

·规范与标准·

常规体外受精中国专家共识(2024 年)

中国医师协会生殖医学专业委员会

通信作者:李蓉,北京大学第三医院妇产科生殖医学中心,北京 100191, Email: roseli001@sina.com; 李达,中国医科大学附属盛京医院生殖医学中心,沈阳 110022, Email: leeda@sina.cn

【摘要】 常规体外受精(conventional *in vitro* fertilization, c-IVF)是利用优化后的精子与卵母细胞自然结合完成 IVF 的一类辅助生殖技术,主要应用于女性因素不孕、部分男性因素不育及不明原因不孕不育患者的助孕治疗。但目前尚缺乏 c-IVF 相关的操作标准或共识,尤其对于如何选择最佳授精方式以避免受精率低下或完全受精失败的发生,始终是困扰辅助生殖临床医生与胚胎实验室人员的难题。因此,由中国医师协会生殖医学专业委员会发起,并联合全国多家生殖医学中心共同编撰了本共识,旨在规范 c-IVF 的选择标准、精液优化处理及授精操作流程,为辅助生殖临床医生和胚胎实验室人员提供实用性参考,以期获得稳定且满意的辅助生殖助孕结局。

【关键词】 生殖技术,辅助; 常规体外受精; 精液参数; 精液优化方式; 授精方式; 共识

Chinese expert consensus on conventional *in vitro* fertilization (2024)

Chinese Association of Reproductive Medicine

Corresponding authors: Li Rong, Center for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China, Email: roseli001@sina.com; Li Da, Center for Reproductive Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China, Email: leeda@sina.cn

【Abstract】 Conventional *in vitro* fertilization (c-IVF) is one of the most commonly used assisted reproductive technology (ART) approaches. In c-IVF, cumulus-intact oocytes are incubated with a defined range of spermatozoa, followed by a fertilization assessment a few hours later. c-IVF is primarily used for patients with female factor infertility, some cases with male factor sterility, and unexplained infertility. Given the absence of standardized operating protocols or consensus regarding c-IVF, the selection of an optimal insemination method poses challenges for ART clinicians and embryologists when dealing with special cases involving critical semen parameters. Therefore, this consensus was initiated through collaboration with the Chinese Association of Reproductive Medicine and collaboratively compiled by numerous reproductive medicine centers in China. The objective of this consensus is to establish standardized protocols for semen preparation and fertilization procedures in c-IVF while providing selection criteria for insemination methods. This consensus serves as a practical reference for ART clinicians and embryologists aiming to achieve consistent and satisfactory outcomes in ART.

【Key words】 Reproductive techniques, assisted; Conventional *in vitro* fertilization; Sperm parameters; Sperm preparation methods; Insemination methods; Consensus

常规体外受精(conventional *in vitro* fertilization, c-IVF)是人类辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)中被广泛应用的授精方式之一,其主要是针对女性因素(如输卵管性不孕、子宫内膜异位症、排卵异常及宫颈因素等)、部分男性因素(如轻、中度少弱畸形精子症)及不明原因不孕不育(卵巢功能评估、输卵管通畅度评估及男性精液分

析均正常)患者所采取的治疗方案。相较于卵胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术而言,c-IVF 的精卵结合方式更接近人类生理状态,实验室操作也相对简单。然而在精液参数正常的情况下,c-IVF 仍然有 20% 左右的取卵周期发生受精率低下(low fertilization rate, LFR, < 25%)及 5%~15% 的取卵周期发生完全受精失败

DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20231225-00376

收稿日期 2023-12-25 本文编辑 王李艳

引用本文:中国医师协会生殖医学专业委员会.常规体外受精中国专家共识(2024 年)[J].中华生殖与避孕杂志, 2024, 44(3): 219-228. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20231225-00376.

中华医学会杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



(total fertilization failure, TFF)^[1]。目前尚缺乏 c-IVF 的操作标准或共识,尤其对于精液参数处于临界值的病例,授精方式的选择多根据临床医生和胚胎实验室人员的经验并结合患者病史决定,虽然做到了个性化处理,但由于缺乏有力数据的支持,无法避免发生 LFR 和 TFF 的风险。部分中心为了避免受精失败的发生,则会选择对全部或部分卵母细胞行 ICSI 技术授精,无形中导致了 ICSI 技术的过度应用。本共识根据国内外发表的文献,并结合长期实践经验,经过专家讨论制定而成。通过对 c-IVF 选择标准、精液的优化处理、授精操作、授精时机的选择、短时受精及早期受精判断、受精失败的补救措施、受精观察、其在胚胎植入前遗传学检测 (preimplantation genetic testing, PGT) 与无创胚胎染色体筛查 (non-invasive chromosome screening, NICS) 的应用、质量控制及胚胎实验室新员工培训与考核等多方面进行详细阐述,并提出相应推荐意见,以期辅助生殖临床医生和胚胎实验室人员提供实际可行的建议和指导。

一、c-IVF 的精液标准

《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第六版)》(WHO 手册第六版)提出的正常男性精液质量下限参考标准(第五百分位值):精子总量为 39×10^6 、精子浓度为 $16 \times 10^6/\text{mL}$ 、前向运动精子率为 30%、正常形态精子率为 4%^[2],但该下限标准对 ART 治疗中是否可以选 c-IVF 缺乏指导意义。因此,仍需制定一个可以选择 c-IVF 授精方式的精液质量下限标准。

对于少、弱精子症患者(精子浓度 $<20 \times 10^6/\text{mL}$ 和/或精子活动率 $<40\%$, WHO 手册第四版^[3])授精方式选择的一项随机对照试验研究中,将 106 个取卵周期的 1 518 枚卵母细胞进行随机分配,行 c-IVF (669 枚)或 ICSI (849 枚),结果表明 ICSI 组受精率(50%)高于 c-IVF 组(41%),且 c-IVF 组发生 TFF 的风险要明显高于 ICSI 组^[4];另一项随机对照试验研究分别对少精子症组[精子浓度 $(5 \sim 20) \times 10^6/\text{mL}$, WHO 手册第四版]与少弱精子症组[精子浓度 $(5 \sim 20) \times 10^6/\text{mL}$ 且前向运动精子 10%~32%, WHO 手册第四版]的卵母细胞行 c-IVF 或 ICSI,结果表明两组不同授精方式间的受精率差异没有统计学意义^[5]。但目前尚缺乏基于最新版 WHO 手册少弱精子症诊断标准的相关研究。

鉴于 ART 治疗所使用的精子通常是经密度梯度离心或上游后所获得的活力较高的精子,因此将处理后的精子参数作为受精结果的预测指标更为合适。一项回顾性研究显示,当处理后前向运动精子总数 (total progressively motile sperm cell count, TPMC) $<1.1 \times 10^6$ 时发生 TFF 的风险 $>25\%$ ^[6]。另一项对 112 个同时行 c-IVF 和 ICSI 周期的回顾性研究显示,ICSI 受精而 c-IVF 未受精周期的处理后活动

精子总数 $[(1.06 \pm 0.9) \times 10^6]$ 显著低于 c-IVF 与 ICSI 均受精周期的处理后活动精子总数 $[(4.4 \pm 3.4) \times 10^6]$,表明优化处理后的活动精子总数为较好的预测受精失败的指标;该研究将处理后活动精子总数 $<1.5 \times 10^6$ 作为临界指标,结果显示其对 c-IVF 受精失败的预测灵敏度为 80%^[7]。聂玉林等^[8]的一项回顾性研究表明,上游后前向运动精子回收率 $\leq 5\%$ 和 TPMC $<1.0 \times 10^6$,是影响受精率的高危因素。

