

Estimación de la variabilidad en la evaluación del análisis seminal

Alfredo Martín Rivera-Montes, Alfredo Rivera-Gallegos, Enrique Rodríguez-Villasana, Armando Juárez-Bengoa, María de los Ángeles Díaz-Pérez, Marcelino Hernández-Valencia

RESUMEN

Antecedentes: el diagnóstico de infertilidad masculina sigue dependiendo, en gran número de casos, del análisis del semen. La adecuada interpretación de éste implica considerar: la confiabilidad del laboratorio y el conocimiento del médico acerca del significado de las alteraciones seminales.

Objetivo: comparar los resultados del análisis seminal realizado por varios observadores de diferentes laboratorios.

Material y métodos: estudio descriptivo efectuado en el Instituto Nacional de Perinatología. Se incluyeron los pacientes a quienes se realizó espermatobioscopia directa. La muestra se obtuvo en un ambiente acondicionado en el laboratorio de análisis de líquidos biológicos del Laboratorio Central (A), donde se efectuó la primera valoración. La muestra se trasladó de inmediato al laboratorio de Andrología (B) en un recipiente térmico con agua a 37°C, ahí tomaron la muestra para estudio y el remanente se analizó en el laboratorio de Reproducción Asistida (C). Se tomaron en cuenta: concentración, índice de movilidad progresiva y morfología espermática.

Resultados: con base en los parámetros de la OMS se analizaron 28 muestras seminales por un observador en el laboratorio A, un observador en el B y 4 en el laboratorio C. Se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las mediciones de concentración ($p < 0.01$), índice de movilidad ($p < 0.03$) y morfología espermática normal ($p < 0.001$) entre los tres laboratorios, con coeficientes de variación intraobservador de 3.6, 20.3 y 9.4% para concentración, índice de movilidad y morfología espermática, respectivamente. Los coeficientes de variación interobservador fueron de 23.4, 33.9 y 94.8% para concentración, índice de movilidad y morfología espermática, respectivamente.

Conclusiones: existe variabilidad entre los laboratorios estudiados, con diferencia principal en la morfología espermática. Es conveniente establecer la correlación entre los diferentes laboratorios.

Palabras clave: espermatobioscopia, morfología espermática, infertilidad, variabilidad.

ABSTRACT

Background: Masculine Infertility diagnosis continues depending in a great number of cases of the analysis of the semen. However, appropriate interpretation of the seminal analysis implies to consider two factors, the dependability of the laboratory and the medical knowledge about the meaning of the seminal alterations.

Objective: Compare the results of the semen analysis among clinical laboratories.

Material and methods: It was used the semen samples of the patients that need a semen analysis for their study. The sample was collected in the biological fluids assessment laboratory (A) and was evaluated the sperm count, morphology and motility. They were distributed to the other laboratories, andrology laboratory (B) and Assisted Reproduction laboratory (C). It was calculated the coefficients of variation intra-observer and inter-observer and descriptive statistics.

Results: It was analyzed 28 semen samples by one technician in laboratory A, one in laboratory B and four in the laboratory C, using the World Health Organization (WHO) recommendations for reporting sperm count, motility and morphology. There is an inter-laboratory variability of the parameters studied in the sperm morphology with statistical difference ($p < 0.001$). The observed mean coefficients of variation intra-observer (CVs) were 3.6% for sperm count, 20.3% for motility and 9.4% for sperm morphology. The mean CVs inter-laboratory results were as follows: 25.7% for sperm concentration, 52.2% for sperm motility and 82.6% for sperm morphology.

Conclusions: There is an inter-laboratory variability for the analysis of the semen samples between the 3 laboratories studied for the semen parameters studied.

Key words: Spermatoscopic, spermatic morphology, infertility, variability.

RÉSUMÉ

Antécédents: Le diagnostic de l'infertilité masculine reste tributaire d'un grand nombre de cas, l'analyse du sperme.

L'interprétation correcte de cette implique la prise en compte de deux facteurs: la fiabilité du laboratoire et les connaissances des médecins sur l'importance des altérations séminales.

Objectif: Comparer les résultats de l'analyse du sperme effectué par plusieurs observateurs dans différents laboratoires.

Matériel et méthodes: Étude descriptive à l'Institut national de périnatalogie. Nous avons inclus des patients ayant subi une spermatobioscopy direct. L'échantillon a été obtenu dans un environnement conditionné à l'analyse en laboratoire des fluides biologiques laboratoire central (A), où la première évaluation a été faite. L'échantillon a été immédiatement transférée au laboratoire d'andrologie (B) dans un conteneur isolé avec de l'eau à 37 ° C, puis l'échantillon prélevé pour l'étude et le reste a été analysé dans le laboratoire de reproduction assistée (C). Ont été pris en compte: la concentration, le taux de mobilité progressive et la morphologie des spermatozoïdes.

Résultats: Sur la base de 28 échantillons de sperme paramètres de l'OMS ont été analysés par un observateur dans le laboratoire A, un observateur à B et 4 dans le laboratoire C. Une différence statistiquement significative n'a été observée lorsque l'on compare les mesures de concentration ($p < 0,01$), l'indice mobilité ($p < 0,03$) et la morphologie des spermatozoïdes normaux ($p < 0,001$) entre les trois laboratoires, avec des coefficients de variation de intraobserver de 3,6, 20,3 et 9,4 % de la concentration, de la motilité et de l'indice morphologie du sperme, respectivement. Les coefficients de variation interobservateur étaient de 23,4, 33,9 et 94,8% pour la concentration, la motilité et la morphologie indice sperme, respectivement.

Conclusions: Il existe une variabilité entre laboratoires sondés, avec la différence principale dans la morphologie des spermatozoïdes. Il est souhaitable d'établir la corrélation entre les différents laboratoires.

Mots-clés: analyse du sperme, la morphologie des spermatozoïdes, and l'infertilité.

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, servicio de Biología de la Reproducción, Secretaría de Salud. Unidad de Investigación en Enfermedades Endocrinas, Diabetes y Metabolismo, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México DF.

Correspondencia: mherandezvalencia@prodigy.net.mx

Recibido: 14 de marzo 2013

Aceptado: 5 de septiembre 2013

Este artículo debe citarse como: Rivera-Montes AM, Rivera-Gallegos A, Rodríguez-Villasana E, Juárez-Bengoa A, Díaz-Pérez MA, Hernández-Valencia M. Estimación de la variabilidad en la evaluación del análisis seminal. Ginecol Obstet Mex 2013;81:639-644.

www.femecog.org.mx

RESUMO

Antecedentes: O diagnóstico da infertilidade masculina depende de um grande número de casos, a análise de sêmen. A interpretação adequada deste envolve tendo em conta dois fatores: a confiabilidade do laboratório e do conhecimento médico sobre o significado das alterações seminais.

Objetivo: Comparar os resultados da análise do sêmen realizada por vários observadores em diferentes laboratórios.

Material e métodos: Estudo descritivo do Instituto Nacional de Perinatologia. Foram incluídos pacientes que se submeteram a spermatobioscopy direta. A amostra foi obtida em um ambiente climatizado na análise de laboratório de fluidos biológicos Laboratório Central (A), onde foi feita a primeira avaliação. A amostra foi imediatamente transferida para o laboratório de andrologia (B) em um recipiente isolado com água a 37 ° C, em seguida, a amostra retirada para o estudo e a parte restante foi analisada no laboratório de Reprodução Assistida (C). Foram levados em conta: a concentração, a taxa de motilidade e morfologia dos espermatozoides.

Resultados: Com base em parâmetros da OMS 28 amostras de sêmen foram analisados por um observador no laboratório A, um observador em B e C. 4 no laboratório. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada na comparação entre as medições de concentração ($p < 0,01$), índice de motilidade ($p < 0,03$) e morfologia espermática normal ($p < 0,001$) entre os três laboratórios, com coeficiente de 3,6, 20,3 e 9,4 variação intra-observador % para a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides índice, respectivamente. Intervalidadores coeficientes de variação foram de 23,4, 33,9 e 94,8% para a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides índice, respectivamente.

Conclusões: Existe variabilidade entre laboratórios pesquisados, com maior diferença na morfologia dos espermatozoides. É desejável estabelecer a correlação entre diferentes laboratórios.

Palavras-chave: Análise do sêmen, a morfologia do esperma, infertilidade.

El análisis seminal fisicoquímico proporciona información de la contribución secretora de las glándulas sexuales accesorias y el análisis microscópico refleja la función espermatoxénica y esteroidogénica de los testículos.^{2,3} Esta función se determina a través de tres parámetro: 1) la concentración espermática, que es un indicador sensible de la espermatoxénesis;³ es la que menos variabilidad intraobservador debería tener (menos de 10%) en el laboratorio, debido a que es producto de una medición objetiva con un instrumento preciso. 2) la movilidad espermática,^{1,3} medición que mayor variación tiene en el análisis seminal debido a que es la medición

más subjetiva que se hace del semen y^{1,4} 3) la morfología espermática, calculada por cualquiera de dos métodos, uno propuesto por la OMS¹ y otro por Kruger.⁵

El diagnóstico de infertilidad masculina sigue dependiendo 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.² Por lo tanto, 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 son la subjetividad de la técnica y la falta de estandarización de los procedimientos en los diferentes laboratorios.⁵

El control de calidad en el laboratorio clínico es el conjunto de procesos que aseguran la fiabilidad técnica de las determinaciones realizadas, y que detecta y minimiza los errores de medición. Estos tienen dos componentes: aleatorio y sistemático. El error aleatorio hace referencia a la dispersión resultante de medir un mismo parámetro varias veces en la misma muestra, en su ausencia se habla de precisión y suele expresarse en desviación estándar o coeficiente de variación. El error sistemático se refiere al error del proceso; es decir, a la diferencia entre el valor real y la media obtenida luego de ejecutar varias determinaciones; su ausencia implica veracidad o exactitud y se expresa en unidades o porcentaje respecto del valor verdadero.⁴

Para fines de 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. Es necesario que la medición duplicada se efectúe desde el comienzo del procedimiento, si se limita a la lectura al microscopio no podrán detectarse los errores de preparación.⁶ Este estudio tiene el objetivo de establecer cuáles son las variaciones en una misma muestra de semen al analizarse en diferentes laboratorios, lo que pudiera tener repercusiones en la interpretación de los resultados.

MATERIAL Y METODOS

Estudio descriptivo efectuado en el Instituto Nacional de Perinatología en tres laboratorios: Andrología, Reproducción Asistida y Central del InPer, con aprobación del Comité de Investigación.

Se incluyeron las parejas de los pacientes atendidas en el servicio de Esterilidad a quienes se realizó una esper-

matobioscopia directa como parte del protocolo de estudio de la pareja infértil; a todos se les explicó el objetivo del estudio y quienes aceptaron participar firmaron el consentimiento informado.

En el Laboratorio Central el paciente entregó la muestra seminal que se obtuvo mediante masturbación que y se recolectó en un envase de polipropileno, con tapa de rosca de poliestireno estéril. La muestra se colocó en baño maría a 37°C durante 20 minutos, con agitador, y enseguida se estudió.

Análisis manual y semiautomatizado

El personal técnico analizó la muestra y sumergió un capilar, aproximadamente 1 mm de la punta, en el envase de polipropileno; el excedente se limpió con una toalla suave y se introdujo el lado plano del capilar hacia arriba, hasta donde llegó en el interior de la ranura de la cámara óptica del analizador de calidad de esperma, SQA IIC-P; al cabo de 45 segundos se obtuvo el reporte y se imprimió; este procedimiento se realizó dos veces para cada muestra. El personal encargado de analizar las muestras efectuó un análisis manual de la concentración espermática con la técnica de gota gruesa y de la movilidad espermática y los resultados se compararon con los del reporte del analizador de calidad seminal SQA IIC-P.

La muestra se trasladó inmediatamente al laboratorio de Andrología, en un recipiente térmico con agua a 37°C, en donde se efectuó otro estudio; el remanente se analizó en el laboratorio de Reproducción Asistida. En estos dos últimos laboratorios la técnica de preparación y valoración de la muestra seminal fue la misma y se realizó en dos oportunidades por cada observador; los datos se vaciaron en la hoja de recolección. Los observadores permanecieron cegados al diagnóstico del paciente. La muestra seminal se colocó en baño maría a 37°C y se efectuaron las siguientes valoraciones:

Determinación de la concentración con cámara de New Bauer. Los espermatozoides se inmovilizaron con formaldehído al 3.5%, con diluciones dependientes de la concentración obtenida en la cuenta gruesa. La valoración se hizo en un microscopio óptico de contrastes de fases y filtro verde, con objetivo de 40X. Luego de cuantificar los espermatozoides se realizaron los cálculos respectivos para el resultado final, que expresa la cantidad de espermatozoides en millones por mililitro. La valoración de la movilidad espermática se efectuó en pipetas automáticas

calibradas; se tomaron 10 mL de semen homogeneizado por pipeteo y se colocaron en un portaobjeto con un cubreobjeto de 22 x 22 mm y se valoró en un microscopio óptico de contraste de fases y filtro verde con objetivo de 40X. Se valoraron 200 células al azar en diferentes campos que se clasificaron según su movilidad en: A, B, C y D. Para este estudio se tomó en cuenta el índice de movilidad, que es la suma de la movilidad A + B.

Para valorar la morfología espermática, se utilizaron pipetas automáticas calibradas, se tomaron 3 mL de semen y se colocaron en placas preteñidas, cubriendolo con un cubreobjeto y se valoraron 100 espermatozoides al azar con un microscopio óptico de campo claro con objetivo 100X, clasificándolos en normales o anormales. Para el este estudio se tomó en cuenta el porcentaje de espermatozoides normales.

Participaron seis observadores de tres laboratorios diferentes; todos tienen experiencia y pertenecen a la plantilla de personal técnico encargado de la valoración de las muestras seminales del Instituto.

Con la información reunida se integró una base de datos en el programa Excel y con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows se analizaron las variables en estudio; se aplicaron: estadística descriptiva, con medidas de tendencia central y de dispersión, prueba de Kruskall-Wallis para la valoración de los resultados de los diferentes observadores.

RESULTADOS

Se analizaron las muestras seminales de 28 pacientes atendidos en el servicio de Esterilidad a quienes como parte del protocolo de estudio de la pareja infértil se solicitó una espermatobioscopia directa. Todos los participantes en el estudio observaron las muestras en dos oportunidades.

Al valorar la concentración, el laboratorio A llegó a una media de 86.55 ± 35.94 con rangos promedio de 20.5 a 163 millones de espermatozoides por mililitro. El laboratorio B tuvo una media de 64.62 ± 40.40 con rangos de 8.75 a 170.5 millones de espermatozoides por mililitro. El laboratorio C obtuvo una media de 95.24 ± 60.31 con rangos de 15.5 a 282 millones de espermatozoides por mililitro. Al aplicar la prueba estadística de Kruskall-Wallis se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el laboratorio B en relación con los laboratorios A y C ($p<0.01$).

En la movilidad espermática se observó que el laboratorio A llegó a una media de 36.77 ± 18.89 con rangos de 0.5 a 65.5%. El laboratorio B tuvo una media de 54.19 ± 19.61 con rangos de 17.5 a 84.2 %. El laboratorio C tuvo una media de 49.11 ± 22.71 con rangos de 0 a 85.5 %. Al aplicar la prueba estadística de Kruskall-Wallis se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el laboratorio A en relación con los laboratorios B y C ($p<0.001$).

Al comparar la morfología entre los tres laboratorios se observó que el laboratorio A llegó a una media de 9.95 ± 4.54 con rangos de 1 a 19%. El laboratorio B tuvo una media de 39.11 ± 15.04 con rangos de 17 a 48.5%. El laboratorio C reportó una media de 7.78 ± 4.26 con rangos de 1 a 20%. Al aplicar la prueba estadística de Kruskall-Wallis se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el laboratorio B en relación con los laboratorios A y C ($p<0.001$).

Los promedios de los coeficientes de variación intra-observador son resultado de dos evaluaciones por cada miembro del laboratorio: concentración espermática promedio de 3.6% con rangos de 2.8 a 5.7%. El coeficiente de variación promedio del índice de movilidad espermática fue de 20.3% con rangos de 3.5 a 51.2%. Para la morfología normal, el coeficiente de variación promedio fue de 9.4% con rangos de 4.2 a 12.7%.

El promedio del coeficiente de variación interobservador (comparación entre cada uno de los observadores) para la variable concentración espermática, fue de 23.4%, con rangos de 6.7 a 46.3%. El índice de movilidad mostró un coeficiente de variación promedio de 33.9%, con rangos de 9.6 a 229.7% y para morfología espermática el coeficiente de variación promedio fue de 94.8%, con rangos de 50.6 a 154%.

DISCUSIÓN

En la actualidad, el análisis seminal es la prueba más importante para evaluar la fertilidad masculina, y en ocasiones la única.⁷ El objetivo del análisis del semen es contar con el diagnóstico etiológico, con la intención de encontrar el origen de la infertilidad en una afección andrológica y poder indicar la terapéutica mejor adaptada a cada caso. Si el examen seminal muestra valores dentro de los límites 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. 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 con infertilidad. Los resultados de las pruebas efectuadas a cualquier persona varían debido a tres factores: *a*) influencias pre-analíticas (en el caso del semen, el periodo de abstinencia sexual, el transporte de la muestra hacia el laboratorio, entre otras), *b*) error aleatorio (precisión) y error sistemático y *c*) variación biológica inherente a cada sujeto.⁸ Ha sido descrita por diferentes autores una amplia variación en la concentración espermática entre diferentes laboratorios ya sea en forma manual^{6,9} o por medio de métodos computarizados.¹⁰ Los resultados de este estudio muestran que las concentraciones espermáticas entre los diferentes observadores varían en límites que pueden ser muy amplios con rangos de 25 millones por mililitro en un observador a 108 millones por mililitro en otro para la misma muestra seminal. Los coeficientes de variación interobservador reportados por diferentes laboratorios al realizar el análisis manual son de 22.9 a 138%^{3,11,12} con muestras seminales congeladas; en este estudio se encontró 23.4% entre los tres laboratorios en las 28 muestras estudiadas. Además, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre laboratorios B con el A y C. Este coeficiente de variación interobservador es menor que el reportado por la bibliografía^{11,12} y esto se puede deber a que los diferentes estudios realizados usaron muestras seminales congeladas que fueron enviadas por correo a diferentes laboratorios. Esta manipulación de la muestra puede influir en sus valoraciones con lo que los coeficientes de variación son amplios. En cambio, en este trabajo las muestras seminales las valoraron todos los observadores en las siguientes 2 a 3 horas de haberse recolectado. Al compararlo con estudios realizados con muestras seminales frescas los resultados fueron menores (23.4% vs 44.3%).¹³

En un estudio se reportó un coeficiente de variación interobservador de 40% con semen congelado, de 31% con muestras frescas y de 25% con cintas de video.¹⁴ Nuestro reporte es menor al comunicado en este estudio de 23.4%.

El promedio del coeficiente de variación intra-observador relacionado con la concentración espermática de este trabajo fue de 3.6%, que es menor al de 10% reportado en

otro estudio,⁶ a pesar de contar con amplios límites en el laboratorio B. Debido a la experiencia del personal técnico de los diferentes laboratorios, los coeficientes de variación fueron menores que los reportados en la bibliografía para muestras seminales frescas y no congeladas.

Todos los parámetros seminales, incluida su morfología, se consideraron los más relacionados con el potencial de fertilidad.¹² Sin embargo, también se sabe que existe una considerable variación en esta determinación.^{15,16} Las razones para esta variación incluyen la falta de estandarización, diferentes técnicas de la preparación seminal, y el nivel de experiencia del observador. Muchos autores han usado el análisis computarizado de la valoración morfológica para emplear un método estandarizado y reducir la variabilidad,^{16,17} otros han concluido que la generación actual de analizadores computados de semen no ha sido capaz de analizar la morfología seminal en una forma adecuada para su aplicación clínica de rutina.¹⁷ En este estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los observadores de los tres laboratorios participantes al valorar las 28 muestras siguiendo los criterios de la OMS.

En estudios previos se han encontrado variaciones de 7 a 56%, dependiendo del método de valoración, con menor coeficiente de variación cuando se aplican los criterios de la Sociedad Americana de Patólogos Clínicos (21%) en comparación con los criterios de la OMS (42%) y de los criterios estrictos de Kruger, que son más altos (33%).^{11,18} En este estudio se utilizaron los criterios de la OMS y se encontró un cociente de variación mayor al reportado en la bibliografía, con límites muy amplios entre los tres laboratorios de 62 a 124.8% al valorar las 28 muestras seminales. El laboratorio B mostró porcentajes muy elevados en relación con los otros dos laboratorios. En una muestra del laboratorio A, 20% de normales y por los otros un promedio de 2%. Al medir el coeficiente de variación del laboratorio C se encontró un promedio de 11.52%, que es menor al reportado en la bibliografía. En un estudio se reportó un coeficiente de variación de espermatozoides normales observado en portaobjetos teñidos (45%), sin teñir (52%) y con semen congelado (51%).¹³

En este estudio, al valorar los resultados relacionados con la movilidad espermática, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los observadores de los tres laboratorios al examinar las 28 muestras seminales. El coeficiente de variación interobservador en este estudio

fue de 33.9%, que es mayor a lo reportado en uno de los primeros estudios efectuados,⁵ que fue de 21%, a pesar de haber usado muestras criopreservadas. En otros ensayos se han reportado variaciones amplias de 30 a 78% con el empleo de diferentes técnicas de evaluación.¹⁸ Al valorar los coeficientes de variación intraobservador se encontró 12.3% que es similar al reportado en distintos estudios de 8%⁵ y menor a lo reportado en un estudio de 26.2%.³ En los diferentes estudios revisados se encontraron pocos que entre sus variables hubieran tomado en cuenta la movilidad espermática, porque en las muestras seminales congeladas la movilidad está disminuida por eso los resultados encontrados son muy variables o no se reportan.

En la comparación de los resultados de los tres laboratorios se encontró un coeficiente de variación intraobservador mayor en el laboratorio B (44.4%) y menor en el laboratorio C (5.3%), similar a lo reportado en la bibliografía.

CONCLUSIONES

De las variaciones encontradas en tres laboratorios distintos se desprende la necesidad de efectuar más estudios que permitan estandarizar los procedimientos para obtener valores seminales confiables.

REFERENCIAS

1. Kvist U, Bjorndahl L. Manual de análisis básico de semen. Monografía ESHRE; 2004;1-38.
2. Villanueva CA. Infertilidad Masculina. En: Ginecología y Reproducción Humana, Temas Selectos. Ed. Mexicana; 2006;452-457.
3. Auger J, Eustace F, Ducot B, Blandin T, Daudin M and Diaz I. Intra and inter individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 2000;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. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New Engl J Med* 2001;345:1388-1393.
5. Neuwinger J, Behre H, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990;54:308-314.
6. Hammoud AO, Gibson M, Peterson MC, Carrel DT. Effect of sperm preparation techniques by density gradient on intra-individual variation of sperm motility. *Arch Androl* 2007;53:349-351.
7. Kruger T, Menkveld R, Satnder F. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986;46:1118-1123.
8. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reprod* 2003;18:2082-2088.
9. Coetze K, Kruger TF, Lombrad CJ, et al. Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertil Steril* 1999;71:80-84.
10. Mortimer D. Technician training and quality controls aspects. *Practical Laboratory Andrology*. Oxford University Press, Oxford 1994;337-347.
11. 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;15:680-686.
12. Walker RH: Pilot surveys for proficiency testings of semen analysis. *Arch Pathol. Lab Med* 1992;116:432-434.
13. Jequier A, Ukombe E. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol* 1983;55:434-436.
14. Castilla JA. Control de calidad en el laboratorio de Andrología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2001;18:29-33.
15. Dunphy BC, Kay R, Barratt CL. Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl* 1989;10:378-385.
16. Barroso G, Mercan R, Ozgur K. 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;14:2036-2040.
17. Kruger TF, Coetze K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Human Repro Update* 1999;5:172-178.
18. Jorgensen N, Auger J, Giwerman A. Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *Int J Androl* 1997;20:201-207.