

Avaliação de qualidade de sêmen: reconhecendo as limitações e encarando os desafios

Leonardo F. C. Brito

ABS Global, 1525 River Rd, DeForest, WI 53532, USA; Email:

leo.brito@genusplc.com

1. Introdução

Vários testes para avaliação da qualidade do sêmen foram desenvolvidos nas últimas cinco décadas (Rodriguez-Martinez & Barth, 2007). Entretanto, o objetivo de prognosticar a fertilidade de um touro ou de uma partida de sêmen baseado em exames laboratoriais ainda é elusivo. A diversidade de atributos necessários para conferir ao espermatozóide capacidade fertilizante, a constituição heterogênea da população de espermatozoides das amostras e as limitações de avaliação de fertilidade dificultam a possibilidade de prognosticar fertilidade (Amann & Hammerstedt, 1993; Moce & Graham, 2008).

Infelizmente, a percepção errônea de que partidas de sêmen provenientes de centrais de produção idôneas podem ser “classificadas e rankeadas” de acordo com fertilidade baseando-se em exames de laboratório ainda é bastante difundida, o que gera desnecessária frustração entre os profissionais envolvidos com produção de sêmen, veterinários, representantes comerciais e produtores. É extremamente importante entender as limitações dos testes laboratoriais de qualidade de sêmen para se ter expectativas realistas e que se possa investir energia, tempo e dinheiro de maneira inteligente.

O objetivo deste manuscrito é apresentar os fatos que precluem a utilização de exames de avaliação de sêmen como um teste clínico e descrever a real utilidade desses exames no contexto da inseminação artificial na pecuária bovina.

2. Exames laboratoriais e diagnóstico clínico

A validade de exames laboratoriais para diagnóstico clínico depende de dois fatores: definição de caso e execução do exame propriamente dito. Com respeito a definição de caso, o parâmetro avaliado deve não apenas ter uma relação direta com a “condição” ou “doença”, mas também deve-se conhecer a sensibilidade e a especificidade dos resultados para diagnóstico. Quanto a execução do exame propriamente dito, a obtenção de resultados exatos e precisos depende dos métodos e equipamentos utilizados, da proficiência dos profissionais conduzindo o exame, além da adoção de programas de garantia e controle de qualidade no laboratório. Exames laboratoriais para os quais esses dois fatores não são considerados tem limitado valor para diagnóstico clínico.

O diagnóstico de diabetes pode ser usado como exemplo (Figura 1). A definição de caso nesse exemplo é bastante clara, ou seja, o indivíduo com diabetes apresenta deficiência de produção de insulina e a concentração de glicose sanguínea em jejum maior que 126 mg/dL apresenta sensibilidade e especificidade adequadas para

diagnóstico. Além disso, os métodos e equipamentos recomendados para avaliação de glicose são claramente descritos e periodicamente revisados pela Organização Mundial de Saúde (WHO), programas de garantia e controle de qualidade para laboratórios são recomendados pela Organização Internacional para Padronização (ISO) e laboratórios clínicos são geralmente submetidos a acreditação por entidades governamentais ou conselhos médicos para assegurar a adequação dos procedimentos.

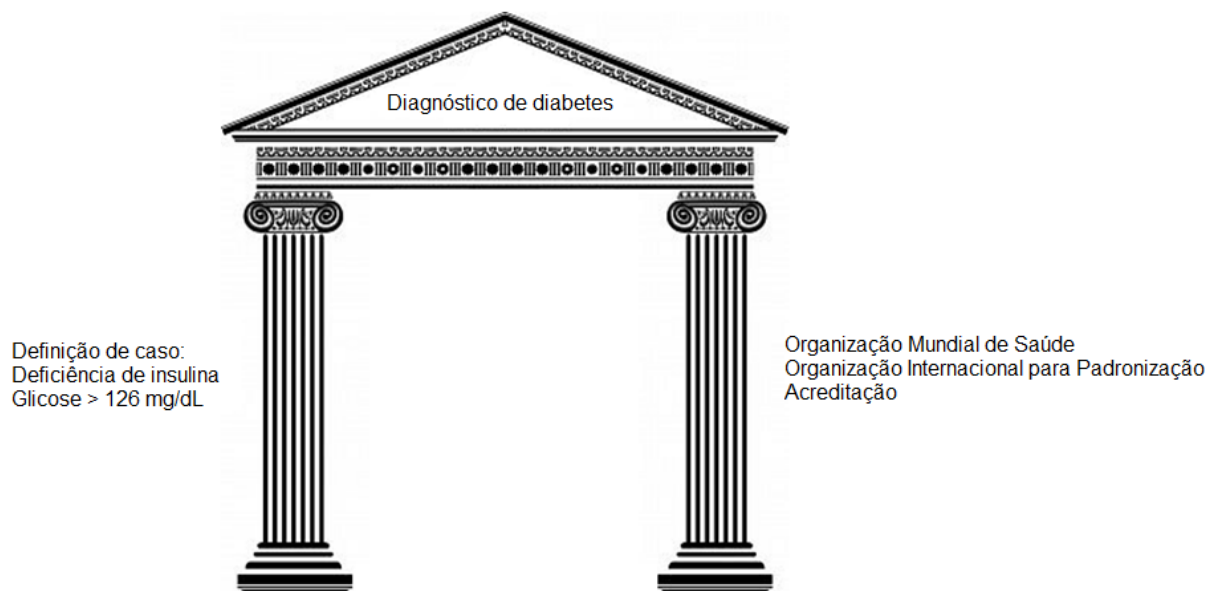


Figura 1. A validade de exames laboratoriais para diagnóstico clínico depende da definição de caso, que inclui a relação do parâmetro avaliado com a condição e a sensibilidade e a especificidade dos resultados para diagnóstico, além da obtenção de resultados acurados e precisos. No exemplo do diagnóstico de diabetes, a definição de caso é clara, uma específica concentração de glicose sanguínea apresenta sensibilidade e especificidade adequadas para diagnóstico e os procedimentos para avaliação de glicose são estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, Organização Internacional para Padronização e entidades governamentais ou conselhos médicos responsáveis pela acreditação de laboratórios clínicos.