针对畸形精子症的最佳授精方式选择同样存在争议。一项荟萃分析表明:虽然单纯畸形精子症行 c-IVF 可能影响受精率,但与其行 ICSI 或与正常精子形态行 c-IVF 的妊娠结局相比,差异均无统计学意义^[9]。近期的一项回顾性研究对畸形精子症做了进一步区分,结果表明,当 96% $<$ 精子畸形率 $\leq 98\%$ 时, c-IVF 组与 ICSI 组的受精率、卵裂率、人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 阳性率、临床妊娠率和活产率差异均无统计学意义;当精子畸形率 $>98\%$ 时, c-IVF 组卵裂率、hCG 阳性率、临床妊娠率和活产率显著低于 ICSI 组^[10]。但对于特殊类型的畸形精子症,如圆头精子症、无头精子症、大头精子症、精子鞭毛多发形态异常等,采用 c-IVF 不能实现正常受精。该类精子畸形可能具有遗传性,需根据精子缺陷类型选择个体化的 ART 助孕^[11]。

推荐意见 1: ①对于精子浓度、活力均正常的样本可以采用短时或过夜 c-IVF 的方式。②对于精子浓度、活力处于临界值的样本,尤其精液优化处理后 TPMC $<1.5 \times 10^6$,建议采用短时受精结合早期脱颗粒的方式。③当精液优化处理后 TPMC $<1.0 \times 10^6$,尤其获卵数较多时,可在签署知情同意的情况下对部分或全部卵母细胞行 ICSI 技术以保障正常受精。④目前尚无有力证据表明单纯畸形精子症对 c-IVF 的受精率及妊娠结局产生不利影响,但对于特殊类型的畸形精子症患者(如圆头精子症、无头精子症、大头精子症、精子鞭毛多发形态异常等),则需要根据精子缺陷的种类及其致病基因,选择 ICSI 或供精治疗^[11]。精液质量参数与推荐授精方式详见表 1。

二、精液优化处理

ART 治疗中精液优化处理的主要目的是最大限度地提高优质精子浓度,减少非前向运动精子、

表 1 精液质量参数与推荐授精方式

推荐授精方式	精子浓度 ($\times 10^6/\text{mL}$)	前向运动 精子率(%)	TPMC
短时/过夜受精	≥ 16	≥ 30	$\geq 1.5 \times 10^6$
短时受精结合 早期脱颗粒	5~16	10~30	$1.0 \times 10^6 \leq \text{TPMC}$ $<1.5 \times 10^6$
部分 ICSI 或 ICSI	< 5	< 10	$<1.0 \times 10^6$

注:ICSI 示卵胞质内单精子注射;TPMC 示前向运动精子总数;精子浓度、前向运动精子率为优化处理前参数,TPMC 为优化处理后参数



不动精子、形态异常精子、未成熟的生精细胞和白细胞,以及去除精浆中抑制精子获能的因子、细胞碎片和其他可能产生负面影响的有害物质(如活性氧、微生物或导致子宫收缩的化合物等)^[12],但目前尚无一种方法可以满足上述所有要求,因此可以根据不同精液质量,选择合适的精液优化处理方法。

临床上常用的精子制备技术有上游法(swing-up, SU)和密度梯度离心法(density gradient centrifugation, DGC)。关于两种方法进行精液优化处理的效果比较,多数是通过处理后的精子浓度、前向运动、正常形态、精子DNA碎片比例、线粒体膜电位及活性氧水平等方面进行对比,但两种处理方法的优劣尚无一致的结论^[13]。多项研究表明,DGC法较SU法具有更高的精子回收率(分别为>20%和<20%),而SU法可以获得更高的前向运动精子比例^[2, 14-15]。一项回顾性研究分析了719个经DGC处理和719个经SU处理的c-IVF/ICSI周期治疗结局,结果显示累积活产率、每移植周期活产率以及其他临床和胚胎实验室结果差异均无统计学意义^[16]。也有学者认为,DGC联合SU应用效果较优,与单独SU相比,联合应用可提高正常形态精子获得率;与单独DGC相比,联合应用可有效减少超微结构异常精子比例、降低精子DNA碎片率和核不成熟比例^[17]。另外,值得注意的是DGC相对SU更容易做到标准化^[2],相对便于胚胎实验室精液处理的质量控制。

近些年,微流控技术也开始应用于ART的精液优化处理,其模拟精子在女性生殖道中经过生理性筛选的过程,具有分选高效、操作简便快捷、对精子DNA损伤少等优势^[18-20]。与传统精液优化处理方法相比较,微流控技术是否能改善生殖结局,仍需更多的临床数据证实。

推荐意见2:①鉴于目前尚无充分证据证实DGC和SU对c-IVF治疗结局有差异,因此单独使用或者两种方法联合使用均可作为c-IVF精液优化处理的常用技术。②对于精液参数正常的样本,可优先使用SU法。③而对精子浓度较低的样本,或精子浓度较高但活力较低、供精、精液内伴有大量圆形细胞、精子凝集程度较高的样本,或男方存在感染因素的样本,建议使用DGC法或DGC联合SU法进行精液的优化处理^[2, 21-22]。

三、授精操作及调整授精浓度

每个ART胚胎实验室均有符合本实验室操作规范的授精操作方式及授精器皿,目前尚无统一的要求或规范。常用受精皿包括:圆形皿(微滴法)、中央孔皿(双井皿)、四孔板等。不同受精皿对应的受精液体积也有所不同,中央孔皿或四孔板通常为0.5~1.0 mL,微滴法通常为30~100 μ L。加精的方式常见以下3种:①将精子调整至合适浓度,通过计算吸取合适体积的精子悬液,加入含有卵丘-卵

母细胞复合物(cumulus-oocyte complexes, COCs)的培养液中,此法适用于使用中央孔皿或四孔板受精;②根据受精液体积,加入适当浓度精子,然后再加入COCs,此法多用于微滴法受精;③用预平衡的受精液将精子稀释至合适浓度,然后制成微滴或加入中央孔皿或四孔板中,再加入COCs。为防止培养液pH值和温度发生改变,建议平衡时间至少1 h。

尽管受精过程中精子的浓度范围较宽,但所获得的总受精率却相近^[23]。而有研究显示,随着精子浓度的增加,多精受精的比例逐渐上升,临床妊娠率逐渐下降^[24]。因此,在保障稳定受精率的前提下,精子浓度应尽量控制在较低的范围。

推荐意见3:①目前尚无有力证据表明不同的受精皿、受精液体积及加精方式对c-IVF结局有影响,因此各中心可根据操作习惯和 workflows 进行选择。②本共识建议授精浓度为30~50 μ L的液滴内加前向运动精子5 000~10 000条,或1 mL的培养液内加前向运动精子10万~30万条。③是否对COCs卵丘细胞进行切割目前尚无统一规范,但建议尽量将血块切割去除,避免将红细胞带入卵母细胞孵育液或受精液中。④胚胎实验室宜结合自身条件与特点进行具体方法改良,比如可进一步根据精子在镜下的活力情况、卵母细胞数量、卵丘成熟度、过夜受精或短时受精方式,灵活调整精子添加浓度,形成符合自身条件的标准操作流程。

四、授精时机

促排卵周期中卵母细胞会存在细胞核与细胞质发育不同步的情况,因此理论上对卵母细胞进行短时间的体外孵育有利于细胞质的进一步成熟,从而提高受精率和临床妊娠率^[25]。几十年来关于卵母细胞授精前孵育时间的相关研究较多,但最佳孵育时间却较为宽泛且观点并不一致^[26-40],详见表2。

近期一项纳入了9 575个周期的大型回顾性研究显示,不同的孵育时间对c-IVF卵母细胞受精能力的影响不同(<1.5 h受精率显著降低,而受精率提高可能增加累积妊娠率),而胚胎发育及妊娠结局却无明显差异^[39]。因此该研究认为,体外孵育时间对卵母细胞的发育潜能无显著影响,可根据胚胎实验室的工作流程在一定时间范围内(孵育1.5~6.5 h)安排授精时机。

另外,适当延长扳机至取卵的间隔时间(36~38 h)同样有助于卵母细胞胞质的进一步成熟(体内成熟),从而改善临床结局^[41],因此授精时机的选择应结合扳机时间来决定。也有学者在授精前将COCs置于体外成熟培养液中孵育,发现可以促进胞质的成熟并提高囊胚形成率^[42]。

