

Doe-het-zelf gebruiksaanwijzing

SPERMOGRAM & MANNELIJKE THERMISCHE ANTICONCEPTIE

<i>Presentatie</i>	Dit is een medisch onderzoek om verschillende kenmerken van sperma te analyseren. Het bestaat uit het bekijken van een druppel sperma met een microscoop om de zaadcellen te tellen en hun kenmerken te noteren. Deze niet-invasieve, pijnloze test wordt regelmatig uitgevoerd om te controleren of uw spermaconcentratie ver onder de anticonceptiedrempel ligt: spermaconcentratie < 1 miljoen/ml.
<i>Indicaties in het kader van CMT</i>	• De eerste test beoordeelt de kwaliteit van uw sperma. Als de kwaliteit van uw sperma niet voldoet aan de normen van de WHO¹, zal uw arts u doorverwijzen naar andere anticonceptiemethoden. • De volgende 2 tests worden 2-3 maanden en 3 weken na het begin van het dragen van het apparaat gedaan. Als uw concentratie < 1 miljoen/ml is, bent u geanticipeerd. Zo niet, herhaalt u de test de volgende maand. • De eerste 6 maanden is de evaluatie maandelijks, daarna driemaandelijks. • Let op: Als je de pil vergeet in te nemen of als deze onregelmatig is, ga dan door met het protocol en neem een maand lang een ander voorbehoedsmiddel en doe daarna de test. • Als u stopt met deze anticonceptie, gebruik dan een andere anticonceptiemethode en laat u na 3 maanden door uw arts controleren of uw vruchtbaarheid weer normaal is volgens de normen van de WHO.
<i>Hoe bereid je je voor?</i>	Onthoudingsperiode van 3 dagen in het algemeen. Drink de dag ervoor een liter water en de dag zelf een groot glas water.

Deze gids dient uitsluitend ter informatie.

¹ WERELDGEZONDHEIDSORGANISATIE. WHO-laboratoriumhandboek voor het onderzoek en de behandeling van menselijk sperma, vijfde editie, Genève, WHO, 2010.

Aide mémoire : examen microscopique de l'éjaculat
pour une concentration inférieure à 50000/ml

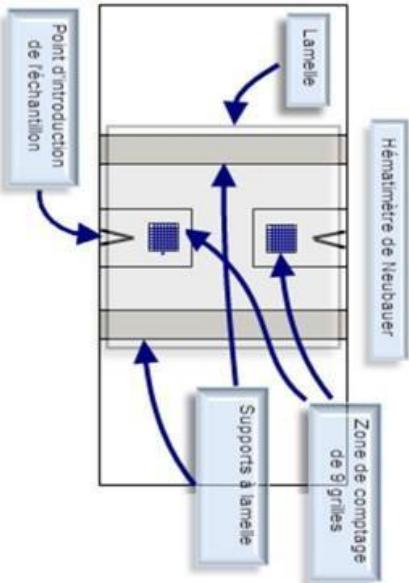
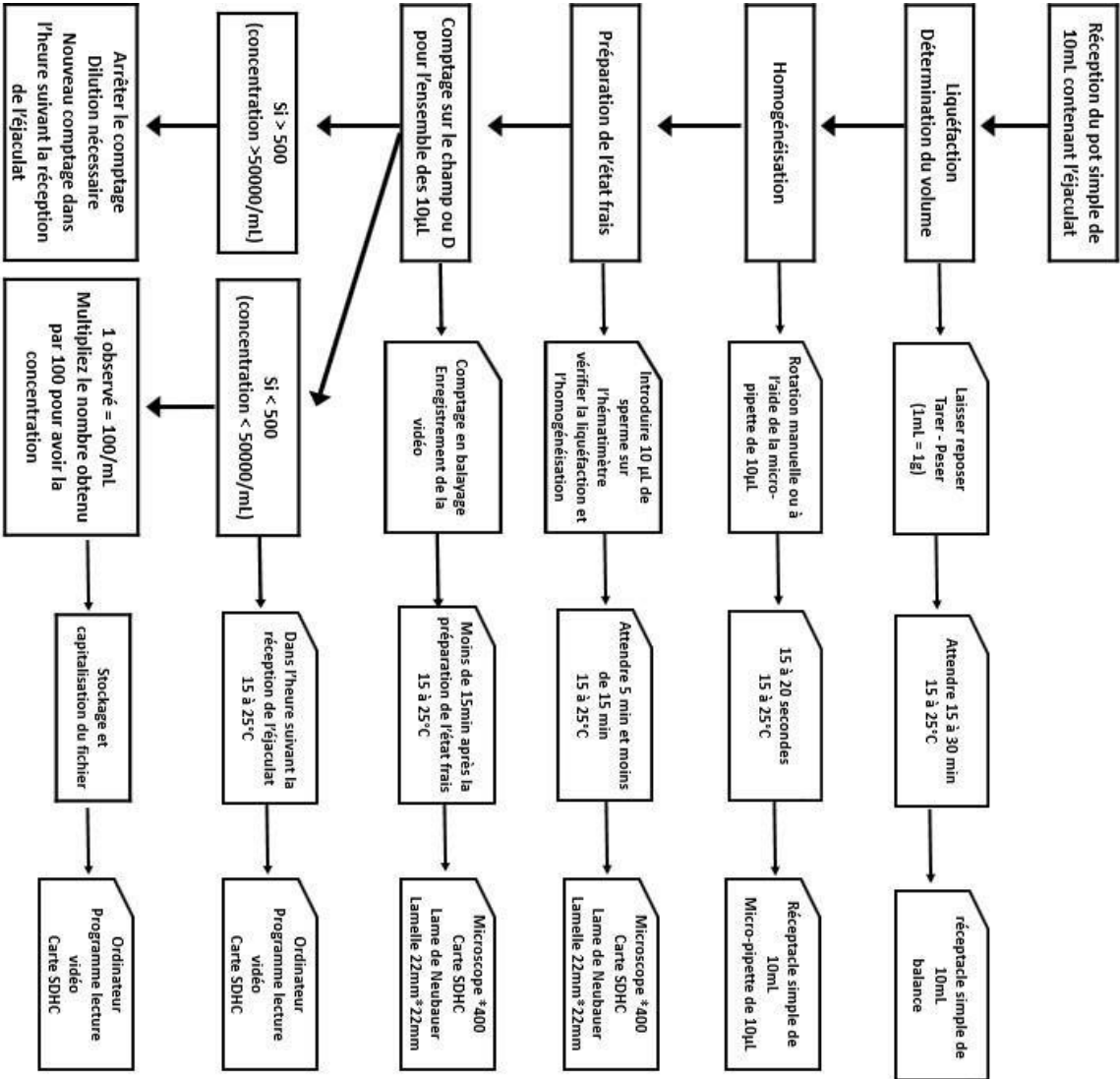


Figure 5: Hémamètre de Neubauer

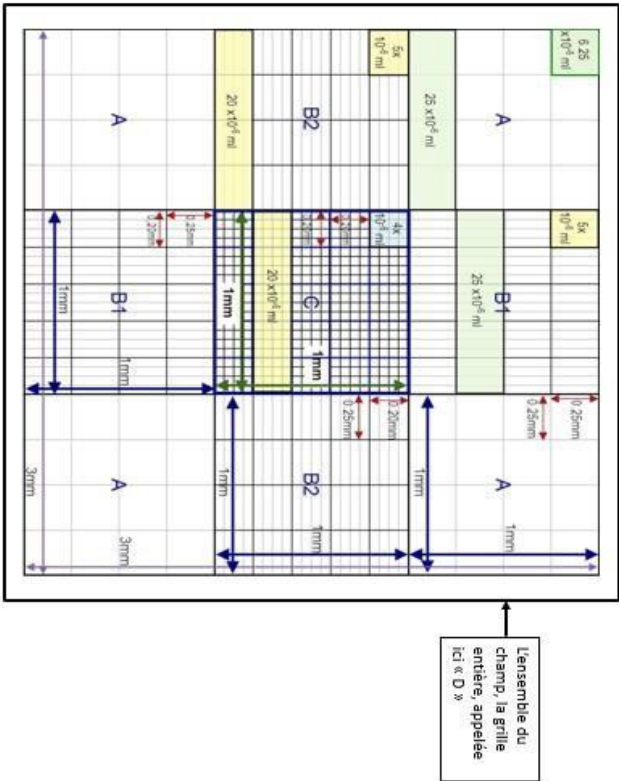
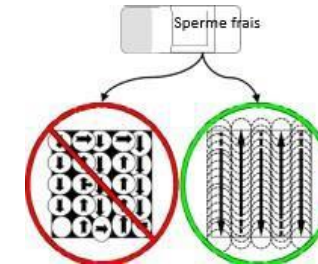
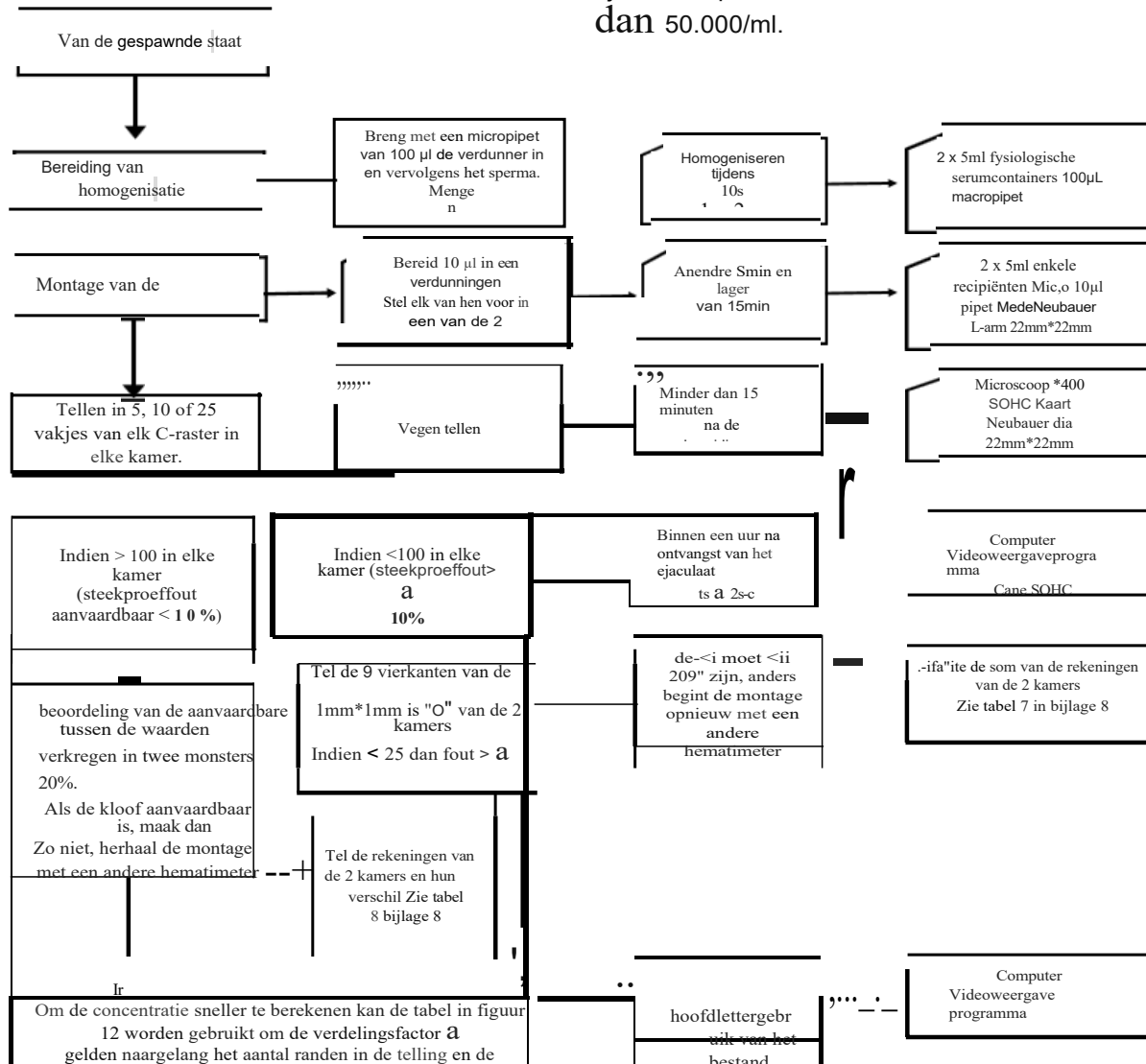
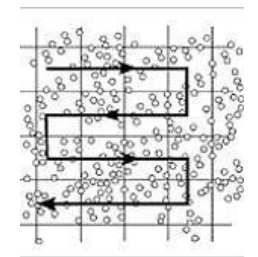


