Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Marco A. Pizzolato

Estudio del semen humano: implementación de un método objetivo*

Study of human semen: implementation of an objective method

Estudo do sêmem humano: implementação de um método objetivo

Patricia Haydee Chenlo[1], Julia Irene Ariagno[2], Mercedes Norma Pugliese[1], Herberto Ernesto Repetto[3], Lydia Melba Sardi Segovia[4], Gabriela Ruth Mendeluk[5], Susana Mercedes Curi[2]

[1] Bioquímica. Especialista en Bioquímica Clínica - Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Ayudante del Departamento de Bioquímica Clínica; Cátedra Análisis Clínicos II; Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA.

[2] Bioquímica. Especialista en Bioquímica Clínica - Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Jefe de Trabajos Prácticos del Departamento de Bioquímica Clínica; Cátedra Análisis Clínicos II; Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA.

[3] Bioquímico. Especialista en Bioquímica Clínica - Área Química Clínica. Bioquímico del Departamento de Bioquímica Clínica; Cátedra Análisis Clínicos II; Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Htal. de Clínicas "José de San Martín".

[4] Bioquímica. Especialista en Bioquímica Clínica - Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Bioquímica del Departamento de Bioquímica Clínica; Cátedra Análisis Clínicos II; Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Htal. de Clínicas "José de San Martín".

[5] Bioquímica. Doctora de Universidad de Buenos Aires. Especialista en Bioquímica Clínica - Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Jefe de Trabajos Prácticos del Departamento de Bioquímica Clínica; Cátedra Análisis Clínicos II; Citología Exfoliativa y de la Reproducción. Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA. Directora del Proyecto UBACyT CB 06.

* Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA, INFIBIOQ. Hospital de Clínicas "José de San Martín". Bs. As, Argentina. Hospital de Clínicas "José de San Martín" - Av. Córdoba 2351 (1120) CABA. Argentina

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y validar un sistema computarizado de análisis de semen CASA, SCA (*Sperm Class Analyzer*) para los parámetros de concentración y movilidad espermática de acuerdo a normativas internacionales. Se estandarizó el tipo de velocidad para la clasificación en grados y la profundidad adecuada de la cámara. Para la validación se determinó precisión, límite de detección, intervalo de medición y estudio de comparación de métodos. Se halló alta correlación lineal en la clasificación del movimiento empleando Velocidad Curvilínea o Velocidad Promedio (r=0,99; p<0,001), estableciendo el uso de la primera para obtener resultados comparables con otros sistemas objetivos. También, se normatizó el empleo de cámaras de 10 µm de profundidad debido a que se obtienen mejores imágenes para el análisis sin afectar la movilidad. La imprecisión media fue 13,29%, 14,26% y 18,75% para recuento, móviles progresivos y móviles grado (a) respectivamente. Se halló alta correlación con el método manual, tanto en concentración (r=0,97, p<0,0001), móviles progresivos (r=0,84; (p<0,001) y móviles grado (a) (r=0,82; p<0,0001). Se comprobó linealidad (r=0,99; p<0,001), entre 0,98 x 10^6 y 125 x 10^6 esp/mL. Se concluye que el método propuesto cumple con los requisitos necesarios para su empleo en la clínica, siendo indispensable la edición de las imágenes por parte de un operador calificado.

Palabras clave: estudio de semen * método objetivo * sistemas computarizados de análisis de semen * validación

Summary

The aim of this study was to standardize and validate a CASA system, SCA (Sperm Class Analyzer) for the parameters of sperm concentration and motility according to international standards. The type of speed for the classification of degrees and the proper depth of the camera were standardized. For the validation, accuracy, detection limit, measuring range and method comparison study were determined. High linear correlation was found in the

classification of motion using curvilinear velocity or average speed (r=0.99, p<0.001), establishing the use of the first to obtain results comparable with other objectives. Likewise, the use of cameras 10 microns in depth was also standardized since better images are obtained for the analysis without affecting mobility. Average imprecision was 13.29%, 14.26% and 18.75% for counting, progressive and mobile grades respectively. High correlation was found with the manual method, both in concentration (r=0.97, p<0.0001), progressive mobiles (r=0.84, (p<0.001) and mobile grade a (r=0.82, p<0.0001). Linearity (r=0.99, p<0.001) was proved between 0.98 and 125 x 10^6 x 10^6 sperm/mL. It is concluded that the proposed method meets the requirements for use in the clinic, being image editing by a qualified operator indispensable.