3. Avaliação de sêmen como diagnóstico clínico

3.1. Definição de caso

Existem vários problemas associados com a percepção de que avaliação de sêmen pode ser usada para diagnóstico de fertilidade. A primeira dificuldade é referente a definição de caso. Não existe uma clara definição de caso porque fertilidade pode ser vista como uma condição do tipo positivo/negativo (fertilidade baixa ou alta) ou como uma variável contínua (taxa de prenhez), além do fato de que prenhez pode ser detectada pelo não retorno ao cio, por ultrasonografia ou palpação após inseminação, ou até mesmo pelo nascimento do bezerro. Mais importante, é preciso reconhecer as

limitações de avaliação de dados de fertilidade. Fertilidade pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\text{Fertilidade} = \text{Taxa de detecção de cio e IA (\%)} \times \text{Taxa de eficiência do inseminador (\%)} \times \text{Fertilidade da fêmea (\%)} \times \text{Fertilidade do sêmen (\%)};$$

é importante entender que os fatores nessa equação são expressos em percentagem e que fertilidade é o produto da multiplicação, e não adição desses fatores. Dessa forma, a fertilidade máxima jamais será superior ao menor fator incluído nessa equação, o chamado fator limitante.

Como exemplo, consideremos um rebanho em que todos os fatores são excelentes (90%). Ainda assim, a fertilidade esperada seria de 65,6% ($0,9 \times 0,9 \times 0,9 \times 0,9$) e não 90%. A simples redução da taxa de fertilidade das fêmeas para 50% causa uma drástica redução da fertilidade para 36,4% sem nenhuma mudança nas taxas de detecção de cio/IA, eficiência do inseminador e fertilidade do sêmen ($0,9 \times 0,9 \times 0,5 \times 0,9$).

Vários estudos em rebanhos leiteiros indicam que diferenças em fertilidade entre touros comerciais provados são mínimas e responsáveis por apenas aproximadamente 1% da variação da fertilidade do rebanho (Everett & Bean, 1986; Kuhn et al., 2008; Abdel-Azim, 2010). A maior variabilidade encontrada em fertilidade está associada aos efeitos relacionados ao rebanho, tais como como nutrição, manejo, sanidade, meio ambiente, técnica de inseminação e descongelamento do sêmen, consaguinidade e genética (Figura 2). Em um estudo recente avaliando o efeito do uso de protocolos de sincronização de cio e sêmen sexado, o efeito da fêmea e do rebanho nos resultados de fertilidade foram 25 a 31 vezes maiores que o efeito da variação em fertilidade dos touros avaliados (Abdel-Azim, 2010).

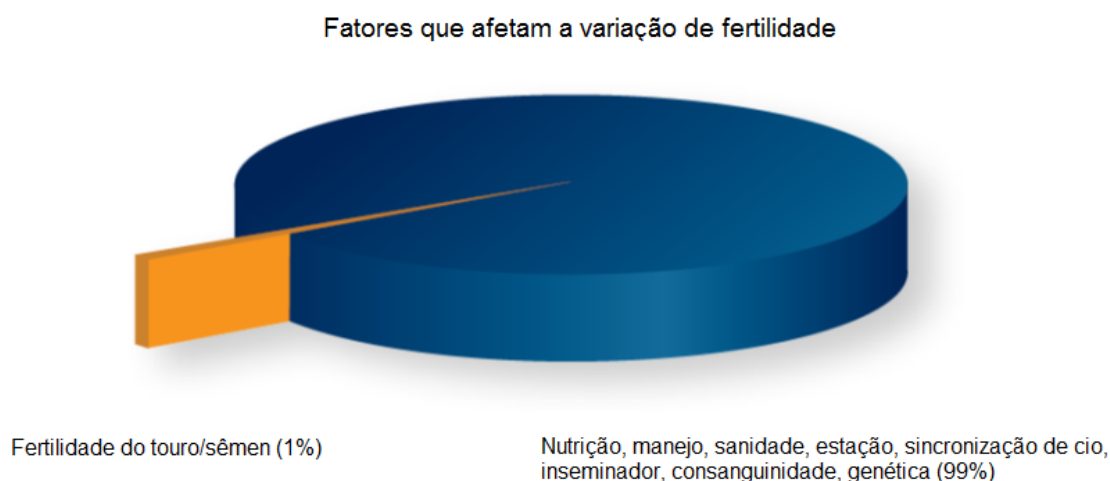


Figura 2. Estudos em rebanhos leiteiros indicam que diferenças em fertilidade entre touros são responsáveis por apenas aproximadamente 1% da variação da fertilidade e que a maior variabilidade encontrada em fertilidade está associada com efeitos relacionados ao rebanho.

Os resultados de um estudo conduzido pela ABS para demonstrar o efeito de fatores relacionados ao rebanho estão ilustrados na Figura 3 (dados não publicados). Como pode ser observado, houve grande variação de fertilidade quando sêmen da mesma partida de um mesmo touro foram utilizados em diferentes rebanhos. Outros resultados interessantes foram obtidos pelo grupo Pfizer-Gerar que compila resultados obtidos em rebanhos de carne que utilizam IATF no Brasil. Os dados obtidos por esse grupo (comunicação pessoal) indicam que o número de propriedades com taxas médias de prenhez superior a 50% cresceu de 41% na estação 2009-2010 para 59% na estação de 2010-2012. Uma possível explicação para esses resultados seria uma drástica mudança da população de touros e um súbito aperfeiçoamento dos métodos de produção e controle de qualidade de sêmen congelado. Contudo, a explicação mais provável é que os resultados foram positivamente influenciados pela experiência adquirida ao longo dos anos e uma maior conscientização de que resultados satisfatórios requerem grande atenção aos detalhes que afetam a fertilidade das fêmeas.

