

GUÍA PRÁCTICA

Guía práctica para la evaluación del semen

Ariagno, Julia¹; Mormandi, Edaurdo²

¹ Laboratorio de Fertilidad Masculina, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Endocrinología, Grupo de Reproducción Humana, División Endocrinología, Hospital Carlos G. Durand. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: Eduardo Mormandi. E-mail: androsite@gmail.com

Resumen

El espermograma es un examen de laboratorio esencial en la evaluación de la infertilidad para el estudio de las enfermedades genitales masculinas y de otras patologías, como las provocadas por la exposición a productos químicos, factores ambientales y medicamentos, entre otras causas.

El análisis del semen o espermograma incluye la evaluación de los espermatozoides, el plasma seminal y la presencia de otras células como leucocitos y células de la línea germinal. También, aporta información importante en cuanto al proceso de espermatogénesis, la función de los espermatozoides y de las glándulas anexas. Se evalúan las características generales del semen tanto macroscópicas: color y aspecto, viscosidad, licuefacción y volumen, como así también parámetros microscópicos, tales como número de espermatozoides, movilidad, morfología y vitalidad.

Se debe realizar un control de calidad riguroso que garantice reproducir de los resultados y minimice los errores inter e intra-observador.

Esta guía da los lineamientos esenciales para la realización de una correcta evaluación del semen humano, de acuerdo con las normativas de la Organización Mundial de la Salud.

Palabras claves: espermática, infertilidad, morfologías, recomendaciones.

Abstract

Semen analysis is an essential laboratory test in the evaluation of infertility for the study of male genital diseases and other diseases such as those caused by exposure to chemicals, environmental factors and drugs. Semen analysis includes assessing sperm, seminal plasma and the presence of other cells such as leukocytes and germ line cells. This analysis provides important information on the process of spermatogenesis, sperm function and function of annex glands. This analysis includes both a macroscopic examination (color, appearance, viscosity, liquefaction and volume of semen) and a microscopic examination (sperm count, motility, morphology and vitality). A rigorous quality control should also be made to ensure the reproducibility of the results and minimize inter- and intra-observer errors. This guide provides the essential guidelines to conduct a proper assessment of human semen according to the regulations of the World Health Organization.

Key words: spermatic, infertility, morphology, recommendations

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM
Código Bibliográfico: RByPC
Fecha de Recepción:
24/02/2015
Fecha de Aceptación:
19/04/2016

Introducción

Análisis del semen

Uno de los principales factores relacionados con la fertilidad es la producción espermática, que se valora mediante el espermograma. El mismo consiste en la evaluación macroscópica y microscópica del semen.

Lamentablemente la gran variabilidad intraindividual de los parámetros del semen, limita la utilidad de este estudio dado que, muestras recogidas por un mismo individuo, bajo las mismas condiciones y con el mismo período de abstinencia, pueden mostrar variaciones en todos los parámetros¹, por lo que se sugiere realizar por lo menos dos espermogramas antes de arribar a un diagnóstico definitivo^{2,3}.

Materiales y Método

Etapa pre-analítica

Preparación del paciente y toma de muestra:

De acuerdo con las recomendaciones del Manual de Laboratorio para el estudio del semen de la OMS – 2010², la muestra para el espermograma se debe tomar según las siguientes normativas:

- 1- El paciente debe recoger la muestra luego de 2 días y no más de 5 de abstinencia sexual previa al examen (no mantendrá relaciones sexuales ni se masturbará).
- 2- Lo ideal es que la muestra se recoja en la intimidad de una dependencia próxima al laboratorio para que sea procesada rápidamente. De lo contrario, deberá ser

trasladada al laboratorio antes de transcurrida una hora de la recolección y se la protegerá de las temperaturas extremas (no menor de 20°C ni mayor de 37°C) durante el traslado al laboratorio.