Key words: Study of semen * objective method * CASA system * validation

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi padronizar e validar um sistema computadorizado de análise de sêmen CASA, SCA (Sperm Class Analyzer) para os parâmetros de concentração e motilidade espermática de acordo com normativas internacionais. Foi padronizado o tipo de velocidade para a classificação em graus e a profundidade adequada da câmara. Para a validação se determinou precisão, limite de detecção, intervalo de medição e estudo de comparação de métodos. Foi encontrada alta correlação linear na classificação do movimento utilizando Velocidade Curvilínea ou Velocidade Média (r=0,99; p<0,001), estabelecendo o uso da primeira para obter resultados comparáveis com outros sistemas objetivos. Também, foi normatizado o uso de câmaras de 10 µm de profundidade visto que se obtêm melhores imagens para a análise sem afetar a mobilidade. A imprecisão média foi de 13,29%, 14,26% e 18,75% para recontagem, móveis progressivos e móveis grau (A) respectivamente. Achou-se alta correlação com o método manual, tanto em concentração (r=0,97; p<0,0001), móveis progressivos (r=0,84; (p<0,001) e móveis grau (A) (r=0,82; p<0,0001). Foi comprovada linearidade (r=0,99; p<0,001), entre 0,98 x 10^6 e 125 x 10^6 esp/mL. Conclui-se que o método proposto cumpre com os requisitos necessários para sua utilização na clínica, sendo indispensável a edição das imagens por parte de um operador qualificado.

Palavras chaves: estudo de sêmen * método objetivo * sistemas CASA * validação

Introducción

Los parámetros básicos del estudio del semen, movilidad, morfología y concentración, son mediciones realizadas en toda la población de espermatozoides eyaculados, por tal razón dichos parámetros no son capaces de garantizar la capacidad fertilizante de los pocos gametos que llegan al sitio de la fecundación; sin embargo, proporcionan información esencial sobre el estado clínico de un individuo y constituyen una herramienta útil para inferir la función reproductiva del varón. El método de análisis, como toda determinación del laboratorio, debe cumplir con ciertos requisitos para que sea válido y pueda ser aplicado a la clínica.

El estudio se encuentra estandarizado por normativas de la Organización Mundial de la Salud (1) y garantizado mediante el uso de controles internos (2) y programas de evaluación externa (3), cumplimentando con los requisitos de calidad propuestos. Sin embargo, es un método subjetivo, estudia los hechos y fenómenos mediante observaciones personales, lo que puede producir elevada imprecisión. Por tal motivo, en la actualidad hay una tendencia a objetivar los estudios bioquímicos.

Diferentes empresas producen Sistemas Computarizados de Análisis de Semen conocidos como CASA (*computer aided sperm analysis*), instrumentos capaces de medir la movilidad y la cinética espermática e incluso de estimar su concentración (1). La ventaja que aportan estos sistemas objetivos es su alta precisión y la posibilidad de proveer datos cuantitativos de parámetros cinéticos del espermatozoide (4). Diferentes factores pueden afectar el rendimiento de los instrumentos CASA, como la preparación de la muestra, el número de fotogramas por segundos, la concentración espermática y la profundidad de la cámara. A pesar de eso se pueden obtener resultados confiables y reproducibles si se siguen los procedimientos apropiados que se encuentran disponibles en la literatura. Sin embargo, para asegurar la calidad de las mediciones estos métodos deben ser validados y estandarizados, lo que aún no ha sido suficientemente reportado. Se entiende por validación, según la CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), a "todas las acciones destinadas a probar que un determinado proceso, sistema, equipamiento o método trabaja de la manera esperada y logra los resultados propuestos". Las normativas internacionales establecen que los métodos analíticos empleados por el laboratorio deben estar perfectamente

validados y que toda la información referida a su desempeño (exactitud, imprecisión, linealidad) debe estar debidamente registrada (5).

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y validar un sistema CASA para los módulos de movilidad y concentración.

Materiales y Métodos

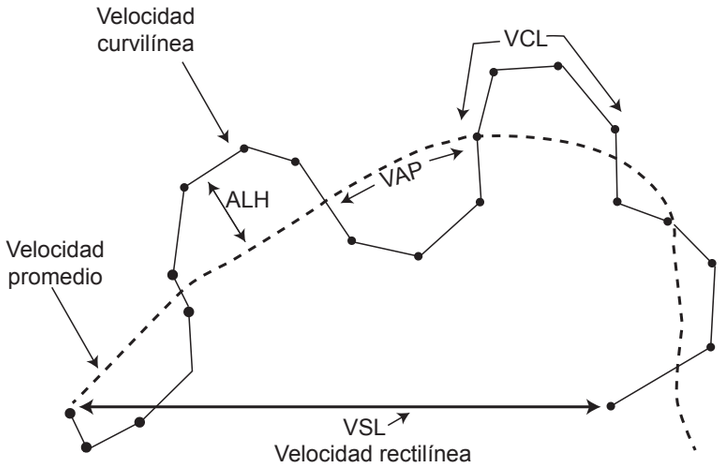
Se emplearon para la validación muestras de semen provenientes de la labor asistencial del Laboratorio de Fertilidad Masculina, FFyB UBA, en el período 2009-2010 procesadas de acuerdo con la estandarización OMS 1999 (6).

