# ESHRE Monografías

Junio 2002

# Manual de Análisis Básico de Semen

**Editor en Jefe de la serie de monografías**
**Maas Jan Heineman**

**Editores**
**U. Kvist y L. Björndahl**

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA Y PATOLOGÍA MOLECULAR

Este manual ha sido revisado para adaptarse a la edición de 1999 del manual de la OMS

# Manual de Análisis Básico de Semen

**Edición en español Noviembre 2004**

**Edición original en inglés Junio 2002**

Editores
U. Kvist y L. Björndahl

Este manual ha sido revisado para adaptarse a la edición de 1999 del manual de la OMS

Monografías de la ESHRE
Editor en Jefe de la serie de monografías
Maas Jan Heineman

# La Serie de Monografías ESHRE

Las revistas de la ESHRE (Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología), *Human Reproduction*, *Molecular Human Reproduction*, y *Human Reproduction Update*, son bien conocidas por todos los que trabajan en las áreas de la ciencia de la reproducción y la medicina de la reproducción. La calidad de estas publicaciones ha sido ampliamente reconocida, las tres revistas tienen una posición sobresaliente en las listas de factor de impacto en las áreas temáticas de "Biología Reproductiva" y "Obstetricia y Ginecología".

Anteriormente, se publicaron diversos suplementos junto con la revista *Human Reproduction*, los cuales fueron muy apreciados. Estos suplementos estaban a menudo basados en los textos de las sesiones de trabajo de la ESHRE, simposios, congresos y otras reuniones científicas. Los suplementos trataron un amplio espectro de temas relacionados con las ciencias reproductivas básicas y con la medicina clínica reproductiva.

El Comité de Publicaciones de la ESHRE discutió la cuestión de la publicación de suplementos. En estrecha colaboración con nuestros editores en Jefe y con el total compromiso del Comité Ejecutivo se decidió detener este tipo de publicación y añadir una nueva publicación hermana de nuestras tres revistas. Recibirá el nombre de *Monografías ESHRE* y sustituirá a los suplementos de *Human Reproduction*.

La serie de *Monografías ESHRE* se centrará en la publicación de directrices de la ESHRE y de ponencias de encuentros científicos en los campos de la ciencia y la medicina reproductiva. Nuestro propósito es producir una serie de monografías de acuerdo con los elevados estándares de las revistas ESHRE existentes. La aceptación de los manuscritos estará sujeta al acuerdo del Comité de Publicaciones de la ESHRE. Cada ejemplar de la serie de *Monografías ESHRE* tendrá un editor invitado que será responsable de controlar el proceso de revisión por pares independientes con la ayuda del Editor en Jefe y del Administrador de la serie de Monografías. La serie de *Monografías ESHRE* será patrocinada por la ESHRE y/o por patrocinadores externos.

Los primeros dos números de las *Monografías ESHRE* serán las "Guías para asesoramiento en Infertilidad" y el "Manual de Análisis Básico de Semen". Invito a nuestros lectores a identificar otros temas y actividades en nuestro ámbito de interés que puedan ser propuestos para un número de la serie *Monografías ESHRE*.

Las *Monografías ESHRE* suponen un desarrollo nuevo e interesante para la Sociedad. Confío en que los miembros de la Sociedad y los lectores de las revistas ESHRE aprecien esta iniciativa.

Maas Jan Heineman
Editor en Jefe de la Serie de Monografías

# Presentación de la Versión Española

El grupo de trabajo de Seminología y Técnicas de Reproducción Asistida de la SEQC se marcó como uno de sus objetivos prioritarios la estandarización y unificación de métodos en el análisis de semen. Para ello se planteó inicialmente la publicación de documentos que desarrollaran los métodos propuestos en el manual de la OMS [1].

Sin embargo, tras la publicación del manual conjunto de la NAFA y la ESHRE, pareció más acertado defender un texto que compartía unos objetivos similares a los de nuestro grupo, con unas recomendaciones detalladas, y que además había sido consensuado por varias sociedades científicas internacionales. La SEQC, a través del grupo de trabajo de Seminología y Técnicas de Reproducción Asistida, se propone colaborar con la NAFA-ESHRE en las actualizaciones y nuevos manuales que se puedan elaborar en el futuro.

Las personas que hemos trabajado en esta traducción agradecemos al Profesor Lars Björndahl su continuo y desinteresado apoyo y habernos propuesto esta interesante colaboración.

[1] WHO (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus interaction. 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK

La traducción de este documento ha sido dirigida por **Carmen Mar Medina**

Traductores:
**Manuel Ardoy Vilches**
Licenciado en Biología. Responsable del Laboratorio de FIV
Hospital Universitario La Paz, Madrid

**Lluís Bassas Arnau**
Doctor en Medicina. Especialista en Endocrinología y Andrología (UAB)
Jefe del Laboratorio de Seminología y Embriología
Fundació Puigvert, Barcelona

**José Antonio Castilla Alcalá**
Doctor en Medicina. Facultativo Especialista de Análisis Clínicos
Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada

**Rosa María Magán Palomares**
Licenciada en Biología
IVI Almería

**Carmen Mar Medina**
Licenciada en Farmacia. Facultativa de Análisis Clínicos
Laboratorio de Bioquímica. Hospital de Galdakao

