

文章编号: 1001-764X(2012)10-834-04

# 精子形态学分析的标准化与质量控制

陆金春(武警江苏总队南京医院检验科, 南京 210028)



**作者简介:**陆金春, 1969 年生, 男, 主任技师, 博士, 任武警江苏总队南京医院检验科主任。主要从事临床检验、细胞生物学和男科学专业。发表学术论文近百篇, 其中 10 余篇被 SCI 收录。主编专著 5 本, 副主编专著 2 本, 参编专著 12 本。获武警部队科技进步二等奖 2 项, 武警部队医疗成果三等奖 2 项, 武警部队“十一五”医学科技先进个人等。现任《临床检验杂志》、《中华男科学杂志》、《中国男科学杂志》编委, 武警部队第五届医学科学技术委员会检验医学专业委员会委员。

**摘要:**精子形态学分析可以评估精子的受精能力。但由于精子洗涤、涂片、染色方法的不同, 以及不同技术人员判断标准的不同, 可以导致精子形态学分析结果有很大差异。因此, 精子洗涤时的离心速度、精子悬液浓度、精子涂片染色方法、染色时间和染色时的温度等均需标准化, 并需建立精子形态学分析的标准操作程序。正常和异常精子形态应以严格的 WHO 标准来判断, 并需进行有效的培训来统一。精子形态学分析的质量控制非常重要, 定位质控片和带质控功能的计算机辅助精子形态分析系统, 以及实验室技术人员对精液分析质量控制认识的加强, 可以促进精子形态学分析的室内和室间质量控制尽早临床实验室开展。

**关键词:**精子形态学分析; 标准化; 质量控制; 标准操作程序

**中图分类号:** R321.1; R446.1

**文献标志码:** A

精子形态学分析可以评估精子的受精能力<sup>[1]</sup>。近年, 精子形态学分析在生殖中心、精子库、男科实验室以及相关的科研单位、计划生育部门、检验科等广泛开展。2010 年第 5 版《WHO 人类精液分析与处理实验室手册》(WHO 5) 的出版<sup>[2]</sup>, 给精子形态学分析带来前所未有的争议<sup>[3]</sup>。相比于前 4 版, WHO 5 修订最明显的内容之一就是精子形态学的判断标准和正常参考范围, 并且手册以大量篇幅介绍了各种形态的异常精子。Eliasson<sup>[4]</sup>、Menkveld<sup>[5]</sup>、Pacey<sup>[6]</sup>、Auger<sup>[7]</sup> 等一些国际著名男科专家均对此提出一些质疑。WHO 手册建议将所有临界形态精子均记为不正常<sup>[2]</sup>, 这听起来非常简单, 但实际操作起来并不容易, 因为精子有不同的大小和形状, 如果观察得足够仔细, 几乎没有哪个精子的形态能真正完美。有研究<sup>[8-11]</sup>显示, 精子洗涤、涂片、染色的不同, 以及不同技术人员判断标准的差异, 可以导致精子形态学分析结果有很大变异。因此, 精子形态学分析操作、染色方法的标准化, 正常形态判断标准的一致性, 以及贯穿精子形态学分析始终的室内和室间质量控制非常重要, 本文对此进行阐述。

## 1 操作的标准化

精子形态学分析过程中的所有操作步骤都可能

影响精子形态学分析的结果, 如精液样本的洗涤、制片、固定、染色方法、显微镜质量、自动化分析系统的质量等。精液直接涂片染色背景较杂, 加之精液成分的影响, 可能会产生一定的杂质沉淀, 从而影响精子形态评估。因此, 临床上多采用精液洗涤后的精子涂片、染色, 这样的涂片不仅背景清晰, 而且精子分散度好, 有利于精子形态分析。尤其是对于黏稠度较高和液化不良的精液, 通过吸管吹打洗涤后, 也可以得到较好的涂片质量。而且, 洗涤后的精子涂片更适用于计算机辅助的精子形态分析。