推荐意见4:鉴于各中心促排卵方案、扳机时间、取卵时机及患者个体间的差异,导致成熟卵母细胞(M II)比例有所不同或卵母细胞间胞质成熟度不一致,因此授精时机的选择应综合考量后合理



表 2 授精前卵母细胞最佳孵育时间的相关研究

作者(发表年份)	周期数	受精方式	有利的孵育时间	不利的孵育时间	主要影响指标
Trounson AO, et al. (1982) ^[26]	90	c-IVF	5~5.5 h	0~0.5 h	受精率
Harrison KL, et al. (1988) ^[27]	716	c-IVF	3~16 h	<2 h 或 >20 h	临床妊娠率
Fisch B, et al. (1989) ^[28]	286	c-IVF	0.5~9 h	/	/
Rienzi L, et al. (1998) ^[29]	95	ICSI	>3 h	<3 h	受精率、优质胚胎率
Jacobs M, et al. (2001) ^[30]	1 313	c-IVF/ICSI	1~7 h/0.5~8 h	/	无差异
Ho JY, et al. (2003) ^[31]	240	c-IVF/ICSI	2.5~5.5 h (c-IVF)	<2.5 h 或 >5.5 h (c-IVF), <2.5 h (ICSI) (c-IVF)	受精率(c-IVF)、成熟卵母细胞比例(ICSI)
Isiklar A, et al. (2004) ^[32]	1 260	ICSI	2~4 h	0 h	受精率、卵裂率、优质胚胎率
Falcone P, et al. (2008) ^[33]	135	ICSI	5~6 h	>7 h	受精率、卵裂率、临床妊娠率
Bárcena P, et al. (2016) ^[34]	3 986	ICSI	1 h 25 min~17 h 13 min	/	/
Pujol A, et al. (2018) ^[35]	1 468	ICSI	1~12.5 h	随着孵育时间延长, hCG 阳性率和临床妊娠率逐渐下降	
Carvalho M, et al. (2020) ^[36]	1 378	ICSI	<6 h	≥6 h	活产率、累积活产率
Vandenbergh L, et al. (2021) ^[37]	8 811	ICSI	0~≥41 h	/	/
Smith MB, et al. (2021) ^[38]	12	ICSI	2~6 h	/	/
Esiso FM, et al. (2021) ^[39]	9 575	c-IVF/ICSI	1.5~6.5 h	<1.5 h 或 >6.5 h (c-IVF)	受精率
Singh N, et al. (2022) ^[40]	726	ICSI	2~6 h	/	/

注: c-IVF 示常规体外受精; ICSI 示卵胞质内单精子注射; hCG 示人绒毛膜促性腺激素; “/” 示文中无相关内容

安排时间节点。本共识建议根据取卵后 COCs 的状态选择个体化的孵育时间, 正常情况下建议在扳机后 38~40 h 内完成授精。

五、短时受精

短时受精是将精卵共孵育的时间由过夜受精的 16~24 h 缩短至 1~6 h 的一种 c-IVF 衍生技术^[43]。有研究显示, 精子产生的活性氧可促进卵丘细胞的凋亡^[44], 且卵母细胞长期暴露在高浓度的精子中可能会对早期胚胎发育产生负面影响^[45]。另外 Li 等^[46]的研究显示, 过夜受精组受精液中的铵离子浓度显著高于短时受精组, 缩短受精时间可以显著降低早产率。早期的荟萃分析显示, 缩短精卵共孵育的时间会增加临床妊娠率、持续妊娠率及种植率^[43]。但也有研究提示, 尽管短时受精比过夜受精在提高优质胚胎率、种植率和持续妊娠率方面具有优势, 但受精率有所降低, 且活产率和临床妊娠率并未提高^[47]。

短时受精分两种: ①将 COCs 从受精液移至新的培养液中继续培养; ②将 COCs 移出受精液后对其进行脱颗粒, 去除卵丘细胞及放射冠, 使卵母细胞透明带完全或大部分暴露, 该方法可以同时观察第二极体的排出情况, 有助于尽早预测受精失败从而避免 LFR 或 TFF 的发生。

现有研究尚不能证实短时受精可显著改善 ART 治疗结局。对于 LFR 或 TFF 高风险病例(如精液参数处于临界值、不明原因不孕、不孕年限较长、多次人工授精失败等), 可选择脱颗粒后进行早期受精预判。但需注意的是, 受精早期颗粒细胞较为致密, 脱颗粒过程中的机械应力可能对受精卵产生不利影响^[48]; 另外, 早期脱颗粒或与多精受精相

关^[47, 49-51]。对于继发不孕且精液质量较好或既往 c-IVF 受精正常的病例, 可采用过夜受精或不进行脱颗粒操作的短时受精。

推荐意见 5: ①鉴于尚无更充分的证据表明过夜受精与短时受精在活产率方面存在差异, 因此两者均可作为 c-IVF 的常规授精方式。②对于不明原因不孕、多次人工授精(≥3 次)失败、原发性不孕、继发不孕年限 ≥5 年且无其他明显器质性疾病(如双侧输卵管阻塞、宫腔粘连等)和/或精液质量处于临界值的周期可以采用短时受精结合早期脱颗粒方式, 通过观察第二极体排出情况, 对受精情况进行早期预判。③对于继发不孕 <5 年且精液质量较好的周期, 若采用短时受精, 也可考虑不进行早期卵母细胞脱颗粒或部分脱颗粒。④对于获卵数 ≤3 枚的周期, 为避免误判可考虑采用过夜受精或短时受精而不进行脱颗粒观察。如果有条件, 也可早期脱颗粒后利用纺锤体观测仪辅助判断受精与否。

六、c-IVF 受精失败的补救 ICSI

在进行 c-IVF 周期中, 当第 1 天(受精后 18~24 h)发生 TFF 时, 可以对未出现原核的卵母细胞(仅明确见第一极体)进行 ICSI, 即晚期补救 ICSI (late rescue ICSI, L-RICSI)。虽然通过 L-RICSI 可以对部分病例进行挽救, 但效果并不理想^[52]。2003 年早期补救 ICSI (early rescue ICSI, E-RICSI) 被首次提出, 即通过观察受精后 6 h 的卵母细胞是否排出第二极体来判断受精情况, 并对明确未受精的卵母细胞(未见第二极体排出)实施补救 ICSI^[53]。E-RICSI 相较于 L-RICSI, 可以减少卵子老化对胚胎发育的影响, 并且胚胎发育与子宫内膜生长的同步性也更好。事实证明, E-RICSI 可以获得比较满意的



治疗结局^[54-55]。目前尚无证据表明 L-RICSI/E-RICSI(相较于 c-IVF/ICSI)会对子代安全产生负面影响,但相关研究有限,亟需更多的长期随访数据进行评估^[52, 54-57]。

多数情况下,典型的第二极体较容易判断,但若极体碎裂或因第二极体排出推迟,则容易造成误判进而出现医源性多精受精^[48, 53]。尤其部分卵母细胞受精失败的周期,行早期补救 ICSI 会增加多精受精的风险^[58]。对于获卵数 ≤ 3 枚的早期受精观察,误判的风险也会增高,同时也给胚胎实验室人员带来压力。因此早期受精观察的时机和准确的判断尤为重要。

另外,对于 ACROSIN 基因突变导致的 c-IVF 受精失败,通过 E-RICSI 可以实现正常受精^[59];但对于 PLC ζ 、ACTL7A、ACTL9、IQCN 等基因突变导致的受精失败则需要利用 ICSI 结合人工卵母细胞激活才可能实现正常受精^[60]。因此,对于 E-RICSI 依然受精失败的患者,条件允许的情况下可以进行受精失败相关基因的遗传学检查,以明确病因指导后续 ART 治疗。

