



جمهوری اسلامی ایران
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

معاونت درمان



جمهوری اسلامی ایران
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

معاونت آموزشی

دبیرخانه شورای راهبردی تدوین راهنماهای بالینی

شناسنامه و استاندارد خدمت

آنالیز طبع منی: بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی به صورت اقمراقی

و همراه بارنگ آمیزی

**Semen analysis; macroscopic, and
microscopic, differential and staining**

کد بین المللی: ۸۹۳۲۲

تدوین کنندگان:

انجمن جنین شناسی

با جمع آوری نظرات:

هیئت مورد تولید مثل، هیئت مورد نازائی

اساتید بیماریهای کلیه و مجاری ادراری

انجمن علمی متخصصی زنان و مامائی

بهمن ۱۳۹۵

مقدمه:

توسعه جوامع و گسترش نظام های سلامت، به ویژه در دو سده اخیر و نیز گسترش علوم پزشکی در جهان موجب شده است که تقریباً تمام کشورها به منظور برآورده شدن نیازهای سلامت محور خود، به تدوین راهنماهای بالینی (راهکارها، سیاست ها، استانداردها و پروتکل های بالینی) در راستای ارتقا سطح کیفی و کمی ارائه خدمت و همچنین تدوین سیاست های کلان در چارچوب استقرار پزشکی مبتنی بر شواهد گام بر دارند. از سویی ضرورت تعیین حدود و ثغور اختیارات دانش آموختگان حرف مختلف پزشکی و استاندارد فضای فیزیکی و فرآیندهای ارائه خدمات سبب شد تا تدوین شناسنامه های مرتبط به منظور افزایش ایمنی، اثر بخشی و هزینه اثر بخشی در دستور کار وزارت متبوع قرار گیرد.

اندازه گیری کیفیت برای جلب اطمینان و حصول رضایت آحاد جامعه، قضاوت در زمینه عملکردها، تامین و مدیریت مصرف منابع محدود، نیازمند تدوین چنین راهنماهایی می باشد. این مهم همچنین به سیاستگذاران نیز کمک خواهد نمود تا به طور نظام مند، به توسعه و پایش خدمات اقدام نموده و از این طریق، آنان را به اهدافی که نسبت به ارائه خدمات و مراقبت های سلامت دارند، ناآل نماید تا به بهترین شکل به نیازهای مردم و جامعه پاسخ دهند. علاوه بر تدوین راهنماها، نظارت بر رعایت آن ها نیز حائز اهمیت می باشد و می تواند موجب افزایش رضایتمندی بیماران و افزایش کیفیت و بهره وری نظام ارائه خدمات سلامت گردد. طراحی و تدوین راهنماهای مناسب برای خدمات سلامت، در زمره مهمترین ابعاد مدیریت نوین در بخش سلامت، به شمار می آید. اکنون در کشورمان، نیاز به وجود و استقرار راهنماهای ملی در بخش سلامت، به خوبی شناخته شده و با رویکردی نظام مند و مبتنی بر بهترین شواهد، تدوین شده است.

در پایان جا دارد تا از همکاری های بی دریغ معاون محترم درمان «جناب آقای دکتر محمد حاجی آقاجانی»، معاون محترم آموزشی «جناب آقای دکتر باقر لاریجانی» و شورای راهبردی تدوین راهنماهای بالینی در مدیریت تدوین راهنماهای طبابت بالینی، و نیز هیات های مورد و انجمن های علمی تخصصی مربوطه، اعضاء محترم هیئت علمی مراکز مدیریت دانش بالینی و همچنین هماهنگی موثر سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران، وزارت کار، تعاون و رفاه اجتماعی و سازمان های بیمه گر و سایر همکاران در معاونت های مختلف وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی تقدیر و تشکر نمایم.

انتظار می رود راهنماهای طبابت بالینی تدوین شده تحت نظارت فنی دفتر ارزیابی فناوری، تدوین استاندارد و تعرفه سلامت و کمیته فنی تدوین راهنماهای بالینی، مورد عنایت تمامی نهادها و مراجع مخاطب قرار گرفته و به عنوان معیار عملکرد و محک فعالیت های آنان در نظام ارائه خدمات سلامت شناخته شود.

امید است اهداف متعالی نظام سلامت کشورمان در پرتو گام نهادن در این مسیر، به نحوی شایسته محقق گردد.

دکتر سید حسن قاضی زاده هاشمی

وزیر



اسامی تدوین کنندگان اصلی:

دکتر محمد مهدی آخوندی: جنین شناس، عضو تیم تخصصی پژوهشگاه رویان
دکتر مجتبی رضازاده: جنین شناس، مدیر گروه پژوهشی جنین شناسی پژوهشگاه رویان
دکتر احمد حسینی: جنین شناس، عضو هیئت مدیره انجمن علمی تخصصی باروری و ناباروری
دکتر پوپک افتخاری یزدی: جنین شناس، مسئول بخش جنین شناسی پژوهشگاه رویان
دکتر منصوره موحدین: جنین شناس، عضو هیئت مدیره انجمن علمی تخصصی باروری و ناباروری
دکتر علیرضا میلانی فر: پزشک و حقوقدان
دکتر حجت اله سعیدی: جنین شناس، مسئول بخش جنین شناسی مرکز ناباروری امید
دکتر لیلا کریمیان: جنین شناس، عضو تیم تخصصی پژوهشگاه رویان
دکتر محمد رضا صادقی: جنین شناس، مسئول بخش جنین شناسی پژوهشگاه ابن سینا
فهیمة رنجبر: کارشناس ارشد مامائی، دبیر جلسات تدوین شناسنامه ها
دکتر مهران دخت عابدینی: متخصص زنان و زایمان، مسئول کمیته راهبری تدوین شناسنامه های خدمات درمان ناباروری

اسامی همکاران مرور کننده شناسنامه:

همکاران متخصص کلیه و مجاری ادراری و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی:
دکتر محمد صدیقی کیلانی، دکتر محمد رضا نوروزی

همکاران فلوشیپ نازائی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی:

دکتر اشرف آل یاسین (دبیر هیئت مورد زنان و نازائی)، **دکتر ساغر صالح پور** (عضو هیئت مورد زنان و نازائی)، **دکتر مهناز اشرفی** (دانشگاه علوم پزشکی ایران)، **دکتر عالیہ قاسم زاده** (دانشگاه علوم پزشکی تبریز)، **دکتر نزهت موسوی فر** (دانشگاه علوم پزشکی تبریز)، **دکتر آیدا نجفیان** (دانشگاه علوم پزشکی تهران)، **دکتر زهرا حیدر** (دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)، **دکتر لیلا نظری** (دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)، **دکتر آزاده اکبری** (دانشگاه علوم پزشکی ایران)، **دکتر ژیلا عابدی اصل**

سایر همکاران: دکتر احمد وثوق، متخصص رادیولوژی، معاون درمان و خدمات تخصصی پژوهشگاه رویان، محسن قائمی نژاد رئیس اداره صدور پروانه

تحت نظارت فنی:

گروه استانداردسازی و تدوین راهنماهای بالینی
دفتر ارزیابی فن آوری، استانداردسازی و تعرفه سلامت

دکتر علیرضا اولیایی منش، دکتر مجید داوری، دکتر آرمان زندی، دکتر آرمین شیروانی، مجیدحسن قمی،
دکتر عطیه صباغیان پی رو، دکتر مریم خیری، دکتر بیتا لشگری، مرتضی سلمان ماهینی



الف) عنوان دقیق خدمت مورد بررسی (فارسی و لاتین):

۸۹۳۲۲: آنالیز مایع منی: بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی به صورت افتراقی و همراه با رنگ آمیزی

89322: Semen analysis; macroscopic, and microscopic, differential and staining

ب) تعریف دقیق خدمت مورد بررسی:

به‌رغم پیشرفت‌های گسترده در آزمون‌های تشخیصی، بررسی مایع منی در طول زمان جایگاه خود را به‌عنوان نخستین آزمون ارزیابی قدرت باروری مردان حفظ کرده‌است. مایع منی حاصل ترشحات بخش‌های مختلف مجاری و غدد تولید مثلی است؛ ترشحات لوله‌های سمینی فرس ۰/۵٪، ترشحات وزیکول سمینال ۰/۷۰٪ و ترشحات پروستات ۰/۲۵٪ آن‌را تشکیل می‌دهد. از این‌رو، ارزیابی پارامترهای مایع منی اطلاعات بالینی ارزشمندی در مورد اسپرم، کیفیت آن و عملکرد بیضه، اپیدیدیم و الگوی ترشحاتی غدد ضمیمه جنسی شامل وزیکول سمینال، پروستات و غدد بولبواورترال یا کوپرا^۱ را در اختیار قرار می‌دهد (۱). ۵۰-۳۵٪ کل موارد ناباروری ناشی از عامل مردانه است که از این میان، بخش عمده آن ناشی از کیفیت نامناسب مایع منی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) است. برای بررسی این موارد، مایع منی باید بر اساس پروتکل WHO تهیه و بررسی شود (۲) ص ۱۲۵۷، پاراگراف آخر. در بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی به صورت افتراقی و با رنگ آمیزی، گزارش همه نقایص مورفولوژی اسپرم، از جمله نقایص یکسان اسپرم‌ها (فاقد آکروزوم گلوبوزو اسپرمی) و گزارش دیگر سلول‌های موجود در مایع منی، مانند لوکوسیت‌ها، ژرم‌سل‌ها، راند سل‌ها و بعضی پارازیت‌ها، مانند تریکوموناس و وجود قارچ‌ها، مانند مونیلیا، ضروری است.

اصطلاحات معمول در آنالیز منی شامل موارد زیر است:

- Normospermia: غلظت بیش از ۱۵ میلیون در میلی‌لیتر، تحرک نرمال بیش از ۴۰٪ و مورفولوژی نرمال بیش از ۴٪
- Oligospermia: غلظت کمتر از ۱۵ میلیون در میلی‌لیتر
- Asthenozoospermia: تحرک کمتر از ۴۰٪ اسپرم‌ها
- Teratozoospermia: مورفولوژی کمتر از ۳ تا ۴ درصد
- Oligoasthenoteratozoospermia: غلظت کمتر از ۱۵ میلیون در میلی‌لیتر، تحرک کمتر از ۴۰٪ اسپرم‌ها و مورفولوژی کمتر از ۳ تا ۴ درصد
- Polyzoospermia: غلظت بیش از ۲۵۰ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر
- Azoospermia: عدم وجود اسپرم در مایع انزال
- Aspermia: عدم وجود مایع منی یا انزال داخل مثانه (Retrograde ejaculation)
- Hemospermia: وجود اریتروسیت در مایع منی
- Piospermia: وجود گلبول سفید در مایع منی (۳) ص ۲۲۶، Table A1.3

1 -bulbouretral (Cowper's)



مراحل ارایه خدمت:

۱. درخواست انجام خدمت توسط فرد صاحب صلاحیت
۲. ثبت اطلاعات بیمار
۳. اطمینان از شرایط مناسب بیمار برای تهیه نمونه مایع منی
۴. آموزش و ارایه اطلاعات لازم برای گرفتن نمونه مایع منی
۵. تهیه نمونه مایع منی در شرایط استاندارد
۶. کنترل نمونه دریافتی برای انجام دادن آنالیز
۷. بررسی ماکروسکوپی مایع منی
۸. بررسی میکروسکوپی مایع منی (با رنگ آمیزی)

