



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی - ایران
برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (EQAP)
دوره چهل و هفتم (نوبت سوم سال ۱۴۰۳)



Semen » Analysis

توصیه میشود: تاریخ انجام هر تست را برای پیگیریهای بعدی برای خودتان یادداشت نمائید.

توجه: ثبت کد شناسائی الزامی است

EQAP -

--	--	--	--	--

کد شناسائی آزمایشگاه:

نام آزمایشگاه: _____

دستورالعمل آماده سازی نمونه:

روش استفاده:

- نمونه حاوی مایع سیمن بوده که باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری شود.
- از یخ زدگی نمونه جلوگیری شود.
- ده دقیقه قبل از انجام آزمایش ویال حاوی نمونه از یخچال خارج گردد.
- ویال حاوی نمونه را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی و رتکس کنید تا نمونه کاملاً بصورت یکنواخت آماده انجام آزمایش گردد.
- قبل از شروع لطفاً متن ذیل را مطالعه نمائید.

هدف: تشریح نحوه شمارش اسپرم در نمونه semen

مواد و وسایل لازم:

- سمپلر در اندازه های مختلف
- لام نئوبار هموسیتومتر
- **Shaker**
- محلول فیکساتیو

تهیه محلول فیکساتیو

۵۰ گرم سدیم بی کربنات (NaHCO_3) را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. ۱۰ میلی لیتر فرمالین ۳۶ تا ۴۰ درصد اضافه و حجم نهایی را به یک لیتر برسانید. به دلخواه ۰٫۲۵ گرم تریپان بلو (**colour index 23859**) برای وضوح سر اسپرم و تسهیل در شمارش می توانید اضافه کنید.

تخمین اولیه جهت تعیین رقت مورد نیاز

نمونه را بوسیله دستگاه شیکر، بهم زنید تا نمونه در تمام لوله یکنواخت و یکسان گردد. **10x** از نمونه را بوسیله سمپلر بردارید و روی لام قرار دهید. لامل **18x18** را روی نمونه قرار داده آنرا جهت بررسی زیر میکروسکوپ قرار دهید. برای تخمین شمارش اسپرم با استفاده از عدسی ۴۰ نمونه را از نظر وجود یا عدم وجود اسپرم بررسی کرده و تعداد اسپرم در هر شان را شمارش و تقسیم بر چهار کنید.



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی - ایران
برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (EQAP)
دوره چهل و هفتم (نوبت سوم سال ۱۴۰۳)



فیکس نمودن اسپرم ها برای شمارش:

در صورتی که اسپرم ها حرکت داشته باشند از مربع ها خارج یا وارد می شوند. به همین علت برای شمارش بایستی اسپرم ها فیکس شوند.

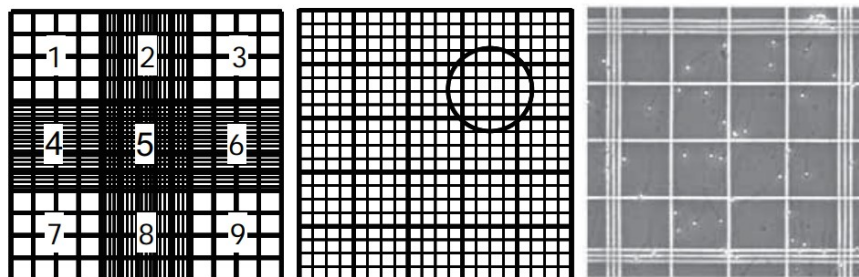
تهیه رقت مناسب از نمونه:

برای تهیه رقت مناسب از نمونه با استفاده از جدول ۱ اقدام می کنیم. پس از تهیه رقت ۱۰ لاند از نمونه رقیق شده را بین لام هموسایتومتر و لامل قرار می دهیم و پس از ثابت شدن نمونه شمارش را آغاز می کنیم.

Spermatozoa per ×400 field	Spermatozoa per ×200 field	Dilution required	Semen (μl)	Fixative (μl)	Chamber	Area to be assessed
>101	>404	1:20 (1+19)	50	950	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
16-100	64-400	1:5 (1+4)	50	200	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
2-15	8-60	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer or large-volume	All 9 grids or Entire slide

لام هموسیتومتر

برای شمارش اسپرم استفاده از لام نئوبار هموسیتومتر توصیه می شود. لام نئوبار هموسیتومتر دارای دو قسمت جداگانه برای شمارش سلول می باشد که در هر قسمت یک مربع ۳*۳ میلی متر روی شیشه لام حک شده است و این مربع بزرگ به ۹ مربع کوچکتر ۱*۱ میلی متر تقسیم شده است. لام نئوبار را با لامل ۲۲*۲۲ پوشانده و عمقی برابر ۰,۱ میلی متر ایجاد می شود (شکل ۱).