1. Método subjetivo: La movilidad fue efectuada por duplicado a 37 ºC (platina termostatizada) por la evaluación de un mínimo de 200 espermatozoides, utilizando como cámara, porta y cubreobjeto, en condiciones para alcanzar una altura de 20 µm. Se informó móviles progresivos rápidos (Grado a), móviles progresivos lentos (Grado b), móviles no progresivos (Grado c) e inmóviles (Grado d).
   El recuento espermático se llevó a cabo empleando cámara de *Neubauer Improved* por duplicado, considerando al menos 200 elementos y se informó en millones/mL.
   El laboratorio tiene implementado el control de calidad interno a través del monitoreo de medias mensuales y participa del programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) de la Fundación Bioquímica Argentina (FBA), de carácter semestral (7). Los estudios fueron llevados a cabo por operadores calificados.
2. Método Objetivo: El laboratorio cuenta con un sistema CASA, denominado SCA (*Sperm Class Analyzer,* Microptic S.L., Barcelona, España), integrado por los siguientes componentes:
   – *Hardware*: ordenador, cámara digital de video Basler (*Vision-Technology,* Alemania), 25 imágenes por segundo, microscopio óptico de contraste de fase positivo Nikon E-200 (Japón) con platina termostatizada a 37 °C.
   – *Software*: SCA. Programa informático compuesto por distintos módulos: movilidad y concentración, morfología, control base de datos e informes, vitalidad, fragmentación de ADN y contador celular.

   El sistema SCA permite al operador cambiar las condiciones de medida y otorgar validez a las imágenes digitales.

ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN Y MOVILIDAD

El análisis de la concentración y la movilidad, con el sistema CASA - SCA, se efectúo en forma simultánea. Se capturaron un mínimo de 400 espermatozoides y por medio del *software* del SCA se analizaron 25 imágenes digitalizadas por segundo de cada espermatozoide de la muestra de semen. Se calculó para cada espermatozoide la velocidad curvilínea (VCL: velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria curvilínea real), la velocidad rectilínea (VSL: velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria rectilínea entre su posición inicial y final) y la velocidad promedio (VAP: velocidad promedio de una cabeza espermática a lo largo de su trayectoria promedio) (Figura 1).



VCL: velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria curvilínea real; VSL: velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria rectilínea entre su posición inicial y final; VAP: velocidad promedio de una cabeza espermática a lo largo de su trayectoria promedio.

Fig. 1. *Terminología estándar de las diferentes velocidades dadas por los sistemas CASA.*

Relacionando la VSL con la VCL y con la VAP se obtuvieron los índices de progresión: Linealidad (LIN, linealidad de la trayectoria curvilínea, VSL/VCL) y Rectitud (STR, linealidad de la trayectoria promedio VSL/VAP).

Los datos obtenidos del sistema SCA requieren de una edición por parte del operador, que consiste en verificar que la imagen analizada corresponda a una célula espermática. En todas las muestras se llevó a cabo este procedimiento por medio de un especialista altamente entrenado.

En base a las velocidades y sus respectivas progresiones, el *software* del equipo clasificó a los espermatozoides en diferentes categorías, por velocidad, rectitud y linealidad en "grados a, b, c y d".

A continuación se detallan los diferentes ensayos realizados:

1. Para la categorización de los espermatozoides en grado (a) y grado (a+b) se trabajó con 20 muestras, las que fueron analizadas en forma simultánea por velocidad curvilínea (VCL) y velocidad promedio (VAP).
2. Para los cálculos de precisión se trabajó con 3 muestras de semen de diferentes niveles de concentraciones y movilidad, las que fueron analizadas entre 10 y 20 veces en dos tipos de cámaras: Leja 10 (altura 10 µm) y Porta-Cubreobjetos (altura 20 µm). La repetitibilidad y reproducibilidad se determinaron como el coeficiente de variación (CV%) intra cámara y entre cámaras, respectivamente (8).
3. Para evaluar el efecto de la profundidad de la cámara en la movilidad espermática, en 28 muestras de semen de diferentes concentraciones y movilidades, se efectuó el análisis objetivo por duplicado empleando cámaras Lejas de 10 y 20 µm de profundidad.
4. Para la estimación del limite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) se emplearon muestras azoospérmicas (n: 13), (9) (10). El LD fue calculado como la media del blanco +3 DE (desvío estándar) y el LQ como 3 veces el LD.
5. Para determinar el Intervalo de medición, una muestra de semen de elevada concentración (125 mill/mL) fue diluida progresivamente empleando pipeta automática de presión positiva con plasma seminal autólogo libre de células (centrifugado y filtrado), hasta llegar a una concentración de 1 mill/mL (11).
6. La comparación entre métodos se llevó a cabo con 100 muestras procesadas simultáneamente en forma subjetiva y objetiva para movilidad y concentración (12).