نکته‌های مهم قبل، حین و بعد از خدمت:

- مرکز موظف به تطبیق فرد نمونه‌دهنده با مشخصات درج شده در پرونده است.
- برای دستیابی به یک نمونه مناسب بررسی، باید به فرد کاندید ارزیابی مایع منی توضیحات دقیق و روشن شفاهی و کتبی درباره نحوه جمع‌آوری مایع منی ارایه شود (۳) ص ۱۰ بخش ۱، ۲، ۲، ۱، پاراگراف ۳.
- باید به بیمار تأکید شود که تمامی نمونه مایع منی گرفته شود و بیمار هرگونه هدر رفتن نمونه را گزارش کند.
- مدت بهینه پرهیز جنسی در منابع مختلف یکسان ذکر نشده است اما به طور معمول یک دوره ۷-۲ روزه توصیه می‌شود (بیشتر از ۷ روز اجتناب از نزدیکی در تهیه مایع منی توصیه نمی‌شود) (۳) ص ۱۰ بخش ۱، ۲، ۲، ۱، پاراگراف ۲.
- نمونه معمولاً در اتاق مخصوصی در کلینیک و نزدیک آزمایشگاه جمع‌آوری می‌شود. این اتاق باید شامل توالت، دستشویی و تخت یا کاناپه ای راحت باشد (۳) ص ۱۰ بخش ۱، ۲، ۲، ۱، پاراگراف ۱.
- برچسب ظرف حاوی نمونه باید شامل اطلاعاتی از جمله نام و نام خانوادگی مراجعه کننده، شماره پرونده و تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه باشد (۳) ص ۱۰ بخش ۱، ۲، ۲، ۱، پاراگراف ۴.
- نمونه باید از طریق استمناء و در ظرف های استریل پلاستیکی یا شیشه ای مخصوص با دهانه گشاد جمع‌آوری شود؛ این ظروف نباید حاوی مواد سمی برای اسپرم باشند (۳) ص ۱۱، پاراگراف ۱.
- ظرفی که برای جمع‌آوری اسپرم در آزمایشگاه استفاده می‌شود قبلاً باید تایید عدم سمیت سلولی برای اسپرم را از طریق انجام تست های کنترل کیفی داشته باشد (۴) ص ۴۷، ستون ۲، شماره ۷.
- در مواردی که امکان تهیه نمونه در شرایط استمناء فراهم نباشد توصیه می‌شود از کاندوم های ویژه ای فاقد هرگونه مواد اسپرم کش، برای جمع‌آوری نمونه استفاده شود. در این موارد توصیه می‌شود بجای کاندوم لاتکس از کاندوم پلی یورتان استفاده شود. استفاده از کرم یا لوبریکانت نیز برای گرفتن نمونه مجاز نیست ولی استفاده از پارافین یا روغن معدنی (Mineral Oil – Embryo Tested) بلامانع است (۳) ص ۱۲، بخش ۱، ۲، ۲، ۱، پاراگراف ۷.



- تمام مایع منی باید در ظرف استریل مخصوص جمع آوری شود و در مواردی که بیمار نتوانسته است این کار را انجام دهد باید موضوع را به اطلاع آزمایشگاه برساند تا جنین شناس بالینی نسبت به شرایط پیش آمده تصمیم گیری نماید.
- از آنجاکه اسپرم موجود در مایع منی در بخش اول انزال و حاصل از تخلیه محتویات اپیدیدیم و کانال دفران می باشد، از دست رفتن این بخش از مایع منی نسبت به بخش آخر آن باعث کاهش غلظت اسپرم در مایع منی می گردد. لذا در صورتی که نمونه گیری کامل نباشد نمونه دیگری با فاصله ۲ تا ۷ روز پرهیز جنسی گرفته می شود (۳) ص ۱۱، پاراگراف ۴.
- از آنجاکه تحرک اسپرم نسبت به کاهش دما شدیداً حساس می باشد، ظرف نمونه گیری قبل و بعد از دریافت مایع منی باید در دمای ۲۰ تا ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و در مدت یک ساعت از جمع آوری مورد بررسی قرار گیرد (۳) ص ۱۱، پاراگراف ۲.
- ممکن است در برخی شرایط استثنایی نمونه در منزل تهیه شود. در صورتیکه نمونه مایع منی با هماهنگی و مجوز جنین شناس بالینی خارج از مرکز تهیه شود پس از جمع آوری باید در تماس نزدیک با بدن فردی که نمونه را به آزمایشگاه منتقل می کند نگهداری شده و حداکثر ظرف مدت یک ساعت برای ارزیابی به آزمایشگاه تحویل شود (۳) ص ۱۲، پاراگراف ۱.
- مایع منی مانند دیگر مایعات حاصل از بدن انسان به صورت بالقوه آلوده در نظر گرفته می شود و در طول مدت کار و آنالیز آن رعایت همه نکات ایمنی و استفاده از وسایل حفاظتی الزامی است.
- در مواردی که نیاز به کشت مایع منی می باشد بایستی آنالیز آن به گونه ای انجام شود که از آلوده شدن آن جلوگیری گردد و یا آزمایش کشت قبل آنالیز انجام شود (۳) ص ۱۳، بخش ۷، ۲، پاراگراف ۱.
- در مواردی که مایع منی برای استفاده در روش های کمک باروری (IUI – IVF – ICSI) جمع آوری می گردد، باید لزوم استریل بودن نمونه و پرهیز از هرگونه آلودگی به بیمار تأکید و آموزش لازم ارایه شود و در زمان آنالیز مایع منی نیز از آلوده شدن آن و یا هرگونه آسیب احتمالی به اسپرم پرهیز گردد (۳) ص ۱۱، بخش ۳، ۲.
- برای پرهیز از جابه جا شدن احتمالی نمونه ها، نباید یک فرد به طور همزمان روی نمونه بیش از یک بیمار کار کند (۲) ص ۱۲۵۷ ستون ۱، پاراگراف ۱۱، سطر ۱.

پروتکل ثبت باید شامل موارد زیر باشد:

- مستند سازی باید شامل نام، تاریخ، تاریخ تولد، تاریخ و ساعت جمع آوری نمونه، شماره پرونده، ظرف مورد استفاده برای نمونه - گیری (در صورتی که از ظرف متفاوتی استفاده شده است)، زمان پرهیز از مقاربت، زمان و محل جمع آوری نمونه (به ویژه اگر خارج از مرکز تهیه شده است)، مشکل در جمع آوری نمونه، مناسب و کافی بودن نمونه، ثبت بخش ابتدایی یا انتهایی مایع منی از دست رفته هنگام جمع آوری و فاصله زمانی بین جمع آوری و آنالیز باشد ص ۴۹، ستون ۲، شماره ۴.

فرایند کار:

آنالیز مایع منی بعد از مایع شدن آن طی ۱۵ تا ۳۰ دقیقه پس از انزال انجام می شود. برای اطمینان از درستی نتایج، آنالیز باید حداکثر ظرف مدت یک ساعت پس از دریافت نمونه انجام شود. بررسی شامل دو بخش ماکروسکوپی و میکروسکوپی به شرح زیر است ص ۱۳ بخش ۳، ۲، پاراگراف ۱:



۱- ویژگی‌های ظاهری نمونه:

ظاهر نمونه طبیعی، هموژن، کدر و خاکستری متمایل به سفید رنگ است. در صورت کاهش غلظت آن، نمونه کدورت کمتری خواهد داشت. رنگ قرمز یا قهوه‌ای نمونه ناشی از وجود خون در مایع منی (Hemospermia) و رنگ زرد آن غیر طبیعی و ناشی از مصرف برخی ویتامین‌ها، داروها و یا ابتلای به هیاتیت است (۲) ص ۱۵، پاراگراف ۲.

۲- مایع شدن^۱

زمانی که نمونه مایع منی به آزمایشگاه تحویل می‌شود، از نظر مایع شدن و ویسکوزیته بررسی می‌شود. اگرچه این فاکتورها در ظاهر مشابه- اند، اما در واقع متمایز هستند. مایع شدن فرایندی طبیعی در قوام منی است که از حالت نیمه مایع به حالت مایع تبدیل می‌شود. اسپرم پس از مایع شدن مایع منی قادر به حرکت خواهد بود. این فرایند معمولاً طی ۱۵ دقیقه از زمان انزال در دمای اتاق (C ۳۷ - ۲۰) رخ می‌دهد و در موارد نادری مایع شدن تا یک ساعت یا بیشتر به طول می‌انجامد. در صورتی که مایع شدن رخ ندهد، ممکن است برای تسهیل آن از یکی از روش‌های زیر استفاده شود:

- افزودن حجم مناسبی از یک محیط کشت فیزیولوژیک همراه با رد کردن مکرر آن از پیپت
- عبور آرام و مکرر (۶ تا ۱۰ بار) از یک نیدل شماره ۱۸ متصل به سرنگ
- استفاده از آنزیم پروتئولیتیک Bromelain (۳) ص ۱۳ بخش ۱، ۲، ۳، ۱ پاراگراف ۱ و ص ۱۴، پاراگراف ۴-۱.

۳- ویسکوزیته:

ویسکوزیته نمونه را می‌توان پس از مایع شدن و با مکش آرام از طریق یک پیپت پلاستیکی یکبار مصرف با قطر ۱،۵ میلی‌متر بررسی کرد. وقتی مایع منی به صورت قطره قطره و با نیروی جاذبه از پیپت خارج می‌شود، می‌توان کشیده شدن آن را بررسی کرد. نمونه طبیعی، به صورت قطره‌های کوچک و جدا از هم از پیپت خارج می‌شود. در حالی که در نمونه غیر طبیعی، کشیده شدن مایع منی بیشتر از ۲ سانتی‌متر خواهد بود.

همچنین، ویسکوزیته را می‌توان با وارد کردن یک میله شیشه‌ای به نمونه و مشاهده طول کشیده شدن آن پس از خارج کردن آرام میله بررسی کرد. در صورتی که طول کشیده شدن از ۲ سانتی‌متر تجاوز کند، ویسکوزیته نمونه به‌عنوان غیر طبیعی ثبت می‌شود. روش‌های کاهش ویسکوزیته در مواردی که نمونه به‌سختی به ظرف چسبیده‌است و وارد پیپت نمی‌شود، مشابه تأخیر در مایع شدن هستند (۳) ص ۱۴ بخش ۲، ۳، ۲، پاراگراف ۴-۱.

۴- حجم نمونه:

حجم مایع منی حداقل ۱،۵ میلی‌لیتر است که از طریق یک پیپت مدرج با حساسیت ۰/۱ میلی‌لیتر اندازه‌گیری می‌شود. حجم مایع منی به‌طور عمده در اثر ترشحات غدد پروستات و سمینال وزیکول و مقدار کمی نیز از ترشحات غدد بولبو اورترال و اپیدیدیم است. اندازه‌گیری دقیق حجم ضروری است، زیرا تعداد کلی اسپرم و دیگر سلول‌ها در مایع منی بر مبنای آن محاسبه می‌شود. بهترین روش اندازه‌گیری نمونه در



ظرف، وزن کردن ظرف جمع آوری نمونه است. نمونه باید در ظرفی تمیز، یکبار مصرف و از قبل وزن شده جمع آوری شود و سپس، ظرف به همراه نمونه نیز وزن شود و وزن ظرف از آن کم شود.