شکل ۱. لام نئوبار هموسیتومتر

همانطور که در شکل ۱ دیده می شود مربع های ۱، ۳، ۷ و ۹ هر کدام به ۱۶ مربع کوچکتر تقسیم می شود. مربع های ۲، ۴، ۶ و ۸ هر کدام به ۲۵ مربع کوچک تر تقسیم شده و به وسیله خطوط افقی و عمودی ردیف بندی می شوند. مربع مرکزی (شماره ۵) خود به ۲۵ مربع تقسیم شده که هر کدام مجدداً به ۱۶ مربع کوچکتر تقسیم می شوند. بسته به رقت تهیه شده از نمونه نواحی مختلف لام جهت شمارش اسپرم بررسی می شود. برای مثال اگر نمونه را ۱:۲۰ یا ۱:۵ رقیق نماییم از مربع شماره ۵ و در صورت لزوم از مربع های ۴ و ۶ استفاده می شود، در حالی که اگر نمونه ۱:۲ رقیق شود همه مربع های ۱ تا ۹ بایستی شمارش شود.



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی - ایران
برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (EQAP)
دوره چهل و هفتم (نوبت سوم سال ۱۴۰۳)



نحوه استفاده از خانه های لام هموسایتومتر:

در هنگام شمارش تنها اسپرم هایی که دارای سر و دم (اسپرم کامل) هستند، شمارش می شوند. اینکه یک اسپرم در شمارش لحاظ شود یا نه، بستگی به محل قرارگیری سر اسپرم در خانه ها دارد. در اینجا طرز قرارگیری دم اهمیت ندارد. مرز هر کدام از مربع های ۹ گانه دارای ۳ خط می باشند. در صورتی که سر اسپرم داخل مربع یا روی دو خط داخلی باشد آن اسپرم در شمارش لحاظ می شود، اما در صورتی که سر اسپرم روی دو خط خارجی باشد، در شمارش لحاظ نمی شود. برای اینکه یک اسپرم روی خطوط دو بار شمارش نشود در هر مربع تنها ۲ ضلع در نظر گرفته می شود.

روش شمارش اسپرم در لام نئوبار هموسایتومتر:

شمارش اسپرم هر نمونه بایستی در هر دو طرف لام نئوبار انجام شود در صورت مغایرت آزمایش تکرار شود. برای شمارش مربع مرکزی (مربع شماره ۵) را انتخاب می کنیم. این مربع ۵ ردیف افقی دارد که حجم هر ردیف ۲۰ نانولیتتر می باشد. ابتدا از یک ردیف شروع می کنیم و اسپرم ها را شمارش می کنیم. این کار را آنقدر ادامه می دهیم تا ۲۰۰ عدد اسپرم شمارش شود. اگر در ردیف اول به ۲۰۰ نرسیدیم ردیف های بعدی را تا رسیدن به ۲۰۰ عدد اسپرم می شماریم. اگر در وسط یک ردیف به ۲۰۰ عدد اسپرم رسیدیم تا انتهای آن ردیف ادامه می دهیم.

روش محاسبه اسپرم های شمارش شده در لام نئوبار هموسایتومتر:

- در رقت ۱:۲۰: تعداد اسپرم های شمارش شده در مربع مرکزی (مربع شماره ۵) تقسیم بر تعداد ردیف.
- در رقت ۱:۵: تعداد اسپرم های شمارش شده در مربع مرکزی (مربع شماره ۵) تقسیم بر تعداد ردیف، عدد حاصل تقسیم بر چهار.
- در رقت ۱:۲: تعداد اسپرم های شمارش شده در مربع مرکزی (مربع شماره ۵) تقسیم بر تعداد ردیف، عدد حاصل تقسیم بر ۱۰.

