



## Протокол проведения спермиологического исследования

Е.Е. Брагина

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва

Контакты: Елизавета Ефимовна Брагина [bragor@mail.ru](mailto:bragor@mail.ru)

Выпущенное в 2010 г. Руководство Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по проведению спермиологических исследований содержит описание стандартных тестов, дополнительных тестов и тестов, имеющих исследовательское значение, подробно разбираются различные ситуации при проведении анализа и возможные ошибки. В настоящей работе приводится реферат Руководства ВОЗ, краткий протокол применения стандартных методов спермиологического исследования, а также ряд замечаний, отражающих альтернативную точку зрения на ряд вопросов.

**Ключевые слова:** спермограмма, концентрация сперматозоидов, подвижность сперматозоидов, нормальная и аномальная морфология сперматозоидов

### Spermologic examination protocol

Ye. Ye. Bragina

A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University;  
Medical Genetics Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The 2010 World Health Organization (WHO) guidelines for semiological examinations describe standard, additional tests and tests of scientific value and analyze in detail different situations and possible errors. This paper gives an abstract of the WHO guidelines, a concise protocol for using the standard methods of a spermologic examination, and a number of commentaries that reflect the alternative view of a number of problems.

**Key words:** semen analysis, sperm concentration, sperm motility, normal and abnormal sperm morphology

В 2010 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выпустила 5-е издание Руководства по проведению спермиологических исследований (WHO, 2010) [1]. В 2012 г. вышел его перевод на русский язык (ВОЗ, 2012) [2].

Это Руководство явилось результатом многолетней работы ряда научных групп, в нем содержатся ценные сведения, позволяющие стандартизовать проведение спермиологических исследований. В Руководстве выделены стандартные тесты, входящие в спермиологическое исследование, дополнительные тесты и тесты, имеющие исследовательское значение, подробно разбираются различные ситуации при проведении анализа и возможные ошибки. Необходимость тщательного изучения всего материала, изложенного в Руководстве ВОЗ, не подлежит сомнению.

Однако в каждой лаборатории должен присутствовать протокол, необходимый для проведения рутинной повседневной работы. Этот протокол должен быть создан по методикам, изложенным в Руководстве, однако он может учитывать особенности проведения анализа в данной лаборатории.

В настоящем реферате Руководства ВОЗ мы приводим краткий протокол стандартных методов спермиологического исследования, снабженный некото-

рыми замечаниями, отражающими альтернативную точку зрения на ряд вопросов.

#### 1. Сбор образца

1.1. Время воздержания 2–7 дней. Для максимальной стандартизации оптимальное время воздержания — 3–4 дня.

1.2. Эякулят собирают путем мастурбации. Эякулят следует собирать в сосуд из нетоксичного пластика с достаточно широкой горловиной. При приеме материала следует установить, полностью ли материал попал в сосуд для сбора спермы.

1.3. Если возникают сложности получения эякулята в лаборатории — возможно получить образец на дому, время доставки — не более 1 ч, при температуре от 20 до 37 °С. В бланке анализа следует отметить, что материал получен вне лаборатории.

1.4. Использование кондома допустимо только при наличии специальных неспермицидных кондомов.

1.5. Следует проинструктировать пациента перед сдачей анализа о времени воздержания, отсутствии тепловых процедур, приеме антибиотиков, больших доз алкоголя.

1.6. При сборе эякулята для микробиологического исследования пациент должен помочиться перед сбо-



ром семени, тщательно вымыть половой член и руки. Сбор эякулята производится в стерильный контейнер.

1.7. При приеме материала следует заполнить вопросник пациента:

**ФИО**

*Дата рождения*

*Лабораторный индивидуальный номер (сквозная нумерация)*

*Дата последней эякуляции*

*Дата сбора образца*

*Время сбора образца*

*Время проведения анализа*

*Полностью ли собран эякулят* **ДА НЕТ**

*Если эякулят был собран не полностью, потеряна*

**ПЕРВАЯ ПОРЦИЯ**

**ПОСЛЕДНЯЯ ПОРЦИЯ**

**ВСЕ ЭЯКУЛЯТ**

1.8. Контейнер должен быть промаркирован (ФИО, номер образца, время эякуляции).

## **2. Макроскопическая оценка эякулята**

### **2.1. Разжижение**

Поместить контейнер в термостат +37 °C на 25–30 мин. Перемешивать раз в 8–10 мин колебательными движениями. Через 25–30 мин убедиться, что разжижение произошло, вращая контейнер 20 с. Если материал привезен из дома, его следует поместить в термостат на 5–10 мин.

### **2.2. Оценка разжижения и вязкости**

Если разжижение не полное (присутствуют тяжи слизи или гелевые частицы), поместить в термостат 37 °C еще на 30 мин.

Если разжижения не произошло, сперму следует развести равным объемом фосфатно-солевого буфера, физиологического раствора или культуральной среды и аккуратно размешать (подвижность при этом может меняться).

Оценку разжижения производят, опустив пипетку (обычно пластиковую пастеровскую пипетку) в эякулят и позволив жидкости свободно стекать. Другой метод определения вязкости — опустить в эякулят стеклянную палочку и наблюдать длину нити, которая тянется за палочкой после ее выведения из эякулята.

