

# 'n Vergelykende Studie van die Witselpipet- en Makler-Telkamermetodes vir die Tel van Spermatozoa

R. MENKVELD, J. A. VAN ZYL, F. S. H. STANDER, E. CONRADIE, K. KOPPER

## SUMMARY

A new method for counting spermatozoa was introduced by Makler. This method was compared with the white blood cell pipette method and the results revealed high precision and accuracy (difference of means = 5,9%). Makler's method, which is very simple to perform, has the advantage that rapid and reliable sperm counts can be done. Therefore, the Makler counting chamber can be used with confidence in the performance of semen analysis by any doctor or in any laboratory.

*S. Afr. med. J.*, 58, 536 (1980).

Sedert die begin van hierdie eeu stel navorsers daarin belang om 'n metode te vind vir die bepaling van die fertiliteit van die man. Daar is van verskillende metodes gebruik gemaak. Volgens Macomber en Sanders<sup>1</sup> is daar begin deur die spermatozoa per hoëveldvergroting te tel en die persentasie spermatozoa met normale vorms te skat. Volgens hierdie skrywers het ander metodes bestaan uit die meet van die koplengte van die spermatozoön en Hühner se postkoitale toets, 'n uitbreiding op die werk van Sims.

Macomber en Sanders<sup>1</sup> het in 1929 aangevoer dat hierdie drie metodes nie betroubaar is nie en dat dieselfde resultate nie in ander laboratoria gevind sou word nie. Hulle het voorgestel dat 'n meer betroubare metode die tel van die spermatozoa in 'n gegewe volume semen sal wees. Hierdie skrywers het dan ook die witselpipet (WSP)-tegniek vir die tel van spermatozoa bekend gestel, wat vandag nog in baie laboratoria gebruik word.

Macomber en Sanders<sup>1</sup> het baie klem gelê op die telling per milliliter en het dit as die belangrikste parameter beskou. Hulle het die grens vir fertiliteit op meer as  $60 \times 10^6$  spermatozoa per milliliter gestel.

Belding<sup>2</sup> het 'n studie gemaak van Macomber en Sanders<sup>1</sup> se metodes en tot die gevolgtrekking gekom dat die metode 'n groot variansie van die telling kan gee. Belding<sup>2</sup> stel dat die tel van spermatozoa 'n indeks gee

van die spermatogenetiese aktiwiteit en dat dit sodoende aan die man se fertiliteit gekoppel is. 'n Lae telling dui nie noodwendig op 'n lae fertiliteit nie. Hierdie stelling pas goed by die bevindings van Van Zyl *et al.*,<sup>3</sup> naamlik dat oligospermie beskou moet word as 'n telling van minder as  $10 \times 10^6$  spermatozoa per milliliter.

Daar bestaan tans twee metodes om die getal spermatozoa in 'n gegewe volume semen (telling/ml) te bepaal, naamlik met behulp van die hemositometer en met behulp van die Coulter-teller. Makler<sup>4</sup> het 'n derde metode bekend gestel. Die doel van hierdie studie is om die WSP-metode met Makler se metode te vergelyk.

## MATERIAAL EN METODES

Vir hierdie studie is daar, benewens die gewone roetine-semenanaliseprosedures van 50 opeenvolgende monsters, ook tellings met behulp van die WSP en die Makler-telkamer (MTK) gedoen. Daar is geen seleksie toegepas nie, behalwe dat die monster se volume groot genoeg moes wees sodat al die tellings gedoen kon word. Daar is dus 6 tellings van elke monster gedoen, naamlik twee met die WSP, twee met behulp van die Makler-telkamer, en twee met behulp van 'n tuberkulienpuit van glas (Super Eva glass  $\mu$ -micromatic, Padova, Italië). Laasgenoemde word as roetine-metode in ons laboratorium gebruik.<sup>5</sup> Die gemiddelde van die twee tellings,<sup>2,6,7</sup> soos verkry met elke metode, is geneem en met mekaar vergelyk. Die tellings is willekeurig deur enigen van drie tegnisi gedoen.