推荐意见 6: ① E-RICSI 的效果明显优于 L-RICSI^[52],对于已实施 L-RICSI 的周期,可以考虑将胚胎培养至囊胚阶段,再行复苏周期移植^[56, 61]。② 目前仍然以第二极体的排出作为早期受精判断的依据,也可结合纺锤体观察进行辅助判断。③ 建议短时受精时精卵共孵育 4~5 h 后再行脱颗粒,当含有第二极体的卵母细胞比例 $<30\%\sim 50\%$ 时(分母为成熟卵母细胞),应延迟至受精后 6 h 再行观察,若含有第二极体的卵母细胞比例仍 $<50\%$,可行补救 ICSI;鉴于临床结局与补救推迟的时间呈负相关^[62],建议受精后 7 h 之内完成补救 ICSI^[63]。对于透明带异常卵母细胞(如蜡样透明带),发现无第二极体排出时即直接行补救 ICSI 操作。

七、受精观察

c-IVF 的原核观察时间点通常为受精后(17 \pm 1) h^[64],即出现 2 个原核(two pronuclei, 2PN)及 2 个极体为正常受精^[65];出现 1 个原核(monopronuclear, 1PN)或 >2 个原核为异常受精;未见原核(nonpronuclear, 0PN)多数情况为未受精,也有少部分是原核出现的时间不在观察时间点内^[66]。因此,结合相关的新技术避免误判对于胚胎实验室正确观察和处理卵母细胞非常重要。

推荐意见 7: ① 不建议将 c-IVF 的 1PN 或 0PN 来源的胚胎直接丢弃,尤其对于高龄或卵巢储备低下的患者。由于囊胚培养有利于筛选正常胚胎^[67-69],故建议对 0PN 或 1PN 来源的卵裂期胚胎进行囊胚培养,若形成可利用囊胚,经充分知情同意后行冷冻保存或移植。如果对这部分胚胎进行遗传学筛查,在筛选整倍体胚胎的同时还需进一步排除单亲二倍体及多倍体胚胎^[70-72]。由于安全性尚需进一步的研究和评估,故临床移植 0PN 或 1PN

来源的胚胎仍需谨慎^[73]。② 对于有条件的中心,也可以考虑将短时受精并脱颗粒后的卵母细胞放入时差成像系统进行培养和观察,以避免原核早消失造成的误判。

八、c-IVF 在 PGT 与 NICS 周期的应用

2020 年欧洲人类生殖与胚胎学会发布的 PGT 指南依然推荐将 ICSI 作为 PGT 周期的首选授精方式^[74]。选择 ICSI 的主要目的是避免精子携带的父源性遗传物质的干扰及颗粒细胞引起的母源性污染。但近几年的相关研究显示,PGT 周期中应用 c-IVF 同样可以获得与 ICSI 相似的胚胎发育结局和遗传诊断结果^[75-78]。因此,对于非男性因素不育行 PGT 的病例,ICSI 是否仍然作为首选授精方式产生了争议。2020 年美国生殖医学学会和辅助生殖技术学会发布的非男性因素 ICSI 适应证委员会意见中指出,在非男性因素行 PGT 周期的情况下,ICSI 仅限在精子 DNA 可能对检测结果准确性造成影响的情况下应用^[79]。这归因于部分扩增技术(如 MALBAC、PicoPLEX)较难扩增出精子 DNA,父源性污染的发生率可忽略不计^[77, 80]。但多重置换扩增技术(multiple displacement amplification, MDA)中使用的碱裂解法对细胞裂解效力更强,可以实现精子 DNA 的扩增,因此基于 MDA 的 PGT 周期不能选择 c-IVF 作为授精方式^[78]。2023 年国际生殖遗传学学会发布的 PGT 指南认为,使用囊胚滋养层细胞活检结合第二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术的 PGT 周期,可以采用 c-IVF 作为授精方式,但应尽量避免附着在胚胎上的精子或颗粒细胞的污染^[81]。同样,也有研究表明在 NICS 周期中,利用 c-IVF 与 ICSI 来源的囊胚培养液进行 NICS 检测的结果相似,并且检测结果的准确性与滋养层细胞活检相比无差异^[82]。

推荐意见 8: ① 本共识建议 ICSI 作为 PGT 周期的首选授精方式。对于胚胎植入前非整倍性检测(preimplantation genetic testing for aneuploidies, PGT-A)周期也可考虑选择 c-IVF 作为授精方式,但应严格限制使用条件并签署知情同意书。② 基于 MDA 的 PGT 周期仍需选择 ICSI 授精。③ 应用 NICS 技术进行胚胎优选,可考虑选择 c-IVF 授精。

九、c-IVF 的质量控制及胚胎实验室新员工培训与考核

1. c-IVF 的质量控制指标及参考标准:根据 2017 年维也纳共识^[65]及《胚胎实验室关键指标质控专家共识》^[83]中的指导意见,将 c-IVF 实验室质控指标的计算方式及参考标准归纳如下,详见表 3。

2. 辅助生殖实验室新员工培训与考核:c-IVF 的技术操作相对简单,应从精子动静态分析、精液的优化处理、捡卵、颗粒细胞去除以及早期受精的判断(短时受精)等方面进行重点培训。并且培训完成后需通过相应的考核方能上岗,当考核指标和



表3 e-IVF实验室质控指标及参考标准

质控指标计算	质控标准	
正常受精率=受精后 16~18 h 出现 2PN 及 2PB 的卵母细胞数/行授精的 COCs 总数×100%	≥60% (最低标准)	≥75% (理想标准)
受精失败率=受精失败周期数/行授精周期数×100%	<5%	
多 PN 率=大于 2PN 卵母细胞数/行授精的 COCs 总数×100%	<6%	
1PN 率=1PN 卵母细胞数/行授精的 COCs 总数×100%	<5%	

注:正常受精率和受精失败率为关键质控指标;多PN和1PN率为一般质控指标;PN示原核;PB示极体;COCs示卵丘-卵母细胞复合物

同期同条件下的质控指标与带教老师偏差较大时,应积极帮助新员工寻找原因并及时给予纠正。

推荐意见9:①辅助生殖实验室新员工在进行岗前培训期间,要求充分掌握《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第六版)》^[2]中ART相关理论及操作技能,充分了解精子动静态分析技术及相关指标临床意义,并能够熟练掌握精子浓度、形态及活动率计数。②对不同质量精液进行优化处理时,当处理后TPMC和前向运动精子百分率与带教老师差异小于10%后($n=10$),方可开始尝试进行临床操作。③新员工须在经验丰富的带教老师指导下完成至少50例捡卵操作并有能力对COCs进行初步评价。④卵母细胞脱颗粒的前期培训包括巴氏吸管或剥卵针口径的选择、剥卵时吹吸力度、幅度、频率及体外操作时间的控制等。操作熟练后,可在带教老师指导下对1~2枚卵母细胞(应选择获卵数>15枚的病例)进行脱颗粒操作,建议累计操作至少100枚卵母细胞,且后续胚胎发育指标达到中心同期质控要求。⑤当对早期受精进行判断时,在严格控制体外观察时限的情况下判断结果与带教老师差异小于10%后($n=100$),方可开始尝试进行临床操作。

十、相关操作参考方法

1. 精液优化处理参考方法

(1)DGC法:①在15 mL离心管中制备非连续密度梯度离心液,分别取40%~45%上层梯度液和等体积的80%~90%下层梯度液1.0~2.0 mL;②将液化后的精液样本(≤ 2 mL)缓慢沿管壁注入低浓度的梯度离心液上方,(300~500)× g 离心15~20 min;③弃去上清液或直接吸取精子沉淀,将精子沉淀重悬于1.5~2 mL培养液中,(200~300)× g 离心5~10 min,此步骤可进行1~2次。最后弃去上清液,依据沉淀量将精子重悬于0.5~1.0 mL培养基(受精液)中备用,以上方法仅作为参考。

(2)SU法:①首先将精液(≤ 2 mL)置于圆底试管中(建议使用容量较大的试管),随后将1.5~2.0 mL培养基轻轻铺在精液上方,或者将精液(≤ 2 mL)缓慢加入1.5~2.0 mL培养基底部。注意保持

