جمهوری اسلامی ایران
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

معاونت درمان

دبیرخانه شورای راهبردی تدوین راهنماهای سلامت

شناسنامه و استاندارد خدمت

آزمایش کامل مایع منی شامل ارزیابی حجم، شمارش، حرکت و مورفولوژی اسپرم بطور کامل به روش دستی

نسخه دوم

پاییز ۱۴۰۰

اسامی تدوین کنندگان اصلی:

دکتر محمد مهدی آخوندی: جنین شناس و عضو تیم تخصصی پژوهشگاه رویان

دکتر مجتبی رضازاده: جنین شناس، عضو هیئت علمی پژوهشگاه رویان

دکتر احمد حسینی: جنین شناس

دکتر پوپک افتخاری یزدی: جنین شناس، مسئول بخش جنین شناسی پژوهشگاه رویان

دکتر منصوره موحدین: جنین شناس، عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس

دکتر علیرضا میلانی فر: پزشک و حقوقدان

دکتر حجت اله سعیدی: جنین شناس

دکتر لیلا کریمیان: جنین شناس، عضو تیم تخصصی پژوهشگاه رویان

دکتر محمد رضا صادقی: جنین شناس، عضو هیئت علمی پژوهشگاه ابن سینا

دکتر فهیمه رنجبر: phD بهداشت باروری، عضو تیم تدوین محصولات دانشی حوزه ناباروری، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران

دکتر مهران دخت عابدینی: متخصص زنان و زایمان، مسئول کمیته راهبری تدوین شناسنامه های خدمات درمان ناباروری

اسامی همکاران عضو هیئت علمی و فلوشیپ نازائی تدوین کننده شناسنامه در نسخه ۱۳۹۵:

دکتر اشرف آل یاسین (دانشگاه علوم پزشکی تهران)، **دکتر ساغر صالحپور**(دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)، **دکتر مهناز اشرفی**(دانشگاه علوم پزشکی ایران)، **دکتر عالیه 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 شهیدبهشتی)، **دکتر لیلا نظری**(دانشگاه علوم پزشکی تهران)، **دکتر آزاده اکبری**(دانشگاه علوم پزشکی ایران)، دکتر ژیلا عابدی اصل

اعضای بازنگری کننده شناسنامه در سال ۱۴۰۰:

دکتر محمد علی صدیقی گیلانی : ارولوژیست فلوشیپ آندرولوژی، **دکتر معرفت غفاری: جنین شناس ،PhD** بیولوژی تولید مثل، **دکتر پوپک افتخاری یزدی،** جنین شناس و عضو هیئت علمی پژوهشگاه رویان، **دکتر فردین عمیدی:** جنین شناس و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران **دکتر محمد رضا صادقی:** جنین شناس، عضو هیئت علمی پژوهشگاه ابن سینا، **دکتر مهران دخت عابدینی:** متخصص زنان و زایمان، مسئول کمیته راهبری تدوین شناسنامه های خدمات درمان ناباروری **دکتر محمد رضا نوروزی** (عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران)

با همکاری(به ترتیب حروف الفبا): دکتر قاسم جان بابائی، دکتر مریم خیری، دکتر فهیمه رنجبر، دکتر مهدی شادنوش، دکتر جمشید کرمانچی، شیرین میرآخورلو، دکتر مهدی یوسفی، انجمن تخصصی باروری ناباروری، انجمن جنین شناسی

زیر نظر :

مرکز مدیریت پیوند و درمان بیماری ها

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

آزمایش کامل مایع منی (Semen Analysis) شامل ارزیابی حجم، شمارش، حرکت و مورفولوژی اسپرم بطور کامل به روش دستی

Semen analysis; macroscopic, and microscopic, differential and staining

کدملی: ۸۰٤٤۰۰

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 فروس ۵٪، ترشحات وزیکول سمینال ۷۰٪ و ترشحات پروستات ۲۵٪ آن‌را تشکیل می‌دهد. از این‌رو، ارزیابی پارامترهای مایع منی اطلاعات بالینی ارزشمندی در مورد اسپرم، کیفیت آن و عملکرد بیضه، اپیدیدیم و الگوی ترشحی غدد ضمائم جنسی شامل وزیکول سمینال، پروستات و غدد بولبواورترال یا کوپر[1] 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 به‌صورت افتراقی و با رنگ‌آمیزی، 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 ٤۰٪ و مورفولوژی نرمال بیش از ٤٪
- Oligospermia : غلظت کمتر از ۱۵ میلیون در میلی‌لیتر
- Asthenozoospermia : تحرک کمتر از ٤۰٪ اسپرم‌ها
- Teratozoospermia : مورفولوژی کمتر از ۳ تا ٤ درصد
- Oligoasthenoteratozoospermia : غلظت کمتر از ۱۵ میلیون در میلی‌لیتر، تحرک کمتر از ٤۰٪ اسپرم‌ها ومورفولوژی کمتر از ۳ تا ٤ 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)

