



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/00 (2020.02); G01N 33/487 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019136865, 18.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.11.2019

Дата регистрации:
09.07.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.11.2019

(45) Опубликовано: 09.07.2020 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

141370, Московская обл., г. Хотьково, ул. 1-я
Хотьковская, 24, кв. 45, Будадин Олег
Николаевич

(72) Автор(ы):

Сапожкова Жанна Юрьевна (RU),
Еремин Константин Игоревич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Сапожкова Жанна Юрьевна (RU),
Еремин Константин Игоревич (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Шатохина И.С. и др. / Уч. Пособие:
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА. - Москва.
- 2014., стр.9-11. Руководство ВОЗ По
исследованию и обработке эякулята человека
ПЯТОЕ ИЗДАНИЕ. // Изд. "КАПИТАЛ
ПРИНТ". - Москва. - 2012., стр.106-108,
ЧАСТЬ 3. Новикова И.А. / Введение в
клиническую лабораторную диагностику:
учебное пособие // Вышэйшая школа. - Минск.
- 2018. - (см. прод.)

(54) Способ комбинированного измерения концентрации пероксидазо-положительных клеток (нейтрофильных гранулоцитов) и сперматозоидов в эякуляте человека с использованием вариаций на основе цитохимического окрашивания

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к способу исследования эякулята для диагностики нарушений сперматогенеза и бесплодия. Способ исследования эякулята для диагностики нарушений сперматогенеза и бесплодия включает сбор эякулята, подготовку препарата для исследования, подготовку счетной камеры Горяева, осаждение клеток, определение количества больших квадратов камеры, необходимых для подсчета лейкоцитов и сперматозоидов, причем для фиксации и разведения эякулята используют единственный рабочий раствор, который готовят путем размешивания проявителя и 10 мкл 30% перекиси водорода, в качестве проявителя используют смесь натрия фосфорнокислого двузамещенного; калия фосфорнокислого однозамещенного; аммония хлористого; динатриевой соли

этилендиаминотетрауксусной кислоты и бензидина, препарат для исследования готовят путем помещения в пробирку эякулята и рабочего раствора при разведении по меньшей мере 1:10, перемешивают и инкубируют при температуре 37°C в течение 30 минут, при этом осуществляется окрашивание лейкоцитов в коричневый цвет, а сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные тельца, эпителии остаются бесцветными, заполняют препаратом две стороны счетной камеры Горяева для двукратного подсчета окрашенных лейкоцитов и сперматозоидов с последующим определением средней величины, удерживают счетную камеру Горяева в горизонтальном положении не менее 4 минут при комнатной температуре для осаждения клеток, определяют

концентрацию сперматозоидов и лейкоцитов в квадратах счетной камеры Горяева, выполняют окрашивание эякулята раствором эозина, 5% водным и раствором нигрозина, 10% водным для определения количества мертвых, окрашенных в красный цвет и живых остающихся неокрашенными сперматозоидов, выполняют окрашивание эякулята раствором красителя азур-эозин по Романовскому и фиксатор-красителем

эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду для выявления структур сперматозоидов, используют полученные в результате исследования эякулята данные для диагностики. Вышеописанный способ позволяет получить результаты анализа с повышенной диагностической точностью, информативностью и достоверностью. 8 з.п. ф-лы, 6 ил.

(56) (продолжение):

365 с., стр.314. RU 2247371 C2, 27.02.2005. RU 2568845 C1, 20.11.2015. Singh, D.K. et al. Factors influencing semen analysis in case of infertility // Indian Journal of Public Health Research and Development. - 2018. - V.9. - N.12. - P.85-91. WO 02095375 A1, 28.11.2002. В. В. Евдокимов и др. Подвижность сперматозоидов при воздействии перекиси водорода. АНДРОЛОГИЯ И ГЕНИТАЛЬНАЯ ХИРУРГИЯ 1. - 2015. - с.69-72.

RU 2726207 C1

RU 2726207 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/00 (2020.02); *G01N 33/487* (2020.02)(21)(22) Application: **2019136865, 18.11.2019**(24) Effective date for property rights:
18.11.2019Registration date:
09.07.2020

Priority:

(22) Date of filing: **18.11.2019**(45) Date of publication: **09.07.2020** Bull. № 19

Mail address:

**141370, Moskovskaya obl., g. Khotkovo, ul. 1-ya
Khotkovskaya, 24, kv. 45, Budadin Oleg
Nikolaevich**

(72) Inventor(s):

**Sapozhkova Zhanna Yurevna (RU),
Eremin Konstantin Igorevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Sapozhkova Zhanna Yurevna (RU),
Eremin Konstantin Igorevich (RU)****(54) METHOD FOR COMBINED MEASUREMENT OF CONCENTRATION OF PEROXIDASE-POSITIVE CELLS (NEUTROPHILIC GRANULOCYTES) AND SPERM CELLS IN HUMAN EJACULATE USING VARIATIONS BASED ON CYTOCHEMICAL STAINING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, particularly to a method for investigating ejaculate for diagnosing spermatogenesis and infertility disorders. Method for examining an ejaculate for diagnosing spermatogenesis and infertility disorders involves collecting ejaculate, preparing the preparation for examination, preparing a Goryaev counting chamber, depositing cells, determining the number of large squares of the chamber required for counting leukocytes and sperm cells, wherein for fixation and dilution of ejaculate used is a single working solution, which is prepared by mixing developer and 10 mcl of 30 % hydrogen peroxide, as developer used is a mixture of disodium phosphate dibasic mixture; monosubstituted potassium phosphate; ammonium chloride; disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid and benzidine, preparation for analysis is prepared by placing into a test tube of ejaculate and working solution at dilution of at least 1:10, mixed and incubated at temperature 37 °C for 30 minutes, wherein colouring leukocytes in

brown, and sperm cells, spermatogenesis cells, lymphocytes, monocytes, macrophages, spermophages, histiocytes, erythrocytes, lipid bodies, the epithelium remains colourless, the preparation is filled with two sides of the Goryaev counting chamber for double counting of coloured leukocytes and spermatozoa with subsequent determination of the average value, Goryaev counting chamber is held in horizontal position for at least 4 minutes at room temperature for cell sedimentation, concentration of sperm cells and leukocytes in squares of Goryaev counting chamber is determined, ejaculate is coloured with eosin solution, 5 % aqueous solution and nigrosine solution, 10 % aqueous to determine the number of dead red-coloured and live uncoloured spermatozoa, staining of ejaculate with solution of azure-eosin dye according to Romanovsky and fixator-dye eosin methylene blue according to May Grunwald for detecting sperm cells, using data obtained as a result of ejaculate analysis for diagnosis.

EFFECT: method described above enables to obtain

analysis results with high diagnostic accuracy,
information value and reliability.

9 cl, 6 dwg

R U 2 7 2 6 2 0 7 C 1

R U 2 7 2 6 2 0 7 C 1

Область, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано при анализе биологических материалов, в частности для диагностики нарушений сперматогенеза и бесплодия в урологии, андрологии, онкологии при проведении функционального теста сперматозоидов для оценки их оплодотворяющей способности и для выявления этиопатогенеза патозооспермии.

