



# VALIDERING AF INSTRUMENT TIL FULDAUTOMATISK ANALYSE AF MORFOLOGI OG MORFOMETRI FOR ORNESÆD

MEDDELELSE NR. 965

Afprøvningen har vist, at et instrument til automatisk vurdering af sædcellernes normale udseende og størrelse kan være et alternativ til måling af sædens morfologi

---

INSTITUTION: VIDENCENTER FOR SVINEPRODUKTION, DEN RULLENDE AFPRØVNING

FORFATTER: **CLAUS HANSEN**

UDGIVET: 17. MAJ 2013

Dyregruppe: Orner

Fagområde: Reproduktion

## Sammendrag

Der er gennemført en afprøvning af et nyt instrument til måling af sædens morfologi (cellens udseende) og morfometri (sædcellens dimensioner). Instrumentet hedder ASQAS (Automatic Semen Quality Analysis System) og er et fuldautomatisk system til analyse af en sædprøve. Resultaterne viste, at der kun var lille variation mellem dobbeltbestemmelser ved analyse af sædcellers defekter og opmåling af sædcellers dimensioner. Korrelationen til manuel morfologisk analyse af sæden viste korrelationskoefficienter på 0,8 eller derover ved analyse for proximaldråber, distaldråber og halekrøller, hvilket er en tilfredsstillende sikkerhed. Målingen med ASQAS kan foretages fra dag 1 til dag 5 efter sædopsamling uden sædens alder bevirker en systematisk forskel i resultatet for analysen.

Resultaterne for denne afprøvning viste, at instrumentet ASQAS kan være et alternativ til manuel vurdering af sædens morfologi. Denne afprøvning dokumenterer repeterbarheder i

dobbeltbestemmelser og korrelation til manuel morfologi. Yderligere afprøvninger inkluderer tværsnitsundersøgelse med ASQAS sammenholdt med ornernes frugtbarhed.

#### TILSKUD

Projektet har været støttet økonomisk af Ornestation Mors samt Hatting-KS

## Baggrund

Sædens kvalitet er vigtig for sædens frugtbarhed. Sædkvalitet omfatter mange aspekter, hvorunder sædens morfologi (sædcellernes udseende), anses for at være en vigtig parameter, som er vist at have indvirkning på sædens befrugtningsevne [1]. Sædens morfologi vurderes traditionelt subjektivt med mikroskopi ved 1.000 ganges forstørrelse. Her vil det være muligt at erkende mange forskellige morfologiske defekter på sædcellen, omend de mindste defekter ved sædcellerne ikke vil kunne erkendes, selv om også de kan have stor betydning for sædens frugtbarhed.

Standarden for morfologisk vurdering af sæd sker ved en visuel vurdering (en person vurderer sæden i mikroskop). Dette er en langsommelig og personafhængig procedure. Der er udviklet instrumenter til automatiseret computerbaseret analyse af sædens morfologi. Disse instrumenter kan samtidig analysere sædens morfometri (sædcellens dimensioner) [2], [3], [4]. Der er stor forskel på instrumenterne, i forhold til hvordan de virker, og hvordan sædprøven skal forberedes inden analysens gennemførelse. Videncenter for Svineproduktion har udviklet et instrument (ASQAS – Automatic Semen Quality Assessment System) til måling af sædens morfologi og morfometri (dimensioner af sædcellerne), hvor der er lagt vægt på, at metoden skal være fuldautomatisk og prøveforberedelsen skal være så simpel, at omkostningerne ved en analyse kan holdes så lav som muligt. Samtidig tilstræbes en god sikkerhed på resultatet. ASQAS består af et mikroskop med motoriseret X/Y bord samt automatiseret fokusering. Mikroskopet er udstyret med kamera, der er tilkøbt en computer. Analysen foretages ved at der optages 224 billeder, som analyseres i computeren.

Formålet med afprøvningen var at validere ASQAS omkring følgende parametre:

- Undersøge om sædcellerne identificeres korrekt
- Undersøge systematiske forskelle mellem målinger af samme sædprøve analyseret på dag 1 til 5 efter sædopsamlingen
- Estimere korrelationen mellem analysen med ASQAS og traditionel manuel analyse af sædens morfologi
- Afrapportere repeterbarheden for målinger af morfologi og morfometri i en analyse med ASQAS.

# Materiale og metode

Afprøvningen omfattede tre delundersøgelser. Del 1 var en undersøgelse af, om instrumentet målte korrekt (nøjagtighed). Del 2 var en undersøgelse af effekten af tid fra sædtagning til analyse. Del 3 var en undersøgelse af sammenhæng mellem målingen med ASQAS og sædens morfologi vurderet med traditionel morfologisk analyse samt opgørelse over repeterbarheder i målingerne.