حجم کم مایع منی ممکن است ناشی از انسداد اپیدیدیم یا مجاری انزالی، عدم تشکیل کانال دفران (CBAVD)، اختلال در عملکرد غدد پروستات یا وزیکول سمینال، انزال معکوس (Retrograde Ejaculation) و یا اشکال در نمونه‌گیری باشد.

حجم زیاد مایع منی ممکن است ناشی از التهاب فعال غدد ضمایم جنسی، طولانی بودن دوره پرهیز از مقاربت باشد (۳) ص ۱۵، بخش ۲، ۳، ۴، پاراگراف ۷-۱ و ص ۱۶، بخش ۱، ۲، ۳، ۴ و ص ۱۶، ۱-۳ comment.

۵- اسیدیته (pH):

pH مایع منی منعکس کننده تعادل میان pH ترشحات مختلف غدد ضمایم جنسی (ترشحات قلیایی وزیکول سمینال و ترشحات اسیدی پروستات) است. بهتر است pH پس از مایع شدن و ترجیحاً بعد از ۳۰ دقیقه اندازه‌گیری شود.

برای اندازه‌گیری pH، نمونه منی به خوبی مخلوط و یک قطره از آن به صورت صاف روی کاغذ pH کشیده می‌شود. تغییر رنگ در کمتر از ۳۰ ثانیه اتفاق می‌افتد. سپس با مقایسه رنگ حاصل با الگوی رنگ استاندارد، pH نمونه تعیین می‌گردد. در نمونه‌های با ویسکوزیته بالا می‌توان pH را با استفاده از یک pH meter که برای نمونه‌های ویسکوز طراحی شده اندازه گرفت. آستانه مورد توافق برای حداقل pH مایع منی ۷،۲ است. با طولانی شدن فاصله زمانی بین دریافت نمونه تا آنالیز، ممکن است افزایش pH ناشی از کاهش خاصیت بافری طبیعی اتفاق بیفتد.

کاهش pH مایع منی به کمتر از ۷ همراه با کاهش حجم مایع منی و غلظت اسپرم می‌تواند ناشی از انسداد اپیدیدیم و مجاری انزالی و عدم تشکیل کانال دفران (CBAVD)، اختلال در عملکرد وزیکول سمینال و وجود عفونت در مایع منی باشد (۳) ص ۱۷ و بخش ۲، ۳، ۵.

ارزیابی میکروسکوپی

ارزیابی میکروسکوپی شامل دو بخش اولیه و ثانویه است. در ارزیابی اولیه، برای بررسی مایع منی تازه و رنگ نشده استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست پیشنهاد می‌شود. میکروسکوپ نوری معمولی نیز می‌تواند در موارد بررسی بدون رنگ‌آمیزی مفید باشد. در مرحله نخست ارزیابی میکروسکوپی، ۱۰ میکرولیتر از مایع منی کاملاً مخلوط شده توسط پیپت روی یک لام تمیز شیشه‌ای قرار داده می‌شود و به وسیله یک لامل با ابعاد ۲۲×۲۲ میلی‌متر پوشانده و همزمان بررسی می‌شود. وزن لامل باعث پخش شدن نمونه روی لام برای مشاهده بهتر می‌شود. باید کاملاً مراقب عدم تشکیل حباب بین لام و لامل بود. تحرک اسپرم، وجود موکوس، وجود توده‌های اسپرمی غیر متحرک، آگلوتیناسیون، سلول‌های غیر از اسپرم (سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های گرد نظیر لوکوسیت و سلول‌های ژرمینال)، سر یا دم مجزا و غیر طبیعی اسپرم، احتمال وجود تریکوموناس واژینالیس و همچنین، تعیین رقت لازم برای شمارش اسپرم از مواردی است که در ارزیابی اولیه میکروسکوپی بررسی می‌شود.

- ارزیابی میکروسکوپی اولیه:

➤ **Aggregation:** چسبیدن اسپرم‌های غیر متحرک به یکدیگر یا به توده‌های موکوسی، سلول‌های غیر اسپرم یا بقایایی سلولی به-

عنوان چسبندگی غیر اختصاصی در نظر گرفته می‌شود.



➤ **Agglutination**: آگلوتیناسیون به طور خاص به اتصال اسپرم‌های متحرکی اشاره دارد که از سر به سر، دم به دم یا دیگر حالت‌ها به یکدیگر چسبیده‌اند. حرکت اغلب قوی است، اما در برخی موارد حرکت آن‌ها محدود است. به هر اسپرم متحرک که از ناحیه سر به اسپرم دیگری چسبیده‌است، باید توجه شود. وجود آگلوتیناسیون می‌تواند دلیلی برای بررسی‌های بیشتر ایمونولوژیک در ارزیابی ناباروری باشد. میزان بالای آگلوتیناسیون باعث خطا در ارزیابی تعداد و تحرک اسپرم می‌شود.

آگلوتیناسیون به چهار درجه تقسیم می‌شود:

- ۱- منفرد (Isolated): کمتر از ۱۰ اسپرم به هم چسبیده و وجود اسپرم‌های آزاد بسیار.
- ۲- متوسط (Moderate): ۱۰ تا ۵۰ اسپرم به هم چسبیده و دارای اسپرم آزاد.
- ۳- بزرگ (large): بیش از ۵۰ اسپرم به هم چسبیده و وجود چند اسپرم آزاد.
- ۴- بسیار بزرگ (Gross): اسپرم‌ها به هم چسبیده و اسپرم آزاد به ندرت مشاهده می‌شود (۳) ص ۱۹-۱۷، بخش ۲، ۴.

تحرک (Motility):

میزان تحرک اسپرم با میزان بارداری مرتبط است. بهتر است تحرک به محض مایع و یکنواخت شدن طی ۳۰ دقیقه اول و حداکثر در یک ساعت بررسی شود تا آثار زیان‌آور دهیدراتاسیون روی pH، اسمولاریته و اسکوزیته و همچنین، تغییر درجه حرارت روی تحرک به حداقل برسد. در هر تکرار ارزیابی تحرک اسپرم، باید حداقل ۲۰۰ اسپرم در ۵ میدان میکروسکوپی ارزیابی شود. تعداد تکرارها معمولاً بسته به حجم مایع منی بین ۲ تا ۳ بار تعریف می‌شود. برای دقت و صحت ارزیابی تحرک اسپرم و تفکیک درجات مختلف تحرک ترجیحاً باید از میکروسکوپ مجهز به لنز چشمی مدرج (Eyepiece reticle) و لنز شیئی و کندانسور فاز کنتراست استفاده شود. همچنین با توجه به حساسیت زیاد تحرک اسپرم به تغییرات، به ویژه کاهش دما، ترجیحاً باید از میکروسکوپ مجهز به صفحه گرم (Warm stage) استفاده شود و در طول ارزیابی مایع منی ظرف نمونه روی صفحه گرم مجاور میکروسکوپ قرار گیرد.

سیستمی ساده برای درجه بندی تحرک:

۱. تحرک رو به جلو ((Progressive Motility(PR)): اسپرم، صرف نظر از سرعت، به طور فعال و به صورت خطی یا دایره‌های بزرگ حرکت می‌کند.
۲. عدم تحرک رو به جلو ((Non Progressive Motility(NP)): دیگر انواع حرکت و یا فقدان حرکت؛ برای مثال، شنا در دایره-های کوچک یا مواردی که نیروی دم‌ها به سختی سر را جابه‌جا می‌کند و یا تنها ضربه‌های دم مشاهده می‌شود.
۳. عدم حرکت ((Immotility(IM))
۴. حداقل میزان تحرک کلی (PR+NP) ۴۰٪ و حداقل میزان اسپرم با حرکت رو به جلو (PR) ۳۲٪ در افراد بارور تعریف شده است (۳) ص ۲۱، بخش ۲، ۶.
۵. ارزیابی میکروسکوپی ثانویه (افتراقی):



در ارزیابی ثانویه، ضمن استفاده از روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی، مورفولوژی دقیق اسپرم و وجود دیگر سلول‌های در مایع منی به صورت افتراقی مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. برای رنگ‌آمیزی اسپرم ابتدا ۱۰ میکرولیتر از مایع منی، به وسیله سمپلر بر روی لام تمیزی قرار داده می‌شود و ضمن تماس قطره با لبه لام دیگری گسترش داده می‌شود. اسپرم پس از خشک شدن، تثبیت و رنگ‌آمیزی می‌شود تا جزئیات ظاهری اسپرم قابل ارزیابی باشد. معمولاً رنگ‌آمیزی اسپرم به روش‌های پاپانیکولاو، Shorr و یا روش سریع (Diff quick) انجام می‌شود که در زیر به آن اشاره می‌گردد:

روش رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو:

در این رنگ‌آمیزی ناحیه اکروزوم و ناحیه بعد از اکروزوم سر، بقایای سیتوپلاسمی، قطعه میانی و قطعه اصلی دم رنگ می‌گیرند. تکنیک تعدیل شده پاپانیکولاو برای آنالیز مورفولوژی اسپرم، بررسی سلول‌های ژرمینال و سلول‌های غیر اسپرمی استفاده می‌شود. لام‌های رنگ‌آمیزی شده به این روش در صورت نگهداری در تاریکی و مונته شدن به مدت طولانی و برای بررسی دوباره و یا استفاده در برنامه‌های کنترل کیفی داخلی به کار گرفته می‌شوند.

معرف‌ها:

- مؤلفه‌های تشکیل دهنده رنگ پاپانیکولاو که به صورت تجاری در دسترس هستند.
- اتانول اسیدی که از افزودن ۱ میلی‌لیتر از اسید هیدروکلریک غلیظ به ۲۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۷۰ درصد به دست می‌آید.
- زایلن (Xylene) و اتانول، ۱+۱(۲): ترکیب بخش‌های برابری از زایلن و اتانول ۱۰۰ درصد.

مراحل رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو:

- تهیه اسپرم یکنواخت به وسیله ۱۰ میکرولیتر مایع منی مخلوط شده روی یک لام تمیز و خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه
- تثبیت اسپرم با غوطه‌ور کردن در اتانول ۹۵ درصد برای حداقل ۱۵ دقیقه
- رنگ‌آمیزی اسپرم تثبیت شده با غوطه‌ور کردن لام‌ها در محلول‌های زیر:



ردیف	فرایند کار	مدت زمان
۱	اتانول ۸۰ درصد	۳۰ ثانیه
۲	اتانول ۵۰ درصد	۳۰ ثانیه
۳	آب مقطر	۳۰ ثانیه
۴	رنگ هریس همتوکسیلین (Harris's Haematoxylin)	۴ دقیقه
۵	آب مقطر	۳۰ ثانیه
۶	اتانول اسیدی	۴ تا ۸ مرتبه غوطه ور نمودن هر بار به مدت یک ثانیه
۷	شست و شو با جریان آب سرد	۵ دقیقه
۸	اتانول ۵۰ درصد	۳۰ ثانیه
۹	اتانول ۸۰ درصد	۳۰ ثانیه
۱۰	اتانول ۹۵ درصد	حداقل ۱۵ دقیقه
۱۱	رنگ نارنجی G-6 (Orange G-6)	۱ دقیقه
۱۲	اتانول ۹۵ درصد	۳۰ ثانیه
۱۳	اتانول ۹۵ درصد	۳۰ ثانیه
۱۴	اتانول ۹۵ درصد	۳۰ ثانیه
۱۵	رنگ سبز EA-50 (EA-50 green)	۱ دقیقه
۱۶	اتانول ۹۵ درصد	۳۰ ثانیه
۱۷	اتانول ۹۵ درصد	۳۰ ثانیه
۱۸	اتانول ۱۰۰ درصد	۱۵ ثانیه
۱۹	اتانول ۱۰۰ درصد	۱۵ ثانیه

از آنجا که تثبیت با اتانول باعث دهیدراته شدن سلول‌ها می‌شود، اسمیرهایی که از مرحله تثبیت در اتانول ۹۵ درصد به‌طور مستقیم به مرحله رنگ‌آمیزی می‌روند، ممکن است نیاز باشد تنها ۱۰ ثانیه در اتانول ۸۰ درصد قرار گیرند. ولی اسمیرهای که بعد از تثبیت در معرض هوا خشک شده‌اند، باید به مدت طولانی تری (۲ تا ۳ دقیقه) در اتانول ۵۰ درصد قرار گیرند.