Уровень техники

Оценку и вычисление концентрации нейтрофильных гранулоцитов/пероксидазо-положительных лейкоцитов в эякуляте осуществляют помощью цитохимического окрашивания орто-толуидином (см. Руководство ВОЗ По исследованию и обработка эякулята человека. - издательство «КАПИТАЛ ПРИНТ», Москва, 2012, пятое издание, ISBN 978-5-905106-09-05 (раздел 2.18.1.5-1.7; рис. 2.14; 3.11).

Недостатки данного способа следующие:

1. отсутствует коммерчески доступный набор для окрашивания, реактив: как правило предлагается 6 реагентов, которые сложно купить в виду того, что они являются прекурсорами,

2. сложно готовить к использованию, ввиду того, что современные лаборатории используют, как правило, исключительно готовые наборы реагентов и не имеет необходимого поверенного оборудования: весов, оборудования для титрования и тд.,

3. используемый орто-толуидин является особо опасным канцерогеном, что обуславливает риск для здоровья персоналу,

4. результаты считают в усовершенствованном гемоцитометре Нейбауэра, который отсутствует на российском лабораторном рынке оборудования и расходных материалов с необходимым регистрационным удостоверением,

5. формула подсчета адаптирована к гемоцитометру Нейбауэра, что вызывает определенные трудности.

Известен способ оценки и вычисления концентрации нейтрофильных гранулоцитов (лейкоцитов)/пероксидазо-положительных клеток (ППК) в эякуляте. При его осуществлении используют полуколичественную оценку содержания лейкоцитов в эякуляте на тест-полоске с помощью иммунохроматографического метода, основанного на ферментативной активности лейкоцитарной эстеразы (без цитохимического окрашивания) (см. В.В. Долгов, С.А. Луговская, Н.Д. и др. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. - М. - Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. - 145 с., 199 ил., 5-94789-144-1. Стр. 70).

Недостатки данного способа заключаются в следующем:

1. Способ позволяет осуществить только приблизительное определение концентрации и только нейтрофильных гранулоцитов/пероксидазо-положительных лейкоцитов в эякуляте,

2. Не дает точного представления о наличии или отсутствии воспалительного процесса у мужчины.

3. Метод определения - неколичественный (полуколичественный «на тест-полоске»: > или <1×10⁶, что противоречит рекомендациям ВОЗ.

4. Лейкоцитарная эстераза появляется в биожидкости при разрушении лейкоцитов, что может привести к ложноположительной диагностике (пиоспермии).

Известен способ количественной оценки содержания круглых клеток (нейтрофильных и других лейкоцитов, макрофагов, клеток сперматогенеза) (концентрации) без цитохимического окрашивания пероксидазо-положительных клеток/нейтрофильных гранулоцитов (лейкоцитов) в эякуляте (см. Е.Е. Братина. Протокол проведения

спермиологического исследования. - Андрология и генитальная хирургия. - 2014, №1, с. 20).

Недостатки данного способа следующие.

1. Производится определение концентрации только круглых клеток (всех подряд), а не только нейтрофильных гранулоцитов/пероксидазо-положительных лейкоцитов в эякуляте.

2. Метод не дает точного представления о наличии или отсутствии воспалительного процесса у мужчины.

3. Метод не приемлем для мониторинга содержания лейкоцитов в сперме.

4. Идентификация лейкоцитов происходит путем субъективной оценки («на глаз») по косвенным идентификационным признакам, что не соответствует рекомендациям ВОЗ.

Известен способ определения концентрации сперматозоидов в 1 миллилитре (мл) эякулята (см. Руководство ВОЗ По исследованию и обработка эякулята человека, издательство «КАПИТАЛ ПРИНТ», Москва, 2012, пятое издание, ISBN 978-5-905106-09-05 (раздел 2.7, 2.8.1, 2.8.4, стр. 34-47).

Недостатки данного способа следующие.

1. Вычисление концентрации осуществляется только сперматозоидов в 1 миллилитре (мл) эякулята.

2. Подсчет проводят в усовершенствованном гемоцитометре Нейбауэра, которого нет на российском лабораторном рынке оборудования и расходных материалов с регистрационным удостоверением.

3. Фиксация и разведение образца спермы происходит рабочим раствором, состоящим из сложной прописи химических веществ - прекурсоров (п. 2.7.5 руководства ВОЗ), которые не используются в современной клинко-диагностической лаборатории. Одним из таких прекурсоров является особо опасный канцероген - формалин.

4. Оценка требуемого разведения для дальнейшего подсчета концентрации сперматозоидов основана на сложных математических расчетах и адаптирована также к гемоцитометру Нейбауэра (Руководство ВОЗ, стр. 40-41 глава 2.8.1).

5. Все формулы для подсчета адаптированы к гемоцитометру Нейбауэра.

Наиболее близким к заявляемому способу является способ измерения концентрации сперматозоидов в 1 миллилитре (мл) эякулята, принятый в качестве прототипа (см. Е.Е. Братина. Протокол проведения спермиологического исследования. - Андрология и генитальная хирургия. - 2014, №1, с. 18-19).

Согласно известному способу производят подготовку препарата, фиксацию эякулята, приготовление счетной камеры, заполнение окошек гемоцитометра эякулятом, осаждение сперматозоида в камере, определение количества больших квадратов, необходимых для подсчета сперматозоидов, измерение количества сперматозоидов в 1 миллилитре (мл) эякулята в препарате в камере Горяева и вынесение заключения.

Недостатки данного способа следующие.

1. Осуществляется только измерение концентрации сперматозоидов в 1 миллилитре (мл) эякулята.

2. Фиксация и разведение образца спермы проводится несколькими рабочими растворами (50 г NaHCO_3 , 10 мл 36-40% раствора формальдегида (насыщенный раствор)). Один из них - прекурсор и является особо опасным канцерогеном формальдегидом. Фиксация физиологическим раствором долгая (до полной остановки подвижных клеток), что отражается на времени оборота теста в лаборатории/ТАТ (turn around time) и вносит дополнительные погрешности.

3. Оценка качества требуемого разведения для дальнейшего подсчета концентрации сперматозоидов многоэтапна и усложнена (с. 18: при приготовлении препарата (10 мкл, покровное стекло 22×22 мм), глубина препарата примерно 20 мкм. Используется специальный подсчет сперматозоидов в поле зрения для определения оптимального разведения. При диаметре поля зрения микроскопа (измерять объективом -
 5 микрометром) 500 мкм обнаружение 4 сперматозоидов в поле зрения примерно соответствует 1 млн/мл. Если диаметр поля зрения 250 мкм - 1 сперматозоид в поле зрения соответствует 1 млн/мл. В этом случае пользоваться табл. 2 следует после умножения количества обнаруженных сперматозоидов на 4).