Если образуется нить длиной более 2 см, регистрируется повышенная вязкость.

### **2.3. Объем эякулята**

Самый простой — прямой метод измерения. Перелить эякулят в мерную пробирку, определить объем. Минимальным референсным значением для объема эякулята является 1,5 мл (доверительный интервал — 1,4–1,7 мл).

### **2.4. Цвет эякулята**

Прозрачный эякулят — показатель сниженного количества клеток; желтый цвет эякулята может быть при

лейкоспермии, длительном половом воздержании, при желтухе, приеме некоторых лекарственных препаратов; красно-бурый — при наличии в эякуляте эритроцитов.

### **2.5. Определение pH тест-полосками**

Использовать pH бумагу с диапазоном значений между 6,0 и 10,0.

Нижней границей значения pH считается 7,2.

Повышение уровня pH происходит с увеличением времени после эякуляции, поэтому считается, что клинического значения данные при pH больше 8 не имеют.

## **3. Первоначальная микроскопическая оценка эякулята**

### **3.1. Приготовление влажного препарата**

Хорошо перемешать препарат, избегая образования пены и пузырьков (не пользоваться вортексом). Поместить 10 мкл эякулята на поверхность чистого предметного стекла, накрыть покровным стеклом 22 × 22 мм (если покровное стекло размерами 18 × 18 мм — следует брать 6 мкл эякулята). Исследование влажного препарата следует проводить после того, как остановится «течение» препарата. Если «дрейф» не прекратится через 60 с — повторить приготовление влажного препарата.

### **3.2. Исследование влажного препарата**

Производится с фазово-контрастной оптикой или при опущенном конденсоре при объективе ×10 или ×20 и окуляре ×10.

### **3.3. Оценка наличия агрегации сперматозоидов**

Слипание неподвижных сперматозоидов между собой либо прилипание к клеточному дебрису, нитям слизи или несперматогенным клеткам считается неспецифической агрегацией. Единичные агрегаты имеются в эякуляте здоровых мужчин, их наличие не имеет клинического значения.

### **3.4. Оценка наличия агглютинации сперматозоидов**

Прикрепление подвижных сперматозоидов друг к другу головка-головка, жгутик-жгутик или головка-жгутик считается агглютинацией сперматозоидов. Степень агглютинации оценивается по количеству склеенных сперматозоидов (I степень — менее 10 сперматозоидов в агглютинате; II степень — 10–50 сперматозоидов; III степень — более 50 сперматозоидов; IV степень — склеивание всех сперматозоидов).

Наличие агглютинации само по себе не имеет клинического значения, но является показанием к определению антиспермальных антител.

### **4. Определение подвижности сперматозоидов**

Производится на влажном препарате сразу после разжижения, но не позднее 1 ч после эякуляции. Оценка подвижности производится с фазово-контрастной



оптикой или при опущенном конденсоре при объективе  $\times 40$  и окуляре  $\times 10$ .

Определение подвижности осуществляется немедленно после приготовления влажного препарата и остановки «течения» препарата. Исследование подвижности проводят в полях зрения, удаленных от края препарата.

Если более 25 % сперматозоидов находится в агрегатах — подвижность определяется только по свободным сперматозоидам, что должно отражаться в бланке исследования.

Сперматозоиды с головками в виде «булавочной головки» не учитываются при определении подвижности.

#### 4.1. Измерение подвижности на влажном препарате

Для измерения подвижности следует готовить 2 влажных препарата из 2 аликвот эякулята. Должно быть подсчитано не менее 200 сперматозоидов на каждом влажном препарате. Для подсчета подвижности в каждом препарате следует выбирать не менее 5 случайных полей зрения (не на краю препарата). При большом количестве сперматозоидов желательно использование окуляра с мерной сеткой (окуляр-микрометр) и подсчет сперматозоидов не во всем поле зрения.

Вначале следует подсчитывать сперматозоиды с быстрой и медленной прогрессивной подвижностью, затем — с ротационной подвижностью и колебательными движениями головки и неподвижные. Подсчитываются только те сперматозоиды, которые находились в поле зрения в момент начала отсчета.

#### 4.2. Категории подвижности

Быстрая прогрессивная подвижность	a	$\geq 25$ мкм/с, или длины 5 головок
Медленная прогрессивная подвижность	b	5–24 мкм/с
Непрогрессивная подвижность	c	$\leq 5$ мкм/с (менее 1 длины головки, или движение по окружности, или колебательные движения головки)
Неподвижные сперматозоиды	d	—

**Примечание 1.** В Руководстве ВОЗ 2010 г. рекомендуется использовать упрощенную систему градации подвижности сперматозоидов: прогрессивно подвижные (PR, progressive motility), непрогрессивно подвижные (NP, non-progressive motility) и неподвижные (IM, immotility). Авторы мотивируют упрощение тем, что специалистам сложно разделить быструю и медленную прогрессивную подвижность типа a и b.