- 3- La muestra deberá obtenerse mediante masturbación y eyacularse dentro de un recipiente pequeño, limpio, de vidrio o plástico y de boca ancha. El mismo, de ser posible, deberá estar tibio para reducir el riesgo de shock por frío.
- 4- Cuando por circunstancias especiales no sea posible obtener el semen mediante masturbación, se podrá utilizar un condón de plástico inerte específico para este fin (colector seminal). El *coitus interruptus* no es aceptable para hacer la recolección del semen porque puede perderse la primera porción del eyaculado que contiene la mayor concentración de espermatozoides. Además, puede existir contaminación vaginal (células, bacterias) y el pH ácido vaginal ejerce un efecto adverso sobre la motilidad de los espermatozoides.
- 5- Las muestras incompletas no se deben analizar, pero en aquellos casos tales como: dificultades psicológicas, imposibilidad de repetir el estudio, problemas físicos, y otras circunstancias que así lo ameriten, se procesará la muestra y se informará al médico lo ocurrido.

Las muestras de semen se deben analizar dentro de la primera hora después de su recolección.

Etapa analítica

Evaluación macroscópica:

A. Color

El color normal del semen licuado es gris claro (blanquecino), pudiendo presentar otros colores debido a situaciones patológicas: leucocitospermia (amarillento), hemospermia (rojizo/amarronado) o colores varios por la ingesta de drogas o vitaminas.

B. Aspecto

El aspecto del semen da idea de la cantidad de células que tiene en suspensión, y se relaciona directamente con el volumen de eyaculado, por lo que frente a grandes volúmenes podrá presentar un aspecto menos opaco o viceversa.

Normalmente el semen tiene aspecto opalescente u opaco.

C. Licuefacción

El semen coagula casi inmediatamente después de su eyaculación para nuevamente licuarse entre 5 y 40 minutos después, por la acción del antígeno próstata-específico, pero dado que su traslado puede demorarse hasta 1 hora, la OMS sugiere que todas las muestras sean evaluadas a los 60 minutos post obtención.

En caso de no licuar a los 60 min se observarán en la muestra, coágulos gelatinosos de diversos tamaños en los que los espermatozoides se encontrarán inmóviles. El resultado puede ser normal o anormal, o expresado de otra forma

completa o incompleta después de este tiempo.

D. Volumen

Las glándulas accesorias que más contribuyen al volumen del eyaculado son las vesículas seminales y la próstata, mientras que las glándulas bulbouretrales de Cowper, las glándulas uretrales de Litre y el epidídimo aportan una pequeña fracción.

La OMS recomienda informar los parámetros del semen en el total del eyaculado por lo que la medida precisa del volumen es esencial.

Los métodos recomendados para la medición del volumen son:

Por pesada: se debe recoger el semen en un frasco pre pesado y luego se lo vuelve a pesar con el semen, dado que la densidad del semen es aproximadamente 1g/ml, el peso obtenido será igual al volumen de semen en ml.

El valor de referencia es ≥ 1.5 ml.

E. Viscosidad

Para su estimación se pueden utilizar dos métodos:

- El más sencillo y recomendable consiste en recoger la muestra con pipeta Pasteur de plástico y dejar caer gota a gota.
- También puede hacerse introduciendo una varilla de vidrio en la muestra y observar el filamento que forma al retirarla.

En cualquiera de los dos métodos se considera anormal cuando se forma un filamento de más de 2 cm, mientras que en una muestra normal, la caída debe ser gota a gota.

No hay que confundir una muestra viscosa con una muestra no licuada. El aspecto de la muestra puede ser líquido, homogéneo y luego hacer un gran filamento cuando la recogemos con pipeta Pasteur, en este caso nos encontramos frente a una muestra muy viscosa. El resultado es normal o aumentada.

F. pH

El pH del semen refleja el equilibrio entre los valores de pH de las diferentes secreciones de las glándulas accesorias, principalmente la secreción de vesícula seminal alcalina y la secreción ácida prostática. El pH debe medirse cuando el semen está licuado en un tiempo estandarizado, preferentemente después de 30 minutos de obtenido, de no ser posible se medirá dentro de la hora de la eyaculación.

El pH del semen aumenta normalmente con el tiempo por la pérdida de CO₂ que se produce luego de la eyaculación, por lo que los valores altos de pH proporcionan poca información de utilidad clínica si no fue determinado rápidamente.

Si el pH es inferior a 7,0 en una muestra de semen con un volumen bajo y bajo número de espermatozoides, puede haber obstrucción del conducto eyaculador o frente a muestras azoospermicas tratarse de ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes, condición en la que las vesículas seminales tampoco están presentes.

Se debe medir con papel de pH de rango reducido de 6,0 a 10,0 con buena discriminación entre valores de 7,0 a 8,5.