10 4. Этап определения количества больших квадратов, необходимых для подсчета сперматозоидов также усложняет процесс исследования, что отражается на ТАТ

Таким образом, известные способы являются низкоинформативными и малодостоверными, и соответственно стоит задача создания достоверной, простой, надежной и информативной методики анализа.

15 Сущность изобретения

Изобретение направлено на решение задачи повышения диагностической достоверности.

Технический результат, достигаемый при использовании представленного способа, состоит в повышении диагностической точности результатов анализа, информативности
 20 и достоверности. Упрощается процесс подготовки и анализа биологического материала.

Технический результат достигается за счет того, что в способе исследования эякулята, включающем подготовку препарата для исследования и рабочего раствора, фиксацию эякулята, подготовку счетной камеры Горяева, осаждение клеток, определение
 количества больших квадратов, необходимых для подсчета лейкоцитов и

25 сперматозоидов, подсчет количества лейкоцитов и сперматозоидов в эякуляте и вынесение заключения, используют единственный рабочий раствор для фиксации и разведения, который готовят путем размешивания проявителя и 10 мкл 30% перекиси водорода, препарат для исследования готовят путем помещения в пробирку эякулята и рабочего раствора при разведении по меньшей мере 1:10, перемешивают в течение

30 10 сек. и инкубируют при температуре 37 градусов в течение 30 минут, выполняют окрашивание эякулята раствором, включающим проявитель и 10 мкл 30% перекиси водорода, при этом сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные тельца, эпителии остаются бесцветными, выполняют окрашивание эякулята раствором эозина, 5% водный, и

35 раствором нигрозина, 10% водный, при этом мертвые сперматозоиды окрашиваются в красный цвет, а живые остаются неокрашенными, выполняют окрашивание эякулята раствором из красителя азур-эозин по Романовскому и фиксатор-красителем эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду, при этом ядра клеток окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, цитоплазма гранулоцитов, эозинофилы, эритроциты окрашиваются
 40 в розовый цвет, головки сперматозоидов - в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью, хвосты сперматозоидов - в нежно-сиреневый цвет, цитоплазматическая капля и шейка сперматозоида окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, заполняют препаратом две стороны счетной камеры Горяева для двукратного подсчета окрашенных лейкоцитов с последующим определением средней величины,
 45 удерживают счетную камеру Горяева в горизонтальном положении не менее 4 минут при комнатной температуре для осаждения клеток, и определяют концентрацию сперматозоидов в больших квадратах счетной камеры Горяева.

Технический результат усиливается за счет того, что определение концентрации

сперматозоидов в больших квадратах счетной камеры Горяева проводят, используя разведение в соответствии с предварительной визуальной оценкой.

При малом количестве круглых клеток, оцененном предварительной визуальной оценкой, количество лейкоцитов определяют в 100 больших квадратах камеры Горяева и расчет проводят по формуле:

$$L = (a \times 250 \times 10 \times 1000) / (100 \times 1000000) \text{ [млн/мл]}$$

где L - количество лейкоцитов в 1 мл эякулята, а - количество лейкоцитов в 100 больших квадратах.

При большом количестве круглых клеток, оцененном предварительной визуальной оценкой, количество лейкоцитов определяют в 40 больших квадратах камеры Горяева и расчет проводят по формуле:

$$L = (a \times 250 \times 10 \times 1000) / (40 \times 1000000) \text{ [млн/мл]}$$

где а - количество лейкоцитов в 40 больших квадратах, 250 - объем одного большого квадрата, 10 - степень разведения спермы, 1000-1000 мкл в 1 мл эякулята, 40 - количество больших квадратов.

При малом количестве сперматозоидов, оцененном предварительной визуальной оценкой, определение концентрации сперматозоидов осуществляют в той стороне камеры Горяева, где были подсчитаны лейкоциты при разведении препарата 1:10.

Определение концентрации сперматозоидов в 5 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 16 малых, по диагонали проводят по формуле:

$$C = a \times 500000 \text{ [млн/мл]},$$

где С - концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята, а - количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали.

При большом количестве сперматозоидов, оцененном предварительной визуальной оценкой, увеличивают разведение препарата до 1:20, 1:40 или 1:80, добавляя к исследуемому препарату по 200 мкл рабочего раствора.

Концентрацию сперматозоидов при большом количестве сперматозоидов, оцененном предварительной оценкой, определяют в 5 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 16 малых, по диагонали по формуле:

$$C = a \times 1000000 \text{ [млн/мл]},$$

где С - концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята, а - количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали

При большом количестве сперматозоидов в эякуляте, оцененном предварительной оценкой, увеличивают разведение до 1:40, 1:50, 1:80 или 1:100, каждый раз добавляя по 200 мкл рабочего раствора.

При увеличении разведения для подсчета концентрации сперматозоидов заполняют свободные квадраты камеры Горяева.

При разведении эякулята в пропорции 1:40 и более, концентрацию сперматозоидов определяют в 5 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 16 малых квадратов по диагонали, по формуле:

$$C = (a \times 250 \times P \times 1000) / (40 \times 1000000) \text{ [млн/мл]},$$

где С - концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята

а - количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали

Р - степень разведения спермы,

В качестве проявителя используют смесь натрия фосфорнокислого двузамещенного; калия фосфорнокислого однозамещенный; аммония хлористого; динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты и бензидина.

Осуществляют контроль качества исследования, при этом в качестве положительного

контроля при определении окраски лейкоцитов образцов эякулята используют цельную кровь, результаты окраски оценивают методом микроскопии.

Описание графических материалов

Сущность изобретения и возможность достижения технического результата будут более понятны из последующего описания со ссылками на фигуры графических материалов, где показано:

на фиг. 1 - 100 больших квадратов камеры Горяева, разделенных на 4 малых,

на фиг. 2 - 40 больших квадратов камеры Горяева, разделенных на 4 малых,

на фиг. 3 - пять больших квадратов камеры Горяева, разделенных на 16 малых,

на фиг. 4 - пять больших квадратов камеры Горяева, разделенных на 16 малых,

на фиг. 5 - результаты клинического обследования по способу, принятому в качестве прототипа,

на фиг. 6 - результаты клинического обследования по предложенному способу.

Осуществление способа

В основе диагностического действия представленного способа лежит метод цитохимического окрашивания, используемый для анализа спермы человека согласно Руководству ВОЗ по исследованию и обработке спермы человека. Состав набора для осуществления способа содержит все необходимые компоненты, позволяющие стандартизовать выполнение рутинной спирограммы в условиях клинико-диагностической лаборатории. Процедура анализа состоит из пяти этапов с использованием следующих методов окрашивания, реагенты для которых входят в состав набора:

- окрашивание сперматозоидов и пероксидазо-положительных клеток (ППК)/нейтрофильных гранулоцитов в эякуляте;

- окрашивание живых/мертвых сперматозоидов,

- окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов,

- разжижения вязкого эякулята.