*Нам ближе точка зрения специалистов ESHRE, которые считают, что лабораторные работники с нормальной подготовкой и при соблюдении правил выполнения спермиологического исследования должны быть способны правильно дифференцировать типы подвижности [3].*

#### 4.3. Подсчет подвижности

Следует подсчитать содержание в процентах сперматозоидов каждой группы подвижности для каждого из 2 препаратов. Для этого количество подсчитанных сперматозоидов в каждой группе подвижности (a, b, c, d) разделить на общее количество сперматозоидов и умножить на 100. Например, для одного влажного препарата получили следующие значения: a = 15, b = 10, c = 8, d = 26. Сумма (a + b + c + d) = 15 + 10 + 8 + 26 = 59.

Содержание сперматозоидов с подвижностью типа a =  $15 \times 100/59 = 25,4\%$  = 25 % (округляем до ближайшего целого числа). Соответственно, подвижность типа b — 17 %, типа c — 14 %, типа d — 44 %.

Для другого влажного препарата получили значения: a = 18, b = 12, c = 6, d = 34. Сумма (a + b + c + d) = 70.

Соответственно, в процентах содержание сперматозоидов с подвижностью типа a — 26 %, типа b — 17 %, типа c — 13 %, типа d — 48 %.

#### 4.4. Определение ошибки подсчета

1. После вычисления процентного содержания сперматозоидов каждой группы подвижности следует вычислить среднее процентное содержание сперматозоидов для каждой группы подвижности по результатам 2 измерений (для приведенного выше примера: a =  $(25 + 18)/2 = 22$ ; b =  $(17 + 17)/2 = 17$ ; c =  $(14 + 13)/2 = 14$ ; d =  $(44 + 48)/2 = 46$ ).

2. Выбрать группу подвижности с самым большим показателем (т.е. одну из групп a, b, c или d). В приведенном примере — группу d. Подсчитать разницу в значениях между 2 измерениями в этой группе. В приведенном примере разница 48 — 44 = 4 %.

3. Определение подвижности считается удовлетворительным, если разница между 2 подсчетами в этой выбранной группе с самыми большими значениями равна или меньше значения, указанного в табл. 1. Если разница больше допустимого различия, следует приготовить 2 новых влажных препарата и повторить исследование.

В приведенном примере среднее значение подвижности типа d = 44. Для данного среднего значения допустимая ошибка равна 10, у нас получилось 4, т.е. результат признается годным.

#### 4.5. Запись результатов

Если подсчеты в 2 влажных препаратах не превышают значения допустимой ошибки, вычисляют среднее значение подвижности по каждой группе (a — d) и записывают в округленной форме (без дробей); 0,5 %



округляют в большую сторону. Сумма процентов во всех группах подвижности должна составлять 100 %.

При необходимости корректируется процентное содержание группы с самым высоким значением (уменьшается или увеличивается на 1–2 %, чтобы сумма составляла 100 %).

Результаты записываются в бланк анализа.

Минимальным референсным значением прогрессивной подвижности принято значение 32 % (доверительный интервал — 31–34), минимальным референсным значением для общей подвижности принята величина 40 % (доверительный интервал — 38–42).

**Таблица 1.** Определение ошибки при подсчете подвижных сперматозоидов

Среднее значение, %	Допустимое различие между 2 измерениями
0	1
1	2
2	3
3–4	4
5–7	5
8–11	6
12–16	7
17–23	8
24–34	9
35–65	10
66–76	9
77–83	8
84–88	7
89–92	6
93–95	5
96–97	4
98	3
99	2
100	1

## 5. Определение жизнеспособности сперматозоидов

Исследование рекомендуется проводить в том случае, если подвижность сперматозоидов меньше 50 %.

### 5.1. Приготовление красителя

В 100 мл дистиллированной воды растворить 0,67 г эозина и 0,9 г хлорида натрия при мягком нагревании в водяной бане, добавить 10 г нигрозина. Раствор вытащить из кипятка, остудить при комнатной температуре. Профильтровать, хранить в стеклянной посуде при комнатной температуре.

### 5.2. Окраска и приготовление мазка препарата

Смешать 1 каплю (50 мкл) неразведенного перемешанного эякулята после разжижения с 1 каплей (5 мкл) красящего раствора эозин-нигрозина на фарфоровой пластине, инкубировать 30 с.

Поместить каплю раствора (12–15 мкл) на предметное стекло и приготовить мазок.

Высушить мазок и исследовать с масляной иммерсией (объектив  $\times 100$ ) с поднятым конденсором. Живые сперматозоиды не окрашиваются и имеют на препарате белый цвет. Мертвые сперматозоиды имеют розовый цвет. Просчитать не менее 200 сперматозоидов.

Результат выразить в процентах.

Минимальным референсным значением для жизнеспособности сперматозоидов принято 58 % (доверительный интервал — 55–63).

**Примечание 2.** Положение Руководства ВОЗ 2010 г. о том, что светло-розовые головки сперматозоидов после окраски эозином являются живыми, ошибочно [4], за исключением тех случаев, когда происходит артефактное нарушение мембраны и окрашивается самая нижняя часть головки сперматозоида [5].