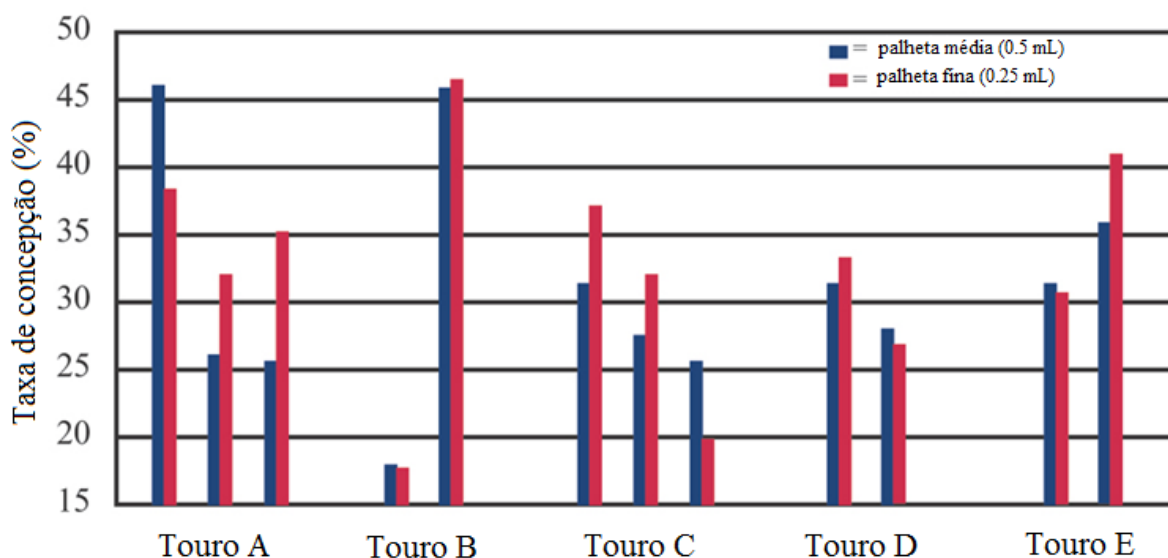


Figura 3. Exemplo da variação da taxa de concepção da mesma partida de um mesmo touro (A-E) em diferentes rebanhos representados por colunas diferentes (isto é, três rebanhos para os touros A e C e dois rebanhos para touros B, D e E). Observe a grande variação de fertilidade entre os rebanhos.

É também importante lembrar que taxa de prenhez é uma variável binominal pois existem apenas dois resultados possíveis, isto é, a fêmea está prenhe ou ela não está. Variação binominal é basicamente a influência do acaso em um ou outro resultado. Por exemplo, com cada lançamento de uma moeda há uma probabilidade de 50:50 de obtenção de “cara” ou “coroa”. Entretanto, a probabilidade de que se obtenha exatamente 50% “cara” em uma série de observações é menor do que a probabilidade de que se obtenha outras combinações; a probabilidade “real” só é observada quando um grande número de observações são conduzidas. A distribuição de resultados de variáveis binominais obedece leis matemáticas e pode ser descrita usando intervalos de confiança colocados em ambos os lados da média. Por exemplo, um intervalo de

confiança de 95% indica que espera-se resultados entre esse intervalo em 95% dos casos.

O intervalo de confiança de 95% para taxas de prenhez pode ser calculado usando-se a seguinte equação (Amann, 2005):

$$\text{Intervalo de confiança de 95\%} = 1.96 \times \sqrt{(\text{probabilidade de prenhez} \times 1 - \text{probabilidade de prenhez}) / \text{número de inseminações}};$$

dessa forma, em rebanhos de corte utilizando IATF, onde a fertilidade esperada é de aproximadamente 50%, o intervalo de confiança de acordo com o número de inseminações é descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Intervalo de confiança de 95% e taxa de prenhez esperada para um rebanho com probabilidade de prenhez de 50% de acordo com o número de inseminações.

Inseminações	Intervalo de confiança	Prenhez esperada
25	19.6%	30.4 – 69.6%
50	13.9%	36.1 – 63.9%
75	11.3%	38.7 – 61.3%
100	9.8%	40.2 – 59.8%
200	6.9%	43.1 – 56.9%
500	4.4%	45.6 – 54.4%

Portanto, a comparação de resultados entre touros deve considerar não apenas as condições de uso (nutrição, manejo, estação, inseminador, etc), mas também a sobreposição dos intervalos de confiança dos resultados (Amann & DeJarnette, 2012). A Figura 4 ilustra o exemplo de resultados obtidos em um rebanho no qual foi usado sêmen de cinco touros para inseminar 250 fêmeas. Uma variação da taxa de prenhez entre touros de 40 a 60% em muitos casos gera pânico entre o produtor, inseminador, veterinário, e representantes comerciais, todos procurando uma resposta (ou algo ou alguém para culpar) pela percepção de que alguns touros apresentaram resultados insatisfatórios. Entretanto quando consideramos o intervalo de confiança de acordo com o número de inseminações, vemos que na realidade não existe nenhuma diferença significativa entre os touros e que a variação observada está dentro daquela esperada devido ao acaso. Em outras palavras, não existe nenhuma indicação que o ranking de fertilidade será o mesmo em futuras inseminações (quando novamente voltarmos a lançar a moeda) e nenhuma indicação de que algum touro apresenta problema de fertilidade.