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se estimó la correlación, la regresión lineal y el análisis de las diferencias, por medio de los *tests* estadísticos de Passing Bablok y Bland Altman utilizando como programa el MedCalc version 9.5.0.0 (*MedCalc Software,* Mariakerke, Bélgica). En todos los casos se consideró como significativo un $\alpha>0,05$.

Resultados

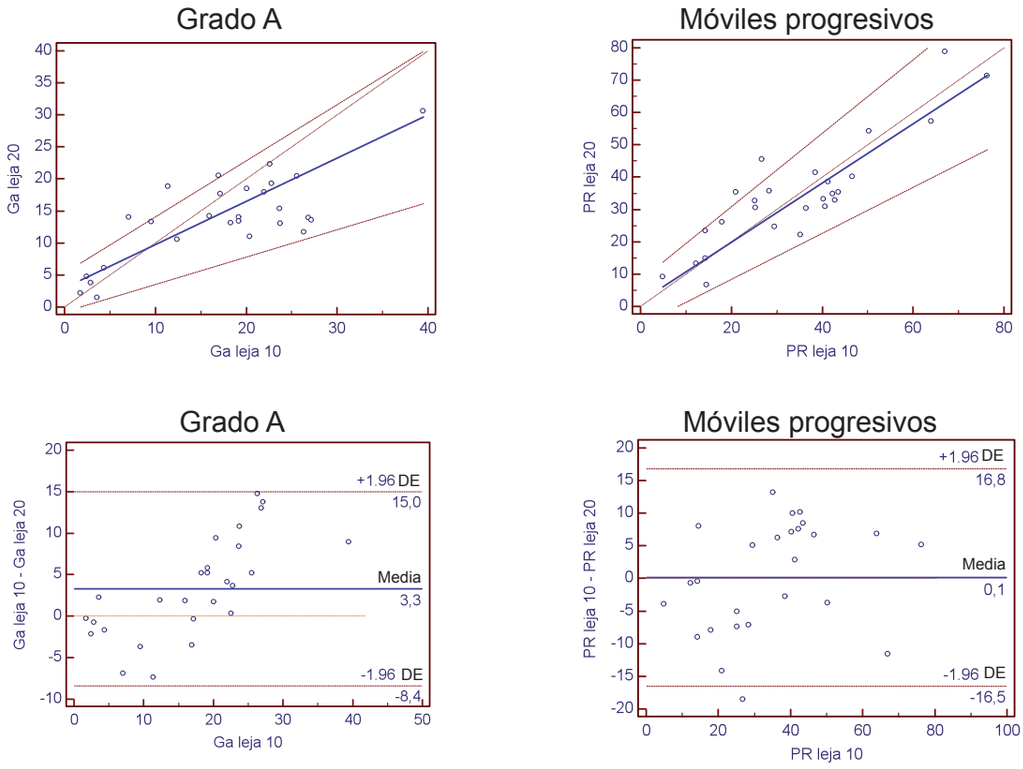
En el presente estudio se ha estandarizado y validado el uso del sistema objetivo SCA para su empleo en un laboratorio andrológico.

1. Se efectuó estudio de correlación lineal entre los grado (a) y (a+b) calculados a partir de la VCL y VAP obteniéndose un *r*: 0,99 ($p<0,001$) para ambos.
2. a) Reproducibilidad: La precisión del recuento espermático entre ensayos, medido como el coeficiente de variación (CV%) utilizando como cámara porta-cubre objeto con altura de 20 µm, fue de 25,05%, resultando superior al hallado con el empleo de cámara Leja de 10 µm de altura, cuyo CV% fue de 13,29%. Resultados equivalentes se obtuvieron para el estudio de la movilidad espermática hallándose CV% 31,60 y 18,75 para grado (a) y 21,24 y 14,26 para grado (a+b) empleando porta-cubreobjeto y Leja respectivamente. El requisito de calidad deseable según variabilidad biológica para la precisión en concentración es de 13,4%, y para móviles rápidos (grado a) y móviles progresivos (grado a+b) es de 14,1% y 11,4% respectivamente, en el nivel mínimo del requisito. Como se muestra, trabajando en cámara Leja 10 se alcanza el requisito deseable para concentración, sin embargo, para movilidad, aunque el desempeño está cercano, no logra cumplir con el nivel mínimo propuesto por este criterio de calidad (Tabla I).
   b) Repetitibilidad: para la precisión intraensayo, utilizando cámara Leja de 10 µm, se obtuvo CV%: 7,06 para recuento, y 13,60% y 13,39% para móviles progresivos y móviles rápidos, respectivamente.
3. El estudio del efecto de la profundidad de la cámara en la movilidad espermática, empleando Lejas de 10 y 20 µm, arrojó un coeficiente de correlación lineal de 0,80 (*p*: 0,001) y 0,88 (*p*: 0,001) para grado (a) y (a+b) respectivamente (Fig. 2).
4. El límite de detección (LD) del sistema computarizado, empleando trece muestras azoospérmicas fue de $7,83 \times 10^6$ elementos/mL y el de cuantificación (LQ) 23,49 elementos/mL. Sin embargo, al realizar la validación/edición de imágenes con la intervención del operador, requisito indispensable según la experiencia de los autores, para la emisión de un resultado, el LD y LQ se reducen sustancialmente, a pesar que se pierde objetividad del análisis.