**Примечание 3.** В Руководстве ВОЗ 2010 г. рекомендуется проводить подсчет сперматозоидов на 2 окрашенных мазках, по 200 клеток на каждом препарате, с последующим вычислением разности между 2 измерениями и определением ошибки. R. Menkveld et al. [6] было доказано, что подсчет 200 сперматозоидов достаточен для определения жизнеспособности сперматозоидов и увеличение количества подсчитанных клеток незначительно увеличивает точность исследования, однако увеличивает время, потраченное на анализ.

## 6. Подсчет количества сперматозоидов

### 6.1. Определение разведения эякулята для подсчета концентрации сперматозоидов

При приготовлении препарата так, как указано в п. 4 (10 мкл, покровное стекло  $22 \times 22$  мм), глубина препарата примерно 20 мкм. Используется подсчет сперматозоидов в поле зрения для определения оптимального разведения при помощи табл. 2.

При диаметре поля зрения микроскопа (измерять объективом-микрометром) 500 мкм обнаружение 4 сперматозоидов в поле зрения примерно соответствует 1 млн/мл. Если диаметр поля зрения 250 мкм — 1 сперматозоид в поле зрения соответствует 1 млн/мл. В этом случае пользоваться табл. 2 следует после умножения количества обнаруженных сперматозоидов на 4.

**Таблица 2.** Определение разведения

Количество сперматозоидов в поле зрения при объективе $\times 40$	Разведение	Объем спермы, мкл	Раствор (фиксатор)
Swim up (менее 10)	1:2	100	100
Менее 15	1:5	100	400
15–40	1:10	50	450
40–200	1:20	50	950
Более 200	1:50	50	2450





Стандартным является разведение 1:10 и 1:20. Если предполагается азооспермия или выраженная олигозооспермия (менее 1 сперматозоида в поле зрения), следует просмотреть весь препарат (около 400 полей зрения) и отметить на бланке анализа количество подвижных и неподвижных сперматозоидов.

Если сперматозоиды не обнаружены или обнаружены единичные сперматозоиды в препарате, следует провести центрифугирование образца (15 мин при 1000 или 1500 об/мин) и исследовать осадок в микроскопе (покровное стекло  $22 \times 22$  мм, примерно 400 полей зрения). В бланке анализа записывается обнаруженное количество сперматозоидов в осадке спермы, а также подвижные они или неподвижные.

Если при сканировании влажного препарата, полученного из осадка спермы (примерно 400 полей зрения при объективе  $\times 40$ ), сперматозоиды не обнаружены, в заключении можно написать, что существует подозрение на азооспермию и в осадке содержится менее 188 сперматозоидов.

#### **6.2. Приготовление раствора для фиксации препарата**

50 г  $\text{NaHCO}_3$ ;

10 мл 36–40 % раствора формальдегида (насыщенный раствор).

Растворить компоненты в дистиллированной воде, довести объем до 1000 мл, профильтровать. Хранить при  $+4^\circ\text{C}$  (может храниться по крайней мере 12 мес). Заменять при появлении осадка.

#### **6.3. Фиксация эякулята**

Хорошо перемешать эякулят. Необходимое количество эякулята (согласно табл. 2) поместить в пробирку с помощью автоматической пипетки с положительным замещением. Пробирка должна быть с плотной крышкой. Добавить определенное количество фиксатора.

#### **6.4. Приготовление счетной камеры (гемоцитометра)**

Смочить покровное стекло камеры (специальное для гемоцитометра) небольшим количеством жидкости. Притереть стекло до образования колец Ньютона.

**Примечание 4.** Руководство ВОЗ 2010 г. рекомендует для подсчета концентрации сперматозоидов использовать усовершенствованный гемоцитометр Нейбауэра (Neubauer hemocytometer). Но так как в настоящее время в большинстве лабораторий РФ для подсчета концентрации клеток используется камера Горяева, мы приводим расчеты концентрации сперматозоидов с использованием последней.

#### **6.5. Заполнение окошек гемоцитометра эякулатом**

Разведенную фиксатором сперму перемешать в течение 10 с на вортексе, взять аликвоту 6–10 мкл и по-

местить в окошко счетной камеры. Повторно взять аликвоту фиксированного эякулята и заполнить вторую камеру. Камеры должны быть заполнены полностью, но не должно образовываться избытка жидкости.

#### **6.6. Осаждение сперматозоидов в камере**

Камеру инкубировать 10–15 мин во влажной камере, чтобы сперматозоиды осели на сетку счетной камеры.

#### **6.7. Определение количества больших квадратов, необходимых для подсчета сперматозоидов**

Подсчитать количество сперматозоидов в квадрате, расположенном в верхнем левом углу счетной камеры:

< 10 — считать по 25 большим квадратам в обоих окошках камеры;

10–40 — считать по 10 большим квадратам в обоих окошках камеры;

> 40 — считать по 5 большим квадратам в обоих окошках камеры.

Должно быть подсчитано около 200 сперматозоидов в каждом окошке камеры, чтобы определить допустимую ошибку между 2 подсчетами (всего около 400 сперматозоидов).

