

HOVEDBUDSKAP

- Sædanalysen utgjør en viktig del av infertilitetsutredningen
- WHO har utgitt retningslinjer for standardisert sædanalyse og referanseområder for analysevarene
- Nøyaktige og reproducerbare resultater bygger på god opplæring og kvalitetskontroll ved laboratoriet

SAMMENDRAG

Bakgrunn:

Sædanalysen er et viktig verktøy i utredningen av ufrivillig barnløshet. Standard sædanalyse inkluderer spermiekonsentrasjon, totalt antall spermier, spermimotilitet og spermimorfologi. Analysen er basert på subjektive vurderinger og er vanskelig å standardisere. Ofte utføres metodene noe ulikt ved forskjellige laboratorier. Verdens helseorganisasjon har utarbeidet retningslinjer for hvordan en human sædprøve bør undersøkes.

Materiale og metoder:

Denne artikkelen er basert på retningslinjene fra Verdens helseorganisasjon, forfatterens erfaringer og forskning i fagfeltet samt litteratursøk i PubMed og Google Scholar.

Resultater/Diskusjon:

For å oppnå nøyaktige og reproducerbare resultater og å kunne sammenligne resultater med andre laboratorier, er det nødvendig at undersøkelsene av sædprøven er standardiserte. De seneste retningslinjene fra Verdens helseorganisasjon, publisert i 2010, er i større grad evidensbaserte enn de tidligere anbefalingene. I denne artikkelen omtaler vi de sentrale undersøkelsene som gjøres i en standard sædanalyse, referanseområder for de ulike sædvariablene, utvalgte metoder som ikke inngår i standard analyse, kvalitetssikring ved laboratoriet og klinisk betydning av sædparametrene.

Nøkkelord: sædanalyse, standardisering, Verdens helseorganisasjon, referanseverdier, kvalitetssikring

- Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.

Sædanalysen

Av Oliwia Witczak, ph.d. (førsteamanuensis),
Herman Sebastian Folkestad Evensen, MSc
(avdelingsingeniør),
Jorunn Marie Andersen, ph.d.
(førsteamanuensis, bioingeniør),
Hilde Herring, MSc (overingeniør, bioingeniør) og
Trine B. Haugen, ph.d. (professor)
Fakultet for helsefag, Høgskolen i Oslo og Akershus.

Korresponderende forfatter:
Oliwia.Witczak@hioa.no

Infertilitetsutredning starter som regel med en sædanalyse. Som for andre laboratorieanalyser forventes også sædanalysen å skulle gi nøyaktige og reproducerbare resultater. Dette forutsetter at metodene er standardiserte. En global standardisering er dessuten viktig for å kunne sammenligne resultater fra ulike laboratorier på tvers av landegrensler, følge endringer i sædkvalitet over tid og for å kunne delta i internasjonale studier. Sædanalysen er vanskelig å standardisere fordi den består av svært ulike metoder som er basert på subjektive vurderinger. Verdens helseorganisasjon (WHO) publiserte de første retningslinjer for å undersøke en human sædprøve i en manual i 1980 (1) og har jevnlig revidert denne, sist i 2010 (2). Den siste utgaven av WHO-manualen er i større grad evidensbasert enn de tidligere utgavene. I tillegg til metodebeskrivelser er kvalitetssikring og kvalitetskontroll sentrale temaer. Standard sædanalyse omfatter celledelling og vurdering av spermimotilitet og spermimorfologi. Manualen omfatter også undersøkelser som gjøres i visse tilfeller og metoder som kun er anbefalt til forskningsformål.

