向位移的振幅（ $\mu\text{m}$ ）：精子头部关于平均路径的横向位移的大小。ALH通常表示为这种位移的最大值或平均值。不同的CASA系统使用不同的算法计算ALH，因此这些值可能没有可比性。

MAD，平均角位移（度）：曲线路径的瞬时旋转角度的时间平均绝对值。需要注意的是，这并不能测量精子头部所指向的方向的转动角度。



其他常用的度量是来自于这五个变量的计算：

LIN, 线性关系：曲线路径的线性关系（直线速度/曲线速度）；

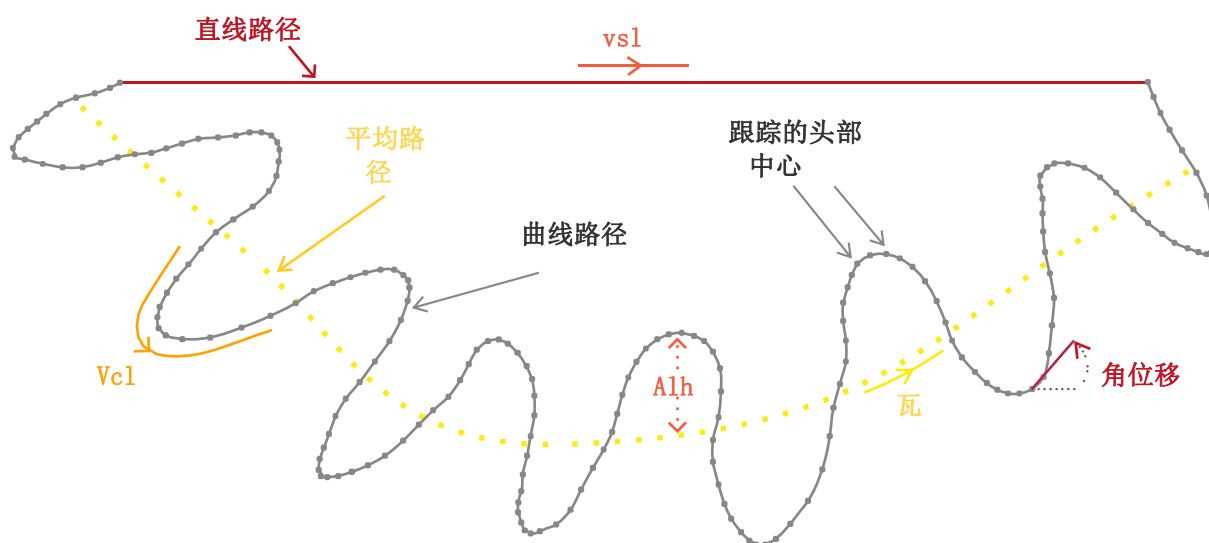
摆动摆动：曲线路径对平均路径（平均路径速度/曲线速度）的振荡的度量；

STR、直线度：平均路径的线性度（直线速度/平均路径速度）；以及

BCF, 节拍交叉频率(Hz)：曲线路径穿过平均路径的平均频率。然而，需要注意的是，BCF已被证明与鞭毛跳动频率（316）无关。

D, 分形维数：对平面（310）上曲线的“空间填充”性质的定量评估。

图。4.4由CASA系统测量的变量的标准术语



注意：不同的CASA工具使用不同的数学算法来计算许多这些运动变量。所有仪器的测量结果的可比性尚不清楚。

#### 4.5.2 利用CASA来评估精子的过度活化

过度活化是人类精子的一种重要的生物学现象，表现为获能（获得受精能力的过程），包括鞭毛波形的行为变化。过度活化的特征通常是鞭毛跳动振幅增加，跳动频率降低和非进行的侧偏航（317）。

过度活化精子鞭毛运动的复杂参数很难通过人工分析来可靠和明确地识别。因此，作者提出了各种算法和基于计算机的系统来定量分析单个精子的运动，以评估运动的刻板印象。这些分析是基于推导出的量



.. 通过跟踪头部运动，(318, 319)现代计算能力允许同时评估数千个精子的动力学参数及其分类，(320)直接测量鞭毛波形也可以用来更准确地理解过度激活(321)期间的运动学参数的变化。

### 4.5.3利用CASA评价精子形态

图像分析有可能在精子形态评估的定量、客观性和再现性方面取得重大进展。商业系统可用于量化精子头部和中间部分的形态，并可能是主要部分。然而，使用CASA可以测量运动的尾巴缺陷更直接地评估运动和运动。使用CASA系统进行形态学评估依赖于细胞染色的高度标准化和质量，结果很容易由于染色的变化而产生偏差。因此，自动染色系统通常是CASA形态学的合理配对，以有助于消除变异。

与手动系统(95)相比，自动形态学分析系统具有更大的客观性、精度和再现性的潜力。精度和重现性至少可高达92%的(322)，这优于由经验丰富的技术人员手工评估。然而，计算机辅助精子形态测量评估(CASMA)结果的可重复性和准确性可能会受到方法上的不一致，如聚焦、照明、样品制备和染色(323, 324)，以及正确区分精子头部和精子碎片的技术困难，特别是当精子浓度较低时(322, 324, 326)。自动评估的性质意味着没有办法弥补准备缺陷和人工制品。因此，相对于细胞染色的背景阴影的微小差异可能导致不正确的分类或无法识别细胞为精子，从而导致结果的偏差。

与人工形态评估一样，程序和仪器必须标准化并保持QC，以确保可比性和可靠的结果。精液可以作为第45页的载碎片或粘性射精部分的描述，以减少CASMA记录的背景。如果精子浓度较低( $<2 \times 10^6/\text{ml}$ )，样品需要离心浓缩，如第45页关于低精子浓度的射精部分所述，但需要注意的是，离心可能会影响精子形态，必须记录其使用情况。.

有两项研究报道了CASMA结果与生育终点之间的显著关系。Coetzee等。(327)发现自动正常的精子形态结果是体外和妊娠受精率的重要预测因素。Garrett等。(102)发现，在一群亚生育夫妇中，精子的百分比(%Z)以及精液中的直线速度(VSL)与自然妊娠率显著且独立相关。%Z和VSL与生育率的关系似乎是连续的，没有发现阈值以上，妊娠率没有进一步增加。需要对CASA的生育结果、男性生殖器官功能和疾病进行更多的研究，以完善CASA在测量精子形态方面的应用。



自动化系统可能有助于获得额外的研究数据（包括精子形态亚群、质膜完整性、精子能量指数）(328-330) 和QC系统，但需要更多的研究来显示它们在临床目的上的益处。

IQC的缺失会导致系统和实验室之间的大量CASA错误。因此，有必要规范CASA（331）的过程和QC。尽管比较研究的结果新出现（332-337），但仍然没有足够的证据允许计算机分析在广泛的临床实践中应用CASA。

## 4.6 新兴技术

近年来，许多新兴技术正在发展，有可能在不久的将来显著提高计算机分析的效率 and 洞察力。这些技术可以分为计算（算法开发）或技术（包含新设备或功能测试）。

### 4.6.1 计算进展

图像处理算法的进步使精子分析比以前更多、更细节。与传统的CASA相比，新的系统能够提取样本中单个细胞的轨迹，如图所示。4.5a（338, 339）使用CASA运动学测量将精子分类为不同的亚群，正被证明可以提高对细胞运动性（320）变化的理解和监测。

· 超越了头部衍生的运动测量方法，现在还可以自动跟踪游动细胞的鞭毛波形(见图。(316)第160页) 虽然当细胞成像时需要更多的护理，以确保跳动的鞭毛可见和聚焦，但鞭毛跟踪可以使人类精子研究中的大量的诊断、毒理学和治疗可能性成为可能。在已知粘度的流体中可视化鞭毛跳动也可以评估细胞消耗的能量，或这在种群中的方差。

除了商业CASA系统外，还开发了一些免费或开源产品，以增加对计算机辅助分析（316, 340）的访问。



评论：在使用尚未获得临床使用认证的新兴技术时应谨慎，但应鼓励使用它们来进一步调查研究中的问题。

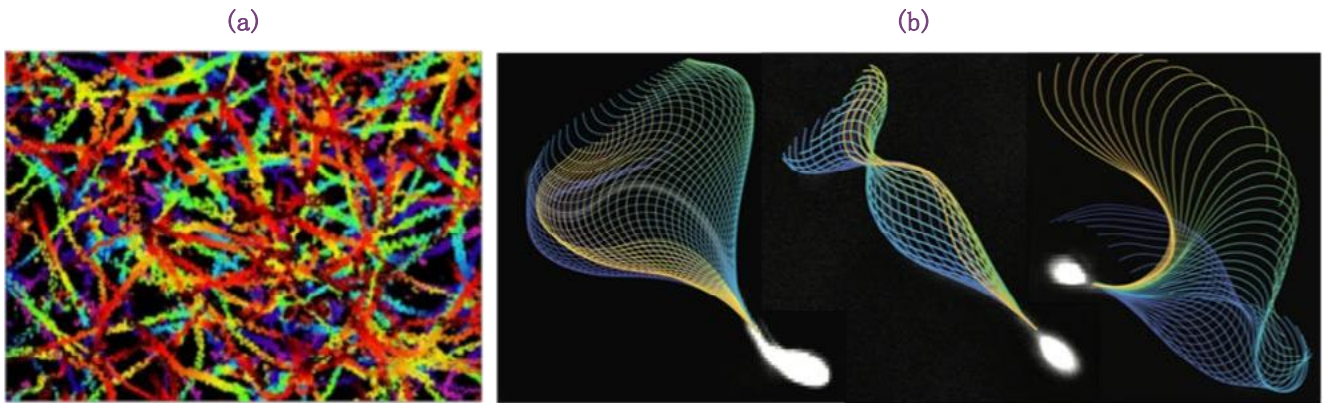
### 4.6.2 技术进步

越来越多的，CASA的发展和其他新兴的计算进步的补充，使用额外的技术来提高质量和获得诊断的机会。



现有的CASA系统，通常是实验室使用而设计的，通常是昂贵的和难以访问的。智能手机的使用可能有巨大的精子分析，因为他们是移动，配备高质量的数码相机，可以很容易地连接到显微镜（341）目前智能手机设备不能实现质量和准确性所需的精液分析，然而这些设备的广泛使用可能成为一种有用的手段为男性寻求早期适当的医疗建议，调查和因果治疗。在使用尚未获得临床使用认证的新兴技术时应谨慎，但应鼓励使用它们来进一步调查研究中的问题。

图。4.5不同CASA应用程序的图形表达式示例



a) 在10×物镜下10秒（每个轨迹代表活动精子）10秒的典型彩色编码图像(339)；b)精子（从左到右）的鞭毛波形：在低粘度介质中，在高粘度介质和高活化的(316)中





## 第五章： 精子制备技术

5.1 介绍.....	161
5.2 一般原则.....	163
5.3 简单的洗涤.....	164
5.4 直接游泳.....	165
5.5 不连续密度梯度.....	166
5.6 磁性激活细胞分选(macs).....	166
5.7 准备感染艾滋病毒的精液样本.....	167
5.8 准备睾丸和附睾精子.....	167
5.9 准备逆行射精样本.....	169
5.10 准备辅助射精样本.....	170

### 5.1 介绍

#### 5.1.1 理由

精子动物可能需要从精原体中分离出来，如功能能力的诊断和研究测试、培养基组成的影响评估以及辅助生殖技术(ART)的精子恢复。抗逆转录病毒治疗考虑精子准备技术的前提是确保良好的精子质量和消除不利于受精的因素。如果精子功能的测试，这是至关重要的，精子分离精血浆射精，限制任何损伤从非精子细胞（284）和减少增加渗透压的有害影响发生在射精保持在体外（147, 342）。

“一种理想的精子制备技术应该恢复一个功能较高的精子群体，以保存DNA，并且不会通过精子和白细胞产生ROS而引起功能障碍。

”



虽然混合精液的一些成分似乎有助于精子穿透宫颈粘液，例如提罗德的溶液（超街等，1980），负面影响精囊液对精子活力，精子DNA的生存和保护（13,256），是存在“斩首因素”在精浆(343)此外，精浆的一些成分是实现怀孕的障碍当自然在抗逆转录病毒治疗绕过障碍，如IUI或体外受精。将人类精子从精浆中分离出来，并最终制备含有高比例形态正常和运动细胞的制剂，减少DNA损伤，没有碎片、非生殖细胞和死亡精子，对临床实践和研究预后阈值非常重要。

### 5.1.1.1 方法的选择

精子制备技术的选择取决于精液样本（344,345）的性质及其目的。辅助生殖，包括体外受精程序，精子准备技术需要产生精子人口最小DNA损伤（346）理想的精子准备技术应该恢复一个功能高的精子种群(347)保存DNA和不诱导功能障碍通过生产的精子和白细胞（348,349）恢复精子应该有合适的形态和保留功能运动的范围被考虑。建议用培养基稀释精液和离心制备IUI（345,350）的正常精子标本，同时考虑方法的选择也取决于使用指示或目的。例如，直接游泳技术在选择运动精子时很有用，因为它反映了精子游入培养基中的运动能力。研究表明，以存在单链双链DNA损伤为特征的DNA片段与ART结果（346,351,352）呈负相关(第86页第3.2节)。直接游泳和颗粒游泳技术显著降低总DNA碎片率，尽管颗粒游泳涉及离心，这可能影响其他精子功能参数（353,354）直接游泳技术通常使用当精液样本被认为是正常的，而在严重的少精子症，畸形精子症或弱精子症的情况下，DGC通常是首选，因为产量更大，因此可能总数的运动精子恢复。密度梯度也可以改变以优化单个样品特定特性的处理：可以减少梯度材料的总体积，限制精子沉积的距离，最大限度地提高精子总运动恢复，或者增加高粘度标本的离心时间。

每个实验室应确定形成可管理的精子颗粒所需的离心力和离心时间。当精子数量极低时，可能有必要改变离心力或时间，以增加恢复最大精子数量的机会。在临床实施之前，应对推荐时间和离心力的修改进行严格测试。最合适的制备方法可以从所制备的精子功能能力中得到确定，例如，通过精子活力（第23页第2.4.6节）和活力（第26页第2.4.7节）来确定。





### 5.1.1.2 从精浆中进行精子分离的效率及对感染性微生物的处理效率

精子选择技术的效率通常用绝对值表示

精子数量、运动精子的总数或形态上正常的运动精子的恢复。游泳通常比DGC (>20%) (<20%)。在最终的精子制备中，游泳和DGC也会产生不同水平的精液成分污染。利用前列腺分泌锌作为可溶性精成分的标志物，锌从精液向覆盖游动介质的时间依赖性扩散 (355) 游泳准备的最终锌浓度大于密度梯度准备后的锌浓度。

精液样品可能含有有害的感染源，技术人员应将它们作为一种生物危害，极其小心地处理。除了消除低质量的精子，包括那些静止，精子准备应该允许消除其他细胞，如白细胞，细菌，(356)，以及有毒或生物活性物质(347)精子制备技术不能被认为100%有效去除感染源从精液(167节5.7页)。应严格遵守第214页第8.2节中概述的安全指南。良好的实验室实践是实验室安全(48, 357)的基础。

## 5.2 一般原则

下面是一些可用的精子制备技术。对于所有这些物质，建议的培养基是一种添加蛋白质的平衡盐溶液，并含有适合处理精子的环境条件的缓冲液。对于辅助生殖程序，如ICSI、体外受精和人工授精，人血清白蛋白必须高度纯化，不受病毒、细菌和以前的污染。专门为这种程序设计的白蛋白在市售。为了诊断目的，可以使用更便宜的BSA(第225页上的第8.4节)。如果培养箱只含有大气空气，且温度为37°C，则应缓冲介质(见第225页第8.4.1节)。坚持这一点将确保培养的pH与精子存活相容。加工精子的最终处置将决定哪种缓冲介质是合适的。例如，精子功能分析一般需要一种支持精子获能的培养基，该培养基通常含有碳酸氢钠(25mmol/L)。

抗逆转录病毒治疗的精液应以无菌方式收集(第68页第2.5.12节)。无菌技术和材料在治疗应用时应用精子制备技术是必不可少的。



**注：**虽然可以在实验室中制备介质，但需要注意的是，溶液的性能及其安全性不能被精确控制。通常预计，在可用的情况下，商业生产、测试和批准用于治疗的介质将用于抗逆转录病毒治疗。

下面提供了可以制备或购买的介质的例子，但这不是建议它们在抗逆转录病毒治疗中的治疗使用。



## 5.3 简单的洗涤

如果精液样本质量好，这种简单的洗涤程序可以提供高产量的精子，但它并不能消除精液中存在的碎片或白细胞。

### 5.3.1 代理

- BWW、EBSS、sEBSS、HTF（市售或见第225页第8.4节）或其他专有的、适当测试和制造的培养基，最好补充人血清白蛋白(HSA)或血清，如下所述
- HSA，高度纯化，无病毒、细菌和朊病毒污染和内毒素
- HSA补充剂：在50ml培养基中加入300mgHSA，1.5mg丙酮酸钠，0.18ml乳酸钠（60%（v/v）糖浆）和100mg碳酸氢钠
- 如有需要，可补充血清。到所述的非专有介质：在46毫升培养基中加入4毫升热灭活（56° C，持续20分钟）患者血清、1.5mg丙酮酸钠、0.18ml乳酸钠（60%（v/v）糖浆）和100mg碳酸氢钠。

### 5.3.2 程序

1. 将精液样本混合均匀。
2. 用培养液稀释整个精液样本1+1（1：2），以促进精浆的清除。
3. 将稀释后的悬浮液转移到多个离心管中，最好每管不超过3ml。
4. 300-500克的离心机，持续5-10分钟。
5. 小心地抽出并丢弃上清液。
6. 通过温和的移液法将组合后的精子颗粒重新悬浮在1ml的培养液中。
7. 300-500克离心3-5分钟。
8. 小心地抽吸并丢弃上清液。
9. 通过温和的移液法，在一个体积适合最终处置的培养液中重新膨胀精子颗粒。授精。

通过减少管的使用和增加每个管的体积，可以减少去除精浆的洗涤次数。如果这样做，应增加离心力和离心持续时间，以确保精子完全造粒。500-600克，持续8-10分钟。请注意，离心力随半径和每分钟转数(rpm)而变化（离心力的计算见第217页第8.2.2节）。



## 5.4 直接游泳

精子动物的选择可能是通过它们游出精液并进入培养基的能力。这被称为“游泳”技术。精液最好不要在游泳前稀释和离心，因为这可能导致精子膜（348）的过氧化损伤，因此，精子从精子是分离运动精子的首选方法（例如，. . . 45, 46）直接游泳技术可以在液化培养液上分层液化精液上，也可以分层液化精液在培养液下。然后将运动的精子游入培养基中。这种方法的精子产量比洗涤低，但选择它们，在精液中运动精子的百分比较低的情况下是有用的。用于体外受精和ICSI。

### 5.4.1 代理

- BWW、EBSS或sEBSS（第225页第8.4节）最好补充HSA或血清，如下所述
- HSA，高度纯化，无病毒、细菌和朊病毒污染和内毒素
- HSA补充剂：在50ml培养基中加入300mgHSA，1.5mg丙酮酸钠，0.18ml乳酸钠（60%（v/v）糖浆）和100mg碳酸氢钠
- 血清补充剂：在46ml培养基中加入4ml热灭活（56° C，持续20分钟）的患者血清，1.5mg丙酮酸钠，0.18ml乳酸钠（60%（v/v）糖浆）和100mg碳酸氢钠。

### 5.4.2 程序

1. 将精液样本混合均匀。
2. 将1ml精液放入无菌的15ml圆锥形离心管中，轻轻放一层在它上面有1.2毫升的培养基。或者，在培养液下小心地抽取精液。
3. 以约45° 的角度倾斜试管，增加精液-培养液界面的表面积，并在37° C下孵育1小时。
4. 轻轻地将管返回到直立位置，取出最上面1毫升培养基。这将包含高度运动的精子细胞。
5. 用1.5-2.0ml的培养基稀释它。
6. 300-500g离心5分钟，弃置上清液。
7. 将精子颗粒重新花在0.5ml培养基中，以评估精子浓度、总活力和进行性活力（第23页第2.4.6节和第28页第2.4.8节）。
8. 该标本可直接用于治疗或研究目的。



## 5.5 不连续密度梯度

不连续的密度梯度可以作为一种有效的、适应性强的收集高质量精子的抗逆转录病毒治疗方法。它可以提供一个良好的运动精子的选择，不受其他类型的细胞和碎片。它比游泳技术更容易标准化，因此结果更一致。该技术用于恢复和制备精子，用于体外受精和ICSI。

这种方法是在由涂覆硅烷的胶体硅组成的密度梯度上离心，硅烷仅通过密度分离细胞。一种简单的两步不连续密度梯度制备方法应用最为广泛。应遵循制造商的指导（见84）使用密度梯度离心(DGC)制备精子，通常会导致部分高度运动的精子，没有碎片，污染白细胞、非生殖细胞和退化的生殖细胞。

许多商业产品可用于使适合精液加工的密度梯度。任何偏离程序建议都应循证。大多数密度梯度培养基含有高相对分子质量成分，具有固有的低渗透压，所以它们通常是在与女性生殖道液体等渗透的培养基中制备的。

### 5.5.1 试剂和程序

按照制造商的说明准备和使用。如果准备大量梯度应注意，因为它容易受到微生物污染。如果在显微镜上观察到任何情况，则必须丢弃。

## 5.6 磁性激活细胞分选(MACS)

抗逆转录病毒治疗的出现，特别是在需要提取精子进行辅助受孕的地方，如在男性因素不育的情况下的ICSI，已经导致了额外的优化的精子功能恢复检测方法的发展，不受显著的DNA损伤。

Cochrane系统综述（358）没有发现通过透明质酸结合(HA-ICSI)或其他选择技术选择的精子在临床或活产方面的差异。此外，在DGC后观察到DNA片段增加，导致试管受精/ICSI夫妇（354）的怀孕概率较低。

### 5.6.1 通过MACS恢复精子的试剂和设备

- HTF修改的HEPES缓冲区
- 锚蛋白v偶联的微球或微珠
- 安联素V微珠试剂盒（米尔特尼生物技术，加利福尼亚州，美国；MACS良好制造规范(GMP)安联素V试剂盒，米尔特尼生物技术，德国）



分离柱或铁球安装磁铁（迷你MACS，Miltenyi生物技术）

埃本多夫试管（1.5ml）

SBAR中心

SBAR孵化器。

## 5.6.2 程序

1. 将0.5ml等量精子悬浮在HTF修饰的HEPES缓冲液中，在精子洗涤去除精浆后获得，或在加入DGC前获得。
2. 用20μl偶联微球偶联微球(annexinV微珠试剂盒，米兰生物技术，休本，美国)结合缓冲液中，在室温下离心15分钟。
3. 加入400μl的结合溶液，放在分离柱中，非标记（活）细胞通过柱。
4. 非标记的部分被恢复和处理，如描述的（359）。

## 5.7 准备感染艾滋病毒的精液样本

如果人类免疫缺陷病毒(HIV)存在于精液中，则病毒核糖核酸和非精子细胞中可以发现游离的和原病毒DNA。在一项系统回顾和荟萃分析中，（360）对3994名来自艾滋病毒不一致夫妇的妇女进行了11 585 个周期的抗逆转录病毒治疗，56.3%实现了临床妊娠，在没有血浆病毒抑制的情况下没有发生HIV血清转化。由于HIV受体(CD4、CCR5、CXCR4)只在非精子细胞中表达，DGC联合游泳被提出作为预防未感染女性伴侣（361, 362）感染的一种方法，但也有其他有效的方法存在(363)。这些程序是为了将病毒感染的非精子细胞和精浆（在密度梯度上清液中）从无hiv的运动精子（从密度梯度颗粒中）中分离出来。制备的样品在使用前应采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)进行检测，仅用于抗逆转录病毒治疗的无hiv样品。虽然到目前为止的结果令人鼓舞，但目前还没有足够的证据表明通过精子制剂可以消除艾滋病毒感染的风险。



注：该技术应仅在安全设施中使用，以减少无艾滋病毒样本（364）交叉污染的风险。最近的证据（365-368）表明，在不一致的夫妇中，病毒抑制，很少或没有艾滋病毒传播给伴侣。

## 5.8 准备睾丸和附睾精子

从睾丸组织和附睾中恢复的精子动物需要特殊的准备。附睾抽吸的典型指征是阻塞性无精子症，而不是睾丸功能障碍。因此，相对大量的精子可以收获用于治疗目的。附睾



抽吸物通常可以在最小的红细胞和非生殖细胞污染下获得，这使得运动附睾精子的分离和选择相对简单。如果获得了大量的附睾精子，DGC是为后续使用做准备的有效方法（第165页第5.4节）。如果精子数量较低，可以进行简单的清洗（第164页第5.3节）。

睾丸精子可以通过开放活检（有或没有显微解剖）或经皮针活检获得。睾丸标本总是被非生殖细胞和大量红细胞污染，因此需要额外的步骤来分离出干净的精子制剂。为了释放精小管结合的细长精子细胞（“睾丸精子”），需要酶或机械的方法。睾丸精子数量较低，活力较差，准备ICSI。

### 5.8.1 酶法

1. 用胶原酶孵育睾丸组织。0.8mg组织溶菌芽孢杆菌，每毫升培养基1A型），在37°C下持续1.5-2小时，每30分钟涡旋一次。



注：酶可能会对精子造成损害，如果使用，应适合治疗使用。

2. 100g离心10分钟，检查微球。

### 5.8.2 机械方法

1. 用玻璃覆盖物在培养基中浸泡睾丸组织，直到产生分离组织的细浆。
2. 或者，使用平行于培养皿基部弯曲的细针（附着在一次性结核菌素注射器上）从精小管中剥离细胞。

### 5.8.3 胞浆内精子注射用精子悬浮液的处理

1. 加入1.5ml培养基清洗标本。
2. 300克离心机，持续8-10分钟。
3. 取出上清液，在0.5ml新鲜培养基中重悬颗粒。
4. 估计颗粒中精子的运动性和数量。（一些精子数量较少的标本可能需要在较低体积的培养基中重悬。）
5. 在培养皿中放置一个5-10μl的液滴培养基。
6. 用矿物油覆盖它（用CO<sub>2</sub>预平衡）。



7. 将5-10 $\mu$ l的精子悬液引入培养液中。
8. 用ICSI移液管小心地抽吸出在培养基和油之间的界面上发现的运动精子。
9. 将它们转移到粘性液滴溶液中。聚乙烯吡咯烷酮（培养基中为7-10%（100g/L））。

## 5.9 准备逆行射精样本

在一些男性中，精液在射精时进入膀胱，导致失血，没有明显的射精。这种情况是通过检查高潮后尿液样本有无精子。如果药物治疗不可能或不成功，就可以从尿液中提取精子。例如，通过摄入碳酸氢钠使尿液碱性化，将增加任何进入尿液的精子保留其运动特征（369）的机会。

### 5.9.1 在收集精子前不进行碱化处理

在实验室中，应要求该人员：

排尿时膀胱没有完全排空；

通过手淫到一个标本容器中来产生射精；和

再次排尿到含有培养基的第二个标本容器中（以进一步使尿液碱性化）。

### 5.9.2 在收集精子前给予碱化处理

尿液的钾化可以通过在尝试收集射精前1-2小时喝用氯化钠和碳酸氢钠来实现。这可以与阿尔法1受体刺激剂治疗相结合。

在实验室中，应要求该人员：

通过手淫到一个标本容器中来产生射精；和

高潮后在第二个容器中排尿（体积至少500毫升）

### 5.9.3 顺行射精和高潮后尿液分析

如果有的话，射精和尿液样本都应该进行分析。由于可能产生大量尿液，通常需要通过离心（500克8分钟）浓缩标本一旦浓缩，可以使用密度梯度制备方法最有效地处理（第166页第5.5节）。



## 5.10 准备辅助射精样本

射精紊乱或不能射精的男性的精液可以通过直接振动刺激阴茎或直肠电刺激附属器官来收集。脊髓损伤患者的射精通常会导致精子浓度较高，精子活力降低，以及红细胞和白细胞污染。电射精获得的标本可以通过DGC最有效地处理（第166页第5.5节）。无论准备方法是何种方法，这些类型的射精通常都含有高百分比的静止精子细胞。







## 第六章：精子的低温保存

6.1 介绍.....	171
6.2 精子低温保存的原因.....	172
6.3 低温保存和风险评估 人类精液的储存.....	174
6.4 Semen低温保存协议.....	177
6.5 玻璃化.....	182

### 6.1 介绍

精子的冷冻保存是许多精液分析实验室工作的重要组成部分，特别是那些与不孕症诊所相关的实验室。

人类精子冷冻生物学的历史可以追溯到20世纪40年代末。发现甘油保护精子免受冷冻的损害，导致使用人类精子储存在 $-79^{\circ}\text{C}$ （370-372）的干冰上，随后使用液氮，随着许多国家建立商业精子库或协调国家服务，精液冷冻保存迅速发展（373-377）。

“

冷冻和解冻后的细胞存活在很大程度上取决于细胞内冰晶形成的最小化。

”

各种冷冻保存方案现在被用于不同的低温保护剂和冷冻程序。冷冻和解冻后的细胞存活在很大程度上取决于细胞内冰晶形成的最小化。这是通过使用适当的冷冻保护剂和应用冷却和加热速率，以减少细胞内受冰形成的水量（378-380），如果精子花费大量时间超过 $-130^{\circ}\text{C}$ （玻璃过渡温度），特别是在解冻过程中，可以发生重结晶，与可能破坏细胞内冰晶的生长。冷冻保护剂有两类：渗透性，如二甲亚砜(DMSO)和甘油，和不渗透性，如白蛋白、二旋糖酐和蛋黄柠檬酸。

人类精子可以忍受一系列的冷却和升温速率。它们对快速初始冷却（冷休克）造成的损伤不是很敏感，可能是由于脂质中不饱和脂肪酸的高膜流动性



. 双分子层 (381) 由于它们的低水含量 (约50%)，它们也可能比其他细胞更耐低温保存损伤。然而，低温保存确实对人类精子的功能有不利影响，特别是活力。冷冻保存后，运动精子的百分比可能从50.6%下降到30.3%，这取决于 (382) 的研究，优化冷冻保存过程可能会将这种损害最小化。.

使用冷冻供精液人工授精后的怀孕率通常与解冻后的精子质量、授精时间，特别是受体因素，如年龄、受精、排卵和子宫输卵管疾病 (383) 如果精液储存在适当的条件下，精子质量不会随着时间的推移而明显恶化；儿童受精后使用精液储存超过28年 (384, 385)。在选定的情况下 (例如，当精液中存在高水平的白细胞时)，建议选择高度运动的精子组分 (第161页第5章)，因为它可以提供更好的恢复 (386)。。.