## Udførelse af analyse med ASQAS

Fra en kommerciel sæddose (30-40 mio. sædceller pr. ml) blev udtaget cirka 5  $\mu$ l sæd, som blev fikseret ved tilblanding af cirka 1  $\mu$ l 4 pct. formalin direkte på et objektglas. Fra den fikserede sæd blev udtaget cirka 1,5  $\mu$ l, som blev overført til et objektglas. Et dækglas blev presses ned, således at væsken dannede et så tyndt lag som muligt under dækglasset. Objektglasset blev straks placeret i ASQAS til analyse. Analysen blev gennemført fuldautomatisk.

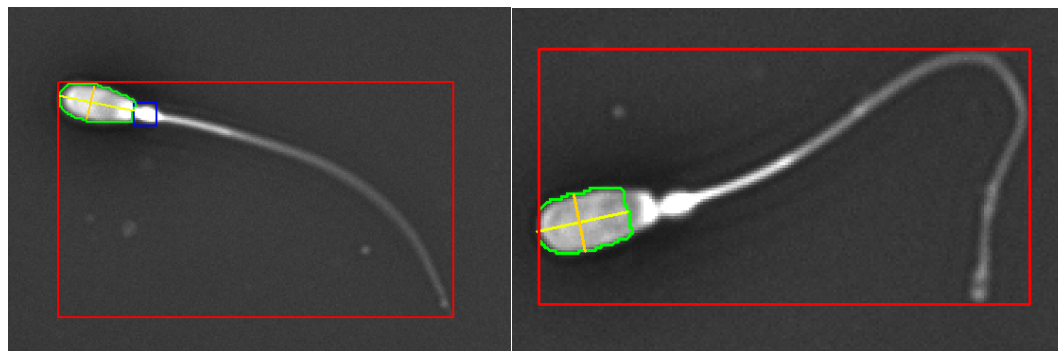
Ved analysen med ASQAS blev indsamlet 224 billeder optaget fra mikroskopet. Hver sædcelle blev identificeret og opmålt med dimensioner af sædcellens hoved og mellemstykke samt opmåling af pixelintensitet og variation i pixelintensitet. Dimensionerne ved opmålingen anvendtes til at skelne sædceller fra objekter, der ikke var sædceller. I ASQAS er der fastlagt kriterier for, hvor meget en sædcelle kan afvige fra de normale dimensioner. Kriterierne, for hvornår en sædcelle kunne anvendes til morfologiske analyser, var ikke de samme som for sædceller der skulle indgå i morfometriske analyser af sædcellerne. Det skyldes, at opmåling af sædcellens dimensioner kræver, at sædcellen er i fokus i billedet, mens identifikation af morfologiske defekter ikke stiller samme krav til skarpheden i billedet. Derfor vil der indgå flere sædceller fra en prøve i den morfologiske måling end der gør i den morfometriske måling. Inklusionskriterier for sædceller til morfometrisk og morfologisk analyse er angivet i appendiks 1 - tabel 3.

## Del 1 - Nøjagtighed i målinger med ASQAS

Undersøgelsens formål var at efterse og kontrollere, om ASQAS identificerede sædceller korrekt, om ASQAS identificerede de morfologiske defekter korrekt (morfologi) og om kanten af sædcellen blev fundet korrekt, således at instrumentet kunne måle sædcellens dimensioner korrekt (morfometri).

Til undersøgelsen blev der tilfældigt udvalgt billeder fra tidligere udførte analyser med ASQAS. En analyse med ASQAS omfattede normalt 224 billeder. Til denne delundersøgelse blev udvalgt nogle af disse billeder til manuel kontrol af billederne. Der blev i alt udvalgt 770 billeder fordelt på 22 forskellige analyser, således at billeder fra start til slut i analyserne var repræsenteret. Billederne var tilfældigt udvalgt. Samlet omfattede undersøgelsen 2.308 sædceller, der kunne indgå i analysen af morfologi og 1.748 sædceller, der kunne indgå i analysen af morfometri.

I analysens resultatvindue viser programmet et billede af hvert fundet objekt (sædcelle) med en markering af, hvor ASQAS har fundet kanten af objektet. For hver sædcelle, som ASQAS havde fundet, blev det manuelt kontrolleret, om der var tale om en sædcelle. Herefter blev det undersøgt, om sædcellen havde proximaldråbe, distaldråbe eller halekrølle; samt om sædcellehovedets ydre kant var fundet korrekt. Se figur 1 med eksempel på henholdsvis korrekt og forkert identificeret kant af sædcellen.



Figur 1. Billeder af sædceller hvor den røde ramme er en afgrænsning af hele det objekt som ASQAS har fundet. Den grønne markering viser den kant ASQAS har fundet for sædcellens hoved. Det gule kryds angiver, hvor ASQAS måler længde og bredde. Den blå firkant indikerer, om der er fundet en morfologisk defekt. Billedet til venstre (A) viser korrekt identificeret kant (grøn) på en sædcelle med en blå markering af en proximaldråbe. Billedet til højre (B) viser forkert identificeret kant på en sædcelles hoved, idet en del af hovedet nærmest halen ikke er med i markeringen. ASQAS har heller ikke fundet, at også denne sædcelle har en proximaldråbe.