#### **6.8. Критерии подсчета клеток**

Подсчет осуществляется в больших квадратах камеры Горяева. Если сперматозоиды попадают головками на линии границы квадрата, следует учитывать только те, которые лежат на левой и верхней линиях.

Свободные головки рекомендуется подсчитывать, «булавочные головки» не учитываются. Если сперматозоидов типа «булавочные головки» более 20 %, их наличие отмечается в бланке анализа отдельно.

#### **6.9. Вычисление концентрации сперматозоидов**

##### **6.9.1. Определение допустимой ошибки при подсчете сперматозоидов в гемоцитометре**

Сравнить результаты подсчета сперматозоидов 2 аликвот в 2 окошках камеры Горяева. Вычислить общее количество подсчитанных сперматозоидов и разницу между 2 подсчетами. Подсчет считается удовлетворительным, если разность между 2 подсчетами равна или меньше цифры, указанной в табл. 3 для данного количества подсчитанных клеток. Если разность больше указанного числа, следует перемешать зафиксированную (разведенную) сперму на вортексе в течение 10 с и повторно заполнить камеру 2 аликвотами.

##### **6.9.2. Объем большого квадрата**

Длина стороны большого квадрата камеры Горяева 0,2 мкм, глубина (зазор между основным стеклом камеры и покровным стеклом) — 0,1 мм. Таким образом,

$$V = 0,2 \times 0,2 \times 0,1 = 0,004 \text{ мм}^3, \text{ или } 0,004 \text{ мкл.}$$



Таблица 3. Определение ошибки при подсчете количества сперматозоидов по 2 камерам

Сумма подсчитанных клеток в 2 камерах	Допустимая ошибка	Сумма подсчитанных клеток в 2 камерах	Допустимая ошибка
144–156	24	329–346	36
157–169	25	347–366	37
170–182	26	367–385	38
183–196	27	386–406	39
197–211	28	407–426	40
212–226	29	427–448	41
227–242	30	449–470	42
243–258	31	471–492	43
259–274	32	493–515	44
275–292	33	516–538	45
293–309	34	539–563	46
310–328	35	564–587	47

### 6.9.3. Коэффициент для подсчета концентрации клеток

Рассчитывать концентрацию клеток (содержание в 1 мл) следует по формуле:

$$C = A \times 100\,000 / V \times B,$$

где  $A$  — общее количество подсчитанных клеток;  $B$  — количество просмотренных квадратов в 1 окошке гемоцитометра.

Так как подсчет велся в 2 окошках, следует количество подсчитанных клеток разделить на 2.

Таким образом, при подсчете

5 квадратов  $C = A/2 \times 50\,000 \times B$ ;

10 квадратов  $C = A/2 \times 25\,000 \times B$ ;

25 квадратов  $C = A/2 \times 10\,000 \times B$ .

Можно также воспользоваться таблицей коэффициентов (табл. 4). Сумму сперматозоидов, просчитанных в 2 окошках камеры Горяева, следует умножить на коэффициент, исходя из разведения и количества просчитанных в 1 окошке квадратов.

Минимальное референсное значение для концентрации сперматозоидов —  $15 \times 10^6$  сперматозоидов на 1 мл (доверительный интервал —  $12–16 \times 10^6$ ).

### 6.9.4. Вычисление общего числа сперматозоидов в эякуляте

Значение общего количества сперматозоидов в эякуляте получают умножением концентрации сперматозоидов на объем эякулята.

Минимальное референсное значение для общего числа сперматозоидов —  $38 \times 10^6$  сперматозоидов в эякуляте (доверительный интервал —  $33–46 \times 10^6$ ).

## 7. Подсчет круглых клеток

Подсчитать количество круглых клеток в 2 окошках камеры Горяева, отдельно считать нейтрофильные лейкоциты, которые имеют сегментированные ядра

и в процессе приготовления препарата приобретают «шероховатую» микроворсинчатую поверхность, незрелые половые клетки (НПК) и безъядерные «остаточные тельца».

Другой вариант подсчета концентрации круглых клеток — на окрашенных мазках, приготовленных для изучения морфологии сперматозоидов.

### 7.1. Вычисление концентрации нейтрофильных лейкоцитов

Концентрация нейтрофильных лейкоцитов определяется в зависимости от подсчитанного количества квадратов:

5 квадратов  $N = L/2 \times 50\,000 \times B$ ;

10 квадратов  $N = L/2 \times 25\,000 \times B$ ;

25 квадратов  $N = L/2 \times 10\,000 \times B$ ,

где  $N$  — концентрация нейтрофильных лейкоцитов;  $L$  — количество лейкоцитов, подсчитанное в 2 окошках гемоцитометра;  $B$  — разведение.

Если концентрацию сперматозоидов определяют в повторно взятых аликвотах, количество нейтрофильных лейкоцитов также определяется повторно.

Таблица 4. Коэффициенты для расчета концентрации сперматозоидов

Разведение	Количество подсчитанных квадратов		
	25	10	5
1:2	10 000	25 000	50 000
1:5	25 000	62 500	125 000
1:10	50 000	125 000	250 000
1:20	100 000	250 000	500 000
1:50	250 000	625 000	1 250 000

Минимальное референсное значение концентрации лейкоцитов в настоящее время не определено. За пороговое значение принята концентрация  $1 \times 10^6$  нейтрофильных лейкоцитов в 1 мл эякулята.

