



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES  
SUBDIRECCIÓN DE MEDICINA REPRODUCTIVA**

**ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD EN  
LA EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS  
SEMINAL – ESTUDIO PILOTO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALISTA  
EN**

**BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

**P R E S E N T A**

**DR. ALFREDO MARTIN RIVERA MONTES**

**DR. ARMANDO JUAREZ BENGOA  
DIRECTOR DE TESIS**



**MÉXICO, D. F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Para Rosa María y María José, los amores de mi vida, las amo*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme despertar cada mañana.

A Rosa María, mi amor, por ser mi amiga, mi sostén en los momentos difíciles que nos tocó vivir en estos 6 años de camino juntos, eres mi vida. Sin ti no hubiera llegado hasta donde estoy. Gracias mi vida por todo tu sacrificio. TE AMO.

A María José, mi gorda hermosa, disculpa por los momentos que no pude estar junto a ti, TE AMO.

A mis padres, que aunque estemos lejos, siempre me han apoyado en todo momento. Alfredo eres y serás siendo mi Maestro.

A mis hermanas, Mabel y Cecilia, a Renato, Mateo y mis suegros; gracias por siempre darme ánimos.

A mis maestros del servicio de Esterilidad por sus enseñanzas y por su amistad incondicional.

A mis amigos, Juan, Cacique, Gerardo, Israel, etc. por su amistad durante estos 2 años, siempre contarán con su amigo peruano.

Al Dr. Armando Juárez, por su tiempo y asesoría para la realización de ésta tesis.

A todas las personas que colaboraron en la realización de este trabajo en forma desinteresada, gracias a mis amigas Marú, Heidi, Xochilt, Maribel, Vilma y al área de Líquidos biológicos del Laboratorio Central

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

Introducción	1
Justificación	8
Objetivos	8
Diseño del estudio	9
Material y Métodos	10
Metodología	12
Resultados	16
Discusión	25
Anexos	30
Bibliografía	32

## **RESUMEN**

**OBJETIVO** - Comparar los resultados del análisis seminal realizado por varios observadores de diferentes laboratorios.

**MATERIAL Y MÉTODOS** – Se tomaron en cuenta a las parejas de las pacientes que son vistas en el servicio de Esterilidad y que se les solicitó la realización de una espermatobioscopia directa. La muestra se obtuvo en un ambiente acondicionada en el laboratorio de Análisis de líquidos biológicos del departamento del Laboratorio Central (laboratorio A) donde se realizó la primera valoración. Inmediatamente se trasladó la muestra al laboratorio de Andrología (laboratorio B) en un recipiente térmico con agua a temperatura de 37°C, y se tomó la muestra para su estudio en este laboratorio y el remanente fue analizado en el laboratorio de Reproducción Asistida (laboratorio C). Se tomaron en cuenta la concentración, índice de movilidad progresiva y morfología espermática.

**RESULTADOS** –Se analizaron 9 muestras seminales por 1 observador en el laboratorio A, 1 en el B y 4 en el laboratorio C, utilizando los parámetros de la OMS. Se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las mediciones de morfología espermática entre los 3 laboratorios ( $p < 0.000$ ). Con coeficientes de variación intra-observador de 4.3%, 12.3% y 7.9% para concentración, índice de movilidad y morfología espermática respectivamente. Y coeficientes de variación inter-observador de 25.7%, 52.2% y 82.6% para concentración, índice de movilidad y morfología espermática respectivamente

**CONCLUSIONES** – Existe variabilidad entre los laboratorios estudiados siendo la diferencia principal la morfología espermática. Es conveniente establecer la correlación de los valores seminales entre los diferentes laboratorios.

## **ABSTRACT**

**OBJECTIVE** – Compare the results of the semen analysis among clinical laboratories

**RESEARCH DESIGN AND METHODS** – It was used the semen samples of the patients of the Sterility's service that need a semen analysis for their study. The sample was collected in the biological fluids assessment laboratory (A laboratory) and for the evaluation of sperm concentration, sperm morphology and sperm motility were evaluated different samples and distributed to the other laboratories, andrology laboratory (laboratory C) and Assisted Reproduction laboratory (laboratory B). It was calculated the coefficients of variation intra-observer and inter-observer and descriptive statistics.

**RESULTS** – it was analyzed 9 semen samples by one technician in laboratory A, one in laboratory B and four in the laboratory C, using the World Health Organization (WHO) recommendation for reporting sperm count, motility and morphology. There is inter-laboratory variability between the parameters studied mainly in the sperm morphology with statistical difference ( $p < 0.000$ ). The observed mean coefficients of variation (CVs) in the participants' results for sperm count were 4.3%, for motility 12.3% and for sperm morphology 7.9%. The mean CVs in the laboratories results were as follows: 25.7% for sperm concentration, 52.2% for sperm motility and 82.6% for sperm morphology .

**CONCLUSIONS** – There is inter-laboratory variability for the analysis of the semen samples and the main difference was made by the analysis of sperm morphology,

## INTRODUCCION

El análisis seminal es el estudio fisicoquímico y microscópico del semen. El primero proporciona información sobre la contribución secretora de las glándulas sexuales accesorias, en tanto que el segundo, refleja la función espermatozónica y esteroidogénica de los testículos <sup>(1, 2)</sup>.

En el análisis fisicoquímico del semen puede reflejarse la patología de las glándulas accesorias, de acuerdo a la OMS se debe valorar lo siguiente <sup>(1)</sup>:

- Licuefacción: indica la presencia de fibrinolisisina, secretada por la próstata; una muestra de semen normal se licua dentro de los 60 minutos de la eyaculación a temperatura ambiente, aunque esto suele ocurrir dentro de los primeros 15 minutos.
- Aspecto: La muestra de semen debe ser examinada inmediatamente después de su licuefacción o dentro de los 60 minutos de emitida por simple inspección a temperatura ambiente. Una muestra normal tiene una apariencia homogénea gris opalescente. Puede aparecer menos opaca cuando la concentración de espermatozoides es muy baja, marrón cuando tiene glóbulos rojos o amarillentos en el caso de un paciente con ictericia o que consume algunas vitaminas.
- Volumen: está en función al funcionamiento conjunto de las glándulas accesorias que contribuyen con cantidades diferentes: la vesícula seminal con 70%, la próstata con 29% y las glándulas bulbouretrales con 1%; puede ser medido usando un cilindro graduado de base cónica o mediante la comparación del peso de un contenedor estándar con y sin semen, siendo normal un volumen de 2 ml o más.
- Viscosidad: es una característica que refleja la capacidad de desplazamiento del líquido como consecuencia de la contribución principal de la próstata y las vesículas seminales. El pH refleja la alcalinidad del líquido seminal formado por el conjunto de las



secreciones de todos los componentes de la vía seminal, aunque la contribución principal es de las vesículas seminales; puede ser estimada aspirando la muestra en una pipeta de 5ml, y permitiendo la libre caída de las gotas, en las que se observa la longitud del filamento formado. En una muestra normal se observan gotas pequeñas y bien definidas, mientras que en una muestra de viscosidad anormal se formará un filamento mayor de 2cm. Como método alternativo, la viscosidad se puede evaluar introduciendo una varilla de vidrio en la muestra y observando la longitud del filamento que se forma al retirarlo, este no debe exceder los 2cm.

- pH: puede ser medido dentro de una hora de la eyaculación. Se distribuye una gota de semen sobre el papel de pH, al cabo de 30 segundos el color de la zona impregnada debe ser uniforme y se compara con la cartilla de calibración para determinar el pH de la muestra, siendo valores normales de 7.2 o más.
  
- Otras células y detritus: que pueden encontrarse en el semen se evalúan en varios campos y los hallazgos inusuales se expresan como comentarios libres en el informe mediante diversas expresiones estandarizadas:
  - Ausencia de detritus es una situación muy rara, algún grado de detritus es típico, pero una contaminación moderada con detritus no es necesariamente anormal. Mayores cantidades de detritus son, sin embargo, anormales. Tener cuidado de diferenciar entre partículas acelulares y bacterias.
  - Los glóbulos rojos (eritrocitos) no deben encontrarse en el semen, aunque pueden encontrarse unos pocos sin que ello indique patología.
  - Las células epiteliales (escamosas, cúbicas y transicionales) son habituales en pequeño número en el semen. Su aumento no está relacionado con ninguna alteración funcional específica o presencia de infección.

- Las “células redondas” se observan a menudo en el semen y es importante diferenciar los leucocitos de los gametos inmaduros o grandes fragmentos celulares (habitualmente sin núcleo) con citoplasma exfoliado del túbulo seminífero del testículo. También, las células de origen prostático tienen un aspecto redondeado en el eyaculado. Si hay  $>1 \times 10^6$  células redondas/mL, contadas en la cámara de New Bauer (al mismo tiempo que se realiza la concentración espermática), debe realizarse la detección de leucocitos mediante un método específico para identificar la presencia de “células inflamatorias” <sup>(1)</sup>.
  
- Concentración espermática es un indicador sensible de la espermatogénesis, excepto en los casos de obstrucción total o parcial de la vía seminal, y por tanto, refleja la normalidad de interacción de las células del epitelio germinal con las células de Leydig, de Sertoli y miotubulares; así como la normalidad de la regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (3). De acuerdo a los criterios de la OMS se considera como normal al conteo de más de 20 millones por ml. La concentración espermática es la que menos variabilidad intraobservador debe tener (menos de 10%) en el laboratorio, debido a que es producto de una medición objetiva que se obtiene con un instrumento bastante preciso. La medida de la concentración espermática hecha por aparatos automatizados no han sido validado internacionalmente para el análisis del semen <sup>(1)</sup>.
  
- Movilidad espermática está relacionada con diferentes características anatómicas y funcionales de los espermatozoides. Para que el espermatozoide pueda desplazarse requiere de la integridad anatómico-funcional de las mitocondrias y el flagelo en el cual se encuentran el axonema, organelo formado por un conjunto de microtúbulos y micro filamentos dispuestos en forma circular <sup>(1,3)</sup>.  
La movilidad espermática es la medida que mayor variación tiene en el análisis seminal debido a que es la medida más subjetiva que se hace en el semen. Para que esta medida sea confiable, el técnico debe entrenarse con

un experto para asegurar que se han aprendido y estandarizado los criterios de clasificación <sup>(1,4)</sup>.

- Morfología espermática, cuantifica un porcentaje, por cualquiera de dos métodos de clasificación, uno propuesto por la OMS <sup>(1)</sup> y otro que se basa en los criterios estrictos de Kruger <sup>(5)</sup>. Aunque inicialmente los valores de normalidad entre ambas clasificaciones eran muy diferentes, recientemente la OMS ha cambiado sus criterios, lo que ha logrado que las diferencias sean más estrechas. Los criterios originales de la OMS fueron generados a partir de un estudio multicéntrico con un estándar arbitrario. La morfología espermática refleja dos procesos diferentes: la espermiógenesis y la maduración espermática en el epidídimo.

Para las variables normales de semen, deben evaluarse especímenes de hombres que han producido un embarazo recientemente, con preferencia antes de los 12 meses desde que su compañera dejó de usar anticonceptivos. La necesidad de grandes números (alrededor de 1000), la compleja relación entre los resultados del análisis del semen y la fertilización, en conjunto con el tiempo requerido para lograr el embarazo, hacen que estos estudios sean difíciles de realizar <sup>(2,3)</sup>.

El manual de la OMS ha sufrido diversas modificaciones en sus respectivas ediciones, la última no está dirigida exclusivamente a laboratorios que tratan infertilidad, sino también a las necesidades de aquellos laboratorios que investigan métodos potenciales para la regulación de la infertilidad masculina o que estimulan la toxicología reproductiva masculina. En este contexto se dan los rangos de referencia, basados en la experiencia clínica de varios investigadores que han estudiado poblaciones de hombres fértiles sanos. Ya que estos no son los valores de semen mínimos necesarios para lograr la concepción, por ejemplo, obtenidos por la evaluación de *in vivo* o *in vitro* en una población subfétil, esta categorización se ha cambiado de valores “normales” a valores de “referencia”. Por lo tanto, aquellos hombres cuyas variables de semen son inferiores a las indicadas en este manual pueden ser inferiores. Los valores de referencia dados por la OMS <sup>(1)</sup> son:

Volumen	2.0ml o más
pH	7.2 o más
Concentración espermática	20 x 10 <sup>6</sup> espermatozoides/ml o más
Número total de espermatozoides	40 x 10 <sup>6</sup> espermatozoides por eyaculado o más
Motilidad	50% o más de progresión anterógrada (Categorías a y b), ó 25% o más con progresión lineal rápida (categoría a) dentro de los 60 minutos de la eyaculación
Morfología	30% o más de normales
Viabilidad	50% vivos o más, por ejemplo excluyendo el colorante
Leucocitos	Menos de 1 x 10 <sup>6</sup>
Prueba de inmunobeads	Menos del 50% de espermatozoides móviles con partículas adheridas
Prueba de MAR	Menos del 50% de espermatozoides con partículas adheridas

### Importancia del análisis seminal en infertilidad

A partir de los resultados del análisis de semen no es posible asegurar fertilidad. No hay propiedades específicas que se puedan medir en toda la población espermática que reflejen específicamente la capacidad fecundante del reducido número de espermatozoides que son capaces de alcanzar el lugar de fecundación. No obstante, los resultados del análisis de semen se han usado para categorizar los hombres en grupos con distintas posibilidades de conseguir embarazo durante un período de tiempo determinado <sup>(3)</sup>.

El diagnóstico de infertilidad masculina sigue dependiendo en un gran número de casos del análisis del semen. La adecuada interpretación del análisis seminal implica tomar en cuenta dos factores: la confiabilidad del laboratorio y el conocimiento del médico acerca del significado de las alteraciones seminales <sup>(2)</sup>.

Variabilidad del laboratorio:

Para que haya un buen control de la interpretación de los resultados del análisis seminal debe haber un buen control interno. Las razones para la variabilidad existente es la subjetividad de la técnica y de que no existe una estandarización de los procedimientos en los diferentes laboratorios <sup>(6)</sup>.

El control de calidad en el laboratorio clínico es el conjunto de procesos que aseguran la fiabilidad técnica de las determinaciones que se realizan, el cual pretende detectar y minimizar los errores de medida. Estos tienen dos componentes: aleatorio y sistemático. El error aleatorio hace referencia a la dispersión que se obtiene al medir un mismo parámetro varias veces en la misma muestra, en su ausencia se habla de precisión y se suele expresar en desviación estándar o coeficiente de variación. El error sistemático hace referencia al error del proceso, es decir, la diferencia entre el valor real y la media obtenida tras la realización de varias determinaciones, en su ausencia se habla de veracidad o exactitud y se expresa en unidades o porcentaje respecto al valor verdadero <sup>(4)</sup>.

La distribución aleatoria de los espermatozoides, incluso cuando la muestra está muy bien mezclada, es en gran parte responsable de falta de precisión en los resultados del análisis del semen. La medición de concentración, movilidad y morfología se realiza con un limitado número de espermatozoides que suponemos representativos de toda la muestra, lo cual provoca un error aleatorio que se denomina "error de conteo". La magnitud de este error está inversamente relacionada con la raíz cuadrada del número de espermatozoides contados. Teniendo en cuenta que el error de conteo puede ser reducido examinando un mayor número de espermatozoides, debe también evaluarse la posible pérdida de exactitud debida al cansancio del técnico que realiza la medición por lo que es necesario establecer un equilibrio entre ambos factores <sup>(2)</sup>.

Además del error de conteo, se producen otros errores adicionales que pueden provenir de una inadecuada homogenización de la muestra, estrés del técnico y

material en condiciones no idóneas. Por el contrario, si la variabilidad encontrada es inferior a la esperada por el error de conteo, se plantea la posibilidad de errores en la obtención de la muestra o sesgos inducidos por el conocimiento de anteriores resultados <sup>(2,3)</sup>.

Para fines de un control de calidad es deseable que todas las mediciones que realiza un observador se hagan por duplicado y si las diferencias superan el error de conteo, se rehace la medición comenzando de nuevo. Es necesario que la medición duplicada se realice desde el comienzo del procedimiento, si lo limitamos a la lectura al microscopio no podremos detectar errores de preparación. Cuando entra a formar parte de un equipo de trabajo, deberá ser instruido y realizará mediciones en paralelo hasta conseguir que no existan desviaciones sistemáticas <sup>(8)</sup>.

## **JUSTIFICACION**

En la evaluación del factor masculino de la pareja infértil, el análisis seminal es el estudio más importante y, en ocasiones, el único. Si éste muestra valores que se encuentran dentro de los límites considerados normales, en la mayoría de las ocasiones no se solicitan más estudios al varón. Sin embargo los resultados pueden ser diferentes si una muestra es analizada por dos observadores. De tal manera que si un observador reporta valores normales cuando en realidad existen alteraciones, no se realiza un estudio más completo al varón y, en consecuencia, puede pasar un tiempo sin el tratamiento idóneo en la pareja que presenta infertilidad, problema en el que la edad juega un papel muy importante.

El conocimiento de las diferencias en los resultados del análisis seminal que encuentran distintos evaluadores, orientará al médico a decidir si continúa con una mayor investigación del factor masculino o propone un tratamiento acorde con los resultados reportados.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Comparar los resultados del análisis seminal realizado por varios observadores de diferentes laboratorios.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Valorar cuánta diferencia existe en cada una de las mediciones del análisis seminal entre los diferentes observadores.

Valorar cuánta diferencia existe en cada una de las mediciones del análisis seminal entre los diferentes observadores.

## **DISEÑO DE ESTUDIO**

Es un estudio Observacional.

Es un estudio transversal, prospectivo y analítico.



## MATERIAL Y METODOS

### CRITERIOS DE INCLUSION

- Pacientes varones que asisten a la consulta de Esterilidad y requieran la realización de una espermatobioscopia directa como parte de su estudio.
- Abstinencia sexual de 3 a 6 días previos a la recolección de la muestra.
- Aseo genital con jabón y abundante agua.
- La muestra debe ser colectada en el laboratorio central del instituto.
- Presentación de credencial oficial vigente y con fotografía

### CRITERIOS DE NO INCLUSION

- Pacientes que se nieguen a participar.

### CRITERIOS DE ELIMINACION

- Pacientes que es aceptado pero no cumple con la entrega de la muestra.
- Muestras seminales de pacientes con volúmenes pequeños.
- Falta de evaluación por parte de algunos de los observadores.

### VARIABLES

#### - Movilidad espermática

- **Definición conceptual:** porcentaje de espermatozoides que presentan movilidad progresiva.
- **Definición operacional:** Se toma 10ul de semen homogeneizado por pipeteo y se coloca en un portaobjeto cubriéndolo con un cubreobjeto de 22x22mm y se valora con un microscopio óptico de contrastes de fases y filtro verde con el objetivo de 40X. Se valoran

200 células al azar en diferentes campos clasificándolos de acuerdo a su movilidad en:

- A: movilidad progresiva rápida
- B: movilidad progresiva lenta
- C: movilidad no progresiva
- D: Inmóviles

- **Unidad de medición:** % de espermatozoides con movilidad A, B.
- **Tipo de variable:** cuantitativa continúa

#### - **Concentración espermática**

- **Definición conceptual:** es el número de espermatozoides por ml de semen.
- **Definición operacional:** Para esta determinación se emplea la cámara de New Bauer o hemocitómetro. Se realiza inmovilizando a los espermatozoides con formaldehído al 3.5% realizando diluciones que dependerá de la concentración obtenida en la cuenta gruesa. Se valora con un microscopio óptico de contrastes de fases y filtro verde con el objetivo de 40X. Una vez obtenido el número de espermatozoides se realizan los cálculos respectivos para el resultado final.
- **Unidad de medición:** millones de espermatozoides por ml
- **Tipo de variable:** cuantitativa continúa

#### - **Morfología espermática**

- **Definición conceptual:** porcentaje de espermatozoides con morfología normal
- **Definición operacional:** se toma 3ul de semen y se coloca en placas preteñidas y cubriéndolo con un cubreobjeto y se valora 100

espermatozoides al azar con un microscopio óptico de campo claro con el objetivo de 100X clasificándolos en:

- Normales: presentan cabeza oval con contornos regulares casquete acrósmico que cubre la tercera parte de la cabeza. Pieza intermedia delgada se encuentra alineada con el eje longitudinal de la cabeza. Gota citoplasmática  $\leq 10\%$  del tamaño de la cabeza.

- Anormales: se describen si presentan defecto de cabeza, defecto de flagelo y defecto de pieza intermedia

- **Nivel de medición:** porcentaje de espermatozoides normales
- **Tipo de variable:** cuantitativa continúa

## **METODOLOGIA**

El presente estudio se realizó en tres laboratorios: Andrología, Reproducción Asistida y el laboratorio de Análisis de líquidos biológicos del departamento del Laboratorio Central, del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, con aprobación del comité de Investigación.

Se tomaron en cuenta a las parejas de las pacientes que son vistas en el servicio de Esterilidad y que se les solicitó la realización de una espermatobioscopia directa como parte del protocolo de estudio de la pareja infértil, se les explicó el objetivo del estudio y que será usado el remanente de la muestra seminal, aceptando en participar en el estudio firmando el consentimiento informado.

En el caso del laboratorio central que fue donde el paciente entregó la muestra seminal fue obtenida por masturbación en un ambiente acondicionado para el mismo y su recolección en un envase de polipropileno con tapa de rosca de poliestireno estéril; habiendo cumplido con los requisitos para el estudio.

Una vez obtenida la muestra se colocó en un baño maría a 37°C por 20 minutos con agitador, posteriormente se procedió a su valoración mediante el siguiente método:

Análisis manual y semiautomatizado:

Se procedió al análisis de la muestra seminal por el personal técnico asignado para el mismo. Se realizó la medición del volumen con una pipeta graduada y el análisis fisicoquímico.

Posteriormente se sumergió un capilar aproximadamente 1mm de la punta en el envase de polipropileno con la muestra, se limpió el excedente con una toallita suave y se introdujo el lado plano del capilar hacia arriba hasta donde llegue en el interior de la ranura de la cámara óptica del Analizador de Calidad de Esperma, SQA IIC-P, 45 segundos después nos dio el reporte y se imprimió; este mismo procedimiento se realizó 2 veces por muestra. Al mismo tiempo el personal encargado de la realización del análisis de las muestras efectuó un análisis manual de la concentración espermática con la técnica de gota gruesa y la movilidad espermática las cuales fueron comparadas con la del reporte del analizador de calidad seminal, SQA II-CP.

Inmediatamente se trasladó la muestra al laboratorio de Andrología en un recipiente térmico con agua a temperatura de 37°C, y se tomó la muestra para su estudio en este laboratorio y el remanente fue analizado en el laboratorio de Reproducción Asistida. En estos dos laboratorios la técnica de preparación y valoración de la muestra seminal es la misma la cual detallaremos a continuación y fue realizada en 2 oportunidades por cada observador, vaciando los datos en la hoja de recolección. Los observadores se encontraron cegados al diagnóstico del paciente. La muestra seminal fue colocada en baño maría a una temperatura de 37°C y se realizó las siguientes valoraciones:

Valoración de la concentración espermática:

Para esta determinación se emplea la cámara de New Bauer o hemocitómetro. Se realiza inmovilizando a los espermatozoides con formaldehído al 3.5% realizando diluciones que dependerá de la concentración obtenida en la cuenta gruesa. Se valora con un microscopio óptico de contrastes de fases y filtro verde con el objetivo de 40X. Una vez obtenido el número de espermatozoides se realizan los cálculos respectivos para el resultado final.

Para el presente estudio se tomo en cuenta el número de espermatozoides dado en millones por mililitro.

Valoración de la movilidad espermática:

Utilizando pipetas automáticas calibradas se toma 10ul de semen homogeneizado por pipeteo y se coloca en un portaobjeto cubriéndolo con un cubreobjeto de 22x22mm y se valora con un microscopio óptico de contrastes de fases y filtro verde con el objetivo de 40X. Se valoran 200 células al azar en diferentes campos clasificándolos de acuerdo a su movilidad en:

- A: movilidad progresiva rápida
- B: movilidad progresiva lenta
- C: movilidad no progresiva o in situ
- D: Inmóviles

Para el presente estudio se tomó en cuenta el Índice de movilidad que es la sumatoria de la movilidad A + B.

Valoración de la morfología espermática:

Utilizando pipetas automáticas calibradas se toma 3ul de semen y se coloca en placas preteñidas y cubriéndolo con un cubreobjeto y se valora 100 espermatozoides al azar con un microscopio óptico de campo claro con el objetivo de 100X clasificándolos en:

- Normales: presentan cabeza oval con contornos regulares casquete acrómico que cubre la tercera parte de la cabeza. Pieza intermedia delgada se encuentra alineada con el eje longitudinal de la cabeza, la cola es delgada no enrollada y de contornos regulares. Gota citoplasmática  $\leq 10\%$  del tamaño de la cabeza.
- Defectos de cabeza: acintadas, piriformes, macrocéfalos, cabeza de alfiler, amorfas, etc
- Defecto de flagelo: enrollados, doble flagelo, cortado
- Defecto de pieza intermedia: cuello encurvado y gota citoplasmática  $\geq 10\%$  del tamaño de la cabeza.

Para el presente estudio se tomo en cuenta el porcentaje de espermatozoides normales.

Se contó con la participación de 6 observadores divididos de la siguiente manera; 1 en el laboratorio de Reproducción Asistida que será llamado el laboratorio B; en el laboratorio de Análisis de Líquidos biológicos del departamento del Laboratorio Central, laboratorio A, se contó con 1 observador que usó el equipo Analizador de la Calidad Seminal, SQA II-C P y 4 observadoras en el laboratorio de Andrología, que será el laboratorio C. Todos los participantes cuentan con experiencia y son parte del personal técnico encargado de la valoración de las muestras seminales del Instituto.

Con los datos obtenidos se obtuvo una base de datos en el programa Excel y con el uso del programa estadístico SPSS 12.0 para Windows y se procedió al análisis de las variables en estudio usando estadística descriptiva, con medidas de tendencia central y de dispersión. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de los resultados de los diferentes observadores.

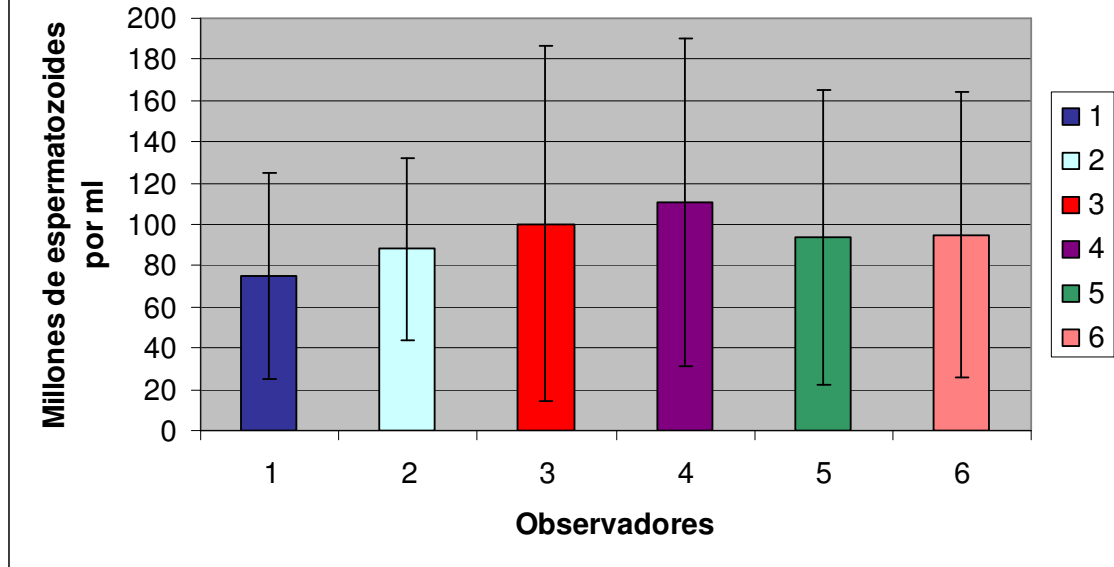
## RESULTADOS

Se analizaron las muestras seminales de 9 pacientes que fueron atendidos en el servicio de Esterilidad a los que se les solicitó una espermatobioscopia directa como parte del protocolo de estudio de la pareja infértil.

Se contó con la participación de 6 observadores, uno correspondió al laboratorio de Reproducción Asistida (B), otro en el laboratorio de Análisis de líquidos biológicos del laboratorio central (A) y cuatro en el laboratorio de Andrología (C); todos con experiencia en la valoración de muestras seminales, utilizando los parámetros de la OMS tanto para la concentración, movilidad y morfología espermática. Todos observaron las muestras en 2 oportunidades.

En la gráfica No. 1 se aprecia los resultados de las medias y sus desviaciones estándar de las mediciones de la concentración espermática de cada observador de las 9 muestras. Las barras indican el valor promedio de las concentraciones espermáticas  $\pm$  su desviación estándar de las mismas muestras seminales evaluadas por los 6 observadores. El observador No. 1 mostró una media de  $75.11 \pm 50.42$  con rangos de 12.5 a 170.5 millones de espermatozoides por ml. El observador No. 2 mostró una media de  $88.25 \pm 44.16$  con rangos promedios de 28.5 a 163 millones de espermatozoides por ml. El observador No. 3 presentó una media de  $100.36 \pm 86.06$  con rangos de 17.5 a 284 millones de espermatozoides por ml. El observador No. 4 mostró una media de  $110.5 \pm 79.52$  con rangos de 15.5 a 276.5 millones de espermatozoides por ml. El 5to observador mostró una media de  $93.64 \pm 71.19$  con rangos de 25 a 240 millones de espermatozoides por ml y el 6to observador mostró una media de  $95 \pm 69.48$  con rangos de 16 a 239 millones de espermatozoides por ml.

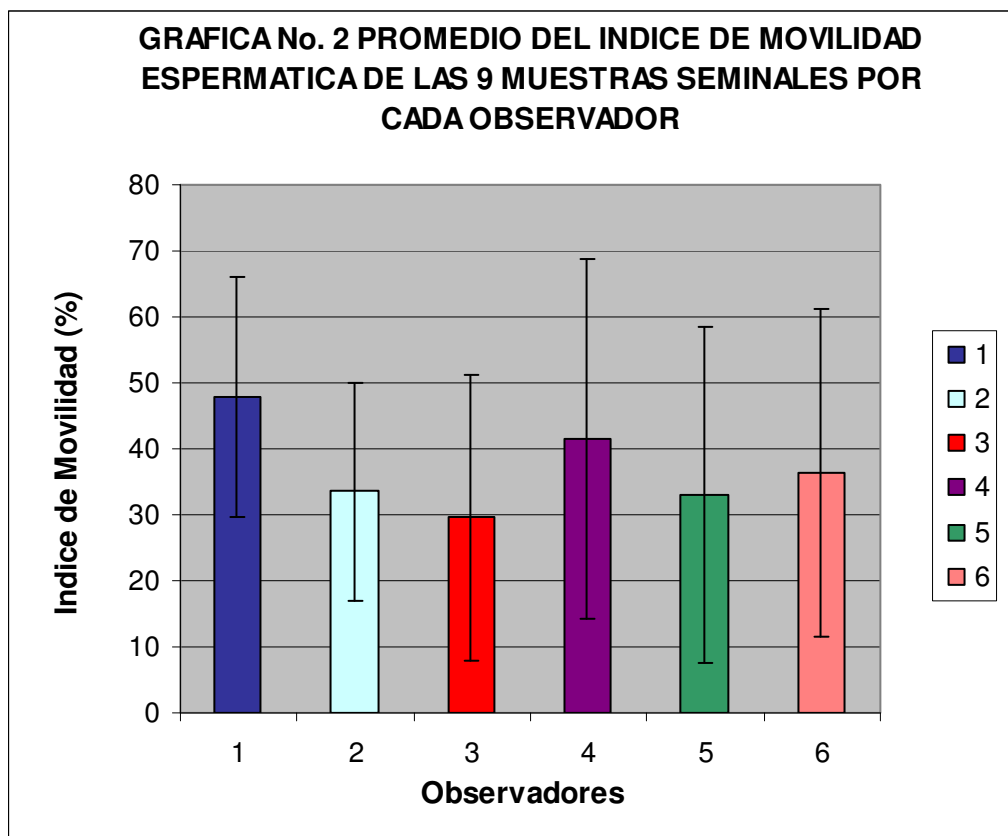
**GRAFICA No. 1 PROMEDIO DE LAS  
CONCENTRACIONES ESPERMATICAS DE LAS 9  
MUESTRAS SEMINALES POR CADA OBSERVADOR**



En la gráfica No. 2, se observa las medias y desviaciones estándar de la movilidad espermática de las 9 muestras por cada observador. Las barras indican el valor promedio de la movilidad espermática  $\pm$  su desviación estándar de las mismas muestras seminales evaluadas por los 6 observadores. El observador No. 1 mostró una media de  $47.77 \pm 18.15$  con rangos de 17.5 a 61.5 % de espermatozoides con movilidad progresiva. El observador No. 2 mostró una media de  $33.5 \pm 16.48$  con rangos de 7.5 a 54.5 % de espermatozoides con movilidad progresiva. El observador No. 3 presentó una media de  $29.57 \pm 21.57$  con rangos de 0 a 36.5 % de espermatozoides con movilidad progresiva. El observador No. 4 mostró una media de  $41.5 \pm 27.35$  con rangos de 0 a 77.5 % de espermatozoides con movilidad progresiva. El 5to observador mostró una media de  $33.0 \pm 16.48$  con rangos de 0 a 66.5 % de espermatozoides con movilidad progresiva y el 6to observador mostró una

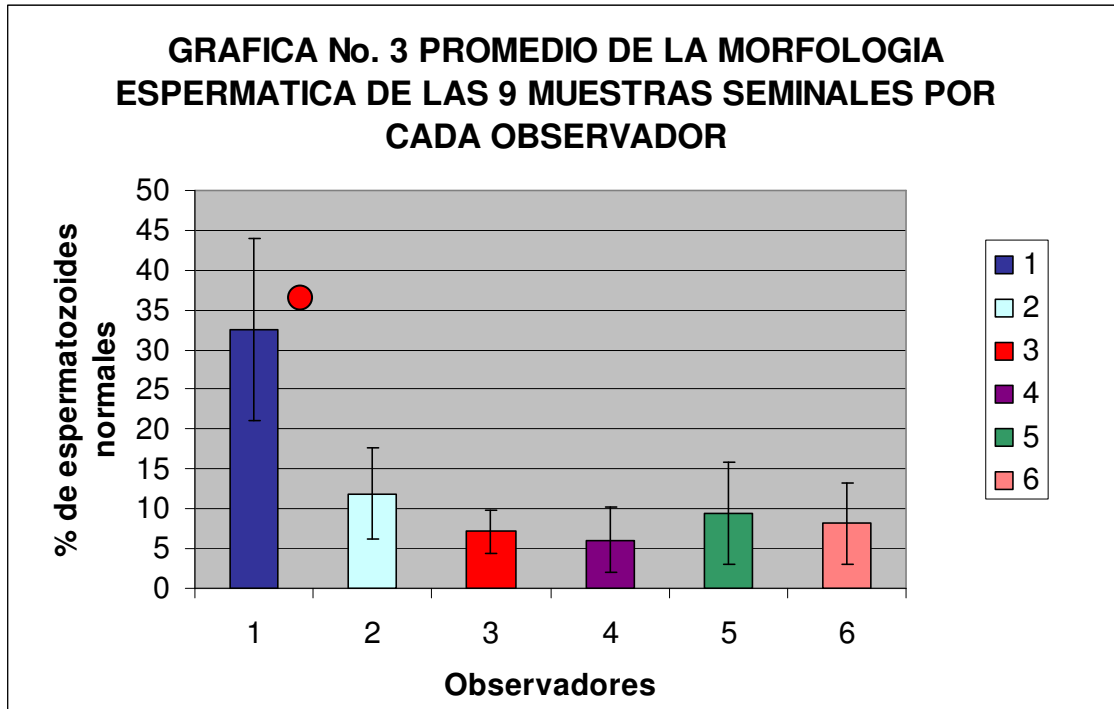


media de  $36.38 \pm 24.85$  con rangos de 0 a 62 % de espermatozoides con movilidad progresiva.



En la gráfica No. 3 se aprecia las medias y desviaciones estándar de la morfología espermática. Las barras indican el valor promedio de la morfología espermática  $\pm$  su desviación estándar de las mismas muestras seminales evaluadas por los 6 observadores. El observador No. 1 mostró una media de  $32.5 \pm 11.4$  con rangos de 17 a 48.5 % de espermatozoides normales. El observador No. 2 mostró una media de  $11.87 \pm 5,74$  con rangos de 3 a 17.5 % de espermatozoides normales. El observador No. 3 presentó una media de  $7.14 \pm 2.68$  con rangos de 2.5 a 11.5 % de espermatozoides normales. El observador No. 4 mostró una media de  $6.11 \pm 4,14$  con rangos de 2 a 15.5 % de espermatozoides normales. El 5to observador mostró una media de  $9.5 \pm$

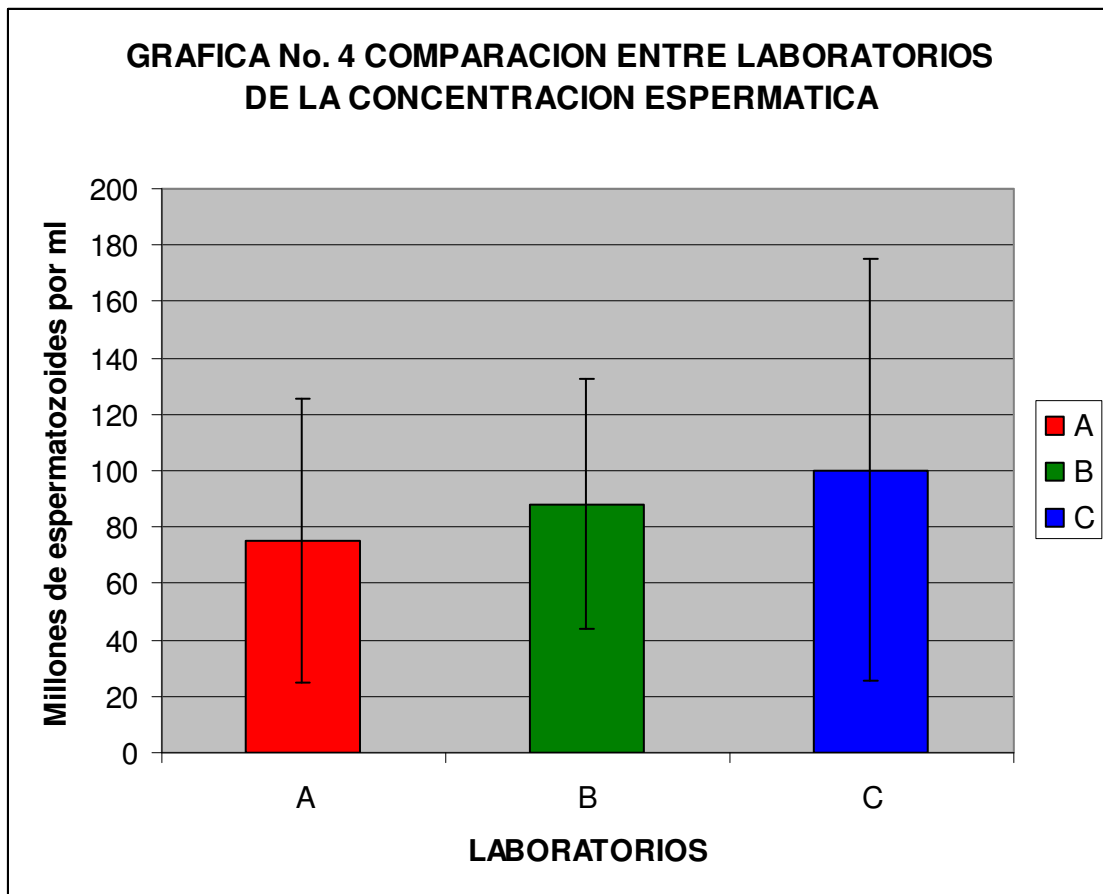
6.44 con rangos de 1 a 20 % de espermatozoides normales y el 6to observador mostró una media de  $8.22 \pm 5.11$  con rangos de 1.5 a 16 % de espermatozoides normales. Y resultó estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ )



●  $p < 0.0000$

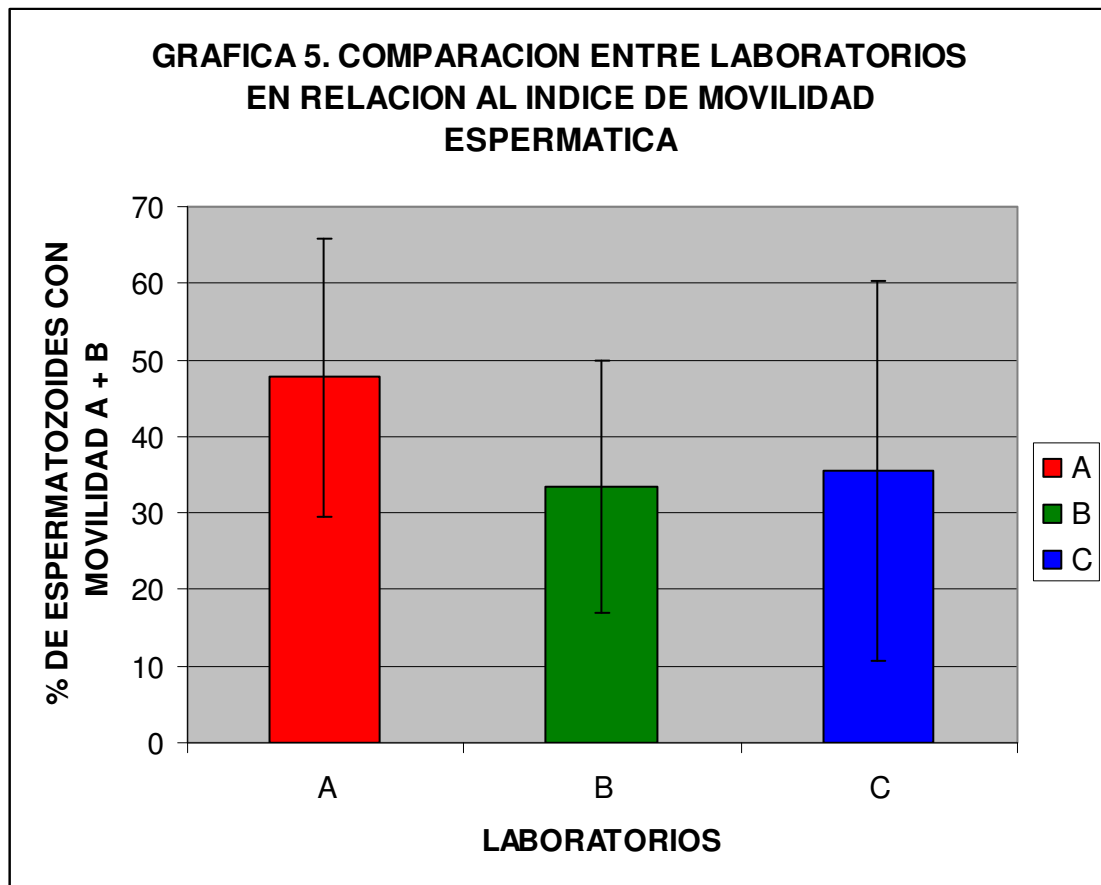
En la gráfica No. 4 se observa los diferentes promedios  $\pm$  sus desviaciones estándar de las concentraciones espermáticas de las 9 muestras seminales estudiadas por los laboratorios participantes. Las barras muestran los promedios con sus desviaciones estándar respectivas. El laboratorio A mostró una media de  $75.11 \pm 50.20$  con rangos de 12.5 a 170.5 millones de espermatozoides por ml. El laboratorio B mostró una media de  $88.25 \pm 44.16$  con rangos promedios de 28.5 a 163 millones de espermatozoides por ml. El

laboratorio C presentó una media de  $100.23 \pm 75.03$  con rangos de 15.0 a 284 millones de espermatozoides por ml.



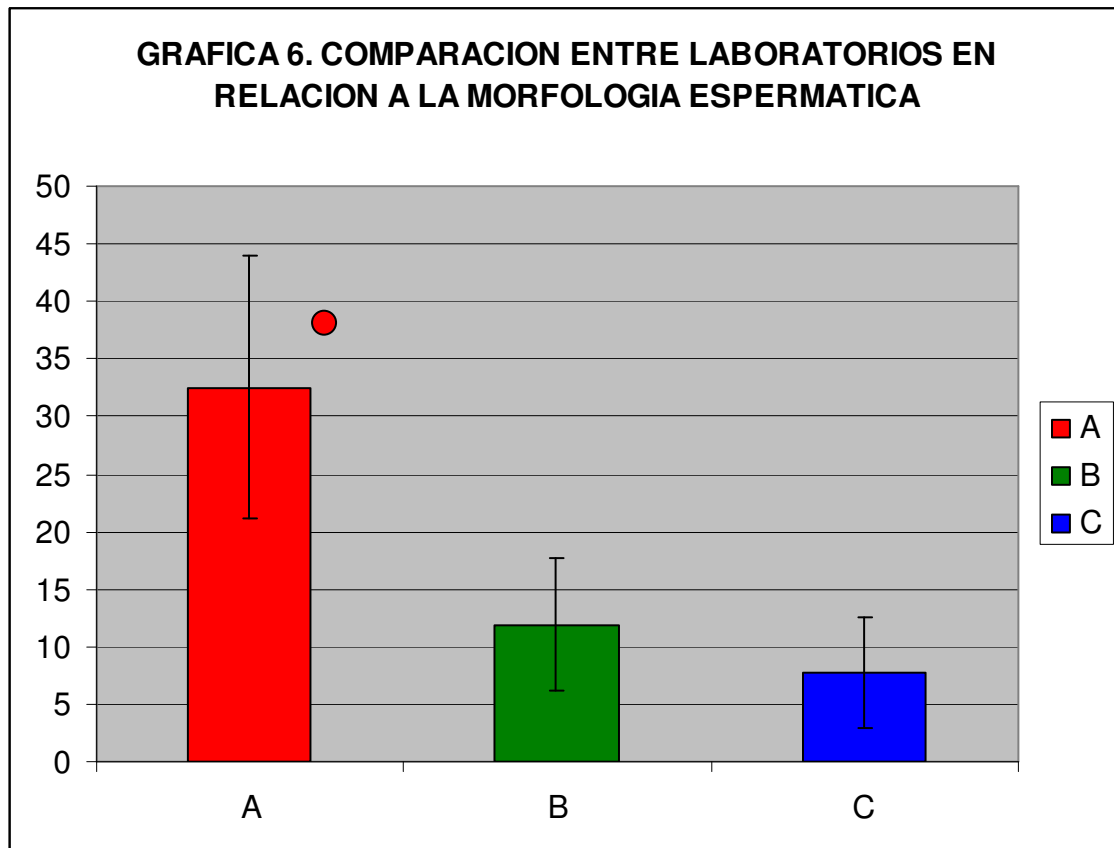
En la gráfica No. 5, se observa las medias y desviaciones estándar de la movilidad espermática de las 9 muestras por cada uno de los laboratorios. Las barras indican el valor promedio de la movilidad espermática  $\pm$  su desviación estándar de las mismas muestras. El laboratorio A mostró una media de  $47.77 \pm 18.15$  con rangos de 17.5 a 61.5 % de espermatozoides con movilidad progresiva. El laboratorio B mostró una media de  $33.5 \pm 16.48$  con rangos de 7.5 a 54.5 % de espermatozoides con movilidad progresiva. El laboratorio C

presentó una media de  $35.59 \pm 24.84$  con rangos de 0 a 77.5 % de espermatozoides con movilidad progresiva.



En la gráfica No. 6 se aprecia las medias y desviaciones estándar de la morfología espermática. Las barras indican el valor promedio de la morfología espermática  $\pm$  su desviación estándar de las mismas muestras seminales evaluadas por los 3 laboratorios. El laboratorio A mostró una media de  $32.5 \pm 11.4$  con rangos de 17 a 48.5 % de espermatozoides normales. El laboratorio B mostró una media de  $11.87 \pm 5,74$  con rangos de 3 a 17.5 % de espermatozoides normales. El laboratorio C presentó una media de  $7.67 \pm 4.83$

con rangos de 1 a 20 % de espermatozoides normales. Con una diferencia estadísticamente significativa.



●  $p < 0.0000$

En la tabla No.1 se aprecia los promedios de los coeficientes de variación (%) de cada uno de los observadores participantes del estudio al valorar las variables estudiadas. En concentración espermática se encontró un promedio de 4.3% con rangos desde 2.2 a 8.8%. El CV promedio del índice de movilidad espermática fue de 12.3% con rangos de 3.1 a 44.4%. Y para la morfología normal el CV promedio fue de 7.9% con rangos de 3 a 18.8%.

Tabla No. 1 Comparación de los coeficientes de variación (%) intra-observador de los 3 laboratorios en relación a los parámetros seminales estudiados

Variables	Coeficiente de Variación Intra-observador (%)						Promedio (%)
	A		B		C		
	1	2	3	4	5	6	
Concentración	8.8	2.6	2.4	2.2	4.6	5.1	4.3
Índice de movilidad	44.4	8.3	6.6	3.1	7.5	4.0	12.3
Morfología	3.3	5.5	10.9	5.9	3.0	18.8	7.9

En la tabla No. 2 se aprecia los promedios de los coeficientes de variación Inter-observador en relación a las variables estudiadas como concentración, índice de movilidad y morfología espermática.

Para la variable concentración espermática se encontró un CV promedio de 25.7%, con rangos de 7.4 a 36.8%. El índice de movilidad mostró un CV

promedio de 52.2% con rangos de 11.0 a 211.4% y para morfología espermática se encontró un CV promedio de 82.6% con rangos de 62% a 124.8%.

Tabla No. 2 Comparación de los coeficientes de variación (%) inter-observador de las 9 muestras seminales de los parámetros estudiados

Muestras	Coeficientes de variación inter-observador (%)		
	Concentración	Índice de Movilidad	Morfología
<b>1</b>	32.0	47.2	78.4
<b>2</b>	23.8	41.0	124.8
<b>3</b>	46.3	20.5	96.0
<b>4</b>	12.2	18.3	62.2
<b>5</b>	21.4	11.1	74.2
<b>6</b>	7.4	23.6	86.7
<b>7</b>	20.3	18.5	73.6
<b>8</b>	31.4	78.3	85.1
<b>9</b>	36.9	211.4	62.0
<b>PROMEDIOS (%)</b>	25.7	52.2	82.6

## DISCUSION

El análisis seminal es actualmente la prueba más importante utilizada para evaluar la fertilidad masculina y en ocasiones es la única prueba. Es una prueba ampliamente usada en el laboratorio, en la que se determina el número, la movilidad, las formas de los espermatozoides <sup>(10)</sup>. El objetivo del análisis de semen es ofrecer un diagnóstico etiológico posibilitando encontrar el origen de la infertilidad en una patología andrológica y poder emplear la terapéutica mejor adaptada en cada caso.

Aún con las recomendaciones para estandarización por parte de organizaciones nacionales e internacionales como la OMS, la mayoría de los métodos usados por los laboratorios tienen mucha subjetividad. Por lo que se ha recomendado la realización de controles de calidad tanto internos como externos y que se debe cuantificar las variaciones intra e inter observadores <sup>(11)</sup>. Si éste muestra valores que se encuentran dentro de los límites considerados normales, en la mayoría de las ocasiones no se solicitan más estudios al varón. Sin embargo los resultados pueden ser diferentes si una muestra es analizada por dos observadores. De tal manera que si un observador reporta valores normales cuando en realidad existen alteraciones, no se realiza un estudio más completo al varón y, en consecuencia, puede pasar un tiempo sin el tratamiento idóneo en la pareja que presenta infertilidad, problema en el que la edad juega un papel muy importante.

Los resultados de pruebas de cualquier persona varían debido a 3 factores: a) influencias pre-analíticas (en el caso del semen, el período de abstinencia sexual, el transporte de la muestra hacia el laboratorio etc.) b) del error aleatorio (precisión) y el error sistemático y c) la variación biológica inherente de cada sujeto <sup>(12)</sup>. También hay que tener en cuenta que la distribución aleatoria de los espermatozoides, incluso cuando la muestra está muy bien mezclada, es en gran parte responsable de falta de precisión en los resultados del análisis del semen. La medición de concentración, movilidad y morfología



se realiza con un limitado número de espermatozoides que suponemos son representativos de toda la muestra <sup>(13)</sup>.

Ha sido descrito por diferentes autores una amplia variación en la concentración espermática entre diferentes laboratorios ya sea en forma manual <sup>(6, 11)</sup> o por medio de métodos computarizados <sup>(14)</sup>. Los resultados del presente estudio muestra que las concentraciones espermáticas entre los diferentes observadores varían en límites que pueden ser muy amplios con rangos de 27 millones por ml en un observador y 105 millones por mililitro en otro para la misma muestra seminal. Estas variaciones también se presentan en otras muestras seminales pero no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los observadores de los distintos laboratorios. Es importante mencionar que al solo valorar una muestra seminal con un observador podemos estar diagnosticándolo de oligozoospermia (12.5 millones por ml) cuando la misma muestra es observada por otro observador y se encuentra normal (25 millones por ml) que al igual que en otros estudios se encontró la misma variación <sup>(15)</sup>. Los coeficientes de variación inter-observador reportados por diferentes laboratorios al realizar el análisis manual va de rangos de 22.9 a 138% <sup>(3, 15,16)</sup> usando muestras seminales congeladas; en el presente estudio se encontró un 25.7% entre los 3 laboratorios y las 9 muestras estudiadas. No hubo diferencia estadísticamente significativa de los resultados de los diferentes observadores usando los 2 diferentes métodos de preparación y valoración pero al igual que otros estudios las muestras estudiadas presentaron amplios rangos de concentraciones espermáticas.

Este CV encontrando es menor que lo reportado por la literatura <sup>(15,16)</sup> y esto se puede deber a que los diferentes estudios realizados usaron muestras seminales congeladas que fueron enviadas por correo a diferentes laboratorios y esta manipulación de la muestra puede influir en sus valoraciones; en cambio en el presente estudio las muestras seminales fueron valoradas dentro de las 2-3 horas de recolectadas las muestras por todos los observadores. Al compararlo con estudios realizados con muestras seminales frescas los resultados fueron menores que lo encontrando de 44.3% en un estudio <sup>(17)</sup>.

En un estudio encontraron que la concentración espermática presentaba un coeficiente de variación de un 40% si se utiliza semen congelado, de un 31% si se utiliza muestras frescas y de un 25% si se utilizan cintas de vídeo <sup>(13)</sup> y también nuestro reporte es menor a lo reportado en este estudio.

En este trabajo los coeficientes de variación intra-observador se aprecia que el laboratorio A presentó el mayor porcentaje de 8.8 y el laboratorio C con 3.6%. El promedio del CV intra-observador en relación a la concentración espermática fue de 4.3% y es menor a lo reportado en un estudio que fue de 15.8% <sup>(3)</sup> y de 10% en un estudio alemán <sup>(6)</sup> pesar de contar con unos rangos amplios en el laboratorio A. Dada la experiencia del personal técnico de los diferentes laboratorios hace que los CV sean menores que lo reportado por la literatura.

Se sabe que de todos los parámetros seminales, la morfología seminal se ha considerado como la que más se relaciona con el potencial de fertilidad <sup>(16)</sup>. Sin embargo también se sabe que existe una considerable variación en esta determinación <sup>(18, 19)</sup>. Las razones para esta variación incluyen la falta de estandarización, diferentes técnicas de la preparación seminal, y el nivel de experiencia por el observador. Muchos autores han usado el análisis computarizado de la valoración morfológica para emplear un método estandarizado y reducir la variabilidad <sup>(19, 20)</sup> otros han concluido que la generación actual de analizadores computarizados de semen no son capaces de analizar la morfología seminal en una forma adecuada para su aplicación clínica de rutina <sup>(21)</sup>. En este estudio, se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los observadores de los laboratorios participantes al valorar las 9 muestras usando los criterios de la OMS, el mayor CV intra-observador fue del observador 6 del laboratorio C con 18.8%.

En estudios realizados encontraron una variación de 7 a 56% dependiendo del método de valoración, teniendo un menor CV al usar los criterios de la Sociedad Americana de Patólogos Clínicos (21%) en comparación con los criterios de la OMS y de los criterios estrictos de Kruger que son más altos (33%) <sup>(15)</sup> y de 42 a 90% <sup>(22)</sup>. En este estudio se utilizaron los criterios de la OMS encontrando un CV mayor a lo reportado por la literatura, presentando

rangos muy amplios entre los 3 laboratorios de 62% a 124.8% al valorar las 9 muestras seminales ya que el laboratorio A mostró porcentajes muy elevados en relación a los otros dos laboratorios, como en una muestra se observó en el laboratorio A 19.5% de normales y por los otros un promedio de 2%. Al hacer la comparación de los 4 observadores del laboratorio C se encontró un CV promedio de 34.6% que es similar a lo reportado por la literatura como en un estudio encontraron un CV de espermatozoides normales observado en portaobjetos teñidos (45%) y sin teñir (52%) o con semen congelado (51%) <sup>(17)</sup>.

En el presente estudio al valorar los resultados en relación a la movilidad espermática se encontró que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los observadores de los 3 laboratorios al examinar las 9 muestras seminales. El CV inter-observador en el presente estudio fue de 52.2% que es mayor a lo reportado en uno de los primeros estudios realizados <sup>(6)</sup> que fue de 21%, a pesar de haber usado muestras criopreservadas para su estudio. En otros estudios se han reportado variaciones amplias donde usaron diferentes técnicas para su evaluación de 30 a 78% <sup>(22)</sup>. Lo encontrando en el presente estudio refleja las diferencias encontradas entre el primer laboratorio y los 2 restantes al encontrar índices de movilidad espermática diferentes pero al aplicar las pruebas estadísticas no nos mostró diferencia estadística. Al hacer la valoración de los CV intra-observador se encontró un 12.3% que es similar a lo encontrando en diferentes estudios de 8% <sup>(6)</sup> y menor a lo reportado en un estudio de 26.2% <sup>(3)</sup>. En los diferentes estudios revisados hay muy pocos que dentro de sus variables de estudio toman en cuenta la movilidad espermática ya que al usar muestras seminales congeladas se ha visto que la movilidad esta disminuida por lo que los resultados encontrados son muy variables.

Al comparar los resultados de los 3 laboratorios se encontró una CV-intra-observador mayor en el laboratorio A de 44.4% y menor en el laboratorio C de 5.3%,

El conocer los CV intra e inter-observador de los 3 laboratorios orienta a la consideración de los datos para hacer exámenes complementarios y proponer el manejo respectivo a los pacientes.

En el presente estudio se encontró variabilidad entre los 3 laboratorios estudiados siendo la diferencia principal la morfología espermática, por lo que es conveniente establecer la correlación de los valores seminales entre los diferentes laboratorios.

**ANEXO 1.**

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
ESTIMACION DE LA VARIABILIDAD EN LA EVALUACION DEL ANALISIS  
SEMINAL**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo \_\_\_\_\_

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios y riesgos se me han explicado detalladamente, para lo cual se usara el remanente de mi muestra seminal.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione, se vea afectada por este hecho.

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me debe brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informo y un testigo, conservando una copia del consentimiento informado.

México, DF a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2007

**NOMBRE**

**FIRMA**

PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_

INVESTIGADOR \_\_\_\_\_

TESTIGO \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

### INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ESTIMACION DE LA VARIABILIDAD EN LA EVALUACION DEL ANALISIS SEMINAL

#### HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

---

Fecha de realización:

Número de identificación de paciente:

	Examen 1	Examen 2
VOLUMEN SEMINAL (ml)		
CONCENTRACIÓN (millones / ml)		
MOVILIDAD (%) A B C D		
MORFOLOGIA (%) Normales Defectos de cabeza Defectos de PI Defectos de flagelo		
VIABILIDAD (%)		

Estudio realizado por:

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kvist U, Bjorndahl L. Manual de análisis básico de semen. Monografía ESHRE; 2004. p. 1-38
2. Villanueva CA. Infertilidad Masculina. En Ginecología y Reproducción Humana, Temas Selectos. Ed. Mexicana; 2006. p. 452-7
3. Auger J, Eustace F, Ducot B, Blandin T, Daudin M and Diaz I (2000) Intra and inter individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. Hum Reprod 15,2360–2368.
4. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D and Vogel DL; National Cooperative Reproductive Medicine Network (2001) Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. New Engl J Med 2001; 345: 1388–93.
5. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Matta JF. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. Urology 1987; 30: 248-51
6. Neuwinger J, Behre H, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. Fertil Steril 1990; 54: 308-14.
7. WHO: Laboratory Manual of Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press: Cambridge, 1999.
8. Auger J,. et al. Intra- and Inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. Human Reprod 2000; 15: 2360-8.

9. Brooks KA. How reliable are results from the semen analysis?. *Fertil Steril* 2004; 82: 41-4
10. Kruger T, Menkveld R, Satnder F. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118-23.
11. Coetze K, Kruger TF, Lombard CJ, et al. Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. 1999 *Fertil Steril*; 71: 80-4
12. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reprod* 2003; 18: 2082-8
13. Castilla JA. Control de calidad en el laboratorio de Andrología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2001; 18: 29-33
14. Mortimer D. Technician training and quality controls aspects. *Practical Laboratory Andrology*. Oxford University Press, Oxford. 1994: 337-47
15. Keel BA, Quinn P, Schmidt CF Jr, Serafy NT Jr, Serafy NT Sr, Schalue TK. Results of the American Association of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. *Hum Reprod* 2000; 15: 680–6.
16. Walker RH: Pilot surveys for proficiency testings of semen analysis. *Arch Pathol. Lab Med* 1992; 116: 432-4
17. Jequier A, Ukombe E. Errors inherent in the performance of a routine semen análisis. *Br J Urol* 1983; 55: 434-36
18. Dunphy BC, Kay R, Barratt CL. Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl* 1989; 10: 378-85



19. Barroso G, Mercan R, Ozgue K et al. Intra- and inter- laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: impact of semen preparation, staining techniques and manual versus computerized analysis. Human Reprod 1999; 14: 2036-40
20. Kruger TF, Coetze K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. Human Repro Update 1999; 5: 172-8
21. ESHERE Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of the spermatozoa. Human Reprod 1998; 13: 142-5
22. Jorgensen N, Auger J, Giwerman A. Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. Int J Androl 1997; 20: 201-7