

DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.026>  
УДК 616.697

Сапожкова Ж.Ю.<sup>1,2</sup>, Еремин К.И.<sup>1</sup>, Долгов В.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Международная школа цитологии, Москва, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Подольский диагностический центр, Подольск, Россия

<sup>3</sup> Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Sapozhkova Zh.<sup>1,2</sup>, Eremin K.<sup>1</sup>, Dolgov V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> International Cytology School, Moscow, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Centre of Laboratory Diagnostics, Podolsk, Russia

<sup>3</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

## Унификация процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчины

Unification of Procedures of Cytochemical Staining of Human Ejaculate to Determine the True Fertility of Men

---

### Резюме

Руководство ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) регламентирует цитохимическое окрашивание форменных элементов эякулята для последующего определения статуса фертильности мужчины. Несмотря на то что во всех странах этот документ является основополагающим в анализе спермы, существуют определенные сложности и ограничения его использования в России. В целях установления истинной репродуктивной возможности и мониторинга сперматогенеза предлагается стандартизация протокола цитохимического окрашивания эякулята, который заложен в наборе реагентов отечественного производства «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия). Набор полностью соответствует прописям руководства ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) и российским рекомендациям, т. е. полностью подтверждена идентичность полученных результатов окраски. Набор является безопасным для использования, не содержит веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием или влияющим на репродуктивную функцию человека. Технологические возможности набора определяют стандартизированные подходы в протоколе цитохимического окрашивания элементов эякулята, тем самым исключая ошибки аналитического этапа спермограммы. Унификация диагностических процедур анализа спермы человека представляется необходимым шагом на пути сохранения репродуктивного здоровья семьи.

**Ключевые слова:** анализ спермы человека, спермограмма, пероксидазоположительные клетки, жизнеспособность сперматозоидов, нормальная и anomальная морфология сперматозоидов.

---

### Abstract

Currently, WHO guidelines (5th edition, 2010) regulate the cytochemical staining protocol for human semen examination to determine the fertility status in men. Even though this document

is fundamental for semen analysis worldwide, it is not so often used in Russia due to peculiarities of Russian laboratory market. In order to avoid the non-suitable peculiarities of the WHO staining protocol, as well as to reveal the true fertility in men, there was developed a home-produced set of reagents (GEMSTANDART-SEMEN ANALYSES, LLC "GEMSTANDART", Saint Petersburg, Russia), which lets to obtain completeness of the cytochemical staining protocol. The identity of the set of reagents and the WHO staining protocol in the way to obtain the coloration results is fully confirmed. The GEMSTANDART-SEMEN ANALYSES (LLC "GEMSTANDART", Saint Petersburg, Russia) is safe to use, because it does not contain the substances that have a carcinogenic, mutagenic or other effect on human reproductive system. The technological capabilities of the set determine the standardized approaches in the protocol of cytochemical staining of the elements of ejaculate, thereby eliminating the errors of the analytical stage of the semen analyses. Such approach seems to be a necessary step for unification of the semen analysis protocol in Russia for preserving the reproductive health of family.

**Keywords:** human semen analysis, semen analysis, peroxidase-positive cells, sperm vitality, normal and abnormal sperm morphology.

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Руководство ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) регламентирует цитохимическое окрашивание форменных элементов эякулята для последующего определения статуса фертильности мужчины [3, 14]. Несмотря на то, что в других странах этот документ является фундаментальным в анализе спермы [13, 14], существуют определенные сложности и ограничения его использования в России. Руководство ВОЗ рекомендует применение ряда реагентов для окрашивания, не зарегистрированных в России и содержащих канцерогенные прекурсоры. Отсутствие обработки спермы реагентами для надлежащего цитохимического окрашивания, рекомендованными в прописях ВОЗ, является главным источником ошибочного определения уровня истинных лейкоцитов / пероксидазоположительных клеток (ППК), а также живых и мертвых сперматозоидов в российских лабораториях. Оценка ППК, жизнеспособности эякулята, а также морфологии сперматозоидов остается одним из проблемных параметров анализа спермы, неверная оценка которых приводит к разнотению результатов, недостоверной диагностике и неправильному лечению. В целях установления истинной репродуктивной возможности и мониторинга сперматогенеза мужчины предлагается унификация процедур цитохимического анализа спермы человека, который заложен в наборе реагентов отечественного производства «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия).

