



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX

精液基础检验 要求和实验方法

Basic semen examination — Specification and test methods

(ISO 23162:2021)

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 员工培训和能力	3
4.1 常用部分	3
4.2 培训	4
4.3 能力验证	4
5 精液特性、取样及检查前处理	4
5.1 一般特征	4
5.2 理化特性	4
5.3 样品采集和初步处理	4
5.4 主题信息和数据收集	4
5.5 初始样品处理	5
5.6 精子毒性试验	6
6 检查	6
6.1 所需设备	6
6.2 内部配制试剂	6
6.3 评估	6
7 检验后处理及检验报告	8
7.1 总则	8
7.2 结果计算和呈现	9
7.3 结果介绍	9
7.4 质量保证的实践方面	10
附录 A（资料性） 精子缺失测定的统计基础	12
附录 B（资料性） 高倍视野	13
附录 C（资料性） 运动评估训练	14
附录 D（资料性） 精子浓度测定用稀释剂	16
附录 E（资料性） 精子浓度测定中适宜稀释度的估算	17
附录 F（资料性） 报告百分比的两个重复评估的一致性比较	18
附录 G（资料性） 两次精子浓度重复计数的一致性比较	错误!未定义书签。
附录 H（资料性） 精子活力评估	错误!未定义书签。
附录 I（资料性） 精子形态学评价	错误!未定义书签。
参考文献	25

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC136）归口。

本文件起草单位：XXXXX

本文件主要起草人：XXXXX

精液基础检验 要求和实验方法

1 范围

本文件规定了对通过射精收集的人类精液进行基本检查的实验室最佳实践试验方法的设备和关键方面的最低要求。

本文件适用于基本精液人工检查的全过程，也适用于计算机辅助精子分析（CASA）的样品制备。

本文件不适用于输精管结扎术后评估。

注：考虑到输精管结扎术后射精评估的医疗法律后果，本文件中的方法很可能不足以确定射精是否完全“清晰”（即射精中没有精子）。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

ISO 15189:2012医学实验室-质量和能力要求

ISO/TS 20914:2019医疗实验室测量不确定度评定实用指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

国际标准化组织和国际电工委员会在下列地址维护用于标准化的术语数据库：

-ISO在线浏览平台：<http://www.ISO.org/obp>。

-IEC Electropedia：可在<http://www.Electropedia.org> /上获得。

3.1

空气置换式移液器 air displacement pipette

带一次性吸头的普通实验室移液器，吸液量由吸液管手柄内封闭室中等量空气的置换量来控制。

注：空气置换式移液器只能对于粘度接近水的液体准确体积。

3.2

无精子症 azoospermia

射精中完全没有精子（3.4）

注：术语无精子症不是临床诊断，而是对实验室发现的描述。完全缺乏精子是很难确定的绝对值。由于只能检查射精（3.4）的一部分，现代定义是基于从射精（3.4）的随机等分样本调查中获得的数据得出的概率计算（见附件A）。

3.3

计算分析 CASA

计算机辅助精子分析 computer-aided sperm analysis

利用成像技术设备自动检查精子（3.4）。

检查基于视频图像分析，以获得精子浓度（3.18）和运动能力的信息，精子形态较少。

注：市场上有计算机精液分析系统，但没有用于验证、评估、分析可靠性或报告内容的通用标准。本文件的范围不是为计算机精液分析系统提供标准，尽管预检查方面对计算机精液分析系统设备的开发、制造商和用户也很有用。

3.4

射精 ejaculate

通过手淫、性交、振动刺激或电射精获得的精液或精液样本。

注：射精是精子和分泌物的混合物，主要来自精囊、前列腺和附睾。

3.5

射精收集容器 ejaculate collection container

初级样品容器 primary sample container

注1：射精收集容器应被测试对精子无毒。

注2：如果射精（3.4）只能在性交时收集，可以使用无毒的硅橡胶避孕套，射精（3.4）必须在实验室收到后转移到射精样品容器中，这必须在报告中注明。

3.6

射精粘度 ejaculate viscosity

射精（3.4）的特性，描述其在液化后像水一样的流动阻力（3.10）。

注：由于射精液中含有凝胶结构，未完全液化的精液不是均质液体。

3.7

实验室间比较 interlaboratory comparison

外部质量控制 external quality control

能力测试 proficiency testing

由两个或两个以上实验室按照预定条件对相同或类似项目进行的测量或试验的组织、性能和评价。

3.8

高倍视野 high power field

高倍镜下可见的载玻片面积（×400）。

注：这不是标准区域，因为尺寸根据所用眼睛的类型而变化（例如标准或宽视野）（见附件B）。

3.9

不活动 immotile

完全缺乏主动尾翼运动。

3.10

液化 liquefaction

射精（3.4）从凝胶状或凝聚状变为液相的过程。

注：液化是由于对大分子的酶作用导致凝胶状或凝聚状性质的降解。

3.11

非进行性精子运动 non-progressive sperm motility

活跃的尾巴运动导致精子移动速度小于5微米/秒。

注：正常头部长度约为5 μ m。

3.12

容积式移液器 positive displacement pipette

普通的实验室移液器，通过毛细管内由活塞驱动的置换原理工作，而不是密闭腔体中的空气置换。

注1：吸管尖端的活塞与液体样本直接接触。

注2：用于避免精液等粘稠液体的体积误差。

3.13

进行性精子运动 progressive sperm motility

大于5 $\mu\text{m}/\text{s}$ 精子的向前运动。

注：另见缓慢进行性精子运动（3.17）和快速进行性精子运动（3.14）。

3.14

快速进行性精子运动 rapid progressive sperm motility

精子的向前运动速度至少为25微米/秒。

3.15

精浆 seminal plasma

分泌物的混合物，主要来自精囊、前列腺和附睾，无精子。

3.16

禁欲 sexual abstinence

射精收集（3.4）和最近一次射精之间的时间。

3.17

缓慢进行性精子运动 slow progressive sperm motility

5 $\mu\text{m}/\text{s}$ ~24 $\mu\text{m}/\text{s}$ 精子的前向运动。

3.18

精子浓度 sperm concentration

单位体积精子数

注1：精子浓度以百万或千/毫升表示）。

注2：不得与精子密度（质量/体积）混淆。

3.19

精子活力 sperm vitality

活精子的百分比，与其活动能力无关。

3.20

精子总数 total sperm number

计算出的射精精子总数（3.4）

注1：精子总数=精子浓度 \times 射精量（3.4）。

注2：精子总数与精子浓度不同。

3.21

Tygerberg 标准 Tygerberg strict criteria

基于精子能在宫颈粘液中穿透和迁移的形态学标准。

3.22

典型精子 typical spermatozoon

精子具有典型形态，能在宫颈粘液中渗透和迁移并到达受精部位。

[来源：Menkveld等人，1991年^[7]，Menkveld和Kruger，1995年^[8]]

