

临床实验室应重视精液检验的规范化

陆金春

(东南大学附属中大医院生殖医学中心, 江苏 南京 210037)

摘要: 精液检验结果的准确、可靠直接影响相关疾病的诊断与治疗。因此, 临床实验室应重视精液检验的规范化。规范化不仅需要在方法学上做到科学、合理, 在样本留取、检验项目名称和具体操作方面亦应如此。在缺乏精液检验室内质量评价的情况下, 建立适当的室内质量控制措施很有必要。随着精液检验自动化、仪器设置最优化的普及, 精液检验规范化将更易实施, 而教育、培训、质量控制将是保证所有临床实验室对精液进行规范化检验并保持长期稳定的重要举措。

关键词: 精液分析; 规范化; 质量控制

Clinical laboratories should pay attention to the standardized detection of semen LU Jinchun. (Center for Reproductive Medicine, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The accuracy and reliability of semen analysis results affect the diagnosis and treatment of related diseases. Therefore, the clinical laboratories should pay attention to the standardized detection of semen. The standardization of semen analysis is reflected not only in the reasonable and scientific methodology, but also in the collection of semen samples, the name of detection items and specific operation details of each detection item. In the lack of specified institutions for the external quality assessment of semen analysis at present, it is necessary to establish the appropriate intra-laboratory quality control measures. With the continuous popularization of the automation of semen analysis and the optimization of instrument settings, the standardization of semen analysis will be easier to be implemented, and education, training and quality control will be important measures to ensure that all clinical laboratories carry out the standardized detection of semen samples and maintain the long-term stability of detection results.

Key words: Semen analysis; Standardization; Quality control

精液检验为临床实验室尤其是男科实验室或生殖医学实验室最基本的项目, 可用于确定男性生育状态, 是不育评估的第一步^[1]。除常规检验外, 精液检验还包括精子形态学及存活率、精子DNA完整性、精子膜完整性、精浆生化、精浆或精子表面抗精子抗体、精液弹性蛋白酶及脱落细胞等特殊检查。精液常规检验是一组理学和显微镜检验的结合, 包括精液颜色、气味、量、pH值、液化、黏稠度、精子浓度与总数、精子活力及有无精子凝集等。

精液检验的每个项目对男性生育力的综合评估都是必不可少的^[2], 其结果准确与否直接关系到患者治疗方案的选择。为保证精液检验结果准确可靠, 必须进行规范化检验。我们将从精液检验规范化的重要性、具体要求和相关质量控制措

施等方面进行阐述, 为临床实验室从事精液检验的人员以及实验室负责人提供参考。

1 精液检验规范化的重要性

精液检验结果准确、可靠直接关系到临床医生的准确诊断和辅助生殖技术治疗措施的选择^[2]、实验室及检验人员的自身信誉以及实验室的可持续发展。为避免误诊和漏诊, 保证科研和流行病学的调查质量规范化检验十分关键。

目前, 许多已发表的关于精液分析的文献结果之间并不一致, 原因可能与统计学方法运用不当、检验方法不规范、检测结果变异较大等有关^[3-4]。因此, BJÖRNDAHL等^[5]提出, 所有撰写精液分析相关论文的作者, 必须说明检验方法是否依照世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 手册^[6]、检测人员是否经

过培训、有无参加室间质量评价等，如作者没有遵循WHO手册，在投稿论文中，应对所用方法提供偏差和不确定度说明，表明其所投论文检验结果准确、可靠。

2 精液检验规范化的具体要求

精液检验规范化在方法学上应做到科学、合理，在样本留取、检验项目名称、检验项目具体操作等方面亦应如此^[7]。

2.1 选择科学、合理的检验项目是精液检验规范化的前提

要规范一个检验项目，首先检验原理必须科学，性能必须经过充分评估，且应经验证适合应用于临床^[8]。然而，临床实验室使用的检验项目，尤其是一些相对较新的项目，在未经充分评估和验证后就进入临床，其价值常被临床医生质疑。

如对于反映精子DNA损伤的精子DNA碎片化指数（DNA fragmentation index, DFI）^[9]的测定，最常用的方法为流式细胞术的精子染色质结构分析法，此法存在设门不规范，计算方法存疑等缺陷，并引入了目前尚存在争议的高DNA可染色性参数^[10]。尽管不断有临床医生和检验人员提出质疑^[11]，但因仪器分析过程完全封闭且有文献支持，许多男科实验室仍在采用。又如反映男性生殖道隐性感染的精液弹性蛋白酶检验^[12]，其试剂盒检测原理为：酶标抗 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶抑制剂抗体和抗弹性蛋白酶抗体与精液样本中弹性蛋白酶- $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶抑制剂复合物结合。这说明此法检测的是精液样本中弹性蛋白酶- $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶抑制剂复合物，而精液中与 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶抑制剂结合的弹性蛋白酶为失活的酶，炎症过程起作用的却是游离弹性蛋白酶^[11]，该法虽存在明显缺陷，但仍有临床实验在采用。因此，为保证检测结果准确、可靠，每个精液检验项目用于临床样本检测前，必须进行科学性和临床价值评估^[13]。