因此, 精子形态学分析操作的标准化首先是精子洗涤时离心速度的标准化。离心速度越高, 对精子的损伤越大。WHO 5 规定<sup>[2]</sup>, 不论是低浓度还是黏稠的或液化不良的精液样本, 精液洗涤时的离心速度为  $600 \times g$  或  $800 \times g$  离心 10 min。精液洗涤后应根据原始精液样本的精子浓度将洗涤后的精子悬液的精子浓度调整到  $20 \times 10^6/\text{mL} \sim 50 \times 10^6/\text{mL}$ 。这样的浓度制备的精子涂片精子分散相对适中, 如果浓度过高, 涂片中的精子会相互重叠, 影响精子形态的准确判断; 如果浓度过低, 涂片中的精子相对分散, 每个视野中的精子数很少, 会大大延长样本分析时间。由于 WHO 5 规定每份精液样本至少分析 2 次, 每次至少分析 200 条精子, 且 2 次的分析结果应在 95% 的可信区间, 因此涂片精子浓度过低, 很难

适应我国男科门诊患者较多的现状。

精子涂片的方法也应标准化,对于未稀释的精液,采用拉薄技术,将 1 滴精液沿成角度的载玻片后缘展开,载玻片向前拖拉,制成涂片;对于洗涤精子悬液,采用移液管法,水平持移液管向前平滑推动,将 1 滴精子悬液沿载玻片表面展开。拉薄涂片时,载玻片角度约为  $45^\circ$ ,拖拉时用力应均匀,类似血液涂片。涂片制备后自然干燥,等待染色。最佳染色操作的标准化对保证精子形态学分析结果的重复性和可比性非常重要<sup>[12]</sup>。WHO 5 推荐的精子染色方法有三种,分别为巴氏染色、Diff-Quik 染色和 Shorr 染色。而文献报道的染色方法除这三种推荐的方法外还有瑞氏、瑞-姬氏、HE 染色法<sup>[13]</sup>、GZIN 法<sup>[11]</sup>、湿片法<sup>[10]</sup>、Testsimplents 染色法<sup>[8,14]</sup>等,这些方法所获得的正常形态精子百分率结果差异很大<sup>[8-11]</sup>。笔者<sup>[13]</sup>曾对瑞氏、瑞-姬、HE 染色、巴氏染色、Diff-Quik 染色和 Shorr 染色等六种染色方法的精子头的长宽径、顶体比、面积和周长等参数进行比较,结果显示,长径、宽径、面积、周长 4 种参数有相同的变化趋势,即瑞-姬染色 > 瑞氏染色  $\approx$  Diff-Quik 染色 > HE 染色 > 或  $\approx$  Shorr 染色 > 巴氏染色。最近,徐元诚首次采用激光 3D 技术分别测量了巴氏染色和 Diff-Quik 染色前后的精子头的长、宽径,发现巴氏染色后精子头长、宽径较染色前降低约 10% ~ 15%,而 Diff-Quik 染色前、后精子头长、宽径变化不大。这些结果提示,不同的化学染料和染色试剂的渗透压等因素对精子形态有明显影响。Meschede 等<sup>[10]</sup>曾提出,为了保证实验室之间结果的可比性和增加精子形态学分析预测生育力的价值,对于形态学玻片的制备和染色应该仅推荐一种标准方法。这样的建议在现实操作中很困难,但规范染色试剂的品质、根据不同染色试剂下精子测量参数来判断精子形态并建立标准的染色片应是可行的。另外,染色时间和染色时的温度也应标准化<sup>[15]</sup>,使用全自动染色机比手工方法易于控制。

## 2 判断标准的一致性

正常形态精子的判断标准是影响精子形态学分析结果准确性的重要因素之一。尽管 WHO 5 对正常精子的形态有明确的标准<sup>[2]</sup>:精子头外形应光滑、轮廓规则,大体上呈椭圆形,顶体区可清晰分辨,占头部的 40% ~ 70%,没有大空泡,并且不超过 2 个小空泡,空泡大小不超过头部的 20%,顶体后区不含任何空泡;中段应该细长、规则,大约与头部长

