

## 精液分析程序

### 总则:

男性不孕症的分析指标之一就是精液常规的分析，也称为精子记数。精子记数这一名称并不准确，因为精子的分析不仅仅包括精子的记数，而且也包括精子活力和形态的检测。

### 临床意义:

精液分析是目前诊断男性不孕症的唯一也是最重要的诊断方法。其结果与精子的受精能力以及体内胚胎的发育，有密切的联系。

### 样本:

精液需经手淫法收集到医院指定的无菌塑料容器内。必须在 1 小时以内处理。其他的方法不推荐，但可以经研究使用。不能使用常规避孕套收集精液，因为避孕套内含有杀精子的成分，影响精液分析结果。如必须使用避孕套，则由实验室提供特殊的避孕套。

### 患者准备:

患者需与医生预约辅助受精的日期，如 IVF，GIFT，IUI，ICSI 等。应通知患者下述事项：禁欲时间、取精时间、送精液到实验室和标签的用法。医生同时应提供给患者一份“精液分析患者取精指南”。同时附上带有医生签名的精液收集表，作为清洗精液的书面指示。如果没有这份表，应告知患者复印此表，在取精之前让患者充分阅读取精方法。

1. 患者应在取精前 2-3 天内禁止一切性活动，包括手淫。禁欲时间过长或过短，都会影响结果。
2. 患者取精前必须洗手，阴茎必须干净。

### 类型:

1. 精液经手淫法取得。
2. 精液需收集到无菌的精杯中 (Corning cat # 25400250, or Baxter cat # C8827-4, 或其他的经小鼠合子质控合格的无胚胎毒性的杯子)。不能从家中带杯子来，需从医生处获得。为避免污染，杯盖只在取精前打开。取精后，马上盖上盖子。不能触摸杯子的内部。如果取精后又泼出，绝对不能重新放入杯子。在精液分析表中的问题 3 中注明。
3. 如果患者在其他地方取的精液指标不合格，(例如 一级精子<25%),就应该安排下一次在医院取精。并在最短的时间内送到实验室。
4. 患者任何正在治疗的情况必须在精液收集表上注明。一些心脏病的药如钙离子通道阻断剂可能对精子有毒害作用。

## 处理条件:

### 1. 时间

- a. 患者应在禁欲 2-3 天后取精。禁欲期间禁止一切性活动，包括手淫。
- b. 精液取出 1 小时之内，必须送往实验室。最好在医院指定的位置取精。精液标本不能暴露在过高或过低的温度中。运送精液应放在贴身体的部位保温。（不能放在包中或纸袋中）。如果不能在 1 小时之内将精液送回实验室，或者精液常规结果不好（记数或活力太低），都应在医院的取精室内取精。这样可能会取得较好的结果。

### 2. 在处理精液和精子的整个过程中，严格无菌操作。

## 设备和材料:

### 设备:

1. 相差或微分干涉显微镜 (例如 Olympus, Nikon, Leica DMLS)，或者是具有聚光镜的普通显微镜。
2. 37°C 培养箱。
3. 超净工作台 II 类, A 型 (例如 Baker model no. SG-600) 或者层流工作室 (例如 Baker Edgegard models, Pure Aire Corp, 或其他)。层流空间应与工作量相符。
4. 2-8°C 冰箱 (使用温度计每天记录温度) 储存培养液。
5. 台式离心机。(例如 Clay Adams, Model Dynac II, cat. no. 0103).
6. 37°C 水浴箱(例如 Precision Scientific Model 182 cat no. 66643).
7. 组织培养级的注射器、吸管、培养皿、培养瓶和滤器。  
推荐使用的注射器应是全塑料的、无热源的、无润滑剂的类型，Air-Tite, Virginia Beach, VA 出品。吸管和培养皿是 Falcon 公司的 (1 ml pipette cat. no. 7521; 5 ml pipette cat. no. 7543; 10 ml pipette cat. no. 7551; tissue culture dish 60 x 15 mm cat. no. 3002; petri dish 60 x 15 mm cat. no. 1007; organ culture dish cat. no. 3037). 培养瓶 Falcon 出品 (70 ml, cat. no. 3082; 250 ml, cat. no. 3083). 滤器 Gelman Sciences 出品 (Acrodisc, pore size 0.2 um, cat. no. 4192)。配合 1、5、10 毫升移液管的手动或电动的移液器 (例如 Drummond Scientific, model no. 400100)。
8. 带帽的、并可在外部标记的椎型离心管例如 Corning cat. no. 25310-15 or Falcon cat. no. 2099.
9. 可调的移液枪和灭菌吸头(例如 Elkay cat. no. 000-PIPT-STR)。范围 0-20 ul 一个， 0-200 ul 一个 (例如 Pipetman P-20 and P-200)。