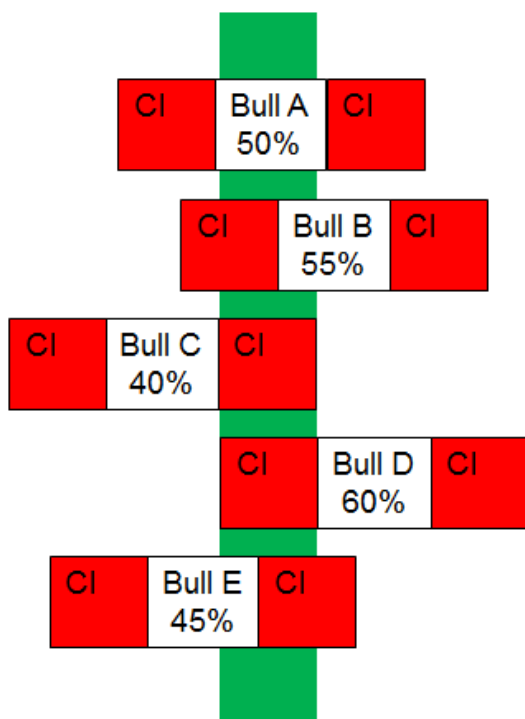


Figura 4. Exemplo da variação esperada da taxa de prenhez em um rebanho no qual a probabilidade de prenhez é de 50% e no qual foi usado sêmen de cinco touros para inseminação de 250 fêmeas. Apesar da aparente diferença de fertilidade entre os touros (40 a 60%) a sobreposição (zona em verde) dos intervalos de confiança (CI; 13.9%) indica que não existe diferença significativa de fertilidade.

Outro problema relacionado a definição de caso está relacionado a associação dos resultados dos exames laboratoriais com a fertilidade. As correlações de motilidade e morfologia espermáticas com fertilidade entre diferentes estudos são inconsistentes (Moce & Graham, 2008) e geralmente são bastante baixas quando se usa sêmen pre-selecionado. Por exemplo, estudos conduzidos pela ABS em rebanhos de leite (dados não publicados) demonstram que a fertilidade obtida com partidas com motilidade entre 30 e 40% foi semelhante a fertilidade obtida com partidas com motilidade superior a 40% (Tabela 2). Em rebanhos de corte que fazem parte da rede ABS Pecplan de IATF, diferenças nas taxas de prenhez entre touros também não parecem estar associadas a diferenças em motilidade e morfologia espermáticas ou número de espermatozóides móveis na dose inseminante (Tabela 3).

Tabela 2. Fertilidade de amostras de sêmen selecionadas de acordo com a motilidade espermática após a descongelação em rebanhos de leite.

	Motilidade 30-40%	Motilidade >40%
Inseminações	285.639	288.048
Motilidade média	33%	46%
Taxa de prenhez	75.5%	75%

Tabela 3. Resultados de exames de sêmen e taxa de prenhez de touros de corte usados em programas de IATF no Brasil. Resultados de avaliação de sêmen são médias obtidas entre janeiro e dezembro de 2010. Taxas de prenhez são médias obtidas entre 2009 e 2011.

	Normal (%)	Motilidade (%)	Espermatoz. móveis (milhões)	Número de inseminações	Taxa de prenhez (%)
Touro A	83	57	11	3.669	45
Touro B	84	54	10	7.914	55
Touro C	84	55	11	1.504	34
Touro D	85	60	11	9.989	56
Touro E	79	56	12	1.057	47

Outro exemplo são os resultados de um recente estudo no Brasil, que demonstrou que a motilidade espermática após teste de termoresistência não teve qualquer associação com fertilidade após a inseminação de 4.920 vacas Nelore (Vianna et al., 2009). Esses autores demonstraram que amostras que não continham nenhum espermatozóide móvel após incubação a 46°C por 30 minutos ou a 38°C por 5 horas produziram taxas de prenhez similares a amostras que apresentavam motilidade superior a 40% após incubação quando usadas para inseminação imediatamente após a descongelação (73 vs 70% e 63 vs 66%, respectivamente).

3.2. Execução de exames de qualidade de sêmen

Embora às vezes vistos como triviais, a obtenção de resultados exatos e precisos de análise de sêmen exige conhecimento dos princípios e peculiaridades de diferentes testes e equipamentos, em conjunto com programas de garantia e controle de qualidade, incluindo educação e avaliação de proficiência dos profissionais realizando exames (Keel, 2002; Brito, 2010; Pacey 2010). Estudos realizados por laboratórios humanos de andrologia demonstram grandes variações nos resultados de avaliação de sêmen entre laboratórios e até mesmo dentro de um mesmo laboratório (Keel et al., 2000; Alvarez et al., 2005). Os resultados de um estudo envolvendo seis laboratórios nos Estados Unidos demonstrou que os mesmos desafios são enfrentados por laboratórios de andrologia veterinária (dados não publicados). Dez partidas foram utilizadas e cinco repetições da mesma partida foram codificadas com números de identificação diferentes; portanto cada laboratório recebeu 50 amostras para avaliação.

Similarmente ao observado em estudos envolvendo laboratórios de andrologia humanos, os resultados de morfologia, motilidade e concentração espermática foram diferentes entre os laboratórios (Figura 5). A distribuição dos resultados relatados por cada laboratório de acordo com a média geral para cada partida são ilustradas na Figura 6. As diferenças na concentração de espermatozóides variaram entre cerca de -20 a +20 x 10⁶ espermatozóides/mL, enquanto que variações muito maiores foram

observados para motilidade (aproximadamente -30 a +30%) e morfologia (aproximadamente -15 a 15%). Além das diferenças entre laboratórios, houve também considerável diferença entre as repetidas análises da mesma partida dentro do mesmo laboratório, como indicam os coeficientes de variação (CV) descritos na Tabela 4.