روش Shorr:

معرف‌ها:

۱- هریس هماتوکسیلین (Harris's Haematoxylin)

۲- محلول Shorr: این محلول به صورت تجاری در دسترس است و یا به روش زیر تهیه می‌شود.

۴ گرم پودر Shorr در ۲۲۰ میلی‌لیتر اتانول گرم ۵۰ درصد حل کرده و اجازه می‌دهیم سرد شود. سپس ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال (زیر هود شیمیایی) به آن افزوده و فیلتر می‌شود.

۳- اتانول اسیدی: اضافه کردن ۲۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به ۷۵ میلی‌لیتر از اتانول ۹۵ درصد

۴- اتانول آمونیاکی: اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر از هیدروکسید آمونیوم ۲۵ درصد به ۹۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد.

برای رنگ‌آمیزی به روش Shorr، اسمیری یکنواخت، به‌وسیله ۱۰ میکرولیتر مایع منی مخلوط شده روی یک لام تمیز در تهیه و در دمای آزمایشگاه خشک می‌شود. برای تثبیت اسمیر در اتانول ۹۵ درصد برای حداقل ۱۵ دقیقه غوطه‌ور می‌گردد. رنگ‌آمیزی اسمیر تثبیت شده با غوطه‌ور نمودن لام‌ها در محلول‌های زیر انجام می‌شود:

ردیف	مراحل انجام فرایند	مدت زمان
۱	شست‌وشوی با جریان آب	۱۲ تا ۱۵ مرتبه غوطه‌ور کردن هر بار به مدت ۱ دقیقه
۲	رنگ هریس هماتوکسیلین (Harris's Haematoxylin)	۱-۲ دقیقه
۳	شست‌وشوی با جریان آب	۱۲ تا ۱۵ مرتبه غوطه‌ور کردن هر بار به مدت ۱ دقیقه
۴	اتانول آمونیاکی	۱۰ مرتبه غوطه‌ور نمودن هر بار به مدت ۱ دقیقه
۵	شست‌وشوی با جریان آب	۱۲ تا ۱۵ مرتبه غوطه‌ور کردن هر بار به مدت ۱ دقیقه
۶	اتانول ۵۰ درصد	۵ دقیقه
۷	رنگ Shorr	۳-۵ دقیقه
۸	اتانول ۵۰ درصد	۵ دقیقه
۹	اتانول ۷۵ درصد	۵ دقیقه
۱۰	اتانول ۹۵ درصد	۵ دقیقه



در این روش اسمیر مایع منی در معرض هوا خشک و به مدت یک ساعت در اتانول اسیدی یا اتانول ۷۵٪، تثبیت و رنگ می‌شود. لام‌های رنگ‌آمیزی شده به این روش در صورت نگهداری در تاریکی و مونته شدن به مدت طولانی و برای بررسی دوباره و یا استفاده در برنامه‌های کنترل کیفی داخلی به کار گرفته می‌شوند. درصد اشکال طبیعی اسپرم در روش رنگ‌آمیزی shorr مشابه پاپانیکولاو است. روش سریع (Diff quick):

این روش تنها زمانی استفاده می‌شود که ارایه گزارش سریع آنالیز مورفولوژی طی همان روز با درخواست پزشک معالج الزامی است. اگرچه برای ثبت نتایج دقیق‌تر یکی از روش‌های گفته شده دوباره انجام و گزارش می‌شود. در این روش، ابتدا اسمیری از مایع منی تهیه می‌شود. پس از خشک شدن کامل، لام به شیوه زیر رنگ‌آمیزی می‌شود. ابتدا لام در محلول رنگ‌آمیزی سریع شماره یک، به مدت ۱۰ ثانیه و سپس در محلول رنگ‌آمیزی شماره دو، به مدت ۵ ثانیه قرار داده می‌شود، سپس رنگ اضافی با ۱۰ تا ۱۵ بار شست‌وشو با آب مقطر خارج و بررسی می‌شود.

- کیت رنگ‌آمیزی سریع (Diffquick) حاوی:
- تثبیت کننده (رنگ Triarylmethane حل شده در متانول)
- محلول رنگ‌آمیزی ۱ (Eosinophilic Xanthenes)
- محلول رنگ‌آمیزی ۲ (Basophilic Thiazine)

مراحل رنگ‌آمیزی:

- ۱- اسمیرهای تثبیت شده به مدت ۱۵ ثانیه در فیکساتیو Triarylmethane یا تنها در متانول ۹۵ درصد به مدت ۱ ساعت غوطه‌ور می‌شود، سپس محلول اضافی با قرار دادن لام به صورت عمودی روی کاغذ صافی خشک می‌شود.
- ۲- غوطه‌ور کردن اسمیر در محلول رنگ‌آمیزی سریع شماره ۱، به مدت ۱۰ ثانیه
- ۳- غوطه‌ور کردن اسمیر در محلول رنگ‌آمیزی سریع شماره ۲، به مدت ۵ ثانیه
- ۴- شست‌وشو با جریان آب به میزان ۱۰ تا ۱۵ بار تا رنگ اضافی شسته شود.

محلول اضافی در هر مرحله با قرار دادن عمودی لام روی کاغذ صافی خارج می‌شود. لام‌ها را می‌توان به صورت مونته شده و غیر مونته مشاهده کرد.

- در لنزهای زمینه روشن در تمام این سه نوع رنگ‌آمیزی سر اسپرم به صورت آبی کم‌رنگ در ناحیه اکروزوم و آبی تیره در ناحیه بعد از اکروزوم (هسته) رنگ می‌گیرد. قسمت میانی ممکن است رنگ قرمز نشان دهد و دم نیز آبی یا قرمز خواهد بود. بقایای سیتوپلاسم در سر یا قسمت میانی در رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو با رنگ صورتی یا قرمز و در رنگ‌آمیزی Shorr با قرمز یا نارنجی مشخص می‌شود.



در ارزیابی افتراقی اسپرم موارد زیر مورد توجه قرار می‌گیرد:

اسپرم شامل سر، گردن و دم (قطعه میانی، بخش اصلی و بخش انتهایی) است. از آنجاکه دیدن قسمت انتهایی با میکروسکوپ نوری مشکل است، می‌توان سلول را شامل سر و گردن و دم (قطعه میانی و قطعه اصلی) در نظر گرفت. در صورتی اسپرم طبیعی تلقی می‌شود که هم سر و هم دم نرمال باشند. تمام اشکال بینابینی باید ناهنجار تلقی شوند. سر باید صاف بوده و شکل بیضی داشته باشد. محل قرارگیری آکروزوم نباید شامل هیچ واکوئل بزرگ و یا حاوی بیشتر از دو واکوئل کوچک (با اشغال بیش از ۲۰٪ سر اسپرم) باشد. منطقه بعد از آکروزوم نیز نباید هیچ واکوئلی داشته باشد.

قطعه میانی باریک و منظم و تقریباً هم‌طول با سر اسپرم است. محور بزرگ قطعه میانی با محور بزرگ سر اسپرم در یک راستا قرار دارد. سیتوپلاسم باقی‌مانده تنها در صورتی ناهنجار تلقی می‌شود که بیش از حد باشد. مثلاً وقتی از یک سوم اندازه سر اسپرم تجاوز کند. قطعه اصلی باید نسبت به طول آن گنجایش ثابتی داشته باشد، نازک‌تر از قطعه میانی باشد و تقریباً ۴۵ میکرومتر (تقریباً ۰ برابر طول سر) طول داشته باشد. قطعه اصلی ممکن است بدون هیچ زاویه تندی که حاکی از شکستگی دم باشد روی خودش و به سمت عقب پیچ‌خورده باشد.

مایع منی در انسان حاوی اسپرم‌هایی با انواع مختلف ناهنجاری‌ها است. اسپرمانوزن ناقص و بعضی از پاتولوژی‌های اپیدیدیم معمولاً با افزایش میزان اشکال غیر طبیعی اسپرم همراهند. نقایص مورفولوژیک معمولاً به صورت توأم دیده می‌شوند. اسپرم‌های ناهنجار، بسته به نوع آنومالی قدرت لقاح کمتری داشته و ممکن است DNA غیر طبیعی داشته باشند. نقایص مورفولوژیک با افزایش قطعه قطعه شدن DNA، افزایش شیوع اشکالات ساختمانی در کروموزوم، کروماتین نابالغ و آنپلوئیدی همراه است. سر اسپرم از اهمیت بیشتری برخوردار است، اگرچه دم (قطعه میانی و اصلی) برای تحرک و قدرت باروری طبیعی اسپرم مهم است.

نقایصی که در ارزیابی مورفولوژی مورد توجه قرار می‌گیرد:

- نقایص سر: سر بزرگ یا کوچک، باریک، گلابی شکل، گرد، بدشکل و نامنظم، واکوئل دار (وجود بیش از دو واکوئل یا واکوئل‌هایی که بیش از ۲۰٪ فضای سر اسپرم را اشغال کرده اند)، واکوئل در ناحیه بعد از آکروزوم، وجود دو سر و یا عدم وجود آکروزوم یا آکروزوم‌های خیلی کوچک و یا هرگونه ترکیبی از این موارد به عنوان موارد غیر طبیعی سر اسپرم در نظر گرفته می‌شوند. ذکر نوع و درصد هر یک از موارد غیر طبیعی سر اسپرم در تصمیم‌گیری برای روش درمانی فرد بسیار مهم است، به‌گونه‌ای که در مواردی نظیر اسپرم فاقد سر و یا دارای سر گرد میزان لقاح در حد صفر است.
- نقایص گردن و قطعه میانی: قرار گرفتن غیر قرینه قطعه میانی در سر، ضخیم شدن یا غیرقرینه بودن قطعه میانی، تاشدگی‌های شدید، باریک بودن آن و یا ترکیبی از این موارد.
- نقایص قطعه اصلی: کوتاه، چندتایی، شکسته، خم‌شدگی‌های سوزنی و باریک، تاشدگی‌های زاویه‌دار و تیز، عرض نامنظم، پیچ‌خوردگی یا ترکیبی از این موارد.



- بقایای سیتوپلاسمی: اسپرم غیر طبیعی با مقادیر زیادی سیتوپلاسم رنگ شده نامنظم (یک سوم یا بیشتر حجم سر اسپرم) مشخص می‌شود و اغلب با قطعه میانی غیرطبیعی نیز همراه است. این تجمع سیتوپلاسمی غیر طبیعی نباید قطره سیتوپلاسمیک خوانده شود. قطره سیتوپلاسمی (وزیکول‌های غشایی در قطعه میانی در تقاطع سر و گردن) از اجزای طبیعی در عملکرد فیزیولوژیک اسپرم هستند. ممکن است این قطره‌ها به وسیله میکروسکوپ فاز کنتراست در تمام طول قطعه میانی دیده شوند. در نمونه‌های تثبیت شده و رنگ شده طبیعی قطره‌های سیتوپلاسمی کمتر از یک سوم حجم سر اسپرم را تشکیل می‌دهند.