10. 载玻片和盖玻片(例如 Baxter cat. no. M6130 and M6045-2)。
11. 精子记数板 (Makler Chamber, Sefi-Medical Instruments)
12. 移液管 - Samco cat. no. P5214-10s.
13. 用于精子形态学检测的预染载玻片。(例如 Boehringer Mannheim , Irvine Scientific, 或 SAGE BioPharma 的产品)。

#### 材料:

1. 添加 5 mg/ml 人血清白蛋白 HSA 的 Hepes- HTF (例如 SAGE BioPharma, San Clemente, CA), 或者是实验室自行配制的培养液。
2. Percoll (Sigma Chemical Co cat. no. P 4937) 和 10x Hepes-HTF 溶液 (例如 SAGE BioPharma) , 配置等渗 (90%) Percoll 溶液。
3. Percoll 的替代品也可以应用。SAGE BioPharma (PureCception), Irvine Scientific 或 Scandinavian IVF 公司均有提供, 用法与 Percoll 相似。

#### 准备:

1. 配制 10%福尔马林溶液: 在 9 份 HEPES-HTF 溶液中, 加入 1 份福尔马林溶液 (戊二醛浓度大约是 40%, 例如 Mallinckrodt cat. no. 5016), 配完后加入 1 mg/ml 聚乙烯醇 PVA(Sigma cat. no. P 8136)。
2. 添加 5 mg/ml 人血清白蛋白的 Hepes 缓冲 HTF(ART-1023) 和碳酸盐缓冲的 HTF (ART-1020, 1026)。可使用 Quinn's HTF 溶液配置。9.5 毫升的 HTF 溶液中, 加入 0.5 毫升的人血清白蛋白溶液 (100 mg 白蛋白/毫升溶液) 。
3. 等渗 Percoll 溶液: 1 份 10x Hepes-HTF 添加到 9 份的 Percoll 溶液中。

#### 应用须知:

培养液 HTF 和血清白蛋白 HSA 需经过小鼠合子的质控实验, 囊胚率需高于 80%。

#### 储存须知:

1. 添加或不添加白蛋白的 Hepes 缓冲液可在出厂后 2-8°C 保存 12 个月。在 2-8 °C 条件下储存的碳酸盐缓冲液, 自出厂后可保存 70 天。加入人血清白蛋白后, 放入 37°C, 6% CO<sub>2</sub> 二氧化碳孵箱中, 可最多保存 4 天。
2. 等渗 Percoll: 可在 2-8°C 储存最多 4 周。
3. PureCception 可在 2-8°C 储存最多一年  
标签纸需是自动粘贴的并是可以拿下的, (如 Avery Dennison, Product No. S-812) 。标记使用铅笔, 而绝对不能使用记号笔。标记培养液成分和日期。