[1] -bulbouretral (Cowper's)

- Hemosperia: وجود اریتروسیت در مایع منی
- Piospermia: وجود گلبول سفید در مایع منی (۳) ص ۲۲٦،Table A1.3

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
٤. آموزش و ارایه اطلاعات لازم برای گرفتن نمونه مایع منی
۵. تهیه نمونه مایع منی در شرایط استاندارد
٦. کنترل نمونه دریافتی برای انجام‌دادن آنالیز
۷. بررسی ماکروسکوپی مایع منی
۸. بررسی میکروسکوپی مایع منی (با رنگ‌آمیزی)

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 ۲,۲,۱، پاراگراف۳.
- 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 می شود (بیشتر از ۷ روز اجتناب از نزدیکی در تهیه مایع منی توصیه نمی شود)(۳) ص ۱۰ بخش ۲,۲,۱،پاراگراف۲.
- نمونه معمولا در اتاق مخصوصی در کلینیک و نزدیک آزمایشگاه جمع آوری می شود. این اتاق باید شامل توالت ، دستشویی و تخت یا کاناپه ای راحت باشد(۳) ص ۱۰ بخش ۲,۲,۱،پاراگراف۱.

- برچسب ظرف حاوی نمونه باید شامل اطلاعاتی از جمله نام و نام خانوادگی مراجعه کننده، شماره پرونده و تاریخ و ساعت جمع آوری نمونه باشد(۳) ص ۱۰ بخش ۲,۲,۱،پاراگراف٤.
- نمونه باید از طریق استمناء و در ظرف های استریل پلاستیکی یا شیشه ای مخصوص با دهانه گشاد جمع آوری شود؛ این ظروف نباید حاوی مواد سمی برای اسپرم باشند(۳)ص ۱۱،پاراگراف۱.

- ظروفی که برای جمع آوری اسپرم در آزمایشگاه استفاده می شود قبلا باید تایید عدم سمیت سلولی برای اسپرم را از طریق انجام تست های کنترل کیفی داشته باشد(٤)ص ٤۷، ستون ۲، شماره ۷.

- در مواردی که امکان تهیه نمونه در شرایط استمنا فراهم نباشد توصیه می شود از کاندوم های ویژه ای فاقد هرگونه مواد اسپرم کش، برای جمع آوری نمونه استفاده شود. در این موارد توصیه می شود 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 ۲,۲,٦، پاراگراف۱و۷.

- 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 ٤.
- از آنجاکه تحرک اسپرم نسبت به کاهش دما شدیدا 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 ، پاراگراف۲.
- 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،پاراگراف۱.

- 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 ۲,۲,۷،پاراگراف۱.
- 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)ص۱۱،بخش ۲,۲,۳.
- برای پرهیز از جابه‌جا شدن احتمالی نمونه‌ها، نباید یک فرد به‌طور همزمان روی نمونه بیش از یک بیمار کار کند(۲)ص ۱۲۵۷ ستون۱، پاراگراف ۱۱، سطر۱.

پروتکل ثبت باید شامل موارد زیر باشد:

- مستند سازی باید شامل نام، تاریخ، تاریخ تولد، تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه، شماره پرونده، ظرف مورد استفاده برای نمونه‌گیری (درصورتی‌که از ظرف متفاوتی استفاده شده‌است)، زمان پرهیز از مقاربت، زمان و محل جمع‌آوری نمونه (به‌ویژه اگر خارج از مرکز تهیه شده است)، مشکل در جمع‌آوری نمونه، مناسب و کافی بودن نمونه، ثبت بخش ابتدایی یا انتهایی مایع منی از دست رفته هنگام جمع‌آوری و فاصله زمانی بین جمع‌آوری و آنالیز باشد ص٤٩، ستون ۲، شماره٤.

فرایند کار:

آنالیز مایع منی بعد از مایع شدن آن طی ۱۵ تا ۳۰ دقیقه پس از انزال انجام می‌شود. 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 ۲,۳،پاراگراف۱:

بررسی ماکروسکوپی

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 هپاتیت است (۲) ص ۱۵، پاراگراف۲.

۲- مایع شدن[2]

زمانی‌که نمونه مایع منی به آزمایشگاه تحویل می‌شود، از نظر مایع شدن و ویسکوزیته بررسی می‌شود. اگرچه این فاکتورها در ظاهر مشابه‌اند، 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. درصورتی‌که 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 (٦ تا ۱۰ بار) از یک نیدل شماره ۱۸ متصل به سرنگ
- استفاده از آنزیم پروتئولیتیک Bromelain (۳)ص ۱۳ بخش ۲,۳,۱ پاراگراف۱ و ص ١٤، پاراگراف ٤-۱.