度相等,中段主轴应与头部长轴成一条直线,残留胞浆不超过精子头大小的 1/3;主段应该比中段细,均一,长约 45  $\mu\text{m}$ ,可以自身卷曲成环状,尾部没有显示鞭毛折断的锐利折角。但标准中的“大体”和“主段可以自身卷曲成环状”还是给技术人员留下了不少想象空间,然而,WHO 5 同时指出“所有处于临界形态的精子应该认为是异常”,这种自相矛盾的描述让实验室技术人员无所适从。而且,有关精子头、中段和主段的长、宽径的具体定值的描述虽然 WHO 5 提供了 77 条巴氏染色精子的正常参考范围,但由于不同染色方法对精子大小有明显的影响,这样的参考范围是否适用于 WHO 5 推荐的 Diff-Quik 染色和 Shorr 染色尚难定论。因此,制定一个严格且能为广大男科实验室技术人员接受和使用的标准是目前迫切需要解决的问题。

张欣宗等<sup>[16]</sup>报告了 9 名实验室人员分别用 WHO 4 和 WHO 5 的标准评估了相同的 1 000 个精子的结果。用 WHO 5 的标准时正常形态精子百分率为  $(26.50 \pm 5.06)\%$ ,显著高于 WHO 4 的  $(11.39 \pm 3.17)\%$ ,而头部异常率  $[(64.26 \pm 7.66)\%]$ 和尾部异常率  $[(10.92 \pm 2.03)\%]$ 显著低于 WHO 4 的  $(76.11 \pm 8.13)\%$ 和  $(39.89 \pm 3.85)\%$ 。同样,吴根凤等<sup>[17]</sup>分别用 WHO 5 和 WHO 4 的标准比较了 50 例精子涂片的精子形态学结果,使用 WHO 5 的标准时正常形态精子百分率为  $(11.8 \pm 3.5)\%$ ,显著高于 WHO 4 的  $(8.7 \pm 3.1)\%$ ,而头部异常率  $[(62.1 \pm 2.7)\%]$ 和尾部异常率  $[(17.4 \pm 3.4)\%]$ 显著低于 WHO 4 的  $(69.3 \pm 3.3)\%$ 和  $(24.3 \pm 3.9)\%$ 。作者认为,WHO 5 的评估标准不如 WHO 4 的严格,正常形态精子百分率更高。其主要原因是 WHO 5 的头部“大体呈椭圆形”的描述,以及尾部 WHO 4 认为“尾部自然弯曲大于  $90^\circ$ 的精子为异常”,而 WHO 5 可以判定为正常。

因此,精子形态的判断标准应该较为严格,不应该有模棱两可的描述,否则精子形态学分析结果将会有很大差异<sup>[18]</sup>。只有实验室技术人员按照一致的标准经过反复的实践操作,彼此之间的分析结果才会趋于一致,提示遵循推荐的判断标准和经验对精子形态学分析十分重要<sup>[19]</sup>。

## 3 质量控制

目前精子形态学分析技术尚有待进一步完善,可通过建立精子形态学分析的质量控制体系来减少分析过程中由于涂片制备、染色方法、分析标准、技

术人员的主观性等所致的结果差异,从而保证结果的准确和可重复性。精子形态学分析的质量控制可从下列几方面进行:(1)建立精液样本留取、精子洗涤、涂片和染色的标准化操作程序(SOP)文件,在实际操作中严格照此文件进行;(2)通过培训,掌握和统一精子形态学的评估标准。Franken等<sup>[1]</sup>报道,WHO于1995年在Tygerberg医院启动了精子形态学培训项目,用WHO形态学判断标准培训来自不同国家的学员,然后每3个月发送不同的巴氏染色精子涂片,参与者评价每张涂片后将结果返回。结果显示,经培训后,大多数参与者维持了形态学阅读技巧,并且适应了WHO形态学判断标准,且彼此间的结果更趋于一致;(3)定位质控片的使用。中心实验室可以将已染色的、涂片但未染色的或者空白的定位质控片按时间先后发给不同的实验室,然后技术人员将已染色的定位质控片上的定位精子的正常和异常结果返回给中心实验室,并与中心实验室的结果对比,可以此评价各实验室对精子形态的评判标准是否一致;在此基础上,不同实验室可进一步评价涂片但未染色的定位质控片上的精子,以进一步评价各实验室染色方法对精子形态学结果的影响;最终发放空白定位质控片和同一份精液标本至不同实验室,评价各实验室涂片制备、染色方法及分析标准等所有精子形态学检查的操作对结果的影响;(4)计算机辅助精子形态学分析系统(CASA)的使用。客观的自动化方法评价精液质量明显优于传统手工方法<sup>[20-21]</sup>。使用带有质控功能的CASA系统进行精子形态学分析可以大大提高分析的准确性和分析速度,而且,CASA系统可以精确测定精子头的长宽径、顶体比甚至有无空泡等<sup>[22]</sup>。所谓带有质控功能。即CASA系统能够自动进行95%可信区间分析,并带有回放功能和视频刻录功能,当对某些结果有疑问时,能够通过回放人工校正绝大部分错误,并可分析这样的错误来自CASA系统本身还是随机误差等。但需注意的是,这样的CASA系统应带有刻度标尺,而且其所配置的电脑显示屏应为标屏,因为标尺有利于人工分析精子大小,而标屏可避免精子形态被人为异常化。另外,质量控制应该成为男科实验室日常工作的基本内容之一。