Die telling met die WSP is volgens die metode van Freund<sup>8</sup> gedoen en 'n verdunning van 1:10 of 1:20, afhangende van die konsentrasie van die spermatozoa, is gemaak. Vir die MTK is dit nie nodig om 'n verdunning te maak nie. Die semen word eers vir 5 minute in water met 'n temperatuur van 50°-60°C geplaas om die spermatozoa te immobiliseer. Daarna word 'n druppel van die goed gemengde semen met behulp van 'n stokkie of Pasteur-pipet op die telkamer geplaas. Sorg moet gedra word dat die druppel nie te klein is nie, aangesien dit tot 'n te lae telling kan lei. Die spesiale dekglasie waarop die telvierkante gegraveer is, word oor die druppel in posisie geplaas op vier klein steunpunte. Laasgenoemde sorg dat daar 'n spasie van presies 10  $\mu$ m tussen die twee oppervlaktes is. Aan die onderkant van die dekglasie is 'n vierkant van 1 mm<sup>2</sup>, bestaande uit 100 blokke van 0,1  $\times$  0,1 mm elk. Met die dekglasie in posisie is die volume van elke vierkant dus presies 0,01 mm<sup>3</sup> of  $10^{-5}$  ml.

Vir die tel van die spermatozoa word aanbeveel dat 'n 20 $\times$  objektief en 10 $\times$  oogstuk gebruik word; 'n 40 $\times$  objektief kan normaalweg nie gebruik word nie, aangesien die dekglasie te dik is. Met 'n 10 $\times$  objektief

Departement Andrologie, Afdeling Ginekologie en Verloskunde, Tygerberg-hospitaal en Universiteit van Stellenbosch, Parowvallei, KP

R. MENKVELD, B.S.C. HONS, M.S.C., Senior Vakkundige Beampte

J. A. VAN ZYL, M.B. CH.B., M.MED. (O. & G.), M.D., Eerste Spesialis en Hoof

F. S. H. STANDER, Senior Tegnikus

E. CONRADIE, Tegnikus

K. KOPPER, Tegnikus

Ontvangsdatum: 12 Februarie 1980.



is die spermatozoa te klein vir 'n akkurate telling, tensy 'n baie hoë oogstukvergroting gebruik word

As daar 'n hoë konsentrasie van spermatozoa aanwesig is, word 'n strook van 10 vierkante getel. Dit gee dan die getal spermatozoa in miljoene per milliliter. Daar kan enige aantal stroke getel word. Om die telling per milliliter te bereken, word die eindtotaal slegs deur die aantal getelde stroke gedeel. Die telling word gedoen soos vir bloedselle wat met behulp van 'n hemositometer getel word. Daar word aanbeveel dat twee of drie verskillende druppels getel word en dat die gemiddelde dan bereken word om die betroubaarheid van die telling te verhoog. In gevalle van lae tellings, kan al die spermatozoa in al die vierkante getel word. Deur slegs 5 nulle by die totaal te voeg, word die getal spermatozoa per milliliter verkry.

Die twee reekse tellings is met behulp van Student se *t*-toets vir gepaarde waarnemings met mekaar vergelyk en die regressielyn is bereken.

## RESULTATE

Die twee waardes (gemiddelde van 2 tellings elk) wat met die twee telmetodes vir elk van die 50 monsters verkry is, het op die oog af baie goed met mekaar ooreengestem. Daar was egter twee gevalle waar daar met die MTK hoër waardes verkry is as met die WSP, naamlik 38,0 en 56,0 miljoen/ml teenoor 25,2 en 44,0 miljoen/ml onderskeidelik. Hierdie twee hoër waardes is herhaaldelik met verskeie duplikaattellings gevind en is nie vir enige verdere berekeninge in aanmerking geneem nie. Die resultate word in Tabel I en Afb. 1 weergegee.