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с мая по ноябрь 2019 г. на учебной базе Международной школы цитологии (Москва) проведен корреляционный анализ результатов клинического анализа спермы от 200 мужчин 29–65 лет. Исследования выполнены в клинико-диагностической лаборатории сети медицинских клиник г. Подольска двумя способами.

Способ 1. Используются растворы, приготовленные согласно прописям рекомендаций и протоколов по анализу спермы человека, представленных в широком доступе в интернете [1–4, 7, 10–14]. Прописи

содержат вещества, обладающие канцерогенным, мутагенным действием (насыщенный раствор формальдегида, орто-толуидин).

Способ 2. Используется набор реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (далее – набор) для комплексной оценки показателей спермограммы, в том числе для цитохимической окраски ППК и сперматозоидов, применяемой для определения их жизнеспособности и морфологии, что является одной из инновационных составляющих набора. В состав набора входят следующие компоненты для окрашивания: Реагент № 1 – проявитель: смесь натрия фосфорнокислого двузамещенного, калия фосфорнокислого однозамещенного, аммония хлористого, динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты и бензидина; 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, содержащий фосфатно-солевой раствор бромелайна, для окрашивания не предназначен, а используется лишь в целях разжижения вязкого эякулята. Набор не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого или животного происхождения; в нем нет веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием или влияющим на репродуктивную функцию человека.

#### **Принцип действия реагентов для цитохимического окрашивания в способе 2**

Реагенты № 1 и Реагенты № 2, входящие в состав набора, при обработке образца спермы окрашивают в коричневый цвет клетки, содержащие пероксидазу (нейтрофильные лейкоциты). Клетки, не содержащие пероксидазу (сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистициты, эритроциты, липоидные тельца, эпителий), остаются бесцветными. В качестве положительного контроля при определении окраски ППК образцов эякулята используется цельная кровь, результаты окраски оценивают микроскопией.

Реагент № 3 и Реагент № 4 предназначены для цитохимического окрашивания живых и мертвых сперматозоидов. В результате взаимодействия двух реагентов, смешанных в строго определенных соотношениях с эякулятом на предметном стекле, отчетливо визуализируются под микроскопом окрашенные эозином в красный цвет мертвые сперматозоиды и неокрашенные (бесцветные) живые сперматозоиды. Нигрозин обеспечивает темное окрашивание фона, что упрощает идентификацию бледно-окрашенных сперматозоидов.

Реагент № 5 и Реагент № 6 идентифицируют внутриклеточные субстанции эякулята. Принцип действия основан на том, что они имеют разную pH и связываются с компонентами клеток, имеющих противоположную реакцию. Ацидофильные структуры окрашиваются в разные тона красного цвета, базофильные структуры – в тона от пурпурового до синего. Ядра клеток богаты нуклеиновыми кислотами, имеют кислую реакцию и окрашиваются азур-эозином в сине-фиолетовый цвет. При использовании окраски по Романовскому и Май-Грюнвальду головки сперматозоидов окрашиваются в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью. Хвосты сперматозоидов окрашиваются в нежно-сиреневый цвет.

### **Приготовление рабочего раствора из реагентов 1, 2**

К флакону с Реагентом № 1 осторожно добавить 10 мкл Реагента № 2 и перемешать. Рабочий раствор использовать в течение 24 часов при хранении при 0–5 °С. Остатки неизрасходованного рабочего раствора аликвотировать по 500 мкл в сухие микропробирки типа Эппендорф и заморозить. Допускается 1 месяц хранения в морозильной камере с последующим однократным размораживанием перед проведением исследования.

Реагенты № 3–6 готовы к использованию.

### **Окрашивание ППК в эякуляте**

1. Тщательно перемешать образец спермы, не допуская образования пузырьков и пены.
2. В пробирку поместить аликвоту из 20 мкл спермы и 180 мкл рабочего раствора (разведение 1:10) – готовая смесь исследуемого препарата.
3. Аккуратно перемешать суспензию в течение 10 с. стеклянной палочкой и инкубировать при 37 °С 30 минут.
4. После предварительного аккуратного повторного перемешивания суспензии заполнить две стороны камеры Горяева.
5. Для осаждения клеток удерживать камеру Горяева горизонтально не менее 4 минут при комнатной температуре.
6. Оценить ППК в заполненной камере в световом микроскопе.