**Inmaculada Martín Navas**
Doctora en Farmacia. Facultativo Especialista en Análisis Clínicos
Laboratorio de Análisis Clínicos. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca

Coordinador de la edición: **Felipe Antoja Ribó**

Grupo de trabajo de Seminología y técnicas de reproducción asistida: **Jose Antonio Castilla Alcalá, Amparo Galán Ortega, Maria Luisa Hortas, Carmen Mar Medina (presidenta), Isabel Sánchez Prieto, Maria del Valle Lozano Vera, Inmaculada Martín Navas, Mercedes Marcos, Carlos Aulesa Martínez y Maria del Carmen Gonzalvo López.**

Comité de Publicaciones: **Felipe Antoja Ribó, Francisco Cañizares Hernández, José M. Egea Caparrós, Román Galimany Solé Miguel García Montes, Luis Gregorio Gómez-Cambronero López, José M. González de Buitrago, José M. Hernández Pérez, Jordi Huguet Ballester (presidente), Joan B. Ortolà Devesa, Anna Padrós Fluvià y Eulàlia Urgell Rull.**

Editado por: **Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular**
Padilla, 323, desp. 68 - 08025 Barcelona - http://www.seqc.es/ - secre@seqc.es
Impresión: Talleres Gráficos Vigor
ISBN 84-89975-16-7
Dep. Legal: 42.778

# Prefacio

## Manual de Análisis Básico de Semen

Este *Manual de Análisis Básico de Semen* es el resultado de un esfuerzo de colaboración entre los miembros de la Asociación Nórdica de Andrología (NAFA) y del Grupo de Interés Especial en Andrología (SIGA) de la ESHRE.

Este manual está dirigido a todos aquellos que trabajan en el campo de la biología y la medicina de la reproducción, y especialmente a los que tienen responsabilidad en el control y garantía de calidad en el laboratorio de Seminología.

El manual detalla los fundamentos y principios básicos del análisis de semen en la actualidad. Los primeros seis capítulos se centran en la concentración espermática, movilidad, vitalidad, morfología, y los anticuerpos antiespermatozoide. Se pone especial énfasis en los procedimientos, cálculos, resultados, reactivos, equipos y materiales. El capítulo final se dedica al control y garantía de calidad. El manual concluye con algunos apéndices útiles.

Aunque el *Manual de Análisis Básico de Semen* se publica en las páginas web de la NAFA (http://www.ki.se/org/nafa) y la ESHRE (http://www.eshre.com)* se consideró útil disponer también de una versión del mismo en *Monografías ESHRE*. Espero que este manual sea de utilidad tanto en la clínica como en el laboratorio. Se invita a aquellos clínicos que no estén familiarizados con la actividad del laboratorio de semen a conocer los principios básicos del análisis de semen. Para otros puede ser de ayuda en la revisión de sus técnicas.

Agradezco a los miembros del grupo de trabajo NAFA-ESHRE por este valioso *Manual de Análisis Básico de Semen*.

Maars Jan Heineman
Editor en Jefe de las Monografías

La versión en inglés se encuentra también disponible de forma gratuita en el sitio de internet: http//eshremonographs.oupjournals.org

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

# Prólogo

La Asociación Nórdica de Andrología (NAFA) decidió en Turku en Agosto de 1995 crear el Grupo de Calidad de Laboratorio de Andrología en Análisis de Semen. La misión de este grupo fue desarrollar un manual técnico detallado con métodos basados en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO 1992). El objetivo era que el manual pudiera constituir la base para un control de calidad externo y para la colaboración científica en este campo.

Los miembros del grupo NAFA fueron : Ulrik Kvist (coordinador), Alexander Giwercman, Trine B. Haugen, Jyrfki Suominen, y Lars Björndahl (secretario). Otros colaboradores fueron: Birute Zilaitiene, Margus Punab, Øystein Magnus, Åse Strutz, Trine Henrichsen, Turid Vollen, Ingmarie Sundgren, Inger Söderlund, Maiken Simonsen, Lene Andersen, Majbrit Kvist y Antero Horte.

La primera edición de este manual se publicó en 1997. La segunda edición se publicó en 1998 y la tercera, reeditada con el fin de adaptarse a la edición de 1999 de las recomendaciones de la OMS, en el año 2000.

Durante la reunión de trabajo anual del Grupo de Interés Especial en Andrología (SIGA) de la ESHRE en Bolonia, en Julio de 2000, se decidió aunar esfuerzos para realizar un Manual de Análisis Básico de Semen conjunto NAFA-ESHRE. Se constituyó un grupo de trabajo con representantes de la ESHRE SIGA, formado por Usha Punjabi, David Mortimer, Chistopher Barrat y Lars Björndahl por parte de la ESHRE, y el Grupo de Calidad de Laboratorio de Andrología en Análisis de Semen de la NAFA. Ulrik Kvist coordinó el trabajo y Lars Björndahl actuó como secretario.