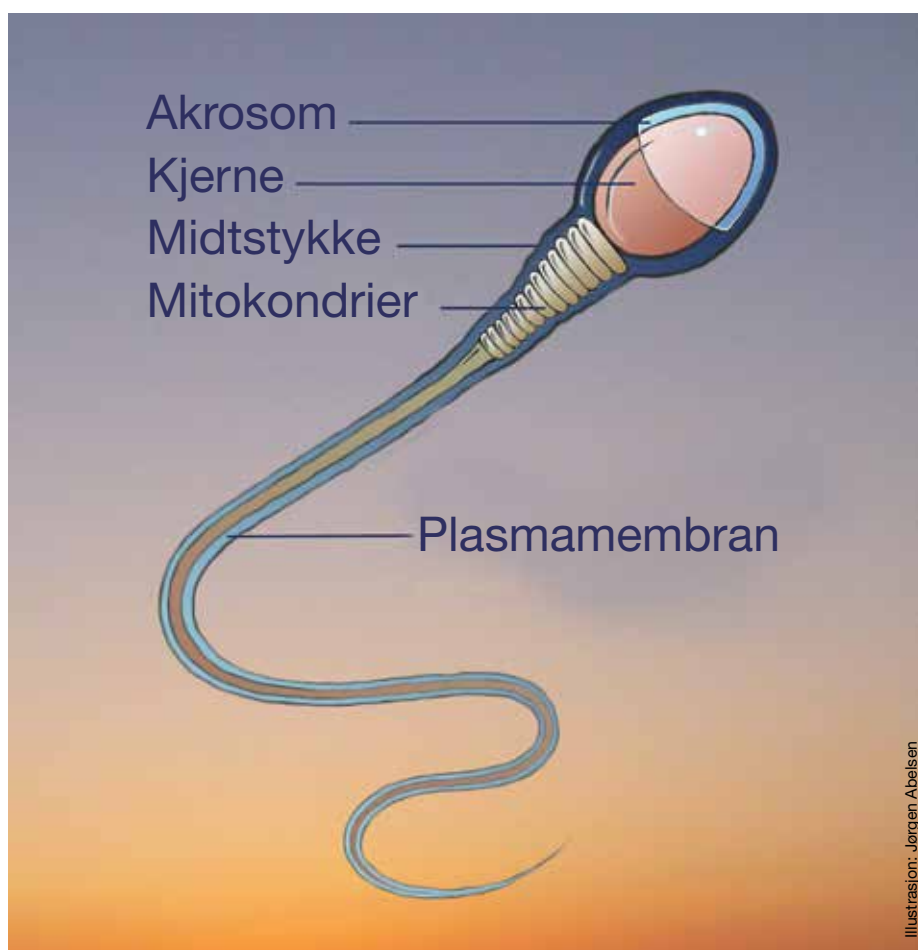
Hensikten med artikkelen er å beskrive standard sædanalyse, utvalgte valgfrie tester, referanseverdier, kvalitetssikring og klinisk betydning av sædparametrene.

Materiale og metoder

Artikkelen bygger på WHO-manualen om sædanalyse fra 2010 (2), litteraturen referert til i denne og litteratursøken frem til 14.09.2017 i PubMed og Google Scholar. Søkeord som ble brukt; «sperm, spermatozoa, semen parameters, sperm concentration, sperm count, sperm motility, sperm morphology» i kombinasjon med «fertility». I tillegg ble det søkt med «sperm chromatin structure assay, computer aided sperm analysis, computer assisted sperm analysis». Søkeordet «TUNEL» (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labelling) ble kombinert med «sperm DNA fragmentation». Filteret «human» ble brukt i alle søk bortsett fra for «computer aided sperm analysis, computer assisted sperm analysis». Artikler ble valgt på grunnlag av populasjon, størrelse på studien og metodene som ble benyttet. Denne oversiktsartikkelen baserer seg også på forfatterens erfaringer fra andrologiske laboratorier og egen forskning. Sisteforfatter (TBH) har ledet et andrologisk laboratorium og vært medlem i WHO's arbeidsgruppe om standardisering av sædanalysen. OW, JMA, HH og TBH har gjennomført kurs i standard sædanalyse organisert av European Society of Human Reproduction and Embryology og Nordic Association for Andrology.

Utstyr

WHO har som mål at sædanalysen skal kunne gjøres på laboratorier over hele verden og derfor ikke kreve kostbart utstyr. Basisutstyret omfatter vekt, sentrifuge, lysmikroskop, fasekontrastoptikk, immersjonsobjektiv, forbedret Neubauer tellekammer og manuell differensialcelledeteller. For motilitetsanalyser ved 37 °C skal mikroskopet ha et oppvarmet objekt-



FIGUR 1: Skjematisk fremstilling av en human spermie (33). Figuren er gjengitt med tillatelse fra Tidsskrift for Den norske legeförening.

bord. Siden sædprøven er viskøs, gjøres uttak til fortykning for celledtelling med en «positive displacement»-pipette, der et stempel i spissen, og ikke luft, er i kontakt med væsken.