### **Окрашивание живых и мертвых сперматозоидов в эякуляте**

1. На предметное стекло разместить 10 мкл спермы.
2. Добавить 20 мкл Реагента № 3.
3. Аликвоту эякулята и Реагент № 3 размешать на предметном стекле и оставить для окрашивания на 5 с.
4. К полученной смеси добавить 30 мкл Реагента № 4.
5. Все размешать и оставить для последующего окрашивания на 5 с.
6. Оценить живые и мертвые сперматозоиды в световом микроскопе.

### **Окрашивание сперматозоидов для определения их морфологии**

1. Приготовление и фиксация препаратов. Сделать мазки из эякулята на предметных стеклах, высушить на воздухе либо в термостате при температуре не выше 37 °С до исчезновения влажного блеска. Зафиксировать высушенные препараты неразведенным раствором фиксатора-красителя по Май-Грюнвальду (Реагент № 6 Фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду) – налить неразбавленный раствор фиксатора-красителя так, чтобы он покрыл весь мазок в течение 1–2 мин. Смыть фиксатор перед окраской не требуется.
2. Проведение окраски. Непосредственно перед окраской мазков приготовить рабочий раствор красителя: смешать 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 налить рабочий раствор красителя,

по истечении 15–20 мин. препараты промыть деионизированной/дистиллированной водой, высушить и микроскопировать.

### **Процедура проведения цитохимического окрашивания эякулята двумя способами**

В способе 1 процедура цитохимического окрашивания эякулята состояла из двух этапов: 1) окрашивание живых/мертвых сперматозоидов различными методами, предложенными руководством ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) [3, 14] и российскими рекомендациями [1, 2, 4]; 2) окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов. Этап окрашивания ППК был заменен на оценку присутствия нейтрофильных гранулоцитов субъективно (на глаз) по косвенным идентификационным признакам.

В способе 2 процедура цитохимического окрашивания эякулята состояла из трех этапов: 1) окрашивание живых/мертвых сперматозоидов методом, заложенным в наборе; 2) окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов методом, заложенным в наборе; 3) окрашивание ППК методом, заложенным в наборе.

## **■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Способом 1 и способом 2 параллельно было исследовано 200 образцов эякулята по четырем диагностическим параметрам: концентрация лейкоцитов, концентрация сперматозоидов, жизнеспособность эякулята и морфология сперматозоидов. Оценивалось количество образцов, в которых показатели не соответствовали референсным значениям, указанным в 5-м руководстве ВОЗ, 2010 г. (см. таблицу).

Результаты таблицы свидетельствуют о том, что при оценке свойств эякулята способом 1 из 200 исследованных образцов в 136 (68 %) выявлены отклонения, выходящие за референтные значения; в способе 2 патологические отклонения выявлены в 37% тех же образцов эякулята. Как видно из таблицы, высокий процент выявленных отклонений способом 1 – это преимущественно пиоспермия и некрозооспермия; расхождение в сорок одном (41) и одиннадцати (11) результатах соответственно.

Согласно данным литературы [5–10], умеренные уровни ППК в эякуляте (<1 млн/мл) являются физиологической нормой; при более высоких концентрациях (1–2,5 млн/мл) сперма может оставаться фертильной.

### **Сравнительные результаты выявления показателей эякулята использованными способами, выходящие за референсные значения, указанные в 5-м руководстве ВОЗ**

