



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1535—2024

代替YY/T 1535—2017

人类辅助生殖技术用医疗器械 人精子存活试验

Medical devices for human assisted reproductive technology—
Human sperm viability assay(HSVA)

2024-07-08发布

2025-07-20实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语、定义和缩略语	1
4 试验方法	2
5 方法一 人精子活力试验	3
6 方法二 人精子活力恢复试验	4
7 方法三 人精子冷冻复苏试验	6
8 试验报告内容	7
附录 A(资料性)供试产品的试验操作	8
参考文献	9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替YY/T 1535—2017《人类体外辅助生殖技术用医疗器械生物学评价 人精子存活试验》，与YY/T 1535—2017相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 在“范围”中将人精子存活试验的试验方法增加为三种：人精子活力试验、人精子活力恢复试验和人精子冷冻复苏试验(见第1章)；
- b) 将术语“人精子存活试验”更改为“人精子活力试验”，并更改了其定义(见3.1.1, 2017年版的3.1.1)；
- c) 更改了“精子活力”的定义(见3.1.2、2017年版的3.1.2)；
- d) 将术语“精子活力分级”更改为“精子运动分类”，并更改了定义(见3.1.4, 2017年版的3.1.4)；
- e) 将术语“精子活力系数”和“相对精子活力系数”分别更改为“精子活力比值”和“相对精子活力比值”(见3.1.5、3.1.6, 2017年版的3.1.5、3.1.6)；
- f) 增加了人精子活力恢复试验和人精子冷冻复苏试验中使用的术语、定义(见3.1.7、3.1.8和3.1.9)；
- g) 更改了部分缩略语(见3.2, 2017年版的3.2)；
- h) 删除了人精子存活试验中试验方法概述(见2017年版的4.1)；
- i) 更改了主要仪器和器具的表述(见4.1, 2017年版的4.2)；
- j) 更改了耗材和试剂的表述(见4.2, 2017年版的4.2)；
- k) 更改了材料的要求(见4.3, 2017年版的4.3)；
- l) 增加了计算机辅助精子分析法的要求(见4.4.2)；
- m) 更改了精子样本制备方法(见4.5, 2017年版的4.4.2)；
- n) 增加了“阴性对照组”和“供试产品组”所需的样品体积(见5.1和5.2), 删除了“阳性对照品”(见2017年版的4.4.3.1和4.4.3.2), 增加了“方法一人精子活力试验”的具体操作方法(见5.3、5.4)；
- o) 删除了试验可接受准则中的阳性对照组指标(见2017年版的4.4.5.2)；
- p) 增加了“方法二人精子活力恢复试验”和“方法三人精子冷冻复苏试验”(见第6、7章)；
- q) 更改了附录A表A.1(见表A.1, 2017年版的A.1)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由人类辅助生殖技术用医疗器械标准化技术归口单位归口。

本文件起草单位：上海市第十人民医院生殖医学中心、北京大学第三医院、上海交通大学医学院附属仁济医院、中国人民解放军总医院第七医学中心、山东大学附属生殖医院、上海市生物医药技术研究院、浙江省医疗器械审评中心。

本文件主要起草人：千日成、周静、严杰、孙赟、李建华、高选、施惠娟、张坤智、乔杰。

本文件历次版本发布情况为：

——2017年首次发布为YY/T 1535—2017；

· 一本次为第一次修订。

人类辅助生殖技术用医疗器械 人精子存活试验

1 范围

本文件描述了人类辅助生殖技术用医疗器械产品进行人精子存活的试验方法，包含人精子活力试验、人精子活力恢复试验和人精子冷冻复苏试验。

人精子活力试验适用于评价人类辅助生殖技术用医疗器械中与精子直接接触的培养液类及器具/耗材类产品可能产生的毒性风险。通过观察精子与液体类产品或浸提液直接接触后的活力变化情况，评价培养液类及器具/耗材类产品可能产生的精子毒性风险。

人精子活力恢复试验适用于评价精子制动液和类似产品可能产生的毒性风险。通过观察精子与精子制动液或类似产品直接接触后的活力恢复情况，评价精子制动液或类似产品可能产生的毒性风险。