TABEL I. BESONDERHEDE VAN RESULTATE VERKRY MET DIE WITSELPiPET- EN MAKLER-TELKAMERMETODES

Getal monsters ( <i>N</i> )	= 48
Gemiddelde telling m.b.v. die witselpipet-metode	= $18,35 \times 10^6$ /ml, standaardafwyking $19,08 \times 10^6$ /ml
Gemiddelde telling m.b.v. die Makler-telkamermetode	= $19,36 \times 10^6$ /ml, standaardafwyking $20,26 \times 10^6$ /ml
<i>t</i> -toets (gepaarde vergelykings)	= 2,91 en $P < 0,01$
$t_{(47 \text{ gr})}$	= 0,99
Korrelasie	= 0,99

'n Korrelasie van 0,99 is verkry, wat aantoon dat daar 'n baie goeie verband tussen die twee metodes is. Die gemiddelde telling per milliliter van die twee groepe lê baie na aan mekaar, naamlik  $18,35 \times 10^6$  en  $19,36 \times 10^6$  vir die WSP- en MTK-metodes onderskeidelik. Dit gee 'n gemiddelde verskil van 5,2%.

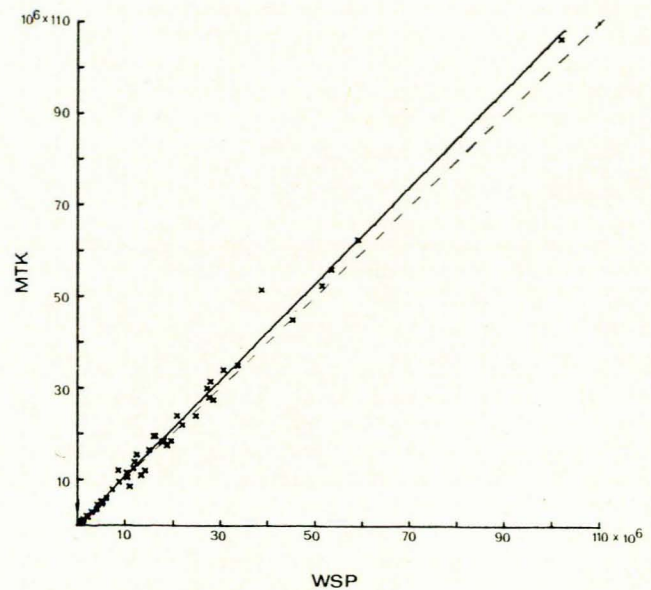
Met die *t*-toets vir gepaarde waarnemings is egter gevind dat die twee waardes betekenisvol van mekaar verskil ( $0,005 < P < 0,01$ ). Dit kan toegeskryf word aan die feit dat met 31 van die 48 tellings hoër waardes met die MTK as met die WSP verkry is. Fisher se teken-toets is uitgevoer, wat aangetoon het dat die MTK-metode wel geneig is om hoër waardes as die WSP-

tegniek te gee ( $0,01 < P < 0,05$ ). Afb. 1 toon dat die regressielyn effens hoër lê as die stippellyn wat die 45°-lyn voorstel, en bevestig dus die waarneming dat die MTK-metode effens hoër waardes gee as die WSP-metode.

## BESPREKING

Die twee metodes wat teenswoordig die mees algemeen gebruik word vir die tel van spermatozoa, naamlik dié met die hemositometer en dié met die Coulter-teller, het elk sy beperkinge.

Die gebruik van die Coulter-teller vereis 'n hoër mate van vaardigheid en 'n grondige opleiding.<sup>8</sup> Die Coulter-teller verg ook baie voorbereiding, veral die korrekte instelling daarvan. Daar moet ook noukeurige verdunnings gemaak word en aandag gegee word aan die nadelige gevolge wat klompings van spermatozoa en agtergrond-partikels kan gee.<sup>7</sup> 'n Hoër verdunning, maar veral 'n lae een, kan probleme veroorsaak en spesiale verdunnings moet gemaak word. Gordon *et al.*<sup>9</sup> het gevind dat indien die aantal spermatozoa minder as  $1,1 \times 10^6$ /ml is, die telling nie meer akkuraat is nie.



Afb. 1. Voorstelling van die lineêre regressielyn. Die stippellyn stel die 45°-lyn voor (WSP = witselpipet-metode en MTK = Makler-telkamermetode).