精液与培养基界面分明。②将试管倾斜45°置于通气培养箱内上游30~60 min。③将孵育后的上清液(中上层呈云雾状液体部分)转移至新的无菌离心管,(200~300)× g 离心5~10 min。弃去上清液,将精子沉淀重悬于1.5~2.0 mL培养基中,(200~300)× g 离心5~10 min。最后弃去上清液,依据沉淀量将精子重悬于0.5~1.0 mL培养基(受精液)中备用。

(3)DGC联合SU法:①首先进行DGC法(同上),最终保留0.5~1.0 mL的精子沉淀悬液;②将精子悬液移入新的离心管底部,再将1~1.5 mL培养基轻轻置于精子沉淀悬液上层,或将精子沉淀悬液轻轻加入含1~1.5 mL新培养基的试管底部;③将试管倾斜45°置于培养箱中上游5~30 min,随后吸取上清液备用。

(4)其他新方法:除了上述经典方法外,胚胎实验室宜结合自身条件与特点进行具体方法改良,也可以参照其他相关新方法进行尝试(如微流控技术),经过实验室质控稳定后形成标准操作程序。

(5)特殊情况处理:①精液不液化或液化不良的样本,建议在离心前用巴氏吸管反复吹打混匀,或加等体积的培养液反复吹打(尽量避免产生大量气泡),促其液化后再离心处理;②精液黏稠度较大的样本,可以添加适当培养液进行稀释,再行优化处理;③精液里有团块或者胶冻样本,可将精液转移到15 mL尖底离心管内,待团块或者胶冻样本自然沉淀后弃去,再对样本进行密度梯度离心;④若精液存在絮状漂浮物,待液化后可采用瞬时离心方法去除,如将液化后的精液利用Eppendorf的ShortSpin功能瞬时离心3~5 s。

2. 前向运动精子浓度的调节方法:吸取制备后的精子混悬液10 μ L,滴入Makler计数板,双人分别计数横竖各10个小方格后取平均值,计数所得前向运动精子个数×10⁶/mL即为前向运动精子浓度。例如:计数结果为20条精子/10个小方格,则前向运动精子浓度为20×10⁶/mL(2 000万/mL)。加精体积计算参考公式如下:

$$\text{加精体积}(\mu\text{L}) = \frac{\text{预期受精体系前向运动精子总数(万条)}}{\text{前向运动精子计数浓度(万条/mL)}} \times 1000$$

举例1:预期受精体系前向运动精子总数为15万条(例中央井皿法),计数浓度为2 000万条/mL,加精体积(μ L)计算如下:

$$\frac{15(\text{万条})}{2000(\text{万条/mL})} \times 1000 = 7.5(\mu\text{L})$$

举例2:预期受精体系前向运动精子总数为1万条(例100 μ L微滴法),计数浓度为3 500万条/mL,加精体积(μ L)计算如下:

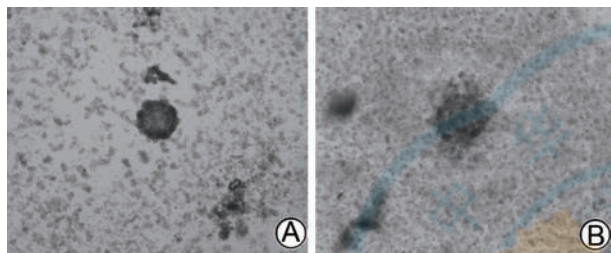
$$\frac{1(\text{万条})}{3500(\text{万条/mL})} \times 1000 \approx 0.3(\mu\text{L})$$

提示:制备后的精子浓度越高,加精体积则越小,移液枪的定量偏差则越大,因此建议依据最后一次离心沉淀量进行0.1~1.0 mL的稀释;或者先将

制备后的精子混悬液调整至合适浓度,便可以按固定的体积进行加精。另外使用移液枪加精时,建议选用长枪头,避免移液枪杆接触到精子样本导致交叉污染。

3. 短时受精观察的辅助判断方法

(1) 常规辅助判断方法:短时受精的判断除观察第二极体外,还可结合 COCs 形态(图 1)、卵周间隙变化(部分受精卵卵周间隙会有所增加)、卵母细胞形态规则性(部分受精卵胞质轮廓可能呈现不规则形态)综合判断。对于较难判断受精情况的卵母细胞,也可适当延时观察时间,通过前后时间点极体形态和数量变化鉴别。



注:COCs 示卵冠丘复合物;COCs 松散程度与精子浓度及共孵育时间相关,因此其仅作为辅助早期受精判断的参考指标之一

图 1 短时受精 5 h 后受精与未受精卵母细胞 COCs 的形态(40×) A 示受精卵母细胞,COCs 表现为卵丘细胞松散、脱落;B 示未受精卵母细胞,COCs 表现为卵丘细胞致密、黏稠,不易将卵母细胞与卵丘细胞剥离

(2) 纺锤体观测仪辅助判断方法:通过极体结合纺锤体观察(受精后 5~6 h),可以进一步提高卵母细胞受精情况判断的准确度^[62, 84]。具体判定方法:①出现双极体或碎裂极体,未见纺锤体(图 2A)或纺锤体位于胞膜并与极体形成交联(图 2B),则为完成受精的卵母细胞,无需早补救;②出现单极体或碎裂极体,纺锤体位于胞质内(图 2C),则为未完成受精的卵母细胞,可行早补救;③出现单极体

却未见纺锤体(图 2D)或纺锤体位于胞膜并与极体交联(图 2E),为刚排出第一极体或质量较差的卵母细胞,可根据具体情况考虑延迟行补救 ICSI 或不进行补救。

十一、小结

目前我国已普遍开展短时受精结合早期补救技术,有效限制了 ICSI 的过度应用。本共识通过对 c-IVF 相关操作细节的归纳总结及相应推荐意见的阐述,以期为 ART 从业者提供实用性的参考,进而选择更合适的授精方式,最大限度地避免 LFR 或 TFF 的发生,在获得稳定且满意的临床治疗结局的同时,亦可节约医疗支出、减轻患者经济负担。

执笔专家:李达(中国医科大学附属盛京医院)、章志国(安徽医科大学第一附属医院)、吴克良(山东大学附属生殖医院)、韩伟(重庆市妇幼保健院)、杨大磊(中国医科大学附属盛京医院)

参与编写共识的专家组成员(按姓氏汉语拼音排序):毕星宇(山西省妇幼保健院)、蔡令波(南京医科大学第一附属医院)、曾海涛(中山大学附属第六医院)、陈曦(北京大学人民医院)、程东凯(沈阳菁华医院)、丁晓芳(华中科技大学同济医学院附属协和医院)、高英卓(中国医科大学附属盛京医院)、巩晓芸(新疆医科大学第一附属医院)、顾亦凡(中信湘雅生殖与遗传专科医院)、郭毅(同济医科大学附属第一妇婴保健院)、韩伟(重庆市妇幼保健院)、郝大勇(郑州大学第三附属医院)、贺小进(上海交通大学医学院附属第一人民医院)、洪燕(上海交通大学医学院附属仁济医院)、黄冰玉(吉林大学第二医院)、黄博(华中科技大学同济医学院附属同济医院)、江莉(广西医科大学第一附属医院)、金波(北京中医药大学深圳医院)、金海霞(郑州大学第一附属医院)、金仁桃(安徽省立医院)、郅艳荣(北京大学第一医院)、李博(空军军医大学唐都医院)、李达(中国医科大学附属盛京医院)、李建华(解放军总医院第七医学中心)、李磊(广州医科大学附属第三医院)、李萍(厦门市妇幼保健院)、李蓉(北京大学第三医院)、李瑞岐(海南木棉花花生殖与遗传医院)、李燕(温州医科大学附属第一医院)、李友筑(厦门大学附属第一医院)、廖宏庆(衡阳南华星辉生殖健康专科医院)、刘丽英(沈阳市妇婴医院)、刘奇才(福建医科大学附属第一医院)、卢伟英(海南省妇女儿童医学中心)、鹿群(首都医科大学附属北京朝阳医院)、吕芳(苏州大学附属第二医院)、吕祁峰(上海交通大学医学院附属第九人民医院)、马燕琳(海南医学院第一附属医院)、孟祥黔(四川锦欣西园妇女儿童医院)、木良善(复旦大学附属中山医院)、那芷菁(中国医科大学附属盛京医院)、倪昊花(温州医科大学附属第一医院)