Este manual NAFA-ESHRE constituye una aplicación de las directrices de la OMS (WHO 1999) para facilitar el establecimiento de métodos y materiales comunes y estandarizados en los laboratorios de andrología de los países europeos, como requisito previo para la colaboración científica y el control externo de calidad. No existe ningún método único que resulte ideal, y el grupo ha discutido diferentes posibilidades para alcanzar un consenso en métodos, que sea posible usar en los laboratorios de andrología clínica, y a la vez sean aceptables desde el punto de vista metodológico (eliminación de las fuentes de error).

Los métodos en el manual también se adecuan con el currículo del curso estandarizado para enseñanza de Análisis Básico de Semen desarrollado e implementado por el SIGA. Estos cursos se han celebrado como cursos conjuntos ESHRE-NAFA en Estocolmo (1995, 1996 y 2001), Åarhus (1997), Gothenburg (1998), Oslo (1998) y Helsinki (2001).

**Referencias**

WHO (1992) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
WHO (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus interaction. 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Direcciones**

ESHRE: Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología. Página web: http://www.eshre.com
NAFA: Asociación Nórdica de Andrología, Presidente Marita Räsänen. Página web: http://www.ki.se/org/nafa
SIGA: Grupo de Interés Especial en Andrología, coordinador Herman Tournaye. Página web: http://www.eshre.com



© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

# Contenido

**Editorial. . . . . vi**

**1. Análisis de semen: visión general. . . . . 1**
Conceptos y principios básicos. . . . . 1
Seguridad en el laboratorio de andrología. . . . . 1
La muestra de semen . . . . . 2
Calibración . . . . . 2
Procedimiento . . . . . 5
Equipo y materiales . . . . . .

**2. Concentración espermática . . . . . 7**
Principios básicos. . . . . 7
Determinación de la dilución apropiada . . . . . 7
Procedimiento . . . . . 8
Cálculos. . . . . 9
Resultados . . . . . 10
Control de calidad . . . . . 10
Reactivos . . . . . 11
Equipo y materiales . . . . . 11
La confianza de los recuentos espermáticos . . . 12

**3. Movilidad espermática. . . . . 15**
Principios básicos. . . . . 15
Procedimiento . . . . . 16
Movilidad espermática en
el monitor de vídeo . . . . . 16
Determinación de la motvlidad espermática . . . 16
Cálculos. . . . . 16
Resultados . . . . . 16
Control de calidad . . . . . 16
Equipo . . . . . 17
Grabación de vídeo . . . . . 17

**4. Vitalidad espermática. . . . . 19**
Principios básicos. . . . . 19
Procedimiento . . . . . 19
Cálculos y resultados . . . . . 19
Reactivos . . . . . 19
Equipo y materiales . . . . . 20

**5. Morfología espermática . . . . . 21**
Principios básicos. . . . . 21
Consideraciones para la evaluación
de la morfología espermática . . . . . 22
Preparación de las extensiones . . . . . 23
Evaluación de la morfología espermática . . . . . 26
Control de calidad . . . . . 26
Cálculos y resultados . . . . . 26
Reactivos . . . . . 27
Equipo y materiales . . . . . 27
Referencias . . . . . 27

**6. Anticuerpos antiespermatozoide . . . . . 29**
Principios básicos. . . . . 29
Anticuerpos antiespermatozoide. . . . . 29
Prueba “SpermMAR”. . . . . 30
Prueba “immunobead” . . . . . 31
Control de calidad para las pruebas
“spermMAR” e “Immunobead”. . . . . 33
Equipo y materiales . . . . . 33

**7. Control de calidad y garantía de calidad. . 35**
CC . . . . . 35
CCI . . . . . 35
Control a nivel intra-análisis. . . . . 35
Programa básico de CCI. . . . . 35
Media mensual de los resultados . . . . . 36
Control del equipo y los instrumentos . . . . . 36
CCE. . . . . 36
GC. . . . . 36
Referencias . . . . . 36

**Apéndice I. . . . . 37**
**Apéndice II . . . . . 38**

For any citations from this Manual, the source must be given as the original chapter with full bibliographic details as given as the top of the first page of each chapter.
Cualquier cita de este Manual deberá mencionar la fuente de la versión original en inglés, con todos los detalles bibliográficos tal como se mencionan en la cabecera de la primera página de cada capítulo.

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis p.v-vii 2002

# Editorial

*Ulrik Kvist[1] y Lars Björndahl[2]*

[1]Department of Women and Child Health, Andrology Center, Karolinska Hospital and Institute, Box 140, SE-171 76 Stockholm, Sweden and [2]Assisted Conception Unit, Birmingham Women's Hospital, and Reproductive Biology and Genetics Group, University of Birmingham, Birmingham B15 2TG, UK

Históricamente, el análisis de semen ha surgido como una disciplina que acompaña a aquellas que se ocupan del hombre o de la pareja infértil. En la medicina moderna, el análisis de semen es por tanto realizado en una amplia variedad de circunstancias. En consecuencia, el microscopio para el análisis de semen puede estar en la poyata del urólogo, ginecólogo, dermatólogo o endocrinólogo, en el laboratorio de urología, patología o análisis clínicos, en el departamento de medicina del trabajo y actualmente también en gran medida en el creciente número de clínicas que ofrecen tratamientos para la infertilidad. Un técnico a tiempo parcial puede realizar algunos análisis al año, mientras que los facultativos experimentados de los centros de andrología pueden realizar varios miles de análisis. Como resultado de esta amplia variedad de tradiciones y situaciones, el análisis de semen no ha alcanzado siempre la atención y desarrollo técnico que la medicina moderna exige de la buena práctica en el laboratorio.