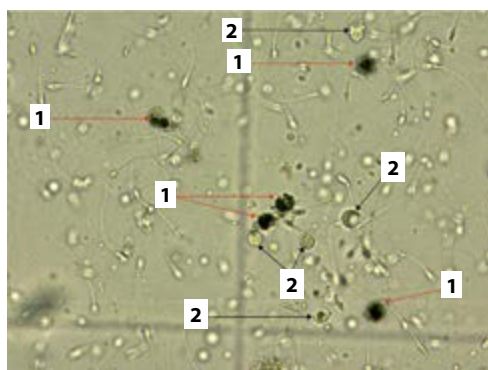
| <b>Выявленная патология (анализировано 200 образцов эякулята)</b> | <b>Способ 1, результат</b> | <b>Способ 2, результат</b> |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Пиоспермия (концентрация ППК (лейкоцитов) >1 млн/мл)              | 96                         | 55                         |
| Некрозооспермия (количество живых сперматозоидов <58%)            | 21                         | 10                         |
| Олигозооспермия (концентрация сперматозоидов <15 млн/мл)          | 11                         | 5                          |
| Тератозооспермия (количество патологических форм >4%)             | 8                          | 4                          |
| Всего категорий патологии, n                                      | 136                        | 74                         |

Необходимо обращать внимание на критично высокий уровень ППК (>2,5 млн/мл), частота наступления беременности при котором может снижаться. В этой связи крайне важно не допускать ложную пиоспермию, так как необоснованно назначенное антибактериальное лечение может необратимо спровоцировать патологию остальных главных показателей эякулята.

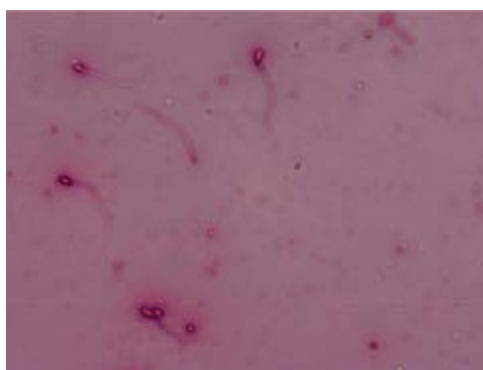
Главным источником расхождений между способами было отсутствие в способе 1 обработки спермы реагентами для цитохимического окрашивания нейтрофильных гранулоцитов, которые окрашивают круглые клетки (КК), содержащие пероксидазу, в коричневый цвет. За основу подсчета лейкоцитов способом 1 была принята известная методика количественной оценки содержания КК без цитохимического окрашивания ППК (нейтрофильных лейкоцитов) в эякуляте [1]. Недостатки методики следующие: 1) проводится оценка и определение концентрации всех КК, а не только нейтрофильных гранулоцитов/ППК в эякуляте; 2) применяются косвенные идентификационные признаки ППК: округлая форма, сегментированные ядра, микроворсинчатая поверхность, средний размер, что не соответствует рекомендациям ВОЗ. Очевидно, что методика не приемлема для мониторинга содержания лейкоцитов в сперме, так как не дает представления об их истинном содержании. Как результат происходили ошибочная интерпретация и излишний подсчет концентрации бесцветных (неокрашенных) лейкоцитов: за ППК были приняты все КК, не содержащие пероксидазу. Необходим подсчет истинных лейкоцитов, содержащих пероксидазу. Все КК были отнесены к лейкоцитам по их субъективным признакам, что привело к ложной пиоспермии. На рис. 1 представлены истинные коричневые ППК и бесцветные КК.

Согласно руководству ВОЗ (5-е издание, 2010 г.), присутствие ППК в эякуляте определяют с помощью метода цитохимического окрашивания токсичным, канцерогенным и мутагенным раствором на основе орто-толуидина [3, 14]. Использование этого протокола в России затруднено, так как: 1) отсутствует коммерчески доступный набор для окраски; составить набор из 6 реагентов затруднительно, так как орто-толуидин является прекурсором и в свободном доступе отсутствует; 2) в медицинских лабораториях запрещено использование самостоятельно приготовленных реагентов, к тому же современные лаборатории не имеют необходимого поверенного оборудования: весов, оборудования для титрования; в КДЛ России используют готовые наборы реагентов.

В соответствии с различными вариациями протоколов спермограммы [1–4, 7, 10–14] широкое применение в практике КДЛ нашла методика оценки присутствия лейкоцитов в эякуляте на тест-полоске с помощью иммунохроматографического метода, основанного на ферментативной активности лейкоцитарной эстеразы [2]. Недостатки методики заключаются в следующем: 1) позволяет приблизительно определить присутствие лейкоцитов, но не ППК в эякуляте; 2) может приводить к ложной пиоспермии, так как лейкоцитарная эстераза появляется в биологической жидкости и при разрушении лейкоцитов; 3) не дает истинного представления о наличии или отсутствии воспалительного процесса у мужчины.