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 به‌صورت قطره قطره و با نیروی جاذبه از پیپت خارج می‌شود، می‌توان کشیده‌شدن آن‌را بررسی کرد. نمونه طبیعی، به‌صورت قطره‌های کوچک و جدا از هم از پیپت خارج می‌شود. درحالی‌که در نمونه غیر طبیعی، کشیده شدن مایع منی بیشتر از ۲ سانتی‌متر خواهد بود.

[2] - Liquifaction

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. درصورتی‌که طول کشیده‌شدن 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 ١٤ بخش ۲,۳,۲،پاراگراف٤-١.

٤- 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 جمع‌آوری نمونه است. نمونه باید در ظرفی تمیز، یک‌بار مصرف و از قبل وزن شده جمع‌آوری 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 ۲,۳,٤،پاراگراف۷-۱و ص١٦، بخش ۲,۳,٤,۱ و ص ١٦،3-1 comment .

٥- 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 به‌خوبی مخلوط و یک قطره از آن به‌صورت 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)ص۱۷و ١٦ 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 به‌وسیله 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 به‌عنوان چسبندگی غیر اختصاصی در نظر گرفته می‌شود.

  - Agglutination: اگلوتیناسیون به‌طور 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.

اگلوتیناسیون به چهار درجه تقسیم می‌شود:

۱- منفرد (Isolated): کمتر از ۱۰ اسپرم به‌هم‌چسبیده و وجود اسپرم‌های آزاد بسیار.

۲- متوسط (Moderate): ۱۰ تا ۵۰ اسپرم به‌هم‌چسبیده و دارای اسپرم آزاد.

۳- بزرگ (large): بیش از ۵۰ اسپرم به‌هم‌چسبیده و وجود چند اسپرم آزاد.

٤- بسیار بزرگ (Gross): اسپرم‌ها به‌هم‌چسبیده و اسپرم آزاد به‌ندرت مشاهده می‌شود(۳)ص ۱۹-۱۷، بخش ۲,٤.

تحرک (Motility):

میزان تحرک اسپرم با میزان بارداری مرتبط است. بهتر است تحرک به‌محض مایع و یکنواخت شدن طی ۳۰ دقیقه اول و حداکثر در یک ساعت بررسی شود تا آثار زیان‌آور دهیدراتاسیون روی pH، اسمولاریته ویسکوزیته 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 (Eyepiepe 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، به‌طور فعال و به‌صورت خطی یا دایره های 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 به‌سختی سر را جابه‌جا می‌کند و یا تنها ضربه‌های دم مشاهده می شود.

۳. عدم حرکت (Immotility(IM))

٤. حداقل میزان تحرک کلی (PR+NP) ٤٠٪ و حداقل میزان اسپرم با حرکت رو به جلو (PR) ۳۲٪ در افراد بارور تعریف شده است(۳)ص ۲۱، بخش ۲,٦.

۵. ارزیابی میکروسکوپی ثانویه (افتراقی):

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

روش رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو:

در این رنگ‌آمیزی ناحیه اکروزوم و ناحیه بعد از آکروزوم سر، بقایای سیتوپلاسمی، قطعه میانی و قطعه اصلی دم رنگ می‌گیرند. تکنیک تعدیل شده پاپانیکولائو 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 مونته شدن به مدت طولانی و برای بررسی دوباره و یا استفاده در برنامه‌های کنترل کیفی داخلی به‌کار گرفته می‌شوند.

معرف‌ها:

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

مراحل رنگ‌آمیزی پاپا نیکولائو:

- تهیه اسمیر یکنواخت به‌وسیله ۱۰ میکرولیتر مایع منی مخلوط شده روی یک لام تمیز و خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه
- تثبیت اسمیر با غوطه‌ور کردن در اتانول ۹۵ درصد برای حداقل ۱۵ دقیقه
- رنگ‌آمیزی اسمیر 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
٤	رنگ هریس هماتوکسیلین (Harris's Haematoxylin)	٤ دقیقه
٥	آب مقطر	۳۰ ثانیه
٦	اتانول اسیدی	٤ تا ۸ مرتبه غوطه ور نمودن هر بار به مدت یک ثانیه
۷	شست‌وشو با جریان آب سرد	٥ 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
۱٤	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 به‌مدت 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.