## Statistisk analyse

Nøjagtigheden i analysen af sædcellens morfologi blev vurderet ved at sammenligne sædcellerne fundet med ASQAS med den visuelle vurdering, og beregne analysens sensitivitet, specificitet, prædiktive værdi af positiv test og prædiktive værdi af negativ test. Nøjagtigheden i analysen af sædcellens morfometri kan udelukkende vurderes ud fra andelen af sædceller hvor yderkanten var fundet korrekt. Der findes ikke en metode, der kan sammenlignes med, ved måling af de enkelte sædceller som blev fundet i analysen.

## Del 2 – Effekt af sædens alder på målingen af sædens morfologi og morfometri

Formålet med denne delundersøgelse var at estimere effekten af sædens alder på resultatet af analysen, når sæden var 1 til 5 dage gammel, hvor dag 1 var dagen efter sædopsamlingen. Effekten af alder blev målt for både sædcellernes morfologi og morfometri.

Undersøgelsen omfattede analyse af 20 forskellige batch af sæd, hvor en batch er sæddoser produceret ud fra sæd fra mellem en og 10 orner. Fra hver batch blev udtaget fem sæddoser, som blev opbevaret ved 17° C indtil analyse. En sæddose blev analyseret på hver af dagene fra 1 til 5 efter sædopsamling. Alle analyserne blev gennemført som dobbeltbestemmelse. I gennemsnit blev analyseret 342 sædceller pr. analyse af morfologi med ASQAS, hvor mindre end 10 pct. af analyserne

havde færre end 140 sædceller pr. analyse. Ved analyse af morfometri med ASQAS indgik i gennemsnit 185 sædceller pr. analyse, hvor 10 pct. af analyserne indeholdt færre end 89 sædceller.

### Statistisk analyse

For hver gennemført analyse blev beregnet gennemsnit og variationer for opmåling af sædcellen (se appendiks 1 - tabel 4 for definition af de enkelte variable). Statistisk analyse af forskelle mellem analysedage er gennemført ved variansanalyse. For hver parameter blev det undersøgt, om dag kunne forklare variationen i tallene, hvor dag indgik som klassevariabel og den enkelte batch af sæd som tilfældig effekt. Signifikansgrænser blev korrigeret efter bonferroni for effekten af multiple sammenligninger.

### Del 3 – Korrelation mellem analyse med ASQAS og traditionel analyse af sædens morfologi samt repeterbarhed på analyser med ASQAS

Formålet med denne delundersøgelse var at korrelere analysen med ASQAS til visuel analyse af sædens morfologi. Samlet blev der analyseret sæd fra 466 ejakulater, fordelt på 57 Landrace-orner og 87 Yorkshire-orner. Undersøgelsen omfattede analyser af sæd fra op til fem forskellige sædopsamlinger fra hver orne. Ornerne var udvalgt ud fra ornernes gennemsnitlige frugtbarhed, således at orner med både meget høj frugtbarhed og meget lav frugtbarhed indgik i undersøgelsen. Fra hver sædopsamling blev produceret kommercielle sæddoser og udtaget en sæddose. Sæddosen blev sendt fra KS-stationen som kommerciel sæddose og blev ved ankomsten til laboratoriet opbevaret ved 17° C. På 3. dagen efter sædopsamling blev sæddosen analyseret med ASQAS med dobbeltbestemmelse samt med traditionel visuel morfologisk vurdering af sædens defekter.

Ved analyse af sædens morfologi med mikroskopi blev udtaget cirka 5µl sæd. Hertil blev tilsat cirka 1 µl 4 pct. formalin til fiksering af cellerne. Fra den fikserede sæd blev der udtaget cirka 2-3 µl, som blev afsat på rent objektglas og monteret med dækglass. Efterfølgende blev vurderet 400 sædceller med 1.000 ganges forstørrelse. For hver sædcelle blev vurderet, hvilken defekt sædcellen havde, eller om sædcellen var normal efter kriterier angivet af regler for KS-stationers vurdering af sædkvalitet [5].

### Statistisk analyse

Sammenhængen mellem ASQAS-målinger af andelen af distaldråber, proximaldråber, halekrøller og normale sædceller er korreleret til manuel vurdering af sædens morfologi ved hjælp af lineær regression samt ved analyse af korrelationen mellem ASQAS og visuel vurdering af sædens morfologi. Korrelationen blev udregnet som Parssons korrelationskoefficient. Ved vurderingen af manuel morfologi blev sædceller, som hverken havde distaldråber, halekrølle eller proximaldråbe anset for værende normale, da ASQAS kun ville kunne erkende disse tre typer defekter. Ved lineær regression er regressionslinjen tvunget gennem 0,0. Det kan ikke analyseres, om målingen af sædcellernes dimensioner korrelerer til morfologien, da det ikke er sammenlignelige målinger der

udføres. Repeterbarhed for målinger foretaget med ASQAS er vurderet som estimeret spredning mellem dobbeltbestemmelser.