### 7.2. Определение содержания незрелых половых клеток

Содержание НПК выражается в процентах от общего количества половых клеток (сумма сперматозоидов и НПК).

$$\text{НПК (\%)} = B / (A + B) \times 100,$$

где А — количество сперматозоидов, подсчитанное в 2 окошках гемоцитометра (камеры Горяева); В — количество НПК, подсчитанное в тех же квадратах гемоцитометра.

## 8. Оценка морфологии сперматозоидов

### 8.1. Предметные стекла

Для приготовления мазка следует использовать обезжиренные предметные стекла. Перед приготовлением мазка на шлифованной части мазка следует подписать стекло несмываемым фломастером или карандашом (фамилия, № образца).

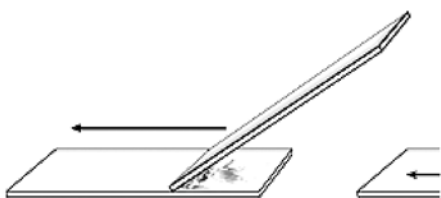
### 8.2. Приготовление мазка

Для приготовления мазка на стекло поместить 5–10 мкл эякулята. Если концентрация сперматозоидов менее 20 млн/мл, следует поместить на стекло 10–20 мкл. При низкой концентрации сперматозоидов возможно предварительно центрифугировать эякулят при 1000 об/мин, удалить большую часть супернатанта, осадок ресуспендировать и использовать для приготовления мазка.

При повышенной вязкости образца или большом количестве слизи возможно развести сперматозоиды физиологическим раствором и центрифугировать 10 мин при 1000 об/мин. Слить супернатант, ресуспендировать осадок и использовать для приготовления мазка. В этом случае следует использовать адгезивные предметные стекла.

Центрифугирование и отмывка мазка могут влиять на морфологию сперматозоидов и должны быть запротоколированы.

Мазок делается предметным стеклом со шлифованным краем, как показано на рисунке. Толщина мазка зависит от угла наклона шлифованного стекла —



Образец проведения мазка

чем меньше угол, тем тоньше мазок. Толщина мазка зависит от скорости движения шлифованного стекла — чем больше скорость, тем толще мазок.

Обычный угол наклона  $45^\circ$ , но угол и скорость могут варьировать при повышенной вязкости спермы.

Мазок следует высушить на воздухе (долгое высушивание может привести к морфологическим изменениям сперматозоидов — разрыву головки и жгутика, «усадке» акросомы). Рекомендуется проводить фиксацию сразу после высушивания при получении мазка на адгезивном стекле, на не полностью высушенном стекле.

Рекомендуется делать по 2 мазка с каждого образца. В этом случае 1 стекло остается резервным.

### 8.3. Фиксация мазка

Фиксация 15 мин в 95 % этаноле. Мазки можно оставлять на несколько дней до окраски в фиксирующем этаноле. Для долгого хранения лучше использовать 70 % этанол.

Возможно окрашивание спреем влажного мазка. При использовании спрея, содержащего полиэтиленгликоль (Carbowax), необходимо промыть мазок до окрашивания для его удаления (50 % этанолом).

### 8.4. Окраска мазка

Сосуды с растворами должны находиться в вытяжном шкафу.

В табл. 5 описана процедура окраски мазка эякулята по Папаниколау.

### 8.5. Заключение окрашенного мазка

Заключение позволяет хранить мазки в течение долгого времени. Заключение мазки рекомендуется просматривать не ранее чем через сутки, в крайнем случае — через 30 мин, избегая надавливания на стекло.

Мазки без заключения должны просматриваться так быстро, как возможно.

Использование спирторастворимых монтирующих сред рекомендовано вместо вредного для здоровья ксилола (табл. 6).

### 8.6. Оценка морфологии сперматозоидов

#### 8.6.1. Количество просмотренных сперматозоидов

Должно быть просмотрено по крайней мере 200 сперматозоидов в проходящем свете при объективе  $\times 100$  и окуляре  $\times 10$ , с иммерсионным маслом. Рекомендуется проводить повторный подсчет в случае, когда содержание морфологически нормальных сперматозоидов колеблется около значения 4 %.

Подсчет удобно проводить с помощью лабораторного счетчика клеток.