## 质量控制:

1. 在 10%福尔马林溶液中, 固定 2 个或多个健康男性的精液样本, 作为阳性对照。储存在 2-8°C, 每周取 0.1 mL 检测精子浓度。每次检测至少 10 个样本以获得标准差 (SD):  $SD = \{\sum(x^2) - (\sum x)^2 / n\} / n - 1$ ,  $\bar{x}$  = 每次的值,  $n$  = 总样本数。
2. 如果对照组的标准差在 $\pm 2$ 的范围内, 同时标准差在前 6 次检测中的变化均在平均值的上下浮动, 数据的结果才可用。或者: 对照组的标准差波动范围大于 $\pm 2$ , 但小于 $\pm 3$ 的范围, 并且在 20 次检测中, 出现不超过 1 次, 数据也可使用。
3. 如果对照组的标准差波动范围大于 $\pm 3$ ; 或者对照组的标准差波动范围大于 $\pm 2$ , 并且在 20 次检测中, 出现超过 1 次; 或者标准差在连续 6 次检测中的变化都在平均值之上 (或之下) 浮动, 则检测结果不能使用。
4. 标本要检测两次, 每次的结果不能相差超过 10%范围。程序#Q016 详述了这种方法。

## 步骤:

### I. 精液分析:

1. 室温下轻轻摇动精液使其液化 (20 到 24°C), 射精后 60 分钟开始处理精液。从家中送来的精液样本应在 1 小时之内送到实验室。如果时间超过 1 小时, 而精子活力又低于 25%, 就应该重新约定下次取精的时间, 同时, 精液样本应在短时间内送往实验室。
2. 报告精液液化时间。正常: 液化时间在 30 分钟以内, 没有: 不液化和延迟: 液化时间长。
3. 报告颜色: 正常: 灰白色或淡黄色。异常: 描述精液的特定颜色。
4. 粘稠度: 正常的精液从吸管中滴出后, 可形成一圆形的滴。不正常的样本会产生长约 2 厘米的丝。如果样本不液化或粘稠度太高, 就使用 3.5 毫升或 5 毫升的注射器和 18 号针头反复抽吸, 使其液化。结果为正常和不正常两种。
5. 用带有刻度的吸管测量精液的体积。
6. 使用相同的吸管, 吸一滴精液, 放置在 PH 试纸上。(pHydrion Vivid, 6.0-8.0 范围). 30 秒钟以后, 与标准对比, 测定 pH 值。
7. 显微镜下检测
  - a) 取 10 到 15  $\mu$ L 的精液, 滴到载玻片上。盖上盖玻片, 稳定一分钟后, 在 400 倍相差显微镜下观察。在整个玻片上观察, 记录以下指标:
  - b) 形态学: 判断正常精子的比例, 同时, 记录主要异常精子的形态, 例如头部异常、扁头、双头、尾部弯曲、扭结、破损、短尾和双尾等。
  - c) 其他细胞的记数: 主要包括腺上皮细胞, 未成熟的精原细胞和白细胞等。在 400 倍镜下查看 5 个视野, 如果找到一个非精子细胞, 记数大约相当于  $1 \times 10^6$  个/ml。报告形式为: 小于  $1 \times 10^6$ /ml,  $1-5 \times 10^6$ /ml,  $5-10 \times 10^6$ /ml 或大于  $10 \times 10^6$ /ml 四种。

- d) 杂质：观察样本细菌污染的情况。查看非精子细胞的数目。非精子细胞（1980年WHO的手册上定义为圆形细胞）。没有杂质不常见，常见的情况为轻度杂质。重度污染也少见。不应出现红细胞。上皮细胞和白细胞常见。报告形式为正常和异常两种。如果出现红细胞，则应注明。