ارزیابی اسمیر مورفولوژی اسپرم:

ارزیابی باید در هر اسپرم قابل دسترسی در چندین نقطه از لام که به‌طور سیستماتیک انتخاب شده صورت بگیرد تا از خطا در ارزیابی مورفولوژی اسپرم با انتخاب اسپرم‌های خاص پرهیز شود. بررسی لام با استفاده از عدسی زمینه روشن با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ و روغن امرسیون صورت می‌گیرد. شمارش و ارزیابی باید در چندین میدان میکروسکوپی انجام شود و در هر میدان تمام اسپرم‌های قابل مشاهده مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. تعداد اسپرم‌های طبیعی و غیر طبیعی با کمک کانتر ازمایشگاه شمارش می‌شوند. ارزیابی مورفولوژی حداقل برای ۲۰۰ اسپرم انجام می‌شود. برای اطمینان از صحت و جلوگیری از خطای احتمالی ترجیحاً ارزیابی در لام دیگری یا به‌صورت آترناتیو در همان لام تکرار می‌شود. درصد مورفولوژی طبیعی در این دو ارزیابی جداگانه با هم مقایسه می‌شود و میانگین آن محاسبه و تفاوت‌ها بررسی می‌شود. تنها اسپرم سالم که دارای سر و دم است مورد ارزیابی قرار گرفته و سلول‌های ژرمنال (گرد) شمارش نمی‌شوند. در مواردی که اسپرم در حاشیه قرار دارد (به‌عنوان مثال سر اسپرم روی لبه میدان میکروسکوپی) مورد ارزیابی قرار نمی‌گیرد، زیرا نمی‌توان آنرا به‌طور کافی بررسی کرد. تعداد کل اسپرم‌های طبیعی از نظر مورفولوژیک اهمیت بیولوژیکی بالایی دارد و با ضرب کردن تعداد کل اسپرم‌های مایع منی در درصد اشکال طبیعی محاسبه می‌شود.

اشکال غیر طبیعی اسپرم ممکن است جنبه تشخیصی داشته و یا در تحقیقات اهمیت داشته باشند. در صورت تمایل ماهیت نقص گزارش شده و درصد اشکال غیر طبیعی سر (%H)، قطعه میانی (%M) یا قطعه اصلی (%P)، و سیتوپلاسم باقیمانده بیش از حد (%C) شمارش می‌شوند. بدین منظور می‌توان از کانترهای چند دکمه‌ای استفاده کرد که یکی از آنها به اشکال طبیعی و بقیه به هر یک از چهار شکل غیر طبیعی (H,M,P,C) اختصاص می‌یابد.

پس از ارزیابی ۴۰۰ اسپرم درصد اسپرم‌های طبیعی و غیر طبیعی به‌دست می‌آید که مجموع آنها ۱۰۰ درصد خواهد بود. ولی از آنجا که برخی اسپرم‌ها چند نوع ناهنجاری دارند، مجموع انواع نقایص مورفولوژی عدد ۱۰۰ نیست. برخی از اسپرم‌ها نقایص ساختمانی ویژه‌ای دارند. ممکن است آکروزوم تشکیل نشده باشد که در این حالت سر گرد یا کوچک بوده و گلوبوزواسپرمیا (Globozoospermia) خوانده می‌شود. از آنجا که دم‌های آزاد (Pin head) و یا سرهای آزاد به‌عنوان اسپرم شمارش نمی‌شوند، به‌عنوان نقایص اسپرم نیز محاسبه نمی‌شوند. مردانی که تمام اسپرم‌های آنها دارای این نقایص‌اند، معمولاً نابارورند. چنین مواردی نادر است، ولی شناسایی و گزارش صحیح آنها بسیار مهم است. بنابراین، وجود نقایص خاص اسپرم مثل سر آزاد اسپرم، دم آزاد و سر بدون آکروزوم در برای انتخاب بهترین روش درمانی باید گزارش شود.



- وجود سلول‌های غیر اسپرم:

وجود سلول‌های غیر از اسپرم در مایع منی نشانگر آسیب به سلول‌های بیضه (سلول‌های ژرمینال)، پاتولوژی مجاری وایران و یا التهاب غدد ضمایم جنسی (لکوسیت‌ها) است. تعداد سلول‌های غیر از اسپرم در مایع منی (سلول‌های اپی‌تلیال، سلول‌های گرد (سلول‌های ژرمینال و لکوسیت‌ها و سر یا دم منفرد اسپرم) را می‌توان مشابه اسپرم در لام هموسیئومتر شمارش کرد. برای تفکیک سلول‌های ژرمینال از لکوسیت‌ها و تعیین غلظت دقیق این سلول‌ها از تست پراکسیداز استفاده می‌شود.

- ارزیابی لوکوسیت در مایع منی:

لوکوسیت‌ها، به‌ویژه انواع پلی‌مورفونوکلر در بیشتر نمونه‌های مایع منی وجود دارند. گاهی در نمونه رنگ‌آمیزی شده مایع منی به روش پاپانیکولاو می‌توان آن‌ها را از اسپرماتید یا اسپرماتوسیت افتراق داد. افتراق بر اساس تفاوت در رنگ پذیری و اندازه و شکل هسته است. لوکوسیت‌های پلی‌مورفو نوکلر را می‌توان به‌آسانی از لحاظ مورفولوژیکی به‌وسیله رنگ آبی در رنگ‌آمیزی در مقایسه با رنگ صورتی اسپرماتیدهای چندهسته‌ای افتراق داد. اندازه هسته ممکن است به افتراق کمک کند. هسته منوسیت‌ها دارای تفاوت زیادی در اندازه هستند که از $7\mu\text{m}$ تا بیش از $15\mu\text{m}$ در ماکروفاژها متفاوت است. از آنجاکه گرانولوسیت‌های پراکسیداز مثبت شکل غالب لوکوسیت‌ها در مایع منی هستند، ارزیابی فعالیت پراکسیداز یک تکنیک غربالگری اولیه و مفید است. تعداد کلی سلول‌های پراکسیداز مثبت در مایع منی ممکن است انعکاس شدت یک وضعیت التهابی باشد. وجود تعداد زیاد لوکوسیت در مایع منی (لوکوسیتواسپرمیا، پیواسپرمیا) ممکن است با عفونت و کیفیت پایین اسپرم همراه باشد. همچنین، لوکوسیت‌ها را می‌توان با ارزیابی پرهزینه‌تر و وقت‌گیرتری، به‌نام ایمونوسیتوشیمی از لوکوسیت معمولی و سلول‌های ژرمینال افتراق داد.

رنگ‌آمیزی سلول‌های پراکسیداز مثبت با استفاده از ارتو تولوئیدین (Ortho-toluidine) انجام می‌شود. بدین منظور، نمونه مایع منی به خوبی مخلوط شده، $0/1$ میلی‌لیتر از آن با $0/9$ میلی‌لیتر از محلول از پیش آماده شده (9 ml o-toluidine substrate, add 1 ml of saturated NH_4Cl solution, 1 ml of 148 mmol/l Na_2EDTA , and 10 % of 30% (v/v) H_2O_2) مخلوط می‌شود.

سوسپانسیون حاصل، به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده و در درجه حرارت 20°C تا 30°C انکوبه می‌شود. قبل از برداشتن نمونه دوباره آن را مخلوط کرده و سپس با قرار دادن ۱۰ میکرولیتر از مخلوط فوق روی لام نئوبار و پوشاندن آن با لامل تعداد سلول‌های پراکسیداز مثبت در مربع های لام نئوبار (هموسیئومتر) ارزیابی می‌شود. در هر بار تکرار آزمایش ۲۰۰ سلول پراکسیداز مثبت شمارش می‌شود تا خطای نمونه‌گیری به حداقل برسد. سلول‌های پراکسیداز مثبت در رنگ آمیزی رنگ قهوه‌ای می‌گیرند، در حالی‌که سلول‌های پراکسیداز منفی بدون رنگ باقی می‌مانند. یک لام نئوبار در قسمت وسط دارای یک مربع بزرگ است که خود حاوی ۲۵ مربع کوچک می‌باشد. شمارش به‌صورت مربع به مربع انجام می‌شود و بسته به تعداد لوکوسیت‌های پراکسیداز مثبت از یک تا تمامی ۲۵ مربع کوچک شمارش می‌شود. بسته به تعداد مربع شمارش شده در ضریب تصحیح ضرب می‌شود. برای مثال، هرگاه تنها پنج مربع کوچک شمارش شود ضریب فوق عدد ۵ و برای ۱۰ مربع ضریب فوق ۲/۵ است. تعداد سلول‌های پراکسیداز مثبت و مربع‌ها به کمک کانتور آزمایشگاه شمارش و ثبت می‌شود. تفاوت در شمارش نمونه در ۹۵ درصد موارد به‌دلیل خطای نمونه‌گیری است. اگر تفاوت شمارش در هر بار تکرار آزمایش زیاد باشد دو رقت جدید آماده شده و شمارش تکرار می‌شود. برای محاسبه غلظت سلول‌های پراکسیداز مثبت تعداد آنها بر حجم تعداد مربع های مورد بررسی (حجم یک مربع ۱۰۰ نانولیتراست) تقسیم و در فاکتور رقت ضرب می‌شود. از این روش می‌توان برای محاسبه سلول‌های گرد (پراکسیداز منفی) نیز استفاده



کرد. فقدان سلول‌های پراکسیداز مثبت به معنی عدم وجود آن در مابقی نمونه نیست. در حال حاضر هیچ منبعی در مورد دامنه نرمال سلول‌های پراکسیداز مثبت در مایع منی مردان بارور وجود ندارد، ولی $10^6 \times 1$ در هر میلی‌لیتر از مایع منی به‌عنوان یک حد آستانه پذیرفته شده‌است. برای محاسبه تعداد لوکوسیت‌های پراکسیداز مثبت از مثال زیر می‌توان استفاده کرد: چنانچه در ۵ مربع کوچک تعداد ۱۰ عدد لوکوسیت پراکسیداز مثبت مشاهده شود، تعداد لوکوسیت پراکسیداز مثبت در ۱ میلی‌لیتر مایع منی به‌صورت زیر محاسبه می‌شود (مایع منی به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شده است).

$$5 \times (\text{ضریب تصحیح}) \times 5 \text{ (تعداد مربع های شمارش شده)} \times 10^4 \text{ (ضریب تصحیح حجم لام نئوبار)} \times 20 \text{ (ضریب رقت)} = 2 \times 10^6$$

(تعداد لوکوسیت‌های پراکسیداز مثبت در یک میلی‌لیتر مایع منی)

- ارزیابی سلول‌های ژرمینال در مایع منی:

سلول‌های ژرمینال شامل اسپرماتیدهای گرد و اسپرماتوسیت هستند و به‌ندرت اسپرماتوگونی در اسمیرهای رنگ‌آمیزی شده مشاهده می‌شود. در صورت دژنره شدن این سلول‌ها، افتراق آنها از سلول‌های التهابی دشوار است. در اسمیرهای رنگ‌آمیزی شده به روش پاپانیکولاو می‌توان اسپرماتیدها و اسپرماتوسیت‌ها را از لوکوسیت‌ها افتراق داد. افتراق بر اساس رنگ‌آمیزی، اندازه هسته، شکل، فقدان پراکسیداز داخل سلولی و فقدان آنتی ژن‌های ویژه لوکوسیت صورت می‌گیرد. اسپرماتیدهای چند هسته‌ای به آسانی با لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلتر اشتباه می‌شوند، رنگ صورتی اسپرماتیدها را از لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلتر متمایل به آبی متمایز می‌کند. اسپرماتیدهای گرد ممکن است با رنگ‌آمیزی اختصاصی برای آکروزوم، لکتین یا آنتی بادیهای اختصاصی مشخص شوند. اندازه هسته به افتراق آنها از یکدیگر کمک می‌کند. اسپرماتوگونی‌ها که به‌ندرت در منی مشاهده می‌شوند، هسته‌ای به قطر $8 \mu\text{m}$ ، اسپرماتوسیت‌ها، هسته‌ای به قطر $10 \mu\text{m}$ و اسپرماتیدها، هسته‌ای به قطر $5 \mu\text{m}$ دارند. این اندازه‌ها به تشخیص کمک می‌کنند، ولی دژنره شدن و یا تقسیم سلولی ممکن است اندازه هسته را تحت تأثیر قرار دهند.