人精子冷冻复苏试验适用于评价人类精子冷冻液产品可能产生的精子毒性和冷冻复苏伤害风险。通过观察精子与精子冷冻液的直接接触以及冷冻复苏后的活力恢复情况，判断精子冷冻液产品可能产生的毒性和冷冻复苏伤害风险。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品

YY/T 0995 人类辅助生殖技术用医疗器械 术语和定义

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语、定义

YY/T 0995界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

人精子活力试验 human sperm motility assay

将精子与供试产品或其浸提液共培养后，通过观察精子活力的变化来判断受试产品对精子的毒性风险。

3.1.2

精子活力 sperm motility

精液中的活动精子，以活动精子占全部精子的百分率表示。

3.1.3

精子活力测定 sperm motility assay

精子运动能力的测定。

3.1.4

精子运动分类 category of sperm movements

精子运动分四个级别：快速前向运动、慢速前向运动、非前向运动和不活动。

3.1.5

精子活力比值 sperm motility index

经过一定培养时间后的精子活力与培养开始时精子活力的比值。

注：反映精子活力的变化情况。

3.1.6

相对精子活力比值 relative ratio of sperm motility index

在相同的培养时间下，供试产品精子活力与阴性对照组精子活力的比值。

注：反映供试产品对精子活力的影响程度。

3.1.7

精子活力恢复 sperm motility recovery

精子与供试产品(精子制动液或类似产品)接触30 min 后清洗，再经过一定时间培养后精子活力的恢复情况。

3.1.8

精子活力恢复比值 sperm motility recovery index

在相同的培养时间下，供试产品(精子制动液或类似产品)的精子活力与阴性对照组精子活力的比值。

注：反映供试产品对精子活力的影响程度。

3.1.9

精子冷冻复苏比值 sperm cryo-survival index

精子与供试产品直接接触，经过冷冻复苏后的活力与冷冻前精子活力的比值。

注：反映供试产品对精子在冷冻复苏过程中的影响程度。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CASA: 计算机辅助精子分析(Computer-Aided Sperm Analysis)

HSCA: 人精子冷冻复苏试验(Human Sperm Cryo-survival Assay)

HSMRA: 人精子活力恢复试验(Human Sperm Motility Recovery Assay)

HSMA: 人精子活力试验(Human Sperm Motility Assay)

IM: 不活动(Immotility)

NM: 非前向运动(Non-Progressive Motility)

PM: 前向运动(Progressive Motility)

PVP: 聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl Pyrrolidone)

SCI: 精子冷冻复苏比值(Sperm Cryo-survival Index)

SMI: 精子活力比值(Sperm Motility Index)

SMRI: 精子活力恢复比值(Sperm Motility Recovery Index)

4 试验方法

4.1 主要仪器和器具

光学显微镜、精子计数板、计数器、恒温台、计时器、温度计、水平式离心机、超净工作台、二氧化碳(或5%氧气、5%二氧化碳、90%氮气)培养箱或恒温培养箱。

注：除人工计数所需的仪器和器具外，选择精子计数和活力分析仪器。

4.2 耗材和试剂

试验所用耗材和试剂均需要无菌并通过体外鼠胚试验或人精子存活试验，包括取精杯、移液管、微量移液吸头、圆底试管、锥型离心管、缓冲液或精子洗涤液、精子制动液和精子冷冻液产品。

4.3 材料

精液样本符合捐精者标准要求，选用精液样本的标准是：PM 精子百分率 $\geq 50\%$ 、精子正常形态率 $\geq 4\%$ 、精子浓度 $\geq 60 \times 10^6$ 精子/mL、圆细胞密度 $< 1 \times 10^6$ 个/mL。用至少3份来自不同捐精者的合格冷冻精液进行试验。

4.4 测试原理

4.4.1 人工计数法

吸取少量精液样本置于预热的 37°C 计数板上，盖上盖玻片在显微镜下观察。将快速前向运动(PM)和慢速前向运动(NM)、非前向运动(NM)和不活动(IM)的精子分别计数，至少计数200个精子，并重复计数一次。