## 6.2 精子低温保存的原因

人类精液冷冻储存的两个广泛的领域可以被确定：为一个人自己的未来使用 (自体抗逆转录病毒治疗) 和供体库 (同源抗逆转录病毒治疗)。

. 精子动物可能存储的未来使用各种原因根据国家指南 (371) 特别是，根据美国临床肿瘤学会，医疗保健提供者应该始终提供精子冷冻保存所有青春期后男性接受癌症治疗，因为这是唯一有效的治疗这些患者 (387)。男性还应该被告知，在开始化疗后收集的精子的基因损伤的风险更高，精子库应该在化疗之前发生。在某些情况下，可能需要修改低温保存程序 (第6.2.2节)。

目前的数据没有发现在ART期间使用低温保存或新鲜精子 (388-390) 有任何重要差异，但值得一提的是，有数据报告在低温保存 (391) 后DNA碎片增加。

### 6.2.1 捐赠者精子

已知或假定可生育的健康捐赠者的射精可以储存以备将来使用。在许多国家，供者的精子必须被隔离6个月，以便对供者进行性传播感染的检测，以确定捐赠的射精中不含有艾滋病毒等微生物。捐赠者可以由诊所或精子库招募，他们的精子可以根据国家指南和立法匿名或不使用。供体精子可用于人工授精、IUI、体外受精或ICSI等。:

对于没有适合ICSI的活精子或细长精子细胞的不育男性的伴侣，或在治疗失败或费用太高的地方；

防止遗传性疾病的传播；



反复流产后，用供体精子授精可能导致成功怀孕；

对于那些希望怀孕但没有男性伴侣的女性，在那些允许有男性伴侣的国家。

应始终遵守有关遗传和感染筛查的地方和国家立法。

## 6.2.2 生育保护

射精可能会在男子接受可能损害其生育能力的程序或暴露之前获得和储存，例如：

输精管结扎术（如果未来伴侣的情况发生变化或想要更多孩子的愿望）；

细胞毒性药物或放疗治疗可能永久性损害精子发生；

在一个危险的职业中担任现役军人。在军队中，在可以接受死后生育或可能发生生殖器伤害的国家；

男女变性人成人和青少年（392）；

睾丸创伤（在某些情况下，睾丸精子提取后，TESE）（393）。



注1：为了保护生育或不孕症治疗，理想情况下，正常的标本应保存10次或以上的授精，以确保有良好的怀孕机会。



注2：由于每个卵母细胞的ICSI只需要一个精子，因此任何活精子的低温保存都是值得的。



注3：在潜在的消毒过程之前收集的精液通常具有重要的心理价值，因为它给了未来的希望。对于即将接受烷基化剂或放射治疗的患者，必须在治疗开始前收集精液，因为精子中有发生突变的风险。所有需要化疗或放疗的患者，包括青少年（394），都应提供储存精子的可能性。

## 6.2.3 不孕症治疗

精子可以在IUI、体外受精或ICSI中使用个体的精子进行治疗。在以下情况下，情况包括：

严重的少精子症或精液中间歇性存在运动精子（作为ICSI的备份）（395），或克兰费尔特受试者（在青春期），当精液样本可以收集（396）；

可能不会持续下去的不孕症治疗，如生殖道阻塞手术或促性腺激素治疗下丘脑-垂体性腺功能减退症；



需要特殊收集，如脊髓损伤患者辅助射精、尿逆行射精精子或生殖道手术收集；

在抗逆转录病毒治疗当天无法提供新鲜精液的患者，如：

在授精当天不能进入抗逆转录病毒治疗实验室或因心理原因难以收集精液的男性；

非阻塞性无精子症患者需要睾丸精子提取；\*

患有脊髓损伤且需要提取睾丸精子的男性；\*

因阻塞性无精子症而接受血管造口或血管睾丸造口的男性，采用显微手术附睾抽吸或睾丸精子提取以保存生育能力。\*

\*在这些情况下，应遵循第180页第6.4.2节中所述的程序。

也有人担心，在有严重男性因素的夫妇中，使用伴侣精子的抗逆转录病毒治疗可能不如使用供体精子（397）的抗逆转录病毒治疗成功得多。

## 6.2.4 尽量减少传染病的传播

对于通过抗逆转录病毒治疗控制的艾滋病毒男性，无法检测到病毒载量的样本可用于IUI、体外受精或ICSI，以尝试受孕，同时减少艾滋病毒传播给女性伴侣的风险。同样，对于那些在乙型或丙型肝炎血清阳性时想要冷冻保存精子的男性，应该检查病毒载量。

## 6.3 人体精液冷冻保存和储存的风险评估

人类精子的低温保存和随后的储存是一个高度复杂的过程，这给实验室工作人员承担了特殊的责任和潜在的责任。在评估与精液的低温保存和储存相关的风险时，应考虑以下问题。

### 6.3.1 资源

船舶、试样和储存室的物理安全，以减少因盗窃或火灾、低温保存吸管、安瓿和容器失效、液氮供应而造成的损失风险

拟使用设备的适用性

安全壳和除氮系统



罐内氮气含量低于一定阈值或温度高于一定阈值，应报警。警报级别应设置为在危急情况发生之前提供警告，并应连接到一个呼叫中心，该呼叫中心将向精子库工作人员提供建议。

### 6.3.2 员工安全保护

银行内应始终提供个人防护设备。如可能，银行应同时有两人，否则进入前提醒外部人员。

建议使用检测低大气含氧水平的报警系统和与之相关的纠正措施。

### 6.3.3 交叉污染的风险

减少储存的样品之间与感染因子交叉污染的风险。通过低温保存血管传播乙型肝炎病毒或乙型肝炎 (HBV) 或丙型肝炎 (HCV) 病毒)，考虑：

储存容器类型：小瓶或吸管和吸管（热或聚合物）的密封方法以及二次套管（吸管内）的使用；

储存容器的性质：液氮或蒸气；

高风险样本（已知含有或疑似含有病毒的样本）的方案和方法。在这种情况下，建议对每种病毒阳性使用单独的储罐，在某些地区需要；

分别对每个患者进行低温保存，并在每次手术结束时对所有表面进行消毒。

如果上述预防措施无法确保，可以采取的避免或限制污染的其他预防措施：

液氮灭菌以防止污染-在样品直接浸入液氮的玻璃化（398）中；

定期用无菌液氮补充杜瓦储存瓶或储罐，并每年对冷冻罐进行净化；

加热前对冷冻标本进行净化；

在进入银行业时（或根据国家法规）对所有男性进行病毒或性传播感染检测：

HIV、1型和2型（使用核酸检测 (NAT)，也检测O组抗体）；

乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎核心抗原 (抗hbc) (IgG和IgM) HBV检测，HBV或包括HBV组合的NAT检测；



世界卫生组织人类精液检查和处理实验室手册，第六版

- HCV使用抗HCV和NAT法检测HCV；
- 苍白球。梅毒)；
- 沙眼衣原体（采用试验设计检测无症状、低流行率人群）；
- 淋病奈瑟菌（采用试验设计检测无症状、低流行率人群）；
- 人嗜t淋巴病毒(HTLV)，I型和II型，使用抗HTLVI/II型；
- 巨细胞病毒(CMV)使用抗CMV(总和IgG和IgM)。



注：对于供精者，根据国家立法，可能需要进行其他检测。

### 6.3.4 冷冻样品的安全性

分割样品并储存在不同的冷冻容器和/或在不同的地点，以减少完全损失的风险。

在每个步骤中重复检查样品的身份。

使用可靠的标签和识别代码。

有定期审核库存材料和样品的使用程序。

经过长期使用后，冷冻储存罐可能会被污染。因此，应定期用不与铝或钢发生反应的溶液进行净化。建议每年至少脱色一次。

所有的储罐都应包含低水平的传感器报警器，以监测温度和液氮液位。传感器应连接到报警器，以提醒实验室人员最终的问题。

资料来源：(364, 377, 399, 400)。



注1：储存在气相而不是液氮本身可能会降低交叉污染的风险。然而，根据样品容器的形状、样品负荷和类型，取决于蒸汽储存容器中可能存在较大的温度梯度。如果使用蒸汽相储存，确保它在为此目的设计并批准国际医疗设备标准的容器中。



注2：由热密封离子树脂制成的安全吸管可储存于液氮（高安全吸管）。这些是泄漏，防细菌和病毒，并在-196° C（364, 377, 400）机械耐药。



## 6.4 Semen低温保存协议

几种冷冻和精子库管理方案可用（377）几种冷冻保护剂在商业上有。冷冻保护剂分为渗透（其中甘油使用最广泛）和渗透或非渗透（如糖分子和蛋黄）。含或不含蛋黄的冷冻保护剂（作为精液延伸剂）的冷冻保护剂都可以使用（377）常用的冷冻保护剂-甘油-蛋黄-柠檬酸（GEYC）和机械冷冻或蒸汽冷冻程序的细节如下所示。

考虑到冷冻保存的精子可用于产生胚胎，所有可能的程序都应根据国际良好制造实践指南在分类房间（至少D）的a类罩下进行。如果低于本标准，应记录冻结的方法和环境，但如果合法，则不是拒绝进行储存的理由。

### 6.4.1 标准程序

#### 6.4.1.1 制备GEYC低温保护剂



注：虽然低温保护剂可以在实验室中制备，但需要注意的是，该溶液的性能及其安全性不能被精确控制。**通常预期，如果可用，则使用商业生产、认证和批准用于治疗用途的冷冻保护剂。**这对于基于蛋黄的冷冻保护剂来说尤其是一个问题，因为来自鸡肉饲料或环境的污染物可能存在。下面描述的程序很难标准化到在当地实验室使用抗逆转录病毒治疗的适当水平。

准备GEYC：

1. 在65ml无菌纯化水中加入1.5g葡萄糖和1.3g柠檬酸三碱二水合钠。
2. 加入15毫升甘油，彻底混合。
3. 加入1.3克甘氨酸。溶解后，通过0.45 $\mu$ m的孔隙过滤器过滤溶液。
4. 加入20毫升新鲜蛋黄（最好从特定的无病原体鸡蛋中获得），清洗鸡蛋并除去壳。将蛋黄周围的膜刺起，取入注射器（每个鸡蛋大约可以获得10毫升的蛋黄）。
5. 将整个悬浮液置于56° C的水浴中放置40分钟，偶尔旋转。
6. 检查解决方案的pH值。如果超出6.8-7.2范围，丢弃溶液并配制新溶液，以防添加不正确的成分或量。
7. 在本阶段可以进行用于无菌试验的细菌培养。



8. 可以在这个阶段进行精子毒性测试。
9. 在无菌工作柜中分发2ml等分溶液，并在-70° C保存。
10. 3个月内使用。

与GEYC类似的冷冻保护剂已在市售。

#### 64.12 在精液中添加冷冻保护剂

1. 解冻低温保护剂，温至室温，然后混合。初始变暖到37° C可能是有益的。
2. 高浓度的甘油对精子有害。因此，在添加和混合冷冻保护剂和精液时，特别小心是至关重要的。
3. 在两体积的精液中加入一体积的GEYC冷冻保护剂，或者通过旋转滴落，或者通过上下轻轻移液，或者在室温下轻轻混合约10分钟。
4. 加入所有GEYC冷冻保护剂后，在30-35° C下孵育5分钟。

#### 64.13 填充精液吸管

1. 塑料0.5毫升吸管因其传热性能和易于储存而广受欢迎。塑料小瓶可用于储存更大的体积。
2. 将精液-GEYC冷冻保护剂混合物吸入成0.5毫升塑料精液吸管或放在冷冻瓶中。一些商业吸管有一次性“填充尖端”，避免稻草末端被精液直接污染。吸管可以填充真空装置上的歧管或适配器安装在吸管的末端。它们被填充，直到液体接触棉絮塞，这将防止吸空。

#### 64.14 密封精液吸管

1. 轻敲容器一侧的稻草管在下端留出1厘米的空气空间。如果使用填充提示，则将自动出现这种情况。
2. 使用热密封器在两端的吸管。
3. 将容器外部擦干，然后用70% (v/v) 酒精或其他微生物去污剂进行消毒。
4. 确保吸管贴上有正确的患者/供体详细信息，并在本阶段或之前在两端正确密封（第181页第6.4.3节）。





### 6415 在可编程的冷冻机中冷却和冷冻精液

可编程的冷冻机可控制液氮蒸气注入冷冻室。

1. 将吸管或冷冻瓶放在可编程的冰箱中，并按照制造商的说明激活该程序。
2. 一个常见的程序是冷却吸管在每分钟 $1.5^{\circ}\text{C}$ ，从 $20^{\circ}\text{C}$ 到 $-6^{\circ}\text{C}$ ，然后以每分钟 $6^{\circ}\text{C}$ 到 $-100^{\circ}\text{C}$ 。这大约需要40分钟。然后，机器将吸室保持在 $-100^{\circ}\text{C}$ 30分钟，以便在吸管转移到液氮之前出现延迟。
3. 根据（401）各个实验室的经验，可以使用其他更复杂的程序。

### 6416 手动冷却和冷冻精液

手动方法比可编程冷冻机更不可控和标准化，但可以得到足够的结果。对于这个过程，有很多替代选择。

1. 将吸管放入冰箱冰箱( $-20^{\circ}\text{C}$ )中放置30分钟，然后在干冰( $-79^{\circ}\text{C}$ )中放置30分钟，然后放入液氮( $-196^{\circ}\text{C}$ )中。
2. 吸管可从 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱进入 $-70^{\circ}\text{C}$ ，或在 $-80^{\circ}\text{C}$ 至 $-100^{\circ}\text{C}$ 的液氮气和空气混合中进入 $100^{\circ}\text{C}$ ，然后放置10-15分钟。它们还可以放置在大容器中液氮上方10-20厘米的机架上，放置1小时以形成液氮之上形成温度梯度。

### 6417 快速蒸汽冷冻

手动快速蒸汽冷冻也可以得到足够的效果。

1. 将吸管放入氮以上10厘米的液氮气中( $-80^{\circ}\text{C}$ )持续8-10分钟，以允许初始缓慢冻结。为了标准化这个过程，可以使用吸管或冷冻瓶的浮动货架盒，以保持吸管和氮气之间固定的距离。
2. 然后立即将吸管放入液氮中。

### 6418 冷冻精液的储存

1. 将冷冻的吸管放在塑料储存管中。迷你高脚杯，拐杖或稻草盒上的管子)，并插入更大的储存高脚杯。
2. 将吸管储存在液氮真空(Dewar)瓶或罐中。



### 6.4.19 冷冻精液的运输

冷冻精子可以在用液氮冷却的干运输罐中运输。根据托运人的大小，随着液氮的蒸发，适当的低温可以保持几天至几周。



注：确保遵守当地、国家、国际有关运输液氮、人体生物样品的法规。

### 6.4.1.10 冷冻精液的旋转

1. 使用前，根据需从液氮或油箱中取出尽可能多的吸管或冷冻瓶，立即放置在37° C（培养箱中，或者是用于接触加热的干热块，在使用之间很容易净化）。
2. 在解冻完成后，用无菌剪刀切断稻草的末端，装载授精装置（治疗用）或排出内容物以确定解冻后的运动性（检查冷冻过程）。
3. 加入培养基，500g离心10分钟。取出上清，在培养基中稀释至适当体积（402）。

如果患者决定丢弃他们的冷冻保存的精液，应取出吸管和/或冷冻小瓶，并在证人在场时丢弃，以确认它是正确的材料。

## 6.4.2 修改了少精子症和手术提取的精子的冷冻方案

仅包含少量运动精子的精液，以及从生殖道或睾丸活检中获得的精子悬液，可以存储用于随后的ICSI。

如果很少有精子要被冷冻保存，就需要根据样本采取个体策略。

- 商业上有特殊的设备可以冷冻保存一个精子，尽管其中许多需要微操作（403）这些设备然后被放置在冷冻管中，并根据生产商的建议储存在液氮中。

在没有这种设备的情况下，建议采用最小体积冻结的策略。

含有精子的附睾或睾丸抽吸液和精子悬液（第165页第5.4节和第166页第5.5节）和重悬在HEPES缓冲液和HSA(4mg/ml)精子制备介质可以用提罗德的葡萄糖甘油(TGG)低温保护剂或根据制造商的说明商业低温保护剂低温保存。



冷冻完整的睾丸组织以获得精子以供未来使用需要特定的开发方案。

#### 6.4.2.1 改性冷冻保护剂(TGG)

1. 在40ml无菌酪罗德溶液中加入5ml无菌人白蛋白原液(100mg/ml)、0.9g葡萄糖和5ml甘油。通过0.45- $\mu\text{m}$ 的孔隙过滤器过滤溶液。
2. 储存在2毫升的等分物在 $-70^{\circ}$ 。

冷冻保护剂的实验室制备见第177页第6.4.1.1节中的说明。

#### 6.4.2.2 程序

1. 如果样品量大于2.0ml，如果运动精子很少，则在室温下1500g离心5分钟。
2. 吸入上清液，留下约1.0ml，重新悬浮精子。确定运动精子的百分比(PR+NP)；如果存在很少的运动精子，则估计每个覆盖物下的运动细胞的数量。
3. 解冻2毫升的TGG或测试蛋黄缓冲液(TYB)。
4. 将一个体积的TGG或TYB加入到一个体积的最终精子制剂中，逐渐混合。
5. 包装在吸管或冷冻瓶中并按上冷冻。如果吸管没有满，盖上小杯，防止吸管冷冻时漂浮。

#### 6.4.3 吸管/冷冻瓶和记录的标签

一个强大的标记吸管或小瓶的编码系统是必不可少的。使用所有实验室数据表和计算机数据库中的代码来保持捐赠者的匿名性。将密码的密钥分别且安全地保存为捐赠者的身份。有许多潜在的编码系统；重要的要求是为每个供者或存储客户端有一个唯一的代码。对于客户/患者，重要的是要根据国家立法确定其名称、出生日期、医院号码、医院编号和储存日期以及任何其他要求。以下编码系统工作良好。

每个新的匿名捐赠者都被分配一个两个字母的代码(AA、AB、AC、BA、BB等，以ZZ结尾，之后需要一种新的方法)。

对患者和已知供体使用三字母代码系统：AAA、AAB等。

来自特定捐赠者的每个标本都用他的个人代码后面的数字表示。例如，由捐赠者BT提供的第八笔捐赠被标记为BT-8。



字母代码和样品号应使用黑色不可磨灭的标记写在每个稻草或小瓶上。或者，使用带有患者姓名、出生日期和存储日期的打印标签。此标签必须设计用于液氮产品。应该适当考虑是否有任何被选择的标签会随着时间的推移而受到损害。

储存吸管的迷你杯（或替代品）也应该有一个带有代码和样本编号的清晰标记贴纸，并且应该只包含该患者的样本。

带有多个样本的大杯和迷你杯的颜色编码也可能有助于快速识别。

由于使用储存的精子，因此在数据库中调整吸管或小瓶的计数。



注：所有涉及供体或患者样本身份的程序，包括接收样品、准备和标签、放置在槽中、解冻使用或丢弃，应由多个人重复检查，并在实验室记录中见证证据。理想情况下，技术人员应该在任何时候只处理一个精液样本。

所有样本都应该有一个代码，允许其在储存和从精液库转移到接收中心的过程中进行识别。

## 6.5 玻璃化

新的证据表明，玻璃化可以是一种有价值的方法冷冻储备射精精子（404）方法的原理是超快速冻结的小样本体积直接接触污染物液氮，应该防止冰的形成和减少渗透损伤。稻草内玻璃化（无菌玻璃化）使用封闭系统，不需要无菌液氮，也有可能。玻璃化可以执行整个精子或选择精子使用渗透和不渗透扩展剂，可以用来冷冻储备单一或低数量的精子（405）目前，然而，玻璃化后解冻后参数相对于传统方法是有限的（406），因此，精子玻璃化应该被认为是一个实验程序。

### 6.5.1.1 直接玻璃化处理方案

玻璃化作用与所谓的“开放”装置相结合，需要将样品直接暴露在液氮中，而这种暴露会造成额外的污染风险。始终建议始终使用无菌液氮。该程序也可能对操作者有危险，他们应始终使用适当的防护设备。

#### 材料

SBAR冷冻保护剂

SBAR无菌液氮



- 液氮的试剂盒
- 一个为玻璃化球体收集的小过滤器
- 试管。

方法(来自伊萨申科等人。(404))

1. 用等体积的扩展剂稀释后， $10^6$  精液通过一次性容器直接滴入无污染物的液氮中。
2. 然后将得到的球体包装成冷冻瓶，立即浸入并储存在液氮中。

### 65.12 秸秆内玻璃化处理方案

稻草内玻璃化（无菌玻璃化）方法使用封闭系统，在双吸管（另一个），完全密封，不直接接触液氮，使更大的样本量（100 $\mu$ l）玻璃化，含有大量精子（404, 407, 408）。此程序对操作员的危害较小。

材料

- 0.5ml和0.25ml吸管
- 玻璃化培养基
- 液氮的试剂盒
- 10ml的圆锥形试管
- 变暖介质。

方法

1. 准备1ml的玻璃化培养基：

- 精子洗涤液或HTF: 0.495ml
- 0.5M的蔗糖溶解在水中(例如。MP生物制剂，猫。152584): 0.495ml
- 葡聚糖血清补充剂。科学，猫。9301): 0.010ml

2. 根据精子参数和当地实验室方案，通过游泳或密度梯度离心，选择选定的精子（不含精心浆）。

3. 回收选定精子后，进行精子计数，离心（300g8-10分钟）浓缩，完全去除上清，加入适量的玻璃化培养基再悬浮颗粒（计算如下）：

- 每根玻璃化悬浮液体积（0.25ml）：100 $\mu$ l

- 每根稻草的精子浓度： $0.1 - 3.0 \times 10^6$  精子

<sup>10</sup> 延长剂的类型、低温保护剂的温度和细胞暴露于低温保护剂中的时间至关重要，可能会影响该过程的有效性。



示例：

精子恢复：15x10精子总数

保存目的：3x10精子/100 $\mu$ l（每根稻草的体积）

1ml=30x10精子

X卷=15x10精子恢复

因此，X=0.5ml玻璃化培养基（加入0.5ml玻璃化培养基，得到5x100 $\mu$ l吸管，每个吸管含有3x10精子）。

4. 在玻璃化前（室温）将精子颗粒与玻璃化培养基（室温）混合。不建议将细胞长期暴露在玻璃化培养基中。
5. 一根0.25毫升的稻草必须切到原来长度的三分之二。然后将其水平放置，在移液管的帮助下，将100 $\mu$ l的等量分配到开放端。在以下阶段中，必须保持水平位置，以免丢失平衡。
6. 然后将稻草引入0.5毫升的稻草，两端热密封。用镊子立即在液氮中水平浸泡5秒，并保存在液氮中。

#### 玻璃化过程后的升温

1. 准备变暖介质。
2. 在预热至42-43 $^{\circ}$  C的培养基中解冻吸管/冷冻瓶的含量。





## 第七章： 质量保证和质量控制

7.1 在男科实验室的质量控制.....	185
7.2 射精检查中错误的性质.....	188
7.3 QA方案.....	190
7.4 数值的质量控制图.....	193
7.5 百分比的QC图表.....	197
7.6 评估 $\bar{X}$ 和S图表.....	197
7.7 分析和分析的统计程序 报告技术人员之间的可变性.....	199
7.8 外部质量控制和质量保证.....	204
7.9 质量控制的频率和优先级.....	205
7.10 训练.....	206

质量保证 (QA) 是实验室服务为用户-临床医生及其患者提供可靠服务的基础。质量控制 (QC) 是一套确定评估本身是否提供可靠结果的工具，而QA是一个更广泛的概念——它不仅仅是关于分析的。质量保证包括实验室提供可靠服务的所有程序。因此，QA包括与患者和转诊临床医生共享信息的程序、接受转诊的标准、结果的分布以及实验室各个方面的错误和投诉的处理。

“

精液检查是独特的复杂和程序难以标准化，  
这可能导致不同实验室的精子数量、活力和  
形态评估的广泛差异。

”

### 7.1 在男科实验室的质量控制

精液检查是独特的复杂和程序难以标准化，这可能导致不同实验室的精子数量、活力和形态评估存在广泛差异 (9409-413)，这种差异可以通过标准化的程序和QC措施来解决。后者可以检测和纠正系统误差，减少结果中的技术变异性。



对于医学实验室，存在一个通用的国际标准，ISO15189（357），以确定实验室质量管理的程序，并为认证机构的实验室认证提供支持。作为ISO15189标准的辅助标准，国际标准化组织(ISO)正在制定一个基于与本世卫组织手册相同原则的技术标准，用于基本精液检查，预计将于2021年出版。

实验室的质量保证包括系统地监测和评估实验室服务和设施的各个方面，以最大限度地提高方案达到既定质量标准的可能性。

这里给出了一些定义。

- **实验室目标（性能标准）：**对特定服务所需的性能水平，通常可根据时间和数量来衡量。它说明了实验室服务预计将提供什么。
- **指标：**衡量与实验室目标直接相关的服务的一个方面的变量。它具体说明了要衡量什么来确定这些目标是否已经实现。
- **质量改进：**一种结构化的方法来分析性能和应用系统的努力来改进性能
- **内部质量控制(IQC)测量实验室结果的可变性。**它有助于检测总体随机变化（精度），以及执行分析的不同个体之间的任何系统和随机差异(第191页第7.3.2节)。
- **外部质量控制(EQC)：**不同实验室之间的一个或多个措施的比较。它有助于检测系统变化和评估准确性。它也被称为能力测试(PF)或外部质量评估或保证(EQA)。

只有在诊断过程的每一步质量都是最佳的情况下，实验室质量方案的预期好处才能实现。

实验室的QC活动从实施准确和可控的评估程序开始，如本手册（第9页第2章）所述。除技术方面外，还必须注意相关人员的资格——绩效监测。

所有进行精液检查的实验室都应实施质量保证方案（第190页第7.3节），其中描述了方法和程序的目标，以确保结果可靠，即。准确和精确。由于广泛的法律认证程序，一些国家的法律已经要求提供QA和EQA课程。在其他情况下，医疗保险系统要求标准化。虽然当地可用的资源和能力可能不允许实施全部程序，但将有基本或标准的常规程序，由内部或尽可能由外部QC或质量保证程序进行监控。基本的常规程序（第9页的第2章）将包括精子计数或浓度、形态和活力的基本参数。





更详细的实际处理和实验室Q控制过程存在（414）。

表7.1 质量保证和质量控制的术语

精度	测试结果与真实值的一致性（或结果正确程度）
分配值	真实值的估计值（通常来自来自多个实验室结果的平均值）（目标值、共识值、常规真实值）
偏差	测试结果与指定值的偏差；与同一方向一致的可重复的不准确度（系统误差）
二项分布	用于模拟事件分为两类的理论分布。运动不动，可以活，不能活
布兰德-阿尔特曼地块	一系列配对观测结果与其平均值（x轴平均值、y轴差值）之间的差值图。
常见的原因变化	影响被研究过程的所有个体值的自然变异的来源
95%置信区间	从观察数据计算出的区间，包括95%重复的真实值 ( $\bar{X} \pm 1.96 \times \text{标准误差 (SE)}$ ) 或 $N \pm 1.96 \times \sqrt{N}$
共识值	请参见指定的值
传统的真实值	请参见指定的值
控制图	显示一系列单个测量值的时间序列图，以及一条中心线和控制限制
控制限制	仅因共同原因引起的过程的最大允许变化；超过控制极限的变化是特殊原因可能影响过程的证据
高卢姆图	显示目标结果累积（增加）偏差的图；偏差和偏移早期预警的工具
漂移	数值的连续小变化导致精度随时间的变化；c. f. <i>偏差</i>
外部质量评估 (EQA)	比较不同实验室在当地进行的程序的结果；用于检测系统变异和评估准确性
良好的实验室实践	一套原则，在此框架提供了计划、执行、监测、记录、报告和存档实验室研究的框架
控制	当所有值都在预期控制范围内时，过程处于控制
内部质量控制 (IQC)	测量实验室内存在的程序中的可变性的质量测试；此类测试评估日常操作的精度；用于检测随机变化（评估精度）
ISO	国际标准化组织 ( <a href="http://www.iso.org">www.iso.org</a> )，一个制定国际标准，包括实验室质量的机构
制造的QC样品	商业用样品，根据生产指南进行制造和分析（分析）
失控	当测量值超过预期控制范围或在控制范围内，但显示值的显著趋势时，过程就失去控制；必须评估失控的过程

精度	测试结果与真实值的一致性（或结果正确程度）
pdca	计划、执行、检查、行动（谢瓦特周期）
泊松分布	一种用于建模计数的理论分布
准确率	重复测量之间的一致性接近；通常表示为不精度（漂移；内部、中间、中间、批次、分析或实验室变化）；精度测量不受偏差影响（参见抽样误差）
熟练度测试	EQA的一种形式，其中外部机构比较来自几个实验室的结果，并在满足设定的性能水平（质量）时颁发证书
随机错误	请参见抽样误差（精度误差）
S图表	测量值与时间的标准偏差的控制图，用于监测过程的均匀性和测量精度
采样错误	计数有限数量精子的误差（与计数数量的平方根成反比）；采样误差（%SE）为以计数的百分比表示的标准误差（ $100 \times [\sqrt{N}/N]$ ）
希瓦特循环	参见PDCA
特殊原因变化	一种大的、间歇性的或不可预测的变异来源，只影响被研究过程的某些个体值（随机变异）
标准操作规程 (SOP)	一套关于应该如何执行过程和方法的说明
统计抽样误差	请参阅采样错误
系统错误	请参见偏差
目标值	请参见指定的值
变化	过程的各个结果之间的差异；变化的原因（误差）可以是常见的，也可以是特殊的。
$\bar{X}$ 杆图表	显示测量值随时间变化的控制图，用于监测过程可变性和检测目标值的变化（评估准确性）
尤登图	从一个样本与另一个样本绘制的值图

## 7.2 射精检查中错误的性质

本节讨论由于技术因素引起的变异的控制（生物变异主要在第2章和第3章中讨论）。

质量C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程序的目的是尽量减少这些变化，否则可能导致患者护理和管理中的错误。IQC更关注测量的不精确性（可变性）；EQA更关注实验室评估的准确性（正确性）。这些高质量的活动将使结果对临床医生和研究人员更可靠、真实和有用，对患者的护理和管理更安全。



## 7.2.1 允许的变化（可接受的随机误差）

总是有某种水平或程度的允许变化，表示为可接受的值范围（在范围的下限和上限内）。此范围通常通过计算置信区间(CI)来定义。CI是一个经过统计计算的范围。最常用的是95%可信区间，其中“95%”意味着，在统计上，95%的真实值很可能在该区间内。根据观察次数的不同，95%CI通常接近标准差(SD)的两倍约±。标准差是对重复评估围绕评估平均值的变化的一种衡量标准。例如，为了比较高浓度和低浓度之间的变异性，变异系数(CV)可能是有用的。CV是通过将SD除以评估的平均值来计算的，通常用百分比表示(注意，当平均值接近于零时，CV将非常高(SD几乎除以零)，几乎无用)。

当范围的上下下限较窄时，测量可以归类为精确。一个狭窄的范围是在重复评估之间的低差异的结果。如果分析得到的结果接近真实值或真实值，则该结果是准确的（或正确的）。准确性被描述为观察结果与真实结果之间的差异。

错误可以分为随机错误或系统错误。

### 7.2.1.1 随机错误

随机误差给出的结果偏离了预期的真实值——有时更高，有时更低。随机误差通常是由于读数的差异或抽样，可以评估重复测量相同的样品使用相同的设备，或所有工作人员执行特定的评估使用所有设备在实验室的评估。期望是这些值之间不应该相差很大。

### 7.2.1.2 系统错误

系统上的错误也被称为“偏差”，而且可能更难被发现。系统的错误会导致错误的结果，通常总是太低或过高。它们的产生来自在两个方向一致影响结果的因素，但没有特别增加对同一精液样本的重复评估的可变性。因此，重复测量不会检测到系统误差。

## 7.2.2 统计抽样误差

即使射精在宏观上混合得很好，精子在其分布、固定物或培养基中仍然有一些随机的变化。由于技术上和实际上不可能有整个射精的计数，手动或计算机辅助测量只能为选定的但希望有代表性的一部分。问题在于从射精（或精子悬浮液）中提取的样本（样本）在多大程度上代表了整个射精的情况。通过选择一个固定的体积（用于估计浓度）或一个固定数量的精子（用于分类运动、形态或活力）而产生的抽样变化是一个随机误差，通常被称为(统计)抽样误差。第187页的表7.1给出了该领域的一些常用术语。



### 7.2.3 尽量减少统计抽样误差

这是不可能测量整个样品的。另一种选择是在大量的重复中检查较小的、希望具有代表性的部分。同样，这将是太耗时和累人的，因此不可行。因此，需要在统计精度（结果的可靠性）的增益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的可靠性之间达到可接受的平衡，本手册中对基本射精检查的建议包括几个项（第2章）：

- 正确射精的阳性移液管稀释量用于评估精子浓度；
- 稀释度（固定精子）和计数室体积（评估的准确体积），便于可靠的精子浓度评估；
- 重复评估精子浓度和活力，并进行比较，通过代表性较差的等分物来减少随机错误的风险；
- 有足够深度的湿准备，为未受损的精子活力；和
- 评估足够数量的精子（运动性和浓度为400；活力和形态为200），以减少随机分布的影响。

当确定实验室的统计抽样误差时，通常带有置信区间，通常设置在95%水平（上下范围）。这意味着，有5%的可能性，正确的结果将不在“可接受的范围”内。如果因此导致正确的结果被拒绝，则会有不必要的重复评估。其基本原理是，大多数被拒绝的结果预计都是由于抽样误差。在许多情况下，不必要的重复评估的频率是可以接受的。对于一些情况，更广泛的限制。在 $2.6\times$ 或 $3\times$ 时，可以选择标准差，而不是通常的 $2\times$ 水平)来减少不必要的重复评估的频率（分别为约1%和0.2%，而不是5%），但必须考虑接受更多错误的风险增加。

## 7.3 QA方案

实验室质量管理的细节见ISO15189（357）。遵守标准和实现可接受的结果的一个重要方面是制定和实施一个持续的质量保证方案。它定期监测和评估实验室提供的数据和服务的质量和适当性。它一般包括管理、管理、统计分析、预防和纠正措施。它可以使用持续的监测，这不仅可以检测和纠正问题，而且还将能够实施帮助防止这些问题发生的措施。质量保证计划应在包含标准操作程序(SOPs)的质量手册中进行描述，这是一套关于实验室中使用的不同工艺和方法的详细说明。与这些说明链接的是许多表格和文件，包括，例如，转诊记录、实验室工作表报告表格和提供给患者和转诊临床医生的信息传单。质量手册描述了实验室的组织结构，列出了不同职位（职位描述)所需的技能(培训)，以及测试人员和主管之间的会议时间表，以及工作人员的持续教育、发展和培训计划。



### 7.3.1 实验室程序手册

要在实验室中定期进行的程序应在手册中进行描述。所有实验室技术人员都应严格遵守书面的sop。这些也将是实验室技术人员内部培训和服务指导的一部分，是非常规程序和不会产生可接受结果的故障排除过程的重要参考。