- زنده بودن اسپرم (Vitality):

به‌طور کلی درصد اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های متحرک بیشتر است. حداقل میزان زنده بودن اسپرم (سالم بودن غشای اسپرم) ۵۸ درصد است که با ضرب کردن تعداد کلی اسپرم در درصد اسپرم‌های متحرک به‌دست می‌آید. اگرچه نتایج بررسی زنده بودن اسپرم باید در همراهی با نتایج میزان تحرک در همان نمونه ارزیابی شود. زنده بودن اسپرم با میزان پایداری غشای سلول، به‌ویژه در تمام نمونه‌هایی که میزان اسپرم دارای حرکت رو به جلو (PR) کمتر از ۴۰ درصد است، دارای اهمیت است. درصد اسپرم‌های زنده با شناسایی اسپرم‌هایی که غشا سالم دارند از طریق عدم نفوذ رنگ حیاتی به داخل اسپرم و یا شوک هایپوتونیک مشخص می‌شود. زنده بودن اسپرم بلافاصله پس از مایع شدن و ترجیحاً طی ۳۰ دقیقه اول و در نهایت طی یک ساعت بررسی می‌شود تا آثار زیان‌آور دهیدراتاسیون یا تغییر درجه حرارت روی میزان زنده بودن اسپرم‌ها به حداقل برسد.

در روش بررسی با رنگ‌های حیاتی ۵ میکرولیتر از مایع منی همگن با ۵ میکرولیتر از رنگ حیاتی (ائوزین-نگروزین، ائوزین، متیلن بلو، ...) روی یک لام مخلوط و با قرار دادن لامل 22×22 میلی‌متر پوشانده شده و پس از ۳۰ ثانیه تعداد ۲۰۰ اسپرم از نظر نفوذ رنگ به داخل اسپرم توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. اسپرمی که رنگ به داخل آن نفوذ کرده‌اسپرم مرده تلقی می‌شود. برای دقت و صحت نتایج بهتر است برای هر نمونه ارزیابی فوق دو بار تکرار شود.



در روش شوک هایپوتونیک (HOS test)^۱ که به عنوان روش جایگزین رنگ‌های حیاتی در ارزیابی اسپرم، به ویژه در انتخاب اسپرم زنده برای تزریق داخل سیتوپلاسم تخمک (ICSI) استفاده می‌شود، اسپرم به مدت ۵ دقیقه در محیط هایپواسموتیک (حدود ۱۵۰ mosl/kg) قرار گرفته و با توجه به نفوذ آب به داخل اسپرم زنده باعث تغییرات یونی و فعالیت کانال‌های سطح اسپرم گردیده که با پیچ خوردگی و جمع شدن دم اسپرم نمایان می‌گردد. اسپرم مرده هیچ‌گونه تغییراتی را نشان نمی‌دهد. در این روش نیز تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه و برای دو بار تکرار بررسی می‌شود (۳)ص ۲۶، بخش ۲، ۶.

- تعداد اسپرم (sperm concentration):

تعداد اسپرم در مایع منی به صورت غلظت اسپرم گزارش می‌شود. غلظت اسپرم به تعداد اسپرم به ازای واحد حجم مایع منی اشاره دارد، ولی تعداد کل اسپرم (Total sperm count) معرف تعداد کل اسپرم‌ها در کل نمونه انزال است که با ضرب کردن غلظت اسپرم در حجم مایع منی به دست می‌آید.

برای بررسی تعداد اسپرم، ۱۰ ماکرولیتر از مایع منی همگن را روی یک لام مورد بررسی قرار داده تا رقت و تعداد مربع‌های مورد نیاز لام نئوبار برای شمارش مشخص شود. این بررسی معمولاً روی لامی صورت می‌گیرد که برای ارزیابی تحرک اسپرم آماده شده است. در مرحله بعد مایع منی با محلول تثبیت کننده (محلول بی کربنات سدیم حاوی فرمالین) رقیق و روی لام نئوبار افزوده و طی ۱۰ الی ۱۵ دقیقه (حداقل دو بار تکرار) شمارش می‌شود و در صورتی که شمارش این دو مشابه باشد، نتایج ثبت می‌گردد. در غیر این صورت، رقت‌های جدیدی تهیه و غلظت اسپرم پس از شمارش در هر میلی‌لیتر و سپس در کل نمونه محاسبه می‌شود.

تنها اسپرم کامل (با سر و دم) شمارش می‌شود. شمارش اسپرم در هر خانه بستگی به موقعیت سر دارد. در صورتیکه سر در خانه‌ای مشاهده شود و بیشتر قسمت سر روی دو خط داخلی حاشیه آن خانه قرار گرفته باشد، شمارش خواهد شد. برای پرهیز از شمارش مجدد اسپرم در خانه مجاور، در مواردی که بیشتر سر اسپرم روی خط وسط قرار گرفته است، تنها در صورتی اسپرم شمارش می‌شود که این خط سمت پایین یا چپ آن خانه باشد و در مواردی که روی خط بالا و راست قرار گرفته باشد شمارش نخواهد شد. لام نئوبار و لامل آن پس از استفاده تمیز و خشک می‌شود. زیرا بقایای خشک شده نمونه قبلی می‌تواند مانع افزودن نمونه جدید شوند.

روش شمارش اسپرم‌ها در مربع‌های لام نئوبار:

شبكة وسط لام هموسیتومتر دارای ۲۵ مربع بزرگ است که هر کدام از آنها دارای ۱۶ مربع کوچکند. در صورتی که تعداد اسپرم‌ها در هر مربع بزرگ کمتر از ۱۰ عدد باشد، باید اسپرم‌های کل شبکه شمارش شود. اگر بین ۱۰ تا ۴۰ اسپرم در هر مربع بزرگ وجود داشته باشد، باید ۱۰ مربع بزرگ ارزیابی شود. در نمونه‌هایی که بیش از ۴۰ اسپرم در هر مربع بزرگ مشاهده می‌شود، اسپرم‌های ۵ مربع شمارش می‌شوند. به عنوان مثال در لوله آزمایش ۹۰۰ میکرولیتر محلول تثبیت کننده می‌ریزند و به آن ۱۰ میکرولیتر مایع منی اضافه می‌کنند. مخلوط حاصل را ورتکس کرده تا خوب مخلوط شود. ۱۰ میکرولیتر از مخلوط حاصله روی لام نئوبار قرار گرفته و سپس با عدسی ۴۰ تعداد اسپرم‌ها شمارش می‌شود. تعداد اسپرم‌ها در ۴ خانه اصلی شمارش شده با هم جمع و بر ۴ تقسیم می‌شود و در ۱۰^۶ ضرب می‌شود تا تعداد اسپرم‌ها در میلی‌لیتر به دست آید.

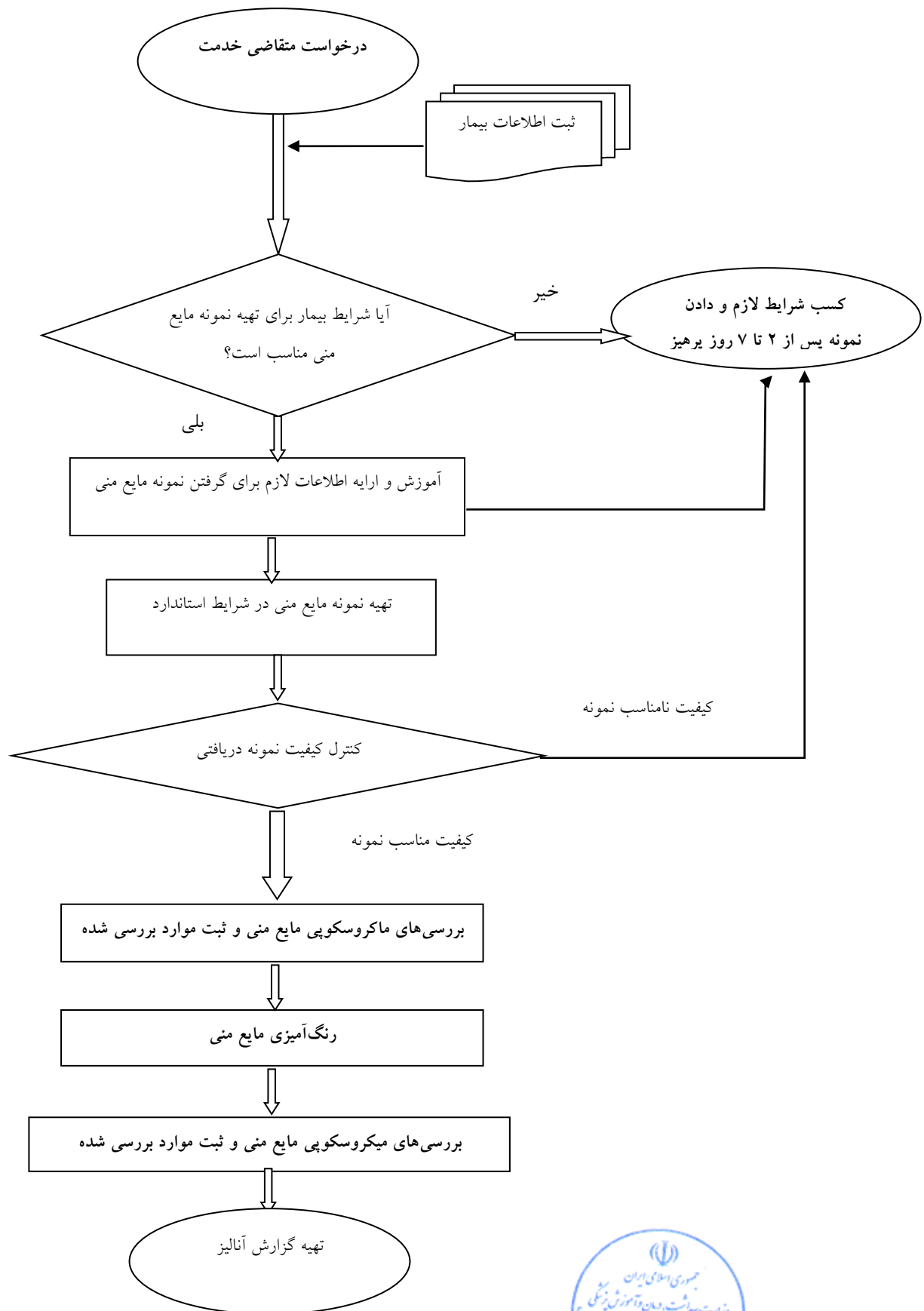
1 - Hypo- Osmotic swelling test



در صورت عدم مشاهده اسپرم در آنالیز اولیه مایع منی، نمونه سانتریفیوژ شده و رسوب آن دوباره در حجم ۱۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از مایع تثبیت کننده مخلوط و دوباره بررسی می‌شود. فقدان اسپرم در رسوب، تشخیص آزواسپرمی را قطعی می‌کند. در اغلب موارد به دلیل وجود تفاوت در نتایج یک فرد و به منظور افزایش دقت و صحت، معمولاً حداقل دو نمونه مایع منی با فاصله حداقل دو هفته و حداکثر ۳ ماه بررسی می‌شود (۳) ص ۳۲، بخش ۲,۷.