Die tweede metode vir die tel van die spermatozoa is met behulp van die hemositometer. Die inherente fout van die hemositometer is gewoonlik klein. Die grootste fout word gewoonlik deur die maak van die verdunning veroorsaak. Die foute met die hemositometer-metode kan dus veral aan die volgende drie faktore toegeskryf word: (i) die tegnikus; (ii) die metode van verdunning; en (iii) die telkamer.

Daar kan onder meer foutiewe tellings met die hemositometer wees as die verdunning nie geskik is nie. So,



byvoorbeeld, sal 'n te lae verdunning, veral as die konsentrasie van die spermatozoa hoog is, aanleiding gee tot 'n konstante laer telling.<sup>2</sup> 'n Tweede fout wat gemaak kan word, is met die vul van die telkamer. Dit staan bekend as die veldfout,<sup>10</sup> en is die gevolg van die oneweredige lukraak verspreiding van die spermatozoa in die telkamer. Daar is gevind dat die distale kant van die telkamer 'n hoër konsentrasie spermatozoa bevat as die kant waarvan die telkamer gevul is.<sup>11</sup> Dit is dus nodig om 'n gelyke getal proksimale en distale vierkante te tel.

Dit is gewoonlik die maak van die verdunning wat die grootste fout veroorsaak en waar die menslike faktor ook 'n groot rol speel.<sup>12</sup> Verskillende metodes word gebruik vir die maak van verdunnings. Macomber en Sanders<sup>1</sup> het gebruik gemaak van die WSP-metode, wat vandag nog die standaardmetode is. Eliasson<sup>6</sup> maak gebruik van verdunnings van 1:50, 1:100 en 1:200. 'n Ander metode is die sogenaamde 'bulk'-metode, waar daar met behulp van 'n gewone pipet 0,1 of 0,5 ml semen by onderskeidelik 9,9 en 9,5 ml verdunningsvloeistof gevoeg word.<sup>2</sup> Van Zyl<sup>15,13</sup> maak gebruik van die 1 ml-tuberkulien-spuut.

Wanneer 'n nuwe metode bekend gestel word, moet dit met bekende metodes vergelyk word. Daar is twee belangrike kriteria waaraan 'n nuwe metode moet voldoen, naamlik: (i) presiesheid, dit wil sê of die metode 'n soortgelyke beraming as die ou metode gee; en (ii) herhaalbaarheid, dit wil sê hoe groot die inherente fout van die metode is.<sup>6,7</sup> 'n Ander belangrike faktor is die gemak waarmee die prosedure uitgevoer kan word.

Vir die eerste kriterium was dit dus nodig om met die twee metodes duplikaattellings op dieselfde monsters te doen en die resultate met behulp van die *t*-toets te vergelyk.

Die resultate het aangetoon dat die MTK goed aan hierdie vereiste voldoen. Daar is wel gevind dat dié metode geneig is om effens hoër tellings te gee. Hierdie neiging kan ook in Afb. 3 van Makler<sup>4</sup> se artikel gesien word. Dit kan moontlik toegeskryf word aan die genoemde feit dat met behulp van die WSP daar nie 'n verdunning van 1:100 gemaak kan word nie en dat die WSP dus met die hoër spermatozoa-konsentrasie laer tellings sal gee. In hierdie studie het die tellings almal onder  $60 \times 10^6$ /ml gelê, behalwe in een geval. In 'n verdere studie sal daar veral op die hoë tellings gelet word en sal die tuberkulien-spuut ook met hierdie twee metodes vergelyk word.

Die verskil tussen die gemiddeldes oor al die tellings geneem was 5,6%, wat volgens Eliasson<sup>6</sup> toelaatbaar is, aangesien tellings van minder as  $60 \times 10^6$ /ml nie meer as 10% en dié van meer as  $60 \times 10^6$ /ml nie meer as 20% mag verskil nie.

Makler<sup>4</sup> het gevind dat by die laer tellings die verskil tussen duplikaattellings neig om groter te wees. Dit kom ooreen met wat in hierdie studie gevind is. Om hierdie probleem te bowe te kom, kan daar meer tellings gedoen word om so 'n gemiddelde telling te bepaal.

