

· 论 著 ·

3种精子计数池的质量评估

陆金春¹, 吕年青², 黄宇烽¹, 李石华(Philip S. Li)³, Harry Fisch⁴

(1. 南京大学医学院临床学院/南京军区南京总医院生殖遗传研究室, 江苏 南京 210002; 2. 江苏省计划生育委员会科学技术研究所, 江苏 南京 210036; 3. Center for Male Reproductive Medicine and Microsurgery, Cornell Institute for Reproductive Medicine & Department of Urology, Weill Medical College of Cornell University, The New York Presbyterian University Hospital for Columbia and Cornell, New York, NY 10021, USA; 4. Male Reproductive Center, Department of Urology, Columbia University Medical Center, New York, NY 10028, USA)

摘要: 目的: 精液分析仍然是评估男性生育能力的一项重要实验测试。然而, 较少严格的医院男科学实验室精液分析质控使得比较不同实验室, 甚至同一实验室在不同时间之间的精液分析结果变得非常困难或毫无意义。本文的目的是评价男科学实验室常用的血球计数池、Makler计数池及Cell-VU计数池的准确性, 为建立标准化的精液分析方法提供科学的实验依据。方法: 以含已知浓度的(Hamilton Thorne Biosciences, USA)美国男科学实验室质控(US andrology lab QC)乳胶珠溶液为QC标准溶液, 分别用3种计数池计数, 并进行比较和分析。结果: Cell-VU、血球计数池及Makler计数池计数的乳胶珠浓度分别为 (37.63 ± 4.89) 、 (42.74 ± 4.98) 、 $(53.52 \pm 6.67) \times 10^6/\text{ml}$ 和 (18.22 ± 1.77) 、 (20.48 ± 1.56) 、 $(24.97 \pm 4.75) \times 10^6/\text{ml}$, 相应的两种标准溶液的浓度分别为 (35 ± 5) 和 $(18 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}$ 。Cell-VU计数池的平均乳胶珠浓度类似于标准溶液, 而血球计数池及Makler计数池的平均乳胶珠浓度显著高于Cell-VU计数池($P < 0.001$)。与标准乳胶珠浓度相比, Cell-VU计数池的平均变异系数(CV)为7.51%和1.22%, 而血球计数池和Makler计数池的CV分别为22.11%、13.78%和52.91%、38.72%。结论: 不同计数池的准确性和可靠性之间存在明显差异, Cell-VU计数池明显优于血球计数池和Makler计数池。因此, 为提供最准确的诊断依据, 我们极力推荐Cell-VU作为医院男科实验室的标准计数池尽快建立精液分析质控标准。

关键词: 精子计数; 乳胶珠; Cell-VU计数池; 血球计数池; Makler计数池; 质量控制

中图分类号: R446; R321.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3591(2004)10-0755-04

Quality Evaluation of Three Different Sperm Counting Chambers

Lu Jinchun, Lü Nianqing, Huang Yufeng, Philip S. Li, Harry Fisch

Laboratory of Reproduction & Genetics, Clinical School of Nanjing University Medical College/Nanjing General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China (Lu JC, Huang YF); Jiangsu Family Planning Research Institute, Nanjing, Jiangsu 210036, China (Lü NQ); Center for Male Reproductive Medicine and Microsurgery, Cornell Institute for Reproductive Medicine & Department of Urology, Weill Medical College of Cornell University, the New York Presbyterian University Hospital for Columbia and Cornell, New York, NY 10021, USA (Li PS); Male Reproductive Center, Department of Urology, Columbia University Medical Center, New York, NY 10028, USA (Fisch H)

Correspondence to: Huang Yufeng, E-mail: yfhuang@androl.cn

收稿日期: 2004-09-10; 修回日期: 2004-09-30

作者简介: 陆金春(1969-), 男, 江苏海安县人, 副主任技师, 博士研究生, 从事男科学、临床检验及细胞生物学专业。E-mail: jclu@jlonline.com