Ha habido diversas e importantes contribuciones a los esfuerzos para mejorar los estándares en el análisis básico de semen. Sólo para mencionar algunos hitos: Freund y Carol sugirieron mejoras fundamentales en los métodos de recuento espermático (Freund y Carol, 1964). MacLeod y Freund realizaron mejoras relacionadas con la morfología espermática (MacLeod, 1964; Freund, 1966). El extenso trabajo de Eliasson, que publicó directrices para los métodos y la buena práctica del laboratorio, y Mortimer, que añadió guías para adiestramiento orientado a objetivos y control de calidad en los laboratorios de andrología (Eliasson, 1971a,b, 1975, 1977, 1981; Mortimer, 1994). Los manuales de análisis de semen de la Organización Mundial de la Salud (WHO 1987, 1992, 1999; Belsey y cols., 1980) han sido fundamentales para iniciar la estandarización global del análisis de semen. Sin embargo, al inicio de un curso de análisis básico de semen (Björndahl y cols., 2002), una muestra de semen fue examinada por 20 participantes que trabajaban en análisis de semen y usaban métodos recomendados por la OMS. Sus resultados fueron tan dispares como 1-71 x $10^6$/mL, aunque el valor diana obtenido por técnicos entrenados utilizando métodos controlados fue de 41 x $10^6$/mL.

La falta de exactitud en los resultados de análisis básicos de semen es todavía un problema urgente. El origen de esta situación se encuentra en la falta de una estandarización global y detallada de los métodos para el análisis de semen (De Jonge y Barrat, 1999). Un sólo laboratorio puede controlar su propia calidad y proporcionar atención adecuada a sus propios pacientes, pero cuando hay que comparar entre laboratorios y publicaciones científicas e interpretar publicaciones de laboratorios que aplican variantes de los métodos recomendados por la

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

OMS- los resultados son raramente aplicables a otros laboratorios.

Además de disponer de métodos comunes, resulta fundamental que el personal que realiza análisis de semen esté bien entrenado para realizarlos del mismo modo. El Grupo de Interés Especial en Andrología (SIGA) de la ESHRE tomó la iniciativa de crear en 1994 un curso estandarizado de aprendizaje en el análisis básico de semen (Björndahl y cols., 2002). Estos cursos han tenido mucho éxito y se celebran regularmente, sobre todo en Holanda, Bélgica, los países nórdicos [en estos últimos como cursos conjuntos de la Asociación Nórdica de Andrología (NAFA) y la ESHRE] y Sudáfrica. En los últimos años también han aparecido muchas publicaciones valiosas que abarcan el control de calidad interno y externo, y el uso de entrenamiento intensivo para conseguir consistencia en los resultados intra e inter laboratorios (Dunphy y cols., 1989; Neuwinger y cols., 1990; Clements y cols., 1995; Franken y cols., 2000; Keel y cols., 2000).

Sin embargo, resultó obvio que las recomendaciones de la OMS no eran lo suficientemente detalladas tanto para asegurar la estandarización de los métodos y las rutinas de trabajo, como para permitir un aprendizaje completamente estandarizado durante y después de los cursos.

Con el fin de mejorar esta situación, y establecer los fundamentos para la estandarización entre laboratorios, en 1995 la NAFA comisionó un grupo de trabajo sobre la calidad del laboratorio de análisis de semen. El grupo de trabajo tenía que escribir un manual de laboratorio detallado que debería ser recomendado por la NAFA a todos los laboratorios que realizan análisis de semen en los países nórdicos. La base para este manual fue la tercera edición del manual de laboratorio de la OMS. La primera versión estuvo disponible en 1997, y la segunda versión se editó en 1998. Cuando la OMS publicó su cuarta edición en 1999, la NAFA decidió hacer nuevas revisiones para adaptarse a este nuevo manual de laboratorio de la OMS. En el año 2000, el SIGA sugirió que la NAFA y la ESHRE deberían realizar un manual conjunto que pudiera recomendarse a todos sus miembros. Se constituyó un grupo de trabajo conjunto de la NAFA (Aleksander Giwercman, Trine B. Haugen, Jyrfki Suominen, y Ulrik Kvist, coordinador) y del SIGA (Usha Punjabi, David Mortimer, Chistopher Barrat y Lars Björndahl, secretario) y este manual se presentó a las dos organizaciones en el verano de 2001.

Se han hecho esfuerzos para crear unas recomendaciones claras y detalladas para el trabajo práctico en el laboratorio de andrología. En la elección entre diversos métodos, el grupo de trabajo ha procurado usar procedimientos simples y controlables, con el menor número posible de fuentes de error. Además, se han integrado elementos básicos de control de calidad en los procedimientos para disminuir la aparición de errores. El resultado, este manual de análisis básico de semen, está ahora disponible a través de la NAFA y la ESHRE SIGA para ser usado en los laboratorios y en los cursos de análisis básico de semen en todo el mundo, como base para la estandarización, mejora de la calidad en el análisis de semen e intercambio de resultados científicos relativos a los análisis de semen.