计算活动精子占全部精子的百分率，见式(1)：

$$\text{精子活力} = \frac{\text{PM} + \text{NM}}{\text{PM} + \text{NM} + \text{IM}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

PM——快速前向运动和慢速前向运动的精子数目；

NM——非前向运动的精子数目；

IM——不活动的精子数目。

4.4.2 计算机辅助精子分析法

根据CASA系统仪器制造商提供的说明书和使用指南，选择至少5个视野进行精子计数和活力测定。

4.5 精子样本制备

4.5.1 洗涤分离精子

用梯度离心法分离死活精子后，分别用3 mL 预热至 37°C 的缓冲液或精子洗涤液清洗2次(500 g 离心5 min)，去除上清吸取离心管底部精子进行上游。

4.5.2 精子上游

取 37°C 预热的缓冲液或精子洗涤液2 mL 置于锥型离心管中，吸取0.5 mL 精子样本缓慢地加入缓冲液或精子洗涤液底部，在 37°C 培养箱内置于 45° 角倾斜的试管架上孵育培养1 h。孵育培养结束后，竖直试管，缓慢地吸取上清液(约1 mL~1.5 mL)，计数并测定精子活力。使用精子活力 $\geq 90\%$ 的样品进行下一步精子样本制备。

4.5.3 离心制备供试精子样本

取上游后的供试精子样本，放置于锥型离心管内，以500g 离心5 min 后弃上清液，用缓冲液或精子洗涤液重新悬浮精子，在显微镜下计数精子，将精子浓度稀释约为 20×10^5 精子/mL，在显微镜下评估精子活力并记录。

5 方法一 人精子活力试验

5.1 液体类供试产品样品制备

阴性对照组：使用已通过无菌测试、细菌内毒素测试、体外鼠胚试验和人精子存活试验的相对应液体类产品，取0.9 mL放入圆底试管内。

供试产品组：取0.9 mL 供试产品样品放入圆底试管内，根据供试产品特性参照附录 A 进行试验操作。

5.2 器具类供试产品样品制备

阴性对照组：使用已通过无菌测试、细菌内毒素测试、体外鼠胚试验和人精子存活试验的配子缓冲液或精子洗涤液产品，取0.9 mL放入圆底试管内。

供试产品组：取0.9 mL 供试产品的浸提液放入圆底试管内。供试产品浸提液按照GB/T 16886.12 进行制备。根据供试产品特性参照附录A 进行试验操作。

5.3 加样

阴性对照组：取0.1 mL 供试精子样本，缓慢地放入含有0.9 mL 阴性对照组液体的圆底试管内混匀后盖紧盖子。

供试产品组：取0.1 mL 供试精子样本，缓慢地放入5.1或5.2中已制备好的供试产品组圆底试管内混匀后盖紧盖子。

5.4 共培养

在37 °C条件下共培养24 h(CO₂ 缓冲体系的培养液需要在CO₂ 培养箱内松动盖子)。

5.5 精子活力测定

共培养结束后，测定两组的精子活力。

5.6 试验结果

用至少三份来自不同捐精者的合格冷冻精液进行试验。

计算精子SMI 和相对 SMI, 分别见式(2)、式(3)：

$$SMI = \frac{\text{试验结束时精子活力}(\%)}{\text{试验开始时精子活力}(\%)} \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{相对 SMI} = \frac{\text{供试产品组 SMI}}{\text{阴性对照组 SMI}} \dots\dots\dots (3)$$

5.7 判断标准

试验可接受标准：

试验结束时，阴性对照组精子 SMI≥0.7，认为该份精子样本的试验有效。

供试产品存在潜在精子毒性的判断：

在三份有效试验中：

- a) 若供试产品的两份样本的SMI≥0.7，且相对SMI≥0.9，则认为对人类精子的影响可以忽略；
- b) 若供试产品的两份样本的 SMI<0.7，或相对 SMI<0.9，则认为对人类精子的影响不可以忽略。