基本文件将包括转诊记录、患者信息程序、患者预约时间表、标本收集、分析性能、分析结果报告、质量测试程序、新的实验室工作人员培训、设备测试、监测和维护、控制图表上的值表明问题时遵循的行动程序，以及试验结果的解释。标准操作程序应包括检查所有设备是否处于正常运行状态的程序，包括常规运行检查、校准时间表和日志，以及关于科学设备维护的文件，如显微镜、离心机、移液管、天平、冷冻机、冰箱和应急设备(例如。洗眼和淋浴)。其基本方法是为每台设备保存一个日志，其中使用检查表或监控工具记录所有的调整或校准。如果实验室程序开始产生失控的结果，这些记录是有用的。

### 7.3.2 内部质量控制

IQC监测精度——或结果的可重复性（最小化随机变化）——，因此通过观察那些超出既定的控制限制的结果，表明分析可能有错误或有问题。所执行的质量控制程序取决于待监测或控制的评估。涉及稀释、移液或重复使用腔室的评估或有多个步骤的评估需要定期或更频繁的测试，而对固定幻灯片或视频的评估可能更少进行测试，因为可能发生错误的步骤更少。

实现IQC的一种实际方法是将IQC程序和IQC样本纳入实验室的常规工作量中，并使用QC图表监测这些程序的结果。通过这种方式，IQC成为实验室常规的一部分，并按照已建立的地方或地区标准进行。重要的是，将质量控制样品作为常规实验室工作的一部分进行分析，而不是以特殊的方式处理。用于监控人员内部的IQC材料类型（指一个人阅读同一类型的样本的一致性）和技术人员之间（指两个或两个以上的人的阅读或解释同一样本的一致性）差异可以从商业来源或实验室购买。每种方法都有优点和缺点。

#### 7.3.2.1 采购的QC样本

有商业上可用的IQC样品提供目标值，最好是该产品建立可接受性能的允许限制。这些优点是可以评估精度和精度。实验室精液分析结果的变化可以与与批准来源的样本相关的变化进行比较。有了这些样品，实验室可以建立自己的控制图来评估精度，并可以使用制造商推荐的范围来评估准确性



(415)，或单个中心甚至可能追求更严格的价值观水平。购买的IQC样品的缺点是它们的成本高，而且它们并不能普遍获得。还可以考虑样品在装运和储存过程中的稳定性。应该注意制造商给出的目标值是如何获得的(多重评估、CASA、共识值、修剪手段等)，如果有提供的话。

### 7.3.2.2 实验室制造的QC样品

实验室生产的IQC样品的优点是降低了成本，局部通用性，以及样品可以专门为实验室的特定需要生产的事实。此外，这些样品将不会被识别为与常规样品的不同。许多样品，涵盖了广泛的结果，可以制备，并长期存储。它们的缺点是目标值是未知的，这可能导致长期的系统偏差或错误系统。建议，有时也需要，应该有控制样本来评估值的平均范围。精子浓度 $50 \times 10^6$ 以及临界值范围。精子浓度 $<15 \times 10^6/\text{ml}$ 。对样品的重复测量可以产生一个接近该材料的真实值的平均值。

### 7.3.2.3 储存的样品 (采购或实验室制造)

存储的精液样本可用于IQC程序来评估精子浓度和精子形态。这些产品的优点是目标值已知(购买样品)(由EQC方案提供)或通过多个评估(实验室生产的材料)估计，以便通过重复测量检测到系统误差。

#### 精子浓度

不同精子浓度的精液样品可以被稀释和储存。存储的样品可以包括从理想或突出到坏或难以评估的样品。关于制备和储存非凝集精子悬液以测量精子浓度的说明见第239页第8.6.3节。

#### 精子形态和活力

对于形态学，风干干燥、固定精液涂片或固定和染色的精液涂片(第43页第2.4.9.1节)，对于活力，可以使用伊红黑松香涂片(第26页第2.4.7节)。切片应该从实验室的常规样本中选择，并掩盖识别码，并进行分析(记住在第48页的精子形态分类一节中提到的考虑事项)。样品应制备具有好、中、差特征的射精。这些幻灯片可以重复使用，但质量必须不时地进行评估。最好使用广泛的幻灯片，以消除技术人员在评估某些幻灯片时越来越熟悉和不那么严格的可能性，这可能会导致有偏见的分析。

关于如何准备形态学评估QC的载玻片，见第242页第8.6.4节。如果准备好载玻片和储存得当，它们将在数月甚至几年内保持稳定。在从一个QC集到另一个QC集的过渡期间，不同的幻灯片集可以交替或重叠。



### 精子运动

在磁带、CD、DVD或共享媒体平台上录制的录像标本，无论是来自诊所、EQA发行版或专门制作的，都可用于QC。视频记录的放大率和分辨率应与在分析实际标本时在显微镜中观察到的分辨率相似。在所有日常评估中使用显微镜相机和视频屏幕，在与录像相同的放大倍数和对比度下，增加了录像对QC的有效性。

关于如何进行运动测量的录像，见235页第8.6.2节。

#### 7.3.2.4新鲜QC样品（实验室制造）

IQC的一种简单方法是让一个或多个技术人员对精液样本的单独等分进行重复读数或测量。重复评估应与常规精液分析一样进行。这种形式的QC可以应用于评估精子浓度、精子形态、精子活力，以及在某种程度上的精子活力（见下文）。凝集和聚集评估的主观性质，以及混合抗球蛋白反应试验（416）的可变性，以及对活配子和阳性对照的需要，使这些试验的QC变得困难。

新鲜样本中精子活力测量的IQC提出了特殊的问题，因为活力往往随着时间的推移而下降，因此需要首先在QC计划中由所有技术人员在同一时间进行评估。因此，在样本采集后一段时间或很长时间读取的样本的测量读数会较低。运动的幻灯片和盖子准备只需要几分钟是稳定的，所以在射精后和不同温度下的时间差异下，可以稳定30分钟，如果没有太大的评估，也可以使用。使用桥式显微镜，或将相机连接到一个或多个屏幕上的显微镜，允许几个技术人员同时从同一准备工作中评估相同的领域。这在初始培训中特别有帮助。可以在监测器上放置一个醋酸盐网格，以模拟在活体运动分析中使用的眼部网格（第235页第8.6.2节）。

使用CASA系统的实验室应遵循制造商的程序进行QC。这通常涉及到回放存储的运动精子的图像，这些图像被标记为以一定的速度游泳。

## 7.4 数值的质量控制图

本节描述显示和分析数值的方法，主要是针对“连续数据”（主要是精子数量）。对于比例，必须使用略有不同的方法。

所谓的控制图的创建和解释是实验室质量保证中不可分割的组成部分。为了获得安排良好和易于理解的QC数据显示，有许多图表可供使用。不同的图表有各种优点，其选择应基于准确性、精度或误差问题的性质和可用材料的性质。如果实验室缺乏在统计和解释结果方面的能力，就必须获得帮助



从外部能力来确保实验室标准可以使用连续的质量保证系统进行监控。潜在的统计理论和计算可能很复杂，但这些图本身也很容易理解和解释。

### 7.1.1 $\bar{X}$ 杆 图表

要使用的一个图表是 $\bar{X}$ 杆图，它主要用于检测与目标值非常不同的结果，或检测变化的总体增加。系统误差可以通过连续测量相同的样品来检测。对样品进行重复测量，并绘制平均值与检测的时间或测试悬浮液的对比。需要使用存储的样品，因为程序取决于了解真实或目标值，这些值可能由制造商（购买的样品）或EQA程序或估计（从材料的多次评估）提供。

$\bar{X}$ 杆图是一种谢瓦特图，用于监测对恒定数量的测试样本的重复分析的平均值。例如，在10个IQC悬浮液（所有都来自一种制备）中，精子计数是由所有进行评估类型的工作人员完成的。对于每个悬浮液，都会计算来自单个评估的测量值的平均值。然后对10个悬浮液的平均值进行绘制。7.1). 目标值 ( $\bar{X}_0$  平均值的平均值)、警告限值和动作限制 (表7.2)。这些限制是基于评估的变化和进行评估的人数，并以 $X$ 条以上和下面的限制表示。

表7.2一个 $\bar{X}$ 的值的计算图表

由4名男性学家(A-D)对一种IQC制剂的10个QC悬浮液评估精子浓度。警告限制 ( $A_2$ ) 和行动限制 ( $A_3$ ) 见表7.3。

人员	悬架									
	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
平均	38.0	37.5	39.5	40.5	38.0	37.0	42.0	43.5	41.5	39.0
sd	3.27	3.70	2.52	7.42	1.63	3.16	2.16	1.00	5.45	3.74
$\bar{X}_{杆}$	39.7									
S	3.40									



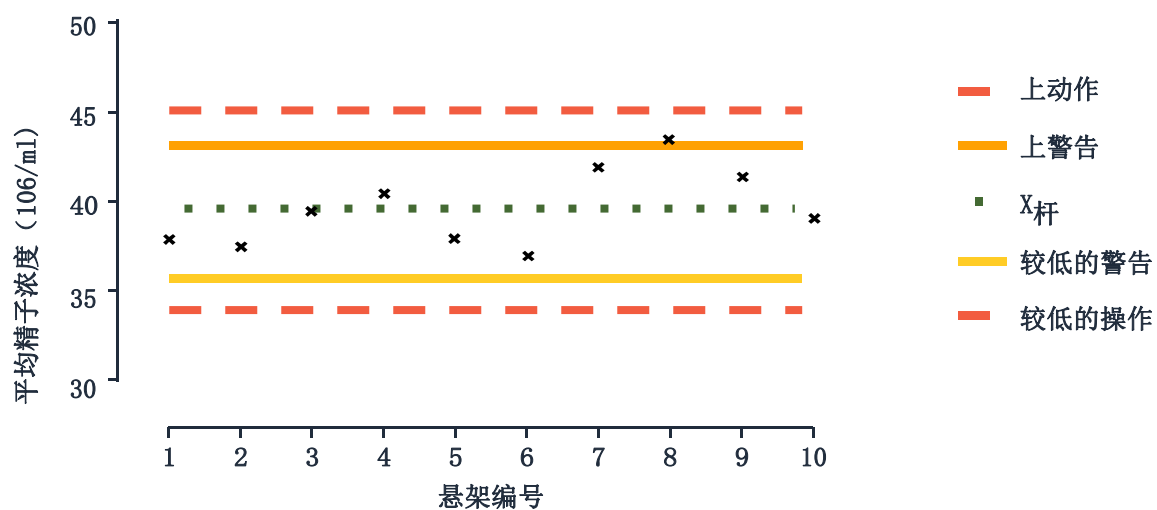


人员	悬架									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
警告					$\bar{x}_{\text{杆}}$	$A_2$	$s_{\text{杆}}$			
上	43.3	$\bar{X}_{\text{杆}} + (A_2 \times S_{\text{杆}})$			39.7	1.08	3.40			
较低	36.0	$\bar{X}_{\text{杆}} - (A_2 \times S_{\text{杆}})$			39.7	1.08	3.40			
行动					$\bar{x}_{\text{杆}}$	$A_3$	$s_{\text{杆}}$			
上	45.2	$\bar{X}_{\text{杆}} + (A_3 \times S_{\text{杆}})$			39.7	1.62	3.40			
较低	34.1	$\bar{X}_{\text{杆}} - (A_3 \times S_{\text{杆}})$			39.7	1.62	3.40			

表7. 3X的警告和动作限值计算的必要因素图表

不。技术人员 (n)	警告限制 ( $A_2$ )	行动限制 ( $A_3$ )
2	1.772	2.659
3	1.303	1.954
4	1.085	1.628
5	0.952	1.427
6	0.858	1.287
7	0.788	1.182
8	0.733	1.099
9	0.688	1.032
10	0.650	0.975

图. 7. 1ANX杆基于表7. 1中的数据绘制的图表



X在检测技术人员是否产生了高度可变的结果方面，图表比S图表更不敏感（第7. 4. 2节）。

### 7.4.2 S图

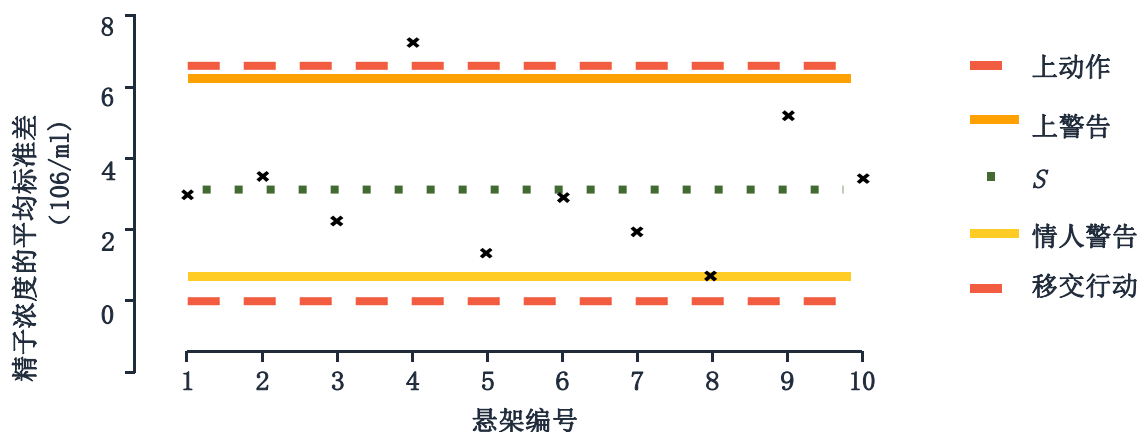
S图检测技术人员是否产生了高度可变的结果。重复测量，并绘制每个被评估的精子溶液的标准偏差。由于QC样本都来自同一个存储池，因此预计样本之间没有差异，因此技术人员之间的任何显著差异都将表明一个或多个技术人员的评估存在系统性偏差。

与X相比图中，是图中绘制的10个悬浮液评估的SD值。7.2)。目标值是所有悬架的平均标准差——在本例中，为 $3.40 \times 10^6/\text{ml}$ 。符合X值的要求，控制限制被添加到S图中。但是，警告和动作限制的计算方法与X中的不同图（表7.4）。低于S图下限的结果表明了出乎意料的小变化，这可能表明技术人员之间的一致性水平上有了真正的改善，或者在最坏的情况下，对数据的不适当操作。

表7.4 S图的警告和动作限制的计算

不. 技术人员 (n)	S的控制限制和评估人员的数量			
	较低的动作限制 ( $s_{0.999}$ )	较低的警告限值 ( $S_{0.975}$ )	警告上限 ( $S_{0.025}$ )	上动作极限 ( $S_{0.001}$ )
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
<b>警告</b>	$\times 10^6/\text{ml}$			n
上	6.51		$S \times s_{0.025}$	4
较低	0.99		$S \times s_{0.975}$	4
<b>行动</b>				
上	8.59		$S \times s_{0.999}$	4
较低	0.33		$S \times s_{0.999}$	4

图. 7.2精子浓度的S图10



## 7.5 百分比的QC图表

与连续或数值数据的QC相比，显示类别或类别的结果必须使用不同的度量来计算控制极限。当精子被分为两个或两个以上的类别（如正常或异常形态，四种运动类，活或死），一类内估计百分比的标准误差取决于真实但未知的百分比以及计数的精子数量(N)。目标百分比(p)计算为对同一测试样本的重复评估的平均值。对于在20%到80%之间的百分比，该百分比的标准误差（可变性）可以近似为 $\sqrt{p(100p)/N}$ 。详情请参见Kuster等人。(417)。虽然单个读数的SD应该接近这些值，但平均SD， $S_{\bar{p}}$ ，由于技术人员之间的额外差异，将超过2.5%。在这种情况下，目标将是减少 $S_{\bar{p}}$ 。

## 7.6 评估 $\bar{X}$ 和S图表

有良好的符合性的两个 $\bar{X}$ 和S图很重要，因为它们可以为实验室提供的服务质量提供重要的见解。此外，这些图表往往为许多机构的实验室认证提供了基础。

实验室工作人员和主管应一起检查控制图。这最好在与员工和主管的定期质量会议中完成，因为质量结果是基于对实验室绩效的联合评估和讨论的团队努力。如果控制值不被接受，则应对整个过程进行系统的评估，以确定可能的变化来源。

### 7.6.1 如何识别失控的值

有监测程序QC的基本指南(414)应根据这些指南检查这些QC图表，并在有需要时采取行动。宣布一个方法失控的规则有各种各样的，而且是最重要的



详见表7.5。在实践中，使用这些规则中的第一个和最后一个是被普遍接受的。第一个规则（操作限制之外的一个结果）是最简单的规则。这可能表明在这个过程中发生了突然的巨大变化。最后一条规则（在平均值的一侧连续8个结果）是有吸引力的，因为它应用起来很简单，而且对第一个规则可能错过的逐渐变化或趋势很敏感。

如果QC样品被“拒绝”，报警对不同类型错误（随机或系统）的灵敏度（报告测试真实和正确值的能力）应指导调查可能的原因（表7.5）。实验室主管应定期审核QC结果。

表7.5 质量控制图表的基本控制规则

控制规则	指示错误
其中一个结果超出了动作控制限制	随机
超出动作控制限制的三分之二	系统的
超出警告控制限制的五分之四的分	系统的
连续两个结果，两者以上或两者都低于上限/下限的“警告”限制	系统的
两个连续的结果，一个高于和一个低于上限/下限的“警告”限制	随机
连续八个结果，全部高于或全部低于平均值	系统的

### 7.6.2 失控值的原因

整个团队必须仔细评估来自QC程序的信号，以确定可能导致失控值的任何错误。可能出现的错误（带有示例）包括：

- 样品混合不充分（常见为粘性和凝集样品）；
- 技术人员压力（例如。采样不稳定或记录错误）；
- 技术差。在滑动片或腔室准备过程中粗心的移液或处理）（第206页第7.10节）；
- 培训不足。精子的计数鉴定、正常形态分类、粉红色和白色精子头部或卷曲精子尾部评估、精子活力检测或一致计算误差的偏差)存在系统差异（206页第7.10节）；
- 仪器的变化。磨损或未校准的自动移液管，可能降低采样和稀释过程中的重现性；错位的显微镜可能降低光学清晰度，防止活力或形态的正确评分；不准确的平衡或测量缸）（第243页第8.6.5节）；
- QC样品的恶化（根据标准化标准）；



- 更换设备，特别是移液管和计数室；以及
- 程序或实验室环境的变化。

### 7.6.3 对失控值的响应

当结果超出控制范围时，应记录可能的原因和所采取的纠正措施。如果问题不明显，可能需要重新分析QC样品，以检查第一个结果是否不寻常。如果质量控制结果仍在控制范围之外，则必须在进行进一步分析之前找到并纠正错误的原因或来源。

为此，请执行以下操作：

1. 逐步创建整个过程的流程图。SOP和第208页的表7.14-7.17可以帮助完成这一过程。
2. 从流程图中，确定潜在变异的区域，推断出可能的原因，并制定减少变异的计划。
3. 收集更多的数据，制作新的控制图表，并审查它们，以确定可变性。这种识别问题、开发和测试假设以及重新评估过程的序列被称为计划、做、检查、行动(PDCA)循环。

## 7.7 分析和报告技术人员之间可变性的统计程序

基于新鲜精液样本评估的QC程序与存储的样本相似，并允许评估技术人员内部和技术之间的可变性。虽然两者也有相似之处，但也有不同之处。对于新鲜样本的分析，真实的值是未知的，所以 $X_{ij}$ 不能使用图表，也不能估计系统误差（技术人员偏差）。在这种情况下，主要的QC程序是评估技术人员之间可变性的S图，以及每5-10个QC样本后的双向方差分析(anova)来评估技术人员之间的系统差异。

### 7.7.1 比较来自两名或两个以上技术人员的结果

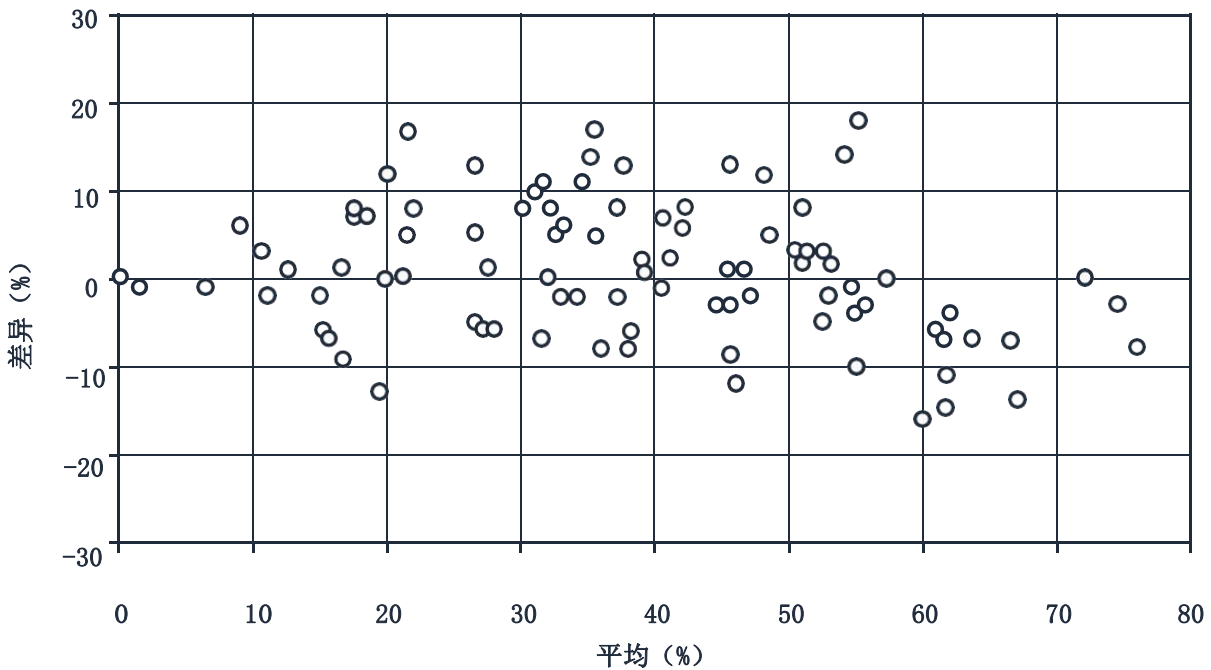
来自两个或两个以上技术人员的结果可以通过几种方法进行比较。

- 绘制两个估计值与它们的平均（418）之间的差异，由两个技术人员对来自同一样本的精子浓度估计值的比较应该产生与图中相似的模式。7.3. 在Bland-Altman图中，两个评估的平均值绘制在x轴上，差异绘制在y轴上。理想情况下，所有的评估都应该集中在y轴上的0左右。一般的系统误差通过偏离0-差异水平和差异来揭示。在图中。7.3，平均差值为0.6%，表示偏差较小，但变异性（SD7.6%）大于理论抽样误差（<5%）。也有证据表明，CASA方法的值高于60%（102）以上的技术人员。



图. 7.3人工和CASA估计的Bland-Altman精子活力进展百分比图

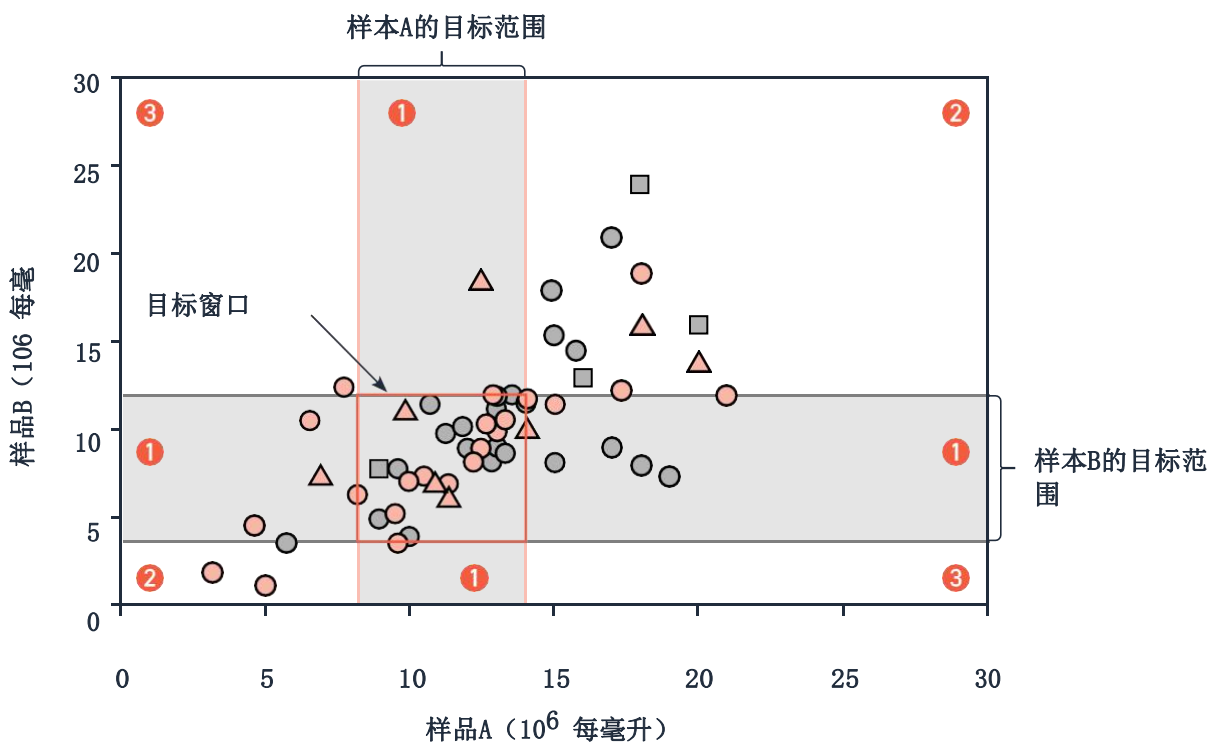
该图绘制了两种方法（手动和CASA）（y轴）与平均值（（手动+CASA）/2）（x轴）的结果之间的差异。



- 计算差异的平均值和标准差（成对比较）。由于两名工作人员分析同一样本，理想情况下，平均值之间的差异应为零。通过配对t检验评估的任何与零的显著差异，都显示了他们的评估之间存在偏差（系统差异）。
- 绘制两个样本的结果（尤登图）。比较几名工作人员对浓度的估计数，每个工作人员检查两个单独的样本，应该产生与图中类似的模式。7.4. 对于每个人（对于IQC）或每个中心（对于EQC），两个样本的值相互绘制。虚线和竖线表示有经验的人(IQC)或参考实验室(EQC)的结果的95%置信限。由这些线的交点定义的区域是这些值应该进入的目标窗口。当一个样本的值在正确范围内但另一个样本的值不是（区域标记为1；其中一个为正确，另一个不是），当两个样本估计值都过高（右上象限，区域标记为2；两者读为过高）或过低（左下象限，区域标记为2；两者读为过低）时，此图显示了系统误差。随机误差很可能导致一个样本过低，而另一个样本过高（区域标记为3）。

图. 7.4精子浓度估计的尤登图

一个人(或EQC中的实验室)可以用不同的符号和颜色来显示。②标记象限的结果可能是由于系统误差，而标记象限的结果可能是由于随机误差。①③



- 双向分析。这种技术在许多统计教科书中都有描述。并可对技术人员之间差异的显著性进行统计检验的统计包中获得。与上面的成对比较一样，所有技术人员的估计之间的差异最好应该为零。因此，计算每个人的每个样本与平均值的差，并为每个个体计算这些差异的平均值和标准差。偏差是指差的绝对值大于平均差的3个标准误差的人。

对工作人员之间差异的正式统计检验是基于双向方差分析表中的f检验，这可以直接从大多数统计方案中获得。平均差异大于约2.5个标准误差不太可能仅由机会变化引起 (<1.2%)，而且很可能是真实的或实际的。无论个体之间的差异是否显著，都有必要回顾个体的手段或均值差异，以确定哪些大于预期。并不是所有的计算机软件包都提供了个体之间差异的标准误差，这可能必须单独计算。各人之间的实质性差异应促使审查所有程序，以确定如何改善一致性。

下一节中的工作示例说明了如何直接计算工作人员之间精子浓度差异的标准误差，并评估它们是否大于仅凭机会变化得出的预期。当直接从观测结果执行计算时，必须保持足够数量的小数位，以避免四舍五入错误。



7.7.1.1 评估技术人员之间的系统差异：工作示例

表7.6精子浓度 (x10由三名工作人员对五个QC样品进行估计)

样本	1	2	3	4	5
A	108	45	100	50	92
B	103	47	102	50	96
C	104	46	89	41	88
样本均值	105.0	46.0	97.0	47.0	92.0

表7.7与从每次观察结果中减去精液样本平均值计算的样本平均值的差异

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计算的每个工作人员的平均值、标准差和平均值/标准误差 (n=样本数)

	平均	sd	平均/标准误差	标准差
	$m_j = \sum d_{ij}/n$	$s_j = \sqrt{(\sum d_{ij}^2 / (n - 1))}$	$(m_j / se(m_j))$	$se(m_j)$
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

对于C，与样本均值的平均差值为 $-3.8 \times 10^6/\text{ml}$ 。为了评估低估的程度是否与随机变化相容，必须进行一系列的计算（表7.9）。

表7.9计算的每个工作人员的平均值、标准差和平均值/标准误差 (n=样本数)

一步一步的指导： 计算一个变化的度量值	计算	结果	单元
首先是标准差的和 <sup>2</sup> (SD见表7.8)	$1.949^2 + 2.775^2 + 3.347^2$	22.702	
除以2[3个人减去1]	$22.702 / (3 - 1)$	11.351	
计算根，得到误差根均值	$\sqrt{11.351}$	3.369	$\times 10^6/\text{ml}$
计算个体差异的标准误差和误差根均值[3个体，5个样本]	$3.369 \times \sqrt{((1 - 1/3)/5)}$	1.230	$\times 10^6/\text{ml}$

1. 介绍  
2. 基本检查  
3. 延长检查时间  
4. 高级考试  
5. 精子制备技术  
6. 精子的低温保存  
7. 质量保证和质量控制  
8. 附录  
9. 参考文献



比较 $3 \times$ 标准误差与C的平均差值的绝对值 ( $3.8 \times 10^6/\text{ml}$ )	$3.8 > 3 \times 1.230$ $3.8 > 3.691$	错误!
---	---	-----



技术人员之间差异的正式统计检验是基于f检验的。使用上述精子浓度进行的方差分析见表7.10。QC样品之间的差异很大( $P < 0.001$ )，因为它们取自不同的新鲜精液样品。人间差异的F检验( $F = 4.81$ 自由度和8自由度， $P = 0.042$ )在0.05水平上显著，表明这些差异大于单独随机变异的预期。

表7.10技术人员和QC样品双向方差的F检验

来源	方块的总和	自由度	平均平方	F比值	P值
QC样品	9807.6	4	2451.90	216.03	< 0.001
人员	109.2	2	54.60	4.81	0.042
错误	90.8	8	11.35		
总数	10007.6	14			

表7.11总结了主要是IQC措施的不同程序。

表7.11IQC程序的主要特征总结

程序	检测到错误	QC材料	不。技术人员
$\bar{X}$ 杆图表	偏差，整体变异变 性，准确性	存储	个人，几个
S图表	bias/precision	stored/fresh	几个
双向阿诺瓦	bias/precision	stored/fresh	几个
布兰德-阿尔特曼	bias/precision	stored/fresh	两个
配对测试	bias/precision	stored/fresh	两个
尤登图	bias/precision	stored/fresh	几个

## 7.7.2 监测每月的手段

虽然主要的IQC程序是基于对工作人员之间和内部差异的评估，但可以通过监测精液分析结果的趋势来获得额外的信息。

所有接受检查的患者的每个变量的平均值。可以绘制在一个 $\bar{X}$ 上图表，与警告和动作限制2和3的标准误差两侧的平均值。标准误差可以从原始观察结果的标准差除以每个区间内精液分析数量的平方根，或者直接从观察到的平均值的分布来估计。控制限制应通过至少6个月的观察来确定，并应定期修订。每个平均值至少有20个结果；一个小实验室可能不得不汇集一个月的结果。该方法的改进包括每月监测正常值患者的平均值



使用累积和(CUSUM)图来快速检测任何系统偏离平均(421)。

与预期值的偏差可能是由于患者的不同特征(被分析受试者的时间依赖性变化、对同一男性的重复测试次数的变化、不同类型不孕症的男性转诊模式的变化)或技术因素(实验室工作人员、实验室用品的变化、季节性温度变化、设备、操作人员之间的变化)。

## 7.8 外部质量控制和质量保证

EQC是监测分析结果的完整质量控制过程的一部分，而EQA则监测了与收集和报告数据相关的所有实验室程序，以确保实验室过程受到控制。EQC允许实验室将其结果与其他测量相同测试的结果进行比较。它允许在单个实验室中不可能的规模进行不同的评估和比较。