В представленном способе в отличие от известных определение двух важнейших параметров спермограммы производится в одной пробирке. Фиксация и разведение образца спермы проводится безвредным для аспирации верхними дыхательным путями и неканцерогенным раствором 30% Перекиси водорода. Перекись водорода 30% позволяет использовать рабочий раствор реагентов как для подсчета концентрации пероксидазо-положительных клеток (ППК) при разведении спермы 1:10, так и фиксировать подвижные клетки в целях последующего подсчета концентрации сперматозоидов при разведении эякулята от 1:10 и выше в больших квадратах камеры Горяева, используя соответствующие формулы.

При этом объективизирована оценка требуемого разведения для дальнейшего подсчета концентрации сперматозоидов: «В случае если сперматозоиды лежат в монослоях (малое количество после предварительной визуальной оценки), то подсчет концентрации сперматозоидов необходимо проводить в этой же стороне камеры Горяева, где были подсчитаны лейкоциты, то есть в прежнем разведении 1:10.

В случае если сперматозоиды лежат в мультислоях (большое количество после предварительной визуальной оценки), то необходимо увеличить разведение до 1:20 и более путем добавления в пробирку №1 с исследуемым раствором еще 200 мкл рабочего раствора. В случае, если необходимо разведение 1:40, 1:80, то необходимо добавлять в пробирку №1 с существующим разведением каждый раз по 200 мкл рабочего раствора соответственно.

Представлены вариативные формулы для расчета концентрации лейкоцитов и

концентрации сперматозоидов в зависимости от результатов предварительной, более объективной оценки количества сперматозидов и разведения эякулята, основанного на ней.

Окончательный диагноз ставится врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

При обработке образца спермы проявителем (реагент №1), Перекисью водорода 30% (реагент №2), клетки, содержащие пероксидазу (нейтрофильные лейкоциты), окрашиваются в коричневый цвет. Клетки, не содержащие пероксидазу (сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные тельца, эпителий) - не окрашиваются (остаются бесцветными).

Реагент №2 позволяет использовать рабочий раствор реагента как для подсчета концентрации пероксидазо-положительных клеток (ППК) при разведении спермы 1:10, так и фиксировать подвижные клетки в целях последующего подсчета концентрации сперматозоидов при разведении эякулята от 1:10 и выше в больших квадратах камеры Горяева, используя соответствующие формулы.

Подсчет концентрации круглых клеток (КК) исключен, к КК относятся клетки сперматогенеза различной степени зрелости, нейтрофильные лейкоциты (гранулоциты), лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты. Необходима только предварительная качественная оценка наличия КК в препарате.

В результате взаимодействия спермы с Реагентом №3 (Раствор эозина, 5%) водный и Реагентом №4 (Раствор нигрозина, 10% водный), фон препарата окрашивается в темно-серый цвет, на котором четко видны окрашенные эозином в красный цвет мертвые сперматозоиды и неокрашенные (бесцветные) живые сперматозоиды, что позволяет произвести отдельный подсчет живых и мертвых сперматозоидов и определить их процентное соотношение.

Реагент №5 (Краситель азур-эозин по Романовскому) и Реагент №6 (Фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду) специфично взаимодействуют с различными структурами клетки. При этом происходит окрашивание ацидофильных структур в разные тона красного цвета, базофильных структур - в тона от пурпурового до синего. Вследствие того, что различные клеточные структуры имеют разную рН и связываются с красителем с противоположной реакцией. Ядра клеток богаты нуклеиновыми кислотами, имеют кислую реакцию и окрашиваются красителем азур-эозин по Романовскому в сине-фиолетовый цвет. Цитоплазма гранулоцитов, зернистость эозинофилов, эритроциты содержат щелочные белки, поэтому окрашиваются красителем азур-эозин по Романовскому в розовый цвет. Головки сперматозоидов окрашиваются в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью. Хвосты сперматозоидов окрашиваются в нежно-сиреневый цвет. Цитоплазматическая капля и шейка сперматозоида окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

Реагент №7 (Фосфатно-солевой раствор бромелайна) представляет собой раствор для разжижения эякулята.

Способ используется для комплексной оценки показателей спермограммы.

В состав реагентов для комплексного анализа спермы входят:

- Реагент №1 (Проявитель - это бесцветная прозрачная жидкость, содержит Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ХЧ концентрации 26,6 ммоль; Калий фосфорнокислый однозамещенный ХЧ концентрации 66,1 ммоль; Аммоний хлористый 4,62 ммоль; Динатриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты 14,8 ммоль ЭДТУК - динатриевая соль DISSOLVINE NA2, Бензидин 2,5 ммоль);

- Реагент №2 (Перекись водорода 30%)

- Реагент №3 (Раствор эозина, 5% водный);
- Реагент №4 (Раствор нигрозина, 10% водный);
- Реагент №5 (Краситель азур-эозин по Романовскому);
- Реагент №6 (Фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду);
- Реагент №7 (Фосфатно-солевой раствор бромелайна).

Чувствительность и специфичность окрашивания клеток), как процентное содержание образцов, соответствующих паспортному значению - не менее 100%.

Нормальное значение концентрации нейтрофильных лейкоцитов (ППК) согласно Руководству ВОЗ по исследованию и обработке спермы человека, 5-ая редакция (2010 год) не более $1,0 \times 10^6$ на 1 мл эякулята.

Чрезмерное количество лейкоцитов в эякуляте (пиоспермия) может быть связано с инфекцией и плохим качеством спермы.

Лейкоциты могут снижать подвижность сперматозоидов и нарушать целостность ДНК посредством оксидативного воздействия. Однако наблюдаемый уровень лейкоцитарного повреждения зависит от факторов, которые невозможно предположить, такие, как причина, время и анатомическая локализация инфильтрации лейкоцитов, а также происхождение лейкоцитов и их нахождение в активированном состоянии (Tomlinson et al., 1993; Aitken & Baker, 1995; Rossi & Aitken, 1997).

Появление лейкоцитов в эякуляте в концентрации, выше пороговой, является поводом для более углубленного обследования мужчины.

Минимальным референсным значением концентрации сперматозоидов, согласно Руководству, ВОЗ по исследованию и обработке спермы человека, 5-ая редакция (2010 год), принято считать - 15×10^6 сперматозоидов на 1 мл эякулята.

От концентрации сперматозоидов в сперме может зависеть оплодотворение и наступление беременности, она определяется объемом секретов семенных пузырьков и простаты (Eliasson, 1975) и не является особой мерой тестикулярной функции.

Представленным способом окрашиваются все клетки, имеющиеся в образце (интерференция при соблюдении требований инструкции по применению отсутствует). Интерпретация и последующий подсчет окрашенных клеток проводится врачом КЛД, обучившимся по соответствующей программе повышения квалификации продолжительностью не менее 18 часов («Практический курс спермограммы, 18 часов»; «Спермограмма. Основы цитологии осадка эякулята, 18 часов», «Анализ спермы человека, 36 часов») по направлению дополнительного профессионального образования по специальности 31.08.05 «Клиническая лабораторная диагностика» в уполномоченных на проведение указанных программ образовательных организаций можно найти на сайте www.ssc-school.com.