As diferenças de resultados relatados por diferentes laboratórios coloca a confiabilidade da análise do sêmen em cheque e demonstra o quanto é difícil, senão impossível, para veterinários e produtores interpretarem de forma significativa os resultados da avaliação do sêmen. Este estudo também demonstra claramente a falácia da adoção de valores de referência indicativos da qualidade do sêmen sem abordar as questões relacionadas com a qualidade dos procedimentos de análise propriamente ditos.

Tabela 4. Coeficiente de variação (%) intra-laboratório médio (mínimo-máximo) para avaliação de morfologia, motilidade e concentração espermáticas. Valores são baseados em resultados da avaliação de 10 partidas em cinco repetições.

	Morfologia	Motilidade	Concentração
Lab I	8.0 (3 to 14)	8.6 (4 to 12)	4.6 (2 to 13)
Lab J	7.7 (5 to 11)	19.6 (7 to 42)	17.3 (8 to 25)
Lab K	8.5 (3 to 13)	17.7 (7 to 31)	86.9 (52 to 135)
Lab L	9.5 (3 to 21)	16.9 (9 to 36)	9.4 (3 to 30)
Lab M	8.1 (4 to 10)	14.6 (0 to 25)	24.7 (12 to 56)
Lab N	5.9 (1 to 10)	18.2 (8 to 31)	39.8 (14 to 79)

4. Objetivo de avaliação de sêmen

Quando avaliamos os critérios necessários para se estabelecer um exame clínico válido (Figura 1) e confrontamos estes com a realidade da possibilidade de utilizar exames laboratoriais de qualidade de sêmen para “diagnosticar” (ou prognosticar) fertilidade, podemos perceber claramente que avaliação de sêmen não pode ser usada como teste de diagnóstico clínico (Figura 7). Porque então realizamos avaliação de sêmen? O objetivo da avaliação de sêmen é identificar touros ou partidas com os quais se espera obter fertilidade muito abaixo da média, ou em outras palavras, identificar touros ou partidas que com um bom grau de certeza podem ser classificados(as) com inférteis ou subférteis (Amann & Hammerstedt, 1993; Amann & DeJarnette, 2012).

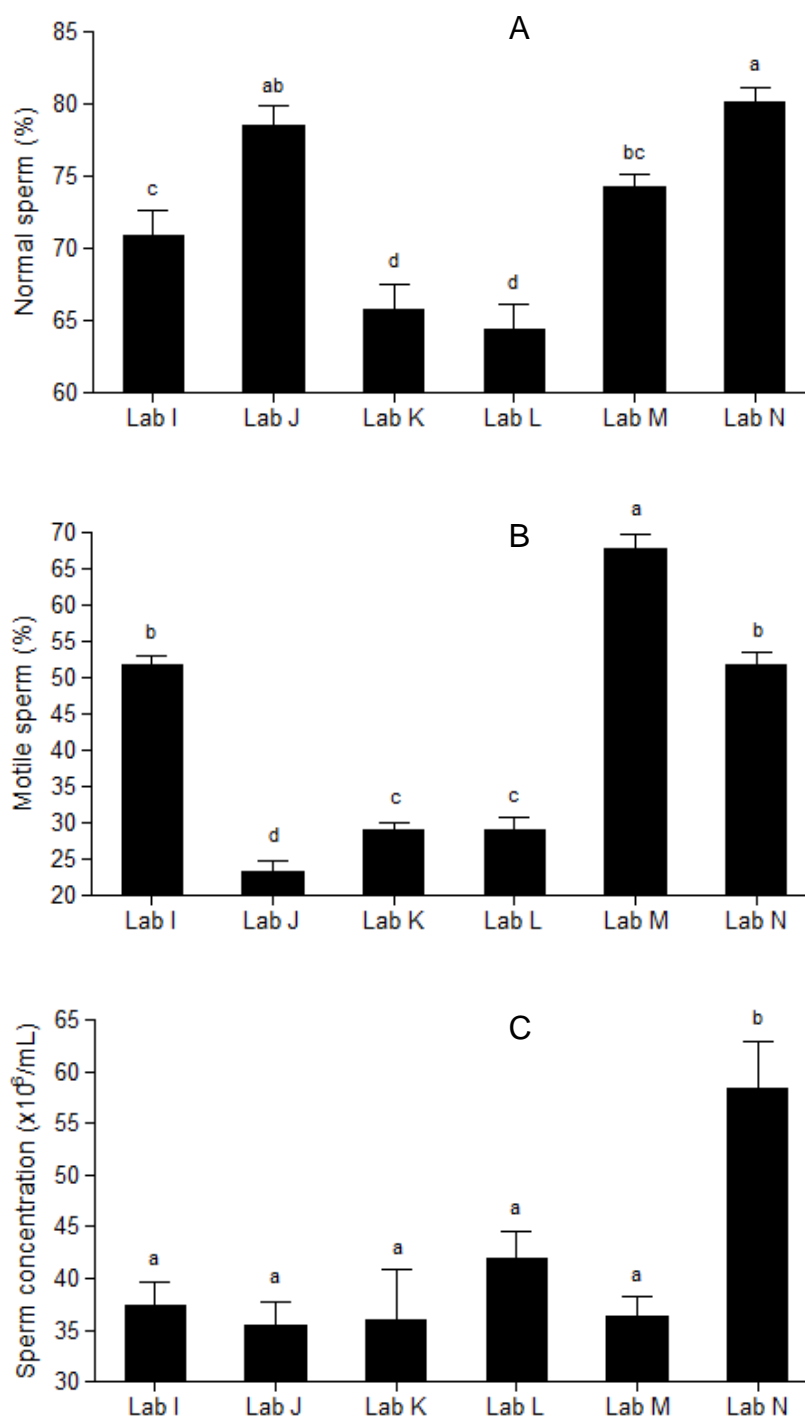


Figura 5. Média (\pm erro padrão) de resultados de morfologia (A), motilidade (B) e concentração (C) determinadas em 10 amostras (5 repetições) em diferentes laboratórios de andrologia veterinária nos Estados Unidos. ^{a,b,c,d}Colunas com sobrescritos diferentes apresentam diferença estatística ($P < 0.05$).