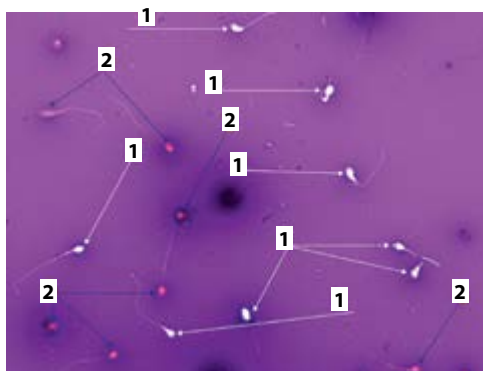
**Рис. 1.** ППК / нейтрофильные лейкоциты (1), окрашенные в коричневый цвет; КК (2) – неокрашенные (бесцветные). Нативный препарат, приготовленный способом 2.  $\times 400$



**Рис. 2.** Головки и хвосты сперматозоидов, а также лецитиновые зерна окрашены в интенсивно-красный цвет. Суправитальная окраска по Блюму (5% водный эозин) для дифференцировки жизнеспособности эякулята. Окрашенный препарат, приготовленный способом 1.  $\times 400$



**Рис. 3.** Головки сперматозоидов окрашены в интенсивно-красный цвет, хвост плохо просматривается (1); некоторые головки сперматозоидов окрашены в бело-розовый цвет (неполное окрашивание), хвост плохо просматривается (2). Представленная методика позволяет дифференцировать все сперматозоиды в поле зрения как мертвые (контактные к красителю), даже если головка сперматозоидов имеет бело-розовое окрашивание. Суправитальная окраска по модификации Блюма для дифференцировки жизнеспособности. Окрашенный препарат, приготовленный способом 1.  $\times 400$



**Рис. 4.** Головки и хвосты сперматозоидов окрашены в интенсивно-красный цвет (2); головки и хвосты живых сперматозоидов не окрашены или бесцветные (1). Сперматозоиды, окрашенные в бело-розовый цвет (неполное окрашивание), отсутствуют. Суправитальная окраска по протоколу набора для дифференцировки жизнеспособности эякулята. Окрашенный препарат, приготовленный способом 2.  $\times 400$ .

Основная причина расхождения одиннадцати (11) результатов в определении некрозооспермии способами 1 и 2 (см. таблицу) – отсутствие стандартизации при аликвотировании компонентов при суправитальной окраске по Блюму [2, 3, 14] для дальнейшего цитохимического окрашивания сперматозоидов способом 1. Метод окраски способа 1 регламентирует окрашивание в течение 30 с. на предметном стекле 1 капли эякулята и равного количества 5% водного эозина. В результате живые сперматозоиды должны оставаться бесцветными, а мертвые – окрашиваться в красный цвет [2]. Неточное дозирование компонентов и несоблюдение времени окрашивания может приводить к переокрашиванию сперматозоидов и мимикрировать живые сперматозоиды (рис. 2).

Существует методика оценки живых и мертвых сперматозоидов, описанная Е.Е. Брагиной [1], где рекомендовано окрашивание смеси 1 капли неразведенного перемешанного эякулята с 1 каплей красящего раствора из 5% водного эозина и 10% нигрозина в течение 30 с. Основной недостаток такого подхода – также отсутствие точного дозирования при аликвотировании компонентов. Как результат – переокрашивание сперматозоидов и ложная некрозооспермия (рис. 3).

В отличие от вышеупомянутых методик дифференцировки жизнеспособности эякулята, протокол окрашивания набора (способ 2) определяет строгое соблюдение дозирования аликвот и время экспозиции окрашивания, в результате достигается надлежащее качество окраски – четко видны окрашенные эозином в красный цвет мертвые сперматозоиды и неокрашенные (бесцветные) живые сперматозоиды. Такой подход обеспечивает безошибочную интерпретацию жизнеспособности (рис. 4).