El procedimiento consiste en:

- Mezclar bien la muestra de semen.
- Extender una gota de semen de manera uniforme sobre el papel de pH.
- Esperar a que el color de la zona impregnada se encuentre uniforme (30seg). El valor de referencia es $\geq 7,2$

Evaluación en fresco del semen:

Como ya se mencionó el semen debe estudiarse dentro de un periodo de tiempo determinado y con condiciones de temperatura precisas, con el fin de asemejar las condiciones fisiológicas y para poder evaluar posibles desviaciones de la muestra respecto de los valores de referencia establecidos por la OMS.

Evaluación microscópica del semen:

El análisis microscópico del semen permite la evaluación de la movilidad, la vitalidad, la concentración y la morfología de los espermatozoides, a la vez que se investiga la presencia de células y/o elementos acompañantes diferentes de espermatozoides, como los leucocitos, células de la progeie espermática, células inflamatorias, bacterias y cristales.

Al igual que con todos los analitos analizados en el laboratorio, la metodología a emplear en esta evaluación debe estar estandarizada para asegurar así que todas las muestras sean evaluadas de misma forma.

Análisis microscópico inicial:

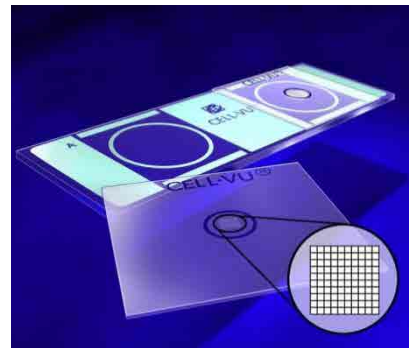
Luego de la evaluación macroscópica se homogeniza bien la muestra con pipeta Pasteur (la homogenización no debe ser tan vigorosa que genere burbujas, porque éstas dificultan la visualización) y se dispensa con pipeta automática un volumen tal de obtener una cámara entre porta y cubreobjetos de alrededor de 20 μm de profundidad, la cual garantiza el movimiento libre de los espermatozoides, a la vez que se distribuirán en monocapa, por lo que no se observarán diferentes planos microscópicos, como ocurre al utilizar un mayor volumen. Para lograr dicha cámara, de emplear cubreobjetos de 22x22mm se deben dispensar 10 μl , con cubreobjetos de 24x24mm dispensar 12 μl y con cubreobjetos de 18x18mm dispensar 7 μl .

Existen en el mercado cámaras para la evaluación del semen tales como CELL-VU® slide con las que se puede evaluar tanto la movilidad como la concentración espermática sin diluir la muestra. Cada portaobjetos-cámara cuenta con dos posiciones (cámaras), facilitando la evaluación por duplicado, cada uno con una profundidad de 20 μm .

Estas cámaras se cargan con aproximadamente 4 μl de semen.

(Figura 1)

Figura 1: Cámara Cell-vu



En el análisis microscópico inicial se debe valorar la presencia de células no espermatozoides, leucocitos, filamentos de moco, cristales (fosfato de espermia), hematíes, espermatozoides agrupados y otros elementos (Trichomonas vaginalis, levaduras, etc.).

Se debe efectuar una primera observación a bajo aumento (100x: lente objetivo de 10x y ocular de 10x) con el fin de visualizar fibras de moco, coágulos, espermatozoides agrupados y luego se debe pasar a una magnificación de 400x donde se realizará la clasificación de la movilidad espermática y de los diferentes elementos presentes estimando además el número de espermatozoides por campo para la determinación de la concentración espermática.

Todos los parámetros microscópicos se deben procesar por duplicado, o sea en 2 alícuotas diferentes de la muestra. Este procedimiento se realiza para minimizar las posibles diferencias debidas a la heterogeneidad propia del semen.

Aceptación o rechazo de los duplicados (tabla válida para movilidad, vitalidad y morfología)

Como ya se mencionó, todas las determinaciones que se informan en forma porcentual se deben realizar por duplicado y se informa el promedio.

Se aceptaran los duplicados y se informara el promedio, si la diferencia entre ambos datos es menor o igual al valor límite que indica la tabla 1 para cada valor de promedio.

Si la diferencia entre porcentajes es mayor a la admitida, debido a errores al contar, se deben descartar los 2 porcentajes y rehacer con nuevas alícuotas.