ج) طراحی گام به گام فلوجارت فرایند کار برای ارائه خدمت:



فرد/افراد صاحب صلاحیت برای تجویز (Order) خدمت مربوط:

- جنین شناس بالینی
- پزشک عمومی
- پزشکان متخصص
- ماما

ه) ویژگی‌های ارایه‌کننده اصلی صاحب صلاحیت برای ارایه خدمت مربوط:

جنین شناس بالینی (۴) ص ۴۵، ستون ۲، شماره ۴:

دارندگان گواهی‌نامه PhD در یکی از رشته‌های علوم پایه پزشکی، شامل بیوشیمی بالینی، ایمونولوژی بالینی، علوم تشریح، بیولوژی تولید مثل، پزشکی مولکولی و یا مدرک جنین‌شناسی بالینی از یکی از مراکز درمان ناباروری داخلی مورد تأیید معاونت آموزشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی یا دارندگان مدارک مشابه خارج از کشور، پس از ارزشیابی و تأیید وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی می‌توانند مسئول آزمایشگاه کمک باروری باشند و در شناسنامه‌های خدمات ناباروری عنوان جنین شناس بالینی به آنها اطلاق گردیده است.

و) عنوان و سطح تخصص‌های مورد نیاز (استاندارد) برای دیگر اعضای گروه ارایه‌کننده خدمت:

ردیف	عنوان تخصص	تعداد مورد نیاز به طور استاندارد به ازای ارایه هر خدمت	فرمول محاسباتی تعداد نیروی انسانی مورد نیاز	میزان تحصیلات مورد نیاز	سابقه کار و یا دوره آموزشی مصوب در صورت لزوم	نقش در فرایند ارایه خدمت
۱	کارشناس یا کارشناس ارشد علوم آزمایشگاهی / بیولوژی یا یکی از رشته‌های علوم پایه پزشکی مرتبط	یک نفر	به‌ازای هر ۵ فرایند در یک شیفت کاری یک نفر	کارشناس یا کارشناس ارشد	داشتن سابقه و تأییدیه مبنی بر ۶ ماه فعالیت تحت نظارت و ۶ ماه فعالیت مستقل در یک آزمایشگاه آندروالوژی	بررسی درخواست انجام خدمت توسط فرد صاحب صلاحیت، ثبت اطلاعات بیمار، اطمینان از شرایط مناسب بیمار برای تهیه نمونه مایع منی، آموزش و ارایه اطلاعات لازم برای گرفتن نمونه مایع منی (قبل از خدمت)، کنترل نمونه دریافتی از لحاظ رعایت استانداردها برای انجام آنالیز، بررسی ماکروسکوپی مایع منی، بررسی میکروسکوپی مایع منی و رنگ آمیزی نمونه برای بررسی مورفولوژی (حین خدمت). ثبت مستندات و کنترل کیفی (پس از خدمت)
۲	پذیرش	یک نفر	-	-	-	تشکیل پرونده، ثبت و مستند سازی درخواست بیمار و تحویل فرم رضایت نامه به بیمار و بازپس پس گیری فرم تکمیل شده، پیگیری مسائل اداری- مالی،
۳	خدمات	یک نفر	-	-	-	جابه‌جایی وسایل در بین بخش‌ها، شست‌وشو، ضد عفونی کردن سطوح، ابزار و وسایل، ..



ز) استانداردهای فضای فیزیکی برای ارایه خدمت:

- اتاق پذیرش ۶ متر مربع

- اتاق نمونه‌گیری دارای تخت، سرویس بهداشتی شامل حمام و توالت حداقل ۱۲ متر مربع

- اتاقی با ویژگی‌های آزمایشگاه آندرولوژی، به وسعت ۳۰ - ۲۰ متر مربع (۴) ص ۵۷، ستون ۱، شماره III

ح) تجهیزات پزشکی سرمایه‌ای (و یا اقلام اداری) استاندارد اداری و به ازای هر خدمت: (۴) ص ۲۲۷، بخش

ردیف	عنوان تجهیزات	انواع مارک‌های واجد شرایط	شناسه فنی	کاربرد در فرایند ارایه خدمت	متوسط عمر مفید تجهیزات	تعداد خدمات قابل ارایه در واحد زمان	متوسط زمان کاربری به ازای هر خدمت	امکان استفاده همزمان برای ارایه خدمات مشابه و یا دیگر خدمات
۱	میکروسکوپ	Olympus Nikon Zeiss Leica یا موارد مشابه	نوری - ترجیحا مجهز به سیستم فازکنتراست و صفحه گرم	مشاهده پارامترهای میکروسکوپی مایع منی	۱۰ سال	۲ تا ۳ خدمت در ساعت	۳۰ - ۲۰ دقیقه	وجود ندارد
۲	یخچال فریزر	زیمنس Bosch یا موارد مشابه	-	نگهداری مواد و محلول‌های آزمایشگاهی	۱۰ سال	-	-	بله
۳	هود	زال فرپژوه یا موارد مشابه	شیمیایی	رنگ آمیزی و تثبیت کردن لام	۱۰ سال	۳ خدمت در ساعت	۲۰ دقیقه	بله
۴	هود	زال فرپژوه یا موارد مشابه	کلاس ۱ یا ۲	جلوگیری از آلودگی‌های محیطی و ایجاد محیطی ایمن برای کار	حداکثر ۵ سال (فیلتر باید حداکثر ظرف مدت ۱ سال تعویض شود)	۲ خدمت در ساعت	۳۰ دقیقه	خیر
۵	انکوباتور CO2	New Brunswick Leek Memmert یا موارد مشابه	-	تامین دمای °C ۳۷ و شرایط بهینه برای حیات جنین	۵ سال	تعداد زیاد، بسته به حجم انکوباتور متغیر است	متغیر	بلی
۶	Warm stage	K system Tokaihit Kitazato اختریان یا موارد مشابه	-	حفظ دمای °C 37	حداکثر ۵ سال	۳ خدمت در ساعت	۲۰ دقیقه	خیر



ردیف	عنوان تجهیزات	انواع مارک های واجد شرایط	شناسه فنی	کاربرد در فرایند ارایه خدمت	متوسط عمر مفید تجهیزات	تعداد خدمات قابل ارایه در واحد زمان	متوسط زمان کاربری به ازای هر خدمت	امکان استفاده همزمان برای ارایه خدمات مشابه و یا دیگر خدمات
۷	سانتریفیوژ	بهداد اپندورف یا موارد مشابه	-	تهیه رسوب نمونه	۵ سال	متغیر، بسته به روتور	۵ دقیقه	بلی
۸	کامپیوتر	Samsung LG ACER HP یا موارد مشابه	-	کنترل اطلاعات زوجین و ذخیره اطلاعات آنالیز مایع منی	۳ سال	۴ خدمت در ساعت	۱۵ دقیقه	خیر
۹	shaker	اختریان یا موارد مشابه	-	مخلوط و یکنواخت کردن مایع منی	۵ سال	۶ خدمت در ساعت	۵ تا ۱۰ دقیقه	وجود ندارد
۱۰	ورتکس vortex	Yellow line یا موارد مشابه	-	ساختن رقت های مختلف مایع منی	۵ سال	۶ خدمت در ساعت	۵ تا ۱۰ دقیقه	وجود ندارد
۱۱	تایمر	Citizen یا موارد مشابه	دیجیتال	اندازه گیری زمان قرار گرفتن نمونه در مراحل مختلف	متغیر	۴ خدمت در ساعت	۱۵ تا ۲۰ دقیقه	خیر
۱۲	ترازو	sartorius	دیجیتال یا حساسیت ۰/۰۰۱ گرم	وزن کردن مواد لازم	۵ سال	۱۲ خدمت در ساعت	۵ دقیقه	خیر
۱۳	کانتر ۶ یا ۹ خانه	-	-	شمارش اسپرم	۳ سال	۲ تا ۳ خدمت در ساعت	۲۰ - ۳۰ دقیقه	خیر
۱۴	لام هموسیتمتر	توما - نئوبار	-	شمارش اسپرم	۱ سال (تاوقتی که نشکند)	۵ خدمت در ساعت	۱۵ دقیقه	خیر
۱۵	سمپلر متغیر	Eppendorf Biohit Socorex یا موارد مشابه	۱۰ تا ۱۰۰ میکرو لیتری	اندازه گیری حجم کم محیط ها	۱ سال/ هر سال یکبار باید کالیبره شود	۶ خدمت در ساعت	۱۰ دقیقه	خیر
۱۶	کپسول CO2 به همراه تجهیزات، مثل مانومتر و رگلاتور	آلمانی - ژاپنی چینی مارک مانومتر - هریس (آمریکا) Zinster یا موارد مشابه	Grade I یا II ۴۰ لیتری	CO2 منبع گاز در انکوباتور	نامحدود تا زمانی که بدنه آن آسیب نبیند.	۵ خدمت در روز	متغیر، تا زمانی که نمونه داخل انکوباتور باشد هر ۱۸ CO2 کپسول روز یکبار، به ازای هر انکوباتور شارژ می شود).	به همراه CO2 کپسول تجهیزات، مثل مانومتر و رگلاتور



ط) داروها، مواد و لوازم مصرفی پزشکی (استاندارد) برای ارایه هر خدمت:

ردیف	اقلام مصرفی مورد نیاز	میزان مصرف (تعداد یا نسبت)	مدل / مارک‌های دارای شرایط (تولید داخل و خارج)
۱	دستکش لاتکس	۲ جفت	Home care
۲	لام و لامل	۴ عدد	Microscope slide
۳	کاغذ pH	۱ نوار	اراک شیمی یا موارد مشابه
۴	پیپت مدرج استریل	۱ عدد	Isolab, Volac یا موارد مشابه
۵	پیپت پاستور	۵ عدد	Volac, Isolab یا موارد مشابه
۶	ظرف نمونه‌گیری دهانه گشاد - یکبار مصرف و استریل	۱ عدد	Falcon - TPP یا موارد مشابه
۷	قلم الماس	۱ عدد	-
۸	Labeling device ماژیک دائمی	۱ عدد	Staedtler یا موارد مشابه
۹	محیط کشت	۵ میلی لیتر	Ham's F10 یا موارد مشابه
۱۰	دستمال کاغذی	۱ جعبه	تمام شرکت‌های ایرانی
۱۱	گاز استریل	۱ عدد	کاره یا موارد مشابه
۱۲	سرسمپلر	۱۰ عدد	eppendorf
۱۳	الکل	-	بیدستان یا موارد مشابه
۱۴	دستکش نایلونی	۱ عدد	مهدی یا موارد مشابه
۱۵	کیت رنگ‌آمیزی پاپانیکولا	۱ عدد	شیمی پژوهش آسیا یا موارد مشابه
۱۶	کیت رنگ‌آمیزی Diffquik	۱ عدد	-
۱۷	کیت رنگ‌آمیزی Shorr	۱ عدد	-
۱۸	پنبه	-	کاره یا موارد مشابه
۱۹	گاز CO2	۲ لیتر	روهام گاز یا موارد مشابه