3.23

畸形精子指数 Teratozoospermia Index

异常精子中缺陷区（头部、颈部/中段、尾部和/或细胞质滴）的平均数目。

注：根据定义，此索引永远不会超出[1.00；4.00]的区间。

4 员工培训和能力

4.1 常用部分

员工培训和能力的一般要求见ISO 15189:2012。这些要求是如何应用于人类精液分析在这里被涵盖。

4.2 培训

精液检查涉及许多分析步骤，需要对操作人员进行培训，以尽量减少操作人员的主观性，从而提供准确可靠的结果（MacLeod and Gold, 1951^[6]、Mortimer, 1994^[10]、Barratt等, 2011^[1]）。

所有对精子活力、精子浓度、精子活力和/或精子形态进行评估的人员应接受使用商业、内部或EQA衍生的经验证参考材料的培训，以确保其结果符合实验室预先确定的测量误差限值。如果没有这样的培训，就不能指望工作人员能够为这些评估提供准确或可靠的结果，参与EQA计划也就毫无意义的。

注：已经公布这些评估有效性面向目标的重复培训程序（Mortimer, 1994^[10]，Björndahl, et al., 2010[2]）；完成培训的新手与实验室经验丰富的工作人员之间的测量误差范围为 $\pm 10\%$ （另见附件C）。

4.3 能力验证

所有执行这些评估的人员应按照实验室质量框架的规定，定期进行能力验证。

注：根据第4.2款，所有接受过培训的人员执行这些评估时，对能力进行持续验证时，预计测量误差的 $\pm 10\%$ 范围内。

5 精液特性、取样及检查前处理

5.1 一般特征

精液检查在某些重要方面不同于其他人体体液的检查。这项研究期待完成射精的收集。结果取决于收集前的射精次数，以及研究前的时间和温度。在不孕症诊断的情况下，由于期望的结果取决于每对夫妇试图实现怀孕的特定临床情况，因此缺少明确的参考限值。

5.2 理化特性

在实验室研究用的装置中收集的射精没有内部稳态控制。最初，整个射精过程被整合到一个凝胶状的凝块中，凝块被逐渐降解（液化）成一种带有粘稠性的液体。在这一过程中，二氧化碳蒸发导致pH的变化。凝胶成分的酶降解导致精子周围的液体渗透性的显著增加，进而影响精子的性能。

5.3 样品采集和初步处理

样本采集应始终由受试者进行，但肢体残疾、脊髓损伤或截瘫等情况除外。如有必要，受试者的伴侣可能会帮助收集样本。对于伦理或宗教上反对自慰的受试者，在性交过程中可以使用无精子毒性（硅橡胶）避孕套来收集射精。然而，这种收集方法会导致一些损失的整体样本，因为它是从避孕套回收。通过性交中断收集射精（“收取”）不建议作为第一选择，精子丰富，射精的分数往往是丢失。某些受试者可能需要使用润滑剂；此类产品应被确认为对精子无毒（Mortimer等人, 2013年^[11]）。

射精后，样品应尽可能保持在37℃附近，不得高于37℃；冷却或加温可能导致人工制品和精子功能障碍。由于射精后发生的所有变化，应在液化后尽快开始检查，通常在射精后30分钟内完成。射精后60分钟不完全液化表明异常。如果射精是在实验室附近收集的，那么在液化完成后开始评估是最好的。由于受试者所经历的性唤起的持续时间和水平会影响射精，因此，如果有重大困难，样本采集最好在受试者选择的地方进行。当在实验室环境外收集射精时，应将其送至实验室，最好在30分钟内，但至少应在60分钟内（报告中应注明收集和运输射精的情况）。尽管如此，对温度和时间的考虑对于检查的质量和稳健性仍然很重要。

5.4 主题信息和数据收集

5.4.1 向受试者提供的信息

以下信息应以主体可理解的语言以书面形式提供给主体，并应包括以下内容：

一般信息实验室联系方式：

- 请求者提供调查理由
- 调查内容概要
- 如何将实验室调查结果传达给受试者

射精收集、处理和运输：

- 如何收集射精
- 样本采集和评估开始之间的延时影响
- 避免射精降温或升温的重要性
- 报告正确的性禁欲时间的重要性
- 报告样本收集不完整的重要性

5.4.2 受试者的数据收集

a) 所需信息

应要求每个受试者提供以下信息，由实验室记录：

- 可靠的个人身份证
- 禁欲时间
- 样本采集时间
- 确认在运送至实验室的过程中，样品受到保护，免受极端温度的影响
- 样本采集的完整性；如果采集不完整，应提供射精序列中哪些部分在采集过程中遗漏的信息

可选信息

这些信息对临床解释很重要，当受试者访问实验室时，可以实际获得，但不是实验室工作的一部分。

- 病史，可能包括：

过去三个月内发生的任何严重炎症过程。

任何先前的手术（腹股沟疝、精索静脉曲张、隐睾或其他与泌尿生殖系统有关的问题）或用化疗、细胞抑制剂或放射治疗泌尿生殖器官。

除短期使用非处方药（如止痛药和抗过敏药）外的任何药物使用。

- 任何娱乐性药物、合成代谢类固醇或其他提高性能的饮食添加剂（如蛋白粉）的使用。

5.5 初始样品处理

- 应记录受试者提供的信息。
- 标本采集容器应清洁、无毒、一次性使用。
- 样本采集容器最好在样本采集前称重，并用两位小数记录其重量。
- 试样采集后，应对试样采集装置进行称重，并将计算出的重量差用作体积测量值。如果使用经校准的血清学移液管，在进行测量后，一些精液将始终丢失在样本收集容器和移液管内。移液引起的误差大于1.0g精液=1.0ml精液的假设（Cooper等人，2007^[4]）。射精量应以毫升为单位报告至小数点后一位。
- 所有文件和样本采集装置应至少贴上两个唯一标识符。
- 在收集后尽快将试样装置放置在培养箱（35℃和37℃之间，以利于液化），最好是用移动的托盘在液化过程中加强混合（当移动托盘不可用时需要频繁的手动搅拌）。

精子受到地球重力和沉淀物的影响，即使它们是活动的，也会沉积到任何容器的底部（“趋地性”）。因此，在对射精取样时，应充分混合，使精子和射精的其他成分均匀分布。即使坐的时间很短，也会导

致射精细胞成分分布不均。因此，重要的是要轻轻地混合射精彻底之前，任何小份采取检查，注意，漩涡混合器不得使用。

5.6 精子毒性试验

为了确保与接触物质对精子无毒性，对每一批新材料都应进行基础毒性试验。其原理是在比较现有材料和新材料对精子运动影响的基础上提出的。暴露时间应与精子暴露在材料中的时间相关—移液管尖端为秒，样本收集容器为30-60分钟。暴露于试验材料和对照材料的目的是至少是预期“正常暴露”的两倍。