Figure 10 & 11: Zone de comptage de l'hémamètre de Neubauer

Aide memoire: microscopisch onderzoek van het ejaculaat op een concentratie van meer dan 50.000/ml.



Figuur 3: Gezichtsveld (scan) om het gehele oppervlak van het glaasje met een bekend volume sperma te onderzoeken.



Figuur 14: Tellen met *e* levee celconcentratie.

Aantal zaadcellen per veld, vergrotingsfactor 400	Verdunning	Sperma (μ l)	Olievloeistof (μ l)
Zeldzaam	1:2	100	100
Minder dan 15	1:5	100	400
De15a40	1: 10	50	450
De41a 200	1: 20	50	950
Meer dan 200	1: 50	50	2450

Figuur 8: Passende verdunningen a1-evaluatie Van de concentratie op de Neubauer hematimeter

Verdunning	Nb., van cartCs in het raster C (van ehaqllle kamer) comoris in de comotae:c			het hele veld, het hele raster genaamd • D>
	5	'10	25	
	Di, ision factor			
1 : 2	20	40	100	900
1 : 5	8	16	40	360
1: 10	4	8	20	180
1: 20	2	4	10	90
1: 50	0.8	1.6	4	36

Figuur 12: Verdelingsfactoren die moeten worden toegepast op het totale aantal in de twee kamers getelde sperma om te berekenen fa concentratie (in x 10-6/ml)

Inhoudsopgave

Materiaal	5
Aan de slag met de microscoop	6
Microscooponderdelen & Eerste gebruik van de microscoop	6
Prepareren van de microscoop, scherpstellen, observeren, opbergen van de microscoop	8
Hygiëne en preventie van de risico's van blootstelling aan biologische vloeistoffen	9
Sterilisatie met kokend water	9
Het interview	9
Handen wassen met hydroalcoholische oplossing	10
Gang van zaken	10
Theoretische gegevens over het spermogram	11
Spermogram	11
Te herstellen gegevens	11
Voor informatie	12
Referentiewaarden volgens de WHO gids 2010	12
Variabiliteit in concentratie binnen hetzelfde onderwerp	13
Variabiliteit in spermakenmerken als functie van de tijd tot onthouding	14
Morfologie van de spermatozoïde	15
Spermabehandeling en voorbereidingstechnieken	16
Standaard opstelling van de hematimeter of Neubauer telcel	16
Liquefactie van het ejaculaat	17
Homogenisering van het ejaculaat	17
Bereiding van de verse staat	17
Neubauer hematometer	18
Selectie van de juiste verdunning voor concentratiebepaling op de Neubauer haematizer	20
Beoordeling van de spermaconcentratie	21
Homogenisering en verdunning van het ejaculaat	21
Montage van de hematimeter en spermasedimentatie	22
Beoordeling van de concentratie	22
Aantal zaadcellen in elk van de bereide monsters	23
Controle van de aanvaardbaarheid van meetverschillen tussen monsters	26
Berekening van de concentratie	26
Detectiegrens	27
Bijlagen	28
Tabellen met aanvaardbare verschillen tussen monsters	28
Tabellen met aanvaardbare verschillen tussen monsters	29
Bibliografie	30

Materiaal

Type	Hoeveelheid	Gebruik	Kost en totaal	Hygiëne
Antiseptisch doekje	1 doos van 100	Eenmalig gebruik Materiaal	4 €	Niet steriel. Bewaren in een schone, beschutte plaats van licht
Waterfles steriel fysiologisch	1 doos van 30 enkele dosis		8 €	
Steriele pads	1 doos van 20 zakken		4€	
Onderzoekshandschoenen geen poeder	1 doos van 100		4€	
Lenspapier	1 doos van 30		8€	
Steriele tips wegwerp	1 doos	Herbruikbaar materiaal	10€	Steriliseren voor gebruik en tussen elke nieuwe bemonstering
70° alcohol fles gewijzigd	1 fles van 200 ml		3€	
Hydroalcoholisch oplossing	1 fles van 75 ml		3€	
Enkelvoudig stopcontact voor de verzameling van alles wat het ejaculaat	1 plastic doos van 10 mL met deksel		5€	
Digitale weegschaal met grammen nauwkeurigheid	1 nieuwe		20€	
Eenvoudige recipiënten om maak de 2 verdunde monsters en de zoutoplossing verdunner	3 x 5 mL plastic doosjes		5€	
Laboratorium micro pipet die 10 µl	1 tweedehands		35€	
Laboratorium micro pipet die kan bevatten 100 µl	1 tweedehands		35€	
Bladen Diepte van veld 0,1 mm Plus oppervlak kleine vierkantjes 0,0025 mm ²	2 Neubauer cellen tellen met 100 dekglaasjes		22€	
SDHC-kaart	1 van 8 GB		7€	
Computer	1 gebruikt met SDHC kaartlezer en VLC-programma videoweergave		50€	

Microscop	1 BORSTELTJE 8,9 cm (3,5") LCD- scherm onderwijs microscop, 50-500x, 2000 (digitaal)		189€	
		Totaal	416€	

De kosten van een spermogram zijn niet te verwaarlozen. Het is raadzaam de verzameling van het materiaal te bundelen om de financiële kosten te amortiseren. De verzameling van al het materiaal kan verschillende gebruikers gedurende meerdere jaren

Aan de slag met de microscoop

De onderdelen van de microscoop & Eerste hantering van de microscoop



Liste complète des divers éléments (graph. 1-5) :

- 1 Module d'écran
- 2 Écran LCD
- 3 Tube
- 4 Revolver porte-objectifs
- 5 Objectif
- 6 Lamelle porte-objet (ici : échantillon préparé)
- 7 Platine de microscope
- 8 Lentille collectrice
- 9 Éclairage LED (éclairage diascopique)
- 10 Pied du microscope
- 11 Témoin lumineux
- 12 Interrupteur marche-arrêt pour module d'écran
- 13 Éclairage LED pour éclairage épiscopique
(utiliser uniquement avec l'objectif 4x)
- 14 Table à mouvements croisés
- 15 Disque à filtre chromatique
- 16 Molette de mise au point
- 17 Raccordement électrique
- 18 Variateur
- 19 Sélecteur d'éclairage
- 20 Touches d'entrée
- 21 Touche de prise de vues
- 22 Touche de menu
- 23 commutateur
- 24 Échelles verniers
- 25 Vis de serrage
- 26 Molette avant/arrière de la table à mouvements croisés
- 27 Molette droite/gauche de la table à mouvements croisés
- 28 Levier pour dispositif de fixation par serrage
- 29 Dispositif de fixation par serrage
- 30 Diaphragme libre (sans filtre chromatique)
- 31 Filtre chromatique
- 32 Câble USB
- 33 Boîte de 10 lamelles porte-objet, 10 lamelles couvre-objet
et 5 préparations permanentes
- 34 A) Instruments de microscopie; B) Pipette; C) Pincette
- 35 Écloserie de crevettes
- 36 Microtome
- 37 Préparations: A) Levure; B) «Gum-media»; C) Sel de mer;
D) Œufs de crevettes

Wees voorzichtig met uw microscoop door hem voorzichtig vast te houden. Let erop dat u uw vingers niet op het oculair legt, dat zeer gevoelig is. Hetzelfde geldt voor het objectief en de preparaten die u gaat bekijken, om te voorkomen dat ze vuil worden en de waarneming verstoren.