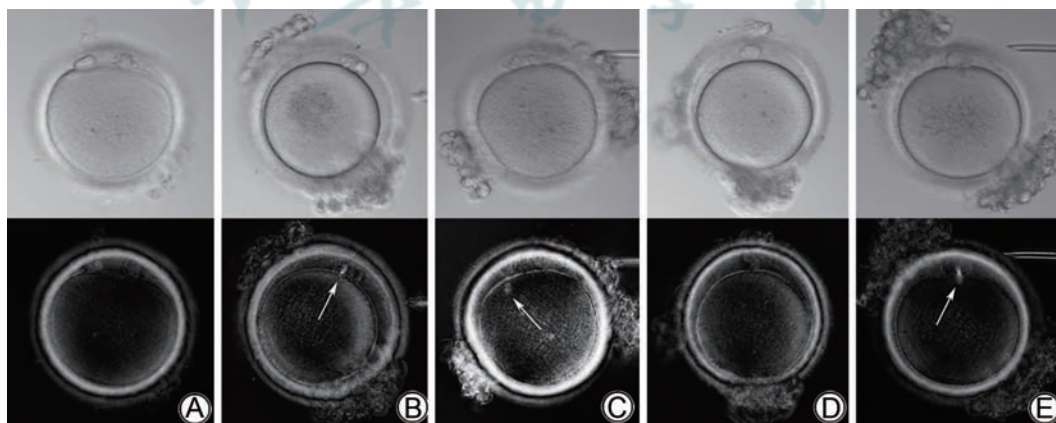


图 2 纺锤体成像系统辅助判断早期受精情况(200×,受精后 5 h,箭头示纺锤体)

A 示双极体,胞质内未见纺锤体(未行 E-RICSI,第 1 天为 2PN);B 示碎裂极体,纺锤体位于胞膜并与极体交联(未行 E-RICSI,第 1 天为 2PN);C 示碎裂极体,纺锤体位于胞质内(行 E-RICSI,第 1 天为 2PN);D 示单极体,胞质内未见纺锤体(未行 E-RICSI,第 1 天为 1PN);E 示单极体,纺锤体位于胞膜并与第一极体交联(受精后 6 h 行 E-RICSI,第 1 天为 2PN)



院)、秦朗(四川大学华西第二医院)、秦琴(山西省人民医院)、史海跃(宁波市妇女儿童医院)、史艳彬(大连市妇女儿童医疗中心)、孙宁霞(海军军医大学第二附属医院)、孙贻娟(上海集爱遗传与不育诊疗中心)、谭季春(中国医科大学附属盛京医院)、汤小晗(哈尔滨医科大学附属第一医院)、滕文顶(成都市妇女儿童中心医院)、汪燕(四川大学华西第二医院)、王天任(香港大学深圳医院)、王伟周(中国人民解放军总医院第六医学中心)、王喜良(中国人民解放军北部战区总医院)、王秀霞(中国医科大学附属盛京医院)、王羽(上海市第一妇婴保健院)、吴克良(山东大学附属生殖医院)、吴琰婷(复旦大学附属妇产科医院)、武泽(云南省第一人民医院)、习海涛(温州医科大学附属第二医院)、夏曦(北京大学深圳医院)、肖雪(四川大学华西第二医院)、徐鸿毅(湖北医药学院附属人民医院)、徐维海(浙江大学医学院附属第一医院)、薛松果(同济大学附属东方医院)、薛侠(西北妇女儿童医院)、杨大磊(中国医科大学附属盛京医院)、杨一华(广西医科大学第一附属医院)、叶英辉(浙江大学医学院附属妇产科医院)、尹太郎(武汉大学人民医院)、张宁媛(南京大学医学院附属鼓楼医院)、张顺(桂林医学院附属医院)、张小建(四川省人民医院)、张艳(武汉大学人民医院)、张曜耀(四川大学华西第二医院)、章志国(安徽医科大学第一附属医院)、赵志明(河北医科大学第二医院)、周桦(贵州医科大学附属医院)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李蓉负责共识设计、指导及修改;李达负责共识设计、指导、论文撰写及修改;章志国、吴克良、韩伟、杨大磊负责论文撰写;其他共识专家组成员均参与了共识的讨论、修改及定稿

参 考 文 献

- van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S, et al. Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional *in vitro* fertilization[J]. Fertil Steril, 2005, 83(3): 612-617. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.08.029.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen[M]. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2021.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction[M]. 4th ed. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1999.
- van der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H, et al. Conventional *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes[J]. Fertil Steril, 2006, 85(2): 395-400. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.05.077.
- Xie BG, Huang YH, Zhu WJ, et al. Comparison of the outcome of conventional *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection in moderate male infertility from ejaculate[J]. Urol Int, 2015, 94(1): 111-116. DOI: 10.1159/000353975.
- Rhemrev JP, Lens JW, McDonnell J, et al. The postwash total progressively motile sperm cell count is a reliable predictor of total fertilization failure during *in vitro* fertilization treatment[J]. Fertil Steril, 2001, 76(5): 884-891. DOI: 10.1016/s0015-0282(01)02826-6.
- Wiser A, Ghetler Y, Gonen O, et al. Re-evaluation of post-wash sperm is a helpful tool in the decision to perform *in vitro* fertilisation or intracytoplasmic sperm injection[J]. Andrologia, 2012, 44(2): 73-77. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2010.01107.x.
- 聂玉林, 廖宏庆, 周静, 等. 体外受精受精率与男方精子参数的关系[J]. 中国男科学杂志, 2014, 28(3): 28-32. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0848.2014.03.007.
- Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, et al. The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after *in vitro* fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis[J]. Fertil Steril, 2011, 95(3): 1141-1145. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.029.
- Zhu Y, Zhang F, Cheng H, et al. Modified strict sperm morphology threshold aids in the clinical selection of conventional *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI)[J]. Asian J Androl, 2022, 24(1): 62-66. DOI: 10.4103/aja.aja.45.21.
- 中国医师协会生殖医学专业委员会生殖男科学组畸形精子症诊疗中国专家共识编写组. 畸形精子症诊疗中国专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(7): 600-609. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210520-00229.
- Çil N, Kabukçu C, Çabuş Ü, et al. Retrospective comparison of the semen preparation techniques for intrauterine insemination: swim-up versus density gradient method[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2022, 51(3): 102321. DOI: 10.1016/j.jogoh.2022.102321.
- Balli M, Cecchele A, Pisaturo V, et al. Opportunities and limits of conventional IVF versus ICSI: it is time to come off the fence[J]. J Clin Med, 2022, 11(19): 5722. DOI: 10.3390/jcm11195722.
- Chen SU, Ho HN, Chen HF, et al. Comparison between a two-layer discontinuous Percoll gradient and swim-up for sperm preparation on normal and abnormal semen samples[J]. J Assist Reprod Genet, 1995, 12(10): 698-703. DOI: 10.1007/BF02212896.
- Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, et al. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus density gradient centrifugation technique[J]. Fertil Steril, 2009, 91(2): 632-638. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.068.
- Rao M, Tang L, Wang L, et al. Cumulative live birth rates after IVF/ICSI cycles with sperm prepared by density gradient centrifugation vs. swim-up: a retrospective study using a propensity score-matching analysis[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2022, 20(1): 60. DOI: 10.1186/s12958-022-00933-2.
- Yamanaka M, Tomita K, Hashimoto S, et al. Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms[J]. J Reprod Dev, 2016, 62(6): 599-606. DOI: 10.1262/jrd.2016-112.
- 李芳芳, 王小英, 周树民. 微流控技术在精子优选及体外受精中的应用[J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(5): 452-459. DOI: 10.13263/j.cnki.nja.2014.05.014.
- Smith GD, Takayama S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction[J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(4): 257-268. DOI: 10.1093/molehr/gaw076.
- Suarez SS, Wu M. Microfluidic devices for the study of sperm migration[J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(4): 227-234. DOI: 10.1093/molehr/gaw039.
- Dai X, Wang Y, Cao F, et al. Sperm enrichment from poor semen samples by double density gradient centrifugation in combination with swim-up for IVF cycles[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 2286. DOI: 10.1038/s41598-020-59347-y.
- Mocanu E, Drakeley A, Kupka MS, et al. ESHRE guideline: medically assisted reproduction in patients with a viral infection/disease[J]. Hum Reprod Open, 2021, 2021(4): hoab037. DOI: 10.1093/hropen/hoab037.
- 中华医学会生殖医学分会第一届实验室学组. 人类体外受精-胚胎移植实验室操作专家共识(2016)[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(1): 1-8. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.01.001.
- 黄国宁, 孙海翔. 体外受精-胚胎移植实验室技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 168.
- Rubino P, Viganò P, Luddi A, et al. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects[J]. Hum Reprod Update, 2016, 22(2): 194-227. DOI: 10.1093/humupd/dmv050.
- Trounson AO, Mohr LR, Wood C, et al. Effect of delayed