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

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

٤- 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)	۲-۱ دقیقه

۳	شست‌وشوی با جریان آب	۱۲ تا ۱۵ مرتبه غوطه‌ور کردن هر بار به مدت ۱ دقیقه
٤	اتانول آمونیاکی	۱۰ مرتبه غوطه ور نمودن هر بار به مدت ۱ دقیقه
٥	شست‌وشوی با جریان آب	۱۲ تا ۱۵ مرتبه غوطه‌ور کردن هر بار به مدت ۱ دقیقه
٦	اتانول ۵۰ درصد	۵ دقیقه
۷	رنگ Shorr	۵–۳ 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 رنگ-آمیزی شده به این روش در صورت نگهداری در تاریکی و مونته‌شدن به مدت طولانی و برای بررسی دوباره و یا استفاده در برنامه‌های کنترل کیفی داخلی به‌کار گرفته می‌شوند. درصد اشکال طبیعی اسپرم در روش رنگ‌آمیزی shorr مشابه پاپانیکولائو 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 گفته‌شده دوباره انجام و گزارش می‌شود. در این روش، ابتدا اسمیری از مایع منی تهیه می شود. پس از خشک شدن کامل، لام به شیوه زیر رنگ‌آمیزی می‌شود. ابتدا لام در محلول رنگ‌آمیزی سریع شماره یک، به‌مدت ۱۰ ثانیه و سپس در محلول رنگ‌آمیزی شماره دو، به‌مدت 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 رنگ‌آمیزی۱ (Eosinophilic Xanthenes)
- محلول رنگ‌آمیزی ۲ (Basophilic Thiazine)

مراحل رنگ‌آمیزی:

۱- اسمیرهای تثبیت شده به‌مدت ۱۵ ثانیه در فیکساتیو Triarylmethane یا تنها در متانول ۹۵ درصد به‌مدت ۱ ساعت غوطه‌ور می‌شود، سپس محلول اضافی با قرار دادن لام به‌صورت عمودی روی کاغذ صافی خشک می‌شود.

۲- غوطه‌ور کردن اسمیر در محلول رنگ‌آمیزی سریع شماره ۱، به‌مدت ۱۰ ثانیه

۳- غوطه‌ور کردن اسمیر در محلول رنگ‌آمیزی سریع شماره ۲، به‌مدت ۵ ثانیه

٤- 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 به‌صورت مونته شده و غیر مونته مشاهده کرد.

- در لنزهای زمینه روشن در تمام این سه نوع رنگ‌آمیزی سر اسپرم به‌صورت 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 رنگ آمیزی پاپانیکولائو 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. ازآنجاکه 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 می شود 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 تقریبا ٤٥ میکرومتر (تقریبا ۱۰برابر طول سر) طول داشته باشد. قطعه اصلی ممکن است بدون هیچ زاویه تندی که حاکی از شکستگی دم باشد روی خودش و به‌سمت عقب پیچ‌خورده باشد.

مایع منی در انسان حاوی اسپرم‌هایی با انواع مختلف ناهنجاری‌ها است. اسپرماتوژنز ناقص و بعضی از پاتولوژی‌های اپیدیدیم معمولاً با افزایش میزان اشکال غیر طبیعی اسپرم همراهند. نقایص مورفولوژیک معمولاً به صورت توام 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 آنوپلوئیدی 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 نا منظم، واکوئل دار (وجود بیش از دو واکوئل یا واکوئل هایی 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 آکروزوم های 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 غیرطبیعی 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، پیچ خوردگی 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 به‌وسیله 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 آلترناتیو در همان لام تکرار می‌شود. درصد مورفولوژی طبیعی در این دو ارزیابی جداگانه با هم مقایسه می‌شود و میانگین ان محاسبه و تفاوت‌ها بررسی می‌شود. تنها اسپرم سالم که دارای سر و دم است مورد ارزیابی قرار گرفته و سلول‌های ژرمینال (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 آن-را 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 می شوند. بدین منظور می توان 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 ٤۰۰ 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 اکروزوم تشکیل نشده باشد که در این حالت سر گرد یا کوچک بوده و گلبوزواسپرمیا (Globozoospermia) خوانده می‌شود. از آنجا که دم‌های آزاد (Pin head) و یا سرهای آزاد به‌عنوان اسپرم شمارش نمی‌شوند، به‌عنوان نقایص اسپرم نیز محاسبه نمی-شوند. 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 وابران و یا التهاب غدد ضمایم جنسی (لکوسیت‌ها) است. تعداد سلول‌های غیر از اسپرم در مایع منی (سلول‌های اپی تلیال، سلول‌های گرد (سلول‌های ژرمینال و لکوسیت‌ها و سر یا دم منفرد اسپرم) را می‌توان مشابه اسپرم در لام هموسیتومتر 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 پلی مورفونوکلئر در بیشتر نمونه‌های مایع منی وجود دارند. گاهی در نمونه رنگ‌آمیزی شده مایع منی به روش پاپانیکولائو می‌توان آن‌ها را از اسپرماتید یا اسپرماتوسیت افتراق داد. افتراق بر اساس تفاوت در رنگ پذیری و اندازه و شکل هسته است. لوکوسیت‌های پلی مورفو نوکلئر 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 ۷mμ تا بیش از ۱۵ mμ در ماکروفاژها متفاوت است. ازآنجاکه 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 ایمنوسیتوشیمی 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، ۰/۱ میلی لیتر از آن با ۰/۹ میلی لیتر از محلول از پیش آماده شده (9 ml o-toluidine substrate, add 1 ml of saturated NH4Cl solution, 1 ml of 148 mmol/l Na2EDTA, and 10 _l of 30% (v/v) H2O2) مخلوط می‌شود.

