راهنمای نحوه شمارش اسپرم و مرفولوژی

هدف: تشریح نحوه شمارش اسپرم در نمونه **semen**

مواد و وسایل لازم:

- سمپلر در اندازه های مختلف
- لام مناسب شمارش سلولی (مثلا لام هموسیتومتر نئوبار و غیره)
- **Shaker**
- محلول فیکساتیو

تهیه محلول فیکساتیو موقت

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.

***** چنانچه محلول فیکساتیو در دسترس نبود از آب شهری میتوان استفاده کرد.**

تخمین اولیه جهت تعیین رقت مورد نیاز

نمونه را بوسیله دستگاه شیکر به آرامی، بهم زنید تا نمونه در تمام لوله یکنواخت شود. **10λ** از نمونه را بوسیله سمپلر روی لام قرار داده و لامل **18×18** را روی گذاشته و با میکروسکوپ بررسی نمائید. برای تخمین شمارش اسپرم با استفاده از عدسی ۴۰ حداقل ۵ شان را شمارش کنید و میانگین آن را بر عدد چهار تقسیم کنید. به عنوان مثال اگر میانگین ۵ شان شمارش شده ۲۰ اسپرم باشد تخمین شما ۵ میلیون بر میلی لیتر میباشد.

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 و تعداد آنها به اندازه کافی تقلیل یابد.

تهیه رقت مناسب از نمونه:

برای تهیه رقت مناسب از نمونه با استفاده از جدول ۱ اقدام می کنیم. پس از تهیه رقت ۱۰ لاندا 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

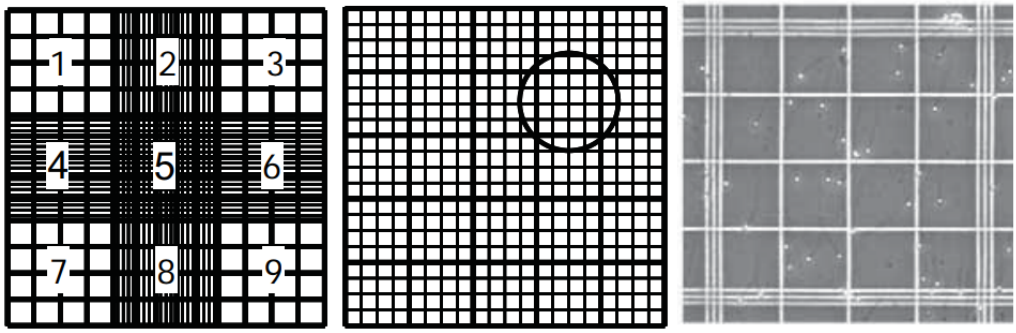
جدول ۱. روش تهیه رقت مناسب از نمونه

لام مخصوص شمارش سلول

برای شمارش اسپرم استفاده از لام های شمارش سلول مرسوم به هموسیتومتر (مثل لام توما، نئوبار ساده یا نئوبار پیشرفته) توصیه می شود. لام های هموسیتومتر رایج معمولا 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. چنانچه لام شمارش سلولی را با لاملل مناسب (موسوم به لامل ؟؟؟)

۲۲ ×۲۲ پوشانده شود و عمقی برابر ۰/۱ میلی متر ایجاد می شود (شکل ۱).

همانطور که در شکل ۱ دیده می شود مربع های ۷، ۳، ۱ 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 هرکدام مجددا 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.



شکل ۱. لام نئوبار هموسیتومتر

قوانین نحوه استفاده از خانه های لام هموسایتومتر:

الف)در هنگام شمارش تنها اسپرم هایی که دارای سر و دم هستند (اسپرم کامل)، شمارش می شوند.

ب) 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.

ج) بر روی اکثر لام ها، 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 همجوار در نظر گرفته می شود.

یک روش پیشنهادی شمارش اسپرم در لام هموسایتومتر:

شمارش اسپرم هر نمونه بایستی در هر دو طرف لام نئوبار انجام شودو در صورت مغایرت بیش از حد، آزمایش تکرار شود. برای شمارش سلولهای اسپرم، معمولاً مربع مرکزی (مربع شماره ۵) را انتخاب می کنیم. این مربع ۵ ردیف افقی دارد که حجم هر ردیف(شامل ۵ مربع متوسط) ۰/۲ میلیمتر مکعب یا ۰/۲ میکرولیتر 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. محاسبه اسپرم های شمارش شده به این روش:

- 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 دم اطلاق می شوند و در شمارش محاسبه نمی شوند.

Analysis Semen

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

توجه: **ثبت کد** شناسائی **الزامی است**

نام آزمایشگاه: ---------- کد شناسائی آزمایشگاه: EQAP - ☐☐☐☐☐

برای آزمایش روی نمونه با مشخصات: B5- 0555 پاسخدهی فقط از طریق اینترنت ۱۴۰۵/۰۹/۱۱ تا ۱۴۰۵/۰۹/۲۵

دستورالعمل آماده سازی نمونه:

روش استفاده:

- **نمونه حاوی مایع سیمن بوده که باید در دمای یخچال نگهداری شود.**
- **از یخ زدگی نمونه جلوگیری شود.**
- **ویال نمونه را به مدت یک دقیقه ورتکس کنیدتا نمونه کاملا بصورت یکنواخت وآماده انجام آزمایش گردد.**
- **تعداد اسپرم را مطابق روش رایج در آزمایشگاه خود شمارش نموده و در جدول مربوطه ثبت نمائید.**

**** چنانچه نمونه دارای آگلوتینه بود به مدت سه دقیقه با دور بالا ورتکس کنید.(توجه داشته باشید که این عمل بر روی شمارش اسپرم ها تاثیری نخواهد داشت)**

نکته: جهت همگن نمودن نمونه از روتاتور استفاده ننمائید.

- **تعداد اسپرم را مطابق روش رایج در آزمایشگاه خود شمارش نموده و در جدول مربوطه ثبت نمائید.**

خواهشمند است محاسبات را به دقت انجام داده و جدول انجام آزمایش‌ها را بر اساس اطلاعات درخواستی شامل مطالب ذیل را به شکل صحیح وارد نمائید.
بدیهی است ثبت ناقص اطلاعات مورد نیاز سبب دسته بندی و آنالیز آماری نامناسب یا حذف آزمایش خواهد شد.

نام آزمایش	روش	نتیجه	واحد
Sperm concentration	☐ **Computer Assisted Semen Analysis(CASA)** ☐ **Improved Neubauer** ☐ **Other**		**millions/mL**
Sperm morphology	☐ **WHO 1999** ☐ **WHO 2010** ☐ **WHO 2021**		**% normal**