## Resultater og diskussion

### Del 1 - Nøjagtighed i måling af med ASQAS

Ved vurdering af sædens morfologi kan ASQAS klassificere sædceller som normale eller med defekterne halekrølle, proximaldråbe og distaldråbe. Desuden kan instrumentet opmåle sædcellens hoved, dersom yderkanterne af hovedet er fundet korrekt. Resultatet fra en analyse præsenteres som opgørelse over procentdelen af sædceller med defekter samt beregninger af dimensionerne for sædcellernes hoveder. En sædcelles grænse var identificeret korrekt, hvis kanten af sædcellen kunne følges hele vejen rundt om sædcellehovedet ved detektion af sædcellens kant (figur 1). Det antages, at opmålingen af en sædcelle er korrekt, dersom grænsen for sædcellens kant er identificeret korrekt. Det er en antagelse, der ikke efterprøves i denne afprøvning. Idet en computer altid vil måle det samme billede på samme måde og kun sædceller i fokus inkluderes i analysen vurderes fejl i opmålingen af sædcellen ikke til at have stor konsekvens for det samlede resultat, blot kanten var identificeret korrekt.

Nøjagtigheden af et instrument er afgjort på baggrund af en visuel gennemgang af 2.545 fundne objekter, hvoraf 2.308 sædceller kunne indgå i analyse af morfologi og 1.748 sædceller kunne indgå i en analyse af morfometri. Resultaterne viste en meget høj grad af specificitet og lidt lavere sensitivitet ved klassificering af, om sædcellen var normal eller defekt (tabel 1). Sensitivitet er "evnen til at finde pågældende defekt". Specificiteten angiver evnen til at finde sædcellerne normale. Specificiteten vil naturligt altid blive høj, fordi andelen af normale sædceller var høj i undersøgelsen. Den prædiktive værdi fortæller, hvad chancen er, for at defekten er til stede, når sædcellen testes henholdsvis positiv og negativ i testen.

**Tabel 1.** Oversigt over sensitivitet, specificitet, prædiktiv værdi af negativ og positiv test for analyse af defekte sædceller med ASQAS.

	Halekrølle	Distaldråbe	Proximaldråbe
Sensitivitet	0,52	0,848	0,939
Specificitet	0,997	0,999	0,994
Prædiktiv værdi af negativ test	0,979	0,979	0,995
Prædiktiv værdi af positiv test	0,897	0,988	0,922

Overordnet sås en ringe sensitivitet for halekrøller, uden at det egentligt kan forklares, hvorfor de overses. Ved detektionen af proximaldråber sås 13 falsk positive sædceller, - det vil sige 13 sædceller, der blev fundet som havende proximaldråber, men som var normale. Alle de falsk positive proximaldråber ville kunne elimineres, hvis der i detektionen af proximaldråber indføres en kontrol af,

hvor stor dråben er. For både halekrøller og distaldråber sås meget få (henholdsvis 7 og 3) falsk positive sædceller. Dette er et udtryk for, at ASQAS næsten altid vil underestimere andelen af defekte sædceller.

Der blev i øvrigt ikke fundet sædceller, hvor den ydre grænse af sædcellen var identificeret forkert.

## Del 2 - Effekt af tid fra tapning på målingen af sædens morfologi og morfometri målt med ASQAS

Resultaterne viste ingen indikationer på systematiske forskelle mellem dage, hvor analysen blev udført. Undersøgte variable fremgår af appendiks - tabel 1. Resultaterne viste, at en analyse med ASQAS kan foretages hvilken som helst dag fra 1 til 5 efter sædopsamling. Undersøgelsen omfattede ikke sæd med meget ringe kvalitet, sammenlignet med sædopsamlinger i del 3, hvorfor det ikke kan udelukkes, at sæd med ringe kvalitet kan variere mere mellem analysedage end sæd med normal kvalitet.

## Del 3 - Korrelation mellem analyse med ASQAS og traditionel analyse af sædens morfologi samt repeterbarhed

Resultaterne viste korrelation mellem 0,8 og 0,9 ved analyse af traditionel morfologisk analyse og vurdering med ASQAS. Korrelation var lavest ved vurdering af andelen af sædceller med halekrølle og størst ved vurdering af andelen af distaldråber, hvor korrelationen var over 0,9. Korrelationerne fremgår af tabel 2. Der blev ved den traditionelle analyse af sædens morfologi vurderet 400 sædceller, hvorfor der ikke er grund til at betvivle den manuelle vurderings validitet.

**Tabel 2.** Oversigt over korrelationer og regressioner mellem måling foretaget med ASQAS og måling foretaget ved traditionel visuel vurdering af sædens morfologi.