سوسپانسیون حاصل، به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده و در درجه حرارت ۲۰ تا ۳۰ $^{\circ}C$ 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 (هموسیتومتر) 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 می باشد. 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 کانتر آزمایشگاه شمارش و ثبت می شود. 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 می شود. برای محاسبه غلظت سلول‌های پراکسیداز مثبت تعداد آنها بر حجم تعداد مربع های مورد بررسی (حجم یک مربع ۱۰۰ نانولیتر است) تقسیم و در فاکتور رقت ضرب می شود. از این روش می‌توان برای محاسبه سلولهای گرد (پراکسیداز منفی) نیز استفاده کرد. فقدان سلول‌های پراکسیداز مثبت به‌معنی 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 ۱×۱۰^{۶} 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 میلی لیتر مایع منی به‌صورت زیر محاسبه می‌شود (مایع منی به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شده است).

۵ × (ضریب تصحیح) × ۵ (تعداد مربع های شمارش شده) × $۱۰^{۴}$ (ضریب تصحیح حجم لام نئوبار) × ۲۰ (ضریب رقت)= ۲×۱۰^{۶}

(تعداد لوکوسیت‌های پراکسیداز مثبت در یک میلی لیتر 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 سلول های التهابی دشوار است. در اسمیرهای رنگ آمیزی شده به روش پاپانیکولائو می‌توان اسپرماتید ها 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 مورفونوکلئر اشتباه می‌شوند، رنگ صورتی اسپرماتیدها را از لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلئر 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 می کند. اسپرماتوگونی‌ها که به‌ندرت در منی مشاهده می‌شوند، هسته‌ای به قطر ۸ mμ، اسپرماتوسیست‌ها، هسته‌ای به قطر ۱۰ mμ و اسپرماتیدها، هسته‌ای به قطر ۵ mμ 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 ٤٠ درصد است، دارای اهمیت است. درصد اسپرم-های زنده با شناسایی اسپرم هایی 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 ۲۲×۲۲ میلی متر پوشانده شده و پس از ۳۰ ثانیه تعداد ۲۰۰ اسپرم از نظر نفوذ رنگ به داخل اسپرم توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار می گیرد. 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)[3] که به‌عنوان روش جایگزین رنگ‌های حیاتی در ارزیابی اسپرم، به‌ویژه در انتخاب اسپرم زنده برای تزریق داخل سیتوپلاسم تخمک (ICSI) استفاده می‌شود، اسپرم به‌مدت 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

[3] - Hypo- Osmotic swelling test

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 ۲٦، بخش ۲,٦.

- **تعداد اسپرم (sperm concentration)**:

تعداد اسپرم در مایع منی به صورت غلظت اسپرم گزارش می شود. 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 به‌دست 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 درصورتی‌که شمارش این دو مشابه باشد، نتایج ثبت می‌گردد. در غیر این‌صورت، رقت‌های جدیدی تهیه و غلظت اسپرم پس از شمارش در هر میلی‌لیتر و سپس در کل نمونه محاسبه می‌شود.