**Примечание 5.** В Руководстве ВОЗ 2010 г. рекомендуется проводить подсчет сперматозоидов на 2 окрашенных мазках, по 200 клеток на каждом препарате, с последующим вычислением разности между 2 измерениями и оп-



Таблица 5. Окраска мазка по Папаниколау

Краска или реагент	Экспозиция	Комментарии
Этанол 50 %	10 с или 10 погружений	Мазки, которые переносят непосредственно из 95 % этанола без высушивания, должны перемещаться по крайней мере через 1 контейнер с 50 % этанолом. Мазки, высушенные на воздухе. Регидратация должна проводиться более долго, 2–3 мин в 50 % этаноле (если мазки хранились несколько дней или недель)
Дистиллированная вода	10 погружений	
Гематоксилин Харриса	4 мин по рекомендации ВОЗ (2010), 3 мин по рекомендации ESHRE	Фиксированные и высушенные мазки можно переносить прямо в гематоксилин, но время инкубации должно быть увеличено. Гематоксилин — ядерный краситель. Следует следить за «истощением» гематоксилина. Если окраска ядер светлая — следует либо увеличить время экспозиции, либо заменить краситель на свежий
Проточная водопроводная вода	5 мин	Удаление несвязанного гематоксилина
Подкисленный этанол (0,25 % HCl в 70 % этаноле)	Двух погружений обычно достаточно для удаления несвязавшегося красителя. Проверять под микроскопом	Гематоксилин связывается со всей клеткой. Кислое воздействие удаляет неспецифическую окраску, так как краситель, связанный с цитоплазмой, удаляется ионами H <sub>2</sub> . Однако слишком длительное кислотное воздействие уменьшает окрашивание ядра. После кислой обработки стекла должны быть помещены в проточную воду немедленно для увеличения pH и для предотвращения удаления всего гематоксилина. В этот момент, перед продолжением окраски, проверяется интенсивность окраски. Если ядро слишком темное, обработка подкисленным спиртом может быть повторена. Слишком светлая окраска ядра показывает, что инкубация в гематоксине недостаточна
Проточная водопроводная вода или щелочная вода	5 мин	Цвет гематоксилина зависит от pH. После кислой обработки гематоксин красный. Промывание мазков в проточной воде несколько минут увеличивает pH, и окраска ядер становится голубой. В некоторых случаях водопроводная вода имеет кислую реакцию, что означает, что изменения цвета не произойдет. В этих случаях мазки можно поместить в раствор Скотта (3,5 г бикарбоната натрия, 20 г сульфата магния, 1000 мл проточной воды и 1 маленький кристалл тимола для предотвращения пророста). Другой метод подщелачивания воды — погружать стекла в раствор, содержащий 2–3 капли жидкого аммония (NH <sub>4</sub> OH) на 200 мл проточной воды. Это быстро изменит цвет ядер на голубой и позволит ускорить процедуру
Дистиллированная вода	1 погружение	
Этанол 50 %	10 погружений	Подготовка к окрашиванию цитоплазмы.
Этанол 70 %	10 погружений	Для окраски цитоплазматических компонентов проводится дегидратация в серии спиртов возрастающей концентрации, так как красители растворимы только в спирте
Этанол 80 %	10 погружений	
Этанол 95 %	10 погружений	
Оранжевый Orange G6	2 мин	Окраска цитоплазмы в розовый цвет
Этанол 95 %	10 погружений	
Этанол 95 %	10 погружений	Удаление оранжевого G6. Если держать в этаноле дольше — окраска исчезнет
EA50 (модифицированный эозин)	5 мин	Окраска цитоплазмы и ядрышка. Небольшое количество ацетиловых остатков в окрашивающей смеси увеличивает количество положительно заряженных компонентов ткани, которые затем связывают эозин. Слишком интенсивная окраска отмывается этанолом (EA50 растворяется в 95 % этаноле-метаноле)
Красителей хватает на 25–30 окрашиваний. Если появляется осадок — краситель следует профильтровать или заменить		

ределением ошибки. Так же как и при определении жизнеспособности сперматозоидов, ряд специалистов [3] считает, что подсчет 200 сперматозоидов достаточен для определения морфологии и увеличение количества подсчитанных клеток незначительно увеличивает точ-

ность исследования, увеличивая время, потраченное на анализ.

#### 8.6.2. Оценка нормальных сперматозоидов

Вначале подсчитываются «идеальные» сперматозоиды.



**Таблица 6.** Заключение окрашенного мазка

Этап	Экспозиция	Комментарии
Этанол 95 %	5 погружений	Дегидратация для заключения в неорганическую среду
Этанол 95 %	5 погружений	
Этанол 95 %	5 погружений	
Этанол 98–99,5 % (абсолютный)	2 мин	
Монтирующая среда, 2–3 капли		
Покровное стекло 24 × 60 мм		Первый контакт покровного стекла с мазком начинать с одного края покровного стекла для избежания воздушных пузырей. Мягко нажимая на стекло, удалить излишки среды

Головка нормального сперматозоида должна быть гладкой, с четким овальным контуром, акросома занимает 40–70 % области головки, в зоне акросомы — не более 2 маленьких вакуолей. Длина головки 3,7–4,7 мкм, ширина 2,5–3,2 мкм.

Шейка нормального сперматозоида тонкая, ее длина равна длине головки, ось шейки должна совпадать с центральной осью головки. Цитоплазматическая капля рассматривается как аномальная, если ее размеры превышают 1/3 размера головки.

Основная часть жгутика должна иметь одинаковый диаметр по всей длине (около 45 мкм — примерно в 10 раз длиннее длины головки).

Минимальное референсное значение нормальных форм — 4 % (доверительный интервал — 3,0–4,0). Это значение используется только тогда, когда оценка морфологии производится на мазках, окрашенных вышеуказанным способом, по указанным в данном разделе критериям [7].

