การตรวจวิเคราะห์น้ำเชื้ออสุจิ (Semen Analysis)

วรินดา พูนทวีรัตน์
นักวิทยาศาสตร์
ศูนย์รักษาผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร

การตรวจวิเคราะห์น้ำเชื้ออสุจิ (Semen Analysis)

การตรวจวิเคราะห์น้ำเชื้ออสุจิ เป็นวิธีการทดสอบหาปริมาณ และคุณลักษณะของน้ำอสุจิ จำนวนตัวอสุจิ การเคลื่อนไหว และความผิดปกติทางรูปร่างของตัวอสุจิตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก แบ่งการตรวจออกเป็น 2 แบบหลักๆ ดังนี้

1. **การตรวจดูลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า** (Macroscopic Examination)
2. **การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์** (Microscopic Examination)

ประโยชน์ของการตรวจวิเคราะห์น้ำเชื้ออสุจิ

- **ทราบจำนวนตัวอสุจิ**
- **ทราบการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ** ถ้าการเคลื่อนไหวไม่ดีอาจส่งผลให้ไม่สามารถว่ายผ่านปากมดลูกไปพบกับไข่ในท่อนำไข่
- **ทราบรูปร่างของตัวอสุจิ** ตัวอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติอาจส่งผลเสียต่อการปฏิสนธิกับไข่

การเก็บตัวอย่างน้ำอสุจิ

- ผู้รับบริการต้องเก็บน้ำอสุจิด้วย**วิธีสำเร็จความใคร่ด้วยตนเอง (Masturbation)** โดยเก็บทุกส่วนใส่ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ
- นำส่งทันที หรือภายใน 1 ชั่วโมงหลังเก็บ
- ห้ามนำน้ำอสุจิแช่น้ำแข็งในขณะนำส่ง
- **ผู้รับบริการควรงดการมีเพศสัมพันธ์ รวมถึงการหลั่งด้วยตนเอง อย่างน้อย 2-3 วัน แต่ไม่ควรเกิน 7 วัน**

สิ่งที่ต้องเตรียมในการตรวจน้ำเชื้ออสุจิ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ภาชนะปราศจากเชื้อ
2. Makler counting chamber
3. Sterile pipette 5 ml.
4. Autopipette
5. Slide
6. กระดาษ pH
7. กล้องจุลทรรศน์

สารเคมี

1. Methanol
2. Eosin
3. Methylene blue
4. Immersion oil

การดูลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า (Macroscopic examination)

หลังจากรับตัวอย่างน้ำเชื้ออสุจิ จะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-20 นาที ให้น้ำอสุจิละลายตัวกลายเป็นของเหลว และควรทำการตรวจภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากผู้รับบริการเก็บตัวอย่างได้ โดยมีการประเมินลักษณะทางกายภาพทั่วไป ดังต่อไปนี้

- **ลักษณะทั่วไปของน้ำเชื้ออสุจิ (Appearance)**
  น้ำอสุจิตามปกติควรมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น
- **ปริมาณของน้ำเชื้ออสุจิ (Volume)**
  ควรมีมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร
- **การละลายตัว (Liquefaction)**
  น้ำอสุจิที่ปกติจะมีลักษณะหนืดข้น และจะเปลี่ยนเป็นลักษณะเหลวภายในเวลาประมาณ 15-30 นาที
- **ความหนืดของน้ำเชื้ออสุจิ (Viscosity)**
- **ความเป็นกรด-ด่าง (pH)**
  ระดับความกรดด่างของน้ำอสุจิควรอยู่ที่ 7.2