Tabla I. *Precisión entre ensayos para concentración y movilidad: Reproducibilidad entre cámaras.*

Cámaras	*CV% Concentración*	*CV% Grado a*	*CV% Móviles progresivos*
Porta-cubreobjeto	25,05	31,60	21,24
Leja 10	13,29	18,75	14,26
Requisito de calidad (VB)	$13,4_a$	$14,1_b$	$11,4_b$

CV: coeficiente de variación; VB: Variabilidad Biológica. Requisito de calidad obtenido de la base de datos de Westgard (http://www.Westgard.com/biodatabase1.htm) [a] Nivel deseable [b] Nivel mínimo.

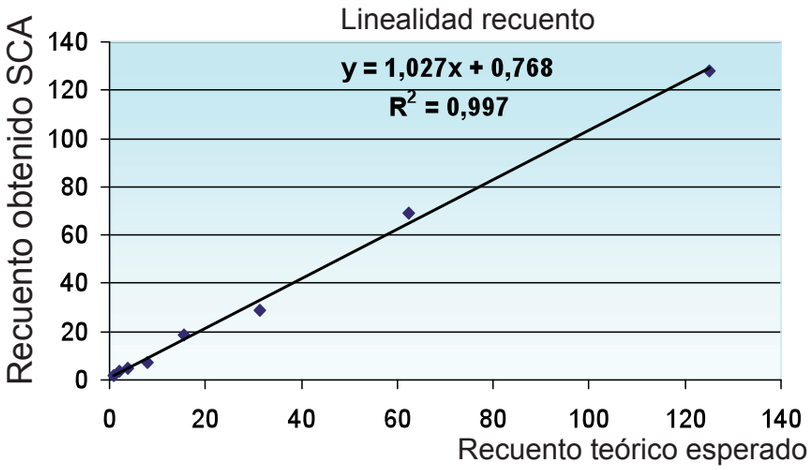


Análisis de regresión de Passing-Bablock y de diferencias de medias de Bland Altman:

Fig. 2. *Comparación de movilidad en Cámara Leja 10 µm y 20 µm.*

5. El intervalo de medición del método fue lineal. (r: 0,99, p<0,001) en el rango de concentraciones estudiadas (0,98 a 125 x10^6/mL) (Fig. 3). Con respecto a la movilidad, el porcentaje de móviles rápidos y de móviles progresivos no se vio afectado por efecto de la dilución, presentando ambas determinaciones un CV% de 17,4 y 18,6 para rápidos y móviles progresivos, respectivamente, semejante al obtenido en el estudio de la precisión del método (Tabla II).

6. Comparación de métodos.
   El estudio de correlación del recuento y la movilidad (grado a y móviles progresivos) obtenida con el SCA y el método tradicional, manual, subjetivo se muestra en la Tabla III, donde se resumen los resultados obtenidos de la recta de regresión de Passing-Bablock.
   Para el recuento espermático se observa una diferencia de tipo constante entre ambos métodos, debido a que el intervalo de confianza (IC 95) de la pendiente contiene al 1, pero el de la ordenada al origen no contiene al 0 (cero). Esto se manifiesta en que el SCA proporciona valores superiores de recuento que el método de referencia con cámara de Neubauer.



Recuento espermático con SCA, empleando cámara Leja 10, en rango de concentración teórico entre 120 a 0,98 millones/mL.

Fig. 3. *Intervalo de medición.*

Tabla II. *Intervalo de medición.*

Recuento teórico Esperado Millones/mL	*Recuento Millones/ mL*	*G a %*	*PR %*	*Esp/cpo*
125,00	127,80	23,70	27,80	493
62,50	69,30	23,80	42,81	238
31,25	29,10	22,76	40,67	107
15,63	18,50	25,59	40,34	59
7,81	7,00	20,08	36,55	34
3,91	4,80	14,35	25,33	17
1,95	3,70	26,43	43,57	14
0,98	1,70	20,37	35,19	8

Con respecto a la movilidad, el grado (a) no presenta diferencias significativas con respecto al método subjetivo llevado a cabo por un operador altamente entrenado, sin embargo, los móviles progresivos muestran diferencias proporcionales y constantes con el método manual que se demuestran porque el IC 95% de la pendiente y la ordenada al origen no contienen ni al 1 ni al 0 (cero) respectivamente (Fig. 4).