通讯作者: 黄宇烽, E-mail: yfhuang@androl.cn

Abstract: *Objective:* Semen evaluation is the most important laboratory test for assessing male fertility. However, lack of strict quality control (QC) for semen analyses in hospital andrology laboratories makes it difficult and meaningless to compare semen data between different laboratories. This paper reports a comparative study on the accuracy of the Hemacytometer (Qiujiing Inc., Shanghai, China), Makler (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel), and Cell-VU (Millennium Sciences Inc., New York, USA) chambers for sperm counting. *Methods:* Both low [$(18 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}$] and high [$(35 \pm 5) \times 10^6/\text{ml}$] pre-calibrated standard latex bead solutions (Hamilton Thorne Biosciences, USA) were used as the quality control solution to perform counts on the three different counting chambers. Bead counts for the three different chambers were compared, and variability within the chambers determined for standard solutions at low and high concentrations of latex beads, respectively. *Results:* Mean bead concentrations for the Cell-VU, Hemacytometer and Makler chambers were (37.63 ± 4.89) , (42.74 ± 4.98) and $(53.52 \pm 6.67) \times 10^6/\text{ml}$ respectively for a standard solution containing $(35 \pm 5) \times 10^6$ beads/ml, and (18.22 ± 1.77) , (20.48 ± 1.56) , $(24.97 \pm 4.75) \times 10^6/\text{ml}$ respectively for a standard solution containing $(18 \pm 2.5) \times 10^6$ beads/ml. Mean bead concentrations for the Cell-VU chamber were consistently similar and close to the standard pre-calibrated bead solutions, while those for both the Hemacytometer and the Makler chambers were significantly overestimated ($P < 0.001$). The average coefficients of variation for the Cell-VU chamber were 7.51% for a higher concentration of the standard solution containing $(36 \pm 5) \times 10^6$ beads/ml and 1.22% for a lower concentration of the standard solution containing $(18 \pm 2.5) \times 10^6$ beads/ml, while the mean variation rates of the Hemacytometer and Makler chambers were 22.11% and 13.78% for a standard solution containing $(36 \pm 5) \times 10^6$ beads/ml, and 52.91% and 38.72% for a standard solution containing $(18 \pm 2.5) \times 10^6$ beads/ml, respectively. *Conclusion:* Semen analysis is one of the most important tests for male fertility evaluation, but the data obtained from commercially available counting chambers may differ markedly in accuracy and reliability. Results from this comparative study demonstrated that the Cell-VU chamber exhibits significantly more accurate and less variable results than those of the Hemacytometer and Makler chambers. To ensure the best possible evaluations and accurate diagnoses, we therefore recommend that Cell-VU be used as the standard counting chamber for routine semen analyses in andrology laboratories. *Natl J Androl, 2004, 10(10): 755-757, 760*

Key words: sperm count; latex beads; Cell-VU chamber; Hemacytometer; Makler chamber; quality control

精液分析是评价男性生育能力的最基本检验手段。理论上,精液分析是一个很简单的操作过程,只要将一滴精液置于玻片上,进而确定其相关参数即可。然而,实际上,精液分析所得的每一个参数都需要大量的专业知识、细致认真的操作及必要的质量控制措施。Keel等^[1]报告了美国几百家男科实验室对精子浓度、形态学、活率及抗精子抗体的室间质量控制结果,精子浓度的结果显示,一份精液标本的精子浓度差异范围达 $3 \sim 492 \times 10^6/\text{ml}$,手工检测的变异系数(CV)为 30% ~ 138%,计算机辅助的精液分析(CASA)的 CV 为 24% ~ 99%。不同实验室精子浓度的较大差异提示,精子计数方法的不同、计数池种类的不同以及操作的标准化对精子计数结果有着直接的影响。为此,我们用已知浓度(Hamilton Thorne Biosciences, USA)美国男科学实验室质控(US andrology lab QC)乳胶珠溶液为 QC 标准溶液,对目前国际上常用的三种精子计数池进行了评价,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 三种计数池分别为:Cell-VU 计数池(Millennium Sciences Inc., New York, USA), Makler 计数池(Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel),血球计数池(上海求精生化试剂仪器有限公司,