- insemination on *in-vitro* fertilization, culture and transfer of human embryos[J]. J Reprod Fertil, 1982, 64(2): 285-294. DOI: 10.1530/jrf.0.0640285.
- [27] Harrison KL, Wilson LM, Breen TM, et al. Fertilization of human oocytes in relation to varying delay before insemination[J]. Fertil Steril, 1988, 50(2): 294-297. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)60076-6.
- [28] Fisch B, Kaplan-Kraicer R, Amit S, et al. The effect of preinsemination interval upon fertilization of human oocytes *in vitro*[J]. Hum Reprod, 1989, 4(8): 954-956. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137019.
- [29] Rienzi L, Ubaldi F, Anniballo R, et al. Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection[J]. Hum Reprod, 1998, 13(4): 1014-1019. DOI: 10.1093/humrep/13.4.1014.
- [30] Jacobs M, Stolwijk AM, Wetzels AM. The effect of insemination/injection time on the results of IVF and ICSI[J]. Hum Reprod, 2001, 16(8): 1708-1713. DOI: 10.1093/humrep/16.8.1708.
- [31] Ho JY, Chen MJ, Yi YC, et al. The effect of preincubation period of oocytes on nuclear maturity, fertilization rate, embryo quality, and pregnancy outcome in IVF and ICSI[J]. J Assist Reprod Genet, 2003, 20(9): 358-364. DOI: 10.1023/a:1025476910771.
- [32] Isiklar A, Mercan R, Balaban B, et al. Impact of oocyte preincubation time on fertilization, embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection[J]. Reprod Biomed Online, 2004, 8(6): 682-686. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61649-5.
- [33] Falcone P, Gambera L, Pisoni M, et al. Correlation between oocyte preincubation time and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection[J]. Gynecol Endocrinol, 2008, 24(6): 295-299. DOI: 10.1080/09513590802095613.
- [34] Bárcena P, Rodríguez M, Obradors A, et al. Should we worry about the clock? Relationship between time to ICSI and reproductive outcomes in cycles with fresh and vitrified oocytes[J]. Hum Reprod, 2016, 31(6): 1182-1191. DOI: 10.1093/humrep/dew070.
- [35] Pujol A, García D, Obradors A, et al. Is there a relation between the time to ICSI and the reproductive outcomes?[J]. Hum Reprod, 2018, 33(5): 797-806. DOI: 10.1093/humrep/dey067.
- [36] Carvalho M, Leal F, Mota S, et al. The effect of denudation and injection timing in the reproductive outcomes of ICSI cycles: new insights into the risk of *in vitro* oocyte ageing[J]. Hum Reprod, 2020, 35(10): 2226-2236. DOI: 10.1093/humrep/deaa211.
- [37] Vandenberghe L, Santos-Ribeiro S, De Munck N, et al. Expanding the time interval between ovulation triggering and oocyte injection: does it affect the embryological and clinical outcome?[J]. Hum Reprod, 2021, 36(3): 614-623. DOI: 10.1093/humrep/deaa338.
- [38] Smith MB, Ho JR, Cortessis V, et al. What is the optimal timing of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) after EGG retrieval? A randomized controlled trial[J]. J Assist Reprod Genet, 2021, 38(8): 2151-2156. DOI: 10.1007/s10815-021-02216-y.
- [39] Esiso FM, Cunningham D, Lai F, et al. The effect of rapid and delayed insemination on reproductive outcome in conventional insemination and intracytoplasmic sperm injection *in vitro* fertilization cycles[J]. J Assist Reprod Genet, 2021, 38(10): 2697-2706. DOI: 10.1007/s10815-021-02299-7.
- [40] Singh N, Malhotra N, Mahey R, et al. Two-six hours is the optimal timing of intracytoplasmic sperm injection after oocyte pickup: single-centre 10 years cohort study[J]. J Hum Reprod Sci, 2022, 15(4): 382-387. DOI: 10.4103/jhrs.jhrs_106_22.
- [41] Gan R, Huang X, Zhao J, et al. Time interval between hCG administration and oocyte retrieval and ART outcomes: an updated systematic review and meta-analysis[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2023, 21(1): 61. DOI: 10.1186/s12958-023-01110-9.
- [42] Li JH, Wang JY, Jiao TT, et al. Effect of pre-IVF incubation in maturation medium on oocyte maturity, fertilization, embryonic development, and clinical outcomes following embryo transfer[J]. Reprod Dev Med, 2022, 6(3): 162-168. DOI: 10.1097/rd9.000000000000029.
- [43] Zhang XD, Liu JX, Liu WW, et al. Time of insemination culture and outcomes of *in vitro* fertilization: a systematic review and meta-analysis[J]. Hum Reprod Update, 2013, 19(6): 685-695. DOI: 10.1093/humupd/dmt036.
- [44] Diaz-Fontdevila M, Pommer R, Smith R. Cumulus cell apoptosis changes with exposure to spermatozoa and pathologies involved in infertility[J]. Fertil Steril, 2009, 91(5 Suppl): 2061-2068. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.073.
- [45] Gianaroli L, Fiorentino A, Magli MC, et al. Prolonged sperm-oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate[J]. Hum Reprod, 1996, 11(11): 2507-2511. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019149.
- [46] Li R, Ou S, Ouyang N, et al. Brief co-incubation of gametes benefits the outcomes of newborns[J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(8): 1537-1542. DOI: 10.1007/s10815-018-1229-y.
- [47] Fan Y, Wu Z, Peng F, et al. Brief and long co-incubation of sperm and oocytes for *in vitro* fertilization: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2023, 23(1): 200. DOI: 10.1186/s12884-023-05490-z.
- [48] Liu W, Liu J, Zhang X, et al. Short co-incubation of gametes combined with early rescue ICSI: an optimal strategy for complete fertilization failure after IVF[J]. Hum Fertil (Camb), 2014, 17(1): 50-55. DOI: 10.3109/14647273.2013.859746.
- [49] Zhou L, Wang J, Xiao L, et al. Differential effects of short co-incubation of gametes and early removal of cumulus cells in patients with different fertilizing capabilities[J]. Reprod Biomed Online, 2016, 32(6): 591-596. DOI: 10.1016/j.rbmo.2016.02.010.
- [50] Kong P, Yin M, Tang C, et al. Effects of early cumulus cell removal on treatment outcomes in patients undergoing *in vitro* fertilization: a retrospective cohort study[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 669507. DOI: 10.3389/fendo.2021.669507.
- [51] Fang Q, Jiang X, Bai S, et al. Safety of early cumulus cell removal combined with early rescue ICSI in the prevention of fertilization failure[J]. Reprod Biomed Online, 2023, 47(2): 103214. DOI: 10.1016/j.rbmo.2023.04.005.
- [52] Beck-Fruchter R, Lavee M, Weiss A, et al. Rescue intracytoplasmic sperm injection: a systematic review[J]. Fertil Steril, 2014, 101(3): 690-698. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.004.
- [53] Chen C, Kattera S. Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF[J]. Hum Reprod, 2003, 18(10): 2118-2121. DOI: 10.1093/humrep/deg325.
- [54] Zeng J, Yao Z, Zhang Y, et al. Fertilization and neonatal outcomes after early rescue intracytoplasmic sperm injection: a retrospective analysis of 16,769 patients[J]. Arch Gynecol Obstet, 2022, 306(1): 249-258. DOI: 10.1007/s00404-022-06445-z.
- [55] Chen L, Zhou H, Liu X, et al. Cycle characteristics and pregnancy outcomes of early rescue intracytoplasmic sperm injection cycles in normal and hyper-ovarian response women: a six-year retrospective study[J]. J Clin Med, 2023, 12(5): 1993. DOI: 10.3390/jcm12051993.
- [56] Zhu X, Tian T, Jiesisibieke D, et al. Clinical outcome of different embryo transfer strategies after late rescue ICSI