Una vez aceptados los promedios se informará:

- % de espermatozoides con movilidad progresiva (PR)
- % de espermatozoides con movilidad no progresiva (NP)
- % de espermatozoides inmóviles (IM)

Los valores de referencia son:

- Móviles totales (PR+NP): $\geq 40\%$
- Móviles progresivos (PR): $\geq 32\%$

La estimación de la cantidad de espermatozoides presentes para decidir la dilución a realizar para el recuento espermático puede observarse en la tabla 2.

En el extendido fresco antes descrito se estima el número de espermatozoides presentes por campo (400x), se deben

evaluar varios campos y promediar las observaciones. Como se describió previamente la observación microscópica inicial se realiza en una cámara cuya altura es 20µm y a 400x, lo que determina que el volumen de cada campo sea aproximadamente de 4nl [diámetro aproximado del campo microscópico: 500µm]², por lo cual al contar la cantidad de espermatozoides presentes por campo se tendrá una idea aproximada de la concentración espermática de la muestra.

CASA [Computer Assisted Semen Analysis]

El método estándar para evaluar la motilidad espermática ha sido y sigue siendo la clasificación subjetiva de los espermatozoides en el semen. Este método sin embargo, es objeto de gran variación inter-laboratorios. La introducción del análisis de semen asistido por computadora [CASA= Computer Assisted Semen Analysis] ha permitido una más objetiva y sofisticada evaluación de la movilidad. La técnica CASA tiene la ventaja de aumentar la precisión y reproducción de las mediciones de movilidad espermática y permite conservar la video-documentación de las muestras analizadas.

Los sistemas CASA están integrados por los siguientes componentes:

- Hardware: ordenador (PC), cámara de video, microscopio óptico de contraste de fase positivo o negativo según el requeri-

miento de cada sistema y platina termostata a 37 °C.

- Software: programa informático compuesto por distintos módulos: movilidad, concentración, morfología, base de datos e informes. Sin embargo, el uso de sistemas CASA presenta algunos inconvenientes:

Se puede tender a una sobreestimación de la concentración espermática, debido a que el software puede contabilizar el mismo espermatozoide dos veces por las colisiones espermáticas. Esta sobrestimación se produce en menor medida cuanto más diluida este la muestra, ya que disminuyen las colisiones.

Algunos equipos como el SCA® [Sperm Class Analyzer, Microptic S.L., Barcelona, España], permiten al operador cambiar las condiciones de medida y otorgar validez a las imágenes digitales.

No existe una estandarización y optimización de los equipos y de los procedimientos utilizados en los análisis.

Cada laboratorio utiliza un equipo diferente, con diferentes características técnicas que dan lugar a resultados muy dispares entre centros.

A los resultados les afectan diferentes factores como la temperatura de la muestra, volumen, tipo de cámara, concentración de la muestra como así también cuestiones vinculadas al suministro eléctrico que condicionan la tensión que llega al equipo. Por ello, es necesario que cada equipo estandarice un protocolo, sabiendo que los resultados serán únicamente aplicables a muestras evaluadas con el equipo en cuestión.

Salvando los inconvenientes, el CASA es el mejor sistema para un análisis preciso y rápido de una muestra de semen⁴.

Test de vitalidad

La OMS indica que el test de vitalidad debe realizarse de forma rutinaria a todas las muestras y considera que es particularmente importante cuando la movilidad progresiva de la muestra es menor de 40%.

El estudio de vitalidad se realiza empleando colorantes supra vitales denominados así, porque penetran en las células cuya membrana plasmática está dañada, por lo que los espermatozoides muertos estarán coloreados y los vivos se verán sin colorante sean móviles o inmóviles.

Se basa en que los colorantes no pueden atravesar una membrana plasmática estructuralmente intacta, de tal forma que un espermatozoide vivo será aquel cuyo núcleo no esté teñido de rojo; y en el caso de que la membrana esté estructuralmente dañada será atravesada por los colorantes, por lo que un espermatozoide muerto será aquel cuyo núcleo se tiña de rojo.

Técnicas sugeridas

Eosina-nigrosina [permite la conservación de los extendidos secos para su evaluación diferida o para emplear como CCI de la determinación].