**Referencias**


Belsey M.A., Eliasson R., Gallegos A.J., Moghissi K.S., Paulsen C.A. y Prassad A.M.N. (1980) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Press Concern, Singapore.

Björndahl L., Barratt C.L.R., Fraser L., Kvist U. y Mortimer D. (2002) ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training. *Hum. Reprod.,* 17, 1299-1305.

Clements, S., Cooke, I.D. y Barratt, C.L.R. (1995) Implementing comprehensive quality control in the andrology laboratory. *Hum. Reprod.,* 10. 2096-2106.

De Jonge, C.J. y Barratt, C.L.R. (1999) WHO manual. Who should care? *Hum. Reprod.,* 14, 2431-2433.

Dunphy, B.C., Kay, R., Barratt, C.L.R. y Cooke, I.D. (1989) Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J. Androl.,* 10, 378-385.

Eliasson, R. (1971a) Standards for the investigation of human semen. *Andrologie,* 3, 49-84.

Eliasson. R. (1971b) Interlaboratory coordination and control in andrology, *Andrologie,* 3, 113-115.

Eliasson, R. (1975) Analysis of semen. In Behrman S.J. and Kistner R.W. (eds) *Progress in Infertiliy,* 2nd edn. Little, Brown, Boston, USA, pp. 691-714.

Eliasson, R. (1976) Semen analysis and laboratory workup. In Cockett A.T.K. and Urry R.L. (eds) *Male infertility. Workup, Treatment and Research*. Grune and Stratton,

Orlando, FL, USA, pp. 169-188.

Eliasson, R. (1981) Analysis of semen. In Burger H. and de Kretser D.M. (eds) *The Testis*. Raven Press, New York, USA, pp. 381-399.

Franken, D.R., Smith, M., Menkveld, R. Kruger, T.F., Sekadde-Kigondu, C., Mbizvo, M. y Akande, E.O. (2000) The development of a continuous quality control programme for strict sperm morphology among sub-Saharan African laboratories. *Hum. Reprod.,* 15, 667-671.

Freund, M. (1966) Standards for rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int. J. Fertil.*, 2, 97-118.

Freund, M. y Carol, B. (1964) Factors affecting haemocytometer counts of sperm concentration in human semen. *J. Reprod. Fertil.*, 8, 149.

Keel, B.A., Quinn, P., Schmidt, C.F. Jr, Serafy, N.T. Jr, Serafy, N.T. Sr y Schlaue, T.K. (2000) Results of the American association of bioanalysts national proficiency testing program in andrology. *Hum. Reprod,* 15, 680-686.

MacLeod, J. (1964) Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. *Int. J. Fertil.*, 9, 281.

Mortimer D. (1994) Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reprod. Med. Rev.*, 3, 97-111.

Neuwinger, J., Behre, H. y Nieschlag, E. (1990) External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil. Steril.*, 54**,** 308-314.

WHO (1987) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction,* 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

WHO (1992) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction,* 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

WHO (1999) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction,* 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

# 1. Análisis de semen: visión general

## Conceptos y principios básicos

A partir de los resultados del análisis de semen no podemos predecir nunca si un determinado hombre puede ser padre biológico o no. No hay propiedades específicas que se puedan medir en toda la población espermática que reflejen específicamente la capacidad fecundante del reducido número de espermatozoides que son capaces de alcanzar el lugar de fecundación. Sin embargo, el análisis del semen puede darnos información acerca de problemas en los órganos genitales del varón; el análisis de semen puede por tanto ser usado para enfocar la investigación continuada de la infertilidad. No obstante, los resultados del análisis de semen se han usado para categorizar los hombres en grupos con distintas posibilidades de conseguir embarazo durante un período de tiempo determinado.

El objetivo del análisis de semen básico es evaluar los parámetros descriptivos de eyaculados obtenidos mediante masturbación. Las cualidades que se evalúan son el aspecto visual, olor, licuefacción, viscosidad, volumen, concentración espermática y número total de espermatozoides, movilidad y vitalidad espermática. Además, también se realiza el recuento diferencial según la morfología espermática, la estimación de la aglutinación/agregación, y la evaluación de la presencia de detritus y otros tipos celulares en semen.

## Seguridad en el laboratorio de andrología

Todo el personal debe saber que las muestras de semen pueden contener virus nocivos y deben por tanto ser tratadas con el debido cuidado. Las recomendaciones de seguridad señaladas en el apéndice II del Manual de la OMS de 1999 deben ser seguidas estrictamente.

## La muestra de semen

El análisis de un eyaculado, obtenido mediante masturbación, empieza en el laboratorio 30 minutos después de la eyaculación. Deben existir habitaciones especiales para la obtención de la muestra. El Manual de la OMS recomienda un intervalo máximo de abstinencia entre 2 y 7 días antes de la recolección de la muestra, pero recomienda que dicho intervalo sea “lo más constante posible”. En consecuencia, se aconseja vivamente la estandarización “del tiempo de abstinencia” a 3-4 días. El tiempo de abstinencia sexual, expresado en días, es muy impreciso. Resulta ventajoso por tanto que el tiempo de abstinencia se exprese en horas. Cuando los resultados han de ser usados en estudios relacionados con el tiempo de abstinencia es obligatorio registrarlo en horas. Algunos hombres tienen dificultades para producir una muestra de semen en el laboratorio. En estos casos, el hombre puede obtener una primera muestra en casa y entregarla en el laboratorio antes de 1 hora. En algunos casos puede ser necesario para el hombre usar preservativos especiales, sin espermicidas, para recoger una muestra de semen durante el coito.