การตรวจดูด้วย กล้องจุลทรรศน์

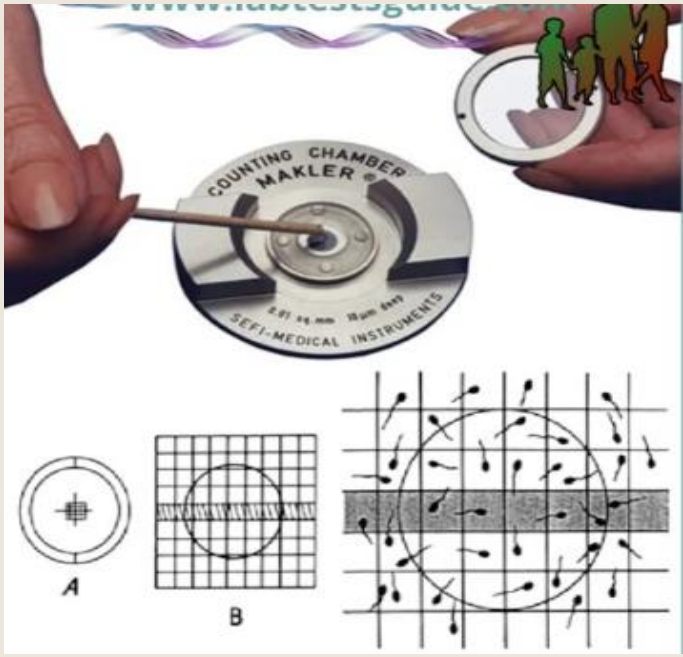
(Microscopic Examination)

การตรวจนับอสุจิด้วย Makler counting chamber

นำน้ำเชื้ออสุจิหยดลงบน Makler chamber ประมาณ 5-10 ul. และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้กำลังขยายเลนส์ 10X

1. ตรวจนับจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่อยู่ภายใน 10 ช่องของ counting grid
2. ตรวจนับเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น RBC, Epithelial cell, Round cell รวมถึงดูการเกาะกลุ่มของตัวอสุจิ ไม่ควรเกิน 1 ล้านเซลล์ ต่อ ml.
3. ดูลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Motility) โดยจะแบ่งการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็น 3 แบบ คือ
   - Progessive motility
   - Non-progessive motility
   - Immotility

ความเข้มข้นของตัวอสุจิ :
ต้องมี ≥ 15 ล้านตัว ต่อ 1 ml.



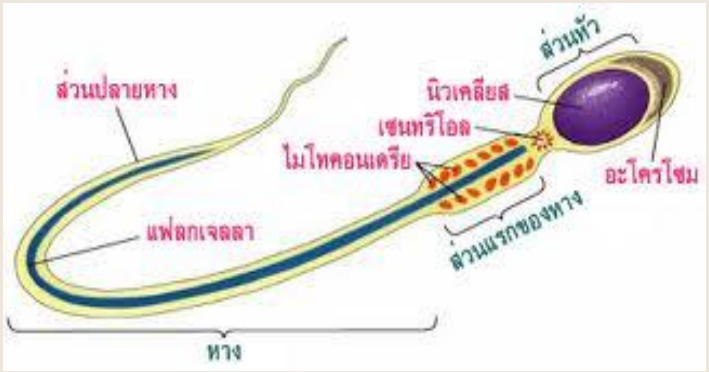
การตรวจดูด้วย กล้องจุลทรรศน์

(Microscopic Examination)

การตรวจดูรูปร่างของอสุจิ (Sperm Morphology)

การประเมินลักษณะรูปร่างของอสุจิ เป็นการดูรูปร่างของอสุจิว่าปกติหรือไม่ จะแบ่งการประเมินออกเป็น 3 ส่วน คือ

- ส่วนหัว (Head)
- ส่วนกลาง/ส่วนคอ (Midpiece)
- ส่วนหาง (Tail)



ขั้นตอนการย้อมสี “ Diff-Quick stain ”