Eosina [se determina en fresco luego de 30 seg. de mezclar el colorante con la muestra y no se puede conservar el

Tabla 1: Diferencias aceptables entre dos porcentajes según el promedio entre ambos para intervalos de confianza del 95%

Promedio [%]	Diferencia aceptable
0	1
1	2
2	3
3 - 4	4
5 - 7	5
8 - 11	6
12 - 16	7
17 - 23	8
24 - 34	9
35 - 65	10
66 - 76	9
77 - 83	8
84 - 88	7
89 - 92	6
93 - 95	5
96 - 97	4
98	3
99	2
100	1

preparado].

Se informa el porcentaje de Espermatozoides vivos.

El valor de referencia es $\geq 58\%$ de espermatozoides vivos.

Recuento espermático

Cuando el tracto masculino no tiene obstrucciones y el tiempo de abstinencia es corto, el número total de espermatozoides en el eyaculado se correlaciona con el volumen testicular y por lo tanto es una medida de la capacidad de los testículos para producir espermatozoides y la permeabilidad de las vías del tracto. La concentración de espermatozoides en el semen está influida por el volumen de las secreciones de las vesículas seminales y la próstata y no es una medida específica de la función testicular.

Los términos “número total de espermatozoides” y “concentración de espermatozoides” no son sinónimos. La concentración de espermatozoides se refiere al número de espermatozoides por unidad volumen de semen y es función del número de espermatozoides emitidos y del volumen de fluido que los diluye. El número total de espermatozoides se refiere al número total de espermatozoides en todo el eyaculado y se obtiene multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen de semen.

La determinación del número de espermatozoides comprende los siguientes pasos:

1- Mezclar bien el semen sin formar burbujas y cargar, como ya se explicó, un volumen exacto de semen licuado entre porta y cubreobjetos, para determinar la dilución adecuada a realizar. Ésta es por lo general la muestra que se empleará para la evaluación de la motilidad.

2- Luego se mezcla el semen y se preparan las diluciones con el fijador [5g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) + 1ml de formol al 35% (v/v) + H₂O destilada c.s.p. 100 ml]. [tabla 2].

3- Se carga la cámara cuenta células [hemocitómetro] y se deja que los espermatozoides se asienten en la cámara húmeda. La evaluación de las muestras se debe realizar dentro de los siguientes 10 a 15 minutos [después de lo cual la evaporación tiene graves efectos].

4- Se deben contar al menos 100 espermatozoides por duplicado, cargando dos cámaras. Se cuentan únicamente espermatozoides enteros [con cabeza y cola].

5- Se comparan los recuentos replicados para ver si son aceptables y si es así, se promedian los conteos; de no ser

así, se preparan nuevas diluciones.

6- Se calcula la concentración de espermatozoides por ml.

7- Se calcula el número total de espermatozoides por eyaculado.

La diferencia esperada entre los dos recuentos independientes debería ser cero, con un error estándar igual a la raíz cuadrada de la suma de los dos recuentos. Por lo tanto $(N1 - N2) / (\sqrt{N1 + N2})$ debe ser $< 1,96$ con un límite de confianza del 95%.

Si la diferencia entre los recuentos es menor que o igual a la indicada en la tabla 3 para la suma de recuentos obtenida, los recuentos son aceptados y la concentración se calcula [tabla 2]. Diferencias mayores sugieren errores de conteo, errores de pipeteado, o que las células no se mezclaron bien, por lo que se obtuvo una distribución no aleatoria en la cámara. Cuando la diferencia entre los recuentos es mayor que la aceptable, se deben desechar los dos valores, y preparar y evaluar dos diluciones frescas de semen. [No se debe contar una tercera dilución de la muestra y calcular la media de los tres valores, ni calcular la media de los dos los valores más cercanos].

Esto se aplica tanto a los recuentos de espermatozoides como de células.

El límite inferior de referencia para la concentración de espermatozoides es:

- 15×10^6 espermatozoides por ml [quinto percentil; IC del 95%: 12 a 16×10^6].

Se recomienda calcular e informar el número total de espermatozoides por eyaculado, ya que este parámetro proporciona una medida de la capacidad de los testículos para producir espermatozoides y de la permeabilidad de las vías espermáticas. Esto se obtiene multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen de eyaculado.

El límite inferior de referencia para el número total de espermatozoides es:

- 39×10^6 espermatozoides por eyaculado [quinto percentil; IC del 95%: 33 a 46×10^6].