EQC和IQC都很重要，两者都应该放在一起，因为它们是互补的过程。如果对照样本没有被充分掩盖或选择，EQC可能会揭示从IQC中可能不明显的准确性问题。EQC的优点是，它允许实验室监测其方法的准确性和稳定性(422)然而，由于EQC的样品明显是外部来源或不同的矩阵，它们容易以特定的方式处理；这应该防范，以便尽可能以与常规样品相同的方式处理。

EQC包括同行比较和熟练测试程序，标本假设是相同的发送到所有参与实验室分析(423)实验室提交结果的中心设施，数据检查异常值，和手段和SDs计算描述参与实验室的性能。

### 7.8.1 EQC结果评估

EQC方案为实验室提供关于其结果和来自其他参与实验室使用相同或不同的方法来测量指定分析物的结果的信息。应该确定指定的目标值是从准确测量、精子浓度的多个血细胞计数、计算机辅助精子活力分析还是从一组良好对照的参考实验室获得的，还是从所有参与中心的修剪手段。结果通常以图形形式呈现，例如在柱形图中，它提供了结果的快速可视化表示。如果多次使用相同的EQC样本，也将报告实验室结果对该样本的偏倚和可变性。

当提供两个样本进行分析时，通常会构造一个尤登图，其中每个样本的值被绘制在x轴和y轴上(图 7.4在201页)。从绘制值的散点和分布可以清楚地看出中心在评估上的不同程度。其他数据可以可视化，例如，通过使用不同的符号或颜色来指示使用不同的方法(计数室、污渍或评估标准)或不同的中心。



当分布两个以上的样本时，可以给出偏差方面（与指定值的差异）。这些包括：

- 偏倚指数得分(BIS)：偏倚除以选定的变异系数 $\times 100$ ，可以为正，也可以为负；
- 方差指数得分(VIS)：这与BIS相似，但总是是正的；
- 平均运行BIS或VIS分数(MRBIS, MRVIS)，这有助于确定趋势。

低MRBIS和低MRVIS表明结果接近指定值；低MRBIS但高MRVIS表示随机误差，高MRBIS和高MRVIS表示系统误差。报告为成功/不成功或排名的结果对实验室检查和认证很有用。

监控性能的一种简单方法是将实验室的结果（y轴）绘制每个参数的目标值（x轴）。这清楚地显示了实验室的值有多接近身份线。或者，与目标值的差异可以显示在Bland-Altman图上(图。7.3在200页)。

## 7.8.2 对失控结果的响应

从EQC方案中获得的基本信息与实验室和实验室方法的偏差或准确性有关。期望的结果是实验室保持或提高他们的方法的准确性，（422）实验室的结果持续/持续高于或低于EQC方案的赋值或平均值，需要重新评估他们的方法。EQC结果的巨大差异通常与IQC结果的巨大差异相关，并表明从样本到样本的测试程序不一致。应仔细重新评估技术程序，以确保它们符合本手册中的建议。

适当的行动包括为IQC讨论的行动（第199页第7.6.3节），包括对技术人员的再培训和对样品的重新测试。第208页的表7.14-7.17也表明了精子分析中变异的潜在来源。实验室之间的科学人员交流往往是有帮助的，在EQC结果良好的实验室对技术人员的培训可能是有益的。来自EQC结果良好的实验室的顾问通常能够看到在哪里可以改变方法以提高重现性。

## 7.9 质量控制的频率和优先级

QC样品应进行常规分析。分析的频率可由国家或地方的建议决定，或由实验室许可法或认证机构授权，最低数量可由国家监管机构商定。这些因素可能会受到实验室正在分析的标本数量的影响。一些规定可能要求每天对QC样本进行分析，以评估患者的精子浓度；否则，1%到5%的样本应用于IQC。

应使用QC样品：

- 监督新聘工作人员和现有工作人员；



- 何时引入新的实验室设备、用品、程序或批次IQC样品；
- 这可能是定期或定期维护计划的一部分。

表7.12包含了QC调度的一般指南；在实际操作中，进度将取决于实验室的工作量。表7.13显示了不同质量控制方案的优先级；某些程序对于资金有限的实验室可能不可行。

表7.12QC的时间表

在任何时候	样本内结果的监测和相关性
每周/月	分析不同技术人员的重复测量结果
每月	平均结果分析
季度/每两年一次	参与EQC
每两年/每年一次	移液管、计数室、其他设备的校准

表7.13QC试验汇总表

参数	材料	目标值	准确性/偏差	准确率	优先级 (1>2>3)
浓度	IQC新鲜	没有		S图，双向阿诺瓦	1
	存储的IQC	是的	$\bar{X}$ 杆图 表	S图表	3
	eqc	是的	$\bar{X}$ 杆图表	S图表	2
形态学	IQC新鲜	没有		S图，双向阿诺瓦	1
	存储的IQC	是的	$\bar{X}$ 杆图表	S图表	3
	eqc	是的	$\bar{X}$ 杆图 表	S图表	2
移动性	IQC新鲜	没有		S图，双向阿诺瓦	1
	存储的IQC	是的	$\bar{X}$ 杆图 表	S图表	3
	eqc	是的	$\bar{X}$ 杆图表	S图表	2
活力	IQC新鲜	没有		S图，双向阿诺瓦	1
	存储的IQC	是的	$\bar{X}$ 杆图表	S图表	3
	eqc	是的	$\bar{X}$ 杆图 表	S图表	2

## 7.10 训练

当工作人员接受培训、引入新的分析方法或修改评估现有方法时，可以使用类似的QC方法。工作人员的培训应包括对下列方法的认识。

### 7.101 在评估精子浓度方面有困难时的实际提示

- 审查混合和稀释程序、腔室网格和计算结果。  
有一个程序的步骤清单可能会很有帮助。
- 在加载腔室后的10-15分钟内读取样品，之后如果不使用潮湿的腔室，蒸发会对精子在腔室内的位置有明显的影响。
- 两名工作人员应一起工作，使用桥式显微镜或配有摄像机和电视屏幕的显微镜，以比较稀释、加载和计数程序。它们应该计算相同的加载腔室，比较行或网格的值，以找到差异的来源。
- 在计数和训练过程中使用桥式显微镜，或检查网格眼中的精子，以决定单个精子是否被考虑在一条直线上，是否有资格被纳入计数。
- 审查表7.14。

### 7.102 在评估精子形态方面有困难时的实用提示

- 遵守本手册中的指导方针。 研究每个精子的显微照片和相关评论。
- 强调使用结构化评估始终检查每个精子的所有四个区域的重要性。 **2.10**在**第50页**)。
- 要特别注意具有边缘性形态的精子。 它们应被归类为异常现象。
- 使用桥式显微镜或配备摄像机和电视屏幕的显微镜进行评分和培训。
- 审查表7.15。

### 7.103 在评估精子活力方面遇到困难时的实际提示

- 在评估前立即做好准备。 只有在任何漂移停止后才通过阅读来减少整体运动性的偏差。
- 随机选择该字段，不要故意选择运动精子数量高或低的字段。 一种方法是避免透过眼筒，直到选择一个字段。
- 不要等待运动精子进入该场后再开始计数。
- 快速分析；根据精子浓度，一次只分析网格的一小部分。



- 避免在分析过程中游到该区域花更少的时间检查网格区域的精子。
- 将进行性、非进行性和不运动的精子分为两个阶段。如果该技术有问题，请扭转分析的顺序。
- 审查表7.16。

### 7.104 在评估精子活力时遇到困难时的实用提示

- 特别注意区分红色（死亡）和粉红色（活）精子头（头部有微弱粉红色染色的精子被评估为活）。如果染色仅限于颈部区域的一部分，而头部区域的其余部分未染色，这被认为是一个“渗漏的颈部膜”，但不是细胞死亡和细胞膜完全解体的迹象。
- 使用推荐的伊红-黑松香法（第26页第2.4.7节）。
- 审查表7.17。

表7.14评价精子浓度时的变异来源（误差）

程序	预防	控制
<b>分析前（在标本采集或处理时）</b>		
稀释前精液样品不完全混合	培训，SOP	重复稀释
稀释错误。假设1：20的稀释度是1+20，而实际上是1+19)	培训，SOP	iqc
移液装置无法进行校准。移液管设置为100μl，但实际上提供95μl或110μl)	设备维护，SOP	重复稀释，IQC，EQC
使用不合适的移液管。空气而不是正移位移液管)	培训，SOP	重复稀释，IQC，EQC
使用低体积稀释，这具有没有代表性的抽样风险	培训，SOP	重复稀释，IQC，EQC
在注入稀释液之前，未能擦拭移液管尖端外部的残留精液	培训，SOP	iqc
<b>分析性（作为被测样品的测量结果）</b>		
房间不干净和干燥	培训，SOP	重复评估
房间的组装或加载不正确。柱子上的污垢颗粒可能会改变腔室的高度)	培训，SOP	重复评估
混合精液和去除稀释之间的时间过长（精液中的精子立即开始沉淀)	培训，SOP	重复的稀释度和评估值
稀释室和加载室之间的时间延迟（稀释精子立即开始沉淀)	培训，SOP	重复的稀释度和评估值
显微镜未正确清洗或对齐；放大倍数不正确	培训、SOP、设备维护	IQC和EQC



程序	预防	控制
加载室后等待时间不够分析（沉淀时间不足）	培训，SOP	复制评估，IQC，EQC
在精子沉降过程中，血细胞计数室不是水平的，或者在沉降过程中没有保持在潮湿的环境中	培训，SOP	复制评估，IQC，EQC
对精子的错误鉴定。将碎片计数为精子或缺乏难以识别的精子)	培训，SOP	IQC，EQC
评估网格上的行太少或太多。 停止在一行的中间	培训，SOP	IQC，EQC
计算精子数量过少，导致采样误差较高	培训，SOP	IQC，EQC
在计数框线上对精子的评分不一致。 如果精子在上、下、左、右边界得分，则高估浓度)	培训，SOP	IQC，EQC
多键计数器故障	设备维护	iqc。eqc
在计算或校正稀释度时出现的数学误差	培训，SOP	IQC，EQC
使用毛细血管填充室（填充过程中精子分布不均匀）	培训，SOP	IQC，EQC

表7.15评估精子形态时的变异来源（误差）

程序	预防	控制
显微镜未正确清洗或对齐；放大倍数不正确	培训、SOP、设备维护	IQC，EQC
在进行分析前所进行的培训不足	训练	IQC，EQC
没有明确指导方针的主观技术	培训，SOP	IQC，EQC
同行对分类系统的细微影响（可能在分析过程中引起变化）	训练	IQC（控制图）
涂片时精液混合不足	培训，SOP	iqc
涂片准备工作不良。太厚或太薄)	培训，SOP	iqc
染色技术较差。浅、暗或过多的背景染色)	培训，SOP	iqc
评估载玻片边缘的精子	培训，SOP	iqc
试图对不平坦或与其他精子重叠的精子进行评分	培训，SOP	iqc
不是对所有区域的精子进行评分，而是选择精子进行评估	培训，SOP	iqc
染色剂随时间的推移而褪色（用于储存的IQC样品）	培训，SOP	IQC（控制图）
分析后报告（与测试结果的手动或电子报告有关）		
如果不计算100的倍数，计算百分比的错误	培训，SOP	IQC，EQC
多键计数器故障	设备维护	IQC，EQC



表7. 16在评估精子活力时的变异来源（误差）

程序	预防	控制
取样品前，样品混合不当	培训，SOP	重复抽样和评估，IQC
滑动后等待太长时间进行分析（精子很快失去活力）	培训，SOP	重复抽样和评估，IQC
舞台变温器的温度不当。温度过高会杀死精子)	培训、SOP、设备维护	iqc
显微镜未正确清洗或对齐，放大不当	培训、SOP、设备维护	IQC, EQC
缺乏目镜网格的引导	设备	IQC（控制图）
在覆盖物边缘附近进行分析（精子在覆盖物外部5mm附近死亡或变慢）	培训，SOP	重复评估，IQC
使评估过慢（其他精子在评估期间游到指定区域）	培训，SOP	iqc
多键计数器故障	设备维护	IQC, EQC
如果不计算100的倍数，计算百分比的错误	培训，SOP	IQC, EQC
主观偏差。始终过高或过低的运动百分比)	培训，SOP	IQC, EQC
减少运动性的准备程序。温度变化，剧烈混合，毒素污染)	索普	iqc
分析领域的非随机选择；分析中的延迟。等 到运动精子游入田野或网格后才开始分析)	培训，SOP	IQC, EQC

表7. 17评价精子活力时的变异来源（误差）

程序	预防	控制
显微镜未正确清洗或对齐，放大不当	培训、SOP、设备维护	IQC, EQC
染色不当的食谱提供了杀死精子的低渗条件	培训，SOP	与运动的比较
等了太久才能染色	培训，SOP	与运动的比较
干燥的涂片的再水化，如果不直接安装，染色将使污渍泄漏到所有的精子	培训，SOP	与运动的比较
死亡精子的过度加速。被认为是精子头部死亡，有轻微的粉红色染色)	培训，SOP	IQC, EQC
评估颈部带有粉红色染色的精子为死亡	培训，SOP	IQC, EQC



## 第八章附录

8.1 对精液检查结果的解释.....	211
8.2 设备和安全.....	214
8.3 基本射精检查的显微镜检查.....	221
8.4 股票解决方案和媒体.....	226
8.5 精液分析记录表格的模板.....	233
8.6 QC材料.....	235
8.7 国家外部质量控制方案 精液分析.....	246

### 8.1 对精液检查结果的解释

本手册不是作为男性因素不孕症治疗方式的选择的临床决策指南。尽管如此，每个实验室都有责任提供能够促进解释结果的信息。最受欢迎的信息是生育能力和不孕不育之间的分歧。在本手册的前四个版本中，提供了传统的共识限制。在第五版中，提出了在12个月内促成自然怀孕的男性的价值分布；这种分布中较低的第五百分位通常被解释为生育和不育男性之间的真正限制。因此，必须扩大对精液检查结果的解释的概念。

#### 8.1.1 怀孕时间(TTP)一年或以下的男性的结果分布

对第五版(424)中提供的数据进行了进一步的评估，并补充了来自(5)12个国家约3500名男性的数据(见第212页的表8.1、8.2和8.3)。收集来自全球不同地理区域的数据是一项巨大的成就。同样值得关注的是，这些发行版与2010年的汇编并没有太大的不同。新的数据合并甚至更加严格，试图主要只包括最可靠的数据。因此，表8.2中的数据提供了在尝试一年内(TTP12个月)的男性结果分布的信息。较低的五百分位代表了在参考人群中只有5%的男性被发现的水平。这可能有助于解释来自个体患者的结果。

<

需要谨慎，以避免过度解释。参考总体的定义允许一定程度的不一致。这些男性的定义是一对夫妇何时被视为不育：至少一年没有自然的受孕(TTP>12个月)。这意味着参考人群被定义为男性不属于与



TTP超过12个月。然而，一些幸运的夫妇在一年内自然受孕，尽管射精有问题。此外，其他射精完全正常的男性被主要由女性因素归类为不孕不育。这指出了应用二分分类的问题生育必须被认为是一个连续（425）也众所周知，精液检查结果可生育和不育男性(6, 8, 426, 427) 有大量的重叠。

坎贝尔等人使用的数据。（5）可以从<https://doi.org/10.15132/10000163> 免费获得。因此可以由调查人员进行检查，并在适当时添加和重新分析。

表8.1坎贝尔等人对参考人群的定义。(5)

纳入标准	排除标准
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 伴侣自然受孕，确诊TTP12个月</li> <li>• 禁欲的时间在2到7天之间</li> <li>• 实验室技术：                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 遵守2010年世卫组织和遵守本恩达尔、巴拉特、莫蒂默和朱安内特（428）的证据</li> <li>• 内部质量控制</li> <li>• 外部质量评估</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 在不孕症诊所或接受生育评估的男性</li> </ul>

表8.2结果（5）分布的数据来源

该表显示了每个研究的受试者总数，并对应于数据汇编的纳入和排除标准。

研究的起源		
国家	继续	受试者数量
包括2010年世卫组织		
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
自2010年世卫组织以来的新消息		
中国	亚洲	1200
埃及	非洲	240
希腊	欧洲	76
伊朗伊斯兰共和国	亚洲	168
意大利	欧洲	105



表8.3在无保护措施性行为导致自然怀孕的男性精液检查结果分布。坎贝尔等人。(5)；可性的第五百分位数(95%置信区间)

	N	电池板									
		2.5th	5th	(95%CI)	10th	25th	50th	75th	90th	95th	97.5th
精液体积(ml)	3586	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 <sup>6</sup> 每毫升)	3587	11	16	(15 - 18)	22	36	66	110	166	208	254
精子总数 (10个 <sup>6</sup> 每次射精)	3584	29	39	(35 - 40)	58	108	210	363	561	701	865
总运动性 (PR+NP, %)	3488	35	42	(40 - 43)	47	55	64	73	83	90	92
渐进运动 (PR, %)	3389	24	30	(29 - 31)	36	45	55	63	71	77	81
非进行性运动 (NP, %)	3387	1	1	(1 - 1)	2	4	8	15	26	32	38
静止精子(IM, %)	2800	15	20	(19 - 20)	23	30	37	45	53	58	65
活力 (%)	1337	45	54	(50 - 56)	60	69	78	88	95	97	98
正常表单 (%)	3335	3	4	(3.9 - 4.0)	5	8	14	23	32	39	45

## 8.1.2 其他评价精液检查结果的方法

### 8.1.2.1 多参数解释

对于体内和体外活产的一般预测，建议对精液检查结果进行多参数解释（7-9, 427）。这种解释的综合参考限制尚未制定。

### 8.1.2.2 决策限制

男性因素不孕是由于广泛的已知和未知的的原因，这意味着需要对不育夫妇中的男性进行更好的诊断评估。精液检查可能有助于诊断和治疗这类疾病，例如。对于内分泌检查和内分泌治疗的随访，选择患者进行基因筛查，如克兰费尔特综合征、Y染色体微缺失、易位、倒置、囊性纤维化突变和纤毛运动障碍。需要制定此类调查的临床上有用的决策限制。

决策限制是基于临床和统计上的考虑，指出需要某种特定的诊断或治疗干预（429, 430）。

### 8.1.3 基于精液检查结果的男性生育能力研究

参考人群中男性数据的较低五百分位（表8.3）并不代表可生育和不育男性之间的限制。

## 8.2 设备和安全

### 8.2.1 男科实验室需要的基本用品

以下是男科实验室进行本手册中描述的基本测试所需的用品和设备的清单。

如果您需要帮助找到以下任何一种用品的来源，请查阅本手册或其他地方参考的已发表的科学文献。

#### 8.2.1.1 一般设备和用品

- 顶部平衡（用于称重精液罐）
- 具有不透水工作表面的工作台
- 容器：
  - 用于处理尖锐的物品
  - 危险废物
- 实验室生物安全手册（48）的副本
- 深冰箱（-20° C）
- 消毒剂或次氯酸钠，净化水中的0.1%（v/v）和1%（v/v）
- 消毒剂肥皂或消毒剂皮肤洁面剂
- 可拆卸手套
- 洗眼液或洗眼液
- 急救套件
- 用于储存和使用有毒试剂、化学品或染料的通风柜
- 制冷剂
- 淋浴。

## 8.2.12 基本精液检查用品及设备

- 中心信息：
  - 台式离心机能够达到300–500克（用于常规精子处理和尿液）、1000克（用于精液标记物）和2000克（用于粘性样品）。离心机应允许密封桶，以减少气雾胶风险。
  - 高速离心机可达到3000克（用于制备疑似无精子症样本）或16000克（用于获得无精子精浆）。离心机应允许密封桶，以减少气雾胶风险。
- 稀释瓶
- 滤纸，90克/米<sup>2</sup>（用于过滤污渍）
- 血细胞计：改进的纽鲍尔或替代品，100μm深，覆盖物较厚（厚度编号4, 0.44mm）
- 孵化器（37° C）
- 实验室胶膜，自密封，可塑
- 实验室多键计数器（六个或九个键）
- 显微镜载玻片：
  - 带有研磨玻璃或纹理书写面和覆盖物（厚度编号为1.5、0.16–0.19mm）
  - 拉一滴精液在另一滴上做精液涂片
- 笔/铅笔：
  - 在磨砂玻璃片上写字：一支带柔软HB的铅笔（美国评分2）就足够了
  - 永久标记笔
- pH纸（范围6–10）
- 相位对比显微镜（可估计精子浓度、活力、形态）和以下附件（见第221页的附录8.3）：
  - ×10、×20（或×25）、×40（或×63）正相物镜、×100油浸物镜
  - 广视场×10（或×12.5）目镜（眼部）
  - 目镜十字线（用于判断扫描的运动区域）
  - 阶段微计（精子形态测量）
  - 加热阶段（可选的，但强烈推荐；用于测量精子速度）



- 移液管和移液管提示：
  - 巴斯德乳液滴器移液管，或塑料一次性转移移液管，或混合精液的自动移液管
  - 空气置换移液管
  - 正移位移液管测量10-100 $\mu$ l
- 精液和黏液分析结果记录表（见第232页附录8.5）
- 样品混合物：
  - 混合精液的二维摇床或旋转轮（可选）
  - 稀释和固定精液的涡旋混合器
- Semen收集容器：
  - 一次性大口容器
  - 斑板、陶瓷或硼硅酸盐玻璃（用于伊红黑敏试验）
- 组织纸，无线。

### 8.2.13 可选设备

- 称重化学品的分析平衡
- 低温保存设备（可选）
- 避孕套，无杀精剂，无毒（可选）
- 荧光显微镜和物镜（可选；用于高灵敏度精子浓度测量、顶体反应试验）
- 孵化器（37 $^{\circ}$  C），具有可控的%（v/v）CO<sub>2</sub>（可选）
- 光度计（可选；活性氧(ROS)测定法）
- 铅笔：蜡脂笔（分隔笔）（可选；用于限制抗体溶液在载玻片上的面积）
- pH(ISFET)电极（可选；用于粘性精液样品）
- 显微镜设备
- $\times$ 40阴性相目标（可选；伊红活力试验）
- 英格兰查找器（带网格的玻璃滑块；可选；用于质量C评估）
- 96孔板的密封带（可选；果糖测定）



- 一次性滑动室（可选；用于QC样品制备）
- 分光光度计（可选；精液生物化学测定法）
- 阶段微计（可选；用于精子形态测量）
- 时间发生器（可选；用于QC样品准备）
- 暖板、台面（可选；用于运动评估的预热滑梯）
- CASA机器（可选）。

### 8.2.14 化学物质

- Papanicolau染色（推荐）
- 抗体（可选的，白细胞用CD45）
- 防发泡剂（可选；QC样品制备）
- 细胞过氧化物酶试剂盒（可选）
- 冷冻保护介质（可选）
- 密度梯度培养基（可选；用于精子制剂）
- 半乳糖试验试剂盒（可选）
- 中性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶检测试剂盒（可选）
- 石油果冻（可选）
- 快速染色试剂盒（可选；精子形态）
- 蜡（熔点48-66°C）（可选）
- 锌测定试剂盒（可选）。

### 8.2.2 计算离心力

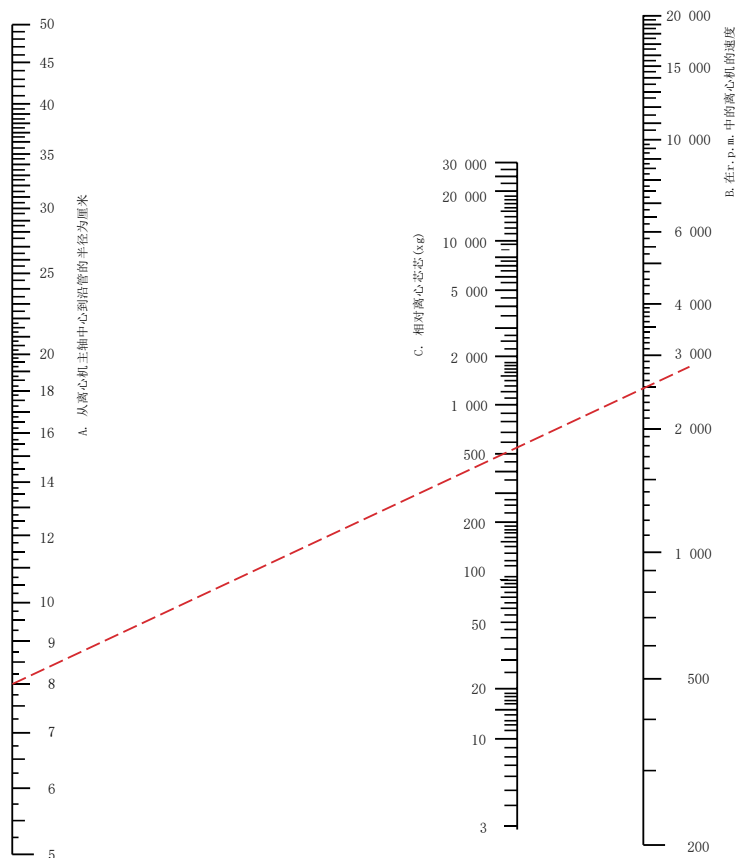
离心过程中精子受到的力（相对离心力，RCF）取决于旋转速度（每分钟N转、rpm）以及从转子中心到测量力点的距离（通常在离心管底部）（半径、R、cm）。RCF的计算公式为： $1.118 \times 10^{-4} \times R \times N^2$ 。例如，其转子半径为8.6cm，5000rpm离心产生2404g的力；转子半径为13.5cm，3900rpm离心产生2296g。图. 8.1是从转子半径和转速中确定RCF的列线图。





图. 8.1根据转子半径和转速确定离心力的离线图

连接转子半径 (cm、左轴) 和转速 (rpm、右轴) 的直线在RCF处与中间轴相交。在本例中，半径为8cm，转速为2500rpm，给出约为550g的RCF。（计算值为559克）



### 8.2.3 男科实验室的潜在生物危害

人体体液，如精液，具有潜在的传染性，应特别小心处理和处置。对于男科实验室来说，在精液中可能发现的最重要的感染性微生物是艾滋病毒和乙型和丙型肝炎病毒 (HBV 和 HCV)。实验室人员应认为所有生物样本具有潜在传染性，并在处理时适当谨慎。

### 8.2.4 实验室人员的安全程序

- 一般建议是，从事人类样本工作的实验室人员应进行乙肝免疫。
- 任何人不得在男科实验室进食、喝酒、吸烟、使用化妆品或储存食品。
- 不应允许用嘴移动。机械移液装置应始终用来操作液体。



- 所有实验室工作人员都应穿仅限于实验室的实验室服装（外套、一次性长袍或其他专门用于实验室工作的服装）。他们应戴一次性手套（橡胶、乳胶或乙烯基，含或不带粉末），特别是在处理新鲜或冷冻的精液、精浆或其他生物样本以及已经接触过他们的任何容器时。工作人员离开实验室或使用电话、电脑或其他设备时，必须拆除丢弃手套。手套不应该被重复使用。
- 人员应定期洗手，特别是在离开实验室前、处理标本后和脱袍和手套后。
- 工作人员应采取预防措施，防止可能被精液污染的尖锐仪器意外受伤，并避免精液与开放性皮肤接触、伤口、擦伤或损伤。
- 应采取措施防止，必要时遏制精液、血液或尿液样本的溢出。
- 所有尖锐的物体（针头、刀片等）使用后应放置在一个有标记的容器中。该容器在装满前应进行密封，并以与其他危险的实验室物品相同的方式进行处理。
- 所有潜在危险处置物品（手套、精液容器）应收集并妥善处理。
- 所有执行可能产生气溶胶或液滴的工作人员都应佩戴口罩或手术口罩。打开的容器的涡旋和离心。最后一滴精液标本不应被强行从移液管中排出，因为这可能会导致形成液滴或气溶胶。
- 必要时应戴防护护目镜、绝缘手套、冷冻围裙和封闭鞋。当使用液氮时（第220页上的第8.2.6节）。重要的是，这些都有正确的尺寸，以适合工作人员。

### 8.2.5 实验室设备的安全规程

与精液或其他生物样品接触的工作表面或非一次性容器应进行消毒或消毒。必须执行以下步骤。

#### 8251 每天，在完成分析后：

- 用消毒剂清洗工作区，例如。次氯酸钠0.1%（1克/升钠）或类似的消毒剂，等待至少1小时（或过夜），然后用水冲洗消毒剂。
- 将计数室和覆盖物浸泡在0.1%（1g/L）次氯酸钠或类似的消毒剂中过夜。用水冲洗掉消毒剂。



### 8.2.5.2 漏油后

- 如果样品容器的外部受到污染，则用消毒剂清洗。次氯酸钠0.1%（1g/L）或类似的消毒剂，然后用水冲洗。
- 发生泄漏后，立即用消毒剂清洗桌面。次氯酸钠1.0%次氯酸钠（10g/L）或类似消毒剂，请等待至少4小时，然后用水冲洗消毒剂。

### 8.2.5.3 精液收集血管中艾滋病毒的热灭活

必要时，可以通过以下方法实现精液收集血管中艾滋病毒的热灭活：

- 在170° C (340° F) 下干热杀菌至少2小时：加热前盖上铝箔，处理前冷却；
- 在高于大气压力101kPa（15psi或1大气）的121° C (150° F) 下进行蒸汽灭菌（高压釜）至少20分钟；
- 连续煮沸20-30分钟。

### 8.2.6 处理液氮时的安全注意事项

- 液氮是危险的。务必小心处理，只使用经批准的储罐，不要试图密封容器。用钳子抽出浸在液氮中的物体。
- 用面罩或安全护目镜保护眼睛，用绝缘手套保护眼睛的手，带冷冻围裙的身体，以及带闭鞋的脚。这些产品必须在需要的尺寸范围内提供，以正确适合在该地区工作的工作人员。
- 当液氮溢出在一个表面时，它倾向于完全覆盖它，从而冷却很大的面积。在室温下软柔韧的物体在液氮温度下通常变得硬脆。
- 极低会造成严重伤害。皮肤上的溢出会产生类似于烧伤的效果。从液体中释放出来的气体非常冷。脆弱的组织，如眼睛的组织，即使是短暂暴露于气体，这可能不会影响面部或手的皮肤。
- 远离沸腾和飞溅的液氮，并释放冷气体。当温暖的容器充电或物体插入液体时，总是会发生沸腾和飞溅。始终缓慢地执行这些操作，以尽量减少沸腾和飞溅。
- 避免接触非绝缘的管道。永远不要允许身体的任何未受保护的部分接触含有液氮的管道或容器。极冷的金属可能会粘得很快，当人们试图分离它时，肉就会被撕裂。
- 在通风良好的区域工作。少量的液氮形成大量的气体（在室温下，约为其液体体积的700倍）。



如果氮气从一个封闭的房间里的液体中蒸发，空气中氧气的百分比可能会变得很低，并造成窒息的风险。氧气探测器，在氧气水平低于17%(v/v)时触发警报，可用，应在储存液氮的地方使用。

- 只使用液氮冷冻的管和吸管。应该时刻小心，即使这些也会在变得温暖时爆炸。
- 所有参与液氮低温程序的工作人员都应接受适当的培训。对于负责该领域的领导，这应包括来自外部机构或液氮设备供应商的相关培训。

## 8.3 基本射精检查的显微镜检查

### 8.3.1 背景

特定显微镜的最佳信息来源是制造商手册，其中应该包括一个识别所有部件的图表。如果没有这样的手册，就可以从互联网搜索中获得有关显微镜设置和使用的信息。

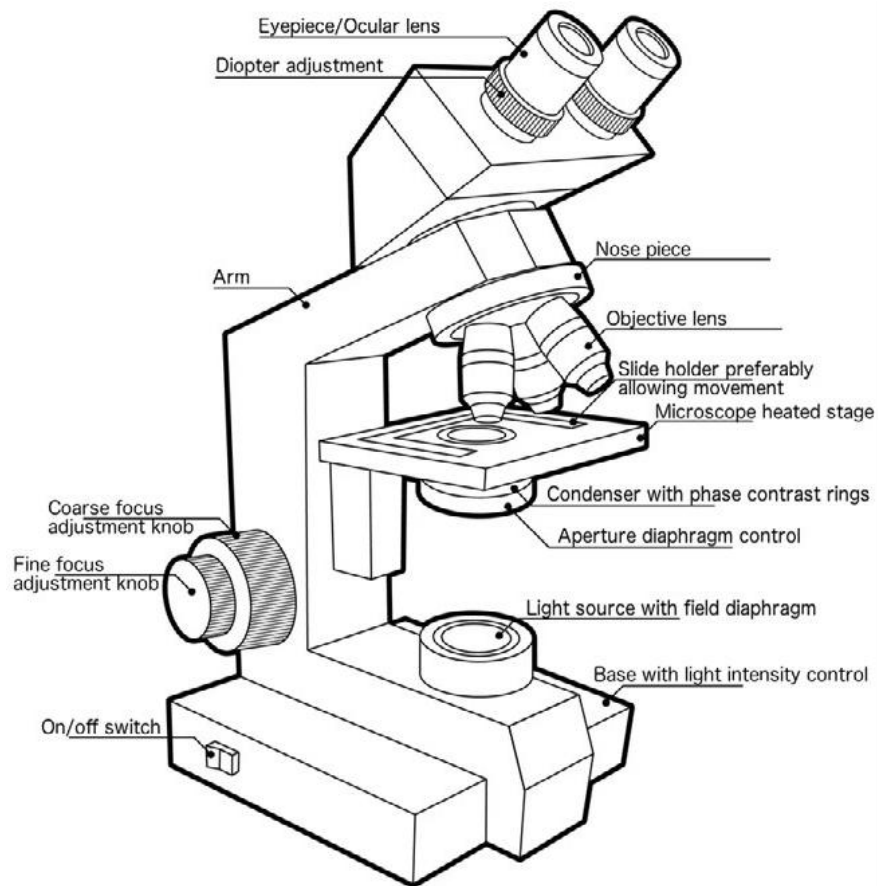
对于本手册中描述的精液评估，建议使用相位对比显微镜。该显微镜最好是双目镜（有两个目镜），带有相位冷凝器，并应配备 $\times 10$ 、 $\times 20$ （或 $\times 25$ ）和 $\times 40$ （或 $\times 63$ ）阶段目标（用于精子和非精子细胞的一般评估、活力和计数），以及亮场 $\times 100$ 油浸目标（用于形态和活力的评估）。