#### 8. 精子活力和记数：

每个样本做两次，取平均值。

**A. 活力：**在400倍镜下，观察4到6个视野，记数100个精子。

活力分为以下几级：

- a) 快速直线运动。
- b) 慢速直线或非直线运动。
- c) 非前进性运动。
- d) 不动。

精子活力等于  $(a + b) / (a + b + c + d) \times 100 (\%)$ 。

#### **B. 精子浓度：**

在涂片中估计精子浓度，然后在确定稀释倍数。在400倍镜下，大约20毫米宽的视野内的精子数乘以  $10^6$ ，就是精子浓度。例如在此视野中有40个精子，那么精子浓度大约为  $40 \times 10^6$  条/ml。用10%福尔马林溶液稀释后，能够更精确地记数。如果估计浓度在20到  $100 \times 10^6$ /ml之间，就以精液：10%福尔马林溶液=1：4的比例稀释精液。如果估计浓度小于  $20 \times 10^6$ /ml，就以精液：10%福尔马林溶液=1：1的比例稀释精液。如果估计浓度大于  $20 \times 10^6$ /ml，就以精液：10%福尔马林溶液=1：9的比例稀释精液。在记数板上保持5分钟，记数大约100个形态正常的精子。只有精子头和精子尾部都在记数格中的精子才记数。在记数格上边和左边的精子也记数。精子浓度等于方格中的精子数乘以稀释倍数。例如：红细胞记数板中，64个小方格中有120条精子，稀释倍数为1：10，那么，精子浓度就是：

$$\frac{120 \times 4 \times 10^6 \times 10}{64} \\ = 75 \times 10^6 / \text{ml}$$

## **II. 精液的 PERCOLL 梯度清洗和过夜成活率**

做IVF/GIFT的患者，在60分钟内通过Percoll离心法，或使用PureCeption (ART-2024) 梯度离心法可获得足够的精子。详见辅助生殖中的精液清洗程序。清洗后的精子溶于Hepes-HTF中 (ART-1023)，调整精子浓度到  $10 \times 10^6$ /ml。30分钟后，检查精子活力。剩余的精液保存在37°C条件下的园底试管中。第二天检查样本的活力。

## **III. 染色法检查精子形态**

只有当精液涂片结果显示，正常精子比率小于30%时，才使用此方法。

- 1. 将5 ul 精液样本涂在特制染色载玻片的中央。
- 2. 盖上盖玻片，去除气泡。
- 3. 用指甲油封片。如果当天不观察，使用封口膜封住后，放到2-8°C冰箱中。第二天检查。

4. 在明视野 400 倍油镜下观察 100 个细胞。
5. 按以下方法对精子进行分类：
  - a. 正常精子：园头，顶体均匀染色。
  - b. 头部异常：小头或大头。
  - c. 尖形头：头部上下均狭窄。（可能与精索静脉曲张有关）。
  - d. 变形头：头部形状不规则等。
  - e. 双头。
  - f. 尾部异常：例如尾部卷曲，双尾、扭结和尾部破裂等。
  - g. 未成熟形态：颈部存在细胞质滴。
6. 参见 WHO 标准。

#### 计算：

##### A. 精子浓度的计算：

精子浓度 (/ml) = 记数板方格中精子数目  $\times 4 \times 10^6 \times$  稀释倍数 / 记数的方格数。

例如精液以 1: 10 的比例稀释，在 64 个方格中，有 120 条精子，最终的精子浓度为：

$$\frac{120 \times 4 \times 10^6 \times 10}{64} \\ = 75 \times 10^6 / \text{ml}$$

##### B. 精子活力：

精子活力指数 = a 级精子数 + b 级精子数 / 精子总数 (a 级 + b 级 + c 级 + d 级)  $\times 100$  (%)。

例如： a=8, b=12, c=50, d=30; 那么 a+b=8+12=20; a+b+c+d=8+12+50+30=100.