La OMS recomienda el uso de cámaras hemocitómetro de 100 μ m de profundidad, sin embargo otras cámaras pueden ser utilizadas, Makler, cámaras desechables por ejemplo Cell Vu, pero tendrán diferentes volúmenes, profundidad y patrones de rejilla, por lo que requerirán diferentes factores para el cálculo. La validez de estas cámaras de recuento alternativas debe ser establecida comparando los resultados

Tabla 2: Factores de dilución y conversión para recuento en cámara de Neubauer

Ez. Por campo de 400x	Dilución (semen + diluyente)	Factores de conversión según el número de cuadrados contados		
		25	10	5
< 15	1:5 (1 + 4)	20	8	4
15 – 40	1:10 (1 + 9)	10	4	2
40 – 200	1:20 (1 + 19)	5	2	1
> 200	1:50 (1+49)	2	0.8	0.4

obtenidos con los de la cámara de Neubauer mejorada y a través de un Control de Calidad Externo periódico evaluar el desempeño para asegurar la fiabilidad y exactitud de los resultados.

Morfología espermática

El estudio clásico de morfología espermática se caracteriza por la utilización de espermatozoides fijados y coloreados, lo que tiene como limitación no poder definir las características cinéticas de los espermatozoides clasificados como normales o anormales. Si bien los manuales de estandarización definen cuali y cuantitativamente los parámetros de una célula espermática, la experiencia del observador es extremadamente importante para dar resultados consistentes y reales, sumado a la calidad de preparación de los extendidos espermáticos y la tinción de los mismos.

El método microscópico subjetivo tiene grandes variaciones entre laboratorios e incluso intra y entre técnicos de un mismo laboratorio, debido a que la veracidad y la precisión están limitadas por el sistema de medida y por la destreza del observador. Para reducir estos errores atribuibles al método de valoración visual, se deben estandarizar los procedimientos, utilizar criterios universales e introducir controles de calidad internos y externos.

La clasificación de normalidad de la OMS se basa en considerar un espermatozoide normal al integrante de una subpoblación de espermatozoides potencialmente fertilizadores seleccionados naturalmente en el moco cervical.

El procedimiento para evaluar la morfología espermática es el siguiente:

- 1- Se debe realizar por duplicado.
- 2- Depositar de 5-10µl de muestra bien homogenizada en el extremo del portaobjetos.
- 3- Extender la gota suavemente con otro portaobjetos.

Si la muestra tiene baja concentración se debe:

- 1- Centrifugar a 600g durante 10 minutos.
- 2- Posteriormente re suspender el pellet.
- 3- Se hace la extensión de la manera antes descripta.
- 4- Secar la muestra al aire
- 5- Fijar
- 6- Colorear (Técnicas de coloración recomendadas: Papanicolaou o Diff-Quick)
- 7- Evaluación de la morfología espermática por duplicado (% de formas normales) con microscopio óptico con inmersión con objetivo 100x.
- 8- Si los porcentajes son promediables (ver tabla 1) se informa el promedio de los porcentajes, sino se realizan otras dos evaluaciones.

El valor de referencia es $\geq 4\%$ (formas normales)

Es importante seguir las instrucciones ya que un volumen de muestra mayor produciría una extensión con los espermatozoides menos dispersos dificultando la visualización de todas las partes del espermatozoide.

El desarrollo de métodos objetivos para la evaluación de la morfología espermática constituye la mayor promesa para mejorar el valor predictivo del parámetro, siendo el ideal la observación en fresco y en simultáneo con la determinación de la movilidad, para evitar de ese modo cambios en la estructura del espermatozoide provocados por la metodología empleada, y posibilitar así la clasificación de cada espermatozoide según su movilidad y morfología al mismo tiempo.. Actualmente la implementación de estos métodos, no han dado resultados favorables, por lo que la sugerencia es seguir un entrenamiento continuo, y mediante el control de calidad interno del laboratorio y los Programas de Evaluación Externa, mantener un adecuado coeficiente de variación intra, inter-operador y entre-laboratorios^{5,6}.