- 物镜的质量和价格差别很大。更昂贵的目标可以提供更好的形象，但较低质量的目标可能就足够了。应该考虑到，有了高质量的目标，实验室工作可以对人员的眼睛造成更小的压力。
- 眼镜眼圈（网状、网格、目镜微米）是已知尺寸的玻璃盘，通常为5毫米或10毫米，或刻有各种形式的网格。有些眼圈有永久安装的眼圈；其他的可以拧开，以便插入十字线。它们有不同的直径，应该与眼部的直径完全匹配。它们可以用舞台微米进行校准，以确定精子的尺寸。它们还被用来限制评估精子活力的田间面积。如图所示。2.4在第27页和图。8.4第239页是一个 $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 网格，在 $\times 20$ 和 $\times 40$ 放大下是一个良好的运动评估尺寸。一些技术人员也更喜欢用 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 网格来估计浓度或评估形态。
- 舞台微米是一种改良的显微镜载玻片，表面刻有刻垢，通常分为1毫米和 $10\mu\text{m}$ 的细分。它可以用来校准目镜微米或十字线网格，并测量尺寸。运动分析（图。8.5第239页）。



下面描述的程序将确保显微镜上的最佳图像。如果光路正确对齐和调整，图像将清晰、清晰，不太可能引起眼睛疲劳。在使用新的显微镜或图像质量较差时，需要执行以下程序。

图8.2 一个显微镜的切片



### 8.3.1.1 目标透镜

每个显微镜镜头都有相关的信息，例如：

UPlanFl	平面Apo	计划纽夫卢尔	计划	S流体
20×/0.80 Immcorr	40×/0.75 博士2	100×/1.35 油虹膜	100×/1.25 石油博士3	20×/0.75∞/0.17
160/0.17	∞/0.17	∞/-	∞/0.17 WD1.0	

平面图：一个平面透镜，允许一个平面的视野，其中一切都在聚焦中

促脂细胞生成素：一种对色差进行高度校正的非色差透镜

F、F1、FL、Neofluor、Fluo、荧光、紫外、S-Fluor：一种能传输紫外线的透镜，用于荧光显微镜

100×、63×、40×等。：镜头的放大倍数

0.30、0.50、0.80、1.30、1.40等。：镜头的数值孔径(NA)。这是透镜的集光能力的一个指示。结合所使用的光的波长，NA决定了分辨率（两个物体之间可以单独区分的最小距离）。选择最高的NA以获得最佳的分辨率。

Ph、Ph1、Ph2、Ph3、NP、N：表示一个有相位环的透镜。Ph表示正相环，NP或N表示负相。Ph1、Ph2和Ph3透镜在冷凝器中都需要一个不同的相环。正相位对比光学允许看到细胞内结构（用于湿准备和运动），而负相位对比光学在黑暗背景下产生白色图像（用于湿制备活力或CASA）。

**Imm、浸没、油、W：表示透镜与物体和透镜之间的油相工作，以提供更清晰的图像。（如果没有指示，则镜头为“干”，不应与液体一起使用。）**

虹膜：表示由滚花环控制的镜头。

表示带有滚花矫正项圈的镜头，允许使用不同折射率的浸泡介质。

160、∞：目镜与物镜之间的管的长度或距离。这过去通常是160毫米，但在大多数现代镜头是无限的（∞）。

0.17，-：目标所需的覆盖物的厚度。保险单号

1.5（厚度0.16-0.19mm）对大多数用途都很有用。血细胞计需要覆盖物4（厚度0.44mm）。“-”意味着覆盖物的厚度不重要，或者浸没液可以直接添加到载玻片中。

WD：工作距离-当样品清晰聚焦时，从物镜的前透镜元件到覆盖物的最近表面的距离。WD通常随着放大倍数和NA的增加而减小，导致镜头的工作距离正常（NWD，高达5mm）、长（LWD、5.25-9.75mm）、超长（ELWD、10-14mm）和超长（SLWD，15-30mm）。一些显微镜可能需要一个LWD镜头与改进的纽鲍尔室一起使用。

折射率指数：光通过介质时的相位阻滞程度。真空的折射率(RI)约为1.0000 1.0（1.0008），水为1.33，甘油为1.47，大多数浸没油为1.515。干燥后的安装介质的RI（1.488 - 1.55）与玻璃（1.50 - 1.58）相似。

## 8.3.2 调整显微镜

### 8.3.2.1 加载样品或舞台微分计以正确聚焦

1. 将10μl载液放在显微镜载玻片上，盖上22mm×22mm(厚度1.5, 0.17mm)，将载玻片放在舞台上。你也可以使用舞台微米，而不是载玻片来调整显微镜。

2. 打开灯，调整它的强度，给予最大的对比，同时舒适的眼睛。





注：如果显微镜是三目镜的。有第三个眼部，可以连接摄像机用于摄影或录像)，将有一个光偏转旋钮，通常位于目镜的右边。这个旋钮可能有三种设置：一个允许所有的光线进入目镜；一个允许所有的光线进入相机；第三个将一半的光线转移到目镜，一半转移到相机。

3. 选择×10正相物镜。旋转冷凝器轮，以对应于所选物镜的功率。

### 8322 调整插座

通过将眼罩分开或将它们推在一起，可以自行调整眼罩（目镜）之间的空间。

### 8323 聚焦图像

1. 旋转粗焦点调整，使舞台尽可能接近×20或×40物镜。为了避免打破物镜和幻灯片，从前面或侧面看物镜和舞台，而不是通过目镜。使用粗焦点来调整舞台的高度，使幻灯片几乎与目标接触。注意，必须以哪种方式转向粗焦点来降低远离目标的阶段。
2. 透过两个目镜，慢慢地转动粗焦点调整，逐渐使舞台远离目标，直到样品接近聚焦。使用微调旋钮来实现最佳的聚焦。



注：如果很难找到焦点，试着聚焦在幻灯片的磨玻璃末端，以接近正确的焦平面。

### 8324 聚焦于筒状体

在一些显微镜下，这两个眼骨可以独立聚焦。对于其他的眼睛，一个眼睛是固定的，另一个眼睛可以聚焦。

1. 可调眼骨通常用“+0/-”量尺标记。在开始此过程之前，将眼部调整为“0”。
2. 如果一只眼固定，只透过固定眼观察（闭合或覆盖另一只眼睛）。
3. 使用聚焦调整聚焦标本图像。将重点关注一个非移动的物体、e.g. a死精子、尘埃颗粒或舞台微米网格。
4. 通过观察可调节的眼睛，闭上或覆盖眼睛来聚焦固定的眼睛。将目镜底部的滚花环旋转到“+”或“-”，直到焦点适合你的眼睛。



### 8.3.2.5 聚焦光冷凝器

1. 关闭现场隔膜（位于显微镜底部的光源）。
2. 使用冷凝器装置左右的小旋钮升起或降低冷凝器，直到隔膜的边缘处于尽可能清晰的聚焦，光的圆小而清晰。这个位置通常会在冷凝器处于最顶部的位置时实现。随着冷凝器的聚焦（色差），光图像的边缘可能从蓝色变为红色，并且冷凝器的边缘将保持轻微模糊。光可能有中心，也可能没有中心。



注：如果视场孔圈没有虹膜隔膜，则聚焦于一个尖锐的物体。放在光源上。

### 8.3.2.6 冷凝器的中心

1. 用冷凝器中心旋钮控制现场隔膜。这些通常是两个（通常是滚花的）旋钮，从冷凝器下面的前面或侧面沿对角线伸出。
2. 一旦光图像为中心，打开场膜，这样光就填充视场。不要打开超过该点的现场隔膜。
3. 关闭冷凝器的孔径，直到眩光消失。

### 8.3.2.7 调整相位环

这是通过使用中心望远镜来完成的，可从显微镜制造商获得。

1. 查看冷凝器中使用的适当的相环。
2. 取下一个目镜，并用对心望远镜更换。用一只手握着中央望远镜的底座，用另一只手旋转顶部，从而聚焦聚焦望远镜的环。转动它，直到两个环处于清晰的焦点处：一个环为暗（相环），另一个光（光环）。
3. 通过转动位于相位冷凝器上的相位调整旋钮来对齐这些环，使它们呈同心圆。这些旋钮通常位于冷凝器的背面。
4. 用眼科显微镜代替对距望远镜。

### 8.3.2.8 荧光显微镜

使用Hoechst33342染料（3.1节在83页）和FITC标记凝集素（144页4.2.2节在144页）采用荧光显微镜检测精子核。Hoechst33342染料和FITC的激发光谱最大值为346nm和





相应的发射最大值分别为460nm和520nm。需要一个荧光透镜（第222页上的第8.3.1.1节）。每种型号的显微镜都将有作为可选的购买设备，包括检查这些染料所需的一套二色镜和过滤屏障。

## 8.4 股票解决方案和媒体

对于所有的溶液，提供纯化的水(蒸馏、双蒸馏或去离子的H<sub>2</sub>O体外精子功能测试需要O)（对于用于辅助生殖组织的培养基，应使用培养级水）。在本版本中，基于已知的对精子、精子功能和可能与（431）分析方法的交互作用的负面影响，不建议使用Ham的F10培养基。

每当处理精子时，pH(通常是pH7.4)和培养基的渗透压都是至关重要的。

### 8.4.1 培养基pH缓冲液

培养基的pH可以通过使用缓冲分子，最常见的是HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)，或一个标准的25mm碳酸氢盐缓冲系统来控制。碳酸氢盐缓冲与活组织中的酸碱稳态机制是相同的平衡：即二氧化碳(CO<sub>2</sub>)与水(H<sub>2</sub>O)发生反应<sup>11</sup>形成碳酸(H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)，它反过来迅速解离形成一个碳酸氢盐离子(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)和一个氢离子(H<sup>+</sup>)，如如下平衡反应所示：



在与正确的CO<sub>2</sub>百分比平衡时，在培养基中加入25mm的碳酸氢盐<sub>2</sub>允许pH在介质中被夹住/缓冲。

应该注意的是，正确的正确百分比<sub>2</sub>要获得pH7.4，取决于CO<sub>2</sub>的分压<sub>2</sub>因此，最值得注意的是，随海拔距离而变化。5%CO<sub>2</sub>因此，经常引用只在海平面相关，以及pCO<sub>2</sub>的当地调整（补偿）<sub>2</sub>(通过CO<sub>2</sub>的百分比<sub>2</sub>)，以实现正确的pH（432）。

### 8.4.2 构成媒体和渗透压

渗透压或渗透压一种培养基对其内部任何细胞的行为都是至关重要的。因此，如果任何媒体是内部媒体，这是必须考虑的一个关键变量。对于购买的任何商业媒体，也应始终要求/指定。

精子培养基（低渗透膨胀试验溶液除外）标准为280-295mOsm（m摩尔）。为了用所述的配方来实现这一点，通常制造最终体积，然后缓慢加入过量的成分，直到达到正确的渗透压，通常是无水氯化钠。这将是渗透计是首选的选择

<sup>11</sup> 每体积溶剂的渗透粒子。

<sup>12</sup> 每一质量的溶剂中的渗透粒子。当溶剂是水时，渗透压和渗透压基本相同。



这些测量。所提供的配方建议“配制多达1000毫升”，以便在没有渗透计的情况下可能会非常接近。

然而，必须记住的是，在标本容器中收集并供液化的射精液在体外渗透压迅速增加。体外精子适应增加的渗透压，这意味着将适应精子暴露于渗透压为280-290mOsm的培养基中会导致精子产生相对低渗透休克，从而降低DGC (147) 的运动性和产量。

### 8.4.3 化学品/介质成分规范

化学品在购买时最常见的水合水平。有些，例如CaCl<sub>2</sub>，可以在不同的水合水平(即。无水CaCl<sub>2</sub>；CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O；和CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)。如果使用不同的水合作用，则必须相应地调整测量的重量，以达到正确的摩尔浓度。同样重要的是要注意，这些化学物质中有许多是吸湿性的，所以它们的正确储存是至关重要的，应该尊重保质期，否则就会导致不正确的介质。

预计用于这些检测的化学物质在可用时至少为细胞培养级。

所列出的许多培养基都需要添加血清。诊断介质的通常建议是牛血清白蛋白(V部分)，通常作为干粉提供，因为它提供了一种更便宜、稳定和广泛使用的人血清替代品。对于像顶体反应这样的分析，正在评估功能影响，血清应始终是无脂肪酸/木炭释放，以增加批一致性，避免激素等污染物的影响。分批检测应在常规进行这些检测的实验室中进行。

如果要用精子进行治疗，那么经过筛选的人血清(通常作为液体提供)应始终用于体内使用。必须遵循相关的存储条件和限制。

配方中含有酚红的培养基添加了pH简单的有用指标，有助于视觉识别主要的pH变化。如果要进行荧光分析，那么通常建议省略苯酚红，因为它增加了精子细胞和培养基的背景荧光。

### 8.4.4 比格斯、惠顿和惠廷汉姆(BWW)

#### 8.4.4.1 BWW库存解决方案(433)

1. 在1000ml纯化水中加入5.54克氯化钠(氯化钠)、0.356克氯化钾(氯化钾)、0.294g七水合物硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)，0.250克二水合物氯化钙(氯化钙<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)和0.162g磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。
2. 用1mol/L氢氧化钠(氢氧化钠)将pH调整至7.4。
3. 每升添加1.0ml(0.04%、0.4g/L)苯酚红。

该解决方案可以在4°C上存储几周。



#### 8.4.4. 2BWW工作解决方案

在使用的当天：

1. 补充100毫升原溶液与210毫克碳酸氢钠 ( $\text{NaHCO}_3$ )、100mgd-葡萄糖、0.37ml60%(v/v)乳酸钠糖浆、3mg丙酮酸钠、350mg牛血清白蛋白(V部分)、10 000 单位青霉素和10mg硫酸链霉素。
2. 在5%(v/v)CO的气氛中使用前加热至 $37^\circ\text{C}$ ，95%(v/v)空气。
3. 空气孵育：加入20mmol/LHEPES (Na盐：5.21g/L)，降低 $\text{NaHCO}_3$ 到10mmol/L (28)。

#### 8.4.5 杜尔贝克氏磷酸盐缓冲盐水 (DPBS)

1. 杜尔贝克葡萄糖-PBS：向750毫升纯水加入0.2克氯化钾（氯化钾）、0.2克磷酸二氢钾（磷酸一钾）、0.1克六水氯化镁 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )，8.0克氯化钠（氯化钠），2.16g七水合磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 和1.00gd-葡萄糖。
2. 溶解0.132g二水合物氯化钙 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 在10ml纯水中，搅拌缓慢加入上述溶液。

为防止沉淀，分别缓慢搅拌加入氯化钙。

3. 用1mol/L（等于1M或1N）氢氧化钠（氢氧化钠）将pH调整至7.4。
4. 用纯化的水配制多达1000毫升。

如有需要，在使用前每100毫升添加0.3g牛血清白蛋白(V分数)。

#### 8.4.6 厄尔氏平衡盐溶液 (EBSS)

1. 在750ml的纯化水中加入6.8克氯化钠（氯化钠）、2.2克碳酸氢钠 ( $\text{NaHCO}_3$ )，0.14g一水合磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )，0.4g氯化钾（氯化钾），0.20g七水合硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 和1.0g的d-葡萄糖。
2. 搅拌缓慢溶解0.23g氯化钙 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 在上述溶液中。
3. 用1mol/L盐酸（盐酸）或1mol/L氢氧化钠（氢氧化钠）将pH调整至7.4。
4. 用纯化的水配制多达1000毫升。
5. 空气孵育：加入20mmol/LHEPES (Na盐：5.21g/L)，降低 $\text{NaHCO}_3$ 到10mmol/L（莫蒂默和莫蒂默，2014年）。



### 8.4.7 补充了Earle的平衡盐溶液 (sEBSS)

1. 在750ml的纯化水中加入6.8克氯化钠（氯化钠）、2.2克碳酸氢钠（ $\text{NaHCO}_3$ ），0.14g一水合磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ），0.4g氯化钾（氯化钾），0.20g七水合硫酸镁（ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）和1.0g的d-葡萄糖。
2. 搅拌缓慢溶解0.23g氯化钙（ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）在上述溶液中。
3. 加入3g牛血清白蛋白（V部分）。
4. 加入0.30g丙酮酸钠。
5. 加入乳酸钠（通常为D钠，L-乳酸糖浆），最终浓度为19mM。
6. 用纯化的水配制多达1000毫升。

### 8.4.8 人输卵管液 (HTF)

来自Quinn等人的原始配方。(434):

1. 在750ml纯化水中加入5.931g氯化钠（氯化钠）、0.35克氯化钾（氯化钾）、0.05g七水化硫酸镁（ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ），0.05g磷酸二氢钾（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ），2.1克碳酸氢钠（ $\text{NaHCO}_3$ ），0.5gd-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的乳酸钠（60%（v/v）糖浆）。<sup>13</sup>
2. 在1ml上述培养基中加入10 $\mu\text{g}$ 酚红、100U青霉素和50 $\mu\text{g}$ 硫酸链霉素。
3. 用1mol/L盐酸（盐酸）将pH调整至7.4。
4. 用纯化的水配制多达1000毫升。
5. 空气孵育：加入20mmol/LHEPES（Na盐：5.21g/L），降低 $\text{NaHCO}_3$ 到10mmol/L。

### 8.4.9 三缓冲盐水 (TBS)

1. 在750ml纯化水中加入6.055g三碱和8.52g氯化钠（氯化钠）。
2. 用1mol/L盐酸（盐酸）将pH调整至8.2。
3. 用纯化的水配制多达1000毫升。

<sup>13</sup> 一些已发表的配方使用乳酸钙作为乳酸来源(29)。



### 8.4.10 蒂罗德的溶液

1. 在750毫升纯水中加入0.2g无水氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )，0.2g氯化钾(氯化钾)，0.05g磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )，0.2g六水合氯化镁(氯化镁 $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )，8.0克氯化钠(氯化钠)，1.0克碳酸氢钠(碳酸氢钠 $_3$ )和1.0g的d-葡萄糖。
2. 用1mol/L盐酸(盐酸)或1mol/L氢氧化钠(氢氧化钠)将pH调整至7.4。
3. 用纯化的水配制多达1000毫升。
4. 如有需要，在使用前每100毫升添加0.3g牛血清白蛋白(V分数)。

### 8.4.11 巴巴尼科拉染色

市售的染色通常令人满意，但染色可以在实验室制备。



注：配制不同等级乙醇前，检查纯水的酸度。pH应该是7.0。

#### 84111 EA-36 (相当于EA-50)

##### 组成部分

伊红Y (颜色指数45380)	10 g
俾斯麦棕色Y (颜色索引21000)	10 g
浅绿色SF, 淡黄色 (颜色指数42095)	10 g
BUR纯化水	300ml
SBAR乙醇95% (v/v)	2000ml
SWAR磷酸化合物酸	4 g
饱和碳酸锂水溶液 (>1.3g/100ml)	0.5ml

##### 库存溶液

将每种污渍分别配制成10% (100克/L) 溶液，处理方法如下：

1. 将10克伊红Y溶解在100毫升纯化水中的伊红Y。
2. 将10g俾斯麦棕色Y溶解在100ml纯化水中。
3. 在100毫升纯化水中溶解10g浅绿色SF。

##### 准备

1. 要制备2升染色剂，混合上述原溶液如下：

50ml 伊红Y



10毫升俾斯麦棕色Y

12. 5ml浅绿色SF。

2. 用95% (v/v) 乙醇配制多达2000毫升。

3. 加入4g磷钨酸。

4. 加入0.5ml饱和碳酸锂溶液。

5. 搅拌均匀，在室温下储存在深棕色盖紧的瓶子中。



注1：该解决方案可稳定2-3个月。



注2：在使用前要通过一个0.45- $\mu$ m的过滤器。

### 84112 橙色G6

组成部分

橙色G晶体（颜色指数16230）	10 g
BUR纯化水	100ml
12月95% (v/v) 乙醇	1000ml
SWAR磷酸化合物酸	0.15 g

库存溶液编号1（橙色G6, 10%（100g/L）溶液）

1. 溶解10g的100毫升纯化水中的橙色G晶体。

2. 摇得很好。在室温前在深棕色或铝箔瓶中放置1周。

库存溶液编号2（橙色G6, 0.5%溶液）

1. 在50ml1号原溶液中加入950ml95% (v/v) 乙醇。

2. 加入0.15g磷钨酸。

3. 混合良好。室温下深棕色储存在或铝箔盖的塞瓶中。



注1：使用前应先进行过滤。



注2：该解决方案可稳定2-3个月。

### 84113 哈里斯的苏木精，不含醋酸

组成部分

苏木精（暗色晶体；颜色指数75290）



- 95% (v/v) 乙醇
- 十二碳水化合物硫酸铵 $(S_4O_2) \cdot 12H_2O$
- 氧化汞（氧化汞）。

#### 准备

1. 加热将160g硫酸铝解入1 600 ml纯水中。
2. 用80ml95% (v/v%) 乙醇溶解8克苏木精晶体。
3. 将苏木精溶液加入到硫酸铝铵溶液中。
4. 加热混合物至95° C。
5. 将热中取出混合物，搅拌时慢慢加入6g氧化汞。



注：溶液的颜色将为深紫色。

6. 立即将容器放入冷水浴中。
7. 当溶液变冷时，过滤过滤器。
8. 在室温下储存在深棕色或铝箔盖的瓶中。
9. 在使用前允许站立48小时。
10. 用等量的净化水稀释所需的量。
11. 再次过滤器。

#### 84114 斯科特的自来水替代品的解决方案



注：只有当普通自来水不足以返回蓝色时，才使用Scott的溶液；它应该经常改变，例如。冲洗20-25张幻玻片后。

#### 组成部分

- 3.5克碳酸氢钠(碳酸氢钠<sub>3</sub>)
- 20.0g七水合硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
- 几种百里香酚晶体（如需要作为防腐剂）
- 1000ml纯化水。



## 84115 酸乙醇溶液

组成部分:

- 300毫升乙醇，99.5% (v/v)
- 2.0毫升浓盐酸（盐酸）
- 100毫升的净化水。

## 8.5 精液分析记录表格的模板

下面的示例记录表单是作为一个模型提供的。它允许使用本手册中描述的方法记录在精液检查过程中进行的观察结果。它还包括派生变量，这是来自主要数据的结果的组合。为了实现可追溯性，应记录哪些工作人员执行了整个程序的哪一部分，从接待病人、检查到检查后的计算和报告结果。

样本记录表单有多列，用于记录在不同时间进行的精液检查结果。这是一种方便的精液检查方法。在表单的某些部分添加额外的空间可能很有用，以便记录注释和无法编码的观察结果。如果可用和适用的决策限制，用方括号给出。

表8.4精液分析报告表单的示例模板

患者姓名	日期			
出生日期, 其他身份证明	示例ID			
转诊诊所/临床医生/转诊日期				
来自患者的信息	禁欲日			
收集	在实验室? Y/N			
完整的收集	如果没有, 则缺少什么?			
收集时间	hour: minute			
样品如不在实验室采集	hour: minute			
过去6个月是否有严重的感染/炎症性疾病? 治疗严重或慢性疾病的药物治疗?				
邻接体积 (ml)	射精净重量			
考试开始了	hour: minute			
考试时间	hour: minute			
射精检查-宏观检查				
外观 (1、正常、2、异常)				
粘度 (1、正常、2、异常)				





液化 (1, 正常; 2, 异常 (分钟))			
治疗方法 (例如。以诱导液化作用)			
射光镜检查			
聚集物 (0、无、1、一些、2、很多)			
凝集作用			
pH			
精子数量			
总数 ( $10^6$ 每次射精)			
浓度 ( $10^6$ 每毫升)			
如果计数数小于400个单元格, 则出现错误 (%)			
移动性			
快速进行 (a) (%)			
缓慢进行 (b) (%)			
非进步 (c) (%)			
运动 (d) (%)			
总移动量 (+b+c) (%)			
所有进行性 (+b)			
活力			
活力 (当<40%运动时) (%活)			
形态学			
正常形式 (%) (或典型或理想)			
头异常 (%)			
中块异常 (%)			
尾异常 (%)			
多余的残余细胞质 (%)			
成人精子症指数 (TZI)			
非精子细胞			
过氧化物酶阳性细胞, 浓度 ( $10^6$ 每毫升)			
附件腺功能			
锌 (每次射精时为 $\mu\text{mol}$ ) <sup>2</sup>			
果糖 (每次射精时的 $\mu\text{mol}$ ) <sup>2</sup>			
$\alpha$ -葡萄糖苷酶 (中性) (mU/射精) <sup>2</sup>			
任何额外的评论			
审查结果经批准发布			

## 8.6 QC材料

### 8.6.1 生产精液样品以进行质量控制

QC标本理想应能代表实验室处理的精液标本的范围。如果只需要分析少量的QC样品，则应为与实验室的主要活动最相关的样品。例如，在不孕症服务的实验室中，临床显著的范围(浓度 $15 \times 10^6$ – $50 \times 10^6$ 每ml，可以选择渐进性运动30–50%，正常形态低于5%)。

- 汇集精液样本的等分可以用4° C冷冻保存剂保存，并每隔分析精子浓度(239页第8.6.3节)。
- 精子动物可能不能很好地存活于低温保存，不能作为用于活力和精子抗体测试的内部和外部QC材料的有用来源。
- 以与日常运动评估相同的分辨率和放大率获得的视频剪辑可以分发给在已建立的媒体上(例如。DVD, CD, 记忆棒)或通过从互联网上的来源流媒体。对于后者，重要的是，带宽和连接允许不间断的下载与足够的分辨率和放大。
- 照片和视频剪辑可用于精子形态。
- 视频记录对于运动性和形态学评估的训练特别有用，但它们的使用应该补充，而不是取代，对精液标本的重复评估。
- 染色的精液片可用于形态学QC。固定的涂片也可以储存和用于监测染色。染色的载玻片可能会随着时间的推移而恶化，这取决于固定或染色程序的质量。然而，使用本手册中描述的巴氏氏程序染色并在室温下黑暗中保存的载玻片应持续数月甚至数年。
- 精子抗体阳性血清可用于间接IB检测的QC，但不推荐用于直接IB检测。

### 8.6.2 对精子活力分析的内部质量控制的录像记录的准备

本方案描述了如何准备用于手动运动评估程序的录像。

- 记录至少5个领域，以模拟在精液评估期间评估的运动性的多个领域分析，并允许至少400个精子被评估。
- 视频记录应该包含来自几个不同精液样本的图像，包括在常规精液评估中常见的运动范围。
- 录像可以简单地有几个不同的精液标本的五个区域；在其他情况下，可能需要更复杂的记录，例如。用于



在实验室之间或在多中心研究中的标准化。在这种情况下，可能会使用更多的精液样本，并且这些样本可以在整个录像过程中随机重复。重复的样本可以估计医生内的精度。

### 8.6.21 附加设备

除了估计运动性的常规设备外，QC记录的准备还需要从良好的相位对比显微镜观看视频剪辑，并使用任何合适的软件进行编辑，允许单独的字段和没有校准十字线的记录样品的编号。

### 8.6.22 程序

1. 如果有几个精液样本，整个录像可以在一个阶段准备好；否则，样本可以在可用时被记录下来。
2. 如果通常按照推荐的方式进行评估，在37° C下进行运动性，那么应该在相同的温度下使用阶段加热器进行记录。同样地，如果通常在室温下评估运动性，则记录应该在室温下进行。



注：如果要在37° C下录制，应打开舞台加热器，并在使用前至少10分钟达到稳定温度。

3. 准备至少10个领域的记录，确保从5个不同的精液样本中记录400个精子。
4. 对于精液浓度较低的标本，可能需要超过10个视野来提供足够数量的精子进行评分。录制10个字段的视频将需要几分钟。
5. 视频录制可以用一个带有盖子的幻灯片或一个固定的20μm深的腔室来完成。



注1：使用一次性计数室载玻片时，运动性稳定比使用载玻片和覆盖物的时间更长。这将允许从相同的准备工作中记录所有10个（或更多个）字段。



注2：当使用幻灯片和覆盖物时，可能需要在视频录制期间使用多个片段，以避免运动性明显下降。

6. 识别几个具有一系列运动值的精液样本。
7. 每个标本在视频录制上都应该有一个独特的代码。编码可以从简单地标记每个样本，到标记每个样本的每个领域。例如，第一个标本标记可以在第一个场的开始，在第二个标本出现之前没有其他编码。或者，该编码也可以包括



每个单独的领域的标记，即。第一个标本的第一个场将被标记为01-01，第一个样品的第二个场将被标记为01-02等。这个更复杂的标记系统可以帮助技术人员跟踪他们在分析过程中的位置。



注1：使用一次性计数室载玻片时，运动性稳定比使用载玻片和覆盖物的时间更长。这将允许从相同的准备工作中记录所有10个（或更多个）字段。



注2：在录制时获得空白段的最简单的方法是覆盖光源。

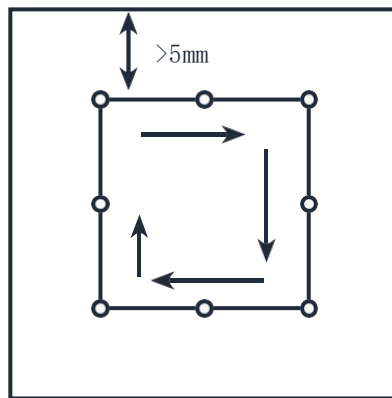


注3：也可以在暂停录音前进行，应始终使用“暂停”按钮，而不是“停止”按钮，因为“停止”按钮可能会引起录音噪音。

8. 在用于记录样品的放大倍数下记录10秒的图像，记录舞台微米。放大倍数应该在显示器上提供一个类似于视觉显微镜分析的图像。舞台显微米图像给出了放大倍数的永久记录，这允许校准屏幕重叠的醋酸盐网格，用于分析录像带或CASA仪器的校准。
9. 记录第一个样本的编码图像5-7秒。在此结束时，阻塞光源3秒钟以提供空白图像作为标记，然后暂停记录。
10. 确定第一个用于记录的精液标本。将10 $\mu$ l混合精液放在玻片上，用22mm $\times$ 22mm覆盖，或装入7 $\mu$ l混合精液的固定载液室。允许样品停留几秒钟（如果需要，在37 $^{\circ}$ C），直到漂移停止。按照图中所示的模式记录10个或更多个字段。8. 3. CASAQC的精子浓度不应超过50 $\times$ 10<sup>6</sup> 每毫升；更浓缩的样品可能必须必须在同源精浆中稀释。

图. 8. 3评估精子活力的帮助

对距离覆盖物边缘至少5毫米的精子活力录像场的系统扫描。



11. 选择覆盖物或腔室左上角附近的第一个字段，距离边缘至少5毫米。记录现场15秒，保持显微镜和舞台尽可能静止。15秒后，记录3秒的空白内容，并暂停录制。如果正在对单个字段进行编码，请更改代码号，并记录只包含代码号的图像5-7秒。
12. 该模式如图中所示。8.3、在幻灯片或腔室上找到第二个运动场，并记录该场15秒。同样，在15秒结束时包括一个3秒的空白空间。暂停录制，如果需要，请更改代码号以指示第三个字段。以这种方式继续记录，直到至少捕获400个精子（10个或10个场，取决于浓度）。在录制了最后一个字段和3秒的空白字段后，停止录制。
13. 准备第二个样品。记录样本2的编码图像5-7秒，然后是3秒的空白。
14. 根据上述步骤记录第二样本，每个记录10个或以上的字段15秒，每个字段之间有一个空白，在最后一个字段的末端有一个空白。
15. 重复此过程，直到记录下所需数量的标本。