หยดน้ำอสุจิลงบน Slide แล้วใช้ cover slip ไถน้ำอสุจิ รอจน Slide แห้ง

↓

Fix Slide ด้วย Methanol 1 นาที และรอให้แห้ง

↓

ย้อมด้วยสี Eosin 30 วินาที และสี Methylene blue 1 นาที

↓

ล้างน้ำ และรอให้ Slide แห้ง

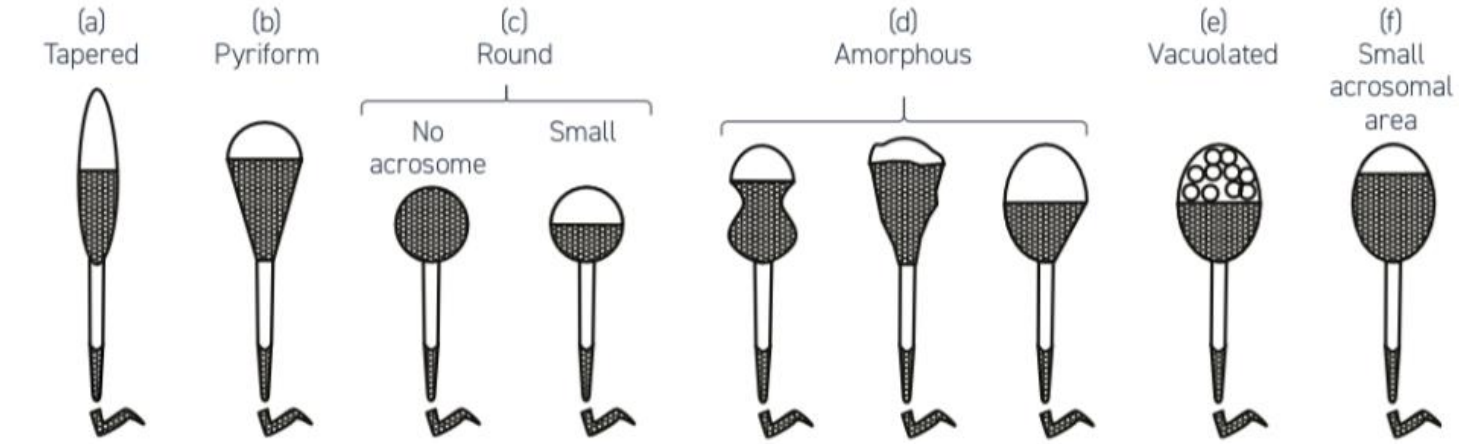
↓

นำไปอ่านผล morphology ของอสุจิ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

การอ่านผลรูปร่างของอสุจิ

ทางห้องปฏิบัติการจะย้อมสีอสุจิที่ถูกเตรียมลงบนสไลด์ และตรวจประเมินรูปร่างของอสุจิอย่างน้อย 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X โดยอสุจิควรมีรูปร่างปกติมากกว่า 4% สามารถแบ่งความผิดปกติของรูปร่างอสุจิได้ ดังนี้

1.ความผิดปกติของขนาดและรูปร่างของหัวอสุจิ : Head defect



2.ความผิดปกติของส่วนคอ:

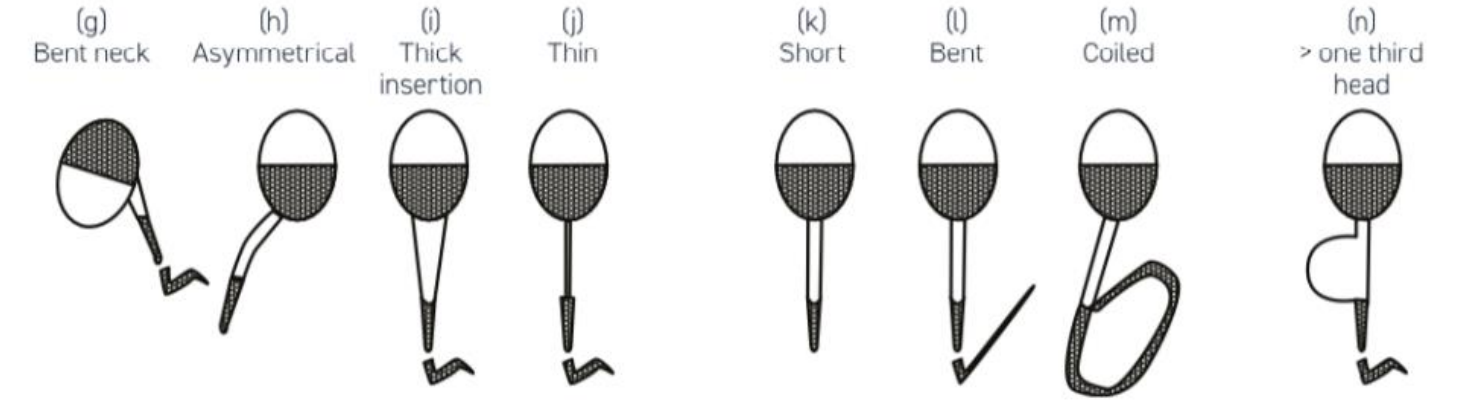
Neck and midpiece defects

3.ความผิดปกติของส่วนหาง:

Tail defects

4.ความผิดปกติของ Cytoplasm ตรงส่วนคอ :

Excess residual cytoplasm



ค่าปกติตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO 2021)

Table 2. WHO 2010 (5th Edition) and WHO 2021 (6th Edition) lower fifth percentile (with 95% confidence interval) of semen parameters from men in couples starting a pregnancy within one year of unprotected sexual intercourse leading to a natural conception.

	WHO 2010	WHO 2021
Semen volume (mL)	1.5 (1.4–1.7)	1.4 (1.3–1.5)
Total sperm number (10^6 per ejaculate)	39 (33–46)	39 (35–40)
Total motility (%)	40 (38–42)	42 (40–43)
Progressive motility (%)	32 (31–34)	30 (29–31)
Non progressive motility (%)	1	1 (1–1)
Immotile sperm (%)	22	20 (19–20)
Vitality (%)	58 (55–63)	54 (50–56)
Normal forms (%)	4 (3–4)	4 (3.9–4)

THANK YOU

การเตรียมน้ำเชื้ออสุจิ
(Sperm preparation)

สุวรรธณา แย้มโตนด

นักวิทยาศาสตร์

ศูนย์รักษาผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร

การเตรียมน้ำเชื้ออสุจิด้วยวิธี Density gradient centrifugation

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Conical tube 15 ml.
2. Round bottom 5 ml.
3. Sterile pipette 5 ml.
4. Sterile pipette 1 ml.
5. Autopipette
6. Makler counting chamber
7. Centrifuge
8. Incubator 37 °C
9. กล้องจุลทรรศน์

การเตรียมน้ำยา

น้ำยาสำหรับเตรียมน้ำเชื้ออสุจิจะถูกเตรียมไว้ล่วงหน้าใน ตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 1 วัน

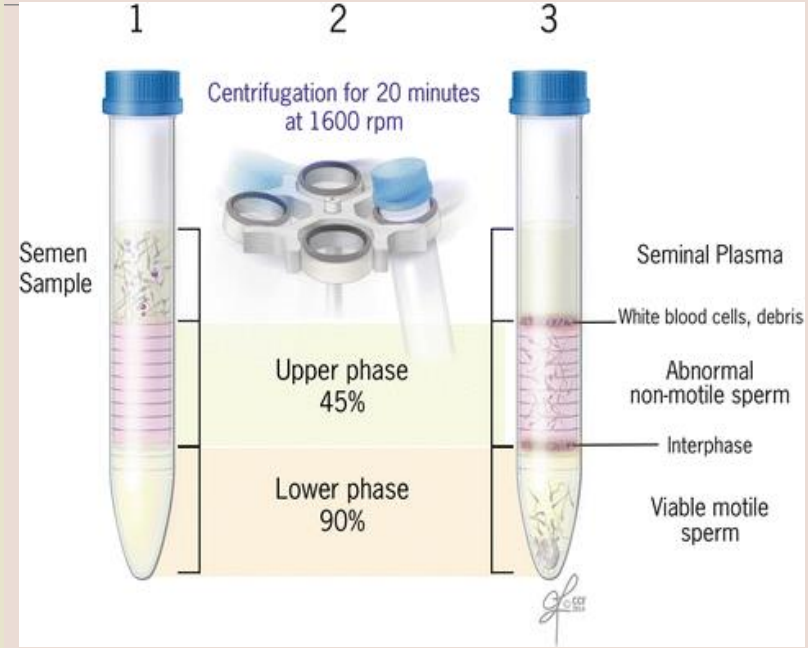
1. 90% Sil-Select 2 ml. จำนวน 2 หลอด
2. 45% Sil-Select 4 ml. จำนวน 1 หลอด
3. Flushing medium 3 ml. จำนวน 2 หลอด

