

· 论 著 ·

4 种精子计数方法的比较

胡毓安¹, 陆金春¹, 吕年青², 邵永¹, 黄宇烽¹(1. 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)

摘要: 目的: 评价血细胞计数池、Makler 计数池、Cell-VU 计数池和计算机辅助精液分析(CASA)系统 4 种精子计数方法的准确性和精确性。方法: 使用两种已知浓度的质控乳胶珠溶液, 1 份浓度为 $(35 \pm 5) \times 10^6/\text{ml}$, 另 1 份浓度为 $(18.0 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}$, 评价 4 种计数方法的准确性和精确性, 并比较 4 种方法计数精液的结果。结果: 计数乳胶珠时, Cell-VU 计数池的结果最接近已知浓度, 分别为 (39.70 ± 4.76) 、 $(19.09 \pm 2.02) \times 10^6/\text{ml}$, 变异系数(CV)值分别为 12.80% 和 10.58%; 血细胞计数池和 Makler 计数池结果均高于已知浓度, 前者为 $(44.84 \pm 4.86) \times 10^6/\text{ml}$ 、 $(21.04 \pm 1.87) \times 10^6/\text{ml}$, CV 值分别为 10.81% 和 8.89%, 后者为 $(52.36 \pm 7.78) \times 10^6/\text{ml}$ 、 $(24.54 \pm 3.67) \times 10^6/\text{ml}$, CV 值分别为 14.86% 和 14.96%; CASA 系统结果低于已知浓度, 为 (28.53 ± 2.06) 、 $(14.62 \pm 0.95) \times 10^6/\text{ml}$, 但 CV 值最低, 分别为 7.22% 和 6.50%。计数精液时, Cell-VU 计数池与 CASA 系统结果差异无显著性 ($P = 0.71$), 分别为 (45.28 ± 34.52) 、 $(41.96 \pm 31.93) \times 10^6/\text{ml}$, 血细胞计数池和 Makler 计数池结果差异无显著性 ($P = 0.14$), 分别为 (76.98 ± 59.90) 、 $(63.89 \pm 53.84) \times 10^6/\text{ml}$, Cell-VU 计数池、CASA 系统与血细胞计数池、Makler 计数池结果间差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 计数精液时, CASA 系统与 Cell-VU 计数结果差异无显著性。各实验室可选择合适的手工或 CASA 计数方法。

关键词: 血细胞计数池; Makler 计数池; Cell-VU 计数池; 计算机辅助精液分析; 精子计数

中图分类号: R446.1; R321.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3591 (2006) 03-0222-04

Comparison of Four Methods for Sperm Counting

HU Yu-an¹, LU Jin-chun¹, LU Nian-qing², SHAO Yong¹, HUANG Yu-feng¹

1. Laboratory of Reproduction & Genetics, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Jiangsu Family Planning Research Institute, Nanjing, Jiangsu 210036, China

Correspondence to: HUANG Yu-feng, E-mail: huangyf@androl.cn

Abstract: **Objective:** To evaluate the accuracy and precision of 4 methods including Hemacytometer, Makler chamber, Cell-VU chamber, and computer-aided semen analysis for determining sperm concentration. **Methods:** Latex bead solutions with concentrations known as $(35 \pm 5) \times 10^6/\text{ml}$ and $(18.0 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}$ and semen samples ($n = 54$) were counted by the above 4 methods and the results were then compared. **Results:** Mean bead concentrations for Hemacytometer, Makler, Cell-VU chambers and CASA were (44.84 ± 4.86) , (52.36 ± 7.78) , (39.70 ± 4.76) , $(28.53 \pm 2.06) \times 10^6/\text{ml}$ respectively for the standard solution containing $(35 \pm 5) \times 10^6/\text{ml}$, and (21.04 ± 1.87) , (24.54 ± 3.67) , (19.09 ± 2.02) , $(14.62 \pm 0.95) \times 10^6/\text{ml}$ respectively for a standard solution containing $(18 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}$. The results of Cell-VU chamber were consistently similar and close to the standard solutions, while those of Hemacytometer, Makler chambers were overestimated, and those of CASA were underestimated. The coefficients of variation for Hemacytometer, Makler, Cell-VU chambers and CASA were 10.81%, 14.86%, 12.80%, and 7.22% respectively for a