При осуществлении способа используются пробирки конические градуированные, полипропиленовые, нестерильные 15 мл; стекла предметные толщ. $2,0 \pm 0,2$ мм; стекла покровные 24×24 мм; шпатели для растяжки мазков лабораторные одноразовые; раствор для сброса использованного расходного материала; одноканальные автоматические дозаторы переменного объема 10-100 мкл наконечники к одноканальному автоматическому дозатору переменного объема 2-200 мкл; перчатки медицинские диагностические одноразовые (ГОСТ Р 52239); микроскоп; защитные очки; камера Горяева; пипетки Пастера; стеклянная палочка; лабораторный счетчик; цилиндры мерные вместимостью 25-1000 мл; секундомер, бумага фильтровальная.

Определение производится из биологического образцов человека (семенная жидкость). Биологический материал «эякулят» для окрашивания набором рекомендуется хранить не более 12 часов при температуре от 25 до 37°C.

Для приготовления рабочего раствора необходимо: к флакону с Реагентом №1 (Проявитель) добавляют 10 мкл Реагента №2 (перекись водорода 30%) и перемешивают. Рабочий раствор возможно использовать в течение 24 часов после приготовления, при хранении 0-5 град.С. Если рабочий раствор не удастся использовать полностью в течение указанного времени (в течение 24 часов после приготовления, при хранении от 0 до 5°С), допустимо замораживание аликвот рабочего раствора в течение 1 месяца с последующим однократным размораживанием перед проведением последующего исследования для окраски лейкоцитов и подсчета их концентрации.

Реагенты №№3-7 готовы к использованию.

Если разжижение эякулята не наступило в течение 60 минут, в пробирку со всей порцией эякулята вносят пипеткой Пастера равное количество Реагента №7 Фосфатно-солевой раствор бромелайна (развести образец эякулята в два раза), размешивают, не допуская образования пузырьков. Инкубируют пробирку в термостате при температуре 37°С 10 минут.

Процедура разжижения может влиять на биохимические показатели эякулята, его подвижность и морфологию сперматозоидов, поэтому использование процедуры должно быть записано.

Разведение в два раза должно быть учтено при расчете концентрации сперматозоидов и лейкоцитов умножением полученных результатов на 2.

Для окраски ППК в эякуляте тщательно перемешивают образец спермы, не допуская образования пузырьков и пены. В пробирку помещают аликвоту из 20 мкл спермы и 180 мкл рабочего раствора рабочего раствора из реагентов 1-2 (разведение 1:10) - готовая смесь исследуемого препарата (Пробирка №1).

Перемешивают суспензию в пробирке в течение 10 сек. стеклянной палочкой и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут

После предварительного повторного перемешивания суспензии заполняют две стороны камеры Горяева для двукратного подсчета лейкоцитов с последующим определением средней величины (в целях минимизации ошибки). Для осаждения клеток удерживают камеру Горяева горизонтально не менее 4 минут при комнатной температуре.

Оценивают заполненные камеры в световом микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.

Нейтрофильные лейкоциты, окрашиваются в коричневый цвет т.к. содержат пероксидазу.

Клетки, не содержащие пероксидазу (сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные тельца, эпителий) не окрашиваются в коричневый цвет (остаются бесцветными).

Подсчитывают число ППК в квадратах камеры Горяева с помощью лабораторного счетчика.

Подсчет концентрации лейкоцитов/ППК осуществляется двумя вариантами
1-ый вариант если круглые клетки (КК) расположены в монослоях (не большое/малое количество после предварительной визуальной оценки), лейкоциты (ППК) считаются в 100 больших квадратах камеры Горяева.

Расчет проводят по формуле:

$$L = (a \times 250 \times 10 \times 1000) / (100 \times 1000000) \text{ [млн/мл]}$$

где L - количество лейкоцитов (ППК) в 1 мл эякулята, а - количество лейкоцитов (ППК) в 100 больших квадратах, 250 - $\frac{1}{250}$ - объем одного большого квадрата, 10 -

степень разведения спермы, 1000-1000 мкл в 1 мл эякулята, 100 - количество больших квадратов (фиг. 1).

Сокращенный вариант формулы:

$$L=a/40 \text{ [млн/мл]}$$

- 5 *При пересчете на млн/мл (установленные ВОЗ единицы измерения), необходимо полученный результат разделить на 1000000.

На фиг. 1 показано 100 больших квадратов камеры Горяева, разделенных на 4 малых.

Пример: при подсчете в 100 больших квадратах камеры Горяева было обнаружено 35 ППК. Расчет концентрации лейкоцитов (ППК) в 1 мл спермы $L=35/40=0,875$ млн/мл.

- 10 2-ой вариант подсчета концентрации ППК

Если круглые клетки (КК) расположены в мультислоях (большое количество после предварительной визуальной оценки), можно считать клетки в 40 больших квадратах (20 квадратов сверху сетки и 20 - внизу). Расчет вести по формуле:

$$L=(a \times 250 \times 10 \times 1000)/(40 \times 1000000) \text{ [млн/мл]}$$

- 15 где а - количество лейкоцитов (ППК) в 40 больших квадратах, $250 - \frac{1}{250}$ - объем одного большого квадрата, 10 - степень разведения спермы, 1000-1000 мкл в 1 мл эякулята, 40 - количество больших квадратов (фиг. 2).

Сокращенный вариант формулы:

- 20 $L=a \times 0,0625$ [млн/мл]

Пример: при подсчете в 40 больших квадратах камеры Горяева было обнаружено 25 ППК. Расчет концентрации лейкоцитов (ППК) в 1 мл спермы $L=25 \times 0,0625=1,5625$ млн/мл.

На фиг. 2 показано 40 больших квадратов камеры Горяева, разделенных на 4 малых.

- 25 Расчет концентрации сперматозоидов в эякуляте

1. В случае если сперматозоиды лежат в монослоях (малое количество после предварительной визуальной оценки), то подсчет концентрации сперматозоидов проводят в этой же стороне камеры Горяева, где были подсчитаны лейкоциты, то есть в прежнем разведении 1:10.

- 30 2. Оценивают заполнение камеры в световом микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.

3. Подсчитывают число сперматозоидов с помощью лабораторного счетчика.

4. Подсчитывают не менее двух сторон камеры Горяева для того, чтобы достичь приемлемо низкой ошибки.

- 35 Расчет ведут по 1-ому варианту:

1-ый вариант подсчета концентрации сперматозоидов

При разведении эякулята 1:10 концентрация сперматозоидов определяется в 5 больших квадратах (фиг. 3) камеры Горяева, разделенных на 16 малых, по диагонали. Расчет проводят по формуле:

- 40 $C=a \times 500000$ [млн/мл]

где С - концентрация сперматозоидов в 1 мл акулата, а - количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали

На фиг. 3 показано 5 больших квадратов камеры Горяева, разделенных на 16 малых.