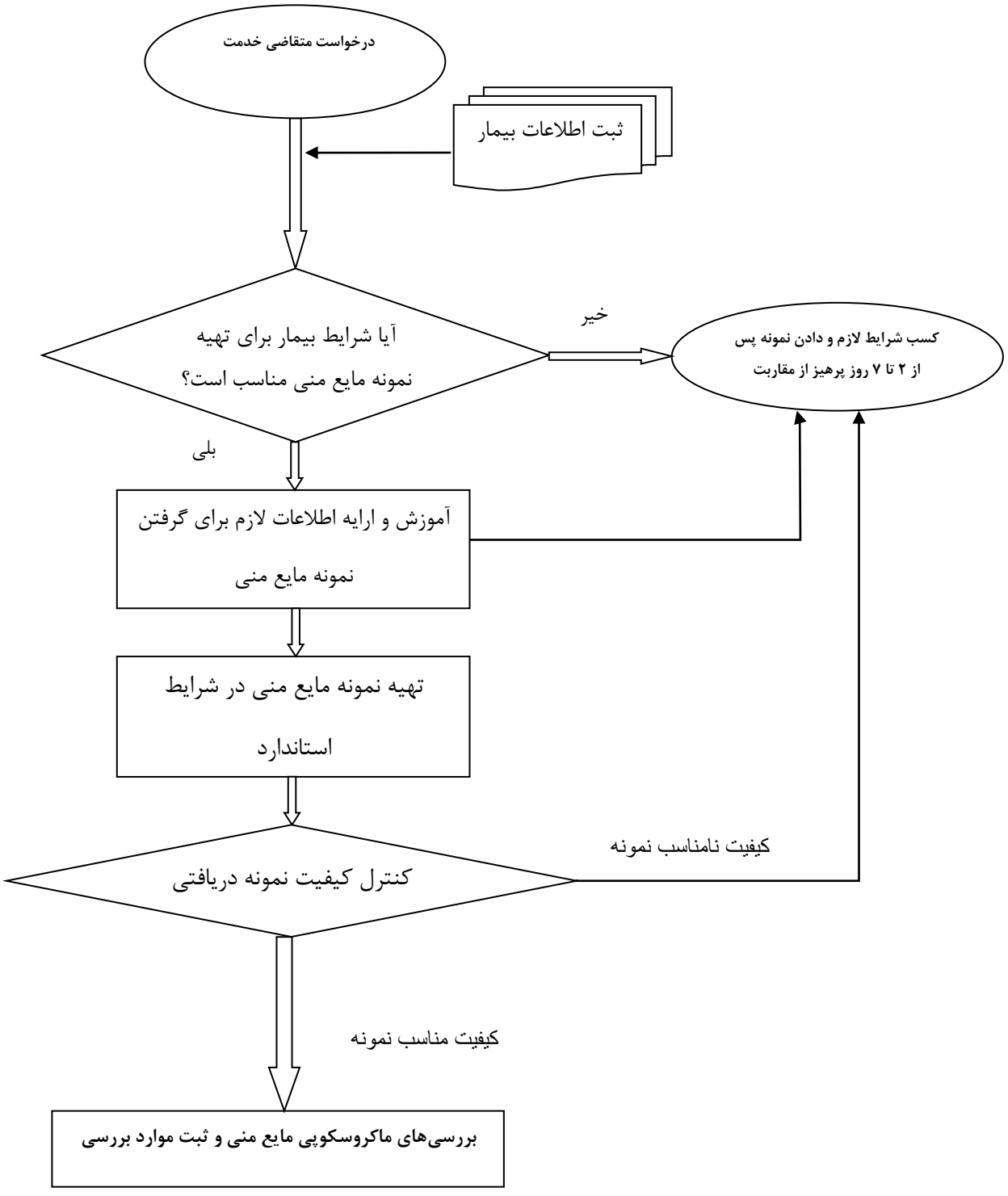
تنها اسپرم کامل (با سر و دم) شمارش می‌شود. شمارش اسپرم در هر خانه بستگی به موقعیت سر دارد. در صورتیکه سر در خانه‌ای مشاهده شود و بیشتر قسمت سر روی دو خط داخلی حاشیه آن خانه قرار گرفته باشد، شمارش خواهد شد. برای پرهیز از شمارش مجدد اسپرم در خانه مجاور، در مواردی‌که بیشتر سر اسپرم روی خط وسط قرار گرفته‌است، تنها در صورتی اسپرم شمارش می‌شود که این خط سمت پایین یا چپ آن خانه باشد و در مواردی‌که 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 می‌توانند مانع افزودن نمونه جدید شوند.

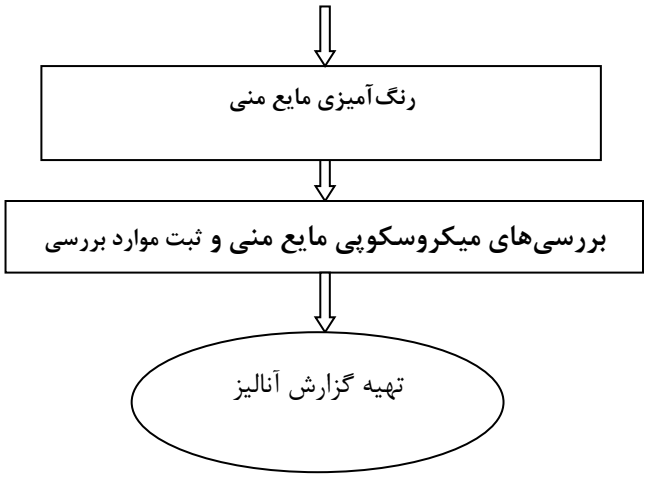
روش شمارش اسپرم‌ها در مربع‌های لام نئوبار:

شبکه وسط لام هموسیتومتر دارای ۲۵ مربع بزرگ است که هر کدام از آنها دارای ۱٦ مربع کوچکند. درصورتی‌که تعداد اسپرم‌ها در هر مربع بزرگ کمتر از ۱۰ عدد باشد، باید اسپرم های کل شبکه شمارش شود. اگر بین ۱۰ تا ٤۰ اسپرم در هر مربع بزرگ وجود داشته باشد، باید ۱۰ مربع بزرگ ارزیابی شود. در نمونه‌هایی که بیش از ٤۰ اسپرم در هر مربع بزرگ مشاهده می‌شود، اسپرم های ۵ مربع شمارش می شوند. به عنوان مثال در لوله آزمایش ۹۰۰ میکرولیتر محلول تثبت 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 ٤۰ تعداد اسپرم‌ها شمارش می شود. تعداد اسپرم‌ها در ٤ خانه اصلی شمارش شده با هم جمع و بر ٤ تقسیم می شود و در $۱۰^٦$ ضرب می شود تا تعداد اسپرم‌ها در میلی‌لیتر به‌دست آید.

در صورت عدم مشاهده اسپرم در آنالیز اولیه مایع منی، نمونه سانتریفوژ 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 به‌منظور 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 فلوچارت فرایند کار برای ارایه خدمت:





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

- **پزشک عمومی**
- **پزشکان متخصص**
- **ماما**

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

دکتری علوم آزمایشگاهی، کلیه PhDهای بالینی در رشته های علوم پایه پزشکی و PhD بیولوژی تولید مثل

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

ردیف	عنوان تخصص(۵)	تعداد موردنیاز 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 رشته های 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 آندرولوژی	بررسی درخواست انجام خدمت، 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 و میکروسکوپی مایع منی و رنگ آمیزی نمونه برای بررسی مورفولوژی ،ثبت مستندات، 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:

استانداردهای لازم برای آزمایشگاه آندرولوژی

- اتاق پذیرش ٦ متر مربع
- اتاق نمونه‌گیری دارای تخت، سرویس بهداشتی شامل حمام و توالت حداقل ۱۲ متر مربع
- اتاقی با ویژگی‌های آزمایشگاه آندرولوژی، به‌وسعت ۳۰ - ۲۰ متر مربع(٤)ص ۵۷، ستون ۱، شماره III

ح) تجهیزات پزشکی سرمایه‌ای (و یا اقلام اداری) استاندارد اداری و به ازای هر خدمت:

ردیف	عنوان تجهیزات	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	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	–	نگهداری مواد و محلول های آزمایشگاهی	۱۰ سال	-	-	بله
۳	هود	شیمیایی	رنگ آمیزی و تثبیت کردن لام	۱۰ سال	۳ خدمت در ساعت	۲۰ دقیقه	بله
٤	هود	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	–	تامین دمای°C ۳۷ و شرایط بهینه برای حیات جنین	۵ سال	تعداد زیاد، بسته به حجم انکوباتور متغیر است	متغیر	بلی
٦	Warm stage	–	حفظ دمای°C37	حداکثر ۵ سال	۳ خدمت در	۲۰ دقیقه	خیر

					ساعت		
۷	سانتریفیوژ	–	تهیه رسوب نمونه	۵ سال	متغیر، بسته به روتور	۵ دقیقه	بلی
۸	کامپیوتر	–	کنترل اطلاعات زوجین و ذخیره اطلاعات آنالیز مایع منی	۳ سال	٤ خدمت در ساعت	۱۵ دقیقه	خیر
۹	shaker	-	مخلوط و یکنواخت کردن مایع منی	۵ سال	٦ خدمت در ساعت	۵ تا ۱۰ دقیقه	وجود ندارد
۱۰	ورتکس vortex	–	ساختن رقت های مختلف مایع منی	۵ سال	٦ خدمت در ساعت	۵ تا ۱۰ دقیقه	وجود ندارد
۱۱	تایمر	دیجیتال	اندازه گیری زمان قرار گرفتن نمونه درمراحل مختلف	متغیر	٤ خدمت در ساعت	۱۵ تا ۲۰ دقیقه	خیر
۱۲	ترازو	دیجیتال با حساسیت ۰/۰۰۱گرم	وزن کردن مواد لازم	۵ سال	۱۲ خدمت در ساعت	۵ دقیقه	خیر
۱۳	کانتر ٦ یا ۹ خانه	–	شمارش اسپرم	۳ سال	۲ تا ۳ خدمت در ساعت	۳۰ – ۲۰ دقیقه	خیر
۱٤	لام هموسیتومتر	–	شمارش اسپرم	۱ سال(تاو	۵ خدمت	۱۵ دقیقه	خیر