总之,精子形态学分析的质量控制非常重要。而且,精子形态学评估结果可通过引入严格的WHO标准、强制的培训和建立外部质量控制措施来改善。在目前还没有特定机构来组织实施外部质量控制的情形下,实验室内部主动实施内部质量控制很有必

要。在内部质控的基础上,随着男科学者的共同努力,精子形态学分析的室间质量评价指日可待。

#### 4 问题与展望

要保证精子形态学分析结果的准确、可靠,除了精子洗涤、涂片、染色等操作的标准外,掌握统一的精子形态判断标准,并着手进行一些质量控制措施非常重要。然而,在现有的精子形态学分析中还有诸多问题有待解决:(1)精子的不同染色方法对精子形态参数的影响尚不清楚,是否不同的染色方法应有不同的精子形态学判断标准?更重要的是,不同厂家的染液组分和染色质量相差很大,染色剂没有品质管理,更没有用于鉴别染色效果的标准染色片;(2)精子形态学的判断标准不够一致,检验人员对判断标准理解还存在偏差,而且,缺乏对统一标准的有效培训;(3)缺乏对精子形态学分析的有效的质量控制体系。绝大多数实验室没有建立精子形态学分析的SOP文件,目前国内外均缺乏有效的精子形态学质控品,更没有一个特定的机构来组织实施精子形态学分析的外部质量控制。总之,精子形态学分析的标准化和质量控制工作还面临许多问题,但随着各国男科学者的共同努力,定位质控片和带质控功能的CASA系统的面世,以及实验室技术人员和各级行政管理人员对精液分析质量控制认识的加强,精液分析尤其是精子形态学分析的标准化和质量控制研究将会取得更大的进步。

#### 5 参考文献

- [1] Franken DR, Oehninger S. Semen analysis and sperm function testing[J]. *Asian J Androl*, 2012, 14(1): 6-13.
- [2] World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010: 56-102.
- [3] 陆金春, 黄宇烽, 吕年青. 《世界卫生组织人类精液分析实验室技术手册》与我国男科实验室现状[J]. *中华男科学杂志*, 2010, 16(10): 867-871.
- [4] Eliasson R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects[J]. *Asian J Androl*, 2010, 12(1): 26-32.
- [5] Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[J]. *Asian J Androl*, 2010, 12(1): 47-58.
- [6] Pacey AA. Quality assurance and quality control in the laboratory andrology[J]. *Asian J Androl*, 2010, 12(1): 21-25.
- [7] Auger J. Assessing human sperm morphology: Top models, underdogs