Aan die tweede kriterium, naamlik die herhaalbaarheid, is in hierdie studie nie baie aandag gegee nie, aangesien Makler<sup>4</sup> dit deeglik bestudeer het. Dit blyk dat die herhaalbaarheid goed is, veral met hoër tellings. In gevalle van lae tellings was die resultate nie altyd so bevredigend nie, aangesien die koëffisiënt van variasie groter geword het met 'n afname in telling. Volgens Eliasson<sup>6</sup> behoort die koëffisiënt van variasie nie meer as 10% te wees nie. As egter in gedagte gehou word dat met 'n telling van onder 10 miljoen/ml 'n verskil van 1 miljoen tussen duplikaattellings altyd 'n verskil van meer as 10% veroorsaak, is dit moeilik om aan hierdie vereiste te voldoen.

Volgens Freund<sup>8</sup> is die fout van die hemositometer groot as dit vir die tel van spermatozoa gebruik word. Freund<sup>8</sup> stel dat die foute tussen laboratoria dus ook groot sal wees, en dat alles moontlik gedoen moet word om die telmetode van spermatozoa te standaardiseer sodat tellings van verskillende laboratoria met mekaar vergelyk kan word.

In hierdie laboratorium is min verskille tussen tegnici gevind. Die foute moet eerder aan die verdunningsmetode toegeskryf word, en sorg moet gedra word om op die moontlike knelpunte, soos hierbo genoem, te let en dit te probeer vermy. Die metode van Makler skakel baie van hierdie knelpunte uit, veral aangesien dit nie nodig is om verdunnings te maak nie. 'n Verdere voordeel is dat duplikaattellings op verskeie druppels baie vinnig gedoen kan word, 'n feit wat die akkuraatheid van die resultate kan verhoog. Die metode van Makler kan dus baie daartoe bydra om variansie in tellings tussen en binne laboratoria uit te skakel.

Ons wil graag ons dank betuig teenoor dr. C. de W. Viviers, Eerste Mediese Superintendent, Tygerberg-hospitaal, vir sy toestemming om hierdie artikel te publiseer, professor W. A. van Niekerk, hoof, Afdeling Ginekologie en Verloskunde, en dr. T. J. van W. Kotze, Instituut vir Biostatistiek van die Suid-Afrikaanse Mediese Navorsingsraad, vir sy raad en belangstelling.

#### VERWYSINGS

1. Macomber, D. en Sanders, M. B. (1929): *New Engl. J. Med.*, **200**, 981.
2. Belding, D. L. (1934): *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **27**, 25.
3. Van Zyl, J. A., Menkveld, R., Kotze, T. J. van W. *et al.* (1975): *Int. J. Fertil.*, **20**, 129.
4. Makler, A. (1979): *Fertil. and Steril.*, **30**, 313.
5. Van Zyl, J. A. (1980): *S. Afr. med. J.*, **57**, 485.
6. Eliasson, R. in Behrman, S. J. en Kistner, R. W., red. (1975): *Progress in Infertility*, 2de uitg., bl. 696. Boston: Little, Brown.
7. Gordon, D. L., Barr, A. B., Herrigel, J. E. *et al.* (1965): *Fertil. and Steril.*, **16**, 522.
8. Freund, M. in Behrman, S. J. en Kistner, R. W., red. (1968): *Progress in Infertility*, 1ste uitg., bl. 593. Boston: Little, Brown.
9. Gordon, D. L., Herrigel, J. E., Moore, D. J. *et al.* (1967): *Amer. J. clin. Path.*, **47**, 226.
10. Miale, J. B. (1962): *Laboratory Medicine — Hematology*, 2de uitg., bl. 403. St Louis: C. V. Mosby.
11. Rümke, L. (1954): *Ned. T. Geneesk.*, **98**, 3480.
12. Freund, M. en Carol, B. (1964): *J. Reprod. Fertil.*, **8**, 149.
13. Van Zyl, J. A. (1972): *S. Afr. J. Obstet. Gynaec.*, **10**, 17.