所以，精子活力 =  $20/100 \times 100 = 20\%$

##### C. 精子形态：

当检查涂片的精子时，正常精子的比例数应减去 10%，才能接近精液的正常形态率。染色检查精子形态，则用畸形精子数占被检精子总数的百分率来表示。

#### 结果的报告：

使用 Q&A 计算机程序报告精液分析结果。

使用附表的形式，报告染色精子形态。实验室的副本应保存至少两年。

#### 参考范围：

WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, WHO 1992, 3rd edition, Cambridge University Press。

体积： 大于 2 毫升。

PH 值： 7.2-8.0。如果大于 8.0，应怀疑感染；如果小于 7.0，同时精子记数低（记数低于  $5 \times 10^6 / \text{ml}$ ），应怀疑输精管、精囊或附睾的病变。

精子浓度： 至少  $20 \times 10^6$  /ml。

总精子数： 多于  $40 \times 10^6$  。

活力： a) 50% 以上的前进运动精子。包括一级和二级精子。一级精子：快速直线前进运动， 二级：慢速直线或非直线运动。

或者： b) 25% 以上的一级精子。

形态： 30% 以上正常形态的精子。

白细胞数： 少于  $1 \times 10^6$  /ml。

### 异常结果的程序：

#### 如果分析结果不能使用：

1. 不要告诉患者。
2. 在质控记录表上记录。（例如已重复标准实验，仪器已经恢复等）。
3. 仔细回顾结果：
  - 读数和记录是否准确？
  - 进位是否正确？
  - 是否复查了计算结果？
  - 稀释倍数是否正确？
4. 检查显微镜的运行状况。
  - 所有的设置是否正确？
5. 质控的检查：
  - 这些质控是否可用于另外的检测？
6. 更改错误，重新检测标本。错误记录在质控记录表上。
7. 检测结果是否与检验单相符？

### 报告格式：

精液分析报告使用 Q&A 计算机程序 (SA.DTF File)。

### 注意：

1. 处理精液样本的整个过程需无菌，并采取常规的防止感染的措施。

2. 在检查之前，精液样本需充分混合均匀。由于粘稠度太大造成的不均匀，会引起精子活力和浓度结果不准确。这种情况下，使用 3.5 或 5 毫升注射器，18 号针头反复抽吸精液，使精液液化完全。
3. 一些特殊状况会影响精液处理结果，例如禁欲时间过短、身体或情感上的刺激、呼吸道感染引发的疲劳等。出现这种情况后，应在 7 天以后，3 个月以内进行复查。
4. 涂片精液分析如记数、活力和形态学应在 24 小时之内出结果。染色结果，在 7 天之内出。

### 样本的抛弃：

所有的体液标本以及实验室弃物均应放在标有“生物危害品”的容器内，按程序规定抛弃。

### 程序中禁忌点：

检测的限制：

1. 精子浓度：浓度在  $1$  到  $100 \times 10^6$  /ml，具有最大的临床意义。
2. 精子活力：至少要数到 100 个精子，这样的精确度可达到 1%。
3. 精子形态：精液涂片的精确度是 10%，染色片的精确度是 1%。

### 干扰物质

污染的精杯可能会影响精子的活力。必须使用组织培养级并通过质量检测的精杯。一些药物如心脏病使用的钙离子阻断剂等，也会影响精子的活力。

### 参考文献：

1. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. WHO 1992, 3rd edition, Cambridge University Press.
2. QUINN P (1993). Sperm processing in assisted reproductive technology male factor. Seminars Reprod Endocrin, 11: 49-55.
3. MORTIMER D (1985). The male factor in infertility. Part I: Semen analysis. In: Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility, Vol VIII, No. 7, Year Book Medical Publishers, Inc, Chicago.