2.2 精液样本留取的规范化是保证样本检测结果准确的基础

随着精液检验自动化的发展，结果准确性和重复性越来越高，但样本采集如不符合要求，结果仍无效，甚至会误导临床，因此检验前规范化样本留取非常重要。

精液样本规范化留取主要体现在以下几个方面^[6, 14]。（1）留取前应禁欲2~7 d，禁欲时

间过短，精液量和精子总数会相应降低；禁欲时间过长，精液量和精子总数会明显增多，但精子活力会降低。如是复查或观察疗效，禁欲天数最好相同，这样检验结果才具有可比性。

（2）不可采取避孕套或性交中断法，前者含杀精剂，影响精子活力检验，后者受女性分泌物影响，应采用手淫法留取。如留取精液确实非常困难，可采用特制无毒避孕套留取。（3）留取精液样本的完整性，是保证精液检验结果准确的关键，精液样本前段或后段任一部分丢失都会影响检测结果。应采用干燥、清洁、无毒、广口的专用采样杯留样，且及时加盖，切忌使用痰杯、尿液杯和试管留样。（4）样本留取应在实验室附近安静、舒适且有一些视频刺激的专用取精室进行，切忌在卫生间留取，因没有足够性刺激，精液很难充分留取，对精液质量也有影响。如患者留取确实困难，可在家或宾馆留取。需在1 h内保温运送至实验室，或在配偶帮助下留取，但用于辅助生殖的精液样本只能在生殖医学中心专用取精室留取。（5）精液样本留取前，应仔细询问患者状况，有无发热、服用药物、饮酒、吸烟及特殊工作环境等，如有，应在报告中注明。样本留取后应置于37℃孵箱液化。（6）留取用于精液培养或辅助生殖的样本前，患者需清洗双手、阴茎，将精液样本留于无菌采样杯中，及时送检。

2.3 精液检验项目名称的规范化

在相关文献和临床实验室工作实践中，许多精液检验项目名称应用不规范^[15]，例如：

（1）“精子密度”应为“精子浓度”，因为精子是可计数的，而密度是质量相对体积的概念；（2）“精子活率”应为“精子活动率”或“精子存活率”，精子活动率是所计数精子中能运动精子的比例，精子存活率是所计数精子中活精子的比例，两者含义不同，且精子存活率结果应高于精子活动率，因为活的精子可以不动；（3）“精子活力”为精子运动能力的分级，不是单一指标，而是包括前向运动精子百分比、非前向运动精子百分比和不运动精子百分比3项；精子活动率为活动精子数占总精子数的百分比，为前向运动精子百分比和非前向运动精子百分比之和，但“精子活力”常被错误地等同于“精子活动率”；（4）“圆细胞”被错误地等同于“白细胞”，圆细胞只是形态上

的概念, 精液中的脱落细胞基本为圆形, 包括来自睾丸的各类生精细胞、各种上皮细胞和血细胞, 出现不同细胞提示不同临床意义, 通过染色法完全可区分“圆细胞”。另外, “精子前向运动率”、“精子正常形态率”、“无精症”、“少精症”等也常用, 但应分别称其为“前向运动精子百分比”、“正常形态精子百分率”、“无精子症”或“无精液症”、“少精子症”或“少精液症”等。

2.4 精液检验操作要求的规范化

要做到精液检验规范化, 首先必须按最新指南、标准或共识执行。目前, 精液分析最权威的指南是WHO发布的第5版《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》^[6]。在此基础上, 临床实验室应结合自身实验条件, 编写适合的标准操作规程(standard operation procedure, SOP)。每个检验项目均应编写含具体操作细节的SOP, 使SOP真正做到“做你所写、写你所做”, 使新检验人员按SOP即可独立操作, 且检验结果在允许误差范围内。

精液检验操作规范化的具体要求^[14]包括以下几方面。(1) 检验前, 样本必须充分混匀, 以保证所取的任何一部分精液、精浆均能代表整体, 混匀时应轻柔地上下颠倒或旋转, 以免产生气泡影响取样准确性^[14]。(2) 精液量用称重法测量, 不用刻度量筒法或目测估算法, 使用可去皮电子天平^[14]。(3) 不液化或液化不全、黏稠度增加的精液样本必须通过反复抽吸或用糜蛋白酶、菠萝蛋白酶处理, 否则会影响精子活力及运动参数分析, 也会影响准确取样、精子与精浆的有效分离^[7]。