Sædprøven

Spermatogenesisen, dannelsen av spermier, tar cirka 70 dager og skjer i de sædførende kanalene i testikkelen. Halen dannes i den siste fasen, kalt spermiogenesisen, som varer i cirka tre uker og er temperaturfølsom. Spermieutviklingen skjer i bitestikkelen, der spermier lagres i en – to uker. Figur 1 viser en skjematisk fremstilling av en spermie og de ulike hoveddelene.

Sekret fra sædblæreene utgjør i underkant $\frac{2}{3}$ av ejakulatet, mens omtrent $\frac{1}{3}$ kommer fra prostata. Kun en liten del av volumet kommer fra testikkelen, bitestikkelen og Cowpers kjertler (3). Ejakulasjonen er en sekvensiell prosess hvor den spermierike delen tømmes tidlig sammen med prostatasekretet, mens sædblærens sekret kommer tilslutt sammen med et fåtall spermier. Kun fullstendige prøver skal analyseres.

Sædparametere kan variere hos samme mann både mellom to prøver tatt innenfor et begrenset tidsrom og over tid (4). Ved avvik fra referanseområdet bør en ny sædprøve analyseres. Feber kan påvirke sædkvaliteten. Hvis mannen har hatt

feber de siste tre uker før sædprøven ble avlagt, bør ny prøve vurderes etter minst tre uker.

Innledende undersøkelse

Før analysestart oppbevares prøven mellom 20 °C og 37 °C, også under eventuell transport. I utgangspunktet er ejakulatet tyktflytende og ikke homogent. I løpet av kort tid vil prostataspesifikt antigen (PSA) som finnes i ejakulatet bryte ned koagulatet og bidra til at prøven blir mer tyntflytende. Denne prosessen kalles likvifisering. Dersom prøven ikke er likvifisert innen 30 minutter, kan enzymatisk eller mekanisk behandling være nødvendig.

Sædprøven er hvitaktig og blakket. Rød-brun farge kan være tegn på at røde blodceller er tilstede. Gul farge kan forekomme etter lang abstinens, høye leukocyttnivåer, ved ikterus eller etter inntak av visse medikamenter og kosttilskudd.

Vanligvis inneholder sædprøven små mengder av andre celletyper, for eksempel epitelceller og «runde celler» som leukocytter og umodne kjønnseller. Tilstedeværelse av et betydelig antall andre celler skal kommenteres. Dersom antallet «runde celler» overskrider 1×10^6 /ml, skal den nøyaktige konsentrasjonen av disse bestemmes. Metoder for å påvise andre celler enn spermier er beskrevet i WHO-manualen.

Innledningsvis observeres ubehandlet sædprøve i mikroskop for å få et overblikk over spermieaktivitet, spermiekonsentrasjon, tilstedeværelse av agglutiner, aggregater eller andre celletyper enn spermier. Agglutinerer skjer når spermier fester seg til hverandre via hode til hode eller hale til hale, forårsaket av antispermieantistoffer. Agglutinerer kan påvirke konsentrasjon- og motilitetsbestemmelsene. Uspesifikke aggregater inneholder klumper av celler og cellerester og sees ofte når det er mange døde spermier.

Dersom ingen spermier observeres ved mikroskopering, sentrifugeres sædprøven, og det gjøres en ny vurdering for å se om det finnes spermier i prøven. ▶

Spermiekonsentrasjon, sædvolum og totalt antall spermier

For bestemmelse av spermiekonsentrasjon og totalt antall spermier telles kun spermier med både hode og hale. Minst 200 celler telles i hvert av to separate uttak. Sædprøven avleveres i en forhåndsveid beholder, og sædprøvevolumet bestemmes ved veing. Et lite volum kan tyde på en ufullstendig prøve eller delvis retrograd ejakulasjon (sæden tømmes i urinblæren), mens et høyt volum kan skyldes betennelse i sædblære eller prostata.

Totalt antall spermier i ejakulatet er produktet av spermiekonsentrasjonen og volumet av sædprøven og gir informasjon om spermieproduksjon og transport av spermier hos en mann.