Discusión y Conclusiones

El SCA es un sistema CASA que permite al operador intervenir en la configuración del método de estudio. Si bien el fabricante recomienda estandarizaciones, el usuario puede elegir ciertas condiciones de medida, como la altura de la cámara a emplear, el rango y tipo de velocidad para la clasificación de la movilidad, brillo y contraste de las imágenes, el número de campos y/o espermatozoides para el análisis y el coeficiente de variación entre los distintos campos de una misma muestra.

La alta correlación hallada en la categorización del movimiento de los espermatozoides obtenida por la VCL y la VAP permitiría utilizar indistintamente ambos tipos de velocidades. Debido a que la velocidad promedio (VAP) es calculada mediante diferentes algoritmos matemáticos establecidos por los sistemas CASA (1), se estandarizó el uso de la VCL para la clasificación de la movilidad, con la finalidad de obtener resultados comparables entre los sistemas objetivos.

La profundidad de la cámara debe ser suficiente para que el espermatozoide realice su movimiento sin restricciones. Las estandarizaciones de OMS recomiendan una

Tabla III. *Comparación de métodos: Resumen de los resultados de la recta de regresión de Passing-Bablock.*

	Recuento	*Móviles Grado a*	*Móviles Progresivos*
Ecuación de la recta	y= 6,008833+0,940119 x	y= 0,40000+1,073333 x	y= -7,275000+1,199000 x
r (*p*)	0,9734 (*p*<0.0001)	0,8167 (*p*<0,0001)	0,8355 (*p*<0,0001)
N	100	100	100
Pendiente (IC 95%)	0,940119 (0,8361;1,0184)	1,073333 (0,9470;1,2000)	1,199000 (1,0735;1,3562)
Ordenada al origen (IC 95%)	6,008833 (2,0386;12,6371)	0,400000 (-1,0000;2,1363)	-7,275000 (-12,8625; -2,0176)

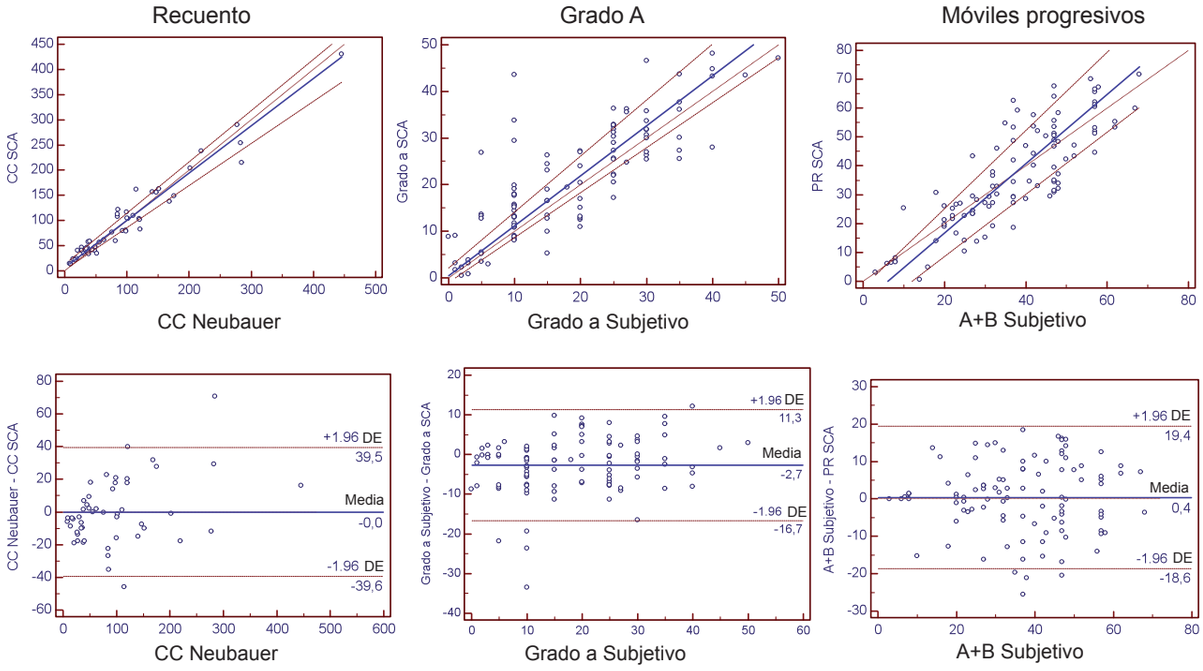


Fig. 4. *Comparación de métodos: Análisis de regresión de Passing-Bablock y diferencias de medias de Bland Altman.*