- procedure: a 10-year total fertilisation failure cohort study[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2023, 23(1): 549. DOI: 10.1186/s12884-023-05859-0.
- [57] Jiang Y, Jin L, Huang B, et al. Cumulative live birth rate and neonatal outcomes after early rescue ICSI: a propensity score matching analysis[J]. *Hum Reprod Open*, 2023, 2023(4): hoad046. DOI: 10.1093/hropen/hoad046.
- [58] Cao S, Wu X, Zhao C, et al. Determining the need for rescue intracytoplasmic sperm injection in partial fertilisation failure during a conventional IVF cycle[J]. *Andrologia*, 2016, 48(10): 1138-1144. DOI: 10.1111/and.12551.
- [59] Hua R, Xue R, Liu Y, et al. ACROSIN deficiency causes total fertilization failure in humans by preventing the sperm from penetrating the zona pellucida[J]. *Hum Reprod*, 2023, 38(6): 1213-1223. DOI: 10.1093/humrep/dead059.
- [60] Wei Y, Wang J, Qu R, et al. Genetic mechanisms of fertilization failure and early embryonic arrest: a comprehensive review[J]. *Hum Reprod Update*, 2024, 30(1): 48-80. DOI: 10.1093/humupd/dmad026.
- [61] Batha S, Ardestani G, Ocali O, et al. Day after rescue ICSI: eliminating total fertilization failure after conventional IVF with high live birth rates following cryopreserved blastocyst transfer[J]. *Hum Reprod*, 2023, 38(7): 1277-1283. DOI: 10.1093/humrep/dead097.
- [62] Guo Y, Liu W, Wang Y, et al. Polarization microscopy imaging for the identification of unfertilized oocytes after short-term insemination[J]. *Fertil Steril*, 2017, 108(1): 78-83. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.009.
- [63] 董娟, 夏梦, 马龙, 等. 不同时间行早期补救 ICSI 在 IVF 完全受精失败周期中的临床结局[J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30(4): 436-440. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2021.04.004.
- [64] Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(6): 1270-1283. DOI: 10.1093/humrep/der037.
- [65] The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators[J]. *Hum Reprod Open*, 2017, 2017(2): hox011. DOI: 10.1093/hropen/hox011.
- [66] 中国医师协会生殖医学专业委员会. 卵胞质内单精子注射 (ICSI) 技术中国专家共识 (2023 年)[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2023, 43(7): 659-669. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20230228-00076.
- [67] Li M, Lin S, Chen Y, et al. Value of transferring embryos that show no evidence of fertilization at the time of fertilization assessment[J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(3): 607-611.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.016.
- [68] Si J, Zhu X, Lyu Q, et al. Obstetrical and neonatal outcomes after transfer of cleavage-stage and blastocyst-stage embryos derived from monopronuclear zygotes: a retrospective cohort study[J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(3): 527-533. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.04.045.
- [69] Li M, Dang Y, Wang Y, et al. Value of transferring embryos derived from monopronucleated (1PN) zygotes at the time of fertilization assessment[J]. *Zygote*, 2020, 28(3): 241-246. DOI: 10.1017/S096719942000009X.
- [70] Xie PY, Tang Y, Hu L, et al. Identification of biparental and diploid blastocysts from monopronuclear zygotes with the use of a single-nucleotide polymorphism array[J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(3): 545-554.e5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.034.
- [71] Kemper JM, Liu Y, Afnan M, et al. What happens to abnormally fertilized embryos? A scoping review[J]. *Reprod Biomed Online*, 2023, 46(5): 802-807. DOI: 10.1016/j.rbmo.2023.02.005.
- [72] Soler N, Bautista-Llàcer R, Escrich L, et al. Rescuing monopronucleated-derived human blastocysts: a model to study chromosomal topography and fingerprinting[J]. *Fertil Steril*, 2021, 116(2): 583-596. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.03.038.
- [73] Li M, Huang J, Zhuang X, et al. Obstetric and neonatal outcomes after the transfer of vitrified-warmed blastocysts developing from nonpronuclear and monopronuclear zygotes: a retrospective cohort study[J]. *Fertil Steril*, 2021, 115(1): 110-117. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.07.019.
- [74] Kokkali G, Coticchio G, Bronet F, et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT[J]. *Hum Reprod Open*, 2020, 2020(3): hoaa020. DOI: 10.1093/hropen/hoaa020.
- [75] Feldman B, Aizer A, Brengauz M, et al. Pre-implantation genetic diagnosis-should we use ICSI for all?[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34(9): 1179-1183. DOI: 10.1007/s10815-017-0966-7.
- [76] Palmerola KL, Vitez SF, Amrane S, et al. Minimizing mosaicism: assessing the impact of fertilization method on rate of mosaicism after next-generation sequencing (NGS) preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A)[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(1): 153-157. DOI: 10.1007/s10815-018-1347-6.
- [77] De Munck N, El Khatib I, Abdala A, et al. Intracytoplasmic sperm injection is not superior to conventional IVF in couples with non-male factor infertility and preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A)[J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(2): 317-327. DOI: 10.1093/humrep/deaa002.
- [78] Zhang S, Xie P, Lan F, et al. Conventional IVF is feasible in preimplantation genetic testing for aneuploidy[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2023, 40(10): 2333-2342. DOI: 10.1007/s10815-023-02916-7.
- [79] Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor indications: a committee opinion[J]. *Fertil Steril*, 2020, 114(2): 239-245. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.05.032.
- [80] Dong Y, Liu D, Zou Y, et al. Preimplantation genetic testing for human blastocysts with potential parental contamination using a quantitative parental contamination test (qPCT): an evidence-based study[J]. *Reprod Biomed Online*, 2023, 46(1): 69-79. DOI: 10.1016/j.rbmo.2022.08.103.
- [81] Ming XC, Jia LS, Chang CS, et al. Preimplantation genetic testing guidelines of International Society of Reproductive Genetics[J]. *Reprod Dev Med*, 2023, 7(1): 3-11. DOI: 10.1097/RD9.0000000000000033.
- [82] Xie P, Zhang S, Gu Y, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for conventional IVF blastocysts[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 396. DOI: 10.1186/s12967-022-03596-0.
- [83] 孙青, 黄国宁, 孙海翔, 等. 胚胎实验室关键指标质控专家共识[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(9): 836-851. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.09.003.
- [84] Shibahara T, Fukasaku Y, Miyazaki N, et al. Usefulness of expanding the indications of early rescue intracytoplasmic sperm injection[J]. *Reprod Med Biol*, 2022, 21(1): e12432. DOI: 10.1002/rmb2.12432.