量制沪字 02270113,中国)。美国男科学实验室质控标准乳胶珠溶液(Hamilton Thorne Biosciences, USA)2份,一份浓度为 $(35 \pm 5) \times 10^6/\text{ml}$,另一份为 $(18 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}$ 。

1.2 方法

1.2.1 Cell-VU 计数法 Cell-VU 计数池由载玻片和 0.5 mm 厚的盖玻片构成,每个载玻片有两个计数池,可同时配有两个盖玻片。盖玻片中央有激光蚀刻的网格,网格区为 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$,均分为 100 个 $0.1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$ 的小方格。计数池的深度为 0.02 mm。将标准乳胶珠溶液振荡混匀,按操作说明上样 $4 \mu\text{l}$,按数上不数下、数左不数右的原则计数 50 个小方格的乳胶珠数,以保证每次计数不少于 200 个珠。结果 $\div 10 \times 10^6/\text{ml}$ 即为乳胶珠的浓度。

1.2.2 Makler 计数法 Makler 计数池专门设计用于测定精子浓度及活力,池深 0.01 mm,上层盖玻片的中央有 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的网格区,均分为 100 个 $0.1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$ 的小方格。按操作说明滴加混匀标准乳胶珠溶液 $5 \mu\text{l}$,同上计数 50 个小方格的乳胶珠数。结果 $\div 5 \times 10^6/\text{ml}$ 即为乳胶珠的浓度。

1.2.3 血球计数池法 血球计数池法是世界卫生组织推荐使用的精子计数测定方法^[2]。将标准乳胶珠溶液用双蒸水以 1:20 稀释,按照 WHO 手册指南计数乳胶珠并计算乳胶珠浓度。

1.3 统计学分析 不同计数池的计数结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数的比较采用 *t* 检验。

2 结果

共取 Cell-VU 计数载玻片 3 片, 计数 6 个池, 每个池计数 5 次, 共有 30 次计数结果; 血球计数板 3 块, 共有 6 个池, 每个池亦计数 5 次, 共有 30 次计数结果; Makler 计数板 1 块, 每天计数 5 次, 共 3 d, 共有 15 次计数结果。它们的均值及标准差见表 1。三组间两两比较显示, 三组间差异均有显著性 ($P < 0.001$)。

标准乳胶珠溶液 1 的浓度为 $(35 \pm 5) \times 10^6/\text{ml}$, 标准乳胶珠溶液 2 的浓度为 $(18 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}$, Cell-VU 计数池的浓度最接近标准乳胶珠的浓度, 平均变异系数 (CV) 分别为 7.51% 和 1.22%, 而血球计数池的 CV 分别为 22.11% 和 13.78%, Makler 计数池的 CV 分别为 52.91% 和 38.72%。提示, Cell-VU 计数池计数结果最准确, 而血球计数池和 Makler 计数池计数结果明显偏高, 尤以 Makler 计数池与标准乳胶珠浓度相差最大, 差异达 52.91%。

另外, 从标准差来看, Makler 计数池也明显高于 Cell-VU 和血球计数池, 提示同一 Makler 计数池不同计数间的差异亦较大。

表 1 不同精子计数池的乳胶珠浓度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The latex bead concentrations of different chambers for sperm count ($\bar{x} \pm s$)

Chamber	n	Concentration for standard solution 1	Concentration for standard solution 2
Cell-VU	30	37.63 \pm 4.89	18.22 \pm 1.77
Hemacytometer	30	42.74 \pm 4.98*	20.48 \pm 1.56*
Makler	15	53.52 \pm 6.67* Δ	24.97 \pm 4.75* Δ

与 Cell-VU 计数池相比, * : $P < 0.001$; 与血球计数池相比, Δ : $P < 0.001$

Compared with the Cell-VU, * : $P < 0.001$; compared with the Hemacytometer, Δ : $P < 0.001$