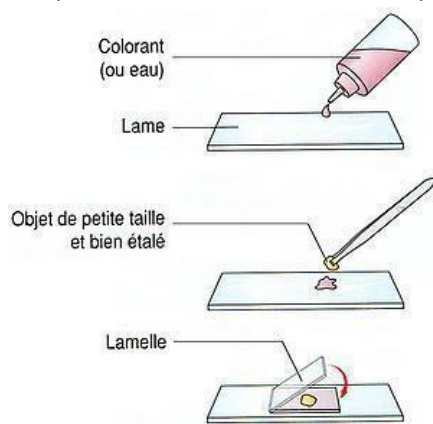
Vermijd plotselinge bewegingen en pak in plaats daarvan de microscoop voorzichtig op aan de steel, het handvat of door de basis op te tillen. Schakel nu de verlichting in en zet deze eerst op maximaal.

Open vervolgens het diafragma volledig om de intensiteit van het licht aan te passen. Uiteraard kunnen deze instellingen worden aangepast aan de te maken waarneming.

De otische buis kan ook worden verlaagd met behulp van de macrometerschroeven. Let op:

Gebruik altijd eerst de kleinste lens.

Prepareren van de microscoop, scherpstellen, observeren, opbergen van de microscoop



Het preparaat bestaat uit een objectglaasje, een objectdeksel en het kleine voorwerp dat moet worden geobserveerd. Plaats het preparaat op het podium en ga over tot de waarneming.

Het te observeren object bevindt zich in het midden van het podium en breng het podium zo dicht mogelijk bij de objectieven. Pas op dat het blad niet breekt.

Om bij lage vergroting scherp te stellen, laat u, terwijl u door het oculair kijkt, de tafel voorzichtig zakken met de macrometerschroef totdat het te observeren object scherp is. Om de scherpstelling te verbeteren, maakt u een aanpassing met de micrometerschroef. Vervolgens kunt u de verlichting aanpassen door het diafragma beetje bij beetje te sluiten of te openen.

Zet de voorbereiding vast met de krikken.

Gebruik schroeven om heen en weer en rechts en links te bewegen.

U kunt dan door het oculair naar uw object kijken en indien nodig de lens verwisselen. Door Als de vergroting bijvoorbeeld niet voldoende is, kies dan het objectief met een hogere vergroting. Stel vervolgens opnieuw scherp met de kleine schroef.

Om de vergroting te berekenen, vermenigvuldigt u de oculairvergroting met de objectiefvergroting.

Zet de microscoop weer op het kleinste objectief en draai het diafragma weer maximaal open. Maak de microscoop grondig schoon, vooral de tafel, en verwijder eventueel stof dat zich op de lenzen heeft afgezet. Om dit te doen,

gebruik het eerder in alcohol gedrenkte lenspapier. Laat tenslotte de optische buis zakken en plaats de microscoop voorzichtig in zijn deksel of koffer.

Ga voor meer informatie naar:

<https://fr.wikihow.com/utiliser-un-microscope>

<https://www.bresser.de/fr/Microscopie/BRESSER-Microscope-d-enseignement-LCD-8-9cm-3-5.htm>

Het gebruik van de microscoop vergt tijd om zich aan te passen om kwaliteitswaarnemingen te kunnen doen.

Hygiëne en preventie van de risico's van blootstelling aan biologische vloeistoffen

De apparatuur die u gebruikt voor het verkrijgen van sperma moet worden gesteriliseerd of onderhouden zoals aangegeven:

- 1 Enkelvoudig stopcontact
- 1 x 3 ml micropipet
- 1 Neubauer telcel met 1 dekglasje

Sterilisatie met kokend water

Dit is het oudste en eenvoudigste systeem:

- Neem een snelkookpan of een grote pan.
- Vul hem voor driekwart met water en kook hem minstens een kwartier, of vul een bak met 1/3 leidingwater en 2/3 met water dat eerder in een elektrische waterkoker is verwarmd.
- Dompel het materiaal er 5 minuten in onder (het kan daarna vervormen).
- Haal hem uit het water met een tang.
- Laat drogen op steriele kompressen.

Onderhoud

- Veeg voorzichtig met lenspapier om sperma of vuil te verwijderen.
- Ontsmet met alcohol 70° om het risico van besmetting te beperken.
- Spoel met water om het ontsmettingsmiddel te verwijderen.

Handen wassen met hydroalcoholische oplossing:



N.B. Als u bij iemand anders dan uzelf een spermogram moet maken, zorg er dan voor dat u niet in huidcontact komt. Draag handschoenen als u met het sperma van iemand anders werkt.

De koers

Stap 1: Voorbereiding van het materiaal

Was uw handen zodra de apparatuur is opgesteld en gesteriliseerd, Stap 2: Ejaculatie verzamelen

Urineer voor het verzamelen.

Was de handen met een hydroalcoholische oplossing. Ontsmet de penis met een antiseptisch doekje.

Spoel de penis met de fles steriel fysiologisch water om alle sporen van het ontsmettingsmiddel te verwijderen. Droog de penis met een steriel kompres.

Was uw handen met de hydroalcoholische oplossing.

Open de container

Verzamel sperma door masturbatie in het meegeleverde steriele bakje.

N.B. Het is zeer belangrijk dat al het ejaculaat wordt opgevangen, vooral de eerste paar stralen, omdat deze een grotere hoeveelheid sperma bevatten dan het einde van het ejaculaat. Als een deel van het ejaculaat niet wordt opgevangen, kunt u het beste opnieuw beginnen met een onthoudingsperiode van 3 dagen.

Sluit het bakje goed af

Was de handen met water en zeep of een hydroalcoholische oplossing. Stap 3: Bemonstering

& microscopische waarnemingen & video-opname

Doe uw handschoenen aan voor de bemonstering met de micropipet, waarbij u een druppel op het glaasje van Neubauer, plaatsen van het dekglasje, aflezen onder de microscoop en opnemen op de SDHC-kaart. Stap 4:

Schoonmaken van de apparatuur

Houd uw handschoenen aan bij het reinigen van niet-steriele apparatuur en het steriliseren van apparatuur die in contact is geweest met sperma.

Stap 5: Telling en datakapitalisatie

Was je handen. Er is geen risico meer op blootstelling aan de biologische vloeistof (sperma). Neem de SDHC-kaart en steek die in de computer. Doe een eerste meting met vlc, en begin dan met tellen. Zodra dit is gebeurd, slaat u het bestand op de computer of anderszins op, met de volgende naam:

jaar_maand_dag_naam of bijnaam_D aantal dagen sinds DO_aantal spermatozoïden_M_ml, en voegt u eventueel de volgende informatie toe: pathologie in de 3 voorgaande maanden, koortsaanvallen, huidige behandeling, leeftijd.

Volg het protocol en herhaal het; door te oefenen leert u de gebaren en de techniek. Naast het risico van blootstelling aan de biologische vloeistof is een onberispelijke hygiëne noodzakelijk om besmetting van het monster te voorkomen en een meting van de beste kwaliteit te verkrijgen.

Theoretische gegevens over het spermogram

Spermogram

Te herstellen gegevens

Volume: Hoeveelheid vrijgekomen sperma, het varieert van 1,5 ml tot 5 ml. Uiterlijk (kleur, viscositeit) en Ph zijn laboratoriumgegevens. Weeg het flesje vooraf met een grammenweegschaal voordat u het verzamelde sperma inbrengt. 1 ml sperma komt overeen met 1 gram, zodat het verzamelde volume gemakkelijk kan worden bepaald.

Tellen: Hierbij worden de verschillende elementen in het sperma geteld:

- Spermatozoa (miljoen/mL), de spermaconcentratie,
- Sperma in het gehele ejaculaat (miljoenen), d.w.z. het aantal zaadcellen,
- Ronde cellen (spermatiden),
- Leukocyten,
- Rode bloedcellen,

De spermaconcentratie wordt verkregen door de telling te delen door het volume van het ejaculaat.

Momenteel is de enige indicator voor de anticonceptiestatus van een man het aantal zaadcellen (miljoen/mL). De telling wordt uitgevoerd met behulp van het Neubauer-meetrooster door alle aanwezige spermatozoën te tellen, ongeacht hun beweeglijkheid. Zodra de telling is voltooid, wordt hieronder een eenvoudige berekening uitgelegd om u een schatting te geven van uw dagelijkse aantal. Het is belangrijk ten minste 2 Neubauer glaasjestellingen uit te voeren van 2 verschillende met de micropipet geëxtraheerde druppels, om de aanvaardbaarheid van de meetverschillen tussen de verschillende tellingen te controleren.

Voor informatie:

Mobiliteit: Het omvat 4 categorieën naar gelang van het waargenomen type verplaatsing:

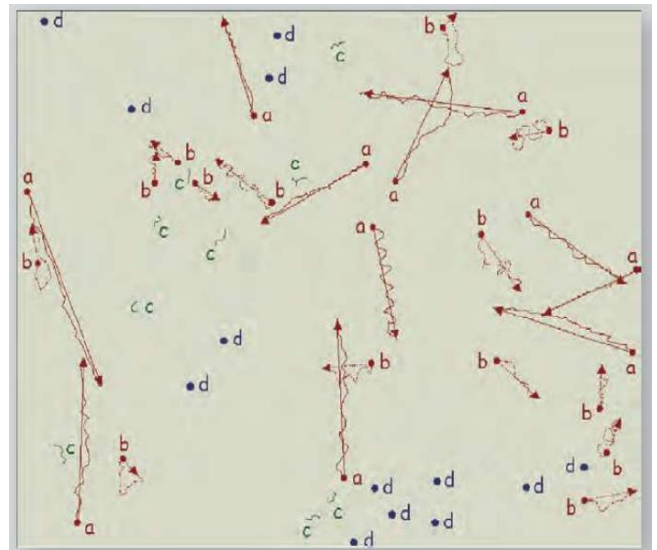
- Type A: progressief, snel, recht - Progressief
- Type B: langzaam progressief of zigzag - Progressief
- Type C: Mobiliteit ter plaatse - Niet-progressief
- Type D: immobiel

Afhankelijk van het aantal getelde spermacellen is het. Het is interessant om het percentage progressieven (A+B) te evalueren. Dit is niet essentieel, maar vergeet niet dat de progressieven een grote kans hebben om de eicel te bevruchten.