### *Instrucciones a los pacientes*

Una hoja de solicitud apropiada conteniendo detalles clínicos relevantes deberá acompañar a la muestra. Antes de producir una muestra de semen, el paciente ha de recibir información verbal y escrita acerca del propósito de la investigación y otros hechos importantes, con el fin de evitar problemas con los análisis. Puede incluirse en el material

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

escrito una pequeña explicación de los órganos reproductivos masculinos, comprensible para no expertos. El paciente debe ser informado sobre la relevancia del tiempo de abstinencia sexual y de la importancia de recoger el eyaculado completo. Si la muestra no puede ser obtenida en el laboratorio, ha de ser transportada protegida del frío (cerca del cuerpo) y entregada al laboratorio preferiblemente en 30 minutos, pero como mucho 1 hora después de la eyaculación.

## Calibración

La calibración debería realizarse siempre después cualquier cambio en el equipo o en cualquier momento en que se sospechen errores.

Las pipetas automáticas usadas para las mediciones (concentración espermática, bioquímica) han de calibrarse al menos dos veces al año. Los protocolos para estas mediciones y sus resultados deben conservarse en un registro especial.

Las balanzas para pesar semen y reactivos deben calibrarse al menos cada año por un técnico o ingeniero certificado por el fabricante de la balanza. Los resultados deben guardarse en un registro especial.

## Procedimiento

### *Aspectos generales*

En la tabla I se describen los pasos a seguir en el análisis básico de semen ordenados apropiadamente para asegurar eficiencia y calidad en el trabajo del laboratorio. Los detalles de cada paso en particular se mencionarán a continuación en este texto. Para el cultivo microbiológico deben usarse recipientes para muestras estériles y pipetas estériles desechables. Algunos pasos no son obligatorios, ya sea por limitaciones acordadas o porque dichos pasos son opcionales según el manual de la OMS (cada laboratorio puede decidir si realizarlos o no).

### *Detalles del procedimiento*

*Registrar, pesar y etiquetar el recipiente de muestras*

Inicialmente, la muestra ha de registrarse. El recipiente debe etiquetarse inequívocamente de acuerdo con el formulario de solicitud, la hoja de registro de la muestra y un cuestionario opcional. El etiquetado debería, en general, comprender dos identificadores únicos, p.ej. nombre y un número único para cada muestra.

Si la muestra se obtiene en el laboratorio, el recipiente ha de ser pesado y marcado antes de la obtención de la muestra. Cuando las muestras no se recogen en el laboratorio, el peso de los recipientes vacíos debe marcarse en los mismos antes de su distribución a los médicos/clínicos solicitantes, o a los propios pacientes. Al recoger la muestra, debe anotarse la hora de la eyaculación de forma clara en el recipiente, así como en el protocolo. El peso neto de la muestra (peso total de la muestra y contenedor menos peso del contenedor vacío) debe anotarse en el protocolo como volumen seminal (unidad mL; 1 decimal).

*Colocar la muestra en un agitador orbital dentro del incubador (37ºC)*

Se debe colocar la muestra enseguida sobre la bandeja móvil de un agitador orbital (37ºC). Es importante comprobar que el recipiente usado permite una mezcla completa de la muestra con el agitador usado. La hora de colocación en el incubador debe escribirse en la hoja de trabajo. La muestra ha de mantenerse en el incubador hasta unos 25-30 minutos después de la eyaculación, de forma que el examen pueda empezar 30 minutos después de la eyaculación. Sacar el contenedor del incubador y comprobar si la muestra está bien mezclada volteándola en el fondo del recipiente durante unos 20 segundos. Si la muestra fue producida fuera del laboratorio, ha de atemperarse en el incubador unos 5-10 minutos antes del examen.

*Evaluación de la licuefacción, apariencia visual y viscosidad del semen*

Inspeccionar la apariencia visual de la muestra en relación al color (sin comentarios o rojizo-marrón), opalescente o claro, presencia de partículas de gel o filamentos mucosos. Un color amarillento del eyaculado habitualmente es debido a un contenido aumentado de flavoproteínas que se originan en las vesículas seminales, indicando un largo período de abstinencia sexual, o procedente de vitaminas B. La ictericia también puede ocasionar color amarillo. Una coloración rojiza o marrón generalmente es debida a presencia de eritrocitos (hemoglobina).

Comprobar si la licuefacción es completa. Si no es así (partículas de gel o filamentos mucosos), poner el espécimen de nuevo en el incubador durante algunos minutos (el examen debe empezar en cualquier caso en el intervalo de 60 minutos

después de la eyaculación; ver Tratamiento de las muestras viscosas, más adelante). Las desviaciones de los hallazgos normales se anotan en la hoja de trabajo. Si el olor de la muestra difiere claramente de la mayoría de las muestras, también se anotará en la hoja de trabajo.