注1：如果需要更复杂的IQC运动录像机，其中包含随机重复的标本，则需要第二台录音机或配备专门视频编辑软件的计算机。



注2：在后一种情况下，每个标本应分别录像，只标记这些字段。不应记录样品编号，因为这将随着样品在记录上重复而变化。



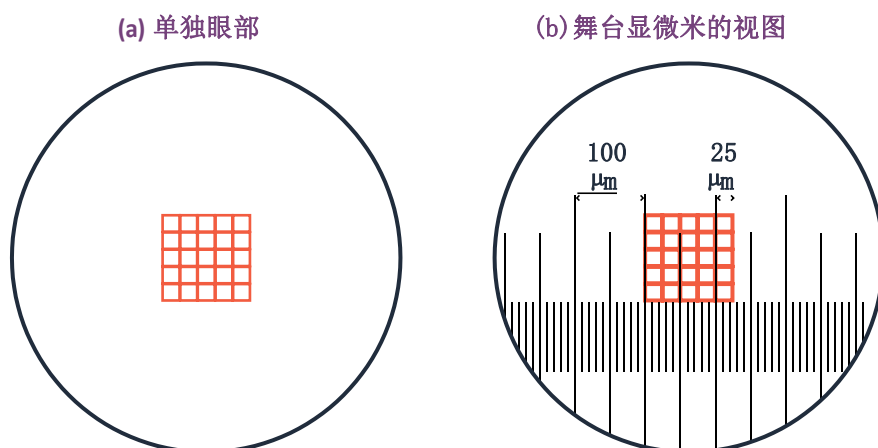
注3：如果有配备视频编辑软件的计算机，则可以根据需要对每个样本的图像进行数字化和组合。

### 8.6.23 录像的分析

1. 绘制醋酸网格覆盖，并将其放置在视频监视器上，用于分析视频录制，如下所示。这将模拟在显微镜分析期间在目镜中使用的网格(图。 8.4)。

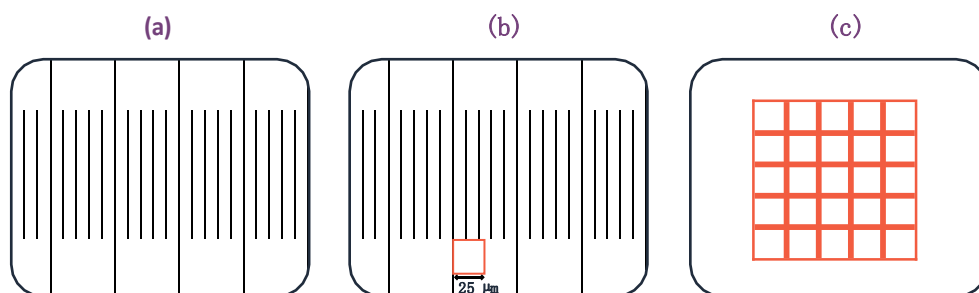


图. 8.4 十字线（红色网格）



2. 将舞台微米放置在显微镜舞台上，其放大倍数用于运动分析。用十字线观察眼部。8.4)，使用台微米测量网格段的尺寸。在本例中，十字线网格为 $125\mu\text{m} \times 125\mu\text{m}$ ，每个方格为 $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ 。记下这些测量值。

图. 8.5 查看显示器上的舞台微米的录像图像和绘制的覆盖层



3. 通过视频显示器播放录音，并在显微米的图像上暂停。 8.5).
4. 在屏幕上贴上醋酸片，在目镜十字线网格中画一个正方形大小的正方形，如上测量(见图. 8.5b).
5. 完成整个目镜网线网格的图像（25个正方形）（图. 8.5c).
6. 要分析视频记录，请确保醋酸盐网格覆盖在视频监视器上。应对网格覆盖的标准化部分进行分析，  
e. g. 最上面的两行或中间的三行。
7. 对每个记录片段的200个精子的评分重复评估。



## 8.6.3 稀释精液精子浓度的制备

### 8.6.3.1 一般考虑

- 测定精液中精子浓度的一些步骤可以使用实验室制备的稀释、保存的精液样本进行监测。
- IQC样本应代表实验室在常规精液评估时通常看到的浓度范围。
- 将精液稀释，将等分物放在储存瓶中。这些都可以冷藏，以后用于计数。空隙应验证其密封性，并验证其精子不粘附在内壁上。
- 在准备悬浮液时，彻底混合标本时要小心，以确保从同一标本制备的小瓶中含有相同浓度的精子。这样，IQC样本上计数的差异就可以归因于计数过程中的问题。
- 在使用血细胞计评估浓度之前，再次稀释保存的IQC样品。使用实验室在常规计数过程中使用的最终稀释液。这确保了背景碎片和其他非精子细胞的浓度将与在常规评估中看到的相似。例如，如果精液最初用等量的稀释剂稀释，额外的1+9（1：10）稀释将最终稀释1：20。
- 当需要一个低精子浓度的保存样本时，最好从一个低浓度的精液样本开始，而不是大量稀释一个更浓缩的样本。这将确保背景与在常规精液分析中观察到的相似。
- 游泳精子制剂缺乏在常规精液评估中看到的碎片、松散的头部和细胞碎片污染，最好只用于监测类似选择的精子悬液的计数。
- 一次制备的IQC精子悬液的数量将取决于技术人员的数量和计数的频率。
- 保存的稀释精液在冷冻后应稳定至少4个月。

### 8.6.3.2 代理

以下两种防腐剂，如下。这些溶液可能会受到污染，应定期丢弃和更新。

- 福尔马林（10%（v/v）甲醛）：向27ml纯化水中加入10ml37%（v/v）甲醛。
- 防凝溶液(apsis)（141）：100ml纯水加入1.0克BSA、2.0克聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、0.90克氯化钠（氯化钠）、0.1ml



TritonX-100和0.004ml硅胶消泡剂。彻底混合，通过0.45 $\mu$ m的过滤器以清除碎片。存储在4 $^{\circ}$ C。



注：可加入杀菌剂叠氮化钠（和0.10g叠氮化钠），使溶液有毒。但是，出于安全考虑，不建议这样做。

### 8.6.3.3 额外的供应

除了估计精子浓度的常规设备外，QC样品的制备还需要：

- 冷冻瓶或其他带有密封盖子的小管来储存
- 标签管的永久标记物。

### 8.6.3.4 程序

1. 识别近似所需浓度的精液样本。所需保存的精液量将根据实验室的需要而不同；要么使用全部可用的精液，要么为每个浓度准备4毫升稀释的精子悬浮液。
2. 收集完精液后，尽快用防腐剂稀释。如果用apsis进行稀释和保存，稀释前的时间越长，稀释后晶体形成的机会就越大。这些晶体会干扰加载腔室和计数精子。
3. 将所需的精液体积转移到一个15毫升的离心管中。对于每毫升精液，加入100 $\mu$ l10% (v/v) 福尔马林、10 $\mu$ l3mol/L叠氮化物或1ml附着体。
4. 将所有用于储存样品的小瓶标记为识别信息和制备日期。应取下盖子或顶部，并将小瓶放在架子上，以便快速和方便地填充。
5. 确保稀释后的精液在整个分配过程中完全混合，以确保所有小瓶中含有相似的精子浓度。即使是混合后的微小延迟，也可以让精子开始沉淀，改变等分物中的浓度。确保不断混合的一种方法是将稀释精液的离心管放在机架中，然后一只手用塑料转移移液管连续混合精液，另一只手用移液管去除等分液。
6. 根据实验室的需要，每个小瓶应含有0.5-1.0ml。将样品储存在0.5毫升的等分物中，可以对每个小瓶进行多次计数。
7. 一旦稀释后的精子悬浮液分配到所有的小瓶中，它们应该紧紧封住。根据使用的小瓶类型，管和盖之间的界面可以覆盖一条自密封的实验室膜，以确保良好的密封。如果使用冷冻小瓶，这是没有必要的。





8. 对剩余的精液样本重复整个过程。

9. 储存在4° C。



注：IQC溶液的浓度应在稀释液制备后测定，不应根据原精液浓度进行假设。一旦保存好精子悬液，可以根据需要取出一个小瓶并进行评估。结果可以使用199页7.7节描述的程序绘制所有计数应使用实验室通常使用的计数方法进行。下一节描述了使用血细胞计的程序。

### 8.6.3.5 使用存储的IQC样本

- 保存的溶液必须在计数前稀释；稀释取决于所使用的防腐剂。
- 福尔马林和叠氮化物对精液的稀释程度很小，因此不需要考虑在内。保存在蚜虫中的精液被稀释两倍。1+1（1：2），在最终计算浓度时必须考虑到这一点。
- 对于原浓度超过每毫升2500万的精液稀释的悬浮液，最好使用1+9（1：10）稀释来完成计数。这可以通过将50μl保存的精子悬液加入450μl的纯化水来获得。最终精液稀释1：20。不要使用蚜虫作为稀释剂，因为这将干扰精子在血细胞计网格上的沉降。
- 对于以下步骤，所有移液管应预设为适当的体积，并预装一个干净的尖端，以便在混合后立即快速去除样品。
- 应用适当体积的水配制一个稀释的小瓶。如果如上所述稀释1：10，则稀释450μl)。储液瓶的内容物应在涡旋混合器上以最大速度混合大约30秒。然后将50μl的样品转移到含水的稀释瓶中。稀释瓶应以最大速度涡旋20秒。血细胞计应装载10μl悬浮液，精子计数如第28页第2.4.8节所述。
- 如果用于制备保存精液的原始精液样本的精子浓度较低，则需要相应调整计数的稀释度。例如，如果原始精液浓度在每毫升4-2500万范围内，以创建实验室的最终稀释，适当的精液额外稀释为2：5（2+3，因为精液已经稀释了1+1（1：2））。这可以通过用75μl的纯化水稀释50μl保存的精液来实现。
- 保存在冰箱中的保守精子悬液应至少稳定4个月，此时应准备新的溶液。希望有一个重叠周期，其中旧和新的解决方案都运行以监控过渡期。



## 8.6.4 对精子形态进行评估的内部质量控制用切片的制备

### 8.6.4.1 一般考虑

- 切片可在实验室制备，用于IQC的形态学染色和分析。
- 可以从多个不同的精液样本中制备多个涂片，代表实验室评分的形态学范围。
- 涂片可以固定和储存，以供以后用于监测染色和分析程序。
- 染色涂片可以单独使用或重复用于形态学分析程序的QC。
- 使用重复可以确定医生内的精度。这些QC载灯片在比较实验室内不同技术人员的结果，或在比较实验室之间的分析时也很有用。
- 经木瓜染色和安装的涂片，保存在室温下的黑暗中，应稳定数月甚至数年。
- 精液在涂片制备的整个过程中必须彻底混合，以确保从一个特定的精液样本中制备的所有涂片都是相同的。这样，在分析过程中检测到的任何主要变化都可以假定是被监测的过程的结果。而不是由于载玻片制备过程中精液混合不足造成的。

### 8.6.4.2 程序

1. 将精液从标本容器中转移到一个15毫升的离心管中。这将允许在载玻片制备过程中更容易和更彻底的混合。
2. 用无衬布的纸组织用力摩擦磨砂玻璃玻片的两个表面。
3. 在磨砂的幻灯片上标注有标识信息。，使用HB（编号2）铅笔。铅笔标记通过固定和切片染色是稳定的；笔的墨水和一些永久标记不是。
4. 将一个干净的尖端固定在移液管上，并将体积设置为10 $\mu$ l（或实验室常规用于制备形态学涂片的体积）。
5. 精液必须在整个过程中彻底混合，以确保所有涂片尽可能相似。混合后，即使是在去除剩余样本之前的微小延迟，也可以让精子开始沉淀，改变运送到载玻片上的精子数量。



6. 将样品在离心管中吸入10次，吸入宽带(直径约1.5mm)的移液管中，与样品的温度平衡。这个过程应该足够有力地混合精液，但不会产生气泡。
7. 混合后，在不允许精子脱离悬浮液的情况下，将10 $\mu$ l精液放在清洗过的载玻片的清晰末端。重要的是不要让精液滴在滑梯上停留超过几秒钟。
8. 使用羽化技术涂抹载玻片表面(第43页第2.4.9.1节)。在这个过程中，用第二张载玻片的边缘沿着载玻液表面拖动精液。一定要用幻灯片将精液“拉”过幻灯片；不要用幻灯片从后面“推”精液。必须注意不要使涂片太厚，否则将会有重叠或聚集的精子 and 更多的背景染色。载玻片上精子的分离取决于精液的体积和精子的浓度、拖动载玻片的角度(角度越小、涂片越薄)(435)和涂片的速度(运动越快，涂片越厚)(436)。
9. 对其余的载玻片重复步骤6-8，每次混合后只制作一个载玻片，以确保精子在移除精子之前不会沉淀。如果混合后暂停超过几秒钟，应在取出前再混合精液。
10. 一旦技术建立，准备工作顺利，每次混合后可以制作两三张玻片。混合后应立即取下所有的等分物，并尽快制作两到三次涂片，无论如何都应在几秒钟内完成。

### 8.6.5 设备校准

移液管、计数室和其他设备应每6个月或每年进行一次校准。

#### 8.6.5.1 保证书

- 平衡应定期与内部校准器进行检查，并在定期提供实验室维护服务时进行外部校准。
- 通过称重外部标准重量来调整平衡。1、2、5、10g，覆盖精液重量范围)。
- 重复测量10次，并计算平均值、SD和变异系数(CV) (=100 $\times$ SD/平均值)。
- 检查准确性。规定的重量是否在测量平均值的2个标准差以内？



### 8.6.5.2 移液管

- 通过将纯水吸到毕业标志，并分配到称重船中，称重船位于前零分析平衡上。
- 假设密度为1g/ml，根据移液管的重量计算预期的体积。



注：水温随温度（437）值的升高而降低。它在20° C处为0.9982g/ml，在30° C处为0.9956g/ml，在40° C处为0.9922g/ml。然而，为了校准，假定值为1.0g/ml就足够了。

- 重复测量10次，并计算平均值、标准差和CV（=100×SD/平均值）。
- 检查准确性。规定的体积是否在测量平均值的2个标准差以内？

### 8.6.5.3 室的深度

- 在显微镜的精细聚焦上使用游标尺度测量计数室的深度。首先关注腔室网格，然后关注覆盖物下方的墨水标记。测量这两点之间的毕业成绩数。
- 重复测量10次，计算平均值、SD和CV（=100×SD/平均值）。
- 检查准确性。规定的深度是否在测量平均值的2个标准差以内？

### 8.6.5.4 孵化器

- 恒温箱和温级的温度应用温度计进行定期校准。
- 公司<sub>2</sub>气体混合物应每天读数培养箱或其他气体分析系统，每周到每月检查，并在维修时进行气体取样。

### 8.6.5.5 pH纸

这应根据已知的pH标准进行校准。

### 8.6.5.6 其他设备

其他实验室设备和试剂，如pH计，也应每3-6个月按标准进行一次检查。



## 8.7 国家精液分析的外部质量控制方案

全球男科领域的许多科学协会和组织为建立和维持有效的EQC精液分析方案提供支持，并可以联系以获得更进一步信息。这些支持来自不同的层面。一些组织与相关公司合作提供正式的方案。这些方案提供必要的培训和材料，以满足各国家存在的法律要求。通常，这些课程和方案都在各自的国家或地区获得认证。其他组织提供关于精液分析的特定方面或对具体程序的实际见解的培训。世界卫生组织与这些方案都没有关联。





## 第九章： 参考文献

1. 贝尔西, 艾莱亚森, 加勒戈斯, 莫吉西KS, 保尔森, 普拉萨德AMN。人精液和精液-宫颈粘液相互作用的实验室手册。新加坡: 新闻关注; 1980年。
2. 世界卫生组织。世卫组织检查人类精液和精液-宫颈黏液相互作用的实验室手册。2nd ed. 英国剑桥大学: 剑桥大学出版社; 1987年。67p.
3. 世界卫生组织。世卫组织检查人类精液和精子-宫颈黏液相互作用的实验室手册。3rd ed. 英国剑桥大学: 剑桥大学出版社; 1992年。107p.
4. 世界卫生组织。世卫组织检查人类精液和精子-宫颈黏液相互作用的实验室手册。4th ed. 英国剑桥大学: 剑桥大学出版社; 1999年。128p.
5. 坎贝尔MJ, 洛蒂F, BaldiE, 施拉特S, 嘉年华议员, 比约恩达尔L等。2020年精液检查结果的分布-为2010年世卫组织精液分析手册整理的数据的随访。仙女座。 2021.
6. 正常的精液质量是什么? 精液分析结果的使用和滥用。HumFertil(Camb)。2011;14(3):179-86.
7. 例如, 例如, 爸爸, 杜勒巴。基于精液参数的自然受孕的预测。IntJ安德罗尔。2008;31(5):499-507.
8. GuzickDS, 超街JW, 因素-LitvakP, 巴西CK, 中岛街, 沙发C等。可生育和不育男性的精子形态、运动性和集中性。NEnglJMed。2001;345(19):1388-93.
9. 巴拉特CLR, 比约翰达尔L, 德琼格CJ, 羔羊DJ, 奥斯卡马蒂尼F, 麦克拉克兰R等。男性不育症的诊断: 分析支持全球世卫组织指导方针发展的证据——挑战和未来的研究机会。Hum复制更新。 2017;23(6):660-80.
10. 王C, 斯韦尔德洛夫RS。精液分析作为男性生育能力测试的局限性和较新测试的预期需求。费尔蒂尔斯特利尔。 2014;102(6):1502-7.
11. Nieschlag E, Pock T, Hellenkemper B. 精液分析的外部质量显示不符合世卫组织指南。J在线复制了Endokrinol\_。 2017;14(6):306-10.



12. 巴拉特公司, 门克维尔德, 莫蒂默德。ESHRE男科基础精液分析课程特别兴趣小组: 持续关注准确性、质量、效率和临床相关性。Hum报告。2011;26(12):3207-12.
13. Bjorndahl L, Kist U。射精序列影响精子作为载体及其信息。在网上复制。2003;7(4):440-8.
14. 韦斯克WH。由腹血管炎引起的精子引起的怀孕。费尔蒂尔斯特利尔。1994;62(3):642-3.
15. Sobrero AJ, Macleod J。立即进行性交后试验。费尔蒂尔斯特利尔。1962;13:184-9.
16. 库柏, 巴菲尔德, 杨志宏。人精液化过程中渗透压的变化。Int J安德罗尔。2005;28(1):58-60.
17. 霍姆斯, 奎斯特。射精后体外人精液渗透压升高。仙女座。2019:e13311.
18. 霍姆斯, 奎斯特。影响射精后体外人精液渗透压变化的可能因素。仙女座。2019:e13443.
19. Zavos PM, Goodfare JC。与手淫相比, 通过精液收集装置性交的特定精液缺陷的临床改善。费尔蒂尔斯特利尔。1989;51(1):190-3.
20. 庞德N, Javed MH, 鲁伯托C, 谢赫马, 德尔山谷美联社。性唤起的持续时间可以预测着手淫射精的精液参数。生理学和行为。2002;76(4-5):685-9.
21. 艾利亚森R。基本精液分析。在: Matson P, 编辑。仙女座的当前主题。珀斯: 拉迪布鲁克出版社; 2003. p. 35-89.
22. 阿曼RP。使用精液评估精子发生: 发射生物学告诉我们为什么报告每个样本的精子总数很重要, 为什么只报告每毫升的精子数量是不合理的。J安德罗尔。2009;30(6):623-5.
23. Ng KK, DONat R, 陈L, Lalaka, Di皮埃罗I, 手工DJ。老年男性的精子输出量。Hum报告。2004;19(8):1811-5.
24. 长时间禁欲后多次射精对健康正常和少精子男性的总、活动和正常精子数量以及副腺分泌物的影响。Hum报告。1993;8(8):1251-8.
25. 费尔南德斯, 穆里尔, 戈耶斯五, 塞格雷尔E, Enciso M等。用改进的精子染色质分散试验简单地测定人类精子DNA分散化。费尔蒂尔斯特利尔。2005;84(4):833-42.
26. 泰勒JP, 克罗克特NG, 德里斯科尔GL。频繁射精的人体精液参数的研究。I. 临床特征。Clin Reprod Fertil。1982;1(4):273-85.
27. 泰勒JP, 克罗克特NG, 德里斯科尔GL。频繁射精的人类精液参数的研究。精子动物的活力和储存能力。Clin Reprod Fertil。1982;1(4):287-93.

28. 德容格, 拉弗朗博伊斯, 博斯莱斯, 考克斯A, Nij斯M。禁欲期对人类精子质量的影响。费尔蒂尔斯特利尔。 2004;82(1):57-65.
29. Correa-PerezJR。受体内禁欲和精子质量。发酵剂。2005; 83(5): 1588-9; 作者回复9-90年。
30. AmannRP, HowardsS。人类男性的每日精子生产和附睾精子储备。J Urol. 1980;124(2):211-5.
31. 阿曼RP。根据每次射精的精子总数来评估人类精子发生时的考虑因素。J安德罗尔。 2009;30(6):626-41.
32. 手DJ, 康威AJ, 博伊兰LM, 龟JR。潜在供精者的睾丸功能: 正常范围和吸烟和精索静脉曲张的影响。IntJ安德罗尔。 1984;7(5):369-82.
33. 贝雷, 伯格曼, 西莫尼, 图特尔曼。原发性睾丸衰竭。在: DeGrootLJ、ChrousosG、邓根K、费因戈尔德KR、格罗斯曼A、赫什曼JM等, 编辑。内文本。南达特茅斯(MA)2000。
34. 安达森公司, 詹森TK, 卡尔森E, 乔根森N, 安德森AM, KrarupT等。在未被选择的年轻男性人群中, 精液质量次优的频率较高。Hum报告。 2000;15(2):366-72.
35. 荷尔斯坦空军, 舒尔茨W, 大卫多夫M。了解精子发生是治疗的先决条件。前列腺生物醇内分泌。 2003;1:107.
36. 原发性和继发性性腺功能减退。在: 西莫尼M, 胡塔尼米I, 编辑。睾丸的内分泌学和男性生殖。2. 伦敦: 施普林格国际出版公司; 2017年。p. 687-747.
37. 麦地那P, 塞加拉G, 巴尔斯特R, 川P, 多梅内克C, VilaJM等。抗抑郁药对人输精管肾上腺素能神经传递的影响。泌尿外科。 2000;55(4):592-7.
38. 贝克HW, KovacsGT。精液质量的自发性改善: 向均值回归。IntJ安德罗尔。 1985;8(6):421-6.
39. 阿尔瓦雷斯C, 卡斯蒂利亚, 马丁内斯, 拉米雷斯, 维加拉, 加福里奥JJ。健康受试者精性参数的生物学变化。Hum报告。2003;18(10):2082-8.
40. 波兰ML, 莫吉西KS, GiblinPT, AgerJW, OlsonJM。正常男性体内精液测量值的变化。费尔蒂尔斯特利尔。 1985;44(3):396-400.
41. 伯曼, 王C, 保尔森。人类精子浓度数据分析中的方法学问题。J安德罗尔。 1996;17(1):68-73.
42. 卡尔森, 彼得森, 安德森, 斯卡克贝克东北。射精频率和季节对精液质量变化的影响。费尔蒂尔斯特利尔。 2004;82(2):358-66.
43. 卡斯蒂利亚JA, 阿尔瓦雷斯C, 阿吉拉尔J, 冈萨雷斯-瓦雷亚C, 冈萨尔沃MC, 马丁内斯L。分析和生物学变异对精性参数临床解释的影响。Hum报告。 2006;21(4):847-51.



44. 基尔BA。不孕男性和正常精液供体的精液参数在受精者之间的差异。费尔蒂尔斯特利尔。2006;85(1):128-34.
45. 实用实验室男科。牛津大学：牛津大学出版社；1994年。393p.
46. 常规临床男科的实验室标准。生殖医学评论。1994;3:97-111.
47. 琼斯DM, 科瓦奇GT, 哈里森L, 詹宁斯MG, 贝克HW。用避孕套及其成分固定精子。ClinReprodFertil。1986;4(6):367-72.
48. 世界卫生组织。实验室生物安全手册，第三版。日内瓦2004。
49. 哈金斯，斯科特，亨宁。人类精液和前列腺和精囊分泌物的化学成分。我是生理学家。1942;136(3):467-73.
50. 巴西C, 天鹅SH, DrobnisEZ, 刘F, 王C, RedmonJB等。多中心研究中精液评价的标准化方法。J安德罗尔。2004;25(4):635-44.
51. 库珀TG, 巴西, 天鹅S, 超街JW。当精液从收集容器中排出或倒入气缸时，射精体积被严重低估。J安德罗尔。2007;28(1):1-4.
52. 玫瑰号, RumkeP, HarperMJK, VyazovO。人精子等构体和自身抗体的检测技术。ClinExp免疫醇。1976;23(2):175-99.
53. 约翰, 坎帕纳, 卢西, 阿戈斯蒂尼。精液分析中“圆形细胞”的评价：比较研究。Hum复制更新。2000;6(4):404-12.
54. 弗朗德M。对人类精子形态学进行评级的标准。合作研究。IntJFertil。1966;11(1):97-180.
55. Jue JS, Ramasamy R。精液培养与男性不育及辅助生殖技术过程的意义。透镜AndrolUrol。2017;6(5):916-22.
56. 米基洛, 瓦萨洛先生, 科德斯基, 安德里亚, 内齐, 弗朗西维拉等。无生殖道感染症状的亚生殖能力伴侣的男性伴侣的精子精液白细胞和氧化依赖性DNA损伤。仙女座。2016;4(5):808-15.
57. 巴勒莫GD, 内里QV, 科佐博T, 张S, 佩雷拉N, 罗森沃克斯Z。揭示了开创性的圆形细胞的本质。PLoS1。2016;11(3):e0151640.
58. 木星P, B公管, 凤凰D, 螺旋A。男性因素和不育夫妇怀孕的可能性。I。对精子特性的研究。IntJ安德罗尔。1988;11(5):379-94.



59. 齐纳曼MJ, 布朗CC, 西莱万SG, 克莱格ED. 精液质量和人类生育能力: 一项针对健康夫妇的前瞻性研究。J安德罗尔。 2000;21(1):145-53.
60. 拉森L, ScheikeT, JondeJP, E恩斯特E, HjollundNH等. 计算机辅助精液分析参数作为一般人群男性生育能力的预测因子。丹麦第一怀孕计划者研究小组。Hum报告。 2000;15(7):1562-7.
61. 艾特肯RJ, 萨顿M, 华纳P, 理查森DW. 人类精子的运动特征与穿透宫颈粘液和无带仓鼠卵母细胞的能力之间的关系。JReprodFertil。 1985;73(2):441-9.
62. 莫蒂默, 潘迪亚, 索尔斯. 人精子活力特性与精子在体外渗透到人宫颈粘液中的关系。JReprodFertil。 1986;78(1):93-102.
63. 老师, 暗示着A, 老师. 精子特性预测精液体外受精能力的准确性。J体外无菌胚胎移植。 1988;5(6):326-31.
64. 巴拉特CL, 麦克劳德身份证, 邓菲, 公元前, 库克身份证. 两种假定的精子功能试验的预后价值: 低渗透肿胀和牛精子黏液渗透试验(Penetrak)。哼哼的支持。 1992;7(9):1240-4.
65. 欧文, 艾特肯德斯. 辅助服务背景下体外精子功能测试的预测价值。Hum报告。 1986;1(8):539-45.
66. 检查JH, LurieD. 评估缺乏具有快速和线性渐进运动的精子在宫内受精或体外受精后对后续妊娠率的影响。J安德罗尔。 1996;17(5):550-7.
67. C, T, 巴拉五, 庞塞莱C, RudantJ, 门彻R等. 世界卫生组织a级运动和带结合测试准确地预测轻度男性因素和不明原因的不精的体外受精结果。Hum报告。 2005;20(10):2769-75.
68. 范登伯格, 埃米利亚尼, 比拉曼, 范宁, 恩格尔特. 胞浆内注射精子后, 精子个体直线速度及其对受精率影响的首次前瞻性研究。Hum报告。 1998;13(11):3103-7.
69. 评估快速进展的精子有效性和意义。亚洲J安德罗尔。 2010;12(1):33-5.
70. 艾利亚森R. 精液分析、精子数量、精子形态和功能方面。亚洲J安德罗尔。 2010;12(1):26-32.
71. 在不运动的人类精子中缺乏动力蛋白臂。J细胞生物醇。 1975;66(2):225-32.
72. 化学物质EH, RaweYV. 精子病理学: 超越描述性形态学的一步。不育男性异常精子表型的起源、特征和生育潜力。Hum复制更新。 2003;9(5):405-28.



73. 威尔顿律师事务所，坦普尔-史密斯公园，贝克路，德克雷瑟路。由附睾精子变性和死亡引起的人类男性不育。费尔蒂尔斯特利尔。1988;49(6):1052-8.
74. 小科雷亚-佩雷斯，费尔南德斯-佩莱格里娜，阿斯拉尼斯，萨沃斯总理。临床管理的男性产生射精的特征是高水平的死亡精子和精浆因素改变与附睾坏死精子症一致。费尔蒂尔斯特利尔。2004;81(4):1148-50.
75. 我，索德伦德一世，约翰逊先生，伊斯兰教徒，普里安先生，奎斯特U.为什么世卫组织对伊红-黑松香染色技术对人类精子活力评估的建议必须改变。J安德罗尔。2004;25(5):671-8.
76. 索德伦德一世，奎斯特U.伊红黑松香染色技术对人体精子活力的评价。Hum报告。2003;18(4):813-6.
77. 用伊红-黑松香染色评估人类精子活力的技术说明。在网上复制。2020;40(6):851-5.
78. SlamaR, EustaceF, B, 詹森TK, 乔根森N, HorteA等。怀孕时间和精液参数：一项对欧洲四个城市生育夫妇的横断面研究。Hum报告。2002;17(2):503-15.
79. 世界卫生组织。男性生育能力调节方法特别工作组：睾酮诱导的无精子症和少精子症对正常男性的避孕效果。费尔蒂尔斯特利尔。1996;65(4):821-9.
80. 邦德JP, 恩斯特E, 詹森TK, 霍伦德NH, 科尔斯塔德H, 亨利克森TB等。精液质量与生育能力之间的关系：一项针对430名首次怀孕计划者的基于人群的研究。柳叶刀。1998;352(9135):1172-7.
81. 贝姆，杨先生，荷尔斯泰坦，温鲍尔GF，加斯纳，尼斯拉格E。男性不孕症和性腺功能减退的诊断。在：尼斯克拉格E，贝雷HM，编辑。男科：男性生殖健康和功能障碍。第二版。柏林海德堡：施普林格；2000。p。90-121.
82. MacLeodJ, 王Y.在精液质量方面的男性生育潜力：对过去的回顾，对现在的研究。费尔蒂尔斯特利尔。1979;31(2):103-16.
83. 艾利亚森R。精液分析。在：BehrmanSJ, 基斯特纳RW, 编辑。不孕症的进展。波士顿：利特尔、布朗和其他公司；1975年。p。691-713.
84. 比约翰达尔L, 莫蒂默D, 巴拉特CLR, 卡斯蒂利亚JA, 门克维尔德R, KvistU等。基础实验室男科的实用指南。剑桥：剑桥大学出版社；2010年。
85. 摩梯末D, 舒马, 谭R。精液分析中精子浓度和精子活力计数的标准化和质量控制。人类繁殖学（英国牛津大学）。1986;1(5):299-303.
86. Kirkman-BrownJ, BjorndahlL。一次性塑料组鲍尔计数室的评价。费尔蒂尔斯特利尔。2009;91(2):627-31.