altura de 20 µm, debido a que el desplazamiento de los espermatozoides se produce como consecuencia del batido del flagelo con una amplitud aproximada de 17 µm (13). Sin embargo los proveedores de los sistemas CASA sugieren utilizar cámaras de 10 µm para evitar que imágenes de la trayectoria se pierdan cuando se produce la captura. Debido a estas consideraciones se compararon los resultados obtenidos entre porta y cubreobjeto (20 µm), Leja 20 µm y lo propuesto por el SCA, Leja 10 µm (14). Los resultados de este trabajo muestran que con la sugerencia del fabricante se obtiene una mejor precisión para los tres parámetros analizados. El uso de porta y cubreobjetos es una opción de fácil adquisición en el mercado y disminuye los costos, sin embargo suelen producirse movimiento de deriva de la muestra, desplazamiento de las partículas estáticas de forma paralela, lo que conlleva a la aparición de otras trayectorias, influenciando la cinética de las células móviles, requiriendo de mayor intervención del operador en la edición de las imágenes, y por lo tanto, reduciendo la objetividad del método. Las cámaras Lejas no presentan esta dificultad y muestran una precisión aceptable y superior al empleo de porta y cubreobjetos. El estudio por duplicado de muestras de semen en diferentes concentraciones, empleando cámaras Lejas de 10 y 20 µm de profundidad mostró buena correlación para recuento y movilidad, con lo cual se comprobó que una altura menor de 20 µm, no afecta la movilidad espermática y mejora el análisis de las imágenes capturadas. Por tal motivo se estandarizó el empleo de cámaras Leja 10 µm.

A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los equipamientos del laboratorio clínico, los fabricantes de los sistemas CASA, en general no proporcionan al usuario datos acerca de la validación del instrumento que ofrecen. Por otro lado, los protocolos estándar de evaluación, tales como los de la CLSI, a veces dificultosos de seguir debido a las características particulares del tipo de muestra y a la inexistencia de patrones de referencia, basan la aceptación o rechazo de los datos en significancias estadísticas, pero no juzgan el impacto clínico de tal diferencia (15). Los procesos de validación y estandarización son requisitos necesarios para trabajar con un sistema de calidad bajo normas internacionales. En este contexto la evaluación de un método es esencial para la mejora continua del servicio del laboratorio, ofreciendo confiabilidad de los resultados emitidos.

El proceso de validación incluye determinar el desempeño del método por medio del error total de medida, y determinar si cumple con el requisito de calidad para ser de utilidad en la práctica clínica. El Consenso Internacional realizado en Estocolmo en 1999 (16) definió la variabilidad biológica como el mejor criterio práctico para establecer el Error de Medida Máximo Tolerable (EMT), ya sea para un nivel óptimo, deseable o mínimo (17) (18). No siempre los errores aleatorios y sistemáticos ocurren en forma independiente. El error total refleja la variación total del resultado con respecto al valor verdadero, es decir, representa el efecto combinado de la imprecisión y el *bias* o error sistemático (ES).

El recuento espermático muestra una precisión media aceptable (CV: 13,29%) por variabilidad biológica, pero para el valor de decisión médica (percentil 5 de la población fértil) el *bias* es elevado, 34%, lo que probablemente se deba, como señalan Vantman *et al.* (19), a la inespecificidad o insuficiente selectividad del método de medida. Sin embargo, el EMT (55%) satisface el requisito mínimo de variabilidad biológica. La movilidad espermática presenta una precisión similar a la reportada en la bibliografía (20) empleando el mismo sistema CASA, pero que no cumple con el nivel mínimo del requisito de variabilidad biológica (CV% 18,75 para Grado a y 14,26 para Grado a+b). Sin embargo, el EMT (32,0% y 31,3% para Grado a y MP respectivamente) cumple con el requisito, ya que al presentar un ES muy bajo (8,9% y 2,8%, para Grado a y MP respectivamente) el peso del error de la medida está dado prácticamente por el error aleatorio. A pesar que los autores no desconocen que la sugerencia es que la medida debe cumplir el requisito, tanto para la imprecisión como para el *bias*.

Con respecto a los intervalos de referencia para esta metodología, se está trabajando para establecer los mismos mediante la convocatoria de varones sanos con fertilidad probada en el último año, datos no informados aún.