نکته: سلول هایی که فاقد سر هستند **pin head** یا سر سوزنی اطلاق می شوند و به عنوان اسپرم در نظر گرفته نمی شوند و در شمارش محاسبه نمی شوند. همچنین سلول هایی که فاقد دم هستند **without tail** یا بدون سر اطلاق می شوند و در شمارش محاسبه نمی شوند.

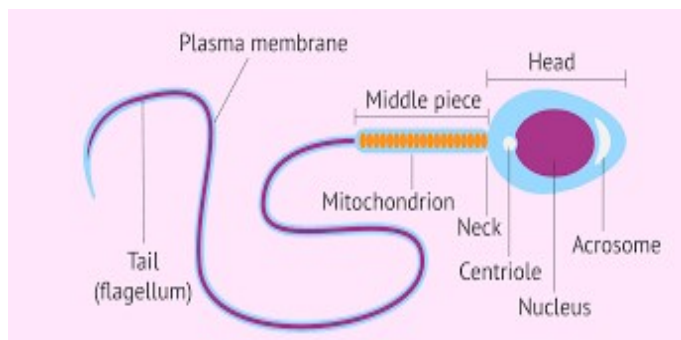


انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی - ایران
برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (EQAP)
دوره چهل و هفتم (نوبت سوم سال ۱۴۰۳)



هدف: تشریح نحوه بررسی مورفولوژی اسپرم در نمونه semen

هر اسپرم داری سر، گردن و دم می باشد. برای اینکه یک اسپرم از لحاظ مورفولوژی نرمال تلقی شود، بایستی تمام اجزای آن کامل و بدون نقص باشد. در شکل ۱ اجزا اسپرم به صورت شماتیک نشان داده شده است.



شکل ۱: اجزا اسپرم

طبقه بندی مورفولوژی اسپرم

سر اسپرم نرمال، صاف و به طور کلی بیضی می باشد و نسبت طول به عرض در سر اسپرم کمتر از ۱٫۵ (گرد) یا بزرگتر از ۲ (دراز) نمی باشد. یک اسپرم نرمال ناحیه آکروزومی کاملاً مشخص دارد که ۴۰ تا ۷۰ درصد از ناحیه سر را شامل می شود. ناحیه آکروزومی نباید دارای واکوئول بزرگ یا بیش از دو واکوئول کوچک باشد.

گردن اسپرم باید باریک، و تقریباً به اندازه سر باشد. گردن باید با محور اصلی سر اسپرم از لحاظ تقارن هماهنگ باشد.

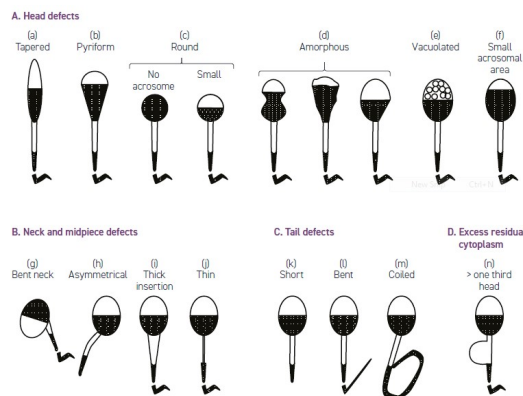
دم

در یک اسپرم نرمال طول دم تقریباً ۴۵ میکرومتر و حدود ۱۰ برابر طول سر می باشد. دم ممکن است بر روی خودش به صورت حلقه شود، مشروط بر اینکه زاویه تیز نشان دهنده شکستگی وجود نداشته باشد.

(ERC) Excess residual cytoplasm

ERC باقیمانده اضافی سیتوپلاسم است که در همه اسپرم ها وجود دارد و اگر کمتر از یک سوم اندازه طبیعی سر باشد به صورت نرمال در نظر گرفته می شود و تنها زمانی به صورت یک نقص در نظر گرفته می شود که بیش از یک سوم اندازه طبیعی سر باشد.

نکته: سلول هایی که فاقد سر هستند **pin head** یا سر سوزنی اطلاق می شوند و به عنوان اسپرم در نظر گرفته نمی شوند و در ارزیابی مورفولوژی در نظر گرفته نمی شوند. همچنین سلول هایی که فاقد دم هستند **without tail** یا بدون سر اطلاق می شوند و در ارزیابی مورفولوژی در نظر گرفته نمی شوند. در شکل ۲ برخی از اشکال غیر طبیعی اسپرم به صورت شماتیک نشان داده شده است.