#### 8.6.3. Параметры оценки сперматозоидов

Оценка морфологии аномальных сперматозоидов проводится по 4 параметрам.

##### 8.6.3.1. Дефекты головки

Размер, форма, вакуолизация, аномальная акросома, двойная головка.

Сперматозоиды типа «булавочная головка» оцениваются в том случае, если их более 20 %.

##### 8.6.3.2. Дефекты шейки и среднего отдела жгутика

Отсутствие жгутика, отсутствие прикрепления жгутика, асимметричное прикрепление жгутика, толстый, тонкий или изогнутый средний отдел жгутика, отсутствие митохондриальной спирали.

##### 8.6.3.3. Дефекты жгутика

Короткий, двойной, шпилькообразный, изогнутый, закрученный, неправильной толщины.

Свободные жгутики не подсчитываются.

##### 8.6.3.4. Аномальная цитоплазматическая капля

Капля размером более 1/3 нормальной головки. Повышенное количество сперматозоидов с каплей мо-

жет быть при коротком времени воздержания и частых эякуляциях.

#### 8.6.3.5. Специфические дефекты

Специфическая патология отмечается, если все или абсолютное большинство сперматозоидов пациента имеют одинаковые дефекты (глобулозооспермия — округлые головки, микроголовки при синдроме ацефалических сперматозоидов, утолщенные укороченные жгутики при дисплазии фиброзной оболочки жгутиков). Если какая-либо специфическая патология сперматозоидов больше 20 % — это также должно быть отражено в бланке анализа.

**Примечание 6.** Морфология сперматозоидов представлена на цветных вкладках в Руководстве ВОЗ 2012 г. Обратите внимание: в результате типографского брака рисунки на вклейке 2 повторяют рисунки на вклейке 1 и демонстрируют нормальные сперматозоиды, хотя по подписям это аномальные сперматозоиды.

#### 8.7. Подсчет индекса тератозооспермии

Индекс тератозооспермии показывает среднее количество дефектов на 1 аномальный сперматозоид и считается по формуле:

$$(a + b + c + d)/E = TZI \text{ (teratozoospermia index),}$$

где a — количество сперматозоидов с дефектами головки; b — с дефектами шейки; c — с дефектами жгутика; d — с цитоплазматическими каплями; E — общее количество аномальных сперматозоидов.

**Примечание 7.** Индекс тератозооспермии согласно Руководству ВОЗ 2010 г. относится к дополнительным тестам. Специалисты ESHRE считают, что величина TZI является важным предиктивным показателем [3].

#### 8.9. Подсчет концентрации незрелых половых клеток и нейтрофильных лейкоцитов на окрашенном мазке

Если подсчет концентрации НПК затруднен в гемцитометре, их подсчитывают на окрашенном мазке. Следует сосчитать количество на 100 сперматозоидов:

$$CH = H/100 \times C,$$

где CH — концентрация НПК; H — количество НПК на 100 сперматозоидов; C — концентрация сперматозоидов (%).

Аналогичный подсчет проводят для нейтрофильных лейкоцитов.

#### 8.10. Запись результатов оценки морфологии сперматозоидов

В бланке должно быть записано:

1. Процентное содержание нормальных («идеальных») сперматозоидов.

2. Процентное содержание сперматозоидов с дефектами головки, шейки/среднего отдела жгутика, жгутика, сперматозоидов с цитоплазматической каплей. Содержание сперматозоидов с дефектами вычисляется от общего количества сперматозоидов, оно может быть больше 100 %.

3. Индекс тератозооспермии.

**Примечание 8.** В Руководстве ВОЗ 2010 г. рекомендуется упростить классификацию сперматозои-

дов на «нормальный/аномальный сперматозоид». Мы считаем, что данные о характере нарушения морфологии дают дополнительные сведения о характере возможных нарушений органов репродуктивной системы.

#### 9. Осуществление внутреннего и внешнего контроля качества

Для внутреннего контроля качества должны проводиться двойные подсчеты с определением возможной допустимой ошибки при подсчете концентрации и подвижности сперматозоидов.

Должны регулярно проводиться оценки одного и того же образца разными исполнителями, но в одно время и на одинаковом оборудовании.

Средние значения основных показателей спермограммы должны незначительно отличаться в течение года (с учетом сезонных колебаний).

Вопрос о внешнем контроле качества должен обсуждаться на административном уровне, так как в настоящее время возможность осуществлять внешний контроль качества отсутствует.

## ЛИТЕРАТУРА

1. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. WHO, 2010. Fifth edition, 2012.
2. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое издание. М., 2012.
3. Barratt C.L., 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(12):3207–12.
4. Mortimer D. Practical Laboratory Andrology. Oxford: Oxford University Press, 1994.
5. Björndahl L., Söderlund I., Johansson S. et al. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. J Androl 2004;25(5):671–8. Review.
6. Menkveld R., Stander F.S., Kotze T.J. et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990;5: 586–92.
7. Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S. et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor *in vitro* fertilization. Fertil Steril 1986;46(6):1118–23.