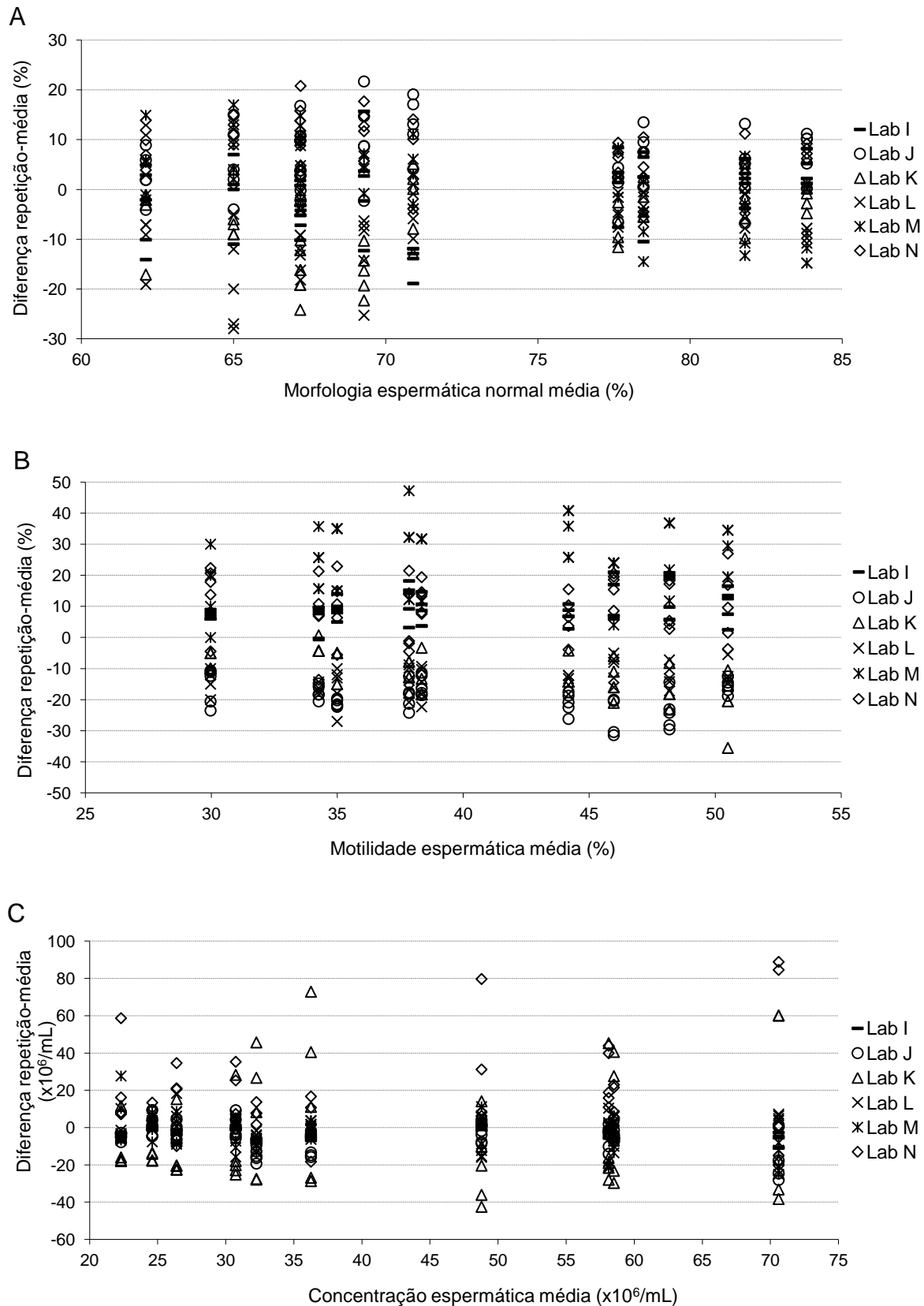


Figura 6. Distribuição de resultados de morfologia (A), motilidade (B) e concentração (C) determinadas em 10 amostras (5 repetições) em diferentes laboratórios de andrologia veterinária nos Estados Unidos.

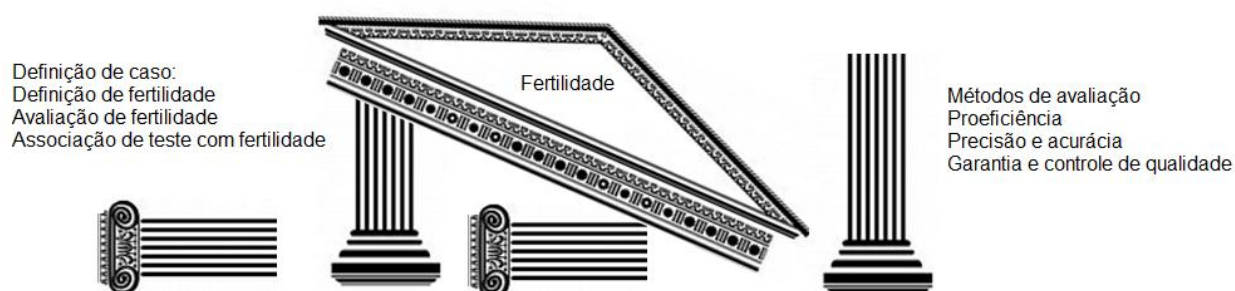


Figura 7. O uso de avaliação de sêmen para diagnóstico clínico de fertilidade não é um procedimento válido porque não existe uma clara definição de caso, a associação dos resultados da avaliação com fertilidade é inconsistente, e a variação de resultados obtidos em diferentes laboratórios é muito grande.