Células no espermatozoides:

El eyaculado además de poseer espermatozoides, posee

Tabla 3: Diferencias aceptables entre duplicados de contajes correspondientes a la suma entre los mismos

Suma	Diferencia aceptable	Suma	Diferencia aceptable	Suma	Diferencia aceptable
35-40	12	144 – 156	24	329 – 346	36
41-47	13	157 – 169	25	347 – 366	37
48-54	14	170 – 182	26	367 – 385	38
55-62	15	183 – 196	27	386 – 406	39
63-70	16	197 – 211	28	407 – 426	40
71-79	17	212 – 226	29	427 – 448	41
80-89	18	227 – 242	30	449 – 470	42
90-98	19	243 – 258	31	471 – 492	43
99-109	20	259 – 274	32	493 – 515	44
110-120	21	275 – 292	33	516 – 538	45
121-131	22	293 – 309	34	539 – 562	46
132-143	23	310 - 328	35	563 - 587	47

otros elementos y células que pueden tener importancia clínica⁷. Esto incluye células epiteliales del tracto genitourinario, leucocitos y células inmaduras de la espermatogénesis. Estas células llamadas en general “células redondas” pueden ser identificadas en el frotis teñido de la muestra y/o también con ayuda de la determinación de la enzima peroxidasa presente en los neutrófilos en fresco. Su concentración se determina de la misma forma en que se realiza el recuento espermático en cámara pero empleando una dilución apropiada (en general menor) según la estimación de su concentración, realizada en fresco del mismo modo como se estima la concentración espermática.

El manual de la OMS propone que las concentraciones de los distintos tipos celulares pueden ser indirectamente cuantificados, determinando la tasa entre espermatozoides y células redondas que se encuentren en el frotis teñido y luego correlacionando esta tasa con la concentración espermática, sin embargo en la experiencia este método resultó más impreciso y dificultoso de realizar que el recuento en cámara

Técnica de peroxidasa para leucocitos polimorfonucleares en semen

Solución A:

- 25 ml de etanol 96%
- 25 ml de agua destilada
- 0,0625 g de bencidina

Solución B:

H₂O₂ al 3% (dura preparada 30 días)

Solución C:

Buffer PBS (pH: 7)

Solución de trabajo

- 4 ml de (A) + 50 µl de H₂O₂ (B), prepararla en el momento de uso.

Técnica

-En tubo de Khan: 40 µl de solución de trabajo + 20 µl de PBS (C) a temperatura ambiente + 20 µl de semen entero. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.

- Cargar la cámara de Neubauer

- Contar en el retículo de rojos los 25 cuadraditos.

$n \times 4 \times 10.000 = \text{peroxidasa (+) / ml de semen}$

10000= factor de la cámara para llevar a ml

Factor inmunológico:

Se conoce desde mucho tiempo atrás, la antigenicidad del semen como fluido y la presencia de sustancias potencialmente antigénicas en el plasma seminal y la célula espermática, todo esto ampliamente descrito en la literatura.

El organismo afortunadamente dispone de mecanismos que contribuyen a que la aparición del fenómeno autoinmune a nivel seminal, pueda controlarse ya sea por la existencia de la barrera hematotesticular, como así también, por la presencia de sustancias inmunosupresoras tanto en la gameta masculina como en el plasma seminal.

Pese a lo anteriormente descrito, en determinadas cir-

cunstancias, generalmente relacionadas a fenómenos que involucren la ruptura de la barrera hematotesticular, la existencia de anticuerpos anti espermáticos puede hallarse en el screening básico seminal propuesto en la evaluación inicial del varón infértil.

Estos anticuerpos pueden producir fenómenos de autoaglutinación, como así también de inmovilización de los espermatozoides, siendo en muchos casos causa de astenozoospermia.

Si bien, la incidencia del factor inmunológico en infertilidad no supera el 10 %, en casos de infertilidad idiopática, en pacientes con varicocele, en aquellos con antecedentes de infección del tracto reproductivo masculino y previo a técnicas de fertilización asistida, es importante descartar al factor inmune como responsable de alteraciones seminales.

Se sugiere como screening para la evaluación de autoinmunidad seminal, la técnica conocida como Mar Test (Mixed Antiglobulin Reaction Test), en la que de manera sencilla pueden detectarse anticuerpos (Ac) anti-espermáticos del tipo IgG sobre la superficie espermática. La técnica directa utiliza semen fresco del paciente, que debe tener una concentración mínima de espermatozoides y un % de formas móviles mínimo del 10%, glóbulos rojos (GR) o partículas de látex cubiertas con anticuerpos incompletos, isotipo IgG, que mezclados con los Ez sin lavar y con el agregado de anti inmunoglobulina humana (anti-IgG cadena gamma) en exceso, formaran aglutinados, que serán mixtos (GR-Ez), en el caso de haber Ac anti-espermáticos presentes o solo de GR de no haber Ac. Se cuentan como positivos los espermatozoides móviles unidos a GR.