شکل ۲. اشکال غیرطبیعی اسپرم



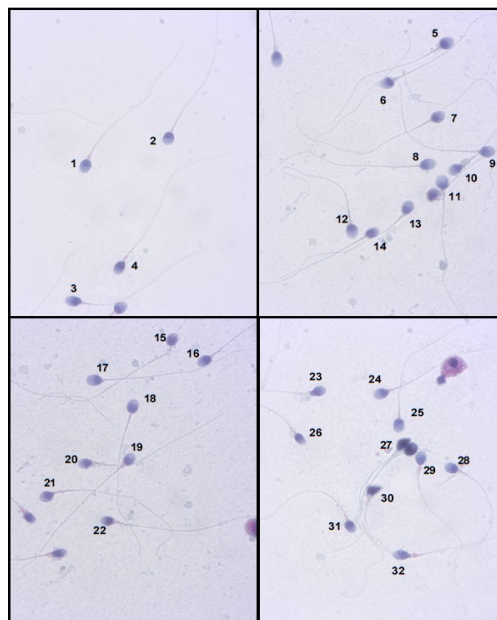
انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی - ایران

برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (EQAP)

دوره چهل و هفتم (نوبت سوم سال ۱۴۰۳)



تعدادی از عکس و نتایج ارزیابی مورفولوژی اسپرم در شکل های ۴، ۵ و جدول های ۱ و ۲ و ۳ زیر آمده است:



شکل ۳. نمونه **Semen** رنگ آمیزی شده به وسیله رنگ آمیزی پاپانیکولا

	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification
1	normal		normal	normal	normal
2	abnormal	amorphous	normal	normal	abnormal
3	abnormal	amorphous	thick	normal	abnormal
4	abnormal		normal	normal	abnormal
5	abnormal	not oval	thick	normal	abnormal
6	abnormal	not oval	normal	normal	abnormal
7	abnormal	PA vac	thick	normal	abnormal
8	normal		normal	normal	normal
9	abnormal	vac	normal	normal	abnormal
10	abnormal	not oval	thick	normal	abnormal
11	abnormal	not oval	thick	normal	abnormal
12	normal		normal	normal	normal
13	abnormal		thick/bent	normal	abnormal
14	abnormal	small	normal	normal	abnormal
15	abnormal		thick	normal	abnormal
16	abnormal		normal	NA	abnormal
17	normal		normal	normal	Normal
18	normal		normal	normal	Normal
19	normal		thick	normal	abnormal
20	abnormal		thick	normal	abnormal
21	abnormal		thick	normal	abnormal
22	abnormal		thick	normal	abnormal
23	abnormal		thick	NA	abnormal
24	abnormal		thick	normal	abnormal
25	normal		thick	normal	abnormal
26	abnormal	tapered	thick	NA	abnormal
27	abnormal	not oval	thick	normal	abnormal
28	normal		thick	normal	normal
29	abnormal		thick	normal	abnormal
30	abnormal	not oval	thick	doubled	
31	abnormal		asymmetrical	normal	abnormal
32	abnormal	not oval/PA vac	normal	normal	abnormal

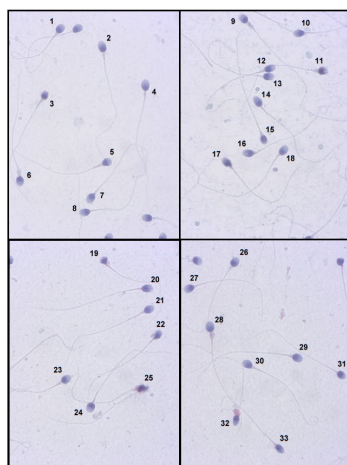
جدول ۱. نتایج ارزیابی مورفولوژی شکل ۳



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی - ایران

برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (EQAP)

دوره چهل و هفتم (نوبت سوم سال ۱۴۰۳)



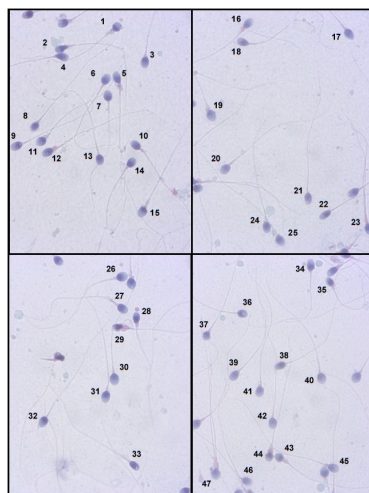
شکل ۴. نمونه Semen رنگ آمیزی شده به وسیله رنگ آمیزی پاپانیکولا