Dessa forma, o valor da avaliação de qualidade do sêmen se encontra justamente no processo de controle de qualidade de centrais de produção. O objetivo principal do controle de qualidade de uma central de produção é assegurar a integridade e qualidade do sêmen vendido comercialmente. Programas de controle de qualidade visam assegurar que o produto liberado para a venda é livre de doenças conhecidas e deve fornecer fertilidade adequada. Isto requer cuidadosa documentação de procedimentos, funcionários bem treinados e meticolosos e estrita observação aos detalhes de protocolos de operação para processamento e avaliação do sêmen. Resultados do programa de controle de qualidade da ABS Global indicam que apenas aproximadamente 60% das partidas produzidas de touros de corte são liberadas para comercialização, enquanto que aproximadamente 25% do total (touros de carne e leite) são consideradas insatisfatórias e descartadas (Figura 8).

O resultado do controle de qualidade posto em prática em centrais de produção pode ser observado através do pequeno desvio da fertilidade observada na maioria dos touros. Por exemplo, de acordo com os dados de abril de 2011, 93, 87, 100, 92 e 87% dos touros Ayrshire, Pardo Suíço, Guernsey, Holândes e Jersey, respectivamente, apresentaram fertilidade apenas 3 pontos percentuais acima ou abaixo da média da população (Amann & DeJarnette, 2012). Além disso, dados da rede ABS Pecplan de IATF para touros de corte indicam que a taxa de prenhez estacional média variou apenas 2 pontos percentuais durante três estações, isto é, 53% na estação 2008-2009 (22.770 AI), 55% na estação 2009-2010 (42.029 IA) e 52.8% (42.394 IA) na estação 2010-2011.

Apesar dos bons resultados obtidos com o uso de sêmen congelado e da baixa variação de fertilidade observada em rebanhos, a National Association of Animal Breeders (NAAB) e Certified Semen Services (CSS) instituíram recentemente um “Programa de Controle de Qualidade Sêmen”. A NAAB e CSS são entidades responsáveis pela auto-regulação da indústria de inseminação artificial na América do Norte. A conformidade com os padrões e diretrizes mínimas recomendadas pela NAAB e CSS são estabelecidas através da assinatura de contratos e é avaliada através de auditorias não-anunciadas anuais. O “Programa de Controle de Qualidade Sêmen” foi lançado em janeiro de 2011 como resultado de um processo de dois anos envolvendo inúmeras discussões, reuniões, teleconferências e consultas (Mitchell, 2012).