Vitaliteit: Dit is het percentage levende zaadcellen 1 uur na emissie. Dit onderzoek wordt uitgevoerd met behulp van een contrastvloeistof.

Normale spermamorfologie: Er zijn verschillende categorieën van afwijkingen:

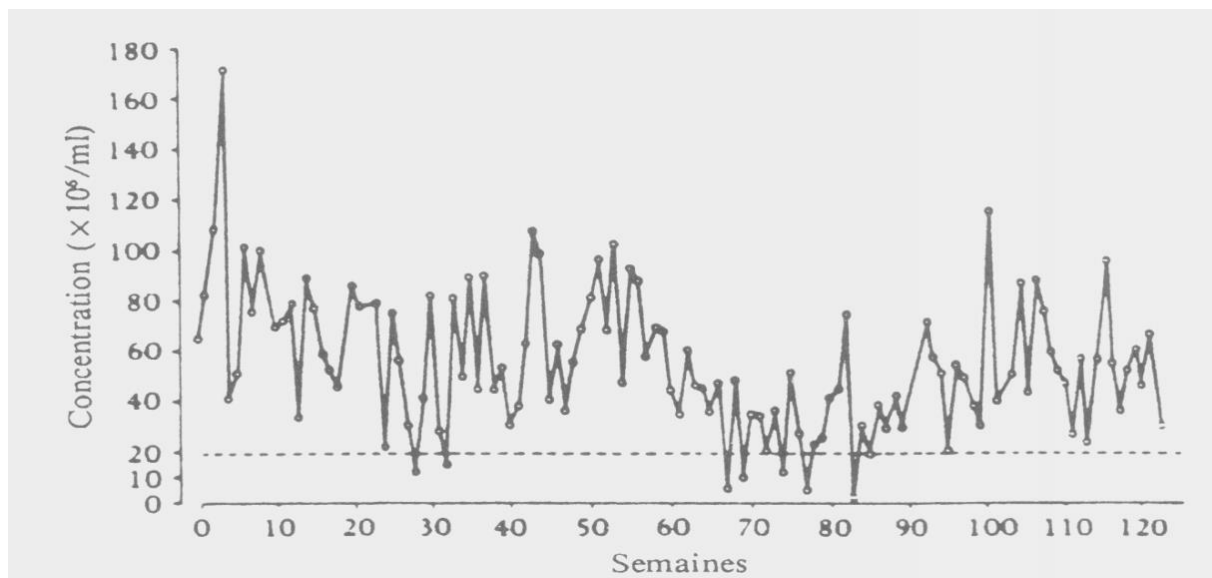
- Hoofdafwijking (langwerpig, verdund, micro- of macrocefaal, meervoudig, onregelmatig, abnormaal of afwezig acrosoom)
- Cytoplasmatische afwijkingen (cytoplasmatisch restant, klein of verdikt tussenstuk, angulatie)
- Afwijking van het flagellum (afwezig, verkort, onregelmatig van grootte, opgerold, meervoudig, geïsoleerd)



Er zijn nog veel meer parameters. Vergeet niet dat alleen de concentratie (miljoen/ml) noodzakelijk is. Zeker, de beoordeling van de mobiliteit en de vitaliteit kunnen interessante elementen zijn om te berekenen, maar zij zijn momenteel niet essentieel bij de evaluatie van uw praktijk van WCL.

KENMERKEN VAN SPERMA	STANDAAR DWAARDEN	STANDAARDWAARDEN ONDER MANNELIJKE ANTICONCEPTIE THERMISCH (na 3 maanden dragen)
VOLUME	> 1,5 ml	> 1,5 ml
CONCENTRATIE	>15 miljoen/ml (onvruchtbaarheids drempel)	< 1 miljoen/ml (contraceptief drempel)
PROGRESSIEVE MOBIELEN (A+B)	> 32%	< 10%
VITALITEIT (MOBILITEIT EEN UUR NA EJACULATIE)	> 58%	< 40%
NORMALE SPERMAMORFOLOGIE	> 4%	< 4%

Variabiliteit in concentratie binnen hetzelfde onderwerp

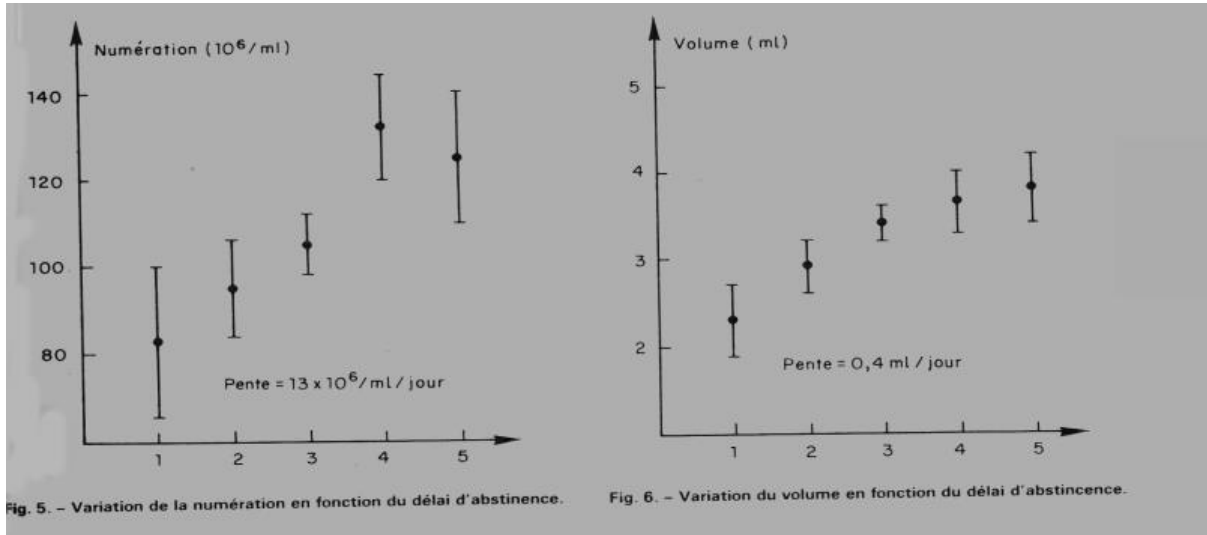


Figuur 1 Tweewekelijkse spermaconcentratie bij dezelfde proefpersoon gedurende een periode van 120 weken. Gedurende deze periode werd de proefpersoon niet behandeld en werden geen koortsige voorvallen geconstateerd (naar Paulsen, WHO, 1992, ongepubliceerde gegevens).

Houd er rekening mee dat uw concentratie in enkele maanden tijd sterk kan variëren. Parameters zoals leeftijd (vooral boven de 50), een medische aandoening die in de afgelopen 3 maanden is opgetreden, een koortsachtige episode, behandeling of medicijngebruik kunnen de hoeveelheid en de kwaliteit van de spermatozoa verminderen. Bij alle onderzoeken bij mannen die aan CMT doen, was er geen bewijs van

dergelijke variaties. Namelijk dat een man onder 1 miljoen/ml nooit boven
Deze drempelwaarde wordt bereikt als het WCL-protocol wordt gevolgd. Het is waarschijnlijk dat de spermatogenese in rust door CMT ook leidt tot een vermindering van de concentratievariabiliteit.

Variabiliteit van de spermakenmerken naargelang de tijd van onthouding

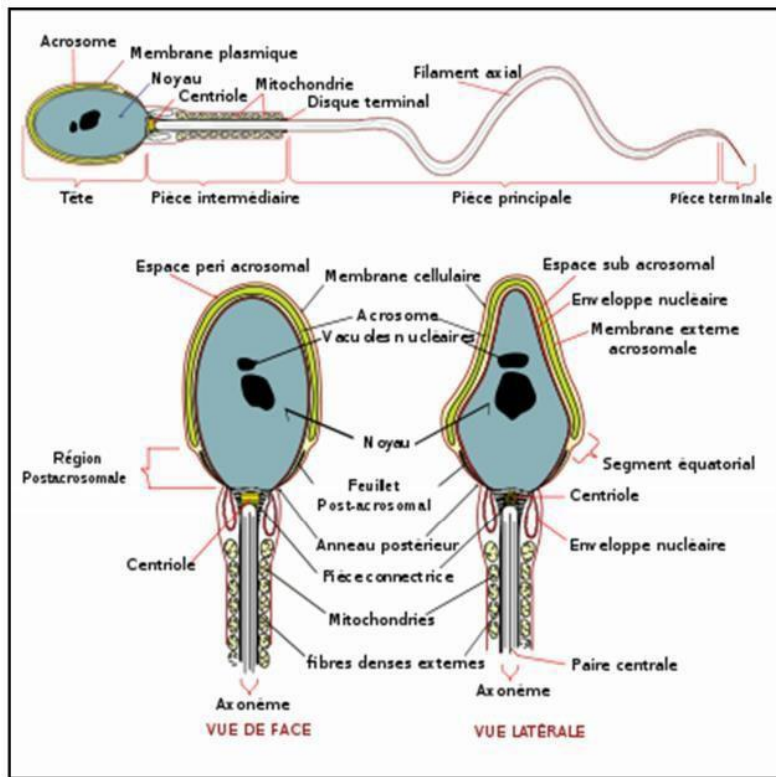


Figuur 2 Variabiliteit in spermakenmerken als functie van de onthoudingstijd, Paulsen, ongepubliceerde gegevens.