实际上，有足够体积的混合良好的精液和良好的运动能力分别暴露在对照和试验材料中。体积应确保精子和材料之间的良好接触，避免蒸发和干燥，并允许在规定时间内进行活动性评估。对照组和试验组精子运动百分率的差异不得超过10%。如果控制和试验均无动力性，则应在持续时间后重复毒性试验，评价温度和可能的蒸发量。

6 检查

6.1 所需设备

精子运动在很大程度上受环境温度的影响，特别是速度的影响。温控设备的使用减少了室温变化的影响。

需要以下设备：

- 实验室天平，量程0.00 g至50.00 g（读数至小数点后两位）
- 能够保持人体体温的培养箱，最好是装在移动托盘（轨道混合器）内
- 相差式显微镜（推荐使用10×20×和40×物镜）、明场显微镜（100×油镜，高倍物镜），以及10×目镜和目镜测微尺（测微尺刻度校准的目镜十字线），以及具有保持体温下的加热装置
- 用于评估精子浓度的容积式移液管，容量为0μL至50μL或0μL至100μL
- 浓缩稀释液、液体试剂和其他试剂、移液器（1μL至20μL、20μL至200μL和200μL至1000μL尺寸）
- 用于染色、组织形态学和载玻片的设备（载玻片支架、染色瓶、用于封固剂一次性移液管）
- 离心机（例如：用于15mL锥形离心管）—最好使用摆动式来离心出更多的颗粒—以及密封桶或密封转子，以保护操作员在离心过程中管破裂时免受可能的气溶胶污染
- 改良Neubauer计数板（100μm深度）

注：应定期检查非一次性计数板，确保磨损不会改变腔室的深度，并且只要经过适当验证和评估，即可使用一次性计数板（Kirkman Brown和Björndahl, 2009^[5]）

- 用于在计数板中沉淀精子的湿室
- 涡旋混合器（用于搅拌固定精子悬浮液以评估浓度）

6.2 内部配制试剂

用于精子浓度评估的稀释剂是必不可少的，可以在内部制备（附件D）。目的是固定（杀死）精子，使计数更可靠。为了评估的方便性和可靠性，如果能够防止微生物的生长，这也是一个优势。

6.3 评估

6.3.1 初评估

为可靠评估精液特性，应完成液化。对于大多数精液来说，如果在收集后保持在37° C的温度下，这可以在30分钟内完成。如果液化未完成，样品可在培养箱中最多留30分钟，然后进行评估。检查开始时的不完全液化应在报告中注明，以及从样品收集到开始湿剂制备作评估的时间。

6.3.2 宏观评估

如果没有人类精液物理特性计量标准的情况下，就不可能实现方法的适当标准化或确定测量的不确定度。然而，一些关于颜色或气味的观察可能与标本来源或受试者的医疗状况有关。因此，报告中的任何此类评论应被视为例外报告，即试图描述超出预期的特性观察结果。

a) 外观：

颜色（正常：乳白色，灰白色，有时略带或甚至亮黄色。异常：褐色或红色，透明；强黄色）

液化（应在37°C射精后30分钟内完成；异常：剩余凝胶团）。

其他物理观测：

粘度-通过让精液在重力作用下从大口径移液管（例如5mL血清学移液管或无毒玻璃或塑料 Pasteur 移液管）缓慢下降来测量。正常：具有<2 cm“线状物”的离散液滴。

气味（精液没有“正常”的气味，其气味是高度主观的。然而，强烈的腐臭味往往表明感染活跃；轻微的腐臭味可能表明禁欲时间延长，或强烈的尿液味可能表明精液被尿液污染）。

精液 pH 值-在收集精液后30分钟内，将一份液化精液放在经验证的 pH 试纸上，至少在没有精子和精液量较低的情况下进行测量。

6.3.3 湿片法显微镜检查

湿片制备方法是將一份10μL的混合好的精液放在标记的预热显微镜载玻片上，并用一个预热的22 mm×22 mm盖玻片（厚度为1/2或2，以允许液滴完全扩散），以获得大约20μm的制备深度（对于18 mm×18 mm盖玻片，相同深度仅需要6.5μL）。

- 观察精子、其他细胞、碎片、晶体的存在
- 观察精子凝集和聚集的情况
- 评估精子浓度的适当稀释度（见附件E）

对人类射精中可能存在的其他细胞和非细胞元素的观察都缺乏计量标准，即使使用定性描述也无法客观评估。然而，一些观察结果可能与受试者的医疗状况有关。因此，报告中的任何此类评估应被视为例外报告，即试图描述超出预期的观察结果。实验室应确保他们能够证明从业者之间的主观性差异最小。

6.3.4 精子活力评估

- 在37° C下对充分混合的样品进行两次独立的湿制备
- 每个复制中至少评估四个不同的字段
- 每个复制品中至少有200个精子被分类

把每个精子分为快速前向运动、缓慢前向运动、非前向运动或不活动。

表1 精子运动分类的定义

等级	运动类型
快速前进 (a)	活跃尾部运动≥25 微米/秒
缓慢前进 (b)	活跃的尾部运动，从 5 微米/秒到 24 微米/秒
非前进 (c)	主动尾翼运动，0 微米/秒至 4 微米/秒
不活动 (d)	无活动尾翼运动

注1：在每个区域首先计数快速和缓慢进行的精子。然后在同一区域内计数非进行性精子和不活动精子。如果精子的浓度很高，建议只在较小的视野区域（如目镜网格或十字线的中心四个正方形）中计数精子。

注2：结合在凝集物或聚集体中的活动和不活动精子不应包括在活动性评估中。如果估计有超过20-25%的精子被困在这些团块中，因此不包括在活动性评估中，则应在报告中注明。

- 为了计算具有预期精度和测量不确定度的结果，需要两次重复评估一致性（见附录F）。

6.3.5 精子浓度评估

- 应分别取两份混合良好的精液样品，并单独稀释。50 μ L或100 μ L的体积（通过容积式移液管的精确体积），取决于估计的浓度（见附录E）
- 稀释每个小份（见附录E；体积取决于湿片的观察结果），以固定精子，并达到可在计数板中可靠计数的浓度。
- 将精子悬浮液装入计数室后，水平放置在潮湿的室内至少10分钟，以使精子沉积到计数网格上。如果超过20分钟，应检查试验箱的湿度。

进行不同单元重复评估时，应比较每个单元中至少200个精子，除非计数不可能，例如每毫升精子的浓度低于100万个。

建议至少200个精子，将统计误差（95%置信区间）降低到 $\leq \pm 10\%$ 。如果至少评估100个精子（一式两份），则相应的误差为 $\leq \pm 14\%$ 。任何基于少于200个观察到的精子的结果应在最终报告中发表评论。