			قتی که نشکند)	در ساعت			
۱۵	سمپلر متغیر	۱۰ تا ۱۰۰ ماکرو لیتری	اندازه گیری حجم کم محیط ها	۱ سال/ هر سال یک‌بار باید کالیبره شود	٦ خدمت در ساعت	۱۰دقیقه	خیر
۱٦	کپسول CO2 به همراه تجهیزات، مثل مانومتر و رگلاتور	Grade I یاII ٤۰ لیتری	منبع گاز در CO2 انکوباتور	نامحدود تا زمانی که بدنه آن آسیب نبیند.	۵ خدمت در روز	متغیر، تا زمانی که نمونه داخل انکوباتور CO2باشد (کپسول هر ۱۸ روز یک‌بار، به ازای هر انکوباتور شارژ می‌شود).	به CO2کپسول همراه 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)
۱	دستکش لاتکس	۲ جفت
۲	لام و لامل	٤ عدد
۳	کاغذpH	۱ نوار
٤	پیپت مدرج استریل	۱ عدد
۵	پیپت پاستور	۵ عدد
٦	ظرف نمونه‌گیری دهانه گشاد – یک‌بار مصرف و استریل	۱ عدد
۷	قلم الماس	۱ عدد
۸	Labeling device ماژیک دایمی	۱ عدد
۹	محیط کشت	۵ میلی لیتر
۱۰	دستمال کاغذی	۱ جعبه
۱۱	گاز استریل	۱ عدد
۱۲	سرسمپلر	۱۰ عدد
۱۳	الکل	–
۱٤	دستکش نایلونی	۱ عدد
۱۵	کیت رنگ‌آمیزی پاپانیکولا	۱ عدد

۱۶	کیت رنگ‌آمیزی Diffquik	۱ عدد
۱۷	کیت رنگ‌آمیزی Shorr	۱ عدد
۱۸	پنبه	–
۱۹	گاز CO2	۲ لیتر

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

ل) اندیکاسیون‌های دقیق برای تجویز خدمت :

آنالیز مایع منی شایع‌ترین و پایه‌ای ترین 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 وازووازستومی
- 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 درنتیجه شانس است و تکرار آن بی‌ارزش است (۳) ص ۱۷۹، قسمت ۷,۲

ن) شواهد علمی درباره کنترااندیکاسیون‌های دقیق خدمت:

- عدم توان ارایه 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 ارایه خدمت) و نیز بر حسب مشارکت همه افراد دخیل در ارایه آن خدمت:

ردیف	عنوان تخصص	میزان تحصیلات	مدت زمان مشارکت در فرایند ارایه خدمت	نوع مشارکت در قبل، حین و بعد از ارایه خدمت
۱	کارشناس یا کارشناس ارشد علوم آزمایشگاهی / بیولوژی یا یکی از رشته های علوم پایه پزشکی مرتبط	کارشناس و کارشناس ارشد علوم آزمایشگاهی	۳۰ دقیقه	بررسی درخواست انجام خدمت توسط فرد صاحب صلاحیت: ۵ دقیقه، ثبت اطلاعات بیمار: اطمینان از شرایط مناسب بیمار برای تهیه نمونه مایع منیو آموزش و ارایه اطلاعات لازم برای گرفتن نمونه مایع منی: ۱۰ دقیقه(قبل از خدمت)، کنترل نمونه دریافتی برای انجام آنالیز، بررسی ماکروسکوپی 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 (در صورت ارائه خدمت در مراکز ناباروری تخصصی)	دکتری PhD	۱۵دقیقه	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)[1]
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:

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- ارایه درخواست کتبی برای عملیات برابر ضوابط
۳- حضور به‌هنگام در مرکز و پرداخت همه وجوه مربوط
٤- تکمیل و امضای اسناد قرارداد و اعلام رضایت از سوی متقاضی و تضمین اصالت نمونهٔ مایع منی

حقوق متقاضی

۱- تشریح کامل خدمت و چگونگی آن و ارایه خدمت با کیفیت مناسب وعده 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.

منابع:

۱. Andrade-Rocha FT. Semen analysis in laboratory practice: An overview of routine tests. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2003;17(6):247-58.

۲. 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.

۳. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. fifth edition ed. Switzerland: World Health Organization; 2010.

۴. Revised guidelines for human embryology and andrology laboratories. Fertility and Sterility. 2008;90(5, Supplement 1):S45-S59.

۵. Medicine PCotASfR, Technology PCotSfAR. Minimum standards for practices offering assisted reproductive technologies: a committee opinion. Fertility and Sterility. 2.۸۲-۵۷۸:(۳)۱۱۵;۰۲۱

- **تاریخ اعتبار این راهنما از زمان ابلاغ به مدت ۳ سال می باشد و بعد از اتمام مهلت زمانی میبایست ویرایش صورت پذیرد.**