Возможная причина четырех (4) расхождений в способах 1 и 2 при оценке нормальных и патологических форм сперматозоидов (см. таблицу) – применение методики быстрого окрашивания эякулята Diff-Quik [3, 14]. С одной стороны, применение экспресс-окрашивания снижает время оборота теста (TAT / turn around time), что оптимизирует производственный процесс. С другой стороны, получаются препараты более низкого качества по сравнению с мазками, окрашенными традиционным методом по Романовскому – Гимзе, что предлагает набор. Отмечается, что анализ морфологии сперматозоидов достаточно субъективен и трудно поддается стандартизации [3, 14] даже при окраске конвенциональным методом. Констатируем, что использование окрашивания по протоколу набора Реагентами № 5 и № 6 повышает качество окрашивания, что дает возможность улучшить оценку эякулята.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе клинико-лабораторных испытаний результаты окрашивания клеток эякулята реагентами набора «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия) полностью соответствуют данным литературы [1–4, 14], т. е. полностью подтверждены на идентичность полученных результатов окрашивания. Набор является безопасным для использования, так как не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого или животного происхождения; в нем нет веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием



или влияющим на репродуктивную деятельность человека. Технологические возможности набора определяют стандартизированные подходы в протоколе цитохимического окрашивания элементов эякулята, тем самым исключая ошибки аналитического этапа спермограммы. Внедрение в практику медицинской лаборатории набора, наряду с профильным повышением квалификации специалистов, представляется очевидным и неременным атрибутом диагностических процедур анализа спермы в целях сохранения мужского репродуктивного здоровья.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

## ■ ЛИТЕРАТУРА

1. Bragina E. (2014) Semen analyses protocol [Protocol provedeniya spermologicheskogo issledovaniya]. *Andrologiya i genitalnaya khirurgiya*, 1: 24.
2. Dolgov V., Lugovskaya S. (2006) *Laboratory diagnostics of male infertility* [Laboratornaya diagnostica muzhskogo besplodya]. M. Tver: «Tryada», 1: 146. (in Russian)
3. (2012) *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5<sup>th</sup> ed.* WHO [Rukovodstvo po issledovaniyu i obrabotke eyakulyata cheloveka]. Moscow, izdatelstvo «Capital Print», 305. (in Russian).
4. Schatochina I., Kuznetcova V. (2014) *Uchebnoe posobie po issledovaniyu eyakulyata* [Study guide on ejaculate analysis]. Moscow, 20 (in Russian).
5. Aitken R.J., Baker H.W. (1995) Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod.*, 10, pp. 1736–9.
6. Cao X-W., Lin K., Li C-Y., Yuan C-W. (2011) A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Zhonghua nan ke xue - National journal of andrology*, 17 (12), pp. 1059–63.
7. Esfandiari N., Sharma R.K., Saleh R.A., Thomas A.J., Jr, Agarwal A. (2003) Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J Androl.*, 24, pp. 862–70.
8. Virginie Barraud-Lange, Jean-Christophe Pont, Ahmed Ziyat, Khaled Pocate, Christophe Sifer, Isabelle Cedrin-Durnerin, Bouchra Fechtali, Beatrice Ducot, and Jean Philippe Wolf (2011) Seminal leukocytes are Good Samaritans for spermatozoa. *J. Androl. Fertil Steril*, 96, pp. 1315–9. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.
9. Kvist U., Björndahl L. (2002) *Manual on Basic Semen Analysis*. Oxford: Oxford University Press.
10. Masha Ahadi, Fereshte Aliakbari (2019) *Evaluation of the Standardization in Semen Analysis Performance According to the WHO Protocols Among Laboratories in Tehran, Iran*, 14 (2), pp. 142–147. Published online 2019 Jun 10. doi: 10.30699/IJF.14.2.142 PMID: PMC6679670
11. Menkveld R. (2007) The basic semen analysis. *Male Infertility. Ch. 9*. Oxford: Informa Healthcare, UK, pp. 141–70.
12. Suresh C Sikka, Wayne JG Hellstrom (2016) Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian J Androl.*, 18 (3), pp. 392–401. Published online 2016 Apr 8. doi: 10.4103/1008-682X.179161 PMID: PMC4854088 PMID: 27056346
13. WHO (2010) *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5<sup>th</sup> ed.* Geneva.
14. WHO (1999) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4<sup>th</sup> ed.* Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Поступила/Received: 15.01.2020

Контакты/Contacts: jannet72@mail.ru