	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification
1	normal		thick	normal	abnormal
2	abnormal		normal	normal	normal
3	abnormal		thick	normal	abnormal
4	abnormal		thick	normal	abnormal
5	abnormal		thick	normal	abnormal
6	normal		thick	normal	abnormal
7	normal		normal	normal	normal
8	abnormal		normal	asymmetrical	abnormal
9	abnormal		thick	normal	abnormal
10	abnormal		normal	NA	abnormal
11	abnormal		thick	normal	abnormal
12	abnormal		thick	asymmetrical	abnormal
13	normal		normal	NA	abnormal
14	abnormal		normal	normal	abnormal
15	abnormal	small	thick/asymmetrical	normal	abnormal
16	abnormal		thick	normal	abnormal
17	abnormal		thick	normal	abnormal
18	normal		normal	normal	normal
19	abnormal		thick	normal	abnormal
20	abnormal		normal	normal	abnormal
21	normal		normal	normal	normal
22	abnormal		normal	normal	abnormal
23	abnormal		thick	abnormal	abnormal
24	abnormal	too wide	thick	abnormal	abnormal
25	abnormal		thick	normal	abnormal
26	abnormal		normal	normal	abnormal
27	normal		normal	normal	normal
28	abnormal		thick	normal	abnormal
29	normal		normal	normal	normal
30	abnormal	small	normal	normal	abnormal
31	abnormal		normal	normal	abnormal
32	abnormal		thick	asymmetrical	abnormal
33	abnormal	tapered	thick	normal	abnormal

جدول ۲. نتایج ارزیابی مورفولوژی شکل ۴



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی - ایران
 برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (EQAP)
 دوره چهل و هفتم (نوبت سوم سال ۱۴۰۳)



شکل ۵. نمونه Semen رنگ آمیزی شده به وسیله رنگ آمیزی پاپانیکولا

	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification
1	abnormal		thick	normal	abnormal
2	abnormal		thick	bent	abnormal
3	abnormal		thick/asymmetrical	NA	abnormal
4	abnormal		thick	NA	abnormal
5	abnormal		thick	normal	abnormal
6	normal		normal	normal	normal
7	normal		normal	normal	normal
8	abnormal	small	normal	normal	abnormal
9	abnormal	PA vac	thick	normal	abnormal
10	abnormal		thick	normal	abnormal
11	abnormal		thick	normal	abnormal
12	normal		normal	normal	normal
13	abnormal		thick	normal	abnormal
14	normal		thick	normal	abnormal
15	abnormal		thick	normal	abnormal
16	abnormal		thick	normal	abnormal
17	abnormal		normal	normal	abnormal
18	abnormal		normal	NA	abnormal
19	abnormal		thick	NA	abnormal
20	normal		normal	normal	normal
21	abnormal		normal	normal	abnormal
22	abnormal	tapered	normal	normal	abnormal
23	abnormal		thick	double	abnormal
24	abnormal	small	thick	normal	abnormal
25	abnormal		thick	normal	abnormal
26	normal		normal	normal	normal
27	normal		thick	normal	abnormal
28	abnormal		thick	bent	abnormal
29	abnormal	small	thick	normal	abnormal
30	normal		normal	normal	normal
31	abnormal		normal	normal	abnormal
32	normal		normal	normal	normal
33	abnormal	tapered	normal	normal	abnormal
34	abnormal		normal	normal	abnormal
35	abnormal	small	thick	normal	abnormal
36	abnormal	small	normal	normal	abnormal
37	abnormal	small	normal	normal	abnormal
38	abnormal		normal	normal	abnormal
39	abnormal	tapered	normal	normal	abnormal
40	normal		normal	normal	normal
41	abnormal		thick	normal	abnormal
42	abnormal		asymmetrical	normal	abnormal
43	abnormal		thick	normal	abnormal
44	abnormal		thick	normal	abnormal
45	abnormal		thick	normal	abnormal
46	abnormal		normal	normal	abnormal
47	abnormal		thick	doubled	abnormal

جدول ۳. نتایج ارزیابی مورفولوژی شکل ۵