- 45 Пример: при подсчете в 5 больших квадратах по диагонали камеры Горяева было обнаружено 135 сперматозоидов. Расчет концентрации сперматозоидов в 1 мл спермы $C=135 \times 500\,000=67,5$ млн/мл.

В случае если сперматозоиды лежат в мультислоях (большое количество после предварительной визуальной оценки), необходимо увеличить разведение до 1:20 и более

путем добавления в пробирку №1 с исследуемым раствором еще 200 мкл рабочего раствора. В случае, если необходимо разведение 1:40, 1:80, то необходимо добавлять в пробирку №1 с существующим разведением каждый раз по 200 мкл рабочего раствора соответственно.

5 При дополнительном разведении рабочего раствора для подсчета концентрации сперматозоидов необходимо заполнять новые свободные камеры Горяева.

После предварительного аккуратного повторного перемешивания суспензии заполняют камеру Горяева. Для осаждения клеток удерживают камеру Горяева горизонтально не менее 4 минут при комнатной температуре.

10 Оценивают заполненную камеру в световом микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.

Подсчитывают число сперматозоидов с помощью лабораторного счетчика.

Подсчитывают не менее двух сторон камеры Горяева для того, чтобы достичь приемлемо низкой ошибки.

15 Расчет ведут по 2-ому варианту подсчета концентрации сперматозоидов:

При разведении эякулята 1:20, концентрацию сперматозоидов считают также в 5 больших квадратах (фиг. 4) камеры Горяева, разделенных на 16 малых, по диагонали. Расчет проводят по формуле:

$$C = a \times 1000000 \text{ [млн/мл]}$$

20 где C - концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята, а - количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали

На фиг. 4 показано 5 больших квадратов камеры Горяева, разделенных на 4 малых.

Пример: при подсчете в 5 больших квадратах по диагонали камеры Горяева было обнаружено 135 сперматозоидов. Расчет концентрации сперматозоидов в 1 мл спермы

25 $C = 135 \text{ млн/мл}$.

Далее проводят дифференциальную диагностику живых и мертвых сперматозоидов (окраска по Блюму) образцов эякулята:

Для этого эякулят тщательно перемешивают. Наносят стеклянной палочкой 1 каплю на предметное стекло. Рядом наносят 2 капли раствора эозина (Реагент №3 Раствор эозина, 5% водный). Каплю эякулята перемешивают с раствором эозина и выдерживают 30 5 секунд. Добавляют 3 капли раствора нигрозина (Реагент №4 Раствор нигрозина, 10% водный), перемешивают и выдерживают 5 секунд. Шпателем лабораторным готовят тонкий мазок.

Мазок высушивают и микроскопируют при увеличении $\times 400$ (объектив $\times 40$, окуляр 35 $\times 10$).

В результате окраски:

- мертвые сперматозоиды при окрашивании реагентами 3 и 4 окрашиваются в красный цвет.

40 - живые сперматозоиды при окрашивании реагентами 3 и 4 не окрашиваются (остаются бесцветные).

Далее проводится окраска сперматозоидов образцов эякулята по Романовскому:

Делают мазки на предметных стеклах, высушивают на воздухе либо в термостате при температуре не выше 37°C до исчезновения влажного блеска. Фиксируют высушенные препараты неразведенным раствором фиксатора-красителя по Май-Грюнвальду (Реагент №6 Фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду) - наливают неразбавленный раствор фиксатора-красителя так, чтобы он 45 покрыл весь мазок в течение 1-2 мин. Смывание фиксатора перед окраской не требуется.

Непосредственно перед окраской мазков готовят рабочий раствор красителя:

смешивают раствор красителя (Реагент №5 Краситель азур-эозин по Романовскому) с деионизированной/дистиллированной водой в соотношении 1+4 (1:5) (на 10 мл красителя 40 мл воды). Полученный рабочий раствор красителя можно хранить до 5-7 суток в закрытом контейнере. На фиксированные мазки эякулята наливают рабочий раствор красителя, по истечении 15-20 мин препараты промывают деионизированной/дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют.

При превышении времени фиксации фиксатором-красителем может произойти чрезмерное высыхание его на мазке крови и выпадение точечных кристаллов красящего вещества, видимых в поле зрения микроскопа и мешающих проведению микроскопического исследования. При появлении этого эффекта необходимо уменьшить время фиксации.

Результаты окраски оценивают методом микроскопии.

Головки сперматозоидов при окрашивании реагентами 5 и 6 окрашиваются в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью.

Хвосты сперматозоидов при окрашивании реагентами 5 и 6 окрашиваются в нежно-сиреневый цвет.

Цитоплазматическая капля и шейка сперматозоида при окрашивании реагентами 5 и 6 окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

Учет результатов. Контроль качества.

В качестве положительного контроля при определении окраски форменных элементов образцов эякулята, используют цельную кровь. Цельная кровь должна использоваться в течение не более 24 часов после сбора (при хранении более 2 часов, хранить при температуре от 2 до 8°C; температура хранения от 20 до 25°C допустима менее двух часов; замораживание не допускается) и не должна содержать никаких добавок, таких как антикоагулянты. Тестируемая кровь будет содержать различные типы лейкоцитов, в том числе окрашенные в коричневый цвет в этой реакции. Некоторые будут неокрашенными. Таким образом, один и тот же препарат контрольного образца будет иметь как положительные контроль - окрашенные в коричневый цвет лейкоциты (гранулоциты), так и отрицательный контроль - неокрашенные лейкоциты. Для отдельного отрицательного контроля, выполняют анализ без использования перекиси. В этом протоколе анализируемая кровь будет содержать неокрашенные лейкоциты.

В качестве примера, на фиг. 5 и фиг. 6 приведены реальные результаты практических клинических исследований по способу, принятому в качестве прототипа и по предлагаемому способу. Цель обследования - определить причину бесплодия.

Сравнение результатов обследования, полученных в соответствии с известным и представленным способами (фиг. 5 и 6), позволяет сделать следующее заключение:

1) Анализ спермы (спермограммы) мужчины 39 лет от 01.10.2019 г, выполненный в клинике, выявил незначительные изменения в подвижности сперматозоидов - "Астенозооспермия".

2) Анализ спермы (спермограммы) того же мужчины 39 лет от 05.10.2019 г, выполненный экспертами Международной Школы Цитологии представленным способом выявил:

более глубокие нарушения фертильности

мужчины: "Олигостенотератозооспермия. Некрозооспермия"

наличие воспаления, которое может являться причиной мужского бесплодия, а также свидетельствовать об асимптомном течении вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (hrHPV): "Пиоспермия"

Исследование представленным способом позволило назначить квалифицированное

лечение.