Spermie motilitet

Sædanalysen er særegen fordi den også omfatter evaluering av bevegelige celler. Vurdering av motilitet gjøres helst med rutenett i okularet. Alternativt til å se direkte i mikroskopet kan bildet av preparatet overføres til en skjerm ved hjelp av et kamera og evalueringen utføres ut fra skjermbildet. Prosedyren utføres i romtemperatur eller ved 37 °C. Temperaturen må standardiseres ved hvert laboratorium. Spermier deles inn i tre bevegeskategorier; i) progressivt motile, spermier beveger seg målrettet fremover, ii) ikke-progressivt motile, spermier beveger seg på stedet og iii) immotile, ubevegelige spermier.

Først vurderes de progressivt motile, så ikke-progressivt motile og til slutt immotile spermier. Minst 200 celler vurderes i hvert av to separate uttak. Resultatet angis som prosentandel spermier innen hver motilitetskategori av totalt vurderte spermier.

Progressiv motilitet har tidligere vært inndelt i rask og langsom (5). De to kategoriene ble slått sammen i 2010-manualen fordi enkelte mente det var vanskelig å vurdere de raskt progressive nøyaktig og reproducerbart (6). Det er fremdeles uenighet i fagmiljøene om betydningen



FIGUR 2: Spermievitalitet. Spermier farget med eosin-nigrosin fargeløsning. Rød spermie klassifiseres som død, hvit som levende.

av å vurdere raskt progressive spermier (7).

Spermievitalitet

I WHO-manualen anbefales det å undersøke andelen levende celler hvis en prøve inneholder færre enn 40% progressivt motile spermier. Imidlertid bør også andelen ikke-progressivt motile tas i betraktning, og en vitalitetstest utføres hvis mer enn halvparten av spermier er immotile (8). Immotilitet kan skyldes at spermien er død, men også at den har haledefekt.

Det finnes ulike metoder for å vurdere vitalitet. De fleste baserer seg på en fargeløsning som tas opp i døde celler på grunn av en skadet membran. I WHO-manualen anbefales eosin-nigrosin-farging. 200 spermier i hvert av to separate utstryk vurderes. Nigrosin farger bakgrunnen, og eosin farger døde celler. Hvite og svakt rosa celler klassifiseres som levende, mens røde og mørk rosa celler klassifiseres som døde (9). Figur 2 viser eosin-nigrosin-fargede spermier.

Hypo-osmotisk svellestest er en annen metode, også beskrevet i WHO-manualen, for å vurdere vitalitet. Et uttak av sædprøven inkuberes med en hypoosmotisk løsning, og cellene vurderes i mikroskopet. Halene til spermier med intakt membran vil svulle, og celler med svellest hale vurderes som levende (10).

Spermie morfologi

Naturlig variasjon i spermienes utseende gjør vurderingen av morfologi vanskelig. En spermie defineres som morfologisk normal hvis hodet er 4-5 µm langt og 2,5-3,5 µm bredt med en jevn oval form (11). Akrosomet, som inneholder enzymer nødvendige for fertilisering, er tydelig definert og dekker 40-70% av hodet. Halen er omtrent 45 µm lang, og midtstykket er noe bredere enn halen og 7-8 µm langt.