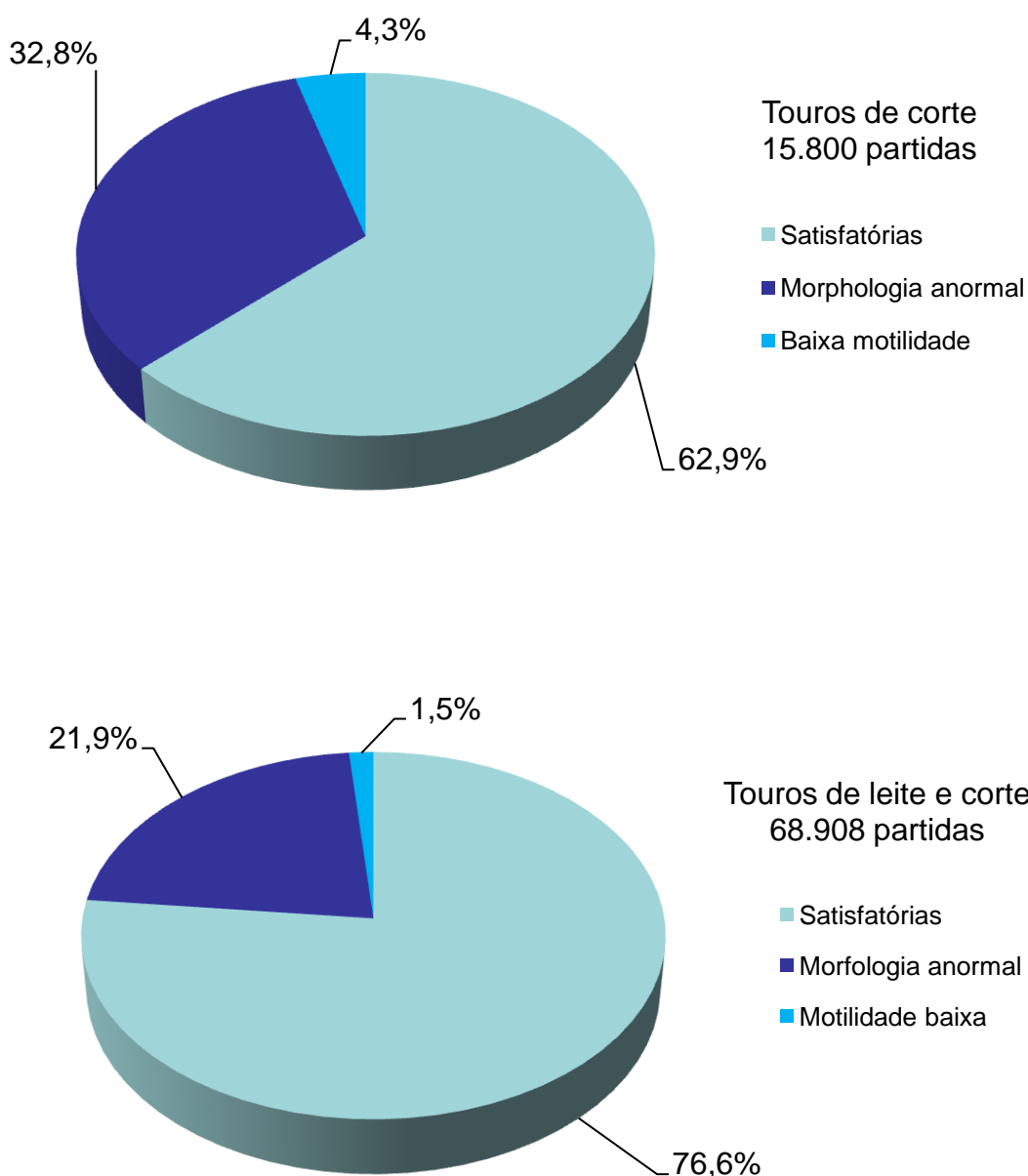


Figura 8. Resultados da produção de sêmen na ABS Global durante um período de cinco anos usando critérios de morfologia espermática e motilidade após descongelamento para controle de qualidade. Apenas 63% das partidas de touros de corte foram consideradas satisfatórias e liberadas para comercialização. No geral, aproximadamente 25% das partidas são descartadas. Na ABS Global a percentagem de partidas descartadas devido a motilidade inadequada é relativamente baixa porque apenas as partidas com morfologia normal são submetidas ao processo de congelamento.

As recomendações iniciais incluem descrição do programa de controle de qualidade, procedimentos para determinação do número de espermatozoides por dose, documentação dos valores pós-descongelamento e desenvolvimento de procedimentos para treinamento e avaliação de competência (Mitchell, 2012). Em 2012 foi também criada uma nova comissão que tratou de desenvolver um documento de orientação para procedimentos de rotina de avaliação de morfologia, motilidade e concentração espermáticas, além de organizar um workshop de análise de sêmen realizado durante a conferência técnica da NAAB (Brito, 2012). Essas iniciativas devem ajudar a assegurar aos consumidores o comprometimento das empresas produtoras de sêmen com a qualidade de seus produtos.

5. Conclusões

Estudos demonstram que a fertilidade do sêmen é responsável por apenas 1% da variação nas taxas de prenhez, indicando que a fertilidade do sêmen raramente é um fator limitante. Dessa forma, produtores devem focar recursos em estratégias para aumentar a taxa de detecção de cios/IA, a eficiência dos inseminadores e a fertilidade das fêmeas, já que esses têm um impacto muito maior sobre as taxas de prenhez.

Não se deve pensar em análise de sêmen como um exame clínico, devido às limitações impostas pela necessidade de definição de caso e as dificuldades envolvidas na execução das avaliações. Análise do sêmen é utilizada como procedimento para controle de qualidade para identificação de amostras com as quais se espera fertilidade muito abaixo da média. Análise de sêmen não é útil para a classificação de amostras de acordo com a fertilidade.

Mais importante, deve sempre ter-se em mente o principal objetivo da utilização de biotécnicas da reprodução, isto é, promover rápido melhoramento genético. Produtores, técnicos e veterinários devem procurar identificar touros que satisfaçam os objetivos genéticos para o rebanho e dar preferência a centrais conhecidas e de renome com elevados padrões de controle de qualidade. Fertilidade deve ser considerada um critério secundário e avaliada através de sumários e não através de estimativas baseadas em exames laboratoriais do sêmen.

6. Bibliografia

- Abdel-Azim G. Effect of synchronization and semen sorting on artificial insemination bull fertility. *J Dairy Sci* 93:420-5, 2010.
- Alvarez C, Castilla JA, Ramirez JP, Vergara F, Yoldi A, Fernandez A, Gaforio JJ. External quality control program for semen analysis: Spanish experience. *J Assist Reprod Genet* 22:379-87, 2005.
- Amann RP. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. *Theriogenology* 63:698-715, 2005.
- Amann RP, DeJarnette JM. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. *Theriogenology* 77:795-817, 2012.

- Ammann RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 14:397-406, 1993.
- Brito LF. Variations in laboratory semen evaluation procedures and testing. *Proc Tech Conf Artif Insem and Reprod*. 2010.
- Brito LF. NAAB/CSS semen quality control program. *Proc Tech Conf Artif Insem and Reprod*. 2012.
- Everett RW, Bean B. Semen fertility--an evaluation system for artificial insemination sires, technicians, herds, and systematic fixed effects. *J Dairy Sci* 69:1630-41, 1986.
- Keel BA, Quinn P, Schmidt Jr. CF, Serafy Jr. NT, Serafy Sr. NT, Schalue TK. Results of the American Association of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. *Hum Reprod* 15:680-6, 2000.
- Keel BA. Quality control, quality assurance, and proficiency testing in the andrology laboratory. *Arch Androl* 48:417-431, 2002.
- Kuhn MT, Hutchison JL, Norman HD. Modeling nuisance variables for prediction of service sire fertility. *J Dairy Sci* 91:2823-35, 2008.
- Mitchell JR. Developing an NAAB/CSS semen quality control program. *Proc Assoc Appl Anim Androl Conf*. 2012 (www.ivis.org).
- Moce E, Graham JK. In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci* 105:104-18, 2008.
- Pacey AA. Quality assurance and quality control in the laboratory andrology. *Asian J Androl* 12: 21-25, 2010.
- Rodriguez-Martinez H, Barth AD. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64:39-54, 2007.
- Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell'Aqua Jr JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. *Anim Reprod Sci* 113:279-282, 2009.