Таким образом, применение представленного способа позволяет исключить недостатки, присущие известным способам, представленный способ имеет следующие преимущества:

- 5 1. Обеспечивает определение двух важнейших параметров спермограммы в одной пробирке что повышает производительность диагностики и объективность контроля.
2. Фиксация и разведение образца спермы проводятся безвредным для аспирации верхними дыхательным путями и не канцерогенным раствором 30% Перекиси водорода.
3. Реагент №2, применяемый в предлагаемом способе, (перекись водорода 30%)
10 позволяет использовать рабочий раствор реагента как для подсчета концентрации пероксидазо-положительных клеток (ППК) при разведении спермы 1:10, так и фиксировать подвижные клетки в целях последующего подсчета концентрации сперматозоидов при разведении эякулята от 1:10 и выше в больших квадратах камеры Горяева, используя соответствующие формулы, что повышает объективность и
15 достоверность результатов диагностики.
4. Объективизирована оценка требуемого разведения для дальнейшего подсчета концентрации сперматозоидов:
 - В случае если сперматозоиды лежат в монослоях (малое количество после предварительной визуальной оценки), то подсчет концентрации сперматозоидов
20 необходимо проводить в этой же стороне камеры Горяева, где были подсчитаны лейкоциты, то есть в прежнем разведении 1:10.
 - В случае если сперматозоиды лежат в мультислоях (большое количество после предварительной визуальной оценки), то необходимо увеличить разведение до 1:20 и более путем добавления в пробирку №1 с исследуемым раствором еще 200 мкл рабочего
25 раствора. В случае, если необходимо разведение 1:40, 1:80, то необходимо добавлять в пробирку №1 с существующим разведением каждый раз по 200 мкл рабочего раствора соответственно.
5. Представлены вариативные модели для расчета концентрации лейкоцитов и концентрации сперматозоидов в зависимости от результатов предварительной, более
30 объективной оценки количества сперматозидов и разведения эякулята, основанного на ней, что повышает объективность и достоверность результатов диагностики.

(57) Формула изобретения

1. Способ исследования эякулята для диагностики нарушений сперматогенеза и
35 бесплодия, включающий сбор эякулята, подготовку препарата для исследования, подготовку счетной камеры Горяева, осаждение клеток, определение количества больших квадратов камеры, необходимых для подсчета лейкоцитов и сперматозоидов, причем
 - для фиксации и разведения эякулята используют единственный рабочий раствор,
40 который готовят путем размешивания проявителя и 10 мкл 30% перекиси водорода, в качестве проявителя используют смесь натрия фосфорнокислого двузамещенного; калия фосфорнокислого однозамещенного; аммония хлористого; динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты и бензидина,
 - препарат для исследования готовят путем помещения в пробирку эякулята и
45 рабочего раствора при разведении по меньшей мере 1:10, перемешивают в течение 10 сек. и инкубируют при температуре 37°C в течение 30 минут, при этом осуществляется окрашивание лейкоцитов в коричневый цвет, а сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные

тельца, эпителии остаются бесцветными,

- заполняют препаратом две стороны счетной камеры Горяева для двукратного подсчета окрашенных лейкоцитов и сперматозоидов с последующим определением средней величины, удерживают счетную камеру Горяева в горизонтальном положении

5 не менее 4 минут при комнатной температуре для осаждения клеток,

- определяют концентрацию сперматозоидов и лейкоцитов в квадратах счетной камеры Горяева,

10 - выполняют окрашивание эякулята раствором эозина, 5% водным и раствором нигрозина, 10% водным для определения количества мертвых, окрашенных в красный цвет, и живых остающихся неокрашенными сперматозоидов,

- выполняют окрашивание эякулята раствором красителя азур-эозин по Романовскому и фиксатор-красителем эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду для выявления структур сперматозоидов,

используют полученные в результате исследования эякулята данные для диагностики.

15 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что определение концентрации сперматозоидов и лейкоцитов в больших квадратах счетной камеры Горяева проводят, используя разведение в соответствии с предварительной визуальной оценкой.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что при малом количестве сперматозоидов, оцененном предварительной визуальной оценкой, определение концентрации

20 сперматозоидов осуществляют в той стороне камеры Горяева, где были подсчитаны лейкоциты при разведении препарата 1:10.

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что определение концентрации сперматозоидов в 5 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 16 малых, по диагонали проводят при разведении эякулята : рабочий раствор 1:10 по формуле

25 $C = a \times 500000$ [млн/мл],

где С - концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята, а - количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали.

5. Способ по п. 2, отличающийся тем, что при большом количестве сперматозоидов, оцененном предварительной визуальной оценкой, увеличивают разведение препарата

30 до 1:20, 1:40 или 1:80, добавляя к исследуемому препарату по 200 мкл рабочего раствора.

6. Способ по п. 2, отличающийся тем, что концентрацию сперматозоидов при большом количестве сперматозоидов, оцененном предварительной оценкой, определяют в 5 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 16 малых, по диагонали при разведении эякулята : рабочий раствор 1:20 по формуле

35 $C = a \times 1000000$ [млн/мл],

где С - концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята, а - количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали.

7. Способ по п. 2, отличающийся тем, что при большом количестве сперматозоидов в эякуляте, оцененном предварительной оценкой, увеличивают разведение до 1:40, 1:

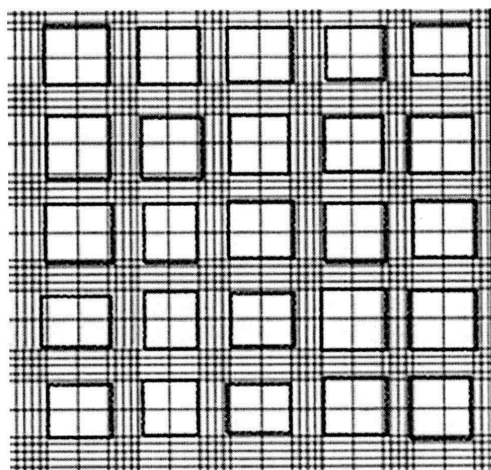
40 50, 1:80 или 1:100, каждый раз добавляя по 200 мкл рабочего раствора.

8. Способ по п. 5 или 7, отличающийся тем, что при увеличении разведения для подсчета концентрации сперматозоидов заполняют свободные квадраты камеры Горяева.

9. Способ по одному из пп. 1-8, отличающийся тем, что осуществляют контроль

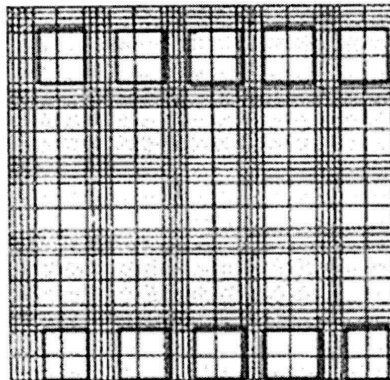
45 качества исследования, при этом в качестве положительного контроля при определении окраски лейкоцитов образцов эякулята используют цельную кровь, результаты окраски оценивают методом микроскопии.