为了计算具有预期精度和测量不确定度的结果，需要两次重复评估的一致性（见附录G）。

6.3.6 精子缺失评估

评估的第一部分是对两个独立的10 μ L小份样品进行彻底、系统地目视检查[（200 \times 至400 \times 放大倍数；扫描22 mm \times 22 mm盖玻片下的整个区域）]，但未发现任何精子。第二部分是在22 mm \times 22 mm的盖玻片下检查整个射精的整个区域，盖玻片为10 μ L的离心颗粒（1000 \times g，15分钟）。如果在这些目测检查中均未检测到精子，则临床实验室可以说明射精不可能含有精子，尽管不能排除偶尔有精子存在（见附件A）。

6.3.7 精子活力评估

精子活力通常不进行常规评估，只有在湿制备的精子活动率较低的情况下，例如总活动率 $< 40\%$ 。

使用经评估和验证的方法来区分活精子和死精子，例如，混合良好的精液与带有背景染色（例如伊红Y和黑色素）的组合超生命染色混合（例如伊红Y和黑色素）Björndahl等人，2003[3]）（见附件H）。

6.3.8 精子形态评价

形态学涂片最好在收集射精后60分钟内进行（见附件I）。由于精液渗透压的持续增加，长期暴露于液化的精子会增加卷曲精子尾的存在。

每个精子应根据头部、颈部和中段、尾部的异常情况以及是否存在残余细胞质团进行评估（见附件I）。只有完整的精子（有头和尾）才能被评估。如果每100个完整精子有20个以上的松散头部，松散头部数应单独报告为每100个完整精子的松散头部数。

为了进行可靠的人类精子形态评估，需要对经过验证的参考材料（巴氏染色涂片和有经验的专家的参考结果）进行广泛的观察者培训。如果没有这种培训，以及持续的能力验证，结果很可能是有限的或没有科学或临床价值。

7 检验后处理及检验报告

7.1 总则

检验后要求包括结果计算和结果呈现。

各实验室应确定测量不确定度（ISO/TS 20914）。

7.2 结果计算和呈现

7.2.1 射精总量

射精中细胞的浓度很难正确解释,因为最终取决于受试者体内以及不同受试者射精之间不同时间的几个不同附睾的贡献。因此,计算每次射精总数也非常重要。

- 精子总数=射精量×精子浓度

7.2.2 其他计算

a) 活力(率)

应根据两次可接受的重复评估的平均值计算运动百分比,并以百分比表示(基于计数的精子数量,仅使用整数,即无小数点)。

- 快速前进
- 缓慢前进
- 非前进
- 不活动
- 除了记录的百分比外,还可以根据记录的结果计算以下百分比,并以整数百分比表示,不带小数点。
- 渐进百分比(快速+缓慢前进)
- 运动百分比(快速+缓慢前进+非前进)

注:四类活动性评估,包括快速和缓慢前进精子之间的区别,为临床决策提供了重要信息(Barratt等人,2011^[1])。

形态学

根据所计数的精子数量,在呈现形态评估时,仅使用整数,即无小数点,只有畸形精子指数例外,其中应使用两个小数点。

- “典型”精子百分比(Mortimer和Menkveld,2001[12])
- 所记录的异常(头、颈/中段、尾或细胞质残留)的百分比,作为其所有精子中各自的百分比(即不只是在异常精子中的比率)。
- 特殊异常(如圆头精子[即球形精子]、梨状精子、松散精子头)如超过每100个精子20个,应单独报告。
- 畸形精子指数(畸形精子指数)–是可选的,其计算方法是:所见缺陷区域(头部、颈部中段、尾部和细胞质残留)的总数除以所计数的异常精子的数量(按惯例报告,小数点后2位)。

7.3 结果介绍

7.3.1 总则

- 以百分比、整数(无小数点)的形式给出。
- 如果报告:畸形精子指数–始终以两位小数位给出。
- 精子浓度和数量:结果≥1000万的整数,不带小数点;0.05–995万之间的数值,为了清晰可见,可以调整小数点后一位。对于较低的数值,例如4万,可以使用类似4万个精子的表达来阐明所得的近似值。

7.3.2 精液检查报告内容

除了ISO 15189中规定的正式要求外,还应包括以下精液检查数据:

- 检查日期

- 禁欲时间（天数）
- 射精和开始检查之间的时间
- 是否在实验室或其他地方收集射精并运送到实验室的信息。在后一种情况下，到达实验室的时间也应包括在最终报告中。
- 粘度、液化和其他肉眼观察射精量（mL）
- 精子浓度（百万/mL）
- 精子总数（百万/精液）

——对于湿制剂（10 μ L）中未观察到精子的精液，需要一份离心颗粒中任何观察到精子的报告。

- 运动百分比。
- 形态百分比和畸形精子指数。
- 特殊病例活精子百分率。
- 测量时pH值。
- 在对湿制备进行显微镜检查时发现的任何其他重要或不寻常的发现，例如聚集体和凝集物、圆细胞、碎片和晶体的存在。

——射精中不同类型的圆形细胞之间的分化通常是困难的。对活跃的炎症细胞（白细胞）的检测有时可以给出一个指示，巴氏染色涂片可以显示不成熟的生殖细胞（精子细胞，精母细胞或在罕见的情况下精原细胞）的存在，但明确的区分往往是不可能的。然而，世界卫生组织手册建议将每毫升 100 多万圆形细胞的观察结果纳入报告（世界卫生组织，2010 年^[13]）。

- 射精异常物理特性的观察，例如颜色、气味、粘度（6.3.1和6.3.2）。

注：精液检查报告的解释和建议由申请人负责。

7.4 质量保证的实践方面

7.4.1 内部质量控制

实验室应实施内部质量控制（IQC），以评估整个分析过程的性能，并检测因所用试剂或设备缺陷、操作程序应用或操作人员培训不当而发生的任何事件。

精子运动的控制材料（录像）和永久安装的载玻片-分别用于形态和活力的染色载玻片，可以制作并保存以供重复使用，或通过参与实验室间比较方案获得。

预稀释和固定精液样品的稳定性可能非常差，在长期用于监测精子浓度之前，应对制备技术进行验证和评估。此外，在某种程度上，可以使用替代技术来验证使用乳胶球等产品进行精子计数的准确性。尽管活动精子的录像不能评估精子活动能力评估的所有方面，但录像的使用对于评估每个操作者评估活动能力检查最重要部分的能力至关重要：正确区分不同类别的精子活动能力。