ขั้นตอนการเตรียมน้ำเชื้ออสุจิสำหรับใช้ในหัตถการ

แบ่งน้ำอสุจิประมาณ 10 ul. หยดลงบน Makler counting chamber เพื่อตรวจวิเคราะห์น้ำเชื้ออสุจิเบื้องต้น พร้อมทั้งบันทึกผลการตรวจ

ใช้ Pipette ขนาด 5 ml. ดูดน้ำยา 45% Sil-Select หยดให้เป็น layer ลงบนน้ำยา 90% Sil-Select หลอดละ 2 ml. อย่างระมัดระวัง โดยน้ำยาต้องเกิดการแยกชั้นให้เห็นอย่างชัดเจน

ใช้ Pipette ดูดน้ำอสุจิค่อยๆ หยดลงบนชั้นของน้ำยา 45% Sil-Select ให้เท่าๆ กันทั้ง 2 หลอด โดยแต่ละหลอดไม่ควรหยดน้ำเชื้ออสุจิเกิน 2 ml.

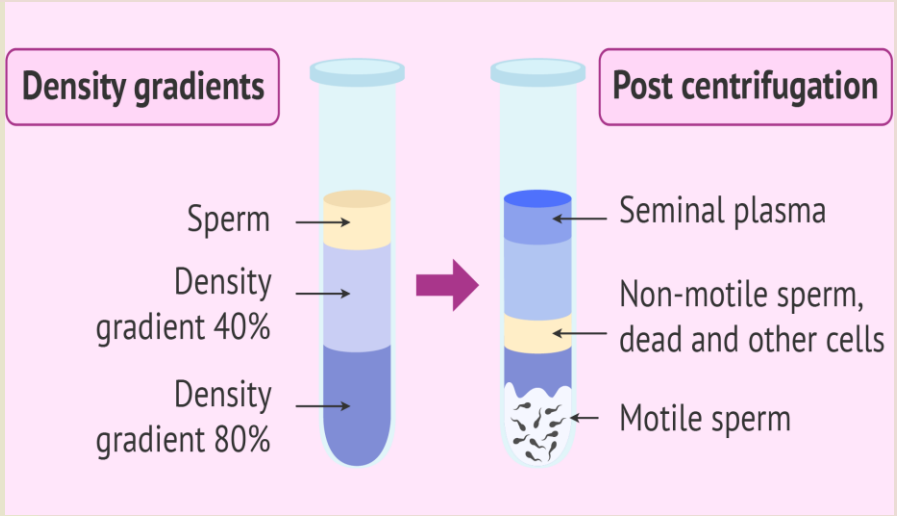


ขั้นตอนการเตรียมน้ำเชื้ออสุจิสำหรับใช้ในหัตถการ

นำหลอดน้ำยาทั้ง 2 หลอดไปปั่นที่ 1800 rpm
ประมาณ 15-20 นาที

ใช้ Pipette ขนาด 1 ml. ดูดตะกอนอสุจิทั้งหมดที่ตกลง
สู่ก้นหลอดไปใส่ในน้ำยา Flushing (Wash1)
นำไปปั่นล้างที่ 1600 rpm ประมาณ 5 นาที