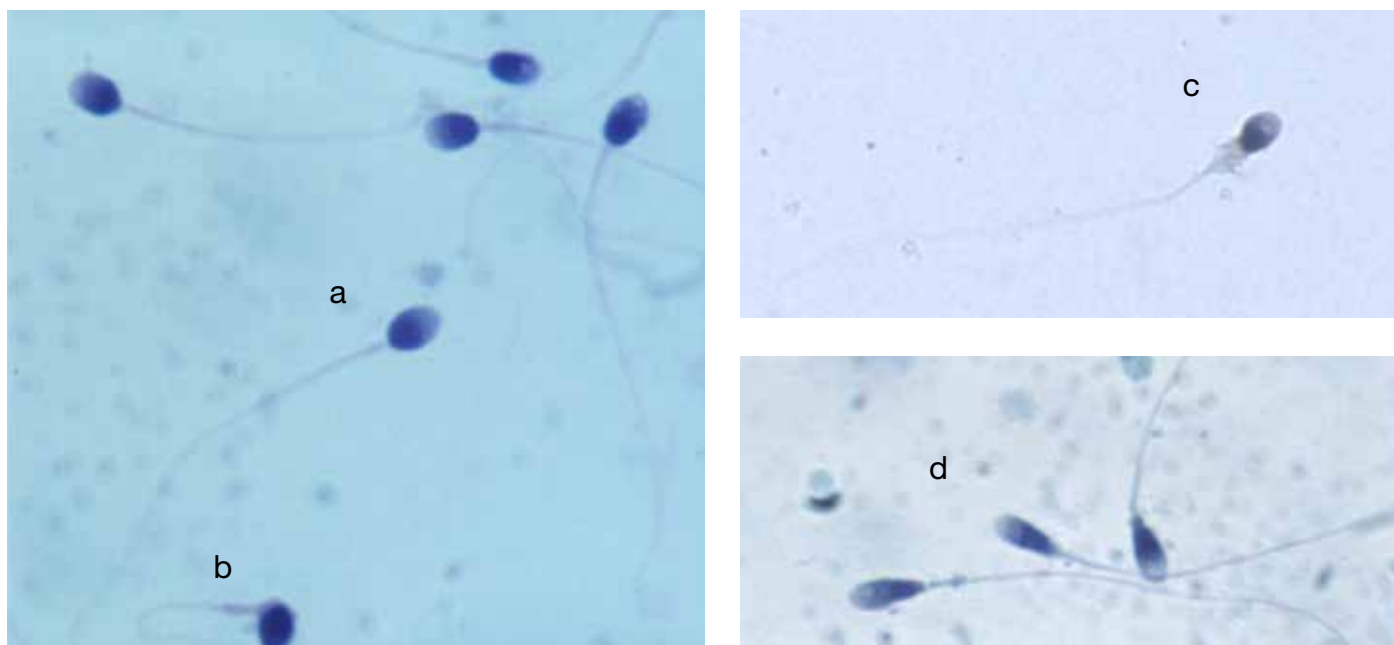
Spermienes morfologi vurderes etter strikte kriterier i utstryk farget etter Papanicolaous metode (figur 3). Andel spermier med normal morfologi beregnes. Defekter kan deles inn i fire kategorier: hodefeil, midtstykkefeil, halefeil og cytoplasmarester rundt hale og midtstykke som er større enn 1/3 av hodestørrelsen. Spermier kan ha en eller flere defekter. Et ofte brukt mål på abnormalitet er teratozoospermiindeks. Det angir antall defekter per unormal spermie og kan bidra med nyttig informasjon.

Minst 200 spermier vurderes i hvert av to separate områder, fortrinnsvis fra to ulike utstryk. WHO-manualen inneholder en stor samling bilder med tilhørende morfologivurderinger.

Kriteriene for vurderingen av en normal spermie har endret seg over tid og er omdiskuterte (12), noe som reflekteres i referansegrensene oppgitt i de ulike utgavene av WHO-manualen. I 1987 var nedre referansegrense 50% spermier med normal form (13). Som følge av endring til strikte kriterier, anbefales nå 4% som referansegrense for morfologisk normale spermier (14).

Antispermieantistoffer

WHO-manualen anbefaler to antiglobulintester for å påvise antistoffer direkte på spermier. «Mixed antiglobulin reaction test» (MAR test) er basert på latekskuler eller behandlede erytrocytter dekket med antistoff mot humant globulin (anti-IgG eller anti-IgA) som binder IgG eller IgA på overflaten til uvaskede spermier. «Immunobead test» baseres på tilsvarende prin-



FIGUR 3: Spermiemorfologi. Spermier farget med Papanicolaou-fargeløsning for spermier. a klassifiseres som morfologisk normal spermie. b (midtstykke- og halefeil), c (uregelmessig hodefasjon og cytoplasmadråpe) og d (for lange og smale hoder) klassifiseres som morfologisk normale spermier.

sipp, men gjøres med vaskede spermier. Andel motile spermier med kuler bundet til overflaten vurderes. Minst 200 celler bør telles.

Antispermieantistoffer kan redusere spermienes evne til fertilisering og kan være av klinisk betydning dersom mer enn 50% av de motile spermene har antistoffer bundet til seg (15).

Andre metoder

WHO-manualen beskriver også valgfrie, biokjemiske analyser i sædvæsken og spermiefunksjonstester og undersøkelse av DNA-skade for forskning.