- colorectal cancer and lymphoma[J]. Br J Cancer, 1999, 81(6): 1009-1016.
- [30] Hui D, Qiang L, Jian W, *et al.* A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2009, 41(1): 36-41.
- [31] Weng DS, Zhou J, Zhou QM, *et al.* Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas[J]. J Immunother, 2008, 31(1): 63-71.
- [32] Hontscha C, Borck Y, Zhou H, *et al.* Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC)[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2): 305-310.
- [33] Li X, Xu B, Wu J, *et al.* Review of Chinese clinical trials on CIK cell treatment for malignancies[J]. Clin Transl Oncol, 2012, 14(5): 242-245.
- [34] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced NK-like T cells: from bench to bedside[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 435745.
- [35] Jager M, Schoberth A, Ruf P, *et al.* The trifunctional antibody er-tumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2[J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 4270-4276.
- [36] Wang QJ, Wang H, Pan K, *et al.* Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK [J]. Chin J Cancer, 2010, 29(7): 641-648.
- [37] Weibel S, Raab V, Yu YA, *et al.* Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 68.
- [38] 陈俊俊, 蒋敬庭, 吴昌平. PD-L1 信号在免疫应答中的作用及对 T 细胞的调控机制[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(6): 450-452.
- [39] Jiang J, Zhu Y, Wu C, *et al.* Tumor expression of B7-H4 predicts poor survival of patients suffering from gastric cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(11): 1707-1714.
- [40] 蒋敬庭, 吴昌平, 沈月平, 等. 协同刺激分子 B7-H4 影响细胞因子诱导的杀伤细胞治疗胃癌预后的多因素 COX 模型分析[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(5): 656-660.
- [41] 蒋敬庭, 吴昌平, 沈月平, 等. 共刺激分子 B7-H4 表达对胃癌患者细胞因子诱导的杀伤细胞治疗预后的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2010, 13(5): 366-370.
- [42] 蒋敬庭, 吴昌平, 沈月平, 等. B7-H4 表达对细胞因子激活的杀伤细胞治疗胃癌患者生存时间的影响[J]. 中华消化杂志, 2010, 30(4): 276-277.
- (收稿日期:2012-08-16)
- (本文编辑:许晓蒙,陈维忠)
- 
- (上接第 836 页)
- or biometrics? [J]. Asian J Androl, 2010, 12(1):36-46.
- [8] Henkel R, Schreiber G, Sturmhoefel A, *et al.* Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa[J]. Fertil Steril, 2008, 89(2):449-455.
- [9] Coetzee K, Kruger TF, Vandendael A, *et al.* Comparison of two staining and evaluation methods used for computerized human sperm morphology evaluations[J]. Andrologia, 1997, 29(3): 133-135.
- [10] Meschede D, Keck C, Zander M, *et al.* Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis[J]. Int J Androl, 1993, 16(6): 362-369.
- [11] Davis RO, Gravance CG. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis[J]. Fertil Steril, 1993, 59(2): 412-417.
- [12] Lacquet FA, Kruger TF, Du Toit TC, *et al.* Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology[J]. Arch Androl, 1996, 36(2): 133-138.
- [13] 陆金春, 黄宇烽, 张红焯. 现代男科实验室诊断[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2009: 36-42.
- [14] 刁英, 杨智敏, 谭兵兵, 等. Testsimplents 染色玻片法与改良巴氏染色法分析精子形态的比较[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(5): 356-357.
- [15] Graves JE, Higdon HL 3rd, Boone WR, *et al.* Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory[J]. J Assist Reprod Genet, 2005, 22(5): 219-225.
- [16] 张欣宗, 姚康寿, 熊承良. 《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版与第 4 版精子形态评估标准的比较研究[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(11): 989-992.
- [17] 吴根凤, 朱卫中. 精子形态分类计数不同判断标准的结果差异[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(5): 395.
- [18] Carrell DT, Cartmill D, Jones KP, *et al.* Prospective, randomized, blinded evaluation of donor semen quality provided by seven commercial sperm banks[J]. Fertil Steril, 2002, 78(1): 16-21.
- [19] Eustache F, Auger J. Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods[J]. Hum Reprod, 2003, 18(5): 1018-1022.
- [20] Garrett C, Liu DY, Clarke GN, *et al.* Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples[J]. Hum Reprod, 2003, 18(8): 1643-1649.
- [21] 黄茜, 刘锋, 邹彦, 等. 计算机辅助分析与人工计数分析精子形态结果比较[J]. 山东医药, 2010, 50(15): 72-73.
- [22] Harr R. Characterization of spermatozoa by planar morphometry [J]. Clin Lab Sci, 1997, 10(4): 190-196.
- (收稿日期:2012-08-31)
- (本文编辑:许晓蒙,陈维忠)