3 讨论

精液分析, 特别是精子计数, 仍是评估男性生育能力的基本测试。但不同精子计数池的准确性和可靠性如何, 我们了解得并不多。以往研究多用精液样品来评估不同计数池的准确性, 但由于没有使用标准溶液所得结果常难以解释^[3]。本研究将含已知浓度的商品乳胶珠溶液引入实验室质控, 来评价不同计数池的准确性和可靠性, 这可避免精液样本固

有误差的来源, 如由精液黏度、精子凝集或存在生精细胞等引起的精子浓度差异。

本研究显示, 不同精子计数池的精子计数结果相差较大, 引起误差的原因是多方面的, 除精液本身性质所致的固有误差外, 还包括技术误差, 这通常是由于个人或操作引起的, 包括样本的混匀、加样等操作, 但也可归因于计数池本身的不准确性。不同精子计数池的相对准确性和精确性可产生显著不一致的结果^[4]。

血球计数板是最早应用于精子计数的计数池之一, 也是目前 WHO 推荐使用的精子计数工具, 目前仍被广泛应用^[1]。血球计数板本来是设计用于计数外周血红细胞与白细胞的, 近年来发现用于精子计数其结果差异较大^[5], 这可能与样本计数前需要稀释有关, 血球计数池为一开放池, 其亦受环境条件、充池及分析时间的影响。

1978 年, Makler 引入一种专供精子计数的计数池。但近年来有研究显示^[6], 其与血球计数池的结果之间缺少相关性。据我们所知, Ginsburg 等^[7]是首先使用一种含有特定颗粒浓度的溶液比较不同计数池结果的人, 其发现 Makler 计数池的计数及标准差都远远高于血球计数池和 Micro-Cell 计数池的结果, 本研究结果与此类似。

不同实验室之间精子计数结果的显著差异可导致临床精液分析结果的不确定性, 1 份精液标本的计数结果在这个实验室检测是正常的, 而在另一个实验室可能就提示不育, 这将导致临床医生对病人采取不同的治疗措施。流行病学研究亦提示, 精子浓度在过去 50 年间已有显著降低, 但也有否定这一说法的报道^[8]。不同地区精子浓度亦有显著性差异^[9,10], 但这些报道使用了不同的人群和精子计数方法, 而不同精子计数方法获得的结果差异又十分显著, 提示, 不同实验室之间严格的质量控制十分必要。

室内质控和室间质控是保证不同实验室结果准确和可靠的重要措施之一。精子计数是男科实验室目前考虑较多的质控项目之一^[11,12], 目前最大的挑战来自精子计数方法学的标准化和监测^[13]。本研究显示, Cell-VU 计数池的准确性和精确性均优于血球计数池和 Makler 计数池, 与文献报道一致^[3,14]。而且, Cell-VU 可一次性或反复多次使用, 这在计数传染性较强的样本时将显示出独特的优势。因此, 我们建议要建立一个标准的计数池操作系统用于所有实验室, 从而为不同实验室的质量控制评价提供

(下转 760 页)

人类精子密度、活力、活率与精液中硒浓度呈明显正相关,在不育患者饮食中添加适量的硒,可明显改善精子活力和活率,并降低精子畸形率。硒在男性生殖发育和改善精子活力、维持精子正常形态和功能中有重要作用。

本研究发现,口服锌硒宝对少弱精子症患者精液质量的提高具有良好的效果,在我们研究的90 d治疗周期中,随着治疗时间的延长,精子活率和活动力均不断升高,精子密度在治疗60 d和90 d时比治疗前和治疗30 d时显著升高,而在治疗90 d时比60 d时有改善,但差异无显著性。治疗无效的4例患者中3例是严重少精子症患者,单纯地补充锌和硒对严重的少弱精子症可能没有明显作用。