Vi vil kort omtale metoder for DNA-skade i spermier fordi det lenge har vært interesse for dette, og analysene gjøres ved en del fertilitetsklinikker. En av de mest brukte er test av spermiekromatinstruktur (sperm chromatin structure assay, SCSA) som ble utviklet for å måle skade i spermens DNA (16). Metoden er kostbar da den er basert på væskestrømscytometri og lisensiert programvare. Protokollen ble standardisert for mange år siden (17). Den andre

metoden som ofte benyttes, måler inkorporering av merkede nukleotider i skadet DNA ved hjelp av deoksynukleotidyltransferase (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labelling, TUNEL). Protokollen ble nylig standardisert (18).

Betydningen for fertilitet er uklar, både når det gjelder naturlig og assistert befruktning. En nylig publisert metaanalyse viser at DNA-skade i spermier har en negativ effekt på graviditetsraten etter *in vitro*-fertilisering (19).

Automatisert sædanalyse

Det er utviklet teknologi for automatisert sædanalyse, og de første systemene ble kommersialisert på 80-tallet. Ofte brukes forkortelsen CASA (computer-aided sperm analysis eller computer-assisted sperm analysis), som vil bli brukt i den følgende omtalen. Hensikten med denne teknologien har vært å oppnå en mer objektiv måling av spermiekonsentrasjon og spermomotilitet sammenliknet med de manuelle metodene. Teknologien gir også en mer detaljert beskrivelse av sper-

mienes bevegelsesmønster; kinematikken. I tillegg har det vært forventninger om at sædanalysen kunne utføres raskere enn med de manuelle metodene.

CASA har gitt gode resultater innenfor veterinærmedisin (20), men det har frem til nå vært vanskelig å få pålitelige og reproducerbare resultater for humane sædprøver. De noe urealistiske forventninger til CASA er hittil ikke innfridd, og metoden er ikke anbefalt som standard metode av WHO, men beskrevet i manualen som en valgfri metode.

Det foregår stadig utvikling av CASA-teknologien, og flere systemer er på markedet. Et CASA-system består av et mikroskop, et videokamera og en programvare. Når en sædprøve plasseres under mikroskopet, blir det tatt opp en kort film, vanligvis i ett til to sekunder, som så blir digitalisert og delt opp i flere bilder ved hjelp av programvaren. Celltelling og kinematisk analyse gjøres samtidig, og det benyttes fasekontrast optikk, som ved manuell vurdering. Hver spermie blir identifisert på bakgrunn av hvor mange piksler sper- ➤

miehodet dekker, og hodet spores gjennom opptaket. Kinematikk og motilitet for alle spermene beregnes.

CASA kan generere store mengder informasjon om en sædprøve, men det vanskelig å standardisere analysen, ikke minst fordi ulike variabler vurderes samtidig. Det kan dessuten være stor usikkerhet i analyseresultatet som følge av viskositet, celleaggregering og tilstedeværelse av andre partikler i prøven. Partikler kan oppfattes som spermier av systemet, og usikkerheten kan derfor være mindre når spermene er separert fra sædvæsken og suspendert i medium. Med de nye CASA-systemene kan både spermiehode og hale identifiseres, noe som gjør det lettere å skille spermier fra andre partikler.

CASA kan ha et stort potensial innenfor forskning og klinisk bruk, men det forutsetter bedre teknologi (21).

Referanseverdier

Referansepopulasjonen for sædvariabler er menn som har gjort sin partner gravid i løpet av det siste året, og der tid før oppnådd graviditet er 12 måneder eller kortere. Selv om standardmetoder benyttes og laboratoriene deltar i eksternt kvalitetskontrollprogram, kan prøvesvar variere mellom laboratoriene. Variasjon kan også skyldes regionale og etniske forskjeller i sædkvalitet (22). WHO anbefaler at det enkelte laboratorium etablerer egne referanseområder, men det er i praksis krevende å få gjennomført. De norske referanseområdene som ble foreslått i 2006 (23), avviker i liten grad fra WHOs anbefalinger (2) (tabell 1).