La viscosidad de la muestra se evalúa estimando la rapidez con que sale de la pipeta. Llenar una pipeta con semen (p.ej. una pipeta de 5 mL. Si el volumen no se mide por peso, la pipeta usada para medir el volumen puede servir) y dejar que el semen se vacíe de nuevo en el contenedor. Si las gotas forman "filamentos" cuya longitud es >2 cm, anotar "viscosidad aumentada" en la hoja de trabajo.

*Tratamiento de las muestras viscosas*

Para las muestras con viscosidad moderada a muy aumentada, es suficiente comentar este hallazgo en la hoja de trabajo como texto libre. La viscosidad aumentada interfiere con la determinación de la movilidad espermática, la concentración y los anticuerpos que recubren los espermatozoides. En las muestras en las que la elevada viscosidad dificulta el análisis, la adición de un volumen conocido de suero salino, solución salina tamponada (PBS) o medio de cultivo, seguida de un mezclado cuidadoso con una pipeta de calibre ancho, debería dar una dilución homogénea para el análisis. Se debe tener en cuenta el volumen original para calcular la concentración espermática original en la muestra no diluida. Si los espermatozoides van a ser utilizados para fecundación asistida, debe evitarse contaminación de la muestra, y ha de usarse para la dilución el medio habitual para preparar el semen con vistas a la fecundación asistida. N.B. Cuando las muestras se diluyen, las características de la movilidad espermática se verán afectadas.

*Preparación en fresco*

*Examen de la preparación en fresco*: Colocar 6 $\mu$L de semen bien mezclado sobre un portaobjetos limpio y poner un cubreobjetos encima (18x18 mm, #1.5; si se usa un cubreobjetos de 22x22, el volumen del semen en el portaobjetos será de 10 $\mu$L). Esto confiere a la preparación una profundidad de ~20 $\mu$m. El examen de esta preparación en fresco ha de empezar tan pronto como cesa el "flujo" en la preparación. Si el desplazamiento no se ha detenido después de 60 s, hay que descartar la preparación y realizar una nueva. Es necesaria una óptica con contraste de fases. Si se encuentra una media de <1 espermatozoide por campo de visión (objetivo 40x con ocular de campo amplio), la muestra debe ser tratada como sospechosa de azoospermia. Para detalles y determinación de la movilidad en monitor de vídeo, ver Sección 3 en este manual.

*Azoospermia u oligozoospermia severa*: Si hay muy pocos o ningún espermatozoide en la preparación en fresco debe anotarse * (asterisco) en la hoja de trabajo y, como texto libre, anotar cuantos espermatozoides móviles e inmóviles se han observado en la preparación en fresco. Si se encuentran pocos o ningún espermatozoide móvil en la preparación en fresco hay que centrifugar la muestra a 1000 *g* por lo menos durante 15 min. y examinar el sedimento nuevamente al microscopio (objetivo 40x, óptica de contraste de fases). Si se pueden identificar espermatozoides móviles o inmóviles después de examinar toda la superficie del cubreobjetos (al menos 400 campos en un cubreobjetos de 22x22 mm), se anotarán en la hoja de trabajo el número de espermatozoides y su movilidad.

*Evaluación de la movilidad espermática*: La primera función espermática que hay que evaluar en la preparación en fresco es la movilidad. Se debe empezar inmediatamente para evitar la caída de la temperatura o la deshidratación de la preparación. Los métodos se describen en detalle en la Sección 3 de este manual.

*Agregación espermática y aglutinación espermática*: La agregación o aglutinación espermática se determina en 10 campos escogidos al azar, lejos de los bordes del cubreobjetos. Se realiza una estimación del porcentaje promedio (estimado al 5% más próximo) de espermatozoides atrapados en grupos. Aglutinación significa que los espermatozoides se adhieren entre sí, sin otras células o detritus. Los anticuerpos antiespermáticos polivalentes causan aglutinación espermática. Si los grupos son muy grandes, puede ser difícil determinar si los patrones de unión son específicos (p.ej. cabeza-cabeza o cola-cola). Si hay células, detritus y espermatozoides inmóviles incluidos, el aglomerado está probablemente causado por agregación. Las aglutinacio-

nes están producidas por anticuerpos antiespermáticos y a menudo contienen una cierta proporción de espermatozoides móviles, mientras que los agregados habitualmente contienen sólo espermatozoides muertos. Los pequeños agregados de espermatozoides muertos y otros materiales se encuentran con frecuencia en semen de hombres normales, mientras son anormales los grandes agregados, a menudo conteniendo centenares de espermatozoides. Cuando la presencia de agregados o aglutinaciones espermáticas está claramente aumentada, debe anotarse en forma de comentario libre en el informe.