87. 库柏, 希腊, J, 卡, , N, WM等。无精子症: 虚拟现实还是可能的量化? J安德罗尔。 2006;27(4):483-90.
88. EzeUI, MooreHM。重新定义无精子症及其含义。费尔蒂尔斯特利尔。 2001;75(1):213-4.
89. 谢里夫K。无精子症的重新分类: 时间到了吗? Hum 报告。 2000;15(2):237-8.
90. 艾利亚森R。精液分析。在: 汉堡汉堡, 克雷瑟DM, 编辑。睾丸。纽约: 乌鸦出版社; 1981年。p. 381-99.
91. 林赛·克斯, 弗洛伊德一世, 斯旺R。无精子症样本的分类。柳叶刀。 1995;345(8965):1642.
92. JaffeTM, KimED, 霍克斯特拉, 利普舒尔茨, 李。精子颗粒分析: 一种通过常规精液分析来检测被认为患有无精子症的男性中精子存在的技术。J Urol。 1998;159(5):1548-50.
93. 无精子症的诊断取决于离心的力。费尔蒂尔斯特利尔。 2005;83(4):920-2.
94. 性交后精子对宫颈分泌物的形态学及其临床意义。费尔蒂尔斯特利尔。 1977;28(8):841-5.
95. 门克维尔德, 看台, 科泽, 克鲁格, 范泽尔。根据更严格的标准来评价人类精子的形态学特征。Hum报告。 1990;5(5):586-92.
96. 门克维尔德, 弗兰肯博士, 克鲁格, 奥宁格, 霍根GD。人类透明带的精子选择能力。国防部支持发展部。1991; 30(4): 346-52.
97. 刘迪, 贝克HW。与在体外不能受精的人类卵母细胞的透明带结合的精子的形态学。JReprodFertil。 1992;94(1):71-84.
98. 埃格特-克鲁斯W, 施瓦兹H, 罗尔G, 德米拉卡T, 蒂尔根W, 伦内鲍姆B。精子形态评估和受孕条件下的男性生育能力。Hum 报告。 1996;11(1):139-46.
99. 库切K, 克鲁奇公司, 伦巴第群岛。正常精子形态的预测价值: 一篇结构化的文献综述。Hum复制更新。 1998;4(1):73-82.
100. 色调JP, 摩萨德H, 成长博士, 莫谢迪M, 斯旺森RJ, 奥宁格S。通过严格的预测人工(宫内)授精结果的标准来评估精子形态的价值。仙女座。 1995;27(3):143-8.
101. 范瓦特, 伦巴德, 翁贝利。正常精子形态在宫内授精(IUI)中的预测价值: 一篇结构化的文献综述。Hum复制更新。 2001;7(5):495-500.
102. 加勒特, 刘迪, 克拉克, 拉什福德, 贝克公司。自动精液分析: “透明带首选”精子形态测量和直线速度与低生育能力夫妇的怀孕率有关。Hum 报告。 2003;18(8):1643-9.

103. 刘迪出版社，加勒特出版社，贝克出版社。低比例的精子可以与人类卵母细胞的透明带结合。Hum报告。2003;18(11):2382-9.
104. 门克维尔德R，王威，伦巴第CJ，韦策尔斯AM，托马斯CM，默库斯HM等。精液参数，包括世界卫生组织，在可育和亚生育人群中严格的形态学：努力实现体内阈值的标准化。Hum报告。2001;16(6):1165-71.
105. 范德梅韦，克鲁格，奥宁格，伦巴第。使用精液参数来识别一般人群中亚生育能力的男性。男性肥胖投资。2005;59(2):86-91.
106. 人类精子的功能解剖学：与超微结构和功能之间的关系。MolHumReprod。2018;24(12):567-92.
107. KatzDF，超街JW，塞缪尔斯SJ，尼斯漫游PW，布鲁姆TD，刘易斯EL。精子评估中的形态学分析。J安德罗尔。1986;7(4):203-10.
108. 亚伯拉罕-佩斯基尔合资公司，鹿角E，费德J。人类精子的中间囊泡对渗透胁迫的反应。Hum报告。2002;17(2):375-82.
109. 细胞质液滴是人类精子的正常结构，但通过常规的精子形态评估程序保存不佳。Hum报告。2004;19(10):2283-8.
110. 克鲁格TF、AcostaAA、西蒙斯KF、斯旺森RJ、MattaJF、欧宁格S。体外受精中精子形态异常的预测价值。费尔蒂尔斯特利尔。1988;49(1):112-7.
111. 佐尔纳，施莱耶，科技公司。根据弱精子症常规精子受精和胚胎移植后受精标准评估正常精子形态的临界值。Hum报告。1996;11(10):2155-61.
112. 弗兰肯博士，巴伦森博士，克鲁格博士。一个严格的精子形态的连续质量控制程序。费尔蒂尔斯特利尔。2000;74(4):721-4.
113. 孟克维尔德，希尔，汉高。人类精子形态与顶体功能的关系。J协助ReprodGenet。2003;20(10):432-8.
114. KistU，BjorndahlL。基本精液分析手册，2002年。海因曼MJ，编辑。牛津：牛津学术；2002年2002年6月15日。24p.
115. 克鲁格TF，门克维尔德R，斯坦德FS，伦巴第CJ，范德梅威JP，VanZylJA等。精子形态学特征作为体外受精的预后因素。费尔蒂尔斯特利尔。1986;46(6):1118-23.
116. 精子功能障碍和纤毛病。复制MedBiol。2016;15(2):77-94.
117. 甘迪尼L，伦巴多F，保利D，辣椒L，家庭G，VerlengiaC等。人精子中凋亡DNA片段的研究。Hum报告。2000;15(4):830-9.



118. 李雅德, 口口, 柳野町。向小鼠卵母细胞注射后具有正常和异常头部形态的人精子的染色体组成分析。Hum报告。1996;11(9):1942-6.
119. 爸爸, 爸爸, 爸爸。苯胺蓝染色的人精子染色质凝集缺陷与精液特征的相关性。仙女座。1988;20(3):211-7.
120. 德维拉德, 梅茨勒-吉利曼, 佩尔蒂埃, 德罗伯蒂斯, 伯格, 亨内比克等。大头精子的多倍体: 3例患者的FISH研究。Hum报告。2002;17(5):1292-8.
121. MartinRH, 雷达制造商AW, 格林C, KoE, HoangT, 巴克莱L等。轻度、中度和重度低精子症男性精子染色体异常频率的比较。生物醇的复制。2003;69(2):535-9.
122. 精子形态学评估——历史的观点和当前的观点。J安德罗尔。2001;22(2):192-205.
123. 鹿角E, 亚伯拉罕-佩斯基尔JV。渗透胁迫后人精子中间囊泡和细胞膜功能完整性的意义。仙女座。2004;36(2):87-93.
124. 我, 杨, 宋泰, 我, 库珀。细胞质液滴与人精子的运动、黏液迁移和体积调节的关系。J安德罗尔。2006;27(2):294-301.
125. 佩尔弗雷RJ, 超街JW, 刘易斯EL。输精管结扎术逆转后持续不孕症的精子形态异常。费尔蒂尔斯特利尔。1982;38(1):112-4.
126. 精子形态分类: 世界卫生组织采用的合理方法。方法MolBiol。2013;927:27-37.
127. 岩本T, 野泽S, 吉克M, 小野T, 爸爸K, 松下T等。324名肥沃的日本人的精液质量。Hum报告。2006;21(3):760-5.
128. , 瑞姆、马普、热维斯、Dumur五、柠檬水等。[双侧输精管发育不全患者泌尿生殖系统异常、精子图和CFTR基因型的相关性]。程序Urol。1998;8(3):370-6.
129. 韦斯克W, 萨尔兹勒, 施罗德王子一世, 韦德纳W。先天性血管转移缺失的临床表现。仙女座。2000;32(1):13-8.
130. 道丁M, 比斯E, 布扬L, 马萨诸塞州G, 庞顿尼尔F, 米乌塞特R。先天性双侧输精管缺失: 临床特征、生物学参数、囊性纤维化跨膜电导调节基因突变, 以及对遗传咨询的意义。费尔蒂尔斯特利尔。2000;74(6):1164-74.
131. 冯·埃克德斯坦, 库珀, 拉沙K, 梅切德D, 霍斯特J, 尼斯切拉格E。精浆特征作为阻塞性无精子症男性囊性纤维化跨膜电导调节器(CFTR)基因突变的指标。费尔蒂尔斯特利尔。2000;73(6):1226-31.



132. 库斯勒美联社，皮门特尔上午，美国铝业DD，刘IP，BrumIS，CappE等。过度粘稠的精液标本的机械加工会对精子DNA碎片化产生负面影响。Int 尿管。2014;46(4):737-42.
133. 朋友，朋友，朋友，越南，热维斯，DumurV等。先天性双侧输精管缺失患者生殖尿异常、精液分析与CFTR基因型的相关性。Br J Urol. 1998;81(4):614-9.
134. HaugenTB, GrotmolT. 人类精液的pH。IntJ安德罗尔。1998;21(2):105-8.
135. D, GriveauJF, PichonJP, QueroJC. 腔室深度对精液或活性介质中人类精子运动模式的影响。Hum报告。1992;7(10):1417-21.
136. 克雷默，飞狮，马丁邦，奥杰。细胞网计算机辅助精子分析系统影响人类精子运动学测量的因素。Hum报告。1998;13(3):611-9.
137. 莫图尔斯基H. 直观的生物统计学。纽约：牛津大学出版社；1995年。
138. 用乳胶珠测定的精液计数室的准确性。费尔蒂尔斯特利尔。1996;66(4):662-5.
139. 马哈茂德，院长B，皮恩斯，高级法官。10种不同的精子浓度估计方法的性能。费尔蒂尔斯特利尔。1997;68(2):340-5.
140. 马格努森K，霍姆伯格R. 改进纽鲍尔裁决对细胞视力计100微米的验证。仙女座。2018;6(S1).
141. 巴西C、斯旺S、TollnerCR、TreeceC、DrobnisEZ、WangC等。在多中心研究中进行精液评价的实验室方法的质量控制。J安德罗尔。2004;25(4):645-56.
142. 道格拉斯-汉密尔顿DH，史密斯NG，库斯特CE，维梅顿JP，阿尔豪斯GC。毛细管负荷颗粒流体动力学：对精子浓度估计的影响。J安德罗尔。2005;26(1):115-22.
143. 道格拉斯-汉密尔顿DH，史密斯NG，库斯特CE，维梅顿JP，阿尔豪斯GC。低体积毛细管加载腔室中的粒子分布。J安德罗尔。2005;26(1):10714.
144. LL，巴拉特CL。精液分析：制定精子数量的测量标准。J安德罗尔。2005;26(1):11.
145. 耶恩德兰，范德范H，佩雷斯-佩拉兹M，克拉博BG，Zanevel德LJ。开发了一种评估人类精子膜的功能完整性及其与其他精液特征的分析方法的关系。JReprodFertil. 1984;70(1):219-28.



146. 侯赛因上午, 里兹克B, 巴里克S, 赫夫C, 索尼克罗夫特IH. 人类精子低渗肿胀的时间过程: 肿胀亚型之间有序过渡的证据。Hum报告。1998;13(6):1578-83.
147. 关于辅助生殖加工过程中的渗透压和精子功能。瑞典斯德哥尔摩: 卡罗林斯卡学院; 2020年。
148. 梅切德, 凯克, 赞德, 库柏, 杨, 尼斯克拉格。三种不同的制备技术对人类精子形态学分析结果的影响。IntJ安德罗尔。1993;16(6):362-9.
149. 克鲁格TF, 阿克曼SB, 西蒙斯KF, 斯旺森RJ, 布鲁戈SS, 阿科斯塔AA. 一种快速、可靠的人类精子形态染色技术。拱门仙女座。1987;18(3):275-7.
150. 库切, 克鲁格, 凡登达尔, 德维利尔斯, 伦巴第CJ. 用于计算机化的人类精子形态评价的两种染色和评价方法的比较。仙女座。1997;29(3):133-5.
151. 口头, 口头, 口头, 口头, 阿克苏FM. 通过严格的标准评估人类精子形态: 湿制剂与改良的Diff-Quik法染色的比较。拱门仙女座。2002;48(4):307-14.
152. 马雷尔, 门克维尔德, 范德霍斯特。人类精子头部的形态测量尺寸取决于所使用的染色方法。Hum报告。2010;25(6):1369-82.
153. 奥杰J, 尤斯塔奇F, 安徒生公司, 欧文DS, 乔根森N, 斯卡克贝克NE等。来自欧洲四个城市的1001名孕妇男性伴侣与环境、生活方式和病史相关的精子形态缺陷。Hum报告。2001;16(12):2710-7.
154. Menkveld RK, T.F. 基本人员分析。在: 阿科斯塔AA, 编辑。辅助生殖中的人类精子。巴尔的摩: 威廉姆斯和威尔金斯; 1990年。p. 68-84.
155. 阿齐兹N, 巴肯一世, 泰勒C, 金斯兰CR, 刘易斯-琼斯一世。精子畸形指数: 体外卵母细胞受精结果的可靠预测因子。费尔蒂尔斯特利尔。1996;66(6):1000-8.
156. 阿齐兹, 阿加瓦尔, 刘易斯-琼斯一世, 沙玛RK, 托马斯AJ, Jr. 特定精子形态缺陷与白细胞精子症之间的新联系。费尔蒂尔斯特利尔。2004;82(3):621-7.
157. 阿齐兹, 萨利赫拉, 沙玛拉克, 刘易斯-琼斯一世, 埃斯法尼迪亚尼, 托马斯AJ, Jr. 等人。精子活性氧的产生、精子形态缺陷和精子畸形指数之间的新关联。发酵剂。2004; 81(2): 349-54.
158. 大卫G, CzyglikF, 马约MJ, 施瓦茨 D. 的成功 A. I. D. 和精液特征: 研究1489个周期和192次射精。IntJ安德罗尔。1980;3(6):613-9.
159. 奥格·杰, F. 标准化分层形态学是大卫修饰的方法。仙女座。2000;10:358-73.



160. 网。基本精液分析手册(ESHRE专著#2)。牛津大学：牛津大学出版社；2002年。
161. 王王，图CF，谭YQ。了解男性不育患者精子鞭毛的多种形态学异常：有什么新发现？亚洲J安德罗尔。2020;22(3):236-45.
162. 库特顿，埃斯科菲尔，马丁内斯，阿努尔特，雷PF。畸形精子症：重点关注人类的主要遗传因子。Hum复制更新。2015;21(4):455-85.
163. JørgensenN，安徒信公司，尤斯塔奇F，欧文DS，苏米宁J，彼得森JH等。欧洲精液质量的区域差异。Hum报告。2001;16(5):1012-9.
164. 穆拉托里，马尔基亚尼，坦伯里诺，Cambim，LottiF，纳塔利I等。较明亮精子的DNA片段独立于年龄和精液参数预测男性的生育能力。费尔蒂尔斯特利尔。2015;104(3):582-90 e4.
165. 《精子DNA片段：起源机制》。AdvExp床比奥尔。2019;1166:75-85.
166. 萨卡斯D，阿尔瓦雷斯JG。精子DNA碎裂：精子的起源机制、对生殖结果的影响和分析。费尔蒂尔斯特利尔。2010;93(4):1027-36.
167. 罗宾逊L，加洛斯ID，康纳SJ，RajkhowaM，米勒D，LewisS等。精子DNA碎片化对流产率的影响：系统综述和荟萃分析。Hum报告。2012;27(10):2908-17.
168. 西森M，WelyMV，曼塞尔S，BruinJP，MolBW等。测量精子DNA片段和医学辅助生殖的临床结果：系统回顾和meta分析。PLoS1。2016;11(11):e0165125.
169. 西蒙L，齐尼，迪亚申科，西安皮，卡雷尔DT。系统综述和元分析，以确定精子DNA损伤对体外受精和胞浆内精子注射结果的影响。亚洲J安德罗尔。2017;19(1):80-90.
170. 谭J，塔斯金，艾伯特，贝达威。精子DNA碎片与特发性复发性妊娠丢失之间的关系：系统综述和荟萃分析。在网上复制。2019;38(6):951-60.
171. 埃夫根尼，B。人类精子DNA片段及其与传统精液参数的相关性。J Reprod Infertil. 2014;15(1):2-14.
172. 罗宾斯DJ，科尔曼女士。双链DNA在末端转移酶催化聚合反应中的启动作用。核酸Res. 1988;16(7):2943-57.
173. 沙玛，崎，阿加瓦尔。精子DNA片段分析采用TUNEL分析。方法MolBiol. 2013;927:121-36.
174. 穆拉托里，坦伯里诺，托奇五世，科斯坦蒂诺，马尔基亚尼，贾奇尼C等。TUNEL检测与流式细胞术相结合的关键步骤的微小变化极大地影响了精子DNA片段的测量。J安德罗尔。2010;31(4):336-45.

175. 我, 坦伯里诺, 我, 圭多, 福尔蒂, 巴尔迪。通过TUNEL/流式细胞术检测精子DNA片段的关键方面。SystBiolReprodMed。 2010;56(4):277-85.
176. 他说, 加尔科夫斯基, 赵H。TUNEL细胞术分析细胞凋亡。方法。 2008;44(3):250-4.
177. 多明戈斯, 卡米乔, 巴莱斯卡, 奥利瓦。人精子DNA片段: 通过流式细胞术和光学显微镜评估TUNEL结果的相关性。细胞术A。 2007;71(12):1011-8.
178. M, 拉弗斯特, 布扬L, 比松内特, 白白。精子DNA片段: 男性生育能力的阈值。Hum报告。 2005;20(12):3446-51.
179. M, 拉弗斯特G, 布兰格K, 比松奈特F, 白G。用尿苷末端末端标记法测定精子DNA片段的纵向研究。Hum报告。 2005;20(7):1921-7.
180. 一种新型的体外流式细胞术脱氧核糖核酸测定脱氧核糖核酸含量。费尔蒂尔斯特利尔。 2013;99(7):1857-61.
181. 米切尔, 德伊利利斯, 艾特肯RJ。TUNEL检测始终低估了人类精子中的DNA损伤, 并受到DNA压缩和细胞活力的影响: 开发一种改进的方法。IntJ安德罗尔。 2011;34(1):2-13.
182. 里贝罗SC, M, 德盖特M, 德盖特C。用BrdUTP/抗BrdUTP进行的TUNEL标记大大低估了精液评价中精子DNA碎片的水平。PLoS1。 2017;12(8):e0181802.
183. 穆拉托里M, 佩莱格里诺G, 漫画G, AzzariC, LottiF, TarozziN等。存活和非存活精子动物的DNA片段以相似的准确性区分生育和不育的受试者。JClin医学博士。 2020;9(5).
184. 马丁内斯MG, 桑切斯-马丁P, 多拉多-席尔瓦M, 费尔南德斯JL, 吉罗内斯E, 约翰斯顿SD等。磁激活细胞分选在减少精子DNA碎片化方面并不完全有效。J协助ReprodGenet。 2018;35(12):2215-21.
185. 费尔南德斯, 卡吉加尔, 洛佩兹-费尔南德斯, 戈萨尔维斯。用精子染色质分散试验评估精子DNA片段。方法MolBiol。 2011;682:291-301.
186. 费尔南德斯, 穆里尔, 里维罗, 戈耶恩斯五, 巴斯克斯, 阿尔瓦雷斯JG。精子染色质分散试验: 一种测定精子DNA片段的简单方法。J安德罗尔。 2003;24(1):59-66.
187. 戈萨尔韦斯J, 罗德里格斯-普雷德拉拉M, 清真寺A, 洛佩兹-费尔南德斯C, 埃斯特维斯SC, 阿加瓦尔A等。通过精子染色质分散测试所识别的具有大量核损伤的精子亚群的特征。仙女座。 2014;46(6):602-9.
188. 彗星分析: 机制和技术考虑。MutatRes。 1996;363(2):89-96.



189. 麦凯维-马丁VJ, 米莉亚N, 沃尔什IK, 约翰斯顿老R, 休斯CM, 刘易斯SE等。碱性单细胞凝胶电泳试验的两种潜在的临床应用：(1)。人膀胱清洗术和膀胱移行细胞癌；和(2)。人类精子和男性不育。MutatRes。1997;375(2):93-104.
190. 西蒙L, 卡雷尔DT。用彗星实验测量的精子DNA损伤。方法MolBiol。2013;927:137-46.
191. 男性生殖毒理学中的彗星分析。细胞生物醇毒素。2009;25(1):81-98.
192. 彗星实验：它真的能告诉我们什么？MutatRes。1997;375(2):183-93.
193. 康卡K、兰科夫A、巴纳西克A、利索斯卡H、K舍夫斯基T、GozdzS等。一种用于彗星实验的跨平台公共领域的PC图像分析程序。MutatRes。2003;534(1-2):15-20.
194. 冈萨雷斯·杰, 罗梅罗一世, 巴基诺·JF, 加西亚·O。用细胞分析仪软件自动分析银染彗星。MutatRes。2012;748(1-2):60-4.
195. 西蒙L, 卡斯蒂略J, 奥利瓦R, 刘易斯SE。人类精子精胺、DNA损伤和辅助生殖结果之间的关系。在网上复制。2011;23(6):724-34.
196. 李巴斯, 佩罗, 费尔南德斯, 美国C, 美国MJ, 普拉达等。采用TUNEL、SCSA、SCD、碱性和中性彗星等5种不同的分析方法对精子DNA片段进行综合分析。仙女座。2013;1(5):715-22.
197. 答, Talkad女士, 拉玛亚MK。“用多种方法评价精子DNA片段：男性不育预测能力比较”的勘误。代表医学。2019;46(4):211.
198. 答, Talkad女士, 拉玛亚MK。采用多种方法评价精子DNA碎片化：比较其对男性不育的预测能力。ClinExprodMed。2019;46(1):14-21.
199. Evenson DP. 精子染色质结构分析 (SCSA(R))。方法MolBiol。2013;927:147-64.
200. 精子染色质结构分析对生育能力评估是有用的。方法细胞Sci。2000;22(2-3):169-89.
201. 精子染色质结构分析的生育能力评估。Curr 协议Cytom。2001; Chapter7: Unit713.
202. 爱文森DP, JostLK, 马歇尔D, 齐纳曼MJ, CleggE, PurvisK等。精子染色质结构分析作为人类生育临床的诊断和预后工具的效用。Hum报告。1999;14(4):1039-49.
203. 吉尔克曼A, 林德斯特L, 拉尔森M, 邦糖M, SpanoM, LevineRJ等。精子染色质结构分析作为体内生育能力的独立预测因素：一项病例对照研究。IntJ安德罗尔。2010;33(1):e221-7.



204. 答, 布兰科J, 布兰科F, 桑达尔纳斯M, 加西亚-吉克斯E, 安东E。罗伯逊易位携带者的精子中分离模式的改变和数量染色体异常相互相关。在网上复制。2015;31(1):79-88.
205. 王邦元, B.。; 唐, D.。; Li, R.。; 刘, X.。; 宋, J.。; 王, W.。; 刘, Z.。 .13个罗伯逊易位后的精子减数分裂分离模式及染色体间效应分析。巴尔干JMedGenet2017; 20(1):43-50.
206. 样本中受dna损伤的精子数量增加, 显示数字染色体异常率增加。Hum报告。2013;28(6):1707-15.
207. 拉马萨米R, 斯科维尔JM, KovacJR, 库克PJ, 羔羊DJ, 利普舒尔兹李。荧光原位杂交检测反复流产男性精子非整倍体增加。费尔蒂尔斯特利尔。2015;103(4):906-9 e1.
208. 科恩, 小科恩, 达里莱克, 拉马萨米, 利普舒尔茨L。对因精子染色体非整倍体异常而反复流产或反复植入失败的男性进行遗传咨询。J协助ReprodGenet。2016;33(5):571-6.
209. 拉马萨米R, BesadaS, 羔羊DJ。人类精子的荧光原位杂交: 诊断、适应症和治疗意义。费尔蒂尔斯特利尔。2014;102(6):1534-9.
210. 龙, 林WW, 羔羊DJ, 庄W, 李, 比肖夫FZ。经严格形态鉴定正常的不育患者精子中X染色体、Y和18不分离的增加: 对胞浆内精子注射的意义。费尔蒂尔斯特利尔。2001;76(5):879-83.
211. , J, 暴风雨。人类的减数分裂不分离和精子非整倍体。复制。2019;157(1):R15-R31.
212. 纽瑟M, 罗根霍弗N, 杜尔S, 奥奇森库恩R, 特罗特曼M, 朱里诺维奇V等。人类精子中16号染色体二聚体率的增加和复发性自然流产。费尔蒂尔斯特利尔。2015;104(5):1130-7 e1-10.
213. 寺庙C, UrozL, 以停止A。关于人类精子中非整倍体的起源和相关性的新见解。MolHumReprod。2013;19(10):634-43.
214. 汤姆林森MJ, 巴拉特CL, 库克身份证。对精液中白细胞和白细胞亚群的前瞻性研究表明, 它们不是男性不育的原因。费尔蒂尔斯特利尔。1993;60(6):1069-75.
215. 精液中白细胞的生物学意义。费尔蒂尔斯特利尔。1995;63(6):1143-57.
216. HomykM, 安德森DJ, WolffH, JC先生。利用针对顶体内抗原SP-10的单克隆抗体MHS-10对精液中未成熟生殖细胞的鉴别诊断。费尔蒂尔斯特利尔。1990;53(2):323-30.
217. 卡多索的NahoumCR。精液和底泡液中白细胞体积计数染色。费尔蒂尔斯特利尔。1980;34(1):68-9.



218. 沙尔马克，帕斯夸洛托博士，纳尔逊博士，小托马斯博士，阿加瓦尔博士。在不孕症诊所治疗的男性中，精液白细胞计数与氧化应激之间的关系。J安德罗尔。 2001;22(4):575-83.
219. 从微生物学的角度来看，白细胞精子症的极限。仙女座。 2003;35(5):271-8.
220. 艾特肯RJ，贝克总部。精性白细胞：乘客、恐怖分子还是好的萨玛利亚人？Hum报告。 1995;10(7):1736-9.
221. 罗西AG，AitkenRJ。白细胞与男性生殖系统之间的相互作用。未回答的问题。AdvExp床比奥尔。 1997;424:245-52.
222. 高级定制M，乌尔斯坦M，伦纳德J，保尔森加州。改进了鉴别人精液中未成熟生殖细胞和白细胞的染色方法。仙女座。1976;8(1):61-6.
223. EzehUI，马丁M，库克ID，摩尔HD。免疫荧光定位检测无精子症患者的睾丸病理和精子提取与射精精子细胞的相关性。Hum报告。 1998;13(11):3061-5.
224. 巴博内蒂A，卡斯德尼C，德安德里亚S，科德斯奇G，桑图奇R，弗朗西维拉S等。抗精子抗体的流行率以及精子自身免疫程度与精液参数和性交后测试结果的关系：对10 000多名男性的回顾性分析。Hum报告。 2019;34(5):834-41.
225. KremerJ，JagerS。引起摇晃现象的抗精子抗体的特征，特别是免疫球蛋白类和抗原反应位点。IntJ安德罗尔。1980;3(2):143-52.
226. 精子抗体：它们在不孕不育中的作用。费尔蒂尔斯特利尔。 1984;42(2):171-83.
227. 布朗森R，库珀G，罗森菲尔德D，威特金党卫军。通过免疫珠结合和酶联免疫吸附试验检测不育夫妇中自发发生的精子定向抗体。纽约艺术科学。 1984;438:504-7.
228. 布朗森RA。通过免疫珠结合检测精子表面的精子特异性抗体。拱门仙女座。1982;9:61.
229. 克拉克GN。精液中的免疫结合蛋白抗体在：布拉塔诺夫K，编辑。生殖的免疫学。布加利亚：保加利亚科学院出版社；1982年。p. 462-85.
230. 地狱W，塞缪尔S，等待AB，超街JW。SpermMar和免疫珠试验对检测抗精子抗体的有效性的比较。费尔蒂尔斯特利尔。 1989;52(6):1027-31.
231. 免疫性男性不育的方法：MAR试验与直接免疫珠试验的比较。ActaEurFertil。 1987;18(1):55-7.
232. 麦克米伦RA，贝克HW。乳胶和聚丙烯酰胺珠检测精子抗体的比较。ClinReprodFertil。 1987;5(4):203-9.

233. 运动精子表面抗精子抗体的检测。免疫珠结合技术(IBT)与混合抗球蛋白反应(MAR)的比较。我代表免疫微生物公司。1988;18(4):120-3.
234. 阿布沙根, 贝尔姆, 库珀TG, 尼斯克拉格E。精子表面抗体对自然妊娠率的影响。费尔蒂尔斯特利尔。1998;70(2):355-6.
235. ChiuWW, 尚利路。抗精子抗体的临床关联及作用机制。费尔蒂尔斯特利尔。2004;82(3):529-35.
236. 王公, 帕斯洛JM, 豪厄尔RJ, 亨德利自然基金会。混合抗球蛋白反应和直接免疫珠试验检测低可育男性精子结合抗体的比较。费尔蒂尔斯特利尔。1992;57(6):1300-3.
237. 古尔德·杰, 巴西CK, 超街JW。精子-免疫珠的结合随着体外孵育而减少。费尔蒂尔斯特利尔。1994;62(1):167-71.
238. 巴拉特CL, 邓菲, 麦克劳德一世, 库克身份证。低到中等水平的精子表面结合抗体的预后价值较差。Hum报告。1992;7(1):95-8.
239. 冯德坎默, 谢特, 韦德纳, 库珀。前列腺功能标志物的评价。UrolRes。1991;19(6):343-7.
240. 库珀, 韦德纳, 尼斯拉。人类男性生殖道炎症对精液标志物-葡萄糖苷酶、甘油磷酸胆碱、肉碱、果糖和柠檬酸分泌的影响。IntJ安德罗尔。1990;13(5):329-36.
241. MoellingH, 格鲁伯。用柠檬酸裂解酶测定柠檬酸盐。肛门生物化学。1966;17(3):369-76.
242. Heite HJ, Wetterauer W. [精液中的酸性磷酸酶。估计方法和诊断意义。仙女座。1979;11(2):113-22.
243. 王J, 牛Y, 张C, 陈Y。一种通过离子掩蔽和统计分校正法快速测定动物饲料、宠物食品和饮用水中微量锌的微量板比色法。食物便宜。2018;245:337-45.
244. 约翰森O, 艾利亚森R。一种市售的人精浆中锌比色测定试剂盒的评价。IntJ安德罗尔。1987;10(2):435-40.
245. 库珀, 库珀, E。来自父亲的精液参数的变化。Hum报告。1991;6(6):859-66.
246. 在45000次射精中高锌浓度的流行率-未发表的数据。2021.
247. 卡沃宁MJ, 马尔姆M。果糖与碘合醇的比色测定。嘉林实验室投资。1955;7(4):305-7.



248. 帕金R, 查德拉因P, 杜贝JY, 特伦布雷RR. 人精浆和附睾1、4葡萄糖苷酶的生化特性。J安德罗尔。1984;5(4):277-82.
249. 库柏, 杨, 国立中山, 日本, 日本。通过使用抑制剂检测精液中的-葡萄糖苷酶来改善对人附睾功能的评估。IntJ安德罗尔。1990;13(4):297-305.
250. 马格努森, 拉尔森, 霍姆伯格, 弗拉纳根。输精管结扎术什么时候会成功? 实验室方面。仙女座。2019;第7页1:96-97.
251. 麦克劳德·J, 霍奇基斯先生。人类射精液中某些精子动物和化学成分分布。J Urol。1942;48(2):225-9.
252. 麦克劳德J, GoldRZ. 男性对生育能力和不孕不育的影响因素。三、。对1000名可生育男性和1000名不育婚姻男性的精子运动活动的分析。费尔蒂尔斯特利尔。1951;2(3):187-204.
253. BjorndahlL, KistU. 精囊液对人精子染色质锌含量的影响。IntJ安德罗尔。1990;13(3):232-7.
254. 库斯特, 杰尔伯格, 比达尔, JC, ArverS. 来自沃尔夫管发育不全的男性的精液: 锌结合特性及其对精子染色质稳定性的影响。IntJ安德罗尔。1990;13(4):245-52.
255. 克尔伯格, 奎斯特大学。精子染色质锌较低的男性的射精序列。IntJ安德罗尔。1991;14(3):174-8.
256. 人类精子在不同射精部分的存活。费尔蒂尔斯特利尔。1973;24(7):521-6.
257. LundquistF. 人类精液的生物化学方面。生理扫描。1949;19日,第66页:1-108.
258. 贝斯万格JC, 迪顿JL, 贾罗JP. 部分射精管阻塞导致精子早期死亡。泌尿外科。1998;51(1):125-7.
259. 艾森伯格, 沃尔什, 加西亚, 真原, 导师PJ. 正常男性和射精管梗阻患者的射精管测压术。J Urol.2008年;180(1):255-60;讨论60年。
260. 菲施H, 康妍, 约翰逊股份有限公司, 戈鲁博夫等。按摩管阻塞。CurrOpinUrol。2002;12(6):509-15.
261. LottiF、科罗娜G、CocciA、奇普里亚尼、巴尔迪E, 因诺森尼等。不育和生育男性前列腺中线囊肿的患病率及囊肿大小与精液参数的关系。Hum报告。2018;33(11):2023-34.
262. 纳格勒HM, 罗特曼M, 佐尔坦E, 菲什H. 部分射精管阻塞的自然病史。J Urol。2002;167(1):253-4.
263. 我们先生, 奥尔汉一世, 菲尔多拉, 科卡科克E. 射精管梗阻的临床和放射学评价。拱门仙女座。2007;53(4):179-86.