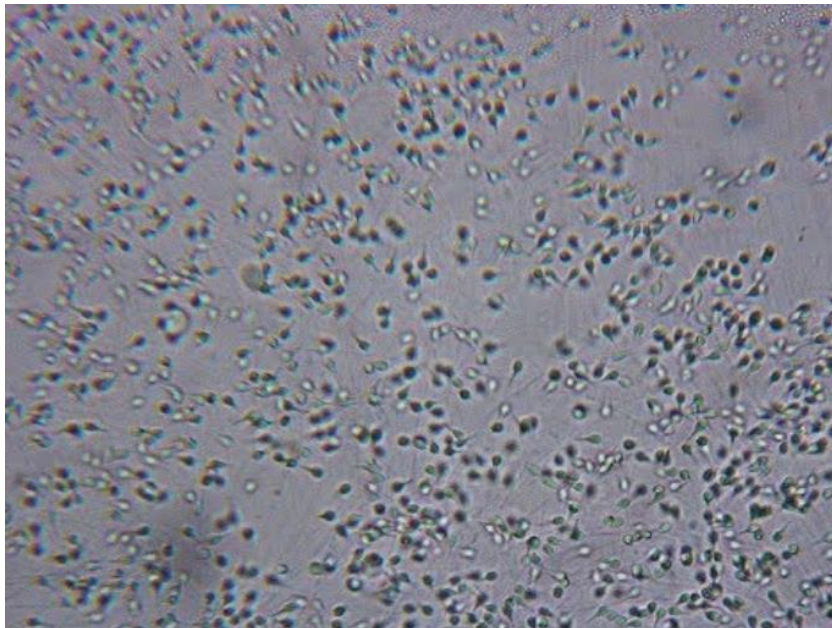
De onthoudingsperiode is van invloed op de concentratie en het uitgestoten volume. De periode van 3 dagen is dus belangrijk om in acht te nemen.

Bovendien kunnen bepaalde moleculen, behandelingen, ziekten, koorts en leeftijd (vooral boven de 50) de hoeveelheid en de kwaliteit van de spermatozoa verminderen. Het is belangrijk om van deze informatie kennis te nemen bij het nemen van het monster en de 3-daagse

Morfologie van de spermatozoïde



Wat je onder de microscoop ziet zonder telrooster:



Wat u ziet op de 8,9cm LCD BRESSER microscoop bij *400 vergroting met een deel van een Neubauer C-telrooster vierkant:

Ceci est un
spermatozoïde



Het identificeren van sperma is vrij eenvoudig als je eenmaal hun karakteristieke vorm kent.

Spermabehandeling en voorbereidingstechnieken

Werk voor dit onderdeel met de laboratoriummicropipet die 10 μ l kan bevatten.

Idealiter wordt sperma bewaard bij 15°C & 25°C, wat ook kamertemperatuur kan zijn.

Standaard opstelling van de hematimeter of Neubauer telcel :

- Plaats het dekglasje op de Neubauer haematizer en leg deze horizontaal op tafel, zodat de micropipet gemakkelijk te hanteren is.
- Steek een wegwerptip in het uiteinde van de propette.
- Stel de micropipet (met een inhoud van 10 μ l) zodanig af dat 10 μ l vloeistof wordt opgezogen. Gewoonlijk geschiedt deze aanpassing door de plunjerknop te bewegen om het gewenste volume te selecteren.
- Steek de punt van de propet in het monster.
- Druk de zuiger voorzichtig in tot hij het einde van zijn slag bereikt.

- Haal de punt van de propette uit het monster en houd het verticaal om het naar de Neubauer hematimeter te brengen.
- Plaats de punt van de pipet op de rand van het dekglasje aan het uiteinde van de Neubauer hemator. Het idee is om de vloeistof door capillaire werking vanaf de zijkant tussen de plaat en het deksel door te laten dringen:
- Laat de plunjer van het document los terwijl u controleert of de vloeistof correct en gelijkmatig in de hematimeter terechtkomt.
- Als er bellen verschijnen, of het deksel is verschoven, of een andere anomalie, herhaalt u de handeling.

De Neubauer haematizer is dan gemonteerd en klaar voor microscopische aflezing.

Deze procedure geldt telkens wanneer u de Neubauer hematimeter van een monster monteert.

Liquefactie van het ejaculaat

15 tot 30 minuten na de zaadlozing, idealiter 30 minuten wachten, maar het kan tot 1 uur duren. Zolang Als het ejaculaat niet vloeibaar is gemaakt, zijn de beweging van het sperma, de homogeniteit van het monster en de mogelijkheid om goede microscopische waarnemingen te doen beperkt. Een eenvoudige methode om de liquefactie te valideren is het gebruik van een pipet. Als het sperma in de pipet druppelsgewijs stroomt, is de liquefactie voltooid, maar als de stroom draderig en stroperig is, is de liquefactie onvolledig.

Homogenisering van het ejaculaat

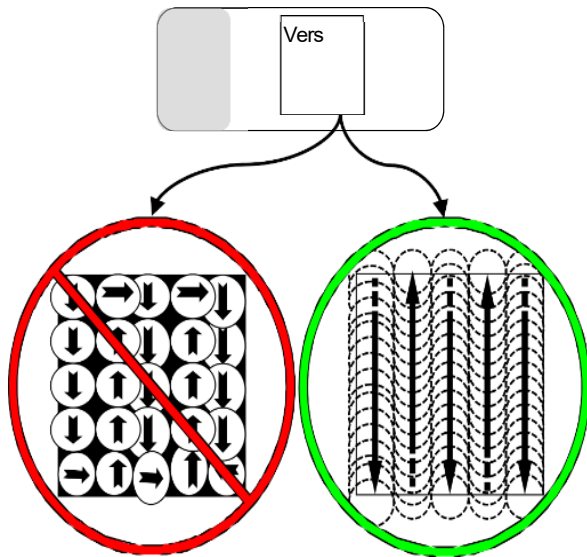
Ofwel door de container te draaien: Draai de container in cirkels met de pols gedurende 15 tot 20 seconden.

Of met een micropipet: Aspireren en het monster voorzichtig uitdrukken (ongeveer tien keer) met de pipet, waarbij ervoor moet worden gezorgd dat er geen luchtbellen ontstaan.

Bereiding van de verse staat

Inbrengen van het 10 μ l monster in de Neubauer-plaat

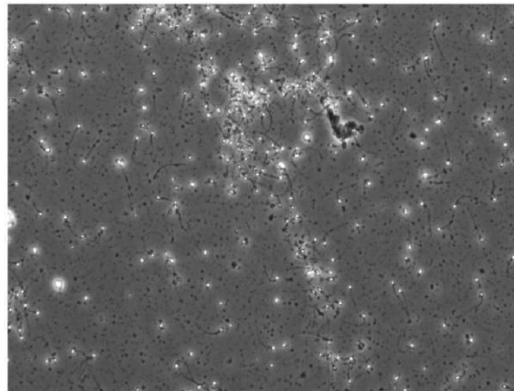
Onder de microscoop moet het verse ejaculaat snel en systematisch worden onderzocht (scannende beweging) om te voorkomen dat het preparaat uitdroogt.



Figuur 3 Verschuiven van het gezichtsveld (scannen) om het gehele oppervlak van het glaasje dat een bekend volume bestrijkt te onderzoeken van sperma.

Als het aantal zaadcellen per veld sterk varieert, is het monster niet homogeen. Het preparaat moet worden weggegooid en opnieuw worden bereid, waarbij bijzondere aandacht moet worden besteed aan de homogenisering. Het onderzoek van vers sperma moet beginnen zodra de cellulaire elementen van de zijn de kiemen gestopt met drijven tussen de dia en het dekglasje.

Microscopisch wordt ook de vloeibaarheid van het verse spermapreparaat gevalideerd. De aanwezigheid van viskeuze stromen wijst erop dat de liquefactie onvolledig is en de telling in gevaar kan brengen. De waarneming van viskeuze stromen, zoals op de foto, is delicaat. Gebruik de druppeltechniek om op vloeibaarheid te controleren.



Figuur 4 Onder de microscoop zichtbare viskeuze stromen die de onvolledige vloeibaarmaking van sperma laten zien.

Neubauer hematometer

De Neubauer hematimeter blijft de referentietelkamer voor het handmatig beoordelen van de spermaconcentratie. Dit is de enige methode voor spermaconcentratie die in deze gids wordt beschreven.

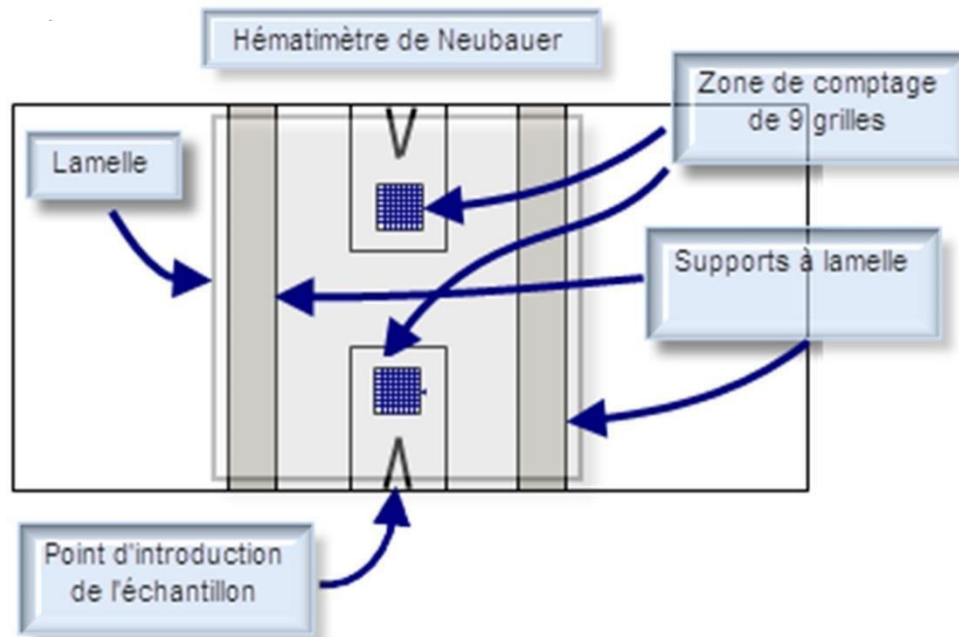
De Neubauer hematimeter bestaat uit twee afzonderlijke telkamers, elk bestaande uit een telgebied

van 3 mm x 3 mm, onderverdeeld in 9 vierkantjes van 1 mm x 1 mm, elk bestaande uit vierkantjes van bekende grootte (zie figuren 5 en 10). Het wordt gebruikt met een dekglasje op