จากนั้นดูดตะกอนอสุจิจากหลอด Wash1 มาใส่ในหลอด
Wash2 นำไปปั่นล้างที่ 1600 rpm ประมาณ 5 นาที



ขั้นตอนการเตรียมน้ำเชื้ออสุจิสำหรับใช้ในหัตถการ

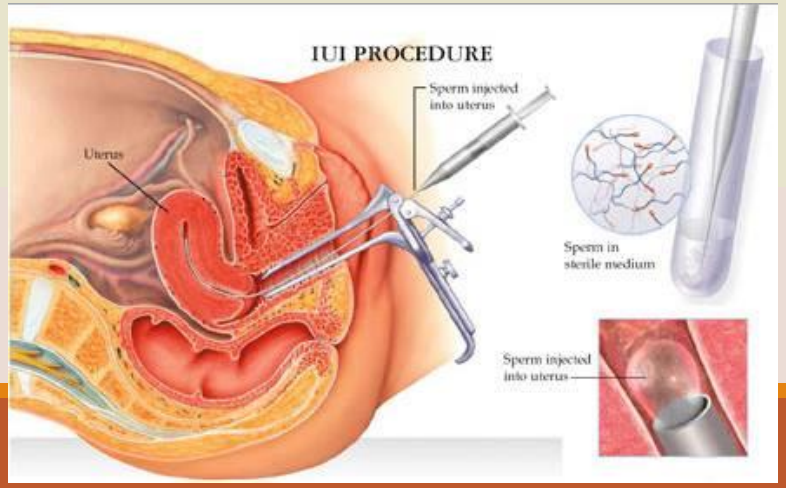
ดูดตะกอนจากหลอด Wash2 จำนวน 0.4-0.5 ml. ใส่ใน Round bottom tube ขนาด 5 ml. ที่มีชื่อผู้รับบริการ

↓

แบ่งน้ำอสุจิประมาณ 10 ul. หยดลงบน Makler chamber เพื่อดูจำนวนอสุจิที่เหลือหลังจากปั่นจนครบกระบวนการ พร้อมทั้งบันทึกผลการปั่นเตรียมอสุจิ

↓

อสุจิที่ได้จากกระบวนการปั่น จะถูกนำไปใช้ในหัตถการ IUI



หมายเลขรับตัวอย่าง.....

รายละเอียดตัวอย่าง :

วันที่...../...../..... เวลาเก็บตัวอย่าง.....น. เวลารับตัวอย่าง.....น.

ระยะเวลางดการหลั่งน้ำเชื้ออสุจิ.....วัน.

วิธีการเก็บตัวอย่าง ☐ Ejaculate ☐ Frozen ☐ Other.....

วิธีเก็บตัวอย่างขณะรอการวิเคราะห์

☐ อุณหภูมิห้อง ☐ CO_2 Incubator : 6% CO_2,Temperature 37 °C

☐ อื่นๆโปรดระบุ.....

ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง :

Analysis at..... Semen volume.....ml. pH.....

Appearance ( ) Normal ( ) Abnormal.....

Liquefaction ( ) Normal ( ) Abnormal.....

Viscosity ( ) Normal ( ) Abnormal.....

วิธีการเตรียมตัวอย่าง :

☐ Density gradient ☐ Washing ☐ Other.....

Semen Analysis :

Pre-wash	Post-wash
Concentration =..... $\times 10^6$ spermatozoa/ml.	Volume =.....ml.
Total sperm count =..... $\times 10^6$ sperm/ejaculation	Concentration =..... $\times 10^6$ spermatozoa/ml.
Motility A. Rapid progression.....%	Total sperm count =..... $\times 10^6$ sperm/insemination
B. slow rapid progression.....%	Motility (A+B) =.....%
C. non-progression motility.....%	
D. Immotility.....%	Conclusion.....
Sperm viability =.....%	
Particulate debris ( ) Round cell..... $\times 10^6$ cell/ml	
( ) Other.....	

THANK YOU