7.4.2 实验室内比较

每个操作者应评估同一精子样本，以评估操作者间的变异性。为了评价的时间一致性，应在同一材料上进行重复评价。

- 精子浓度—用固定稀释液稀释新鲜精子后，实际计数不应在小时到几天的合理时间间隔内随时间变化（取决于稀释瓶的气密性以及精子是否粘附在瓶壁上）。主要问题是精子聚集体的普遍增加降低了游离精子的浓度。
- 精子活力—由于射精中精子活力的变化，很难获得可靠评估。对于个体间变异性和时间的评估一致性而言，精子运动的录像记录是更为一致的材料。为了通过录像进行质量控制的有效性，必须以常规检查精液的方式将观察到的视频序列呈现给观察者。因此，建议使用与QC评估相同的视频或计算机屏幕进行常规评估。（本文件不考虑CASA的运动性评估。）
- 精子形态—个体间变异性的评估可以通过固定、固定和染色的涂片进行

- 精子活力一个体间变异性的评估可以在染色和涂片上进行

应监测不同操作员获得的结果，以便建立长期绩效评估。实验室应确定这些实验室内比较的频率，并考虑每个精子特征的风险评估以及所测不同参数的目标。

7.4.3 实验室间比较

进行人工/目视精液检查的每个实验室还应参与实验室间比较，至少涉及实验室检查和报告的基本射精特征（精子浓度、活力、形态和活力）。

注：理想的方案是提供目标值，而不仅仅依赖于参与实验室的平均值，这些实验室构成了具有可变经验和能力的群体。

附 录 A
(资料性)
精子缺失测定的统计基础

下表A.1说明了确定无精子的统计基础，该表考虑了精子存在的可能性，尽管在整个20 μL的射精样品中未观察到精子（置信区间，CI；Poisson分布）¹⁾。

表A.1 尽管观察结果为阴性，但仍可能有精子的数量—从不同体积的射精中检测出 20 μL 的等份

置信区间	射精量				
	1mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
95%CI	50	100	150	200	250
97.5%CI	185	369	554	738	923
99.5%CI	265	530	795	1060	1325

附 录 B
(资料性)
高倍视野

“高倍视野”（×40物镜和×10目镜）的面积随所用目镜的类型而变化。在较老的显微镜中，视场明显小于更现代的“广角”眼睛。为了正确估计评估精子浓度的合适稀释度，重要的是确定用于初步评估的显微镜的高倍视野区域。下表B.1举例说明了视野面积的差异以及观察到的精子数量与射精浓度之间的关系。

表B.1 高倍视野、检查体积与近似精子浓度的关系

类型	磁场直径(mm)	场地面积 $\pi \times r^2$ (mm ²)	现场体积 (假设深度 为 20 μm) (nL)	精子可见			
				1	15	40	200
				对应射精浓度(10 ⁶ /mL)			
宽度	0.53	0.22	4.4	0.2	3	9	45
长度	0.38	0.11	2.3	0.4	7	18	88

附录 C

(资料性)

运动评估训练

运动能力评估训练是正确检查人类精液的前提。对精子运动分类的理论理解必须与足够的实践训练相结合，以正确地对不同运动类型的精子进行分类。对于男性的诊断和夫妇的治疗来说，确认射精是否有足够的精子通过宫颈粘液到达受精部位是非常重要的。

C.1 培训目的

——将每个精子分为四组

- 快速前进（主动尾部运动，前进速度 $\geq 25\mu\text{m/s}$ ）
- 缓慢进行（主动尾部运动， $5\mu\text{m/s}$ 至 $24\mu\text{m/s}$ ）
- 非渐进式（主动尾部运动，渐进 $0\mu\text{m/s}$ 至 $4\mu\text{m/s}$ ）
- 不动（无主动尾翼运动）

注：这并不意味着应该评估每个精子的确切速度，而只是为了确定每个精子属于哪一类。

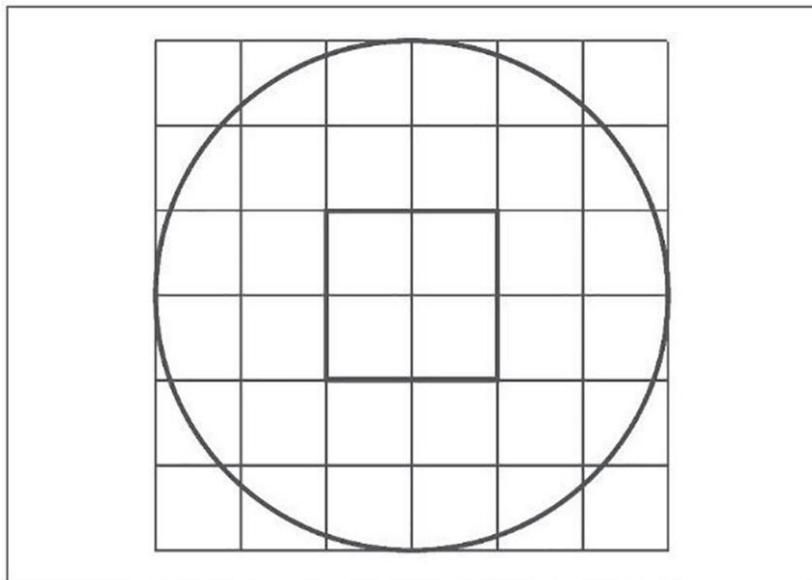
C.2 培训材料

——活体精液样本，带摄像机和显示器的显微镜

- 对于初次介绍，最好与经验丰富的评估员并肩进行
- 建议在显示屏上设置一个网格，并将正方形校准为 $25\mu\text{m}\times 25\mu\text{m}$ ，以帮助区分快速和缓慢进行的精子（如图C.1）。

——录像

- 射精的精子浓度和活动力分布范围很广
- 至少有5个不同的显微镜视野，可以评估总共至少200个精子
- 建议在显示器上（如图C.1）或视频记录中覆盖正方形网格，并校准为 $25\mu\text{m}\times 25\mu\text{m}$ ，以帮助区分快速和缓慢进行的精子。



图C.1 用于人类精子活力评估的视频监视器覆盖示例

圆圈描绘了一个类似于俯视显微镜的视野，由粗线定义的4个框组成的中心组用于定义一个较小的视野区域，以便在精子浓度非常高时进行计数。在校准显微镜视野放大率（使用阶段测微计）后，网格线间隔 $25\mu\text{m}$ ，因此，如果精子在1s内游过一个盒子，它可以被归类为具有至少 $25\mu\text{m/s}$ 的前进速度，即“快速前进”。

请注意，叠加是特定于光学元件的特定组合（显微镜制造商和型号、物镜、中间放大倍数、光学元件未无限修正时的管系数、相机适配器、相机目镜（如果使用）和摄像机型号）。如果在一个实验室中使用多个组合，那么每个组合必须有自己正确校准的覆盖层。