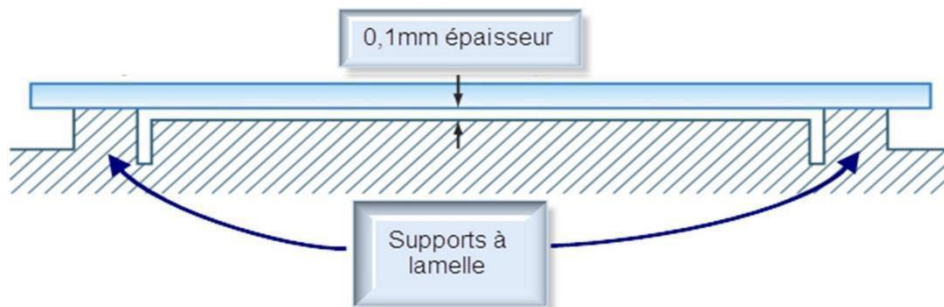
een ingebouwde steun om een spreiding met een constante dikte van 0,1 mm te verkrijgen. Door de oppervlakte van een vierkant te vermenigvuldigen met de dikte van de spreiding kan het volume sperma in dat vierkant worden verkregen en de concentratie worden berekend door het aantal getelde sperma in een bekend volume te delen (concentratie = aantal/volume).

Opmerking: $1 \text{ mm}^3 = 0,001 \text{ ml} = 1 \mu\text{l}$.

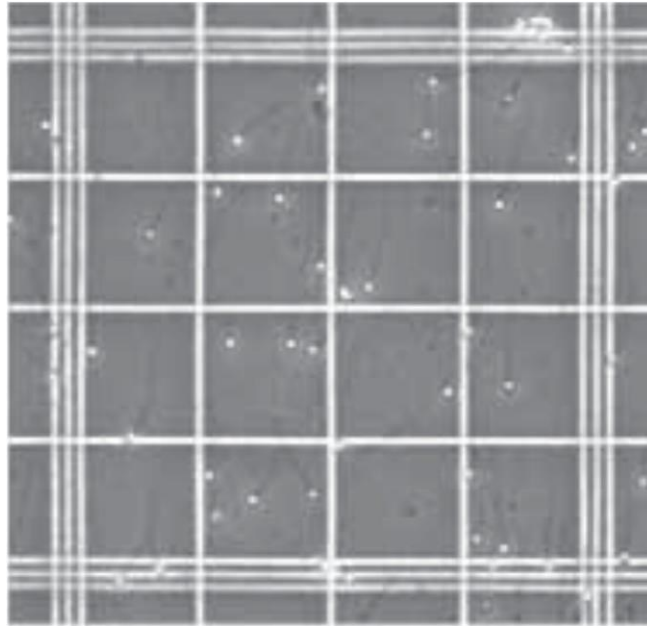
Afhankelijk van de uitgevoerde verdunning en het aantal te tellen zaadcellen per monster moeten de zaadcellen worden geteld op verschillende delen van het telgebied.



Figuur 5 Neubauer hematometer,



Figuur 7 Neubauer hematometer, zijaanzicht.



Figuur 8 Een van de 25 vierkanten in het centrale telgebied van rooster C, onderverdeeld in 16 andere vierkanten en begrensd door 3 parallelle lijnen.

Sperma dat met de Neubauer hematograaf wordt onderzocht, moet om de volgende redenen worden verdund:

- Immobiliseer de spermatozoa,
- Bevorder de verspreiding door capillaire werking onder het dekglasje door het sperma minder stroperig te maken,
- Vergemakkelijkt het tellen wanneer de spermacellen zeer talrijk zijn en elkaar overlappen,
- Vergemakkelijken de telling wanneer het monster veel puin bevat.

Het aantal zaadcellen per veld, beoordeeld in 10 μ l vers sperma, verspreid onder een dekglasje van 22 mm x 22 mm, vormt de leidraad voor de keuze van de juiste verdunning voor de Neubauer hematizeropstelling (tabel in figuur 9) met als doel ten minste 100 zaadcellen per monster te tellen. De verdunning wordt gemaakt met een zoutoplossing.

Nbre de spermatozoïdes par champ, facteur de grossissement de 400	Dilution	Sperme (μl)	Diluant (μl)
Rare	1 : 2	100	100
Moins de 15	1 : 5	100	400
De 15 à 40	1 : 10	50	450
De 41 à 200	1 : 20	50	950
Plus de 200	1 : 50	50	2450

Figuur 9 Verdunningen geschikt voor concentratiebepaling op de Neubauer haematizer.

Beoordeling van de spermaconcentratie

Werk voor dit onderdeel met de laboratoriummicropipet die 100 μl kan bevatten.

De concentratie heeft betrekking op het aantal zaadcellen, uitgedrukt in miljoenen, in één milliliter ($n^{\text{bre}} \times 10^6$ /ml) ejaculaat.

Er zij op gewezen dat als de spermaconcentratie minder dan $1,0 \times 10^6$ /ml bedraagt, de relevantie van de beoordeling van vitaliteit en morfologie kan in twijfel worden getrokken. Een nauwkeurigheid van 20% wordt aanvaardbaar geacht voor grenzen onder $1,0 \times 10^6$ /ml. Fouten tussen 20% en 30% zijn gebruikelijk bij deze telmethode als gevolg van het hanteren van de micropipet, statistische fouten bij een niet-representatief monster, fouten in het volume van het monster dat werkelijk op de plaat is gebracht, enz.

Homogenisatie en verdunning van het ejaculaat

Wegens de viskeuze aard van sperma en het relatief kleine volume van de verdunde monsters is het van essentieel belang dat het sperma grondig wordt gehomogeniseerd voordat het gewenste volume voor de verdunning wordt genomen.

De twee telkamers van de Neubauer hematizer maken het mogelijk twee afzonderlijke monsters van het ejaculaat te tellen. Om de kans op fouten te verkleinen, worden de twee monsters afzonderlijk verdund, in twee verschillende buisjes (d.w.z. de twee telkamers worden niet gevuld met monsters van dezelfde verdunning en er wordt ook niet tweemaal in dezelfde kamer geteld, anders zouden fouten bij de bemonstering, homogenisering of verdunning niet worden opgespoord).

Verdunningen kunnen worden gemaakt in schone buisjes van 5 ml (glas of plastic). Doe eerst de verdunner en vervolgens het sperma in de verdunningsbuis. Voordat u de vloeistof of het sperma in de verdunningsbuis overbrengt, veegt u de buitenkant van de propet af, waarbij u ervoor zorgt dat u de opening van de punt niet aanraakt, zodat er geen vloeistof met het papier wordt opgenomen. Om al het sperma op te vangen, spoelt u de punt van de propet in de verdunningsvloeistof (zoutoplossing) door een paar keer te zuigen en uit te drijven.

Als er vertraging optreedt tussen de bereiding van de verdunning en de montage van de hemator, moeten voorzorgsmaatregelen worden genomen om verdamping te voorkomen.

Montage van de hematimeter en sedimentatie van spermatozoa

Meng de eerste verdunning grondig door ongeveer 10 seconden te schudden of met een propette. Neem onmiddellijk

10 µl van de verdunning en breng de punt van de propette naar het inbrengpunt van de hematometer zonder het glaasje te raken. Pas op dat u het dekglasje niet te zwaar belast of optilt, anders verandert de dikte van de verspreiding.

Doe de tweede verdunning in de tweede kamer. Behandel de hematimeter voorzichtig om te voorkomen dat het glaasje verschuift en laat het horizontaal liggen.

Laat het sperma ten minste 4 minuten, maar niet langer dan 15 minuten bij kamertemperatuur bezinken, anders droogt het preparaat uit en wordt de spermaconcentratie hoger.

Beoordeling van de concentratie

Denk eraan dat ten minste 2 tellingen moeten worden verricht op 2 kamers van twee verschillende druppels van het monster.

Afwezigheid van sperma in vers sperma

Als na onderzoek van het volledige glaasje geen sperma wordt waargenomen.

Minder dan 500 zaadcellen in vers sperma

Indien bij onderzoek van het hele glaasje of op de 9 C-vierkanten minder dan 500 zaadcellen worden geteld, noteer dan het aantal zaadcellen in 10 µl vers (onverdund) sperma.

Als vers sperma volgens de instructies op het glaasje wordt uitgesmeerd en de Als het glaasje volledig is, kan de concentratie per ml als volgt worden geschat:

Eén waargenomen spermacel = 100 spermacellen/ml = $0,0001 \times 10^{-6}/\text{ml}$

Example: 01021 spermatozoa in 10 µl spermatozoa
an 1200 spermatozoa in 10 µl spermatozoa

De drempelwaarde van 500 spermatozoën werd als volgt vastgesteld: aangezien de aanwezigheid van 1 spermatozoön op een glaasje van 10 µl overeenkomt met ongeveer 100 spermatozoën per ml, komt de aanwezigheid van 500 spermatozoën op hetzelfde glaasje overeen met een concentratie van 50.000 spermatozoën per ml. De gepresenteerde hematologiemethode heeft een detectiegrens van 56.000 spermatozoïden per ml. De drempel van 500 zaadcellen in 10 µl maakt het dus mogelijk de concentratie te beoordelen, zelfs onder de detectiegrens van de hematometer.