264. SmithJF, 沃尔什, TurekPJ. 按摩管阻塞。UrolClin北美。2008; 35(2): 221-7, 第二。
265. 李, 李, 李, 李。经尿道手术治疗射精管阻塞前后的精液参数。J Urol. 1996;155(4):1291-3.
266. 李, 李, 李, 黄。经尿道射精管切除术: 梗阻的病因和手术治疗选择。费尔蒂尔斯特利尔。 2019;111(3):427-43.
267. ChanPTK, 8月M。由射精管梗阻引起的不孕症可以通过手术加以纠正——这在男性生殖泌尿外科是一个被遗忘的教训。费尔蒂尔斯特利尔。 2018;110(7):1275-6.
268. 我, 阿布埃克继承人, 我。不孕男性经尿道射精管切除术: 成功的结果和预测因素。Int尿肾。 2012;44(6):1623-30.
269. 哈尔彭, 布兰尼根, 施莱格尔。增强生育能力的男性生殖手术: 回顾过去和对未来的想法。费尔蒂尔斯特利尔。 2019;112(3):426-37.
270. 卡迪奥格鲁, 卡扬, 特费克利, 奥尔汉I, 恩金G, 图里克PJ。不孕症男性对射精管阻塞治疗的反应是否因病理而异? 费尔蒂尔斯特利尔。 2001;76(1):138-42.
271. 射精管阻塞: 目前的诊断和治疗。CurrUroI众议员。 2013;14(4):291-7.
272. 菲希H, 兰伯特SM, 戈鲁博夫等人。射精管阻塞的管理: 病因、诊断和治疗。世界JUroI。 2006;24(6):604-10.
273. 莫蒂默D, 比约恩达尔L, 巴拉特CLR, 卡斯蒂利亚JA, 门克维尔德R, KvistU等。基础实验室男科的实用指南。1st ed. 剑桥, 英国; 纽约: 剑桥大学出版社; 在出版社。
274. AmelarRD, HotchkisRS。分裂射精: 它在男性不育症管理中的应用。费尔蒂尔斯特利尔。 1965;16:46-60.
275. 艾森伯格ML, 李S, 贝尔B, 佩拉RR, 卡伦先生。精液生产与医学共病的关系。费尔蒂尔斯特利尔。 2015;103(1):66-71.
276. 塞尔瓦拉朱五世, 巴斯卡兰, 阿加瓦尔, 汉高。环境污染物与男性不育的影响和机制。仙女座。2020:e13646.
277. 李文, 乔根森, 乔根森, 安德拉德, 门迪奥拉, 明德里斯等。精子计数的时间趋势: 系统回顾和元回归分析。Hum复制更新。 2017;23(6):646-59.
278. 我的名字。不育男性的染色质凝结、DNA片段和表观遗传特征的差异。最好的演讲是一个内分泌指标。2019;33(1):117-26.





279. 琼斯, 曼特, 谢林斯。人精子中磷脂的过氧化物分解、脂肪酸过氧化物的杀精特性和精浆的保护作用。费尔蒂尔斯特利尔。1979;31(5):531-7.
280. 阿尔瓦雷斯股份有限公司, 试金石JC, 布拉斯科L, 商店BT。人精子中自发的脂质过氧化和产生过氧化氢和超氧化物。超氧化物歧化酶是主要的氧毒性酶保护剂。J安德罗尔。1987;8(5):338-48.
281. 艾特肯RJ, 克拉克森JS。精子功能缺陷的细胞基础及其与人类精子产生活性氧的关系。JReprodFertil。1987;81(2):459-69.
282. 比什特, 达达R。氧化应激: 疾病病理中的主要刽子手, 在精子DNA损伤中的作用和预防策略。前生物科学(ScholEd)。2017;9:420-47.
283. 精子中的活性氧和蛋白质修饰。生物醇的复制。2017;97(4):577-85.
284. 艾特肯RJ。氧化应激对男性和女性生殖细胞的影响: 对生育能力的影响。复制。2020;159(4):R189-R201.
285. DiasTR。化学发光法测定精液样品中活性氧。方法MolBiol。2021;2202:103-9.
286. 米勒, 赖斯-埃文斯, 戴维斯。一种测定抗氧化活性的新方法。生物化学Soc链。1993;21(2):95S.
287. 新泽西, 莱斯-埃文斯。ABTS.+自由基阳离子测定抗氧化活性的因素。免费的雷达。1997;26(3):195-9.
288. 徐F, 郭, 朱吴, 范L。人类精子顶体功能分析可以预测体外受精率: 回顾性队列研究和荟萃分析。前列腺生物醇内分泌。2018;16(1):81.
289. 弗兰肯博士, 巴斯蒂安博士, 奥宁格SC。人类精子中顶体反应的生理诱导: 使用最小体积的溶解的同源透明带的微分析验证。J协助ReprodGenet。2000;17(3):156-61.
290. L, 马布里亚尼, M, 卢科尼, 孕酮, 精子和生殖: 最新综述。Mol细胞内分泌。2020;516:110952.
291. 刘迪, 贝克HW。在精子-ZP结合正常的男性中, 透明带(ZP)与离子载体a23187诱导的顶体反应与精子穿透ZP的能力之间的关系。费尔蒂尔斯特利尔。1996;66(2):312-5.
292. FierroR, FoliguetB, G里格农G, DanielM, BeneMC, FaureGC等。顶体反应中人类精子的凝集素结合位点: 电子显微镜/流式细胞术判断的修饰。拱门仙女座。1996;36(3):187-96.



293. 评价人类精子顶体状态的方法。P, 帕里诺J, 编辑。人类精子顶体反应。颜色INSERM。巴黎: 约翰·利比的欧洲文本; 1995年。p. 277-85.
294. 艾特肯出版社, 白金汉宫, 方建家出版社。利用一种新的技术评估顶3187, 分析人类精子对A23187的反应。J安德罗尔。 1993;14(2):132-41.
295. 金斯, 杨WX。参与获能的因素和途径: 它们是如何被调节的? Onco目标。2017;8(2):3600-27.
296. 十字N。两种检测顶体反应的人类精子的简单方法。配子研究。1986;15:213-26.
297. 莫蒂默D, 柯蒂斯EF, 米勒RG。用花生凝集素对人精子外顶体膜的特异性标记。JReprodFertil。1987;81(1):127-35.
298. S, A, J。单载体挑战后人类精子顶体反应与生育能力和其他精性参数的关系的检验。男科杂志。 1991;12:98-103.
299. 克劳斯C, 邦格拉西L, 马乔P, 卢科尼M, 克里斯库利L, FuzziB等。精子对黄体酮反应性的两种功能分析及其对体外受精的预测价值。Hum报告。1996;11(8):1661-7.
300. BjorndahlL, KistU。锌在射精后人类精子染色质稳定动力学中的重要性及与精子DNA脆弱性相关的模型。SystBiolReprodMed。2011;57(1-2):86-92.
301. 影响胚胎质量的父因素。J协助ReprodGenet。 2018;35(11):1953-68.
302. 马尔基亚尼, 坦伯里尼, 贝尼尼, 范法尼, 杜尔斯, 拉斯特雷利G等。精子动物中染色质蛋白化和陷阱的表达可以预测辅助生殖程序后的临床结果。Sci众议员。 2017;7(1):15122.
303. 马尔奇亚尼S, 坦布里诺L, 奥利维托B, 贝蒂L, AzzariC, FortiG等。人精液中流式细胞仪群的表征和分选。仙女座。 2014;2(3):394-401.
304. SmithJF, 叙利亚语O, 地狱M, 服务器C, 曼诺维茨N, KirichokY等。在catsper2缺陷的不育患者中, 孕酮激活的主要精子ca<sup>2+</sup>通道的破坏。我们是科学。 2013;110(17):6823-8.
305. 任D, 纳瓦罗B, PerezG, 杰克逊AC, 徐S, ShiQ等。一种维持精子活力和男性生育能力所需的精子离子通道。自然。 2001;413(6856):603-9.
306. 布朗, 巴拉特CLR, 马丁达席尔瓦。人类精子离子通道(dys)功能: 对受精的影响。Hum复制更新。2019;25(6):758-76.



307. 罗T、陈海、邹QX、王T、程美、王HF等。CATSPER2的一种新的拷贝数变异会导致精液参数正常的特发性男性不育。Hum报告。2019;34(3):414-23.
308. 凯利MC, 布朗SG, 科斯特洛SM, 拉马林加姆M, 德鲁E, 公共平台SJ等。亚生育能力男性[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>信号的单细胞分析: 特征和与受精结果的关系。Hum报告。2018;33(6):1023-33.
309. 戴维斯RO, KatzDF。CASA仪器的标准化和可比性。J安德罗尔。1992;13(1):81-6.
310. 莫蒂默D, 编辑。CASA在人类临床男科和ART实验室的常规应用。第13届国际气候学研讨会; 2018年; 纽约斯德哥尔摩: 短跑运动员; 2021年。
311. 莫蒂默D, 艾特肯RJ, 莫蒂默S, 佩西AA。研讨会报告: 临床CASA——寻求共识。繁殖、生育能力和发育。1995;7(4):951-9.
312. ESHRE男科特别兴趣集团。CASA技术在精子分析中的应用指南。1998年1月。报告没有。: 02681161(打印)合同编号。: 13.
313. 自由的T, 让M, 米拉莉S, 障碍P。年轻可育供者的计算机辅助精子分析参数及其与年龄的关系。SystBiolReprodMed。2012;58(2):102-6.
314. 袁P、张子、罗C、权S、楚Q、赵S。[评估体外受精过程中精子流动性参数的计算机辅助精子分析]。南山可达薛宝。2013;33(3):448-50.
315. 消费者G, 加拉格尔MT, 史密斯澳大学, 柯克曼-布朗J, 编辑。头部和尾部。精子活力的信息和稳健计算测量。第十三届秘鲁气候学国际研讨会; 2018年; 斯德哥尔摩。纽约: 施普林格; 2021年。
316. 加拉格尔MT, 客户G, OoiEH, 柯克曼-布朗JC, 史密斯DJ。快速精子捕获: 高通量鞭毛波形分析。Hum报告。2019;34(7):1173-85.
317. 定时器ST。哺乳动物精子运动的生理重要性和分析。Hum复制更新。1997;3(5):403-39.
318. 朱JJ, 佩西AA, 巴拉特CL, 库克ID。计算机辅助的人类精子过度活化的计算机测量: 欧洲和美国版本的汉密尔顿-索恩运动分析器之间的差异。Hum报告。1994;9(3):456-62.
319. 摩梯末D, 摩梯末ST。计算机辅助精子分析(CASA)。方法MolBiol。2013;927:77-87.
320. 古德森SG, 怀特S, 斯特万斯AM, 帕特S, 高CY, JaworskiS等。CASAnova: 一种用于人类精子运动模式分类的多类支持向量机模型。生物醇的复制。2017;97(5):698-708.



321. OoiEH, 史密斯DJ, 加德尔哈H, 加夫尼EA, 柯克曼-布朗J. 在粘附的人类精子中的过度活化机制. RSoc开放Sci. 2014;1(2):140230.
322. 加勒特C, 贝克HW. 一种新的全自动的人类精子头部形态测量分析系统. 费尔蒂尔斯特利尔. 1995;63(6):1306-17.
323. 球拍FA, 克鲁格TF, 杜托伊特TC, 伦巴第CJ, 桑切斯萨米恩托CA, 德维利耶斯A等. 幻灯片制备和染色程序, 可靠的结果. 拱门仙女座. 1996;36(2):133-8.
324. 门克维尔德R, 球拍足总, 克鲁格, 伦巴第CJ, 桑切斯萨米门托C, 德维利耶斯A. 不同染色和洗涤程序对手工和计算机方法评价人精子形态评估结果的影响. 仙女座. 1997;29(1):1-7.
325. 库切K, 克鲁格联邦有限公司, 伦巴第群岛有限公司. 多重计算机辅助(IVOS)精子形态读数的重复性和方差分析. 仙女座. 1999;31(3):163-8.
326. 库切K, 克鲁格TF, 伦巴第CJ, 肖内西D, 奥赫宁格S, OzgurK等. 使用汉密尔顿索恩研究综合视觉光学系统精液分析仪评估实验室间和流产内的精子形态读数. 费尔蒂尔斯特利尔. 1999;71(1):80-4.
327. 库切, 克鲁格, 伦巴第群岛. 使用自动精子形态学分析仪(IVOS)的临床价值. 费尔蒂尔斯特利尔. 1999;71(2):222-5.
328. 硕士、马何、李华、夏世、黄YF、王华. [流式细胞术评估精索静脉曲张患者中精子质膜的完整性]. 中华南柯薛. 2011;17(11):984-8.
329. Isobe T. 利用计算机辅助精子分析来估计自然妊娠可能性的新方法. SystBiolReprodMed. 2012;58(6):339-47.
330. JL, 田S, 独奏C, RecreoP, 卡雷特罗T, BonoA等. 比较不同的统计方法来评估男性形态测量精子亚群的情况. 亚洲J安德罗尔. 2016;18(6):819-23.
331. 路JC, 黄YF, 路NQ. 计算机辅助精子分析: 过去、现在和未来. 仙女座. 2014;46(4):329-38.
332. 测试A, 拉姆劳-汉森CH, 邦德JP, 图尔斯特鲁普AM, 克里斯滕森SL, Tof特G. 使用166名丹麦年轻男性的样本进行常规精液分析和计算机辅助精液分析(脆软件)的比较. 亚洲J安德罗尔. 2011;13(3):453-8.
333. 胡耀, 路JC, 邵耀, 黄YF, 路NQ. 对两种品牌的计算机辅助精子分析系统的精液分析结果进行比较. 仙女座. 2013;45(5):315-8.
334. 用于人类精子活力分析的精子类分析仪(SCA)CASAMot系统能否降低不精确性和操作者的主观性, 并提高精液分析? HumFertil(Camb). 2019:1-11.



335. 迪林卡格, 基尔本, 林赛。在繁忙的诊断精液分析实验室验证精子类分析仪CASA精子计数系统。HumFertil(Camb)。2014;17(1):37-44.
336. 失去M, 猴子LK, 德米尔A, BozdagG, GunalpS。人工与计算机自动的精液分析。ClinExp肥胖男性。2014;41(6):662-4.
337. 障碍J, 分裂C, 障碍P, 让M, 自由T。双盲前瞻性研究, 比较了两种自动精子分析仪与人工精液评估仪。J协助ReprodGenet。2014;31(1):35-43.
338. 厄巴纳诺, 马森, 维米尔耶, 坎。时间滞后图像中人类精子的自动跟踪和运动性分析。IETTransMed成像。2017;36(3):792-801.
339. 魏, 赵, 黄志, 徐立, 李志, 初步精子分析的集体跟踪方法。BiomedEng在线。2019;18(1):112.
340. 艾尔赛耶德, 艾伯德。利用Image-J开发了用于分析微流控环境下精子运动的计算机辅助精子分析插件。热原性学。2015;84(8):1367-77.
341. 用单球镜头显微镜和智能手机用于男性不育筛查的新设备。费尔蒂尔斯特利尔。2016;106(3):574-8.
342. 霍姆斯, 奎斯特。低渗挑战通过尾巴的卷曲和折叠, 降低了人类精子的活力。仙女座。2020:e13859.
343. 精浆对人类精子获能和过度活化的影响。Hum报告。1998;13(8):2139-46.
344. 卡纳尔D, Giorgi总理, 加斯佩里尼M, 普奇E, 巴莱塔D, 加斯佩里M等人。用分层、颗粒和球孔三种不同技术选择后精子形态的个体间和个体内变异。J内分泌投资。1994;17(9):729-32.
345. 汉高: 最先进的精子制备生理方面和先进精子制备方法的应用。亚洲J安德罗尔。2012;14(2):260-9.
346. A卷, 萨马塔诺F, 里萨里S, 古洛S, 马里诺A, 阿莱格拉A。颗粒游动是在体外受精过程中制备精子的最佳技术。J协助ReprodGenet。2016;33(6):765-70.
347. 汉高公司, 希尔世界银行。抗逆转录病毒治疗的精子准备。前列腺生物醇内分泌。2003;1:108.
348. 艾特肯RJ, 克拉克森JS。活性氧和抗氧化剂在确定精子制备技术的有效性中的意义。J安德罗尔。1988;9(6):367-76.
349. IwasakiA, GagnonC。不育患者精子中活性氧的形成。费尔蒂尔斯特利尔。1992;57(2):409-16.



350. 宫内授精的精液制备技术。Cochrane数据库系统牧师。2007（4）：Cd004507.
351. 西蒙L, 埃默里B, 卡雷尔DT. 精子DNA片段：生殖的后果。AdvExp床比奥尔。2019;1166:87-105.
352. 贾亚拉曼五世, 乌帕迪亚D, 纳拉扬PK, AdigaSK. 通过游泳和密度梯度处理精子是有效地消除DNA损伤的精子。J协助ReprodGenet。2012;29(6):557-63.
353. 艾特肯RJ, 芬尼JM, 穆西奥L, 怀廷S, 康诺顿HS, KuczeraL等. 过渡金属在精子制备介质诱导DNA损伤中的潜在重要性。Hum报告。2014;29(10):2136-47.
354. 穆拉托里, 塔拉兹, CambiM, BoniL, Passaro, 帕萨罗C等. 辅助生殖技术中精子密度梯度选择过程中DNA片段水平的变化：一个可能的新的男性妊娠预测参数？医学（巴尔的摩）。2016;95(20):e3624.
355. 我是我, 伊斯兰教徒, 索德伦德一世, 奎斯特U. 精子选择过程中精浆因子的污染。J安德罗尔。2005;26(2):170-3.
356. 鲁伊斯-迪亚兹, 精子选择改善试管受精和ICSI结果的新技术。前细胞Dev生物醇。2019;7:298.
357. 国际标准组织。ISO15189：2012医学实验室-对质量和能力的要求。日内瓦2012。
358. 利平S, 麦克道尔S, 塞尔LM, KroonB, 格鲁约夫斯基D, 雅兹达尼A. 先进的辅助生殖的精子选择技术。Cochrane数据库系统牧师。2019;7:CD010461.
359. 经磁激活细胞分选后, 人类精子、人类精子、人类精子、人类精子的DNA片段。J协助ReprodGenet。2015;32(1):147-54.
360. 扎弗M, 霍瓦斯H, Mmej0, 范德波尔S, 森普林尼A, 卢瑟福G等. 清洗精液以预防人类免疫缺陷病毒（艾滋病毒）传播和协助与艾滋病毒不一致的夫妇怀孕的有效性：系统回顾和荟萃分析。费尔蒂尔斯特利尔。2016;105(3):645-55 e2.
361. 吉林-史密斯C公司, 尼科普洛斯JD公司, 森普林尼AE公司, 弗罗德沙姆LC公司. 艾滋病毒和生殖护理——对当前实践的回顾。慢跑。2006;113(8):869-78.
362. 萨瓦西五世, 费拉齐E, 兰扎尼C, 奥内塔M, 帕里拉B, 佩尔西科T. 741对hiv-1血清不一致夫妇的精子清洗的安全性和抗逆转录病毒治疗的结果。Hum报告。2007;22(3):772-7.
363. 傅里先生, 洛斯库托夫N, 休瑟C. 精液去污以消除开创性的HIV-1。在网上复制。2015;30(3):296-302.

364. 吉林-史密斯C, 埃米利亚尼S, 阿尔梅达P, 李斯纳德C, 英格兰Y. 血传播病毒患者在辅助繁殖过程中的实验室安全。Hum 报告。2005;20(6):1433-8.
365. 输出y先生、吴W、莱丘曼南M、邦迪L、安东尼乌T、马戈利斯S等人。对异性恋血清不一致伴侣之间的艾滋病毒传播的系统回顾，其中艾滋病毒阳性伴侣在抗逆转录病毒治疗中被完全抑制。PLoS1. 2013;8(2):e55747.
366. 《争议》，《O》，《M周》，《艾维》，《尼拉吉拉》等。通过抗逆转录病毒治疗、抑制病毒载量和安全套使用导致人类免疫缺陷病毒性传播的风险：系统综述。cma.j. 2018;190(46):E1350-E60.
367. 罗杰·AJ, 坎比亚诺五世, 布鲁恩, 维尔纳扎, 柯林斯, 范伦岑J等人。当艾滋病毒阳性伴侣使用抑制性抗逆转录病毒疗法时，血清不同的血清伴侣中艾滋病毒传播的风险。jama. 2016;316(2):171-81.
368. 德尔罗梅罗J, 里约热内卢I, 卡斯蒂利亚J, 巴扎B, 帕雷德斯V, 维拉M等。没有从艾滋病毒感染者传播到异性血清不一致伴侣。铁蛋白感染微生物Clin. 2015;33(10):666-72.
369. 马哈德万M, 利顿JF, 特朗森奥。无创采精法成功人工授精。费尔蒂尔斯特利尔。1981;36(2):243-7.
370. 邦吉RG, 基特尔WC, 谢尔曼JK. 冷冻精液临床应用：4例。费尔蒂尔斯特利尔。1954;5(6):520-9.
371. BungeRG, 谢尔曼JK. 冷冻人精子的受精能力。自然。1953;172(4382):767-8.
372. 波尔奇C, 史密斯大学, 帕克斯大学。低温玻璃化和脱水后精子的恢复。自然。1949;164(4172):666.
373. 克拉克GN, 伯恩H, 赫尔P, 约翰斯顿I, 斯皮尔A, McBainJC等。利用供体精子进行人工受精和体外受精：一篇关于15年工作经验的报告。Hum报告。1997;12(4):722-6.
374. 大卫G, CzyglikM, 马约MJ, 马丁-博伊斯A, 施瓦茨D. 冷冻精子人工授精：1188名妇女的方案、分析方法及结果。Br J Obstet Gynaecol. 1980;87(11):1022-8.
375. 非家养物种的配子和胚胎的低温保存。热原学。2002;57(1):303-26.
376. 佩洛夫, 斯坦伯格, 谢尔曼JK. 氮气技术冷冻人精子动物的概念。费尔蒂尔斯特利尔。1964;15:501-4.
377. 人类精子冷冻技术的目前和未来的概念和实践。在网上复制。2004;9(2):134-51.

378. KeelBA, 韦伯斯特BW。精液低温保存的方法和结果。在: BarrattCLR, 库克ID, 编辑。捐赠者授精。剑桥: 剑桥大学出版社; 1993年。p. 71-96.
379. 谢尔曼JK。人类精液的冷冻保存。龙骨学士学位, 韦伯斯特出版社, 编辑。不孕症实验室诊断和治疗手册。博卡拉顿: CRC出版社, 1990年。p. 229-59.
380. 沃森PF。精子低温保存的最新进展和概念及其解冻后功能的评价。繁殖、生育能力和发育。 1995;7(4):871-91.
381. 克拉克出版社, 刘迪出版社, 贝克出版社。使用冷低温保护剂改善了精子的低温保存。繁殖、生育能力和发育。 2003;15(7-8):377-81.
382. NijsM, 克里默斯E, 考克斯A, 詹森M, 范豪斯登E, 卡斯特罗-桑切斯Y等人。冻融对人精子透明质酸结合的影响。在网上复制。 2009;19(2):202-6.
383. 关惠、郑叶、王JJ、孟TQ、夏W、胡SH等。供体精子参数与宫内授精后妊娠结局的关系: 对1355对夫妇中2821个周期的分析。仙女座。 2016;48(1):29-36.
384. 克拉克出版社, 刘迪出版社, 贝克出版社。在液氮中储存超过28年后, 人类精子活力和与人类透明带相互作用的能力的恢复。费尔蒂尔斯特利尔。 2006;86(3):721-2.
385. 巴西塞尔, 杜索, 莱文。成功储存精子28年。费尔蒂尔斯特利尔。 2005;84(4):1017.
386. 沙玛, 加图尔, 阿加瓦尔。精子储存和选择技术对精子参数的影响。SystBiolReprodMed。 2015;61(1):1-12.
387. OktayK, 哈维, 帕特里奇A, 奎因全科医生, 莱内克J, 泰勒HS等。癌症患者的生育能力保护: ASCO临床实践指南更新。JClin协议。 2018;36(19):1994-2001.
388. 科罗娜G, 米哈斯S, 吉韦尔曼A, 贝托奇C, 丁克尔曼-SmitM, DohleG等。非阻塞性无精子症男性患者的精子恢复和ICSI结果: 系统综述和荟萃分析。Hum复制更新。 2019;25(6):733-57.
389. 库钦斯基, 唐特, 格里戈鲁克, 格罗乔夫斯基, Wołczynski, 萨马托维茨M。胞浆内注射新鲜和冷冻保存的射精精子的结果, 这是一项前瞻性随机研究。Hum报告。2001; 16(10): 2109-13.
390. 尼科普洛斯JD, 吉林-史密斯C, 拉姆齐JW。阻塞性无精子症的原因是否影响胞浆内精子注射的结果: 荟萃分析。BJUInt。 2004;93(9):1282-6.
391. M, 沙拉菲M, 汉高R, 阿加瓦尔A, 埃斯梅利V等。精子低温保存: 综述了目前的分子低温生物学和先进的方法。在网上复制。 2018;37(3):327-39.



392. 李K, 罗德里格斯D, 加布里埃尔森, 森森托拉通用, 坦里库特C. 变性人的精子冷冻保存: 过去十年的趋势和发现。仙女座。2018;6(6):860-4.
393. 斯塔默BZ, BairdA, 幸运的马。对睾丸创伤患者保留生育能力的考虑事项。BJUInt。2018;121(3):466-71.
394. 对患有恶性肿瘤的青少年和成人精子的冷冻保存。J安德罗尔。2004;25(4):586-92.
395. 伯恩, 有钱, 刘迪, 克拉克, 哈拉里, 贝克。胞浆内注射的精子制备: 方法及与受精结果的关系。繁殖、生育能力和发育。1995;7(2):177-83.
396. 霍克斯沃斯DJ, 萨夫ranAA, 乔丹PW, 多布斯, 赫拉蒂阿斯。克兰费尔特综合征患者的不孕症: 精子和睾丸组织低温保存的最佳时机。牧师Urol。2018;20(2):56-62.
397. 柯克曼-布朗JC, 马丁斯MV。“基因与儿童”: 如果目标是为人父母, 我们会使用最佳的方法吗? Hum报告。2020;35(1):5-11.
398. 在液氮中冷冻保存的人体标本解冻前的可靠程序: 用无菌液氮(SLN2)洗涤三次。费尔蒂尔斯特利尔。2012;98(4):870-5.
399. 泰德, 祖克曼, 戈德斯通, 霍金斯, 菲尔丁, 布里格斯EM等。来自受污染的冷冻保存罐的乙肝传播。柳叶刀。1995;346(8968):137-40.
400. 汤姆林森M。管理与低温保存相关的风险。Hum报告。2005;20(7):1751-6.
401. 范, 库柏, 杨志, 阿尔。e. 冷冻前游泳提高冷冻保存的人类精子质量。IntJ安德罗尔。1994;17(3):115-20.
402. MachenGL, HarrisSE, Bird等, BrownML, IngalsbeDA, EastMM等。利用冷冻保存的精子细胞进行储存。入侵ClinUrol。2018;59(3):177-81.
403. 刘S, LiF。单个精子的冷冻保存: 我们今天在哪里? 前列腺生物醇内分泌。2020;18(1):41.
404. 伊萨琴科五世, 拉希米, 马尔曼, 桑切斯, 伊萨琴科。人精子无冷冻保护剂玻璃化技术: 无菌性作为有效性标准。仙女座。2017;5(6):1055-63.
405. 伯科维茨, 米勒, 西尔伯曼, 贝伦基, 伊西克森。一种利用精子玻璃化装置冷冻少量精子的新解决方案。Hum报告。2018;33(11):1975-83.



406. 李YX, 周L, 吕MQ, GeP, 刘YC, 周DX. 精子冷冻保存中的玻璃化和常规冷冻方法: 系统综述和元分析。你是妇科医生的代表。 2019;233:84-92.
407. 桑切斯, 约翰逊, 舒尔茨, 维勒加斯。V., Isachenko, V., &Isachenko, E. 玻璃化精子库: 新的人类精子无菌技术允许在-86° C处低温保存。雄激素生殖痛。2012; 44 (6): 433 - 435.
408. 舒尔茨, M., 约翰逊, J., 乌里贝, 伊萨琴科, 伊萨琴科, 桑切斯, R. 人类精子的玻璃化作用: 一篇科学报告。仙女座。 2020:8(6):1642 - 1650.
409. 库珀, 阿特金森广告, E. 有精子学外部质量控制的经验。Hum报告。 1999;14(3):765-9.
410. 精液分析和精液分析的外部质量控制方案需要全球标准化。IntJ安德罗。 2002;25(5):306-11.
411. Matson PL. 精液分析和精子抗体检测的外部质量评估: 一个试点方案的结果。Hum报告。 1995;10(3):620-5.
412. 莫蒂默D, 比约恩达尔L, 巴拉特CLR, 卡斯蒂利亚JA, 门克维尔德R, KvistU等。基础实验室男科的实用指南。1st ed. 剑桥, 英国; 纽约: 剑桥大学出版社; 在出版社。
413. 男科实验室的外部质量控制: 一个多中心实验性试验。费尔蒂尔斯特利尔。 1990;54(2):308-14.
414. 体外受精实验室的质量和风险管理。2nd ed. 剑桥: 剑桥大学出版社; 2015年: 402年。
415. Westgard JO. 第二版的前言。乔, 编辑。基本的质量控制实践: 对医疗保健实验室的统计质量控制进行培训。美国威斯康星州麦迪逊市: QC出版; 2002年。
416. BohringC, KrauseW. 间接混合抗球蛋白反应试验的测定内和试验间的变化: 质量控制是否合适? Hum报告。1999;14(7):1802-5.
417. 库斯特C, 歌手RS, 阁楼GC. 确定精子形态学评估的样本量。热原学。 2004;61(4):691-703.
418. BlandJM, AltmanDG. 评估两种临床测量方法之间一致性的统计学方法。柳叶刀。 1986;1(8476):307-10.
419. 阿米蒂奇, 贝瑞, 马修斯。医学研究中的统计学方法。牛津: 布莱克威尔科学; 2002: 826
420. 莫图尔斯基H. 直观的生物统计学-一个关于统计学思维的非数学指南。4th ed. 牛津大学: 牛津大学出版社; 2017: 608
421. BurtisCA, 阿什伍德ER. 临床化学教科书。费城伦敦多伦多蒙特利尔悉尼悉尼w. b. 桑德斯公司1999: 1917

422. 普劳特DA, 韦斯特加德JOW. 直流外质量评估。作者: 编辑韦斯特加德·JO。基本的QC实践: 对医疗保健实验室的统计质量控制进行培训。美国州麦迪逊市: QC出版; 2002. p. 125-63.
423. 肯布朗斯基GS, 凯里RN. 实验室质量管理。芝加哥: ASCP出版社; 1989年。
424. 库珀TG, 努南E, 冯埃克德斯坦S, 奥杰J, 贝克总部, 贝尔HM等。世界卫生组织对人类精液特征的参考值。Hum复制更新。 2010;16(3):231-45.
425. 福特WC. 对世界卫生组织人体精液检查和处理实验室手册第五版发布的评论。亚洲J安德罗尔。 2010;12(1):59-63.
426. 麦克劳德J, GoldRZ. 男性对生育能力和不孕不育的影响因素。二、二。包括1000名已知生育男性和1000例不孕婚姻。泌尿学杂志。 1951;66(3):436-49.
427. 博伊德JC. 定义实验室参考值和决策限制: 人群、时间间隔和解释。亚洲J安德罗尔。 2010;12(1):83-90.
428. L, 巴拉特, 莫蒂默, 朱安内特。 “如何正确计算精子”: 基于人类精液分析的研究的可接受性清单。人类繁殖学(英国牛津大学)。 2016;31(2):227-32.
429. OzardaY, 西卡里斯K, 斯特雷切特T, MacriJ, 区间ICoR, 决定L。区分参考间隔和临床决策限制-由IFCC参考间隔和决策限制委员会进行的审查。Clin实验室科学。 2018;55(6):420-31.
430. 亨尼J。 “我的实验室结果正常吗?” 关于参考间隔和决策限制的考虑。ejifcc。 2008;19(2):106-14.
431. 戈麦斯E, 艾特肯J. 体外受精培养基对人精子过氧化物损伤的影响。费尔蒂尔斯特利尔。 1996;65(4):880-2.
432. 摩梯末D, 摩梯末ST. 精子、卵母细胞和胚胎的培养基发育的基本特征。编辑QuinnP. 人类抗逆转录病毒治疗中的文化媒体、解决方案和系统。剑桥大学: 剑桥大学出版社; 2014年。 p. 47-67.
433. 比格斯JD, 惠顿WK, 惠廷汉姆DG. 小鼠胚胎的体外培养。作者: DanielJC, 编辑。哺乳动物胚胎学方法。美国加州旧金山: 弗里曼; 1971年。 p. 86-116.
434. 奎因P, KerinJF, KerinJF, 通用汽车警告道。使用基于人输卵管液组成的培养基提高人体外受精的妊娠率。费尔蒂尔斯特利尔。 1985;44(4):493-8.
435. 接吻。在人类中的生育能力。伦敦: 威廉·海因曼医学书籍; 1945年。
436. 艾利亚森R. 对人类精液的调查的标准。仙女座。 1971;3:49-64.
437. 盖吉的科学表。卷。1: 测量单位, 体液, 身体成分, 营养。巴士底: 汽巴吉有限公司; 1981: 50.

9789240030787



9 789240 030787