C.3 培训过程

——精子运动原理基础介绍

- 理论：运动范畴的解释
- 实用：与经验丰富的检查者一起观看一些射精的录像，从四个类别中识别精子

——目标导向培训（Björndahl 等人，2010^[2]；Mortimer，1994^[10]）

- 给“新手”一系列记录的精液样本（最初可以是一个较低的数字，例如8个样本，之后，由经验丰富的检查人员（“专家”）定期参与EQC计划，以确定其与具有既定参考值的材料的运动性评估的一致性，获得已知目标值（最多20个样本）
- 完成对一组样本的评估后，将每个样本的结果分别与%motile (a+b+c)、%Progressive (a+b)和%Rapid Progressive (a)的专家值进行比较

- 差异=新手-专家

注：负的差异表示新手低估了类别

- 计算差异的平均值、标准偏差和平均值的95%置信区间

- 平均值TM 使用函数：平均值（value1、value2等）
- 标准差：在MS Excel中TM 使用函数：STDEVA（value1、value2等）
- MS Excel中平均值的95%置信区间TM 使用函数：置信度（0.05，标准差，样本量）

- 在每一组样本之后，反馈给新手的是低估和高估的迹象

- 通过重复样本集进行训练，直到新手接近0%（ $\pm 1\%$ ）的平均差异和95%的置信区间 $< \pm 10\%$ 和接近 $\pm 5\%$ 的活动、进行和快速进行精子的比例

C.4 再培训

在长时间不参加（如超过6个月）或根据实验室定义显示IQC结果不合格后，返回实验室工作的工作人员强烈建议通过检查20-30组记录样本（具有已知目标值的存档材料）进行再培训实现与初始培训过程相同的目标。

附录 D

(资料性)

精子浓度测定用稀释剂

制备含有0.595 M碳酸氢钠和近似0.14M甲醛的水溶液。例如，准备1升：

- 将50.0 g NaHCO₃溶于约500毫升蒸馏水中，加入10.0毫升36%至40%甲醛溶液，加水至1000毫升。
- 在+2° C至+8° C下储存12个月。
- 3、如果形成晶体，过滤溶液。

附录 E

(资料性)

精子浓度测定中适宜稀释度的估算

第6.3.5款中使用改良Neubauer法计数板评估精子浓度的合适稀释度的估算：每个视野是在40倍的物镜进行。

对于稀释液，切勿使用小于50 μL 的精液量，并改变稀释液的体积以获得所需的稀释液。1: 5稀释 100 μL 精液量+ 400 μL 稀释液，以提供足够的混合量和评估量。

表E.1 显微镜下精子数量与适当稀释度的关系

每个显微镜视野的精子，40倍物镜	稀释比例	精液量 (μL)	稀释量 (μL)
<15	1:5(1+4)	100	400
15-40	1:10(1+9)	50	450
41-200	1:20(1+19)	50	950
>200	1:50(1+49)	50	2450

附录 F

(资料性)

报告百分比的两个重复评估的一致性比较

附件主要是指精子的运动。如果可能的话，每个重复的评估应该基于至少200个精子的运动分类。

- 1、对于每个重复性样品，计算活动百分比和不活动百分比（整数百分比，不带小数点）。
- 2、可接受的一致性是指当差异依赖于随机因素的概率小于 5%时，根据使用非对称置信区间的二项式分布的概率计算（Bórn Dahl 等人，2010^[2]）
- 3、计算重复性样品之间的差异，使用%运动或%不运动中的较大者
 - a) 将差值与表 F. 1 所示限值进行比较
 - 查找平均值范围中包含重复性样品结果平均值的行。
 - 如果差异小于或等于极限，则可以接受两个重复评估为一致
 - b) 行动：
 - 如果重复评估被接受，不同运动类型的平均值将作为样本结果报告。
 - 如果两个重复不够接近，则使用两个新的重复性样品进行评估。
 - 如果重复比较在三次尝试中未能显示足够的一致性，则使用所有六次评估计算平均值，并在报告中说明结果是基于非一致性评估的平均值。

表F. 1 接受百分比重复计数的限值

平均值%	差值限值
1	2
02-03	3
04-06	4
07-09	5
10-13	6
14-19	7
20-27	8
28-44	9
45-55	10
56-72	9
73-80	8
81-86	7
87-90	6
91-93	5
94-96	4
97-98	3
99	2

附录 G

(资料性)

两次精子浓度重复计数的一致性比较

如果可能的话，每个重复样品都应该基于至少200个精子的计数。

对于两个重复样品，应评估相同体积的精子悬浮液。

G.1 可接受的一致性是指当计数之间的差异取决于随机因素的概率小于 5%时，根据二项分布的概率计算 (Björndahl 等人, 2010^[2])。

G.2 对于每个重复样品评估，记录计数的精子总数。

G.3 计算两个重复样品计数的和以及它们之间的差

G.4 与表 G.1 中的限值比较

- 查找两个计数之和包含在计数范围内的行。
- 如果差值小于或等于极限，则可以接受两次重复评估

表J.1 接受重复精子计数的限值

范围	差值限值	范围	差值限值
969-1000	61	376-395	38
938-968	60	357-375	37
907-937	59	338-356	36
876-906	58	319-337	35
846-875	57	301-318	34
817-845	56	284-300	33
788-816	55	267-283	32
760-787	54	251-266	31
732-759	53	235-250	30
704-731	52	219-234	29
678-703	51	206-218	28
651-677	50	190-205	27
625-650	49	176-189	26
600-624	48	163-175	25
576-599	47	150-162	24
551-575	46	138-149	23
528-550	45	126-137	22
504-527	44	115-125	21
482-503	43	105-114	20
460-481	42	94-104	19
438-459	41		
417-437	40		
396-416	39		

G.5 行动:

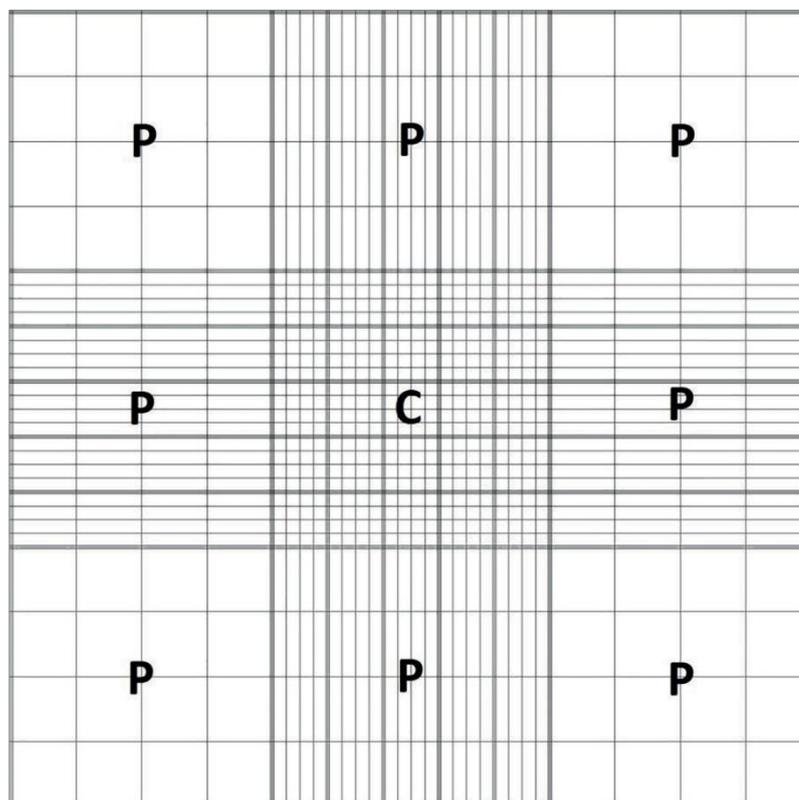
- 如果重复评估被接受，不同运动类型的平均值将作为样本结果报告。
- 如果两个复制不够接近，则使用两个新的复制评估重复。
- 如果重复比较在三次尝试中未能显示足够的一致性，则使用所有六次评估计算平均值，并在报告中说明结果是基于非一致性评估的平均值。