Finalmente, se puede concluir que el método estandarizado brinda información objetiva con una precisión y exactitud clínicamente aceptable para movilidad y concentración en un rango de 0 a 120 mill/mL. Sin embargo, es conveniente cuando el número de espermatozoides (N) por campo supere los 200 elementos, diluir la muestra con plasma seminal autólogo libre de células, lo cual sin afectar la movilidad, permitirá al operador una mejor validación de las imágenes obtenidas. A concentraciones muy bajas, al igual que con las azoospermias, el sistema detecta mayor cantidad de partículas no espermáticas, el LD sin editar fue de 7,83 x 10^6 elementos/mL por lo cual, si bien el operador puede corregirlo luego de la edición de las imágenes, en muestras con menos de 15 espermatozoides por campo, es aconsejable hacer el estudio en forma manual. El recuento en cámara de Neubauer permitirá que el N de elementos sea superior y por lo tanto menor el error cometido y la movilidad será similar a la subjetiva ya que la alta intervención en la edición de las imágenes por parte del operador, afectarán la objetividad del estudio.

El estudio de la movilidad mediante esta nueva metodología aporta información acerca de la cinética espermática (VCL; VSL; VAP; hiperactivación), datos que se están evaluando para su aplicación en el diagnóstico clínico andrológico. También permite llevar un registro de las filmaciones de las muestras archivado por el *software* del equipo, que son de utilidad para futuras reevaluacioes y/o estudios de comparación en diferentes situaciones clínicas. Este sistema, a diferencia de otros CASA, admite la intervención del operador para validar cada imagen, lo cual le confiere una exactitud apropiada.

El sistema SCA es un sistema computarizado que da información objetiva y documentable, pero que no disminuye ni el tiempo de ejecución ni el número de personal afectado a la tarea.

CORRESPONDENCIA

PATRICIA H. CHENLO
Av. Cabildo 3981, 11 A.
CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina
E-mail: pchenlo@hotmail.com

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por UBACYT CB 06.

Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen, 5th edition, Geneva: WHO; 2010.
2. Ariagno J, Curi S, Pugliese M, Chenlo P, Blanco A.B. Control de Calidad en el Laboratorio Andrológico. Faba Informa. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires.[serial online] 2007Oct (420) Available from: URL:http://www.faba.org.ar/fabainforma/420/FBA02.html
3. Curi S, Ariagno J, Chenlo P, Pugliese M, Sardi Segovia, Repetto H, *et al.* Control de calidad externo en el estudio del semen. Acta Bioquím Clín Latinoam 2008; 42 (2): 183-7.
4. ESHRE. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 142-5.
5. Norma IRAM-ISO 15189. Laboratorio de Análisis Clínicos. Requisitos Particulares para la Calidad y la Competencia. Primera edición, 3 de junio de 2005.
6. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed., New York, 1999.
7. Curi S, Ariagno J, Chenlo P, Pugliese M, Sardi Segovia, Repetto H. Laboratorio de Semen: primeros resultados. Faba Informa. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. [serial online] 2006 Sep (407) Available from: URL:http://www.faba.org.ar/fabainforma/407/FBA05.htm
8. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, KrouwerJS, Meier K. EP5-A2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline. Second Edition, Pennsylvania, 24 (25).
9. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including detection an quantification capabilities. IUPAC Recommendations. Pure Appl Chem 1995; 67(10): 1699-723.

10. Thomsen V, Schatzlein D, Mercuro D. Limits of detection in spectroscopy. Spectroscopy 2003; 18 (12): 112-4.
11. Tholen D , KrollC D, Rex Astles J, CaffoA L., Happe TM, *et al*. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A. 2003; 23 (16).
12. Krouwer JS, Thden DW, Garber C. Method Comparison and Bias Estimation Using Patients Simples; Approved Guideline. Second edition. EP09-A2-IR. 2010; 30 (17).
13. David G, Serres C, Jouannet P. Kinematics of human spermatozoa. Gamete Res 1981; 4: 83-95.
14. Manual de SCA (Sperm Class Analyser). Microptic,S.L., Barcelona, Sep 2009.
15. Guglielmone R, De Elías R, Kiener O, Collino C, Barzón S. Verificación de métodos en un laboratorio acreditado y planificación del control de calidad interno. Acta Bioquím Clín Latinoam 2011; 45(2): 335-47.
16. Kenny D, Fraser CG, Hytoft Petersen P, Kallner A. Consensus agreement. Scand J Clin Lab Invest 1999; 59: 585.
17. Alvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. Hum Reprod 2003; 18 (10): 2082-8.
18. Westgard JO. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from biologic variation. Annex I, Part I: Within-subject and between-subject CV values of analytes and Desirable Analytical Quality Specifications for imprecision, bias and total error. [serial online] citado 2011. Available from: URL:http://www.Westgard.com/biodatabase1.htm
19. Vantman D, Koukoulis G, Dennison L, Zinaman M, Sherins RJ. Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. Fertil Steril 1988 ; 49(3): 510-5.
20. Aulesa C, Cabrera M, Alonso R, Benıtez M, Martınez M. Evaluación del sistema automatizado Sperm Class Analyzers (SCA) para análisis del semen. Rev Lab Clin 2009; 2(1): 8–16.

Aceptado para su publicación el 1 de junio de 2012