收稿日期: 2005-08-10; 修回日期: 2005-11-12

基金项目: 江苏省医学重点学科基金(苏卫科教[2001]34号)

作者简介: 胡毓安(1974-), 女, 浙江东阳市人, 主管技师, 硕士研究生, 从事男性不育实验室工作。

通讯作者: 黄宇烽, E-mail: huangyf@androl.cn

higher standard solution, while 8.89%, 14.96%, 10.58%, and 6.50% respectively for a lower standard solution. CASA has the lowest CV%. When semen samples were counted, the results of Hemacytometer, Makler, Cell-VU chambers and CASA were (76.98 ± 59.90), (63.89 ± 53.84), (45.28 ± 34.52), (41.96 ± 31.93) × 10⁶/ml respectively. There wasn't any significant difference either between Cell-VU chamber and CASA ($P=0.71$), or between Hemacytometer and Makler chamber ($P=0.14$), while there was significant difference between Cell-VU chamber or CASA and Hemacytometer or Makler chamber ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** When counting semen sample, there wasn't any significant difference between Cell-VU chamber and CASA. Each laboratory can select its own proper method for manual or computer-aided analysis. *Natl J Androl, 2006, 12(3):222-224, 227*

Key words: Cell-VU; chamber; hemacytometer; Makler chamber; computer-aided semen analysis; sperm counting

精液常规分析是评价男性生育能力的最基本的检验项目,精子计数是其中的重要指标之一。但国内外专家均发现不同实验室间的精子计数结果可比性较差,其原因不仅包括来自精液标本本身的影响因素,如标本完整性、精液粘稠度等,还包括来自精子计数操作过程中的技术误差,如计数池的差异、样本混匀、加样、技术人员的熟练程度等。这些影响因素不仅干扰手工计数结果的准确性,同时也存在于计算机辅助的精液分析(computer-aided semen analysis, CASA)中。因此,精液分析的标准化被认为是一项刻不容缓的工作^[1,2]。本文通过使用已知浓度的质控乳胶珠溶液,评价3种计数池进行手工计数的结果和CASA系统结果的准确性和精确性,并比较了它们计数精液标本的结果差异。

1 材料与方法

1.1 计数工具 血细胞计数池(上海求精生化试剂仪器有限公司生产,量制沪字02270113)。Makler计数池(Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel)为反复使用的专用精子计数池,池深10 μm。Cell-VU计数池(Millennium Sciences Inc, New York, USA)为一次性或可多次使用的专用精子计数池,池深20 μm。CASA系统(北京伟力公司出品WLJY-9000),随机配置Macro精子计数池(南京源程公司生产),为反复使用的专用精子计数池,池深10 μm。标准乳胶珠溶液1为(35 ± 5) × 10⁶/ml,溶液2为(18.0 ± 2.5) × 10⁶/ml(Hamilton Thorne Biosciences, USA)。

1.2 精液标本 来自我院男性不育门诊就诊的患者($n=55$),无精子症、精液液化不良者除外。

1.3 方法

1.3.1 标准乳胶珠溶液计数 由2名熟练实验员同时计数,计数结果取两者平均数。每份标准乳胶珠溶液均取血细胞计数池3块,共6个池,每天计数1次,连续计数10 d,共有60个计数结果;取Cell-VU计数载玻片3片,共6个池,每天计数1次,连续计数10 d,共有60个计数结果;取Makler计数池1