- 如果在每个复制品中计数的精子少于200个，则应在报告中注意，精子浓度结果是基于观察到的精子数量较少。

表J.2 根据评估的体积和稀释度，用于划分两个复制精子计数之和的因素

稀释比例	大方格数			每个方格中计算的面积数								
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9	
校正因子数												
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：血细胞计有两个计数室。每个计数室由9个(3×3)大小相等的区域组成。中心区域由25个大正方形组成，每个正方形由一条三重线包围，而八个外围区域则由20-16个正方形和矩形组成。*)表示稀释不合适。



注：9面积相等；C=中心面积，25个大正方形；P=外围面积，每个面积16-20个不同大小的大正方形

图H.1 改良 Neubaue 计数板外观

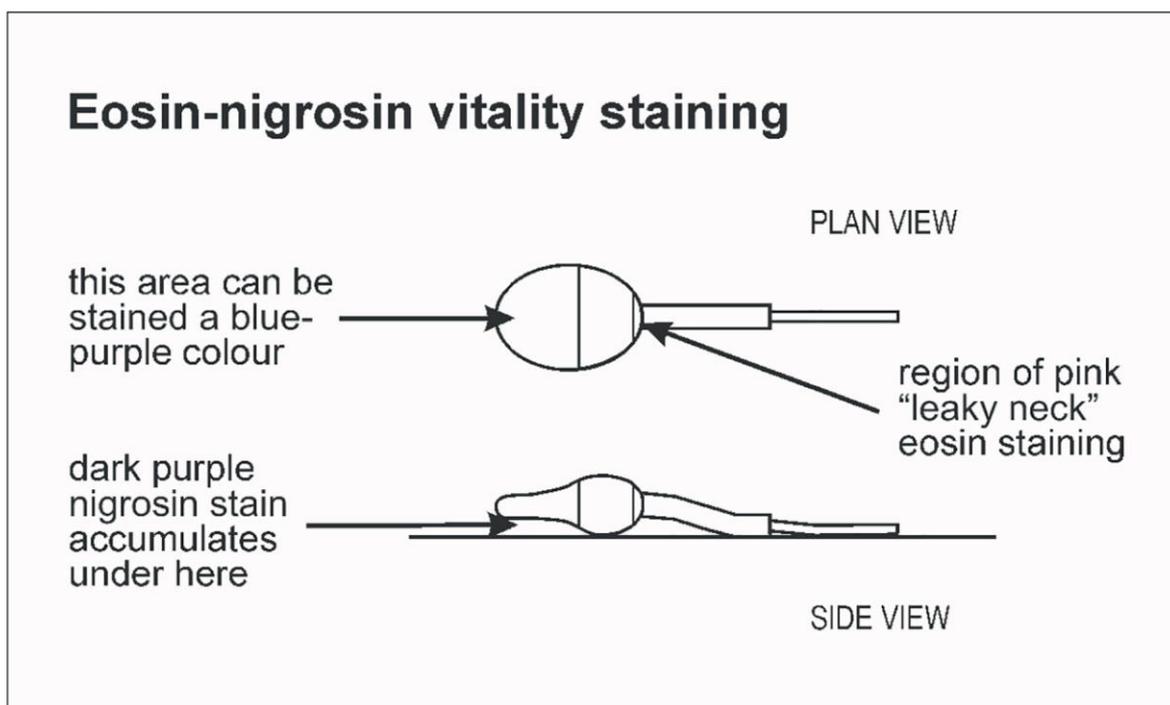
推荐的计数室是一种常用的设备（改良Neubauer计数板），具有高度的准确性。可使用其他经验证和验证的计数室，但应详细说明稀释度和计算系数，以达到准确度和精密度。目前，改良后的Neubauer法是最常用一个标准。

附 录 H
(资料性)
精子活力评估

- 将 30 μ L 精液与 30 μ L 曙红-黑松香混合染色*静置 30 秒
- 将 20 μ L 的混合物转移到标记干净的显微镜载玻片上, 并进行薄薄的涂抹 (以确保黑色素沉淀物不会太厚)
- 让空气干燥, 然后使用大盖片 (例如 22 mm \times 50 mm) **
- 检查至少 200 个精子, 并将每个精子定性为活的或死的
 - 亮场显微镜, 100 \times 油浸物镜
 - 未染色的精子头被算作活细胞
 - 红色或略带粉红色的精子头被视为死亡细胞
 - 仅在头尾交界处有轻微红色或粉红色的精子 (“漏颈”) 被算作活细胞 (见下图H. 1)
 - 无需使用重复涂片进行精子活力评估。