Ten minste 500 zaadcellen in vers sperma

Zodra op het 10 µl-glaasje 500 zaadcellen zijn bereikt, moet de spermatelling worden stopgezet. Rapporteer het aantal zaadcellen op dit glaasje niet en ga onmiddellijk over tot de hematimetrische telling. Alleen het resultaat van de hematologische telling wordt gerapporteerd.

Aantal zaadcellen in elk van de bereide monsters

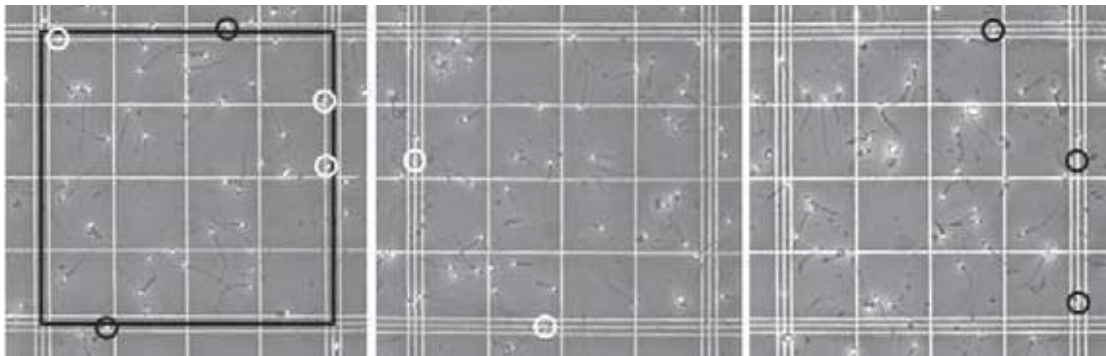
Ga zonder vertraging of onderbreking door met tellen zodra de termijn van 4 minuten is verstreken en niet langer dan 15 minuten wachten.

Aanvaard wordt dat de beoordeling van 100 spermacellen per monster en derhalve een fout van 7,1% volstaan om de kwaliteit van de analyse te waarborgen.

Het tellen gebeurt bij een totale vergroting van 200 of 400.

Het besluit om een zaadcel al dan niet te tellen hangt af van de positie van zijn kop, ongeacht de oriëntatie van het flagellum. De grens van een vierkant is de middellijn van de drie parallelle lijnen langs de zijden. Het sperma wordt geteld als het grootste deel van zijn kop tussen de twee binnenste lijnen van de drieliijnengrens ligt. Het wordt niet geteld als het grootste deel van de kop tussen de twee buitenste lijnen van de drieliijnengrens ligt.

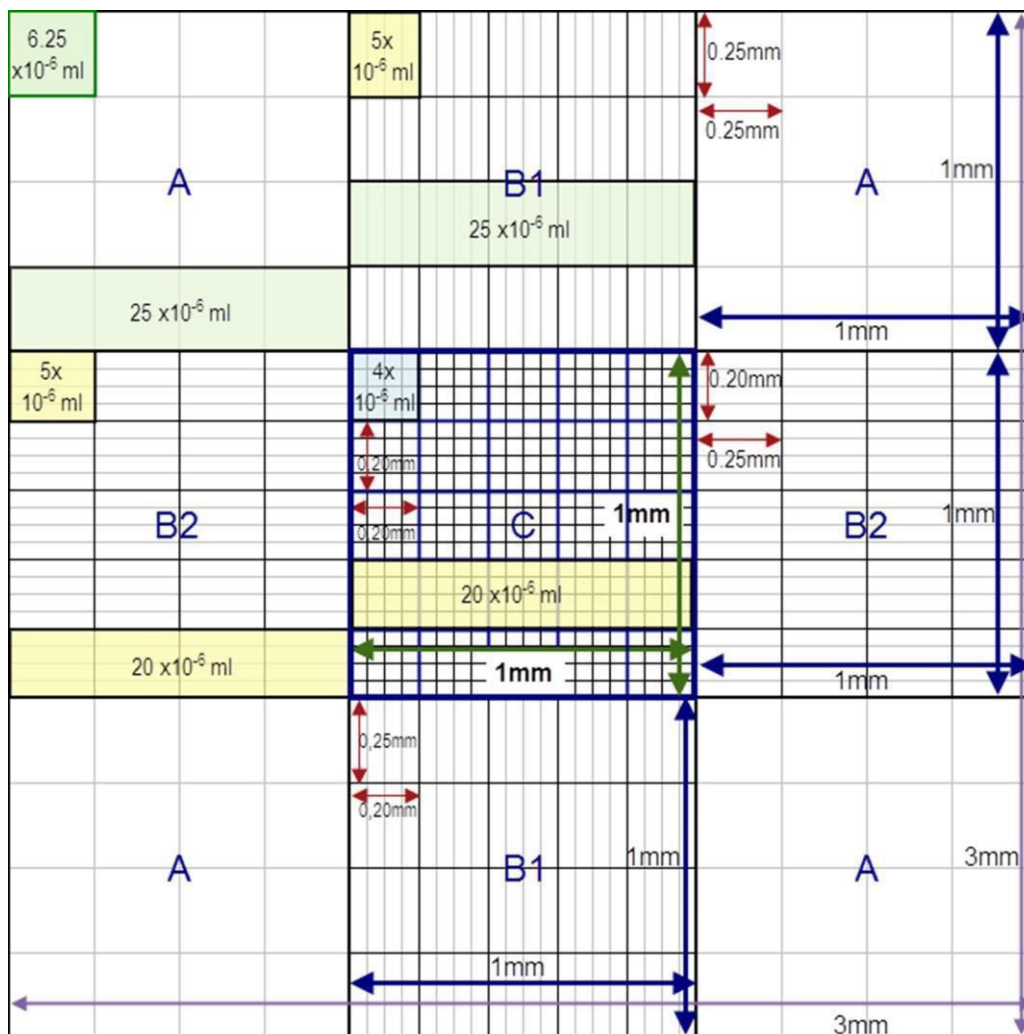
Als het grootste deel van de spermakop op de middellijn ligt, moeten alleen spermatozoïden worden geteld die de randen van twee zijden van het vierkant raken, volgens afspraak de linker- en de onderzijde (figuur 9), om te voorkomen dat in aangrenzende vierkanten twee keer hetzelfde sperma wordt geteld.



Figuur 10 Te tellen sperma in een vierkant in rooster C (begrensd door een rand van 3 lijnen).

Om sperma te tellen dat de randen van het rooster raakt, zie uitleg hierboven. Zwart omcirkelde zaadcellen worden niet geteld, wit omcirkelde wel.

Tel het sperma in 5, 10 of 25 vakjes C (zie figuur 10 en 11) totdat ten minste 100 spermacellen zijn geteld (maximaal 25 vakjes, ongeacht of 100 spermacellen zijn bereikt of niet). Ga naar de tweede telkamer van de hematalysator en tel het sperma in hetzelfde aantal vakjes C (d.w.z. hetzelfde volume) als bij het eerste monster, ook als het uiteindelijke aantal getelde spermacellen minder dan 100 bedraagt. Elk rastervakje C heeft een volume van 4×10^{-6} ml.

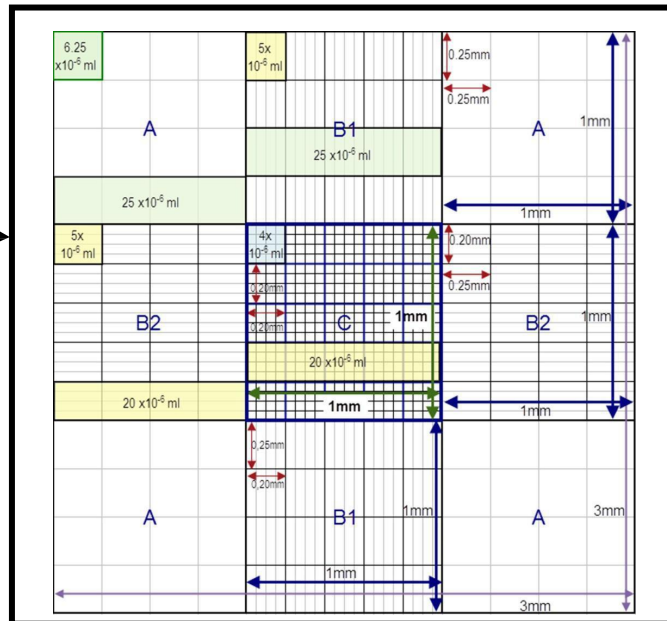


Figuur 11 Telgebied van de Neubauer hematometerkamer.

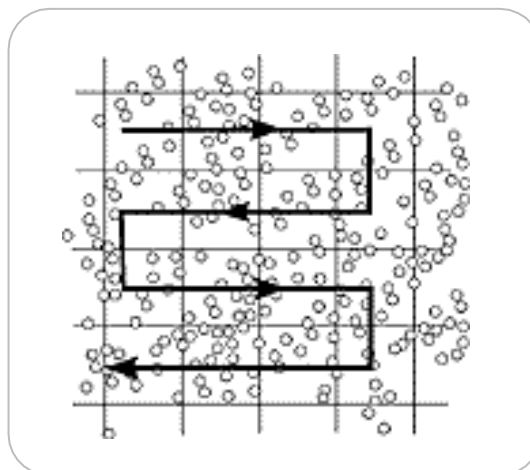
Als de celconcentratie zeer hoog is, kan men zich gemakkelijk in de telling verliezen; daarom wordt een zigzag-telvolgorde gebruikt zoals beschreven in fig. 7 en 12.

- Noteer op een blad de resultaten van het aantal getelde cellen in het eerste frame.
- Herhaal de procedure voor de andere frames die u wilt tellen en noteer het resultaat voor elk frame. Hoe meer frames u telt, hoe nauwkeuriger de meting zal zijn.