(4) 分析精子浓度、活力及形态时, 应随机选择视野, 所选视野应遍布整个分析区域, 避免来回移动视野, 防止重复检验^[14]。(5) 分析精子浓度、活力和形态时, 均需检验2次, 每次检验精子数不低于200个, 且2次结果应在95%可信区间内, 然后取均值报告。如2次检验结果超过95%可信区间, 必须重做^[14]。

(6) 分析精子活力时, 高浓度($>50 \times 10^6/\text{mL}$)样本必须用自身精浆稀释后再分析精子活力, 因为高浓度精子碰撞机会明显增加, 而碰撞会改变精子运动轨迹, 导致活力分析结果出现偏差; 分析视野应距边缘至少5 mm, 以避免边缘效应; 因精子对温度比较敏感, 故应使整个

分析系统处于37℃恒温状态; 因随时间延长检测结果会受影响^[7, 13], 应在样本收集后1 h内完成分析。(7) 使用计算机辅助精液分析(computer-assisted sperm analysis, CASA)系统分析精子浓度和活力时, 必须进行人工校正, 以保证所分析精子数与实际精子数一致^[16]。(8) 样本用于精子形态学分析时, 应离心洗涤, 离心速度必须控制在500~800×g, 以防精子损伤, 而在获取精浆样本时, 离心速度必须不低于3 000×g, 离心15 min, 以免精浆中残余精子或细胞对生化检验结果产生影响。

(9) 进行精子形态学分析时, 所用电脑显示屏必须为标屏, 带有标尺, 如使用CASA系统必须进行人工校正。(10) 进行抗精子抗体检测时, 如用酶联免疫吸附试验, 阳性结果应采用另一试剂盒复检, 如仍为阳性, 可报告结果; 如复检为阴性, 可采用混合抗球蛋白反应法(mixed antiglobulin reaction, MAR)或免疫珠试验(immunobead test, IBT)复检, 最终结果应以MAR或IBT为准。(11) 精子会消耗果糖导致精浆果糖假性降低, 检测精浆果糖时, 精液常规分析完成后应立即将精子与精浆分离。

(12) 对有疑问的结果, 首先应进行复检, 然后根据SOP排除可能影响因素。此外, 不同检验项目要求关注不同细节, 如孵育时间、温度、试剂盒室温平衡、涂片干燥、样本处理等, 一些细节可能会直接影响检验结果的准确性。

3 精液检验的质量控制措施

目前, 仍缺乏精液检验的室内质量评价组织, 因此建立适当的室内质量控制措施就很必要。(1) 用于精液量检验的天平必须每年校验1次; (2) 用于精液pH值检验的试纸必须用pH6.0~10.0的精密试纸, 且必须用不同标准pH值溶液进行验证; (3) 用于精子浓度、活力分析的精子计数池深度每半年或1年必须校正1次; 计数池使用1~2年或损坏后应立即更换^[7]; (4) 精子浓度用定值乳胶珠进行每日质量控制, 在CASA分析仪安装完毕及维修后, 首次使用精子计数池, 同一实验室不同CASA分析仪比较时均需使用定值乳胶珠质控品进行验证; (5) 精子活力分析可用自带刻录功能的CASA分析仪制备视频录像, 并用于每日质量控制; (6) 精子形态学分析可用预染玻片、未染玻片或同一精液样本进行每日质量控制, 分别用于

评价精子形态学判断标准、染色操作以及整个形态学分析过程对结果的影响；（7）精浆生化检测可用同一精浆样本分装的冻融样本作为质控品；（8）抗精子抗体可用分装冻融的阴性和阳性精浆样本作为质控品；（9）使用流式细胞仪检测精子DFI等项目前，应采用标准荧光微球对流式细胞仪进行校准；（10）每份样本，尤其是用于无有效质控品的精液检验项目的样本，均应重复检验2次，2次检验结果差异在可接受范围内，才可取均值报告结果。

需要注意的是，自制室内质控品每日需与精液样本一起分析，且应确保结果在控。如一批质控品即将用完或失效，需提前制备新的质控品，且制备的新质控品应用原质控品监控。室内质量控制要绘制质控图，并定期分析。在质量控制结果失控时，要及时查找原因，尤其要关注环境、试剂、仪器、器材有无更改，质量控制结果在控后，方可进行常规样本检验，失控原因和具体解决措施应有详细记录。