6 方法二 人精子活力恢复试验

6.1 供试产品样本制备

阴性对照组：使用已通过无菌测试、细菌内毒素测试、体外鼠胚试验和人精子存活试验的精子制动液或类似产品，取0.9 mL 放入圆底试管内。

供试产品组：取0.9 mL 供试产品样品放入圆底试管内。根据供试产品特性参照附录A 进行试验操作。

6.2 小颗粒大小计数

取20 μL 供试产品样品，在显微镜400倍下观察5个不同视野，若视野内直径大于或等于2 μm 的PVP 小颗粒总数超过15个，则供试产品不合格，终止试验。

6.3 加样

阴性对照组：取0.1 mL 供试精子样本，缓慢地加入含有0.9 mL 阴性对照组液体的圆底试管内混匀后盖紧盖子。

供试产品组：取0.1 mL 供试精子样本，缓慢地加入含有0.9 mL 精子制动液或其他测试产品样品的圆底试管内混匀后盖紧盖子。

6.4 共培养

在37 °C条件下共培养30 min。共培养结束后，清洗精子。

6.5 清洗精子

把圆底试管内共培养精子转移到锥型离心管内，加入2 mL 缓冲液或精子洗涤液，以500g 离心5 min,去除上清液，再加入3 mL 缓冲液或精子洗涤液，以500g 离心5 min,用1 mL 缓冲液或精子洗涤液缓慢地悬浮稀释精子，在37°C条件下培养24 h 后，观察测定精子活力恢复情况。

6.6 精子活力测定

测定在缓冲液或精子洗涤液中培养24 h 后的精子活力。

6.7 试验结果

计算精子SMRI 和相对 SMRI, 分别见式(4)、式(5)：

$$SMRI = \frac{\text{试验结束后精子活力}(\%)}{\text{试验开始时精子活力}(\%)} \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad (4)$$

$$\text{相对 SMRI} = \frac{\text{供试产品组 SMRI}}{\text{阴性对照组 SMRI}} \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad (5)$$

6.8 判断标准

试验可接受标准：

试验结束时，阴性对照组的 SMRI \geq 0.2，认为判定该份精子样本的试验有效。

供试产品存在潜在精子毒性的判断：

在三份有效试验中：

a) 若供试产品的两份样本的 SMRI \geq 0.2，且相对SMRI \geq 0.9，则认为对人类精子的影响可以

忽略;

- b) 若供试产品的两份样本的SMRI<0.2, 或相对 SMRI<0.9, 则认为对人类精子的影响不可以忽略。

7 方法三 人精子冷冻复苏试验

7.1 供试产品样品制备

阴性对照组: 取0.5 mL 已通过无菌测试、细菌内毒素测试、体外鼠胚试验和人精子存活试验的精子冷冻液或类似产品, 缓慢地滴入含有0.5 mL 精子样本的锥型离心管内, 边滴入边缓慢地混匀, 整个过程需要30 s~60 s,然后在室温条件下平衡。

供试产品组: 取0.5 mL 供试产品精子冷冻液, 缓慢地滴入含有0.5 mL 精子样本的锥型离心管内, 边滴入边缓慢地混匀, 整个过程需要30 s~60 s,然后在室温条件下平衡。

7.2 降温和冷冻

按产品说明书进行平衡后分装入冷冻麦管或冻存管内进行降温冷冻, 浸入液氮中冷冻保存至少 2 h。

7.3 解冻复苏

按产品说明书进行升温解冻复苏。

7.4 清洗精子

以500 g 离心5 min 弃去上清液后, 加入3 mL 缓冲液或精子洗涤液离心清洗一次, 然后用1 mL 缓冲液或精子洗涤液悬浮精子。

7.5 共培养

在37℃条件下共培养2 h~4 h。

7.6 精子活力测定

测定在缓冲液或精子洗涤液中培养2 h~4 h后的精子活力。

7.7 试验结果

计算精子SCI 和相对SCI, 分别见式(6)、式(7):

$$SCI = \frac{\text{冷冻复苏后精子活力}(\%)}{\text{冷冻前的精子活力}(\%)} \quad \dots \quad \dots(6)$$

$$\text{相对 SCI} = \frac{\text{供试产品组 SCI}}{\text{阴性对照组 SCI}} \quad \dots \quad \dots(7)$$