*如果使用单独的曙红和黑色素染色剂, 则按照产品/方法所述的体积和混合比例进行。

**强烈建议安装活力涂片, 以保护其不受人工变化的影响, 而人工变化可能是由于其表面的水分凝结造成的, 从而使曙红从涂片迁移到干燥 (即现在死亡) 的细胞中。

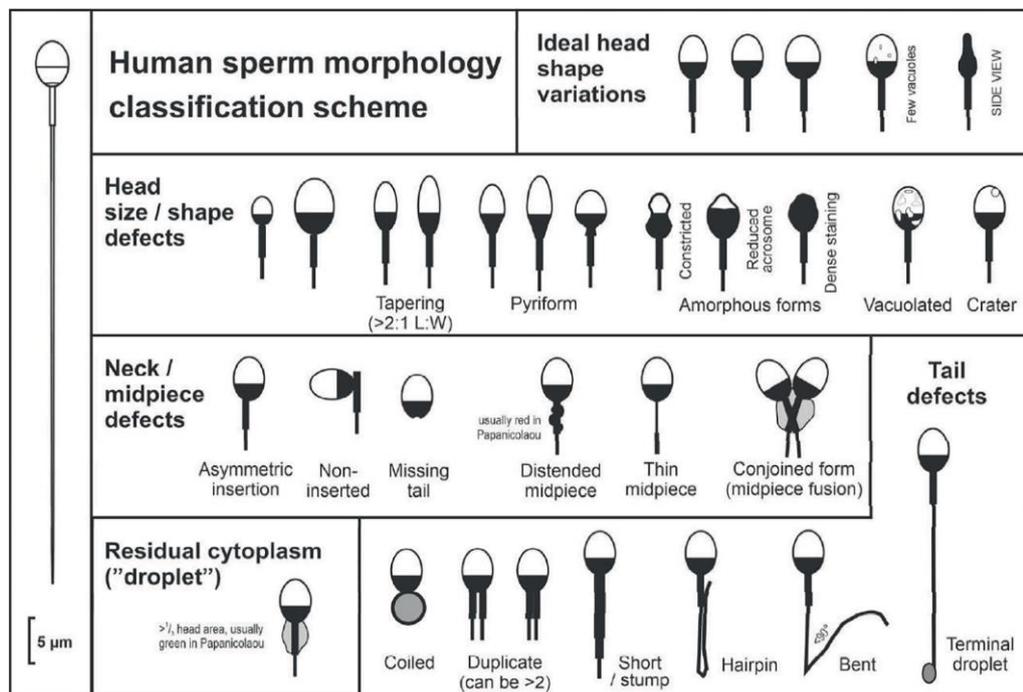


图J. 1 说明在阅读曙红黑色素精子活力幻灯片时遇到的两个常见问题的解释图

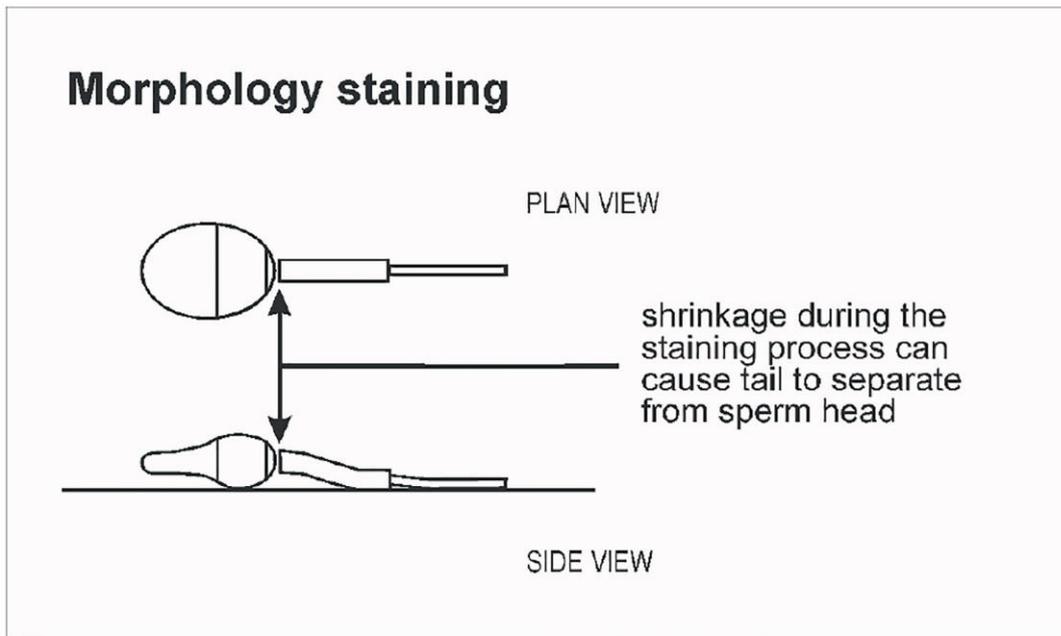
注: (a) 在精子头部前部的黑色素积聚, 可与曙红染色混淆, 以及 (b) 不表示细胞死亡的 “漏颈” 现象的起源。

附 录 I
(资料性)
精子活力评估

- 使用从混合良好的射精精液中提取的约 10 μ L 的独立等份，在干净的标记显微镜载玻片上制备涂片。
- 允许涂片在定影和染色前晾干。巴氏染色法适用于人类精液，通常被推荐为理想的染色方法（Bjórndahl 等人，2010^[2]）。
- 染色后，使用较大的盖玻片（例如 24 mm×50 mm）安装载玻片。
- 根据方法的验证，只需要评估一张幻灯片（Menkveld 等人，2001^[9]）。
- 至少 200 个精子被评估为头部、颈部/中段、尾部或残余细胞质团（以前称为“细胞质滴”）的“典型”形态或异常。注意，异常精子的特征是至少有一个缺陷区，但可能有多达 4 个缺陷区，所有缺陷区都需要在计数范围内进行计数（见图 H. 1）。程序可导致不应记录为异常的人工制品（见图 I. 2）。
- 计算结果如下：
 - “典型”精子的百分比（整数百分比，无小数点）。
 - 每100个精子中每种缺陷的患病率（整数百分比，无小数点）。
 - 任选地，畸形精子指数（畸形精子指数）计算为计算缺陷区域的总和除以计算异常精子的数量。以介于1.00和4.00之间的数值表示，报告时保留两位小数。



图L. 1 显示典型（正常）精子外观和形态异常说明范围的示意图



图L.2 说明精子形态学涂片在干燥、固定和染色过程中的收缩如何导致的人为假象

参 考 文 献

- [1] Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D, ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum Reprod* 2011 26 3207-3212.
- [2] Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U, Alvarez JG, Haugen TB, A practical guide to basic laboratory andrology. Cambridge, UK; New York: Cambridge University Press, 2010.
- [3] Björndahl L, Soderlund I, Kvist U, Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod* 2003 18 813-816.
- [4] Cooper TG, Brazil C, Swan SH, Overstreet JW, Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *J Androl* 2007 28 1-4.
- [5] Kirkman-Brown J, Björndahl L, Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis. *Fertil Steril* 2009 91 627-631.
- [6] MacLeod J, Gold RZ, The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril* 1951 21 187-204.
- [7] Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD, Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1991 30 346-352.
- [8] Menkveld R, Kruger TF, Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology. *Int J Androl* 1995 18 Suppl 2 36-42.
- [9] Menkveld R, Wong W Y, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP, Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* 2001 16 1165-1171.
- [10] Mortimer D, *Practical Laboratory Andrology*. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- [11] Mortimer D, Barratt CL, Björndahl L, de Jager C, Jequier AM, Muller CH, What should it take to describe a substance or product as 'sperm-safe'. *Hum Reprod Update* 2013 19 Suppl 1 i1-45.
- [12] Mortimer D, Menkveld R, Sperm morphology assessment—historical perspectives and current opinions. *J Androl* 2001 22 192-205.
- [13] World Health Organization, WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization, 2010.
-