ی) عنوان خدمات درمانی و تشخیصی طبی و تصویری (استاندارد) برای ارایه هر واحد خدمت:

ردیف	عنوان خدمت پاراکلینیکی	تخصص صاحب صلاحیت برای تجویز	شناسه فنی خدمات	تعداد مورد نیاز	قبل، حین و یا بعد از ارایه خدمت (با ذکر بستری و یا سرپایی بودن)
۱	-	-	-	-	-



ک) ویزیت یا مشاوره‌های لازم (ترجیحاً استاندارد) برای هر واحد خدمت (سرپایی و بستری):

ردیف	نوع ویزیت/ مشاوره تخصصی مورد نیاز	تعداد	سرپایی / بستری
۱	ارولوژی	۱ بار	سرپایی
۲	جنین‌شناس بالینی	۱ بار در صورت لزوم	سرپایی

ل) اندیکاسیون‌های دقیق برای تجویز خدمت (ذکر جزئیات مربوط به ضوابط پاراکلینیکی و بالینی مبتنی بر شواهد و نیز تعداد مواردی که ارایه این خدمت در یک بیمار، اندیکاسیون دارد):

آنالیز مایع منی شایع‌ترین و پایه‌ای‌ترین تست برای پیش‌بینی وضعیت قدرت باروری مردان است. موارد اندیکاسیون آن شامل وضعیت‌های زیر است:

- بررسی توانایی باروری مردان
- تصمیم‌گیری و انتخاب نوع روش درمانی زوج‌های نابارور (Sperm freezing/thawing – Semen processing - IUI – IVF – ICSI - GIFT – ZIFT)
- ارزیابی تأثیر عوامل محیطی، داروها، مواد شیمیایی، سبک زندگی و فعالیت‌های شغلی بر سلامت جنسی مردان
- بررسی میزان موفقیت عمل وازکتومی
- ارزیابی پارامترهای مایع منی پس از جراحی واریکوسلکتومی
- بررسی پارامترهای مایع منی پس از عمل وازوواستومی
- بررسی اثر شیمی‌درمانی و پرتودرمانی بر قدرت باروری مردان مبتلا به سرطان (۱) ص ۲۵۵، table 7

م) دامنه نتایج (مثبت و منفی) مورد انتظار، در صورت رعایت اندیکاسیون‌های پیش‌گفته:

هر اندازه‌گیری دارای میزانی از خطا است که بزرگی آن با فاصله اطمینان بالا و یک حد پایین تر توضیح داده می‌شود. در یک اندازه‌گیری دقیق محدوده‌ی بالا و پایین به هم نزدیک‌اند و به‌اندازه واقعی نیز نزدیک هستند. دو نوع از خطا وجود دارد: تصادفی و سیستماتیک: خطاهای تصادفی، که از دقت، تفاوت شانس در خوانش یا نمونه‌گیری به‌وجود می‌آیند و می‌توان با اندازه‌گیری‌های مکرر توسط ناظر و تجهیزات آنها را ارزیابی کرد. خطاهای سیستماتیک (bias) خطرناک‌تر هستند، زیرا آنها از عواملی به‌وجود می‌آیند که نتیجه را تغییر می‌دهند و در نتیجه، تنها در یک برای به‌وجود می‌آیند، و با اندازه‌گیری‌های مکرر تشخیص داده نمی‌شوند. هدف از کنترل کیفیت در تجزیه و تحلیل روتین مایع منی نظارت بر میزان هر دو خطاهای تصادفی و سیستماتیک و کاهش آن تا حد ممکن است.

خطای نمونه‌گیری را می‌توان با بررسی تعداد بیشتری از اسپرم کاهش داد ولی باید بین دقت آماری، زمان واقعی مورد نیاز برای به‌دست آوردن نمونه و از دست دادن دقت در کار در اثر خستگی تکنسین تعادل برقرار کرد. فاصله اطمینان ۹۵٪ برای ارزیابی قابل قبول بودن تکرار



به این معنی است که در حدود ۵٪ از نمونه‌ها، تفاوت بیشتر از ۱,۹۶ × خطای استاندارد اتفاق می‌افتد که تنها در نتیجه شانس است و تکرار آن بی‌ارزش است (۳) ص ۱۷۹، قسمت ۲، ۷

ن) شواهد علمی درباره کنترل اندیکاسیون‌های دقیق خدمت:

- عدم توان ارائه نمونه
- لغو شدن سیکل درمان، به هر دلیل
- کم بودن حجم نمونه

س) مدت زمان استاندارد هر واحد خدمت به طور کلی (قبل، حین و بعد از ارائه خدمت) و نیز بر حسب مشارکت همه افراد دخیل در ارائه آن خدمت:

ردیف	عنوان تخصص	میزان تحصیلات	مدت زمان مشارکت در فرایند ارائه خدمت	نوع مشارکت در قبل، حین و بعد از ارائه خدمت
۱	کارشناس یا کارشناس ارشد علوم آزمایشگاهی / بیولوژی یا یکی از رشته های علوم پایه پزشکی مرتبط	کارشناس و کارشناس ارشد علوم آزمایشگاهی	۹۰ دقیقه	بررسی درخواست انجام خدمت توسط فرد صاحب صلاحیت: ۵ دقیقه، ثبت اطلاعات بیمار: اطمینان از شرایط مناسب بیمار برای تهیه نمونه مایع منی آموزش و ارائه اطلاعات لازم برای گرفتن نمونه مایع منی: ۱۰ دقیقه (قبل از خدمت)، کنترل نمونه دریافتی برای انجام آنالیز، بررسی میکروسکوپی مایع منی، بررسی میکروسکوپی مایع منی: ۵۰ دقیقه (حین خدمت). نظافت سطوح کاری آزمایشگاه قبل و بعد از انجام خدمت، ثبت مستندات: ۱۰ دقیقه و کنترل کیفی: ۱۵ دقیقه (پس از خدمت)
۲	جنین‌شناس بالینی	دکتری PhD	۶۰ دقیقه	مشاوره با بیمار در صورت نیاز: ۱۰ دقیقه، تشخیص مناسب بودن شرایط بیمار برای تهیه نمونه مایع منی: ۱۰ دقیقه (قبل از خدمت)، نظارت بر روند آنالیز: ۳۰ دقیقه (حین خدمت)، تأیید مستندات: ۵ دقیقه، کنترل کیفی: ۵ دقیقه (بعد از خدمت)
۲	پذیرش	فوق دیپلم	۱۰ دقیقه	تشکیل پرونده، ثبت و مستند سازی درخواست بیمار و تحویل فرم رضایت نامه به بیمار و بازپس‌گیری فرم تکمیل شده، پیگیری مسایل اداری- مالی، انتقال نمونه به انکوباتور
۳	خدمات	دیپلم	۱۵ دقیقه	جابه‌جایی وسایل بین بخش‌ها، شستشو و ضد عفونی و تعویض ملحفه اتاق نمونه‌گیری و آزمایشگاه

ع) مدت اقامت استاندارد در بخش‌های مختلف بستری برای ارائه هر بار خدمت مربوط و ذکر شواهد برای پذیرش و ترخیص

بیماران در هر یک از بخش‌های مربوط (مبتنی بر شواهد): این خدمت بستری ندارد.



ف) حقوق اختصاصی بیماران مرتبط با خدمت دریافتی (با تأکید بر عوارض جانبی مرتبط با خدمت دریافتی):

تکالیف متقاضی

- ۱- پیگیری درخواست آنالیز مایع منی و قبول بررسی‌های لازم
- ۲- ارائه درخواست کتبی برای عملیات برابر ضوابط
- ۳- حضور به‌هنگام در مرکز و پرداخت همه وجوه مربوط
- ۴- تکمیل و امضای اسناد قرارداد و اعلام رضایت از سوی متقاضی و تضمین اصالت نمونه مایع منی

حقوق متقاضی

- ۱- تشریح کامل خدمت و چگونگی آن و ارائه خدمت با کیفیت مناسب و عده داده شده از سوی افراد واجد صلاحیت
- ۲- اعلام این که آخرین دستاوردهای علمی قابل اعتماد و نیز قانون کشور، در هر زمان، بر مفاد اسناد و قرارداد راجع به خدمت حاضر حاکم است.

ص) چه خدمات جایگزینی (آلترناتیو) برای خدمت مورد بررسی، در کشورمان وجود دارد:

آنالیز مایع منی: بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی به صورت غیر افتراقی و بدون رنگ‌آمیزی (کد ۸۹۳۲۰)

ردیف	خدمات جایگزین	میزان دقت نسبت به خدمت مورد بررسی	میزان اثربخشی نسبت به خدمت مورد بررسی	میزان ایمنی نسبت به خدمت مورد بررسی	میزان هزینه - اثربخشی نسبت به خدمت مربوطه (در صورت امکان)	سهولت (راحتی) برای بیماران نسبت به خدمت مربوطه	میزان ارتقاء امید به زندگی و یا کیفیت زندگی نسبت به خدمت مورد بررسی
۱	آنالیز مایع منی: به صورت غیر افتراقی و بدون رنگ آمیزی	کمتر	کمتر	مشابه	کمتر	مشابه	در روش سریع چون نتایج رضایت بخش‌تر است، کیفیت زندگی بهتر است.

ق) مقایسه تحلیلی خدمت مورد بررسی نسبت به خدمات جایگزین (مبتنی بر شواهد):

در پایان، اولویت خدمت با توجه به دیگر جایگزین‌ها، چگونه است؟ (با ذکر مزایا و معایب مذکور از دیدگاه بیماران (End User) و

دیدگاه حاکمیتی نظام سلامت):

به دلیل دقت بالاتر ارجحیت با روش آنالیز مایع منی به صورت افتراقی و با رنگ‌آمیزی است.



1. **Andrade-Rocha FT. Semen analysis in laboratory practice: An overview of routine tests. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2003;17(6):247-58.**
2. **Magli MC, Van Den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van Der Elst J, Gianaroli L. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. Human Reproduction. 2008;23(6):1253-62.**
3. **WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. fifth edition ed. Switzerland: World Health Organization; 2010.**
4. **Revised guidelines for human embryology and andrology laboratories. Fertility and Sterility. 2008;90(5, Supplement 1):S45-S59.**



با تشکر از همکاری :

دکتر امیر احمد اخوان، حسن باقری، سعید معنوی، دکتر غلامحسین صالحی زلانی، دکتر سید موسی طباطبایی، دکتر علی شهرامی،
مینا نجاتی، پروانه سادات ذوالفقاری، دکتر زهرا خیری، دکتر غسل صفایی، دکتر علی شعبان خمسه، سلماز سادات نقوی الحسینی،
سوسن صالحی، مهرناز عادل بحری، لیدا شمس، گیتی نیکو عقل، حوریه اصلانی، حامد دهنوی، دکتر محمدرضا ذاکری،
معصومه سلیمانی منعم، مهرندا سلام زاده، سید جواد موسوی، افسانه خان آبادی، دکتر مجتبی نوحی