7.8 判断标准

试验可接受标准:

试验结束时, 阴性对照组精子冷冻液的SCI≥0.6, 认为判定该份精子样本的试验有效。

供试产品样品精子冷冻液存在潜在精子毒性的判断:

在三份有效试验中:

- a) 若供试产品的两份样本的 SCI≥0.6, 且相对SCI≥0.9, 则认为对人类精子的影响可以忽略;

- b) 若供试产品的两份样本的SCI $<$ 0.6, 或相对SCI $<$ 0.9, 则认为对人类精子的影响不可以忽略。

8 试验报告内容

试验报告应包含如下信息:

- a) 供试品信息;
- b) 试验条件;
- c) 试验程序;
- d) 试验结果;
- e) 试验结论。

附 录 A
(资料性)
供试产品的试验操作

表 A.1 规定了3种方法中供试产品的试验操作。

表 A.1 供试产品的试验操作

供试产品	人精子活力试验 (HSMA)	人精子活力恢复试验 (HSMRA)	人精子冷冻复苏试验 (HSCA)
液体类	1) 需要CO ₂ 平衡缓冲体系的培养液直接与精子样本在37℃培养箱内放置24 h; 2) 不需要CO ₂ 平衡的缓冲液或精子洗涤液加入精子样本后混匀盖紧盖子,然后在37℃培养箱内放置24 h; 3) 梯度离心液可在精子离心后用缓冲液或精子洗涤液悬浮精子盖紧试管盖子,然后在37℃培养箱内放置24 h	1) 供试产品(精子制动液或类似产品)在显微镜下观察是否具有PVP颗粒; 2) 供试产品(精子制动液或类似产品)加入精子样本后混匀盖紧盖子,然后在37℃培养箱内放置30 min; 3) 加入缓冲液或精子洗涤液,离心清洗两次; 4) 用缓冲液或精子洗涤液悬浮稀释管底精子盖紧盖子,然后在37℃培养箱内放置24 h	1) 供试产品精子冷冻液缓慢地加入含有精子样本(1:1)的锥型离心管内充分混匀,整个过程需要30 s~60 s 2) 将混匀的精子样本按产品说明书进行平衡后装入冷冻麦管或冻存管内进行降温冷冻; 3) 将冷冻麦管或冻存管直接浸入液氮里至少保存2 h后进行升温解冻复苏; 4) 解冻复苏后用缓冲液或精子洗涤液离心清洗一次,悬浮精子在37℃条件下放置2 h~4 h
器具 耗材类	用缓冲液或精子洗涤液作为浸提液,悬浮精子盖紧试管盖子在37℃条件下放置18 h~24 h	无	无
其他	培养用油	无	无
浸提液参照GB/T 16886.12进行制备。			

参 考 文 献

- [1]GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价第1部分：风险管理过程中的评价与试验
- [2]GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价第5部分：体外细胞毒性试验
- [3]WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen.6 Edition,2021.
- [4]Barry,D,et al.A rapid sperm motility bioassay procedure for quality-control testing of water and culture media.J IVF-ET.1988,5(2):67-74.
- [5]Bjorndahl L,et al.A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology.Cambridge,UK:Cambridge University Press,2010.
- [6]Claassens OE,Harrison KL.Optimising sensitivity of the human sperm motility assay for embryo toxicity testing.Hum Reprod.2000,15:1586-1591.
- [7]Critchlow JD,et al.Quality control in an in-vitro fertilization laboratory:use of human sperm survival studies.Hum Reprod.1989,4:545-549.
- [8] Hughes PM,et al.Peroxides in mineral oil used for in vitro fertilization:defining limits of standard quality control assays.J Assist Reprod Genet.2010,27:87-92.
- [9]Larson JM,et al.An intrauterine insemination-ready cryopreservation method compared with sperm recovery after conventional freezing and post-thaw processing.Fertil Steril.1997,68:143-148.
- [10]Shi TY,et al.Effects of reactive oxygen species from activated leucocytes on human sperm motility,viability and morphology.Andrologia.2012,44(Suppl 1):696-703.
-