有关精液检验室间质量评价工作，目前我国已有一些尝试，但效果有限，这一情况已引起我国生殖检验专家、相关试剂生产者和行政主管部门的关注，并已着手进行相关研究，期待在不久的将来会有专门从事精液检验室间质量评价的机构出现。

4 展望

随着男科学和生殖医学的快速发展，新的精液检验项目，尤其是精子功能检验项目，如精子线粒体膜电位、诱导顶体反应、精子活性氧、精子表面凝集素、精子与透明带结合、精子穿卵能力检测等^[17]已被引入临床，并逐步发展成为常规检验项目。随着人工智能的引入，将精液量、pH值、黏稠度、精子浓度、精子活动率、形态学等整合在一起的自动化精液检验系统亦可能面世。建立科学、合理的检测方法进行充分的性能评估和广泛的临床验证是保证精液检验规范化的前提；建立规范化SOP和相应质控措施是保证检测结果准确、可靠的有效措施。

总之，随着精液检验的自动化、仪器设置最优化^[13, 18-19]的发展，规范化工作将更易实施，但是教育、培训（尤其是手把手培训）、质量控制将是保证所有实验室对精液进行规范检验并保持长期稳定的重要举措^[20]。

参考文献

- [1] AHADI M, ALIAKBARI F, LATIFI S, et al. Evaluation of the standardization in semen analysis performance according to the WHO protocols among laboratories in Tehran, Iran[J]. Iran J Pathol, 2019, 14 (2): 142-147.
- [2] LEMMENS L, KOS S, BEIJER C, et al. Optimization of laboratory procedures for intrauterine insemination: survey of methods in relation to clinical outcome[J]. Andrology, 2018, 6 (5): 707-713.
- [3] LEWIS K C, LAM I, NIEB J, et al. Inconsistent adoption of World Health Organization V (2010) semen analysis reference ranges in the United States eight years after publication[J]. Urology, 2019, 126: 96-101.
- [4] OMBELET W, DHONT N, THIJSEN A, et al. Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review[J]. Reprod Biomed Online, 2014, 28 (3): 300-309.
- [5] BJÖRNDAHL L, BARRATT C L, MORTIMER D, et al. 'How to count sperm properly': checklist for acceptability of studies based on human semen analysis[J]. Hum Reprod, 2016, 31 (2): 227-232.
- [6] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [7] SIKKA S C, HELLSTROM W J. Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure[J]. Asian J Androl, 2016, 18 (3): 392-401.
- [8] ABOULMAKARIM S, BENBELLA A, HARDIZI H, et al. Retrospective assessment of an assisted reproductive technology method[J]. Ann Biol Clin (Paris), 2018, 76 (1): 11-21.
- [9] 陆金春. 精子DNA损伤检测的临床应用价值及面临的问题[J]. 中华医学杂志, 2015, 95 (36): 2989-2993.
- [10] 陆金春. 应规范男科实验室的检测项目[J]. 中华医学杂志, 2018, 98 (46): 3789-3791.
- [11] 王家雄, 韩慕天, 沈丽燕, 等. SCSA和SCD检测精子DNA完整性结果比较及与精子质量参数的相关性分析[J]. 中华男科学杂志, 2017, 23 (4): 329-336.
- [12] 程兆俊, 周文静, 冯颖, 等. PMNE复查时间的选择对男性生殖道感染患者的影响[J]. 检验医学, 2018, 33 (5): 396-398.
- [13] TALARCZYK-DESOLE J, BERGER A, TASZAREK-HAUKE G, et al. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?[J]. Ginekol Pol, 2017, 88 (2): 56-60.
- [14] 陆金春, 李铮, 夏术阶. 中国男性生育力规范化评估专家共识[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018.
- [15] 陆金春. 我国男科实验室精液分析现状与应对策略[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2017, 5 (2): 65-70.
- [16] LU J C, HUANG Y F, LÜ N Q. Computer-aided sperm analysis: past, present and future[J]. Andrologia, 2014, 46 (4): 329-338.
- [17] AGARWAL A, ARAFA M, CHANDRAKUMAR R, et al. A multicenter study to evaluate oxidative stress by oxidation-reduction potential, a reliable and reproducible method[J]. Andrology, 2017, 5 (5): 939-945.
- [18] 陆金春. 精液生化指标的全自动检测及临床应用[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24 (4): 291-296.
- [19] BOE-HANSEN G B, SATAKE N. An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA[J]. Theriogenology, 2019, 137: 93-103.
- [20] 卢文红, 谷翊群, 李鸿, 等. 精液分析的培训及效果评估[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17 (7): 601-605.

（收稿日期：2020-03-12）

（本文编辑：伍潇怡、范基农）