块,每天计数5次,连续计数12 d,共60个计数结果;CASA系统每天计数6次,连续计数10 d,共60个计数结果。

1.3.2 精子计数 手淫法留取全部精液后,置于37℃水浴箱孵育,液化后即进行精子计数。每份精液标本均由1名熟练实验员分别用血细胞计数池、Makler计数池、Cell-VU计数池和CASA系统计数2次,取2次平均值表示计数结果。血细胞计数池计数时用0.2 mol/L HCl^[3]按WHO手册指南^[4]进行稀释和计算;Makler计数池和Cell-VU计数池计数时,为便于计数用0.4 mol/L HCl对精液进行1:1稀释和制动;CASA系统计数时在Macro计数池上滴加混匀精液5 μl。

1.4 统计学分析 各组结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0软件进行ANOVA分析。

2 结果

2.1 标准乳胶珠溶液计数结果 见表1,图1、2。各组间差异均有极显著性($P<0.01$)。

表1 不同精子计数方法计数的乳胶珠浓度($\bar{x} \pm s, \times 10^6/\text{ml}$)

Table 1. The latex bead concentrations obtained by different counting methods($\bar{x} \pm s, \times 10^6/\text{ml}$)

Method	n	Concentration for standard solution	
		1	2
Cell-VU	60	39.70 ± 4.76	19.09 ± 2.02
Hemacytometer	60	44.84 ± 4.86	21.04 ± 1.87
Makler	60	52.36 ± 7.78	24.54 ± 3.67
CASA + Macro	60	28.53 ± 2.06	14.62 ± 0.95

各组间差异均有显著性, $P<0.01$, P 值均为0

There were significant differences among four groups, $P<0.01$, $P=0$

Cell-VU的变异系数(CV)分别为12.80%和10.58%,血细胞计数池的CV分别为10.81%和8.89%,Makler计数池的CV分别为14.86%和14.96%,CASA系统的CV分别为7.22%和6.50%。

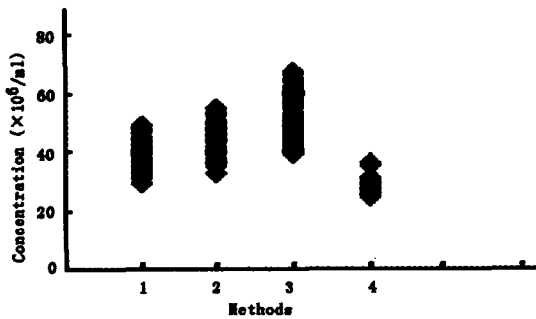


图1 溶液1计数结果 $[(35 \pm 5) \times 10^6/\text{ml}]$

1: Cell-VU; 2: 血细胞计数池; 3: Makler; 4: CASA

Figure 1. Distribution of results from solution 1 $[(35 \pm 5) \times 10^6/\text{ml}]$

1: Cell-VU; 2: Hemacytometer; 3: Makler; 4: CASA

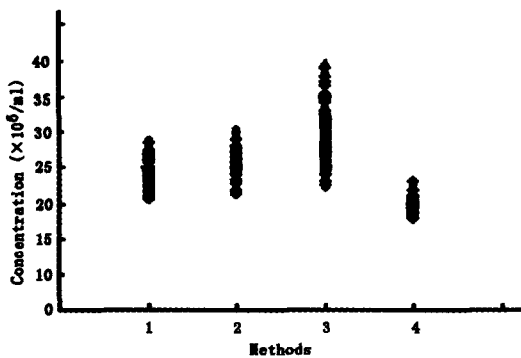


图2 溶液2计数结果 $[(18.0 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}]$

1: Cell-VU; 2: 血细胞计数池; 3: Makler; 4: CASA

Figure 2. Distribution of results from solution 2 $[(18.0 \pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}]$

1: Cell-VU; 2: Hemacytometer; 3: Makler; 4: CASA

2.2 精子计数结果 见表2。Cell-VU计数池与CASA系统结果差异无显著性($P=0.71$),血细胞计数池和Makler计数池结果差异无显著性($P=0.14$),Cell-VU计数池与血细胞计数池、Makler计数池结果间差异显著(P 值分别为0和0.04),CASA系统与血细胞计数池、Makler计数池结果间差异也有显著性(P 值分别为0和0.01)。