© 1996, 1998 Patrick Quinn

All rights reserved. Printed in the United States of America

没有 Patrick Quinn 的允许，此文件不得有任何形式的翻印。Patrick Quinn, 7320 Binnacle Drive, Carlsbad, CA 92009-4860





## 精子染色形态分析报告

患者姓名: \_\_\_\_\_ 日期: \_\_\_\_\_

配偶姓名: \_\_\_\_\_

医生姓名: \_\_\_\_\_

外观	数目	%
正常		
头部异常		
扁头		
无定形头		
双头		
卷尾		
其他的头部损害		

评价:

---

---

---

---

---

---

---

---

完成日期: \_\_\_\_\_ 检验人: \_\_\_\_\_

签名, 实验室主任签名, 电话号码。

## 取精患者指南

1. 患者应在取精前 2-3 天内禁止一切性活动，包括手淫。禁欲时间过长或过短，都会影响结果。
2. 精液需经手淫法收集到医院指定的无菌塑料容器内。必须在 1 小时以内处理。其他的方法不推荐，但可以经研究使用。不能使用常规避孕套收集精液，因为避孕套内含有杀精子的成分，影响精液分析结果。如必须使用避孕套，则由实验室提供特殊的避孕套。
3. 精液需收集到无菌的精杯中 (Corning cat # 25400250, or Baxter cat # C8827-4, 或其他的经小鼠合子质控合格的无胚胎毒性的杯子)。不能从家中带杯子来，需从医生处获得。为避免污染，杯盖只在取精前打开。取精后，马上盖上盖子。不能触摸杯子的内部。如果取精后又泼出，绝对不能重新放入杯子。在精液分析表中的问题 2 中注明。
4. 精液取出 1 小时之内，必须送往实验室。最好在医院指定的位置取精。精液标本不能暴露在过高或过低的温度中。运送精液应放在贴身体的部位保温。（不能放在包中或纸袋中）。如果不能在 1 小时之内将精液送回实验室，或者精液常规结果不好（记数或活力太低），都应在医院的取精室内取精。这样可能会取得较好的结果。
5. 样本在星期一到星期五的 9:00 a.m. - 3:00 p.m. 收集。如果您能在早晨 9 点到实验室，不要在 8 点之前取精。
6. 在取精杯的侧面和杯盖上写清名字以防混淆。不合格的样本拒绝接受。您必需提供新的精液样本。
7. 完成下表，并请与您的精液样本一同送往实验室。
8. 收费 \$\_\_\_\_\_.

门诊病人需持有医生开具的精液检验单。在此单的下部，医生签名，亦可作为检验要求。

姓名: \_\_\_\_\_ 配偶: \_\_\_\_\_ 日期: \_\_\_\_\_  
住址: \_\_\_\_\_ 丈夫的出生日期: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ 邮编: \_\_\_\_\_ 电话: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_  
SSN: \_\_\_\_\_











1. 取精时间?
2. 是否丢失? 此点非常重要! 是\_\_\_\_\_ 否
3. 此次取精之前, 我禁欲 \_\_\_\_\_ 天。
4. 评价: \_\_\_\_\_

由医生填写: \_\_\_\_\_  
地址: \_\_\_\_\_ 日期: \_\_\_\_\_  
检验号: \_\_\_\_\_

WORKING COPY**SEMEN ANALYSIS REPORT**

Patient last Name:		Code #:
First:		Date:
Spouse:	Physician:	
Times Collected:	Received:	Analysed:
Abstained:	days	Test(s) Ordered:

PARAMETER	OBSERVATION	NORMAL	AFTER PERCOLL WASH
Volume	ml	1.5 - 5.0 ml	ml
Concentration	mill/ml	20-250 mill/ml	mill/ml
Motility	%	> 50%	%
Total count	million	>40 million	million
Morphology	% normal	> 30% normal	
Color		grayish-white	
pH		7.2 - 8.0	
Liquefaction		Within 30 min	
Viscosity		Normal	
Debris		Slight	
WBC/round cells	mill/ml	less than 5	

MORPHOLOGY OF STAINED SPECIMEN						
Normal	Head size defect	Tapered	Amorphous	Duplicate	Tail defect	Immature
	 <i>Large</i>  <i>small</i>				 <i>&gt;1 coiled</i>  <i>kinked</i>  <i>broken</i>	 <i>cytoplasmic droplet</i>
%	%	%	%	%	%	%

COMMENTS:

Date Completed:

Interpreted by: