

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

### Ο ποιοτικός έλεγχος των εξετάσεων σπέρματος

Οι εξετάσεις σπέρματος παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγάλες διακυμάνσεις ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια. Αυτό το χαρακτηριστικό οφείλεται, σε μεγάλο ποσοστό, στην έλλειψη σωστού ποιοτικού ελέγχου ενός ανδρολογικού εργαστηρίου. Οι μετρήσεις των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος είναι υποκειμενικές και τόσο η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου, όσο και η ακρίβεια στην εφαρμογή της μπορεί να είναι καθοριστικές για το αποτέλεσμα των μετρήσεων. Το πρώτο βήμα στο ανδρολογικό εργαστήριο αφορά στον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο, ενώ στη συνέχεια πρέπει να ακολουθεί ο εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος. Το επιστέγασμα της συγκεκριμένης προσπάθειας είναι πάντοτε η διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων. Στον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο, ο κάθε τεχνολόγος αξιολογεί τον εαυτό του με μετρήσεις, που πρέπει να περιλαμβάνουν τη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, τη μέτρηση της κινητικότητάς τους και τη μέτρηση της μορφολογίας. Η διακύμανση αυτών των τιμών πρέπει να βρίσκεται μέσα σε συγκεκριμένα όρια, ώστε οι τιμές να γίνονται αποδεκτές. Εάν σε ένα εργαστήριο απασχολούνται πολλά άτομα, τότε πρέπει να ελέγχεται και η διακύμανση των μετρήσεων μεταξύ των διαφορετικών ατόμων. Ο στόχος είναι να μη διαφοροποιείται το αποτέλεσμα της εξέτασης ανάλογα με τον τεχνολόγο που διενεργεί την εξέταση. Στον εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο, οι μετρήσεις ενός δείγματος από ένα εργαστήριο συγκρίνονται με τις μετρήσεις του ίδιου δείγματος από άλλα εργαστήρια. Για το σκοπό αυτόν, το εργαστήριο πρέπει να συμμετέχει σε κάποιο οργανωμένο σύστημα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου. Και πάλι, η διακύμανση μεταξύ των τιμών πρέπει να κινείται μέσα σε στενά όρια, ώστε οι μετρήσεις να είναι αποδεκτές. Στο επιστέγασμα αυτής της προσπάθειας βρίσκεται η διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων, που εξασφαλίζει στον ασθενή ορθή αντιμετώπιση του προβλήματος της υπογονιμότητας.

#### 1. ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Ο εργαστηριακός έλεγχος του υπογόνιμου ζευγαριού περιλαμβάνει πάντοτε το σπερμοδιάγραμμα ως το πρώτο βήμα στη διερεύνηση της αιτίας της υπογονιμότητας.<sup>1</sup> Το αποτέλεσμα του σπερμοδιαγράμματος αρκεί για να χαρακτηριστεί η ποιότητα του δείγματος στον άνδρα, χωρίς όμως από μόνο του να είναι αρκετό για τη διάγνωση της υπογονιμότητας.<sup>2</sup> Σε αρκετές περιπτώσεις, στο δείγμα του σπέρματος απαιτούνται συμπληρωματικές μικροβιολογικές, βιοχημικές ή ανοσολογικές εξετάσεις, ενώ τα τελευταία χρόνια στο συγκεκριμένο κατάλογο έχουν προστεθεί και οι λειτουργικές δοκιμασίες.<sup>3</sup> Με αυτόν τον τρόπο καθορίζεται η γονιμοποιητική ικανότητα του δείγματος με περισσότερες

λεπτομέρειες και έτσι ο κλινικός ιατρός είναι σε θέση όχι μόνο να κάνει πρόγνωση για τη γονιμότητα του ζευγαριού, αλλά και να συλλέξει στοιχεία για συγκεκριμένες δυσλειτούργιες των σπερματοζωαρίων, ώστε να ακολουθηθεί η κατάλληλη θεραπεία.<sup>4</sup>

Ένα πολύ συνηθισμένο και παγκόσμιο φαινόμενο είναι η έλλειψη συμφωνίας στα αποτελέσματα του σπερμοδιαγράμματος του ίδιου δείγματος ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια. Έτσι, ένας άνδρας θεωρείται γόνιμος από ένα εργαστήριο, ενώ, αν λίγες ημέρες αργότερα, αποφασίσει να επαναλάβει την εξέταση, μπορεί να θεωρηθεί υπογόνιμος από ένα άλλο εργαστήριο. Αυτό από μόνο του διαφοροποιεί την πιθανότητα σύλληψης του ζευγαριού και τη θεραπευτική αντιμετώπιση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτή η διαφορά

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2011, 28( ):1-11  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2011, 28( ):1-11

Θ. Ζεγκινιάδου,<sup>1</sup>  
Ι. Βακαλόπουλος,<sup>1</sup>  
Δ. Ραδόπουλος,<sup>1</sup>  
Ν. Σοφικίτης<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Α΄ Ουρολογική Κλινική, Νοσοκομείο  
«Γ. Γεννηματάς» Θεσσαλονίκης,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη  
<sup>2</sup>Ουρολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Quality control of semen analysis

Abstract at the end of the article

#### Λέξεις ευρετηρίου

Ανδρική υπογονιμότητα  
Διασφάλιση ποιότητας  
Εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος  
Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος  
Σπερμοδιάγραμμα

Υποβλήθηκε 23.6.2010

Εγκρίθηκε 19.7.2010

οφείλεται στη διακύμανση που παρουσιάζει το δείγμα σπέρματος του ίδιου άνδρα από εκσπερμάτιση σε εκσπερμάτιση. Είναι γνωστό ότι η εν λόγω διακύμανση μπορεί να είναι σημαντική και πρέπει πάντοτε να λαμβάνεται υπ' όψη για την αξιολόγηση του σπέρμοδιαγράμματος, ανεξάρτητα από το εργαστήριο στο οποίο έγινε η εξέταση.<sup>5,6</sup> Αν και υπάρχει διχογνωμία στη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί ότι ακόμη και ο χώρος συλλογής του σπέρματος μπορεί να επηρεάζει την ποιότητα του δείγματος.<sup>7,8</sup> Επί πλέον, διακύμανση στις τιμές των παραμέτρων έχει αναφερθεί σε άνδρες που ζουν σε διαφορετικές πόλεις της Ευρώπης.<sup>9</sup> Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες όπως το stress, οι ώρες επαγγελματικής απασχόλησης ή η κατάσταση στην εργασία.<sup>10</sup>

Υπάρχουν όμως και πολλοί ακόμη λόγοι, που δυνητικά είναι υπεύθυνοι για τη διαφορά των τιμών στο σπέρμοδιάγραμμα του ίδιου άνδρα και οφείλονται στην ιδιομορφία που παρουσιάζει το εν λόγω δείγμα και στον τρόπο με τον οποίο πρέπει να διεξάγεται η συγκεκριμένη εξέταση. Συνεπώς, το πρώτο που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται από το ανθρώπινο μάτι με μικροσκόπιο και, άρα, είναι υποκειμενικές. Δεν υπάρχει πρότυπο με το οποίο να μπορεί να συγκριθεί το προς ανάλυση δείγμα για τον προσδιορισμό τυχόν αποκλίσεων. Στα εργαστήρια βιοχημείας, για παράδειγμα, η ποιότητα του αποτελέσματος εξασφαλίζεται μέσω της σύγκρισής του με ένα πρότυπο δείγμα (standard), με καθορισμένη τιμή. Δεδομένου ότι το δείγμα και το πρότυπο εξετάζονται με την ίδια μέθοδο, η αλλαγή της τιμής του προτύπου από τα προκαθορισμένα όρια θα προειδοποιήσει για τυχόν μεταβολή στο σύστημα μέτρησης. Αυτή η δυνατότητα δεν υπάρχει στις μετρήσεις των παραμέτρων του σπέρμοδιαγράμματος.

Η άλλη βασική διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι το προς ανάλυση δείγμα αποτελείται από ζωντανά κύτταρα. Ο οποιοσδήποτε λανθασμένος χειρισμός θα μπορούσε να προκαλέσει αλλοίωση στο δείγμα και να επηρεάσει τις μετρήσεις. Επίσης, δεν υπάρχει η δυνατότητα να «επαναληφθούν» αργότερα ορισμένες μετρήσεις, όπως για παράδειγμα αυτή της κινητικότητας ή της ζωτικότητας, δεδομένου ότι οι εν λόγω μετρήσεις πρέπει να διεξαχθούν σε ορισμένη χρονική στιγμή. Τέλος, απλοί χειρισμοί, όπως η επιλογή μη τοξικών δοχείων συλλογής σπέρματος και η μεταφορά του στο εργαστήριο σε θερμοκρασία σώματος, επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα σε μεγάλο ποσοστό.

Ακόμη, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψη ότι τα χαρακτηριστικά των πολλών εκατομμυρίων σπέρματοζωαρίων ενός δείγματος σπέρματος θα καθοριστούν από τις μετρήσεις που γίνονται σε λίγες μόνο εκατοντάδες από αυτά.<sup>11</sup> Κατά συνέπεια, λάθη στην επεξεργασία του δείγματος που

οφείλονται σε μη καλή ανάδευσή του θα απομονώσουν μη αντιπροσωπευτικά τμήματά του, με επακόλουθο λάθη στις μετρήσεις, λόγω της ανομοιογένειας του δείγματος. Έχει ήδη αναφερθεί ότι το λάθος που προκαλείται από πολλαπλές δειγματοληψίες είναι μεγαλύτερο από το λάθος που θα προκληθεί από πολλαπλές μετρήσεις του ίδιου πεδίου.<sup>12</sup>

Ένα άλλο πρόβλημα που επηρεάζει την αξιοπιστία του σπέρμοδιαγράμματος είναι ότι διαφορετικά εργαστήρια χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθόδους για τον προσδιορισμό των παραμέτρων του. Παραδείγματος χάρη, η μέτρηση του όγκου, που αποτελεί μια πολύ απλή παράμετρο, αλλάζει αν τροποποιηθεί και ο τρόπος προσδιορισμού του. Το ίδιο ισχύει και στις άλλες μετρήσεις, όπως ο αριθμός. Στην περίπτωση αυτή, εκτός από την υποκειμενικότητα που εμπεριέχεται στη μέτρηση, η χρήση διαφορετικών θαλάμων καταμέτρησης υπολογίζει διαφορετικό αριθμό σπέρματοζωαρίων, με μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά.<sup>13</sup> Αυτοί οι λόγοι οδήγησαν το 1980 στην έκδοση του πρώτου εγχειριδίου (manual) για τα ανδρολογικά εργαστήρια από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Έκτοτε, ακολούθησαν πολλές εκδόσεις και έτσι σήμερα είναι διαθέσιμο το 4ο εγχειρίδιο με την προσθήκη πολλών νέων δεδομένων, καθώς και αλλαγές σε ορισμένα σημεία έναντι των προηγούμενων εκδόσεων.<sup>14</sup> Τις τελευταίες εβδομάδες, μάλιστα, γνωστοποιήθηκαν τα πρώτα δεδομένα του τελευταίου, 5ου εγχειριδίου του ΠΟΥ, που θα δημοσιευτεί σύντομα.<sup>15,16</sup>

## 2. ΟΙ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ – ΠΗΓΕΣ ΛΑΘΟΥΣ

Η ανάγκη για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων του ανδρολογικού εργαστηρίου αναγνωρίστηκε πριν από πολλά χρόνια.<sup>17</sup> Όπως προαναφέρθηκε, οι εξετάσεις σπέρματος είναι «υποκειμενικές, μη επαναλήψιμες και δύσκολο να διδαχθούν», γεγονός, που καθιστά αναγκαία την παρουσία υψηλών προτύπων στην εργαστηριακή Ανδρολογία.<sup>18</sup> Πολλοί ερευνητές ανέφεραν κατά καιρούς το μεγάλο περιθώριο για αναλυτικό λάθος στο σπέρμοδιάγραμμα.<sup>19-21</sup> Εκτός από την υποκειμενικότητα των μετρήσεων, οι διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα κάθε παραμέτρου του σπέρμοδιαγράμματος αναφέρονται στη συνέχεια.

### 2.1. Μέτρηση του αριθμού των σπέρματοζωαρίων

Η μέτρηση του αριθμού των σπέρματοζωαρίων διεξάγεται στο ειδικό κυτταρόμετρο και για να ολοκληρωθεί είναι αναγκαία τρία στάδια: Αρχικά, το δείγμα του σπέρματος αραιώνεται, στη συνέχεια τοποθετείται στο κυτταρόμετρο για να μετρηθεί στο μικροσκόπιο ο αριθμός των σπέρματο-

ζωαρίων που υπάρχουν σε συγκεκριμένο όγκο αραιωμένου δείγματος και, τέλος, γίνεται ο υπολογισμός του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων, με βάση την αραιώση, που εκφράζεται σε αριθμό σπερματοζωαρίων ανά mL. Σε όλη αυτή την υποκειμενική διαδικασία μέτρησης του αριθμού των σπερματοζωαρίων υπάρχουν σημεία στα οποία θα μπορούσαν να προκύψουν λάθη.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν και αντικειμενικοί τρόποι μέτρησης της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων, όπως είναι η κυτταρομετρία ροής.<sup>22,23</sup> Εκτός από τη μέτρηση του αριθμού, ο κυτταρομετρητής ροής μπορεί να διαχωρίσει με ακρίβεια και διαφορετικές κατηγορίες κυττάρων εκτός από τα ώριμα απλοειδή σπερματοζωάρια, όπως στρογγυλές σπερματίδες, διπλοειδή σπερματοζωάρια, λευκοκύτταρα, G1-σπερματογόνια, πρωτογενή σπερματοκύτταρα κ.λπ. Ιδιαίτερα το ποσοστό των διπλοειδών σπερματοζωαρίων, που προκύπτουν ως αποτέλεσμα ελαττωματικού διαχωρισμού των χρωματίδων, παρουσιάζει σημαντική κλινική σημασία, αφού έχει συνδεθεί με επανειλημμένες αποβολές.<sup>24</sup> Ωστόσο, ο συγκεκριμένος τρόπος, παρά τις δυνατότητές του, δεν χρησιμοποιείται στις μετρήσεις ρουτίνας.

Στις μετρήσεις ρουτίνας, το πρώτο σημείο που χρήζει προσοχής είναι η επιλογή του κυτταρόμετρου. Το ποσοστό λάθους στη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων που μπορεί να προέλθει από την ίδια την πλάκα μέτρησης είναι πολύ υψηλό και έχουν ήδη αναφερθεί σημαντικές διαφορές στον αριθμό των σπερματοζωαρίων ανάμεσα σε πολύ συχνά χρησιμοποιούμενες πλάκες, που μπορεί να φθάνουν στο 62% της πραγματικής τιμής.<sup>25</sup> Σημαντικό κριτήριο για την επιλογή της πλάκας μέτρησης είναι ο τρόπος εύρεσης και μέτρησης των σπερματοζωαρίων ενός δείγματος με μια συγκεκριμένη πλάκα, ακόμη και όταν είναι πολύ λίγα, ώστε να μην κινδυνεύει το δείγμα να χαρακτηριστεί αζωοσπερμικό από εργαστηριακό λάθος. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται επίσης στη σωστή τοποθέτηση του δείγματος στην πλάκα –το «φόρτωμα της πλάκας»– όπως συνήθως λέγεται εργαστηριακά. Έτσι, διαφορές μεταξύ των μετρήσεων πιθανόν να παρουσιαστούν όχι μόνο από τη χρήση διαφορετικών θαλάμων μέτρησης, αλλά και από λανθασμένη πλήρωση των θαλάμων της πλάκας μέτρησης, όπως επισημαίνει η Sally Perreault.<sup>26</sup> [Προσοχή! Στη βιβλιογραφία, η αρ. 26 δεν αναφέρει αυτή τη συγγραφέα. Παράκληση για διερεύνηση.] Στη ρουτίνα συστήνεται η χρήση της πλάκας Neubauer, η οποία συστήνεται και από το εγχειρίδιο του ΠΟΥ.<sup>14</sup>

Για τη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων πρέπει πάντοτε να γίνεται αραιώση του ληφθέντος δείγματος σπέρματος. Η ακριβής τιμή του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων θα καθοριστεί από την ακριβή

αραιώση του δείγματος, γεγονός που είναι εύκολο να επιτευχθεί μόνο με τη χρήση της σωστής πιπέτας δειγματοληψίας, όπως αναφέρει και ο Comhaire.<sup>27</sup> Έτσι, λοιπόν, είναι επιβεβλημένο να χρησιμοποιείται αποκλειστικά πιπέτα θετικής αναρρόφησης, η οποία παρουσιάζει αξιοπιστία στον αναρροφώμενο όγκο, άσχετα με το πόσο παχύρρευστο είναι ένα δείγμα.

Πάντοτε στην εκτίμηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιείται μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης για τη διαφοροποίηση των σπερματοζωαρίων από τα κυτταρικά υπολείμματα (debris) ή από άλλα κυτταρικά στοιχεία.<sup>28,29</sup> Οι Peters et al, σε κάθε μέτρηση του αριθμού, περιελάμβαναν ως υλικό αναφοράς και σφαιρίδια γνωστής συγκέντρωσης, γεγονός που κατόρθωσε να ελαττώσει τη διαφορά των αποτελεσμάτων ανάμεσα σε διαφορετικούς τεχνολόγους ή διαφορετικές πλάκες μέτρησης.<sup>30</sup> Συνεπώς, με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί η ακρίβεια των θαλάμων μέτρησης.<sup>31</sup>

## 2.2. Εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε ένα δείγμα δείχνει το ποσοστό των κινούμενων σπερματοζωαρίων, καθώς και τον τρόπο της κίνησής τους. Έτσι, αν τα σπερματοζωάρια κινούνται με ζωηρή προωθητική κινητικότητα κατατάσσονται στην κατηγορία «α», ενώ αν κινούνται με νωθρή προωθητική κινητικότητα κατατάσσονται στην κατηγορία «β». Σε κάθε δείγμα σπέρματος συνυπάρχουν επίσης σπερματοζωάρια με επιτόπια κίνηση, καθώς και ακίνητα. Η κινητικότητα θα μπορούσε να μετρηθεί αντικειμενικά με μεθόδους όπως η θολομετρία (turbidimetry) ή η οπτική πυκνότητα (optical density)<sup>32</sup> και η φωτογραφία πολλαπλών στάσεων (multiple exposure photography).<sup>33</sup> Ωστόσο, αυτοί οι τρόποι αξιολόγησης της κίνησης των σπερματοζωαρίων δεν ενδείκνυνται για την αξιολόγηση ρουτίνας στο ανδρολογικό εργαστήριο.

Στην πράξη, η κινητικότητα μετράται οπτικά σε υγρή σταγόνα δείγματος, αυστηρά με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης για τη διαφοροποίηση των σπερματοζωαρίων από τα κυτταρικά υπολείμματα (debris) και τα άλλα κυτταρικά στοιχεία.<sup>28,29</sup> Η καλή ανάδευση του δείγματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, όπως και με τη μέτρηση του αριθμού. Παράλληλα, στη μέτρηση της κινητικότητας ιδιαίτερα κρίσιμη είναι η διατήρηση της θερμοκρασίας, τόσο του προς εξέταση δείγματος όσο και της αντικειμενοφόρου πλάκας στην οποία γίνεται η μέτρηση, στους 37 °C. Αύξηση ή ελάττωση της θερμοκρασίας θα προκαλέσει αλλαγή στην κινητικότητα του δείγματος.

Η κινητικότητα μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά με τους αναλυτές σπέρματος με τη βοήθεια κάμερας και ηλεκτρονικού υπολογιστή (computer-aided semen analysis, CASA). Είναι φυσικό ότι το CASA μπορεί να μετρήσει μεγάλους αριθμούς σπερματοζωαρίων και να αξιολογήσει την ταχύτητά τους σε μm/sec, κάτι που δεν εφικτό να πραγματοποιήσει το ανθρώπινο μάτι. Ωστόσο, η μέτρηση με το CASA δεν υπερτερεί πάντοτε από το έμπειρο μάτι με το μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, γιατί η εν λόγω μέτρηση εξαρτάται από τις ρυθμίσεις που γίνονται από το χειριστή. Παρά λοιπόν το γεγονός ότι το CASA θα μπορέσει να καταγράψει με ακρίβεια την ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης του σπερματοζωαρίου ή την πλάγια μετατόπιση της κεφαλής του, απαιτείται μεγάλη προσοχή στα ποσοστά κίνησης του CASA,<sup>28</sup> γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό στις ολιγοσπερμίες.<sup>34</sup> Σε μια μελέτη σύγκρισης της ζωηρής προωθητικής κινητικότητας (ταχύτητας «α») των σπερματοζωαρίων με οπτικό προσδιορισμό και CASA βρέθηκε μεγαλύτερο ποσοστό με τον οπτικό προσδιορισμό σε σχέση με το CASA.<sup>35</sup> Η παρουσία «ξένων σωματιών» ξεγελά τον αναλυτή πιο εύκολα από το ανθρώπινο μάτι. Κατά συνέπεια, δεν προκαλεί μόνο αλλοίωση του πραγματικού αριθμού των σπερματοζωαρίων αλλά και σημαντική αλλοίωση του προσδιορισμού της κινητικότητάς τους.<sup>27</sup>

### 2.3. Εκτίμηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων

Η παράμετρος της μορφολογίας, ως γνωστόν, δεν μπορεί να αξιολογηθεί στην υγρή σταγόνα. Μόνο μετά από μονιμοποίηση και χρώση των σπερματοζωαρίων μπορεί να αξιολογηθεί το μέγεθος και η μορφή της κεφαλής, η περιοχή του αυχένα και το μήκος της ουράς. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αξιολόγηση του ακροσώματος στην περιοχή της κεφαλής. Το ακρόσωμα μπορεί να παρουσιάζει μορφολογικές αλλοιώσεις που ασφαλώς επηρεάζουν την ικανότητα διείσδυσης του σπερματοζωαρίου στο ωάριο, ενώ σε σπανιότερες περιπτώσεις, όπως είναι η μικροστρογγυλοκεφαλία (globozoospermia), το ακρόσωμα λείπει εντελώς και τα σπερματοζωάρια αδυνατούν να γονιμοποιήσουν το ωάριο.<sup>36</sup>

Η πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος χρώσης των σπερματοζωαρίων είναι η χρώση Παπανικολάου,<sup>14</sup> αν και υπάρχουν και ταχύτερες μέθοδοι. Στην αξιολόγηση της μορφολογίας, λάθη ενδέχεται να προκύψουν από την επιλογή λανθασμένης μεθόδου χρώσης των σπερματοζωαρίων.

Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην αξιολόγηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, δεδομένου ότι το ποσοστό των φυσιολογικών μορφών εξαρτάται από τον τρόπο αξιολόγησης. Μάλιστα, η μορφολογία αποκτά ακόμη

μεγαλύτερη σημασία, γιατί φαίνεται ότι παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τη γονιμοποιητική ικανότητα ενός δείγματος, τόσο στη φυσική σύλληψη όσο και στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Τα τελευταία χρόνια, η αξιολόγηση των σπερματοζωαρίων ως προς τη μορφολογία έχει καταστεί πολύ πιο αυστηρή, γεγονός που θεωρείται ότι προσεγγίζει περισσότερο την αληθινή μορφολογία του σπερματοζωαρίου, όπως έχουν δείξει μελέτες σπερματοζωαρίων από την τραχηλική βλέννα στη μετά την επαφή δοκιμασία ή σπερματοζωαρίων από τη διαφανή ζώνη των ωαρίων κατά την εφαρμογή εξωσωματικής γονιμοποίησης.<sup>37</sup> Ιδιαίτερη σημασία αποκτά η αξιολόγηση της μορφολογίας μετά από μια πολύ πρόσφατη δημοσίευση για αλλαγή στην τιμή αναφοράς από 15% σε 4%.<sup>15,38</sup>

### 2.4. Εκτίμηση της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων

Η μέτρηση της ζωτικότητας γίνεται κυρίως με τη μέθοδο της ηωσίνης-νιγροσίνης, ενώ πολύ λιγότερο χρησιμοποιείται η μέθοδος της υπολείμματα-ωσμωτικής διόγκωσης.<sup>14</sup> Αντικειμενικός τρόπος αξιολόγησης της ζωτικότητας μπορεί να γίνει με τη χρήση χρωστικών με φθορισμό και κυτταρομετρία ροής.<sup>22</sup> Η χρώση πρέπει να επιλέγεται με προσοχή για να μην αλλοιώνει τη ζωτικότητα,<sup>39</sup> ενώ ο μεγάλος αριθμός κυττάρων που μετράται από τον κυτταρομετρητή εξασφαλίζει την ακρίβεια της μεθόδου.

Η εκτίμηση της ζωτικότητας είναι η πιο εύκολη μέτρηση και αποτελεί πάντα έναν εξαιρετικό τρόπο επαλήθευσης της μέτρησης της κινητικότητας, όταν γίνεται βέβαια με την ενδεδειγμένη μέθοδο.<sup>40</sup>

## 3. Ο ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Το πρώτο βήμα για την παραγωγή σωστού εργαστηριακού αποτελέσματος είναι ο εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος που βασίζεται σε δεδομένα του δείγματος σπέρματος.<sup>41</sup> Ο εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος εξασφαλίζει την επαναληψιμότητα των μετρήσεων και μέσα από αυτή τη διαδικασία ο κάθε τεχνολόγος αξιολογεί τον «εαυτό του». <sup>42</sup> Πιο συγκεκριμένα, ο τεχνολόγος μετρά πολλές φορές μία από τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος σε ένα δείγμα σπέρματος. Οι τιμές που προκύπτουν πρέπει να παρουσιάζουν μικρή απόκλιση. Η απόκλιση αυτή εκφράζεται με το συντελεστή διακύμανσης (coefficient of variation, CV) και το εύρος τιμών, που θεωρείται αποδεκτό όταν είναι συνήθως <15%. Οι τιμές μετρήσεων του ποιοτικού ελέγχου συχνά χρησιμοποιούνται για να σχηματιστούν οι καμπύλες Levy-Jennings, που παρουσιάζουν μια σχηματική απεικόνιση πολύ εύκολα κατανοητή. Έτσι, παρατηρώντας

κάποιος τις καμπύλες Levy-Jennings μπορεί και μόνο με μια ματιά στα διαγράμματα να ανιχνεύσει λάθη που είναι τυχαία (απότομη αύξηση ή ελάττωση σε μία τιμή), καθώς και λάθη που είναι συστηματικά (διαρκής αύξηση ή ελάττωση σε μια σειρά από τιμές).<sup>17</sup>

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για τον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο είναι συνήθως σταθερά «εξωτερικά» δείγματα, τα οποία παρεμβαίνουν στα δείγματα της ρουτίνας και οι τιμές αυτών των μετρήσεων καταγράφονται στα ειδικά φυλλάδια ποιοτικού ελέγχου του εργαστηρίου. Πολλές φορές, σε αυτά τα δείγματα έχουν ήδη γίνει κάποια στάδια της διαδικασίας των προσδιορισμών των διαφόρων παραμέτρων του σπέρματος, όπως για παράδειγμα οι αραιώσεις, εάν πρόκειται για τη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, ή η χρώση των επιχρισμάτων, εάν πρόκειται για την εκτίμηση της μορφολογίας. Τα έτοιμα προβαμμένα πλακάκια για τη μορφολογία και τη ζωτικότητα είναι πολύ εύκολο να σταλούν από ένα κεντρικό εργαστήριο σε φορέα ελέγχου. Ωστόσο, το γεγονός –όσον αφορά στη χρώση– ότι τα δείγματα είναι προβαμμένα δεν αποτελεί το ιδανικό σενάριο, δεδομένου ότι οι διαφορές που οφείλονται στην τεχνική χρώσης δεν συνυπολογίζονται με αυτόν τον τρόπο. Αυτό σημαίνει ότι η χρήση των εν λόγω «εξωτερικών» δειγμάτων για τον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο δεν αντικατοπτρίζει ακριβώς τη ρουτίνα του εργαστηρίου.

Μια μέθοδος που παρακάμπτει αυτό το πρόβλημα των εξωτερικών δειγμάτων είναι η χρήση των μέσων τιμών ανά μήνα. Στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών της κάθε παραμέτρου του σπερμοδιαγράμματος και στη συνέχεια οι τιμές αυτές συγκρίνονται με τις μέσες τιμές των ίδιων παραμέτρων άλλων μηνών. Οι τιμές και πάλι μπορούν να αναρτηθούν και έτσι να προσδιοριστούν πιθανές τυχαίες ή συστηματικές μεταβολές από το μέσον όρο. Με αυτόν τον τρόπο, ο έλεγχος ενσωματώνεται στις καθημερινές δραστηριότητες του εργαστηρίου και αντικατοπτρίζει τις καθημερινές εργαστηριακές τακτικές χωρίς να φαίνεται ως ένα εξωτερικό ξένο προς το εργαστήριο γεγονός, ενώ παράλληλα δημιουργεί ένα κλίμα «ποιότητας» στους τεχνολόγους του εργαστηρίου χωρίς την αίσθηση του ελέγχου. Η χρήση των μέσων τιμών ανά μήνα αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη για τον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο στο ανδρολογικό εργαστήριο.<sup>17,42,43</sup>

Σε οποιοδήποτε εργαστήριο γίνονται σπερμοδιαγράμματα από διαφορετικά άτομα, πρέπει να υπάρχει συμφωνία ανάμεσα στις μετρήσεις τους. Από το 1971, ο Eliasson τόνισε ότι είναι αναγκαίο να συγκρίνονται οι μετρήσεις της ίδιας παραμέτρου από διαφορετικούς τεχνολόγους,<sup>44</sup> ενώ το ίδιο επισημάνθηκε αργότερα και από άλλους ερευνητές.<sup>20,42</sup> Με

τη σύγκριση των τιμών μεταξύ διαφορετικών τεχνολόγων μπορεί να διαπιστωθεί εάν κάποιος δίνει συστηματικά χαμηλότερες ή υψηλότερες τιμές σε σχέση με άλλους.<sup>20</sup> Με τον ίδιο τρόπο αξιολογείται και η διαφορά, που σχεδόν πάντοτε υπάρχει ανάμεσα σε έναν παλιό και έμπειρο βιολόγο σε σχέση με ένα νέο άτομο.<sup>45</sup> Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί εδώ η εμπειρία των Knuth et al, που έδειξαν ότι ο τρόπος μέτρησης του όγκου του δείγματος από ένα νέο τεχνολόγο επηρέαζε την κινητικότητα!<sup>43</sup>

Στον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο ελέγχονται και οι τρεις σημαντικές παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος, δηλαδή ο τρόπος μέτρησης του αριθμού, η εκτίμηση της κινητικότητας και της μορφολογίας. Σε καθεμιά από αυτές τις μετρήσεις πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη όλες οι εργαστηριακές λεπτομέρειες που μπορούν να καθορίσουν το αποτέλεσμα.

Συνεπώς, για τη μέτρηση του αριθμού πρέπει να γίνει έλεγχος όλων των σταδίων που εμπλέκονται σε αυτή.<sup>46</sup> Είναι αναγκαίο να ελέγχεται η αραιώση και το «φόρτωμα» της πλάκας μέτρησης, δεδομένου ότι, όπως έδειξε από το 1989 ο Dunphy, τόσο η αραιώση του αρχικού δείγματος όσο και το στρώσιμο και το διάβασμα της πλάκας Newbauer συνεισφέρουν στο τελικό αποτέλεσμα.<sup>20</sup> Ο τεχνολόγος που θα μετρήσει τα σπερματοζωάρια της πλάκας επηρεάζει επίσης το αποτέλεσμα και γι' αυτό στη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων από τον ίδιο τεχνολόγο έχει αναφερθεί διακύμανση στο CV διαφορετικών μετρήσεων από 3,9–28%.<sup>13,17,21,45,47</sup> Γίνεται λοιπόν προφανές ότι σημαντική διακύμανση των τιμών μπορούν να προκαλέσουν όχι μόνο η επιλογή και η χρήση της πλάκας μέτρησης, αλλά και η εμπειρία του τεχνολόγου στη συγκεκριμένη μέτρηση.

Για την εκτίμηση της κινητικότητας έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν δείγματα που είχαν συντηρηθεί σε κατάψυξη υγρού αζώτου για να διατηρούν την κινητικότητά τους. Για το σκοπό αυτόν, ένας αριθμός δειγμάτων είχε καταψυχθεί αφού χωρίστηκε σε μικρότερα τμήματα (aliquots) και σε κάθε ημέρα εσωτερικού ελέγχου γινόταν απόψυξη ενός τμήματος. Με αυτή τη μέθοδο αναφέρθηκαν πολύ υψηλές τιμές διακύμανσης για την κινητικότητα, με CV που έφθανε το 26%.<sup>45</sup> Λόγω του μεγάλου εύρους στην κινητικότητα που παρουσίαζαν τα καταψυγμένα δείγματα αυτός ο τρόπος αξιολόγησης της κινητικότητας στο πλαίσιο του ποιοτικού ελέγχου δεν συνιστάται πλέον<sup>48</sup> και έχει καταργηθεί.<sup>17</sup> Η κινητικότητα μετράται σήμερα σε video κινούμενων σπερματοζωαρίων, ενώ το εύρος του CV κυμαίνεται από 4,1–38%.<sup>13,17,21,47</sup> Σε αντιδιαστολή με τους άλλους συγγραφείς, οι Brazil et al αναφέρουν πολύ χαμηλό ποσοστό CV, ίσο με 5%, γιατί στις περισσότερες μελέτες η κινητικότητα είχε μετρηθεί ως σύνολο κινούμενων σπερματοζωαρίων,

χωρίς να κατατάσσεται σε ξεχωριστές κατηγορίες, δηλαδή σε ζωηρή και σε νωθρή προωθητική κίνηση.<sup>13</sup> Και σε αυτή την παράμετρο, καθοριστικό ρόλο παίζει το πόσο έμπειρος είναι ο τεχνολόγος που διενεργεί τη μέτρηση.<sup>45</sup>

Για την αξιολόγηση της μορφολογίας, η διαδικασία του ποιοτικού ελέγχου είναι πιο απλή, γιατί τα βαμμένα πλακάκια διατηρούνται κι έτσι είναι εύκολο να ξαναδιαβαστούν. Η αξιολόγηση της μορφολογίας γίνεται τόσο στις μετρήσεις που πραγματοποιούνται με το μάτι, όσο και στις μετρήσεις με τη χρήση του αυτόματου αναλυτή σπέρματος.<sup>17,49</sup> Συσχετίσεις ανάμεσα στους δύο αυτούς τρόπους έχουν δημοσιευτεί.<sup>50</sup> Διαφορετικές τιμές που αντικατοπτρίζουν τη διακύμανση στην εκτίμηση της μορφολογίας αναφέρονται στη βιβλιογραφία,<sup>42,51,52</sup> όπως για παράδειγμα από τους Coetzee et al, που αναφέρουν τιμές του συντελεστή διακύμανσης 11% και 16% για δύο διαφορετικά εργαστήρια.<sup>49</sup> Η εκτίμηση αυτής της παραμέτρου είναι τελείως υποκειμενική και έχει ήδη καταγραφεί αλλαγή στο ποσοστό των φυσιολογικών μορφών, όταν άλλαξε το προσωπικό, όπως αντικατοπτρίζεται από τις αλλαγές των μέσων μηνιαίων τιμών του εργαστηρίου.<sup>42,43</sup>

Πάντοτε σε χαμηλά ποσοστά φυσιολογικής μορφολογίας, η διακύμανση είναι μεγαλύτερη.<sup>42</sup> Με το πέρασμα των ετών, ο εσωτερικός έλεγχος έδειξε επίσης μια πτώση στο ποσοστό των φυσιολογικών μορφών, που δεν σχετιζόταν με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων στο δείγμα αλλά ούτε και με την ηλικία των εξεταζομένων.<sup>42</sup> Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει την αλλαγή στον τρόπο αξιολόγησης της μορφολογίας, λόγω της εισαγωγής των αυστηρών κριτηρίων. Με παρόμοιο τρόπο αξιολογείται και η εκτίμηση της ζωτικότητας, η οποία, λόγω της απλότητας της μεθόδου, παρουσιάζει μικρότερη διακύμανση.<sup>45</sup>

#### **4. Ο ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ**

Μετά τον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο πρέπει να συγκρίνει κάποιος τα αποτελέσματα ενός συγκεκριμένου δείγματος σπέρματος με τη μέτρηση του ίδιου δείγματος από άλλα εργαστήρια, δηλαδή να συμμετάσχει σε ένα σύστημα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου. Οι παράμετροι, που συνήθως ελέγχονται, περιλαμβάνουν τον αριθμό, την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων, αν και έχουν αναφερθεί και συσχετίσεις ελέγχου μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων για τη ζωτικότητα και τον προσδιορισμό αντισπερματικών αντισωμάτων στο δείγμα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι τεχνολόγοι από τα συμμετέχοντα εργαστήρια συναντήθηκαν σε ένα εργαστήριο, για να μετρήσουν τα ίδια δείγματα και να συγκρίνουν τα

εργαστηριακά τους αποτελέσματα.<sup>19,45,53</sup> Με τον τρόπο αυτόν μπορεί κάποιος να δουλέψει το δείγμα νωπό και να κάνει άμεσα συγκρίσεις. Συνήθως, όμως, τα συστήματα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου περιλαμβάνουν έναν αριθμό δειγμάτων σπέρματος, που χωρίζεται σε μικρότερα τμήματα σε κάποιο κεντρικό εργαστήριο-φορέα και αποστέλλονται στα ενδιαφερόμενα εργαστήρια.<sup>21,47,54-56</sup> Οι Jorgensen et al χρησιμοποίησαν και τους δύο τρόπους εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου.<sup>53</sup>

Για τη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων στο δείγμα του σπέρματος προστίθεται συντηρητικό και αργότερα αποστέλλεται στα συμμετέχοντα εργαστήρια. Εκτός από το αρχικό δείγμα, στέλνονται και προ-αραιωμένα δείγματα. Γενικά, οι μετρήσεις της συγκέντρωσης πρέπει να πραγματοποιούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα, γιατί μετά από λίγο τα σπερματοζωάρια θα δημιουργήσουν συσσωματώματα, που θα τις καταστήσουν αναξιόπιστες. Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων ανάμεσα σε 4 εργαστήρια, οι Brazil et al είχαν χαμηλό συντελεστή διακύμανσης, τόσο με τη χρήση της πλάκας Microcell, όσο και με την πλάκα Newbauer (CV 4,8% και CV 7,9%, αντίστοιχα).<sup>13</sup> Οι Auger et al, για τις μετρήσεις συγκέντρωσης σπερματοζωαρίων ανάμεσα σε 12 διαφορετικά εργαστήρια, αναφέρουν συντελεστή διακύμανσης 22,9%,<sup>45</sup> ενώ οι Toft et al 27%.<sup>57</sup> Άλλες μελέτες, στις οποίες συμμετέχουν πολλά εργαστήρια, για τη μέτρηση του αριθμού, καταγράφουν πολύ υψηλές τιμές του συντελεστή διακύμανσης, που φθάνουν και το 138%.<sup>21,47,58</sup> Αν και γενικά η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων είναι δύσκολο να μετρηθεί με ακρίβεια, η εκπαίδευση του προσωπικού μπορεί να βελτιώσει πολύ τα αποτελέσματα και, όπως αναφέρθηκε ήδη από τους Toft et al, στο εργαστήριό τους ο συντελεστής διακύμανσης μειώθηκε από το 27% στο 8%.<sup>57</sup>

Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων κινητικότητας, αρχικά είχε προταθεί η λύση του καταψυγμένου δείγματος, το οποίο αποψυχόταν στα εργαστήρια τη στιγμή της μέτρησης και έτσι διατηρούσε τη βιωσιμότητά του.<sup>21,54</sup> Ωστόσο, η μεταφορά των δειγμάτων στο υγρό άζωτο είναι δαπανηρή και έτσι θα ήταν δύσκολο να συμμετέχουν σε αυτό το σύστημα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου πολλά εργαστήρια.<sup>55</sup> Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν ότι οι τιμές ανάμεσα σε διαφορετικά τμήματα του ίδιου δείγματος παρουσίαζαν διακύμανση.<sup>17,42,59</sup> Κατά συνέπεια, η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου έπαψε να συνιστάται για την εκτίμηση της κινητικότητας στο πλαίσιο του εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου και καθιερώθηκε η χρήση των ταινιών video, που μπορούν να διανεμηθούν με χαμηλό κόστος, όπως είχε προταθεί από τον Davis.<sup>60</sup> Είναι δύσκολο να υπάρξει ομοφωνία μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων όσον αφορά στη μέτρηση της κινητικότητας<sup>53</sup> και οι αναφε-

ρόμενες τιμές για το συντελεστή διακύμανσης ποικίλλουν: 21,8% από τους Auger et al,<sup>45</sup> 21% από τους Neuwinger et al<sup>21</sup> και 16% από τους Toft et al.<sup>57</sup> Καλύτερη συσχέτιση στην κινητικότητα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων μπορεί να επιτευχθεί, εάν αναφερθεί μαζί η ζωηρή με τη νωθρή κινητικότητα. Έτσι, αναφέρονται τρεις κατηγορίες κινητικότητας και όχι τέσσερις, όπως προσδιορίζει ο ΠΟΥ, ενώ η μέτρηση καθίσταται ευκολότερη, με μικρότερους συντελεστές διακύμανσης.<sup>55,61</sup>

Για την εκτίμηση της μορφολογίας, στο πλαίσιο του εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου το κεντρικό εργαστήριο αναφοράς ετοιμάζει τα δείγματα εφαρμόζοντας την επίσρωση και τη μονιμοποίηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αποστέλλει στα συμμετέχοντα εργαστήρια δύο κατηγορίες αντικειμενοφόρων πλακών: μια κατηγορία στην οποία το εργαστήριο πρέπει να κάνει τη χρώση και μια άλλη με προβαμμένα δείγματα, στην οποία το εργαστήριο πρέπει να κάνει μόνο την εκτίμηση στο μικροσκόπιο. Οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης για τη μορφολογία ποικίλλουν επίσης στη βιβλιογραφία.<sup>47,53,58,62</sup> Οι Barros et al ανέφεραν σύγκριση των τιμών της μορφολογίας μεταξύ δύο διαφορετικών εργαστηρίων και εξέτασαν την επίδραση που έχει στη μέτρηση η επίσρωση σπερματοζωαρίων μετά από έκπλυση του σπερματικού πλάσματος.<sup>50</sup>

Για την παράμετρο της μορφολογίας έχει ήδη αναφερθεί στον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο μεγαλύτερη μεταβλητότητα στο συντελεστή διακύμανσης σε σχέση με τις υπόλοιπες παραμέτρους.<sup>63</sup> Κατά συνέπεια, και εδώ η συνεχιζόμενη εκπαίδευση έχει ιδιαίτερη σημασία. Οι Franken et al, σε εννέα εργαστήρια αρχικά<sup>64</sup> και κατόπιν σε 20,<sup>65</sup> παρατήρησαν βελτίωση των αποτελεσμάτων μετά από εκπαίδευση των τεχνολόγων για 3–6 μήνες, ενώ και οι Cooper et al παρατήρησαν βελτίωση των αποτελεσμάτων.<sup>55</sup> Όπως αναφέρθηκε και στη μέτρηση του αριθμού, τα χαμηλά ποσοστά φυσιολογικής μορφολογίας παρουσιάζουν και μεγαλύτερη διακύμανση.<sup>62</sup>

Τα τελευταία χρόνια, σε αρκετές μελέτες έχει αναφερθεί πτώση των τιμών των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος. Είναι όμως αυτό ένα πραγματικό γεγονός ή οι αλλαγές των παραμέτρων εξ αιτίας έλλειψης ποιοτικού ελέγχου εξάγουν παραπλανητικά αποτελέσματα; Απάντηση σε αυτή την ερώτηση έδωσαν οι Jorgensen et al, οι οποίοι μετά από εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο των συμμετεχόντων εργαστηρίων κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις του αριθμού των σπερματοζωαρίων παρουσιάζουν ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των εργαστηρίων, ενώ, αντίθετα, προσοχή απαιτείται στην εκτίμηση της κινητικότητας και της μορφολογίας.<sup>53</sup> Όταν λοιπόν τα εργαστήρια έχουν εσωτερικό και εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο, τότε οι διαφορές στις τιμές

του σπερμοδιαγράμματος, είτε ανάμεσα σε διαφορετικές χώρες, είτε στο χρόνο, μπορούν να αξιολογηθούν.<sup>9</sup>

Αυτή τη στιγμή υπάρχουν συστήματα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου στα οποία μπορεί να συμμετάσχει ένα ανδρολογικό εργαστήριο. Το SIGA-ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology, Ευρωπαϊκή Εταιρεία για την Ανθρώπινη Αναπαραγωγή και Εμβρυολογία) έχει δημιουργήσει ένα τέτοιο σύστημα, στο οποίο συμμετέχουν εργαστήρια από όλο τον κόσμο. Οι μετρούμενες παράμετροι είναι ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα, η ζωτικότητα και η μορφολογία τους, ενώ η εμπειρία έδειξε ότι η συμμετοχή σε ένα τέτοιο σύστημα ποιοτικού ελέγχου συνεπάγεται βελτίωση της ποιότητας των αποτελεσμάτων.

## 5. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

Σκοπός του ποιοτικού ελέγχου του εργαστηρίου είναι η εξασφάλιση της αξιοπιστίας των μετρήσεων, παρέχοντας αποτελέσματα με υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Από το 1983, οι Chong et al χαρακτήρισαν το σπερμοδιαγράμμα ως «παραμελημένη» εξέταση<sup>66</sup> και γι' αυτό ίσως οι Hargreave και Elton αναρωτιούνται αν υπάρχει χρησιμότητα στην εξέταση του σπέρματος.<sup>67</sup> Ωστόσο, σήμερα πλέον υπάρχει ανάγκη για «περισσότερη ανδρολογία» στην αντιμετώπιση της υπογονιμότητας ενός ζευγαριού και αυτό αυτόματα υπαγορεύει την ανάγκη για άριστης ποιότητας εργαστηριακό αποτέλεσμα.<sup>68</sup> Μόνο το σωστό αποτέλεσμα θα βοηθήσει τον κλινικό ιατρό, ώστε να καταλήξει στη σωστή διάγνωση και να αποφασίσει για την κατάλληλη θεραπεία.<sup>69</sup> Η έκδοση των εγχειριδίων από τον ΠΟΥ έχει βοηθήσει πολύ στη βελτίωση των μεθόδων ανάλυσης του σπέρματος, προτείνοντας συγκεκριμένες μεθόδους και τρόπους για τον προσδιορισμό των διαφόρων εργαστηριακών παραμέτρων. Αυτό από μόνο του θα έπρεπε να είχε καταστήσει τα αποτελέσματα σπέρματος μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων συγκρίσιμα. Ωστόσο, όπως έδειξαν οι Riddell et al, δεν χρησιμοποιούν όλα τα εργαστήρια τις οδηγίες του ΠΟΥ, γεγονός που εξηγεί σε ένα ποσοστό τις διαφορές που παρατηρούνται.<sup>70</sup> Πρόσφατη εργασία, που είχε συμπεριλάβει 118 εργαστήρια, έδειξε ότι η ίδια εικόνα υπάρχει ακόμη και σήμερα.<sup>71</sup>

Στην Αμερική υπάρχουν νόμοι που καθορίζουν τη σωστή λειτουργία των εργαστηρίων, τα οποία εμπλέκονται στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.<sup>72,73</sup> Ήδη, πολλές χώρες στην Ευρώπη έχουν προχωρήσει στη δημιουργία συστημάτων ποιοτικού ελέγχου των ανδρολογικών εργαστηρίων.<sup>63</sup> Διαφορετικά συστήματα ποιοτικού ελέγχου παρουσιάζουν διαφορές, που οφείλονται στην υποκειμενι-

κότητα των μετρήσεων.<sup>74</sup> Έχει ήδη αναφερθεί εκτεταμένα η εξαιρετικά μεγάλη σημασία του συστήματος εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου,<sup>75,76</sup> όχι μόνο γιατί διατηρεί τις τιμές των εργαστηριακών μετρήσεων εντός αποδεκτών ορίων, αλλά και γιατί δημιουργεί στους εργαζόμενους του εργαστηρίου μια «ατμόσφαιρα ποιότητας». Αυτό έχει επίσης ως αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της συνεργασίας ανάμεσα στους τεχνολόγους διαφορετικών εργαστηρίων, με σκοπό την καλύτερη ποιότητα των παρεχομένων υπηρεσιών. Τα υπάρχοντα συστήματα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου δεν έχουν ρόλο ελεγκτικού οργάνου, αλλά, αντίθετα, παρέχουν συμβουλές για τη βελτίωση της ποιότητας, σε περιπτώσεις που τις ζητήσει το εργαστήριο.

Στη βάση του εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου βρίσκονται δύο στοιχεία: (α) Ο εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος, η σημασία του οποίου τονίστηκε παραπάνω, αποτελεί το αναγκαίο πρώτο στάδιο για την προετοιμασία του εργαστηρίου αναφορικά με τη συμμετοχή του στον εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο. Έχοντας ξεπεράσει μικροπροβλήματα από ακατάλληλα υλικά, μηχανήματα ή συνθήκες, το εργαστήριο στη συνέχεια μπορεί να συγκριθεί με άλλα εργαστήρια και (β) η συνεχιζόμενη εκπαίδευση. Η ESHRE έχει οργανώσει σεμινάρια με θέμα τη βασική εξέταση σπέρματος, ενώ η βελτίωση στην αξιολόγηση των παραμέτρων από τους συμμετέχοντες ήταν άμεση.<sup>77</sup> Ο Auger μελέτησε την επίδραση της διάρκειας της εκπαίδευσης των τεχνικών στις τιμές του σπερμοδιαγράμματος. Χώρισε τους τεχνικούς σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη διάρκεια της εκπαίδευσής τους: Στην πρώτη κατηγορία συμπεριελήφθησαν άτομα με καθημερινή ενασχόληση με το δείγμα του σπέρματος για διάστημα τουλάχιστον 3 χρόνων, ενώ στη δεύτερη άτομα με ελάχιστη εκπαίδευση. Η διαφορά στις τιμές του CV ήταν ενδεικτικές της σημασίας που έχει η διάρκεια της

εκπαίδευσης. π.χ. στη συγκέντρωση, η πρώτη ομάδα είχε CV 9,8% ενώ η δεύτερη ομάδα CV 28%.<sup>45</sup>

Δεν αρκεί όμως μόνο η αρχική εκπαίδευση. Πολλές ομάδες έδειξαν τα οφέλη από την οργάνωση σεμιναρίων και τη συνεχιζόμενη εκπαίδευση και στο θέμα της Εργαστηριακής Ανδρολογίας.<sup>57,78</sup> Τα σεμινάρια αυτά οργανώνονται σε ένα κεντρικό εργαστήριο και εκεί οι μετρήσεις γίνονται σε νωπό δείγμα σπέρματος, όπως ακριβώς και στη ρουτίνα. Αυτό αποτελεί μια ουσιαστική διαφορά με τις μετρήσεις του εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου, ειδικά στο θέμα της κινητικότητας, όπου η κινητικότητα αξιολογείται μέσω οθόνης video. Τα χαμηλά ποσοστά στις τιμές του συντελεστή συσχέτισης των διαφόρων παραμέτρων αποτελούν την καλύτερη απόδειξη. Οι Toft et al αναφέρουν πτώση στο συντελεστή συσχέτισης από 27% στο 17% στη μέτρηση της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων μεταξύ διαφορετικών κέντρων. Η μείωση αυτή ήταν αποτέλεσμα της συνεχιζόμενης εκπαίδευσης των τεχνολόγων με τα σεμινάρια. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Franken et al, οργανώνοντας σεμινάριο για την παράμετρο της μορφολογίας σε εργαστήριο αναφοράς με συμμετοχή 20 εργαστηρίων. Η βελτίωση ήταν εντυπωσιακή, όχι μόνο μετά από την αρχική εκπαίδευση αλλά και μετά τα σεμινάρια σε διαστήματα 3 και 6 μηνών.<sup>65</sup>

Το επιστέγασμα βέβαια όλης της προσπάθειας του ποιοτικού ελέγχου είναι η διασφάλιση της ποιότητας (quality assurance, QA), με βάση την οποία αξιολογείται ολόκληρη η λειτουργία του εργαστηρίου,<sup>75</sup> ώστε να παρέχει άριστη εξυπηρέτηση στον ασθενή. Αυτό αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στην αντιμετώπιση της υπογονιμότητας του ζευγαριού, τόσο διαγνωστικά όσο και θεραπευτικά, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για την επίτευξη του καλύτερου αποτελέσματος με το μικρότερο κόστος και τη μεγαλύτερη ασφάλεια.

## ABSTRACT

### Quality control of semen analysis

T. ZEGINIADOU,<sup>1</sup> I. VAKALOPOULOS,<sup>1</sup> D. RADOPOULOS,<sup>1</sup> N. SOFIKITIS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>First Department of Urology, "G. Gennimatas" Hospital of Thessaloniki, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, <sup>2</sup>Department of Urology, University of Ioannina, Ioannina, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2011, 28( ):1-11*

Semen analysis is the first step in evaluation of the infertile man. The evaluation of semen parameters is subjective and the quality of the results depends on the method used and the accuracy of the procedure. The semen analysis results on the same sample can vary considerably between different andrological laboratories. A major reason for this variability is the absence of quality control procedures among the various different laboratories. To avoid such discrepancies an andrological laboratory should firstly establish internal quality control procedures, followed by participation in an external quality control scheme. Quality assurance is at the top of the quality control methods. For



internal quality control each technician first tests him- or herself in examining all three parameters of semen analysis, which are sperm concentration, sperm motility and sperm morphology. The values of the semen parameters are acceptable only when their variation falls within a narrow range. In busy laboratories, where semen analysis is carried out by several different technicians, internal quality control between all the technicians is a necessary procedure, in order to ensure the accuracy and reproducibility of the findings. In other words, the results should be independent of the person carrying out the analysis. The andrology laboratory should then participate in an external quality control scheme. The same semen sample is tested by different laboratories and their results are compared; the variation between the laboratories should fall within a narrow range. This ensures that values between different laboratories are comparable. In addition to internal and external quality control is quality assurance, which ensures the best service to the patient and makes sure that treatment of subfertility is accomplished with maximum safety and minimum cost.

**Key words:** External quality control, Internal quality control, Male subfertility, Quality assurance, Semen analysis

## Βιβλιογραφία

- VAN DEN EEDE B. Investigation and treatment of infertile couples: ESHRE guidelines for good clinical and laboratory practice. European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 1995, 10:1246–1271
- GUZICK DS, OVERSTREET JW, FACTOR-LITVAK P, BRAZIL CK, NAKAJIMA ST, COUTIFARIS C ET AL. Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001, 345:1388–1393
- WEBER RF, DOHLE GR, ROMIJN JC. Clinical laboratory evaluation of male subfertility. *Adv Clin Chem* 2005, 40:317–364
- CANALE D, CAIETTI L. Infertile male patients are patients, not numbers. *Hum Reprod* 1996, 11:2807
- ALVAREZ C, CASTILLA JA, MARTINEZ L, RAMIREZ JP, VERGARA F, GAFORIO JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod* 2003, 18:2082–2088
- OSHIO S, ASHIZAWA Y, YOTSUKURA M, TOHYAMA Y, IWABUCHI M, ADACHI Y ET AL. Individual variation in semen parameters of healthy young volunteers. *Arch Androl* 2004, 50:417–425
- LICHT RS, HANDEL L, SIGMAN M. Site of semen collection and its effect on semen analysis parameters. *Fertil Steril* 2008, 89:395–397
- ELZANATY S, MALM J. Comparison of semen parameters in samples collected by masturbation at a clinic and at home. *Fertil Steril* 2008, 89:1718–1722
- JØRGENSEN N, ANDERSEN AG, EUSTACHE F, IRVINE DS, SUOMINEN J, PETERSEN JH ET AL. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001, 16:1012–1019
- AUGER J, EUSTACHE F, ANDERSEN AG, IRVINE DS, JØRGENSEN N, SKAKKEBAEK NE ET AL. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001, 16:2710–2717
- DAVIS RO, GRAVANCE CG. Standardization of semen preparation, staining and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil Steril* 1993, 59:412–417
- BOONE WR, JONES JM, SHAPIRO SS. Using videotaped specimens to test quality control in a computer-assisted semen analysis system. *Fertil Steril* 2000, 73:636–640
- BRAZIL C, SWAN SH, DROBNIS EZ, LIU F, WANG C, REDMOND JB ET AL. Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004, 25:635–644
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1999
- COOPERTG, NOONAN E, VON ECKARDESTEIN S, AUGER J, BAKER HW, BEHRE HM ET AL. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010, 16:231–245
- HANDELSMAN DJ, COOPERTG. Forward to semen analysis in 21st century medicine special issue in Asian Journal of Andrology. *Asian J Androl* 2010, 12:7–10
- CLEMENTS S, COOKE ID, BARRAT CL. Implementing comprehensive quality control in the andrology laboratory. *Hum Reprod* 1995, 10:2096–2106
- MORTIMER D. Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reprod Med Rev* 1994, 3:97–111
- JEQUIER AM, UKOMBE EB. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol* 1983, 55:434–436
- DUNPHY BC, KAY R, BARRATT CL, COOKE ID. Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl* 1989, 10:378–385
- NEUWINGER J, BEHRE HM, NIESCHLAG E. External quality control in the andrology laboratory: An experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990, 54:308–314
- FERRARA F, DAVERIO R, MAZZINI G, BONINI P, BANFI G. Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. *Clin Chem* 1997, 43:801–807
- HACKER-KLOM UB, GÖHDEW, NIESCHLAG E, BEHRE HM. DNA flow cytometry of human semen. *Hum Reprod* 1999, 14:2506–2512
- WEISSENBERG R, AVIRAM A, GOLAN R, LEWIN LM, LEVRON J, MADGAR I ET AL. Concurrent use of flow cytometry and fluorescence *in-situ* hybridization techniques for detecting faulty meiosis in a human sperm sample. *Mol Hum Reprod* 1998, 4:61–66
- GINSBURG KA, ARMANT DR. The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and move-

- ment measurements obtained by manual and video microscopic analysis. *Fertil Steril* 1990, 53:882–887
26. NIEDERBERGER C. Semen analysis: Are 2 counts truly better than 1? *J Androl* 2004, 25:19–21
  27. COMHAIRE FH, HUYSSSE S, HINTING A, VERMEULEN L, SCHOONJANS F. Objective semen analysis: Has the target been reached? *Hum Reprod* 1992, 7:237–241
  28. KNUTH UA, YEUNG CH, NIESCHLAG E. Computerized semen analysis: Objective measurement of semen characteristics is biased by subjective parameter setting. *Fertil Steril* 1987, 48:118–124
  29. MORTIMER D, GOEL N, SHU MA. Evaluation of the CellSoft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. *Fertil Steril* 1988, 50:960–968
  30. PETERS AJ, ZANEVELD LJ, JEYENDRAN RS. Quality assurance for sperm concentration using latex beads. *Fertil Steril* 1993, 60:702–705
  31. SEAMAN EK, GOLUBOFF E, BARCHAMA N, FISCH H. Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertil Steril* 1996, 66:662–665
  32. HALANGK W, BOHNENSACK R. Quantification of sperm motility by a turbidimetric assay. Correlation to cellular respiration. *Biomed Biochim Acta* 1986, 45:331–341
  33. OLIVA A, SANTILÁN MG, CAILLE A, MUNUCE MJ. Sperm motility analysis using multi-exposure photography (MEP): Validity of the method with normal and abnormal patterns. *Andrologia* 1993, 25:189–193
  34. MORTIMER D, SHU MA, TAN R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Hum Reprod* 1986, 1:299–303
  35. YEUNG CH, COOPER TG, NIESCHLAG E. A technique for the standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis. *Fertil Steril* 1997, 67:1156–1158
  36. DAM AH, FEENSTRA I, WESTPHAL JR, RAMOS L, VAN GOLDE RJ, KREMER JA. Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update* 2007, 13:63–75
  37. MORTIMER D, MENKVELT R. Sperm morphology assessment—historical perspectives and current opinions. *J Androl* 2001, 22:192–205
  38. BOYD JC. Defining laboratory reference values and decision limits: Populations, intervals, and interpretations. *Asian J Androl* 2010, 12:83–90
  39. GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH BL, HAUGLAND RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* 1994, 15:620–629
  40. BJÖRNDAHL L, SÖDERLUND I, JOHANSSON S, MOHAMMADIEH M, POURIAN MR, KVIST U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *J Androl* 2004, 25:671–678
  41. CASTILLA JA, MORANCHO-ZARAGOZA J, AGUILAR J, PRATS-GIMENEZ R, GONZALVO MC, FERNÁNDEZ-PARDO E ET AL. Quality specifications for seminal parameters based on the state of the art. *Hum Reprod* 2005, 20:2573–2578
  42. COOPER TG, NEUWINGER J, BAHRS S, NIESCHLAG E. Internal quality control of semen analysis. *Fertil Steril* 1992, 58:172–178
  43. KNUTH UA, NEUWINGER J, NIESCHLAG E. Bias of routine semen analysis by uncontrolled changes in laboratory environment—detection by long-term sampling of monthly means for quality control. *Int J Androl* 1989, 12:375–383
  44. ELIASSON R. Standards for investigation of human semen. *Andrologie* 1971, 3:49–64
  45. AUGER J, EUSTACHE F, DUCOT B, BLANDINT, DAUDIN M, DIAZ I ET AL. 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
  46. BJÖRNDAHL L, BARRAT CL. Semen analysis: Setting standards for the measurement of semen numbers. *J Androl* 2005, 26:11
  47. MATSON PL. External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: Results of a pilot scheme. *Hum Reprod* 1995, 10:620–625
  48. JOHNSON JE, BLACKHURT DW, BOONE WR. Can Westgard quality control rules determine the suitability of frozen sperm pellets as a control material for computer assisted semen analyzers? *J Assist Reprod Genet* 2003, 20:38–45
  49. COETZEE K, KRUGER TF, LOMBARD CJ, SHAUGHNESSY D, OEHNINGER S, OZGÜR K ET AL. Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton-Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertil Steril* 1999, 71:80–84
  50. BARROSO G, MERCAN R, OZGÜR K, MORSHEDI M, KOLM P, COETZEE 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. *Hum Reprod* 1999, 14:2036–2040
  51. GRAVES JE, HIGDON HL 3rd, BOONE WR, BLACKHURST DW. Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory. *J Assist Reprod Genet* 2005, 22:219–225
  52. FRANKEN DR, KRUGER TF. Lessons learned from a sperm morphology quality control program. *Andrologia* 2006, 38:225–229
  53. JØRGENSEN N, AUGER J, GIWERCMAN A, IRVINE DS, JENSEN TK, JOUANNET P ET AL. Semen analysis performed by different laboratory teams: An intervariation study. *Int J Androl* 1997, 20:201–208
  54. WALKER RH. Pilot survey for proficiency testing of semen analysis. *Arch Pathol Lab Med* 1992, 116:423–424
  55. COOPER TG, ATKINSON AD, NIESCHLAG E. Experience with external quality control in spermatology. *Hum Reprod* 1999, 14:765–769
  56. GANDINI L, MENDITTO A, CHIODO F, LENZI A. From the European Academy of Andrology. Italian pilot study for an external quality control scheme in semen analysis and antisperm antibodies detection. *Int J Androl* 2000, 23:1–3
  57. TOFT G, RIGNELL-HYDBOM A, TYRKIEL E, SHVETS M, GIWERCMAN A. Quality control workshops in standardization of sperm concentration and motility assessment in multicentre studies. *Int J Androl* 2005, 28:144–149
  58. 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
  59. MULLER CH. The andrology laboratory in an Assisted Reproductive Technologies program. Quality assurance and laboratory methodology. *J Androl* 1992, 13:349–360

60. DAVIS RO, ROTHMANN SA, OVERSTREET JW. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril* 1992, 57:648–653
61. BRAZIL C, SWAN SH, TOLLNER CR, TREECE C, DROBNIS EZ, WANG C ET AL. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004, 25:645–656
62. OMBELET W, BOSMANS E, JANSSEN M, COX A, MAES M, PUNJABI U ET AL. Multicenter study on reproducibility of sperm morphology assessments. *Arch Androl* 1998, 41:103–114
63. ALVAREZ C, CASTILLA JA, RAMÍREZ JP, VERGARA F, YOLDI A, FERNÁNDEZ A ET AL. External quality control program for semen analysis: Spanish experience. *J Assist Reprod Genet* 2005, 22:379–387
64. FRANKEN DR, BARENSEN R, KRUGER TF. A continuous quality control program for strict sperm morphology. *Fertil Steril* 2000, 74:721–724
65. FRANKEN DR, SMITH M, MENKVELD R, KRUGER TF, SEKADDE-KIGONDU C, MBIZVO M ET AL. The development of a continuous quality control programme for strict sperm morphology among sub-Saharan African laboratories. *Hum Reprod* 2000, 15:667–671
66. CHONG AP, WALTERS CA, WEINRIEB SA. The neglected laboratory test. The semen analysis. *J Androl* 1983, 4:280–282
67. HARGREAVE TB, ELTON RA. Is conventional sperm analysis of any use? *Br J Urol* 1983, 55:774–779
68. CUMMINS J, JEQUIER AM. Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. *Hum Reprod* 1994, 9:1214–1219
69. COMHAIRE F. Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Guidelines for diagnosis and therapy. *Hum Reprod* 1995, 10:1949–1950
70. RIDDELL D, PACEY A, WHITTINGTON K. Lack of compliance by UK andrology laboratories with World Health Organization recommendations for sperm morphology assessment. *Hum Reprod* 2005, 20:3441–3445
71. LU JC, ZHANG HY, HU YA, HUANG YF, LÜ NQ. A survey on the status of semen analysis in 118 laboratories in China. *Asian J Androl* 2010, 12:104–110
72. GERRITY M. Legislative efforts affecting the reproductive biology laboratory. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1993, 5:623–629
73. KEEL BA. The assisted reproductive technology laboratories and regulatory agencies. *Infert Reprod Med Clin North Am* 1998, 9:311–330
74. COOPERTG, BJÖRNDAHL L, VREEBURG J, NIESCHLAG E. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int J Androl* 2002, 25:306–311
75. KEEL BA. Quality control, quality assurance, and proficiency testing in the andrology laboratory. *Arch Androl* 2002, 48:417–431
76. KEEL BA. How reliable are results from the semen analysis? *Fertil Steril* 2004, 82:41–44
77. BJÖRNDAHL L, BARRAT CL, FRASER LR, KVIST U, MORTIMER D. ESHRE basic semen analysis courses 1995–1999: Immediate beneficial effects of standardized training. *Hum Reprod* 2002, 17:1299–1305
78. FRANKEN DR. African experience with sperm morphology training courses. *Reprod Biomed Online* 2003, 7:114–119
79. BYRD W. Quality assurance in the reproductive biology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 1992, 116:418–422

Corresponding author:

I. Vakalopoulos, 81A Egnatia street, GR-546 35 Thessaloniki, Greece  
e-mail: vakalj@otenet.gr

---

## ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ:

Κεφάλαιο 2.1., 3η παράγραφος. Η βιβλιογραφία Νο 26 δεν αναφέρεται στον ίδιο συγγραφέα με την αντίστοιχη του καταλόγου βιβλιογραφίας

.....