3 讨论

使用已知浓度的乳胶珠溶液有助于评估精子计数的准确性,是目前常用的解决精子计数标准化问题的手段^[5-7]。通过计数已知浓度的乳胶珠溶液,我们的结果显示不同的计数池以及不同方法间差异较大。其中Cell-VU对两个浓度的乳胶珠溶液的计数结果均最接近已知浓度;血细胞计数池、Makler计数池计数结果高于已知浓度,两者相比,前者更接近已知浓度;而CASA计数结果则低于已知浓度。各种

表2 不同精子计数方法计数的精子密度 $(\bar{x} \pm s, \times 10^6/\text{ml})$
Table 2. The sperm concentrations obtained by different counting methods $(\bar{x} \pm s, \times 10^6/\text{ml})$

Method	n	Sperm concentration
Cell-VU	55	45.28 ± 34.52
Hemocytometer	55	76.98 ± 59.90**
Makler	55	63.89 ± 53.84*
CASA + Macro	55	41.96 ± 31.93* ^Δ

与Cell-VU比较,**: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$;与Hemocytometer比较,#: $P < 0.01$;与Makler比较,Δ: $P < 0.01$

Compared with Cell-VU,**: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$; compared with Hemocytometer,#: $P < 0.01$; Compared with Makler, Δ: $P < 0.01$

方法的精密度显示,CASA系统的精密度最好(分别为7.22%和6.50%),Makler计数池的精密度最差(14.86%和14.96%)。Cell-VU计数池、血细胞计数池、Makler计数池的结果与国内外文献报道较一致^[5,7-10]。Cell-VU计数池被认为具有良好的准确性和重复性。

这4种不同方法对精子计数的结果也显示了类似的特点。血细胞计数池与Makler计数池结果均明显高于Cell-VU计数池和CASA系统结果($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),前者计数结果高于后者,但两者间差异无显著性($P=0.14$);CASA系统结果低于Cell-VU计数池,但两者间差异无显著性($P=0.71$)。Mahmoud等^[10]认为计数乳胶珠溶液和计数精子会导致不同的结论,这可能由于精浆的作用引起。如以Cell-VU计数池结果为参考,CASA系统计数精子时与Cell-VU计数结果差异无显著性,而计数乳胶珠浓度时差异有显著性,可能该系统定义计算公式时以精液样品作为评估样品。这种现象提示今后用于校正精子密度的标准溶液是否应该考虑使用精浆作为介质为宜或直接使用冷冻精液。

精液常规分析虽然操作简单,但影响因素很多,除精液本身性质所致的固有误差外,还包括技术误差,如样本混匀、加样等操作,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^[5]。选择具良好准确性和精确性的计数池和计数方法,是做好精液分析标准化工作的环节之一。

血细胞计数池是最早应用于精子计数且被广泛使用的计数池,也是目前WHO推荐使用的精子计数工具。虽然血细胞计数池精确度高,而且各级实验室均能配备,但其本来是设计用于计数外周血细

断术是治疗早泄的有效办法,有效率达81.125%^[7],我们虽然没有行阴茎背神经切断,但从解剖学上,阴茎头、冠状沟末梢神经丰富、感觉特别灵敏,当过长的包皮切除后,阴茎头接受外部刺激触发射精的阈值增加,从而使其敏感性降低,延缓射精,使性交时间延长和性满意度提高^[8]。总之,我们认为包皮环切术后阴茎头敏感度下降可能是治愈早泄的主要原因之一,本组52例早泄合并包皮过长患者,单纯行包皮环切术后12个月内早泄治愈率达54.9%,即使单纯行包皮环切术对早泄改善不明显的患者,再运用常规方法进行治疗,也能收到意想不到的效果。本组12例中就有9例在包皮环切术前应用常规治疗早泄方法而无明显效果,在包皮环切术后应用同样的方法治疗早泄却得到了明显改善,即行包皮环切术后早泄治疗容易了。