参考文献

- [1] Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, *et al.* Decline in semen quality among fertile man in Paris during the past 20 years[J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(5):281-285.
- [2] Hansen JC, Deguchi Y. Selenium and fertility in animals and

- man—a review[J]. *Acta Vet Scand*, 1996, 37(1):19-30.
- [3] 世界卫生组织编. 人类精液及精子-宫颈粘液相互作用实验室检验手册[M]. 第4版. 北京:人民卫生出版社,2001. 5.
- [4] 郭应禄,李宏军主编. 前列腺炎[M]. 北京:人民军医出版社,2002. 119-120.
- [5] Chia SE, Ong CN, Chua LH, *et al.* Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men[J]. *J Androl*, 2000, 21(1):53-57.
- [6] Henkel R, Bittner J, Weber R, *et al.* Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility[J]. *Fertil Steril*, 1999, 71(6):1138-1143.
- [7] 绪广林,钱之玉. 锌对大鼠精子头尾连接的保护作用研究[J]. *生殖与避孕*,2002,22(1):8-13.
- [8] Matsushita K, Kitagawa K, Matsuyama T, *et al.* Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus[J]. *Brain Res*, 1996, 743(1-2):362-365.
- [9] Al-Bader A, Omu AE, Dashti H, *et al.* Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation by zinc[J]. *Arch Androl*, 1999, 43(2):135-140.
- [10] Lin YC, Chang TC, Tseng YJ, *et al.* Seminal plasma zinc levels and sperm motion characteristics in infertile samples [J]. *Changgeng Yi Xue Za Zhi*, 2000, 23(5):260-266.
- [11] Turgut G, Abban G, Turgut S, *et al.* Effect of overdose zinc on mouse testis and its relation with sperm count and motility [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2003, 96(1-3):271-279.

(陆金春 编发)

(上接 757 页)

基础,最终提高所有实验室结果的准确性和可靠性以及可比较性。Cell-VU 应是此标准计数池的最佳选择。

参考文献

- [1] Keel BA, Quinn P, Schmidt CF Jr, *et al.* Results of the American association of bioanalysts national proficiency testing programme in andrology[J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(3): 680-686.
- [2] 世界卫生组织编. 人类精液及精子-宫颈粘液相互作用实验室检验手册[M]. 第3版. 北京:科学出版社,1994. 8-9.
- [3] Seaman EK, Goluboff E, BarChama N, *et al.* Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads[J]. *Fertil Steril*, 1996, 66(4): 662-665.
- [4] Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, *et al.* Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study[J]. *J Androl*, 2004, 25(4): 635-644.
- [5] Brazil C, Swan SH, Tollner CR, *et al.* Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study [J]. *J Androl*, 2004, 25(4): 645-656.
- [6] Peters AJ, Zaneveld LJ, Jeyendran RS. Quality assurance for sperm concentration using latex beads[J]. *Fertil Steril*, 1993, 60(4): 702-705.

- [7] Ginsburg KA, Armant DR. The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measurements obtained by manual and videomicrographic analysis[J]. *Fertil Steril*, 1990, 53(5): 882-887.
- [8] Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, *et al.* Semen analyses in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality [J]. *Fertil Steril*, 1996, 65(5): 1009-1014.
- [9] Fisch H, Ikeguchi EF, Goluboff ET. Worldwide variations in sperm counts [J]. *Urology*, 1996, 48(6): 909-911.
- [10] Fisch H, Goluboff ET. Geographic variations in sperm counts: a potential cause of bias in studies of semen quality [J]. *Fertil Steril*, 1996, 65(5): 1044-1046.
- [11] Franken DR. African experience with sperm morphology training courses[J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 7(1): 114-119.
- [12] Cooper TG, Bjorndahl L, Vreeburg J, *et al.* Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization [J]. *Int J Androl*, 2002, 25(5): 306-311.
- [13] Auger J, Eustache F, Ducot B, *et al.* Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(11): 2360-2368.
- [14] Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, *et al.* The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration [J]. *Fertil Steril*, 1997, 68(2): 340-345.

(朱培元 编发)