1

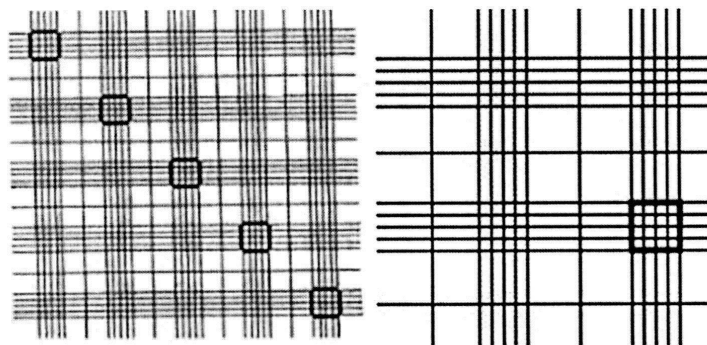


Фиг. 1

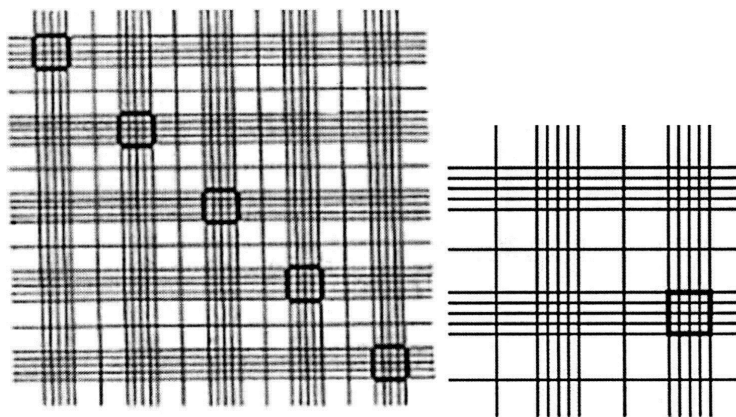
2



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

ЛОГОТИП «КЛИНИКА»

Сайт
Телефон
Город
Адрес

СПЕРМОГРАММА

ФАМИЛИЯ ИМЯ ОТЧЕСТВО

Возраст 41 лет

Дата и время сбора: 01/10/2019г 8.30

ПОКАЗАТЕЛЬ	РЕЗУЛЬТАТ	ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ	Минимальное референсное значение (ВОЗ, 5-ое изд, 2010 г.)
Количество дней воздержания: 3 дни			
Макроскопическое исследование			
Объем	1,5	мл	1,5
Вязкость	18	мм	≤20
Резкокоагулируемость	40	мин	≤60
Цвет	Серовато-желтоватый		серовато-беловатый
Запах	специфический		специфический
pH	7,8		>7,2
Мутность	мутная		мутная
Микроскопическое исследование			
Концентрация (кол-во /мл)	38	млн	≥15
Общее кол-во сперматозоидов в эякуляте	57	млн	≥39
(А) Прогрессивно-подвижные (РВ)	10	%	≥32
(В) Непрогрессивно-подвижные(НР)	39	%	
(А+В) Общая подвижность	49	%	≥40
(С) Неводящие (ИМ)	51	%	
Жизнеспособность	60	%	≥58
Агглютинация ⁴	нет	степени: 1,2,3,4/ A,B,C,D,E	нет
Агрегация	нет		нет
Лейкоциты	0,3125	млн/мл	≤1
Эритроциты	нет	в п/з	нет
Липидные тельца	немного	в п/з	немного
Аминокриные тельца	нет	в п/з	нет
Макрофаги, спермофаги	нет	в п/з	нет
Морфологическое исследование			
Нормальные формы	23	%	≥4
<u>Критерии Крюгера</u> -патология головки -патология шейки -патология хвоста -цитоплазматические капли	Подсчет не целесообразен в виду нормального количества нормальных форм		
Клетки сперматогенеза	1-2		
ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Астеноспермия.			

⁴Степень 1 (частичная) <10 сперматозоидов в агглютинате, много отделено лежащих.
Степень 2 (умеренная) 10-50 сперматозоидов в агглютинате, встречаются отдельно лежащие.
Степень 3 (выраженная) агглютинаты более чем из 50 сперматозоидов, единичные отдельно лежащие.
Степень 4 (тотальная) все сперматозоиды в агглютинатах.
А-головка-головка; В-жгутик-жгутик; С-кончик жгутика-кончик жгутика; D-смешанный; E-беспорядочный

Дата выпуска анализа 01.10.2019 г

Врач

ФАМИЛИЯ ИМЯ ОТЧЕСТВО

Фиг. 5



Международная Школа Цитологии
International Cytology School

<https://www.ssc-school.com>
https://vk.com/ssc_school
8 (499) 398 20 97
Россия – Москва

СПЕРМОГРАММА

ФАМИЛИЯ ИМЯ ОТЧЕСТВО

Возраст 41 лет

Дата и время сбора: 05/10/2019г 9.40

ПОКАЗАТЕЛЬ	РЕЗУЛЬТАТ	ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ	Минимальное референсное значение (ВОЗ, 5-ое изд. 2010 г)
Количество дней воздержания: 3 дня			
Макроскопическое исследование			
Объем	1,3	мл	1,3
Вязкость	20	мм	≤20
Разжижение	30	мин	≤60
Цвет	Желтый		серовато-беловатый
Запах	специфический		специфический
pH	7,3		≥7,2
Мутность	полупрозрачная		мутная
Микроскопическое исследование			
Концентрация (кол-во /мл)	13	млн	≥13
Общее кол-во сперматозоидов в эякуляте	19,3	млн	≥39
(A) Прогрессивно-подвижные (PR)	3	%	≥32
(B) Непрогрессивно-подвижные (NP)	30	%	
(A+B) Общая подвижность	33	%	≥40
(C) Неподвижные (IM)	67	%	
Жизнеспособность	43	%	≥58
Агглютинация*	нет	степени: 1,2,3,4/ A,B,C,D,E	нет
Агрегация	нет		нет
Лейкоциты	1,5623	млн/мл	≤1
Эритроциты	нет	в п/з	нет
Липоидные тельца	немного	в п/з	немного
Амлоидные тельца	нет	в п/з	нет
Макрофаги, спермиофаги	нет	в п/з	нет
Морфологическое исследование			
Нормальные формы	3	%	≥4
Консервация Консервация:			
-патология головки	76		
-патология шейки	10		
-патология хвоста	4		
-цитоплазматические капли	7		
Клетки сперматогенеза	1-2		
ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Олигоастенотератозоспермия. Некрозооспермия. Пиоспермия.			
*Степень 1 (частичная) <10 сперматозоидов в агглютинате, много отдельно лежащих Степень 2 (умеренная) 10-30 сперматозоидов в агглютинате, встречаются отдельно лежащие Степень 3 (выраженная) агглютинаты более чем из 30 сперматозоидов, единичные отдельно лежащие Степень 4 (тотальная) все сперматозоиды в агглютинатах А-головки-головки; В-жгутики-жгутики; С-кончики жгутика-кончики жгутика; D-смешанная; E-беспорядочная			

Дата выпуска анализа 05.10.2019 г

Врач

Сапожкова Ж.Ю., к.м.н., МАС

Фиг. 6