Variabel	Korrelationskoefficient	Regressionslinjens hældning (skæring i 0) $Y = \text{hældning} \times \text{ASQAS estimat}$
Andelen af normale sædceller	0,85	0,68
Proximaldråber	0,88	1,06
Distaldråber	0,90	1,07
Halekrøller	0,80	2,54

Årsagen til den lave sammenhæng mellem målinger med ASQAS og manuel morfologi kendes ikke. De undersøgte sædprøver til de to metoder er udtaget fra samme sædprøve. Betydningen af udtagelse af en sædprøve kendes ikke præcist, men kan estimeres ud fra dobbeltbestemmelser foretaget med ASQAS. Repeterbarhederne indikerer, at instrumentet er rigtig godt til at genfinde samme resultat, men at det blot er et lidt anderledes resultat end man vil finde med traditionel morfologisk analyse. Årsagen til dette kan ligge i programmeringen, hvor grænsen for hvornår en

defekt er til stede, bestemmes ud fra matematiske beregninger for opmålinger på sædcellen. Desuden sås for nogle prøver specielle defekter, som blev klassificeret efter visuel vurderingen af morfologien, hvor et større antal af sædcellerne havde samme type defekt. Hvis ASQAS ikke vil være i stand til at klassificere netop den defekt, vil resultatet mellem ASQAS og visuel vurdering af morfologi variere. Variationen mellem dobbeltbestemmelser fremgår af appendiks 1 - tabel 2.

Repetierbarheden var bedst for estimerne for sædcellernes defekter og opmåling af sædcellens dimensioner. Tidligere studier [6] har angivet repeterbarhederne i målingerne som variationskoefficient (CV). Data fra denne afprøvning var ikke velegnet til beregning af CV. Hvis repeterbarheden for denne afprøvnings resultater alligevel opgjortes som CV, var repeterbarheden generelt under 5 pct. for middelværdi og median for sædcellens dimensioner og over 5 pct. for estimer for varians og standardafvigelse for sædcellens dimensioner (data ikke vist). Disse variationskoefficienter var i samme størrelsesorden som tidligere studier af sædcellers morfometri [6]. ASQAS viste moderat til høj korrelation til traditionel manuel vurdering af sædens morfologi samt god repeterbarhed i analysen af sædcellernes defekter. Det betyder, at ASQAS kunne være et alternativ til måling af sædens kvalitet og dermed erstatte traditionel analyse af sædens morfologi. Denne afprøvning kan ikke vise, om ASQAS vil være bedre til at identificere orner eller ejakulater med reduceret frugtbarhed end traditionel vurdering af sædens morfologi. Til dette formål skal der gennemføres en tværsnitsundersøgelse af orners sædkvalitet, hvor resultaterne skal sammenholdes med frugtbarheden for de enkelte orner.

## Konklusion

Resultaterne for analyse med ASQAS viste lille variation mellem dobbeltbestemmelser ved analyse af sædcellers defekter og opmåling af sædcellers dimensioner. Korrelationen til manuel morfologisk analyse af sæden viste korrelationskoefficienter på 0,8 eller derover ved analyse af proximaldråber, distaldråber og halekrøller. Målingen med ASQAS kan foretages fra dag 1 til dag 5 efter sædopsamling uden systematisk forskel i resultatet for analysen af både morfologi og morfometri. Resultaterne for denne afprøvning viste, at instrumentet ASQAS muligvis vil kunne erstatte en manuel vurdering af sædens morfologi. For at afklare dette spørgsmål igangsættes yderligere afprøvninger hvor målinger med ASQAS bliver sammenholdt med frugtbarheden for sæden.



# Referencer

- [1] Feitsma, H. (2009) Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. *Acta Scientiae Veterinariae* 37(supl 1): 61-71.
- [2] Vicente-Fiel, S., Palacin, I., Santolaria, P., Hidalgo, C. O., Silvestre, M. A., Arrebola, F. og Yaniz, J. L. (2013) A comparative study of the sperm nuclear morphometry in cattle, goat, sheep, and pigs using a new computer-assisted method (CASMA-F). *Theriogenology* 79: 436-442.
- [3] Maroto-Morales, A., Ramon, M., Garcia-Alvarez, O., Soler, A. J., Esteso, M. C., Martinez-Pastor, F., Perez-Guzman, M. D. og Garde, J. J. (2010) Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73: 437-448.
- [4] Phetudomsinsuk, K., Sirinarumitr, K., Laikul, A. og Pinyopummin, A. (2008) Morphology and head morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions. *Acta Vet. Scand.* 50: 41.
- [5] Hansen, C. (2012) Regler for avl, drift og smittebeskyttelse på KS-stationer. Landbrug & Fødevarer, Dansk Svineproduktion.
- [6] Yaniz, J. L., Vicente-Fiel, S., Capistros, S., Palacin, I. og Santolaria, P. (2012) Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology* 77: 1343-1350.

**Afprøvning nr. 1124**

//NJK//

# Appendiks

**Tabel 1.** Oversigt over variable undersøgt for systematisk ændring i forhold til tiden fra tapping med angivelse af gennemsnit og range for analyserne. Der kunne ikke påvises forskelle mellem dage fra dag 1 til 5 efter sædopsamling ved nedenstående variable. Minimum og maksimum angiver henholdsvis mindste og største måling som gennemsnit for en dobbelbestemmelse af en sædprøve.

Variabel	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5	Minimum	Maksimum
Andelen af distaldråber (%)	13,1	12,5	12,7	13,2	12,6	1,8	30,3
Andelen af proximaldråber (%)	8,8	9,6	9,7	9,4	9,8	1,5	25,0
Andelen af halekrøller (%)	2,8	3,1	3,1	2,9	3,0	0	6,6
Andelen af normale sædceller (%)	75,3	74,8	74,4	74,5	74,7	56,3	96,3
Gennemsnit for sædcellehovederne længde ( $\mu\text{m}$ )	9,32	9,30	9,30	9,32	9,29	9,04	9,51
Gennemsnit for sædcellehovederne omkreds ( $\mu\text{m}$ )	49,10	49,02	49,07	49,15	49,02	48,27	50,08
Gennemsnit for sædcellehovederne bredde ( $\mu\text{m}$ )	4,30	4,29	4,30	4,31	4,30	4,13	4,44
Gennemsnit for sædcellehovederne areal ( $\mu\text{m}^2$ )	65,83	65,50	65,70	65,88	65,55	62,66	67,96
Gennemsnit for sædcellehovederne pixelintensitet	121,8	121,7	122,5	122,4	123,0	115,5	126,2
Gennemsnit for sædcellehovederne pixelvariation	1.420	1.453	1.447	1.437	1.459	1.318	1.605
Variation* for sædcellehovedernes længde ( $\mu\text{m}$ )	2,19	2,12	2,07	2,20	2,17	1,32	2,53
Variation* for sædcellehovedernes omkreds ( $\mu\text{m}$ )	8,47	8,34	8,12	8,49	8,71	5,94	10,78
Variation* for sædcellehovedernes bredde ( $\mu\text{m}$ )	1,14	1,11	1,07	1,07	1,05	0,80	1,28
Variation* for sædcellehovedernes areal ( $\mu\text{m}^2$ )	18,64	17,80	17,03	16,63	19,06	11,60	29,77
Variation* for sædcellehovedernes pixelintensitet	39,17	38,95	38,18	37,47	38,08	29,33	46,09
Variation* for sædcellehovedernes pixelvariation	1406	1607	1381	1349	1435	918	2252
Median for sædcellehovederne længde ( $\mu\text{m}$ )	9,30	9,30	9,31	9,30	9,28	9,02	9,46
Median for sædcellehovederne omkreds ( $\mu\text{m}$ )	49,1	49,0	49,0	49,1	49,0	48,2	50,2
Median for sædcellehovederne bredde ( $\mu\text{m}$ )	4,30	4,30	4,31	4,32	4,30	4,14	4,44
Median for sædcellehovederne areal ( $\mu\text{m}^2$ )	65,9	65,5	65,7	65,9	65,6	62,9	68,1

Median for sædcellehovedernes pixelintensitet	121,9	121,8	122,6	122,4	123,0	115,6	126,5
Median for sædcellehovedernes pixelvariation	1.387	1.410	1.414	1.402	1.422	1.290	1.548
Standardafvigelse for sædcellehovederne længde ( $\mu\text{m}$ )	0,338	0,338	0,341	0,343	0,338	0,258	0,436
Standardafvigelse for sædcellehovederne omkreds ( $\mu\text{m}$ )	1,302	1,309	1,310	1,306	1,310	1,059	1,653
Standardafvigelse for sædcellehovederne bredde ( $\mu\text{m}$ )	0,179	0,188	0,178	0,176	0,178	0,133	0,272
Standardafvigelse for sædcellehovederne areal ( $\mu\text{m}^2$ )	2,82	2,94	2,82	2,78	2,86	2,29	3,96
Standardafvigelse for sædcellehovedernes pixelintensitet	7,25	7,89	7,55	7,18	7,40	5,99	11,05
Standardafvigelse for sædcellehovedernes pixelvariation	217	244	225	218	226	158	328

\*: Variationen er udregnet som forskellen mellem 25 og 75 procents percentilen for den pågældende måling.

**Tabel 2.** Oversigt over estimater for analyse i del 3. Residualvariationen repræsenterer variansen mellem analyser af den samme prøve – repeterbarhed. Range angiver største og mindste observation i data.

Variabel	Gennemsnit	Residualvariation	Range i data	
			Min.	Maks.
Andelen af distaldråber	9,7 %	6,872	0,0 %	52,4 %
Andelen af proximaldråber	6,2 %	2,857	0,0 %	74,6 %
Andelen af halekrølle	3,2 %	1,859	0,0 %	25,1 %
Andelen af normale sædceller	80,9 %	13,11	21,5 %	99,0 %
Gennemsnit for sædcellehovederne længde	9,05 $\mu\text{m}$	0,0019	8,67 $\mu\text{m}$	9,81 $\mu\text{m}$
Gennemsnit for sædcellehovederne omkreds	47,79 $\mu\text{m}$	0,0316	46,34 $\mu\text{m}$	50,19 $\mu\text{m}$
Gennemsnit for sædcellehovederne bredde	4,197 $\mu\text{m}$	0,00059	3,94 $\mu\text{m}$	4,40 $\mu\text{m}$
Gennemsnit for sædcellehovederne areal	62,51 $\mu\text{m}^2$	0,243	58,67 $\mu\text{m}^2$	65,44 $\mu\text{m}^2$
Gennemsnit for sædcellehovederne pixelintensitet	124,3	4,497	111,1	130,5
Gennemsnit for sædcellehovederne pixelvariation	1.528	2.843	1.298	1.914
Variation* for sædcellehovedernes længde	0,383 $\mu\text{m}$	0,0035	0,22	0,55
Variation* for sædcellehovedernes omkreds	1,489 $\mu\text{m}$	0,032	0,88	2,42
Variation* for sædcellehovedernes bredde	0,194 $\mu\text{m}$	0,00053	0,139	0,337
Variation* for sædcellehovedernes areal	3,302	0,168	2,363	5,887
Variation* for sædcellehovedernes pixelintensitet	8,51	1,45	5,26	21,85
Variation* for sædcellehovedernes pixelvariation	324	3434	176	721
Median for sædcellehovederne længde	9,04 $\mu\text{m}$	0,0033	8,58 $\mu\text{m}$	9,79 $\mu\text{m}$
Median for sædcellehovederne omkreds	47,73 $\mu\text{m}$	0,037	46,2 $\mu\text{m}$	50,16 $\mu\text{m}$
Median for sædcellehovederne bredde	4,20 $\mu\text{m}$	0,00055	3,96 $\mu\text{m}$	4,41 $\mu\text{m}$
Median for sædcellehovederne areal	62,6 $\mu\text{m}^2$	0,246	58,79 $\mu\text{m}^2$	65,43 $\mu\text{m}^2$
Median for sædcellehovedernes pixelintensitet	124,90	5,493	110,0	131,1
Median for sædcellehovedernes pixelvariation	1.469	3.129	1.239	1.939
Standardafvigelse for sædcellehovederne længde	0,3112	0,00069	0,238	0,446
Standardafvigelse for sædcellehovederne omkreds	1,256	0,0137	0,917	1,967
Standardafvigelse for sædcellehovederne bredde	0,1552	0,00020	0,115	0,253
Standardafvigelse for sædcellehovederne areal	2,643	0,052	1,900	4,241
Standardafvigelse for sædcellehovedernes pixelintensitet	6,570	0,459	4,410	11,444
Standardafvigelse for sædcellehovedernes pixelvariation	270,6	1.052	159,7	474,5

\*: Variationen er udregnet som forskellen mellem 25 og 75 procents percentilen.

**Tabel 3.** Oversigt over kriterier for sædceller inkluderet i analysen af morfologi og morfometri med ASQAS.

Sædceller inkluderes i morfologisk analyse af defekterne proximaldråbe, distaldråbe og halekrølle hvis:

- Bredden på mellemstykket er  $\geq 1,6 \mu\text{m}$  og  $\leq 4 \mu\text{m}$ .
- Bredden på sædcellens hoved er  $\geq 3,6 \mu\text{m}$  og  $\leq 4,9 \mu\text{m}$
- Gennemsnitlig pixelintensitet er  $\geq 85$

Sædceller inkluderes i analyse af morfometri hvis: (sædcellehovedets dimensioner)

- Sædcellen ikke er identificeret som havende halekrølle.
- Mellemstykket er  $> 1,6 \mu\text{m}$  og  $< 2,6 \mu\text{m}$ .
- Hovedets længde er  $> 8,2 \mu\text{m}$  og  $< 10,8 \mu\text{m}$ .
- Hovedets bredde er  $> 3,6 \mu\text{m}$  og  $< 4,9 \mu\text{m}$
- Hovedets areal er  $> 43 \mu\text{m}^2$  og  $< 80 \mu\text{m}^2$
- Hovedets omkreds skal være  $\geq 40 \mu\text{m}$  og  $< 55 \mu\text{m}$
- Gennemsnitlig relative pixelintensitet er  $> 100$

**Tabel 4.** Definition af de enkelte variable angivet fra ASQAS.

Variabel	Definition
<b>Morfologisk analyse</b>	
Andelen af distaldråber <sup>A</sup>	Procent af sædcellerne fra en analyse hvor der er fundet distaldråber på sædcellen.
Andelen af proximaldråber <sup>A</sup>	Procent af sædcellerne fra en analyse hvor der er fundet proximaldråbe på sædcellen.
Andelen af halekrølle <sup>A</sup>	Procent af sædcellerne fra en analyse hvor der er fundet halekrølle på sædcellen.
Andelen af normale sædceller <sup>A</sup>	Procent af sædcellerne fra en analyse hvor der hverken er fundet distaldråber, proximaldråbe eller halekrølle.
<b>Morfometrisk analyse</b>	
Gennemsnit for sædcellehovederne længde <sup>B</sup>	Simpelt gennemsnit for længdemålingerne på sædcellehoveder i en analyse.
Gennemsnit for sædcellehovederne omkreds <sup>B</sup>	Simpelt gennemsnit for omkredsen på sædcellehoveder i en analyse.
Gennemsnit for sædcellehovederne bredde <sup>B</sup>	Simpelt gennemsnit for sædcellehovedet bredde på sædceller i en analyse.
Gennemsnit for sædcellehovederne areal <sup>B</sup>	Simpelt gennemsnit for sædcellehoveders areal på sædceller i en prøve, hvor sædcellerne opfylder kriterierne for analyse af morfometri (se tabel 3 i appendiks).
Gennemsnit for sædcellehovederne pixelintensitet <sup>B</sup>	For hver sædcelle er der målt gennemsnitlig pixelintensitet for hovedet. Variablen består af et gennemsnit for alle sædcellernes gennemsnitlige pixelintensitet.
Gennemsnit for sædcellehovederne pixelvariation <sup>B</sup>	For hver sædcelle beregnes variansen for pixelintensitet. Denne variabel er gennemsnit af variansen for pixelintensitet.
Variation* for sædcellehovedernes længde <sup>B</sup>	Den numeriske differens mellem 25- og 75 pct. percentilen for sædcellehovedernes længde.
Variation* for sædcellehovedernes omkreds <sup>B</sup>	Den numeriske differens mellem 25- og 75 pct. percentilen for sædcellehovedernes omkreds.
Variation* for sædcellehovedernes bredde <sup>B</sup>	Den numeriske differens mellem 25- og 75 pct. percentilen for sædcellehovedernes bredde.
Variation* for sædcellehovedernes areal <sup>B</sup>	Den numeriske differens mellem 25- og 75 pct. percentilen for sædcellehovedernes areal.
Variation* for sædcellehovedernes pixelintensitet <sup>B</sup>	Den numeriske differens på 25- og 75 pct. percentilen for sædcellehovedernes gennemsnitlige pixelintensitet.
Variation* for sædcellehovedernes pixelvariation <sup>B</sup>	Den numeriske differens på 25- og 75 pct. percentilen for sædcellehovedernes varians for pixelintensitet.
Median for sædcellehovederne længde <sup>B</sup>	Medianen for sædcellehovedernes længde.

Median for sædcellehovederne omkreds <sup>B</sup>	Medianen for sædcellehovedernes omkreds.
Median for sædcellehovederne bredde <sup>B</sup>	Medianen for sædcellehovedernes bredde.
Median for sædcellehovederne areal <sup>B</sup>	Medianen for sædcellehovedernes areal.
Median for sædcellehovedernes pixelintensitet <sup>B</sup>	Medianen for sædcellehovedernes gennemsnitlige pixelintensitet.
Median for sædcellehovedernes pixelvariation <sup>B</sup>	Medianen for sædcellehovedernes variation i pixelintensitet.
Standardafvigelse for sædcellehovederne længde <sup>B</sup>	Den estimerede standardafvigelse for sædcellehovedernes længde under antagelse af normalfordeling af data.
Standardafvigelse for sædcellehovederne omkreds <sup>B</sup>	Den estimerede standardafvigelse for sædcellehovedernes omkreds under antagelse af normalfordeling af data.
Standardafvigelse for sædcellehovederne bredde <sup>B</sup>	Den estimerede standardafvigelse for sædcellehovedernes bredde under antagelse af normalfordeling af data.
Standardafvigelse for sædcellehovederne areal <sup>B</sup>	Den estimerede standardafvigelse for sædcellehovedernes areal under antagelse af normalfordeling af data.
Standardafvigelse for sædcellehovedernes pixelintensitet <sup>B</sup>	Den estimerede standardafvigelse for sædcellehovedernes gennemsnitlige pixelintensitet under antagelse af normalfordeling af data.
Standardafvigelse for sædcellehovedernes pixelvariation <sup>B</sup>	Den estimerede standardafvigelse for sædcellehovedernes variation i pixelintensitet under antagelse af normalfordeling af data.

<sup>A</sup>: alle variable markeret med A er kun beregnet for sædceller der opfylder kriterierne for morfologisk analyse (se tabel 3 i appendiks 1).

<sup>B</sup>: alle variable markeret med B er kun beregnet for sædceller der opfylder kriterierne for morfometriske analyse (se tabel 3 i appendiks 1).