Es importante remarcar que este test también puede ser realizado en forma indirecta (método indirecto) en suero, líquido folicular, plasma seminal y moco cervical pre-incubando el fluido a investigar con semen sin anticuerpos anti-espermáticos.

El valor de referencia es: < 50 % de espermatozoides unidos a glóbulos rojos o partículas.

Recomendaciones:

1. Adherir a estandarizaciones internacionales. El Manual OMS (2010) 5ª edición puede descargarse en forma gratuita de internet: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
2. Implementar Controles de Calidad Internos. Sugerimos tener un set de extendidos y realizar periódicamente su re-evaluación, determinar el CV intra e interoperador del laboratorio e implementar el uso de cartas de control de las “Medias Mensuales” de los parámetros del semen (descrito en el Manual de la OMS) para determinar errores sistemáticos⁸.
3. Adherir a Programas de Evaluación Externa de la Calidad nacionales y/o internacionales para evaluar el desempeño de los analitos⁹. El elevado Error de Medida publicado por estos programas para morfología y movilidad progresiva rápida, evidenciaron la necesidad de estan-

darizar los procedimientos y criterios en la comunidad científica nacional e internacional, para lograr el requerimiento de calidad de Variabilidad Biológica, con el fin de que el error analítico no supere la variación intra e interindividual de estas variables. Por este motivo la OMS recomienda, a partir de su último manual, no informar “movilidad progresiva rápida” por el método subjetivo, parámetro con mucho error debido a la subjetividad inherente al método, sino “movilidad progresiva” sin tener en cuenta la velocidad ya que es un parámetro indeterminable por el ojo humano.

4. Formalizar un entrenamiento continuo. El material aportado por los Controles Externos pueden ser reevaluados periódicamente, y así constituirse en un recurso para el control interno (filmaciones, microfotografías, frotis de esperma).

Referencias bibliográficas

1. Oshio S, et al. Individual variation in semen parameters of healthy young volunteers. Arch Androl. Nov-Dec; 50(6):417-25; 2004.
2. WHO manual laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization, WHO Press 5ª edición; 2010
3. Toro-Montoya Al. Espermograma. Medicina & Laboratorio 2009, 15: 145-169. Editora Médica Colombiana S.A., 2009.
4. Chenlo PH, Ariagno JI, Pugliese MN, Repetto HE, Sardi LM, Mendeluk GR, Curi SM. Estudio del semen humano: implementación de un método objetivo. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. vol.47 no.1 La Plata mar. 2013.
5. Ariagno JI, Chenlo PH, Sardi M, Pugliese NM, Mendeluk GR, Repetto HE, Curi S M. Laboratorio de fertilidad masculina: Criterios de evaluación de la morfología espermática. <http://www.faba.org.ar/fabainforma/442/FBA02.htm>. FABA Informa, 442, 2009
6. Ariagno JI, Curi SM, Chenlo P, Repetto HE, Pugliese MN, Palaoro LA, Sardi M, Mendeluk GR. Our experience in sperm morphology assessment. Asian J Androl. Mar; 13(2):201-2; 2011.
7. Ariagno, J; Curi, S; Mendeluk, G; Grinspon, D; Repetto, H; Chenlo, P; Pugliese, N; Sardi, M; Blanco, A. Shedding of immature germ cells. Archives of Andrology Vol48 (2): 155-159, 2002.
8. Ariagno JI, Curi SM, Pugliese MN, Chenlo P, Blanco AM. Control de calidad en el Laboratorio Andrológico. PEEC-Laboratorio del Semen. FABA INFORMA 420; 2007. <http://www.faba.org.ar/fabainforma/420/FBA02.html>
9. Curi S., Ariagno J., Chenlo P., Pugliese N., Sardi M., Repetto H., Mazziotta D., Blanco A.M. Control de calidad externo en el estudio del semen. Acta Bioquím Clín Latinoam 42(2): 183-7; 2008.