综上所述不难看出,包皮过长可能为早泄发生的间接或直接原因,应引起临床医生的高度重视并有待

于进一步研究证实,包皮环切术是治疗早泄合并包皮过长的有效方法。

参考文献

- [1] 郭应禄,张凯,张志文,等主编. 阴茎勃起功能障碍[M]. 北京:北京医科大学出版社,1999.123.
- [2] Masters WH, Johnson VE. Human sexual inadequacy[M]. Boston: Little Brown,1970.92.
- [3] 谢作钢. 国外早泄研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2002,8(6):449-450.
- [4] 王怀鹏,王行环,古维灿,等. 522例早泄患者的勃起功能调查[J]. 中华男科学.2004,10(1):15-17.
- [5] 毛向明,郑少斌,韦安阳. 包皮成形术对早泄治疗的探讨[J]. 中华男科学,2003,9(3):227-228.
- [6] Colpi GM, Fanciullacci F, Beretta G, et al. Evoked sacral potentials in subjects with true premature ejaculation[J]. Andrologia 1986,18(6):583-586.
- [7] 刘继红,熊承良主编. 性功能障碍学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004.232.
- [8] 沈周俊,陈善闻,朱春侠,等. 成人包皮环切术对勃起功能影响的评价[J]. 中华男科学,2004,10(1):18-19.

(王书奎 编发)

(上接224页)

胞的,用于精子计数结果差异较大^[10],作为精子计数结果的金标准受到争议。专用的精子计数池(10 μm或20 μm深),可提供稳定的精子分布,有利于显微镜下拍摄并计算精子的运动速度,为精子运动提供客观的数据,不仅能进行精子计数,还可进行精子活力的测定。Makler计数池是较早研制成功的精子专用计数池,但许多文献显示Makler计数池结果及标准差都高于血细胞计数池和其他计数池^[8-10],本研究结果与此类似。

随着数字化图像处理技术在男科学中的应用,CASA以其特有的强大数据处理功能,可快速准确地进行精子密度和活力测定,且不同操作者间有较好的一致性^[8],正越来越多地服务于临床中。尽管CASA中精子密度的计算由系统软件所决定,而且这些计算公式多为制造商保密,我们也应经常对CASA结果进行标准化检测,及时发现并纠正可能存在的误差。

精液是具传染性的标本,一次性精子计数池如Cell-VU、Microcell等的研制满足了避免交叉感染的需要。精子计数池研发历程中的每一次革新,都更好地满足了临床的要求。通过对各种计数池和计数方法准确性和精确性的评价,寻求适合于手工和

CASA计数的标准计数池,有利于建立满足临床需要的标准操作系统以指导临床实验室。

参考文献

- [1] 黄宇烽,Philip S. Li. 精液分析标准化刻不容缓[J]. 中华男科学杂志,2005,11(2):83-84.
- [2] Keel BA. 精液分析标准化的重要性与紧迫性[J]. 中华男科学杂志,2005,11(2):85-90.
- [3] 陆金春. 0.2 mol/L 盐酸作精子计数稀释液[J]. 临床检验杂志,1996,14(3):156.
- [4] 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,2001.12-14.
- [5] 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.
- [6] Keel BA. Quality control, quality assurance, and proficiency testing in the andrology laboratory[J]. Arch Androl, 2002, 48(6):417-431.
- [7] 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.
- [8] Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer-automated semen analyses. Part 1. Comparison of counting chambers[J]. Fertil Steril, 1996, 65(1):150-155.
- [9] 陆金春,吕年青,黄宇烽,等. 3种精子计数池的质量评估[J]. 中华男科学杂志,2004,10(10):755-757,760.
- [10] 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.

(王书奎 编发)