Referanseområdet for målinger er ofte det sentrale 95 %-intervallet, det vil si avgrenset av 2,5- og 97,5-prosentilene. For sædvariabler kan det være mer hensiktsmessig å benytte det øvre 95 %-intervallet som referanseområde (tabell 1) siden høye verdier sannsynligvis ikke er ugunstig for fertiliteten.

Kvalitetssikring og kvalitetskontroll

Kvalitetssikring er viktig for å standardisere sædanalysen. Målet er å oppnå prøvesvar som har stor grad av nøyak-

TABELL 1: Nedre referansegrense (5-prosentilen) for sædparametere fastsatt av WHO (2) og basert på fertile norske menn (23).

Sædparameter	WHOs nedre —referansegrense	Nedre referansegrense basert på fertile norske menn
Sædvolum	1,5 ml	1,7 ml
Spermiekonsentrasjon	15 x 10 ⁶ per ml	11 x 10 ⁶ per ml
Totalt antall spermier	39 x 10 ⁶ per ejakulat	22 x 10 ⁶ per ejakulat
Total motilitet	40 %	-
Progressiv motilitet	32 %	33 %
Morfologisk normale spermier	4 %	3 %
Vitalitet (levende spermier)	58 %	-

tighet og presisjon, og kvalitetskontroll skal sørge for at man oppdager og korrigerer tilfeldige og systematiske feil. Sentralt i den interne kvalitetskontrollen for sædanalysen er å avdekke forskjeller mellom laboratoriepersonell. Ekstern kvalitetskontroll er vesentlig for å korrigere systematiske feil og avvik som kan oppstå over tid og dermed oppnå sammenliknbare resultater med andre laboratorier. I eksterne kvalitetsprogrammer distribueres konserverte sædprøver til celletelling, videoer til motilitetsbestemmelse og utstryk til morfologibedømmelse. Avvik over tid kan også oppdages i internkontroll ved at lagrede prøver, motilitetsvideoer og utstryk evalueres på nytt ved samme laboratorium. I WHO-manualen er det detaljert beskrevet hvordan kvalitetssikring og kvalitetskontroll bør utføres.

WHO anbefaler at minst 200 spermier vurderes i to paralleller i evalueringen av de ulike sædvariablene. Dersom differansen mellom to paralleller ikke er akseptabel, foretas målinger i to nye parallelle uttak for celletelling og spermimotilitet og ny evaluering av samme preparat til morfologi og vitalitet. I WHO-manualen er det tabeller som viser akseptabel differanse mellom parallellene i evaluering av de ulike sædvariablene (2).

Usikkerheten i resultatet vil være høyere hvis cellekonsentrasjonen i prøven er lav og tallet av den grunn lavere enn 200. Det må kommenteres i rapporten.

Klinisk betydning

Sædprøvesvaret vil kunne si noe om sannsynligheten for befruktning (24), men er kun en av flere vurderinger som gjøres i fertilitetsutredningen. Kvinnens reproduktive helse har stor betydning for om graviditet inntreffer, og det gjøres en samlet utredning av paret. Det kan være uforklarlige årsaker til infertilitet, og et par kan oppleve ufrivillig barnløshet selv om kvinnen og mannen tilsynelatende ikke er subfertile, dvs har redusert fertilitet.

Den kliniske nytteverdien av referanseverdiene er omdiskutert (25, 26), men kan være nyttige som sammenlikningsgrunnlag, forutsatt en forståelse av hva de bygger på. Studier av unge par som sluttet å bruke prevensjon for å oppnå graviditet, viste at sannsynligheten for graviditet økte med økende spermiekonsentrasjon opp til 40 og 55 x 10⁶/ml, avhengig av studie (27, 28). Disse resultatene kan tyde på at en mann kan være subfertil selv om spermiekonsentrasjonen er over 5-prosentilen i WHOs referansepopulasjon, som er 15 x 10⁶/ml.

Progressiv spermimotilitet er vist å ha best prediktiv verdi for fertilitet i noen studier (23, 29-31), mens andre studier ikke har kunne påvise sammenheng mellom spermimotilitet og sannsynlighet for graviditet (27, 28).

Selv om noen studier tyder på at spermimorfologi kan ha betydning for fertiliteten (27, 28), har uenighet om kriterier og endringer i disse ført til at det er vans-

kelig å tolke den kliniske betydningen av denne parameteren (32).