Dit stelt het hele veld of raster voor dat we zullen noemen "D"



Figuur 12 Telgebied van de



Figuur 13 Tellen met hoge celconcentratie.

Indien echter minder dan 100 zaadcellen per 1:2 monster worden geteld, zal de steekproeffout groter zijn en de mate van zekerheid lager. In dat geval moeten de 9 vierkantjes van 1 mm x 1 mm van de 2 telkamers (zie figuur 11) worden onderzocht om te proberen een aanvaardbare steekproeffout (20%) te krijgen.

Bereken de som van de twee tellingen (bv. 1e monster: 75 zaadcellen in de 9 vierkantjes van 1 mm x 1 mm; 2e monster: 70 zaadcellen in de 9 vierkantjes van 1 mm x 1 mm van de tweede kamer, in totaal 145).

Zie tabel 1 in het aanhangsel voor informatie over het percentage van de steekproeffout afhankelijk van het aantal getelde spermacellen; indien dit minder dan 20% bedraagt, wordt de steekproeffout aanvaardbaar geacht.

Controle van de aanvaardbaarheid van meetverschillen tussen monsters

Bereken de som en het verschil van de twee tellingen (bv. 1e monster: 126 zaadcellen in 10 C-raster vierkanten; 2e monster 134 zaadcellen in 10 C-raster vierkanten van de tweede kamer, in totaal 260. Verschil tussen de twee tellingen: 8).

Stel de aanvaardbaarheid van het verschil tussen de getallen vast aan de hand van tabel 2 in het aanhangsel.

Voorbeeld. Voor 260 spermacellen is het aanvaardbare verschil 32; het hier verkregen verschil, 8, is minder dan 32 en wij kunnen overgaan tot de berekening van de concentratie.

Als het verschil te groot is, verdient het aanbeveling beide verdunningen te herhalen, waarbij ervoor moet worden gezorgd dat het sperma in elke fase wordt gehomogeniseerd, en de telling te herhalen. Herhaal deze procedure maximaal twee keer (drie sets van twee monsters). Als het verschil na drie rondes nog steeds te groot is (het ejaculaat is bijzonder stroperig en heterogeen), neem dan het gemiddelde van de zes verkregen getallen.

Berekening van de concentratie

De spermaconcentratie (C) is gelijk aan het aantal (N) zaadcellen gedeeld door het volume (V) sperma waarin zij zijn geteld, vermenigvuldigd met de verdunningsfactor (D).

Voorbeeld:

- $D = 20$ (verdunning 1:20).
- $N = 260$ (1e kamer = 126, 2e kamer = 134).
- $V = 10$ vierkanten (x 2 monsters) van elk 4×10^{-6} ml, in totaal 80×10^{-6} ml.
- $C = (N/V) \times D$ ($260/80 \times 10^{-6}$) $\times 20 = 65 \times 10^{-6}$ per ml.

Dilution	N ^{bre} de carrés de la grille C (de chaque chambre) compris dans le comptage			De heel veld, de hele raster genaamd "
	5	10	25	
	Facteur de division			
1 : 2	20	40	100	900
1 : 5	8	16	40	360
1 : 10	4	8	20	180
1 : 20	2	4	10	90
1 : 50	0,8	1,6	4	36

Figuur 14 Verdelingsfactoren die moeten worden toegepast op het totale aantal in beide kamers getelde zaadcellen om de concentratie (in $\times 10^{-6}/\text{ml}$) te berekenen.

Om de concentratie sneller te berekenen kan de tabel van figuur 12 worden geraadpleegd om de verdelingsfactor vast te stellen die moet worden toegepast naar gelang van het aantal vakjes dat in de telling is opgenomen en de uitgevoerde verdunning.

Laten we teruggaan naar het vorige voorbeeld:

- $N = 260$ (2 kamers)
- Verdelingsfactor = 4 (snijpunt van de 10 vierkanten kolom en de 1:20 verdunningsrij)
- $N/\text{Verdelingsfactor} = C$
- $260/4 = 65$
- $C = 65 \times 10^6/\text{ml}$

Detectielimiet

De voorgestelde methode heeft een detectiegrens van 56.000 spermacellen per ml (zodat de steekproeffout niet meer dan 20% bedraagt). Daarom is deze methode onnauwkeurig als er minder dan 25 zaadcellen per telkamer zijn (in totaal 50 zaadcellen).

Bijlagen

Tabellen met aanvaardbare verschillen tussen monsters

Tabel 1 wordt gebruikt om de steekproeffout te berekenen aan de hand van het aantal in de hematometer getelde spermacellen.

Tabel 1. Afrondingsfout (%) naar totaal aantal zaadcellen

$\frac{\text{nuTmot}}{\text{bael}_r}$	Smp/100 fout	$\frac{\text{nuTmot}}{\text{bael}_r}$	Smp/100 fout	$\frac{\text{nuTmot}}{\text{bael}_r}$	Smp/100 fout
1	100	25	20	88	10,8
2	70,7	30	18,3	90	10,5
3	57,7	35	16,9	95	10,3
4	50	40	15,8	100	10
5	44,7	45	14,9	150	8,2
6	40,8	50	14,1	200	7,1
7	37,8	55	13,5	250	6,3
8	35,4	60	12,9	300	5,8
9	33,3	65	12,4	350	5,3
10	31,6	70	12	400	5
15	25,8	75	11,5	450	4,7
20	22,4	80	11,2	500	4,5

¹ WERELDGEZONDHEIDSORGANISATIE. WHO-laboratoriumhandboek voor het onderzoek en de behandeling van menselijk sperma, vijfde editie, Genève, WHO, 2010.

Voorbeeld: in elke kamer van de hemator worden 100 zaadcellen geteld. Volgens tabel 7 bedraagt de steekproeffout 7,1% per 200 spermacellen.

Tabellen met aanvaardbare verschillen tussen monsters

Tabel 2 wordt gebruikt om de aanvaardbaarheid van het verschil in het aantal getelde spermacellen in twee hematologische monsters vast te stellen.

Tabel 2. Aanvaardbaar verschil tussen de in twee monsters verkregen waarden, rekening houdend met het totale aantal spermatozoën

Totaal	Vershil	Totaal	Vershil	Totaal	Vershil
35 à 40	12	144 à 156	24	329 à 346	36
41 à 47	13	157 à 169	25	347 à 366	37
48 à 54	14	170 à 182	26	367 à 385	38
55 à 62	15	183 à 196	27	386 à 406	39
63 à 70	16	197 à 211	28	407 à 426	40
71 à 79	17	212 à 226	29	427 à 448	41
80 à 89	18	227 à 242	30	449 à 470	42
90 à 98	19	243 à 258	31	471 à 492	43
99 à 109	20	259 à 274	32	493 à 515	44
110 à 120	21	275 à 292	33	516 à 538	45
121 à 131	22	293 à 309	34	539 à 562	46
132 à 143	23	310 à 328	35	563 à 587	47

*Gebaseerd op een afgerond betrouwbaarheidsinterval van 95%.

¹ WERELDGEZONDHEIDSORGANISATIE. WHO-laboratoriumhandboek voor het onderzoek en de behandeling van menselijk sperma, vijfde editie, Genève, WHO, 2010.

Voorbeeld : Eerste voorbeeld : 126 spermatozoa; tweede monster: 134 spermatozoa, in totaal 260. Verschil van 8.

Volgens tabel 8 moet voor een totaal van 260 spermacellen het verschil gelijk zijn aan of kleiner zijn dan 32. Het verschil van 8 is dus aanvaardbaar.

Bibliografie

WERELDGEZONDHEIDSORGANISATIE. *WHO-laboratoriumhandboek voor het onderzoek en de behandeling van menselijk sperma*, vijfde editie, Genève, WHO, 2010.

INTERNATIONALE ORGANISATIE VOOR NORMALISATIE. *ISO15189:2012(E) Laboratoria voor Medische biologie - Eisen voor kwaliteit en bekwaamheid*, derde editie (gecorrigeerde versie 2014-08-15), Genève, ISO, 2012.

MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX. *Overeenstemming van medische laboratoria met de norm CAN/CSA-15189 "Laboratoire d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence"*. 2005-03-21.

PROFESSIONELE ORDE VAN MEDISCH TECHNOLOGEN VAN QUEBEC. *Kwaliteit in de laboratoria voor medische biologie: Règles de pratique*, tweede editie, Montréal, OPTMQ, 2009.

CANADIAN STANDARDS ASSOCIATION. *CAN/CSA-Z15190 Medische laboratoria - Eisen voor veiligheid*. Mississauga: Canadian Standards Association, 2005.

CSA GROUP. *Z316.7-12 Voorzieningen voor primaire monsterafname en medische laboratoria - Patiëntveiligheid en kwaliteit van zorg - Eisen voor monsterafname, transport en opslag*, Mississauga, CSA Group, update nr. 1 maart 2014.

CHROMSRIMEK, Natta, et al. "Effect of Time between Ejaculation and Analysis on Sperm Motility", *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology*, April 2008, Vol. 16, No. 2.

SUCKCHAROEN N., et al. "A comparison of Mackler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement", *J Med Assoc Thai*, September 1994, Vol. 77, No 9.

CHRISTENSEN, P., et al. "Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers", *Theriogenology*, maart 2005, Vol. 63, No 4.

HAMAMAH, S. en BARTHELEMY, C. *Spermogrammen en vruchtbaarheidstests: Belang en beperkingen*.

JTA Hoofdstuk V - Vruchtbaarheid en mannelijke onvruchtbaarheid.

KRUGER, Thinus F. en FRANKEN, Daniel R. *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation*, Londen, *Taylor & Francis*, CRC press, 2004, 86.

Cooper, T.G., et al. "Azoospermie: Virtuele realiteit of mogelijk te kwantificeren?" *Journal of Andrology*, 2006, Vol. 27, No. 4.

KORTHORST, Ruben A., et al. "Clearance after vasectomy with a single semen sample containing < 100 000 immotile sperm/mL: analysis of 1073 patients", *BJU International*, 2009, Vol. 10.