Både spermiekonsentrasjon og spermimotoilitet er av betydning for valg av behandlingsmetode ved fertilitetsklinikker. Dersom det ikke finnes spermier i ejakulatet, kan spermier i noen tilfeller hentes ut fra bitestikkel eller testikkel ved kirurgi, og brukes i behandling med intracytoplasmatisk spermieinjeksjon (ICSI).

Konklusjon

Sædanalysen er vesentlig i utredningen av par som opplever uønsket barnløshet. Denne artikkelen understreker viktigheten av å standardisere sædanalysen, både av hensyn til diagnostikk og behandling, men også av hensyn til forskningssamarbeid. For å oppnå standardisering kreves god opplæring av personalet og implementering av rutiner for intern og ekstern kvalitetskontroll ved laboratoriet. WHO har utgitt retningslinjer for hvordan sædanalysen bør utføres og har etablert referanseområder for sædparametere basert på fertile menn. Automatisert analyse har potensial til å gi en mer objektiv og rask vurdering av sædprøven enn de manuelle metodene, men anbefales per i dag ikke som standard metode. ■

Takk

Takk til professor emeritus Roelof Menkveld ved Stellenbosch University, Sør Afrika, for spermimorfologibilder i figur 3.

Interessekonflikter

Ingen.

Referanseliste

1. Belsey M, Moghissi K, Eliasson R, Paulsen C, Gallegos A, Prasad M. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Singapore: Press Concern; 1980.
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5. utgave. Geneva: WHO Press; 2010.
3. Lilja H, Malm J, Sperman I, Fredricsson B, Pousette Å, red. Andrologi. Stockholm: Almqvist & Wiksell Medicin; 1994. s. 77-84.

4. Alvarez C, Castilla J, Martinez L, Ramirez J, Vergara F, Gaforio J. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod.* 2003;18:2082-8.
5. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 4. utgave. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
6. Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum Reprod.* 2011;26:3207-12.
7. Sikka SC, Hellstrom WJ. Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian J Androl.* 2016;18:392-401.
8. Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U, et al. A practical guide to basic laboratory andrology. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
9. Björndahl L, Soderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod.* 2003;18:813-6.
10. Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984;70:219-28.
11. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod.* 1990;5:586-92.
12. Menkveld R, Holleboom CA, Rhemrev JP. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl.* 2011;13:59-68.
13. Comhaire F, De Kretser D, Farley T. Towards more objectivity in diagnosis and management of male factor infertility. Results of a World Health Organization multicentre study. *Int J Androl.* 1987;7:1-53.
14. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker H, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010;16:231-45.
15. Abshagen K, Behre HM, Cooper TG, Nieschlag E. Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertil Steril.* 1998;70:355-6.
16. Evenson D, Darzynkiewicz Z, Melamed M. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 1980;210:1131-3.
17. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 2002;23:25-43.
18. Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, Agarwal A. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33:291-300.

19. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017;19:80-90.
20. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology.* 2014;81:5-17.
21. Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl.* 2015;17:545-53.
22. Redmon JB, Thomas W, Ma W, Drobnis EZ, Sparks A, Wang C, et al. Semen parameters in fertile US men: the Study for Future Families. *Andrology.* 2013;1:806-14.
23. Haugen TB, Egeland T, Magnus Ø. Semen parameters in Norwegian fertile men. *J Androl.* 2006;27:66-71.
24. Guzik 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;345:1388-93.
25. Björndahl L. What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Hum Fertil.* 2011;14:179-86.
26. Ford WCL. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl.* 2010;12:59-63.
27. Bonde JPE, Ernst E, Jensen TK, Hjøllund NHI, Kolstad H, Scheike T, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet.* 1998;352:1172-7.
28. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jørgensen N, Horte A, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod.* 2002;17:503-15.
29. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjøllund NH, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum Reprod.* 2000;15:1562-7.
30. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril.* 2006;85:629-34.
31. Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Duleba AJ. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. *Int J Androl.* 2008;31:499-507.
32. Tomlinson M. Uncertainty of measurement and clinical value of semen analysis: has standardisation through professional guidelines helped or hindered progress? *Andrology.* 2016;4:763-70.
33. Björndahl L, Haugen TB. Hva forteller en sædanalyse? *Tidsskr Nor Lægeforen.* 2008;128:320-3.