*Otras células y detritus*: Otras células y detritus que pueden encontrarse en el semen se evalúan en varios campos y los hallazgos inusuales se expresan como comentarios libres en el informe mediante diversas expresiones estandarizadas:

- Ausencia de detritus es una situación muy rara, algún grado de detritus es típico, pero una contaminación moderada con detritus no es necesariamente anormal. Mayores cantidades de detritus son, sin embargo, anormales. Tener cuidado de diferenciar entre partículas acelulares y bacterias.
- Los glóbulos rojos (eritrocitos) no deben encontrarse en el semen, aunque pueden encontrase unos pocos sin que ello indique patología.
- Las células epiteliales (escamosas, cúbicas y transicionales) son habituales en pequeño número en el semen. Su aumento no está relacionado con ninguna alteración funcional específica o presencia de infección.
- Las "células redondas" se observan a menudo en el semen y es importante diferenciar los leucocitos de los gametos inmaduros o grandes fragmentos celulares (habitualmente sin núcleo) con citoplasma exfoliado del túbulo seminífero del testículo. También, las células de origen prostático tienen un aspecto redondeado en el eyaculado. Si hay $>1x10^6$ células redondas/mL, contadas en la cámara de Neubauer (al mismo tiempo que se realiza la concentración espermática), debe realizarse la detección de leucocitos mediante un método específico para identificar la presencia de "células inflamatorias".
- Las bacterias y protozoos no se encuentran habitualmente en el semen, pero si hay signos de microorganismos, debe anotarse en el informe.

*Extensiones para tinción de eosina-nigrosina*

Según el manual de la OMS, si la proporción de espermatozoides móviles es <50%, debe determinarse la proporción de espermatozoides vivos. La razón para evaluar la proporción de espermatozoides vivos es diferenciar entre los espermatozoides muertos y los espermatozoides vivos pero inmóviles. Esta diferencia sólo tiene interés clínico cuando hay muy pocos o ningún espermatozoide móvil. Por tanto, un límite de decisión de <40% de espermatozoides móviles no conducirá a ningún diagnóstico erróneo, pero disminuirá la carga de trabajo al reducir el número de evaluaciones de vitalidad en muestras con espermatozoides vivos. El método detallado para la evaluación de la vitalidad espermática se encuentra en la Sección 4 en este manual.

*Prueba de anticuerpos*

La parte secretora de los anticuerpos tipo IgA se une al moco cervical. Por ello, la presencia de IgA unida a espermatozoides ocasiona una reducción de la capacidad para penetrar el moco cervical.

*Anticuerpos en espermatozoides*: La IgG y la IgA unidas a los espermatozoides pueden ser evaluadas directamente en semen mediante, por ejemplo, *SpermMAR*™ para IgG e IgA y, después de lavar, mediante la prueba de *Immunobead*™.

*Anticuerpos en plasma seminal*: En las muestras de semen sin espermatozoides la presencia de anticuerpos antiespermáticos puede evaluarse indirectamente exponiendo espermatozoides de donante, sin anticuerpos, a plasma seminal de un paciente con sospecha de anticuerpos antiespermáticos. Los espermatozoides de donante se procesan a continuación como en el análisis directo de anticuerpos.

Todos los métodos dependen de la movilidad espermática. Deben evaluarse por lo menos 200 espermatozoides móviles.

Los resultados de las pruebas *SpermMAR* y de *Immunobead* no son totalmente concordantes. Un hallazgo positivo de IgA (p.ej. >50% espermatozoides móviles con *immunobeads* adheridas) debe verificarse con una prueba de interacción moco-semen.

*Dilución para determinar la concentración espermática*

Para una buena exactitud de la concentración espermática es esencial que la muestra de semen sea mezclada cuidadosa pero meticulosamente antes de retirar un volumen exacto con una pipeta de desplazamiento positivo. Ver la Sección 2 en este manual para el método detallado de medición de la concentración espermática.

*Separar100 µL para evaluación de células inflamatorias*

Para evaluar si una concentración elevada de células redondas en semen (>1x10$^6$ células redondas/mL) es debida a células inflamatorias, debe usarse un método específico (citológico o inmunocitoquímico) para detección de leucocitos.

*Preparar extensiones para tinción morfológica*

Se preparan dos extensiones de cada muestra de semen en portaobjetos limpios para evaluación citomorfológica. Una alícuota de semen bien mezclado (volumen 8-10-15 µL según la concentración espermática, para evitar un exceso de espermatozoides) se coloca sobre el porta y la gota se extiende con el borde de un cubreobjetos. Un método alternativo es usar dos portaobjetos superpuestos para dispersar la gota de semen entre ambos y entonces separar los portaobjetos por deslizamiento. Independientemente del método usado, las extensiones han de ser uniformes y finas para permitir una buena tinción y un examen fácil.

Las extensiones se dejan secar al aire, se fijan inmediatamente y se guardan para teñirlas posteriormente y realizar la evaluación de la morfología espermática. (ver Sección 5 en este manual). Las extensiones de muestras con sospecha de azoospermia deben fijarse en recipientes separados, con soluciones nuevas con el fin de evitar el riesgo de contaminación con espermatozoides de otras extensiones.

*Separar y centrifugar semen para análisis bioquímicos posteriores*

El volumen seminal restante se centrifuga (3000 *g*, 15 min) y el sobrenadante (plasma seminal) se coloca en un tubo marcado para análisis bioquímicos posteriores. El tubo se cierra y pone por orden de muestra en una gradilla en el congelador (-20ºC). Los métodos de análisis bioquímicos no se incluyen en este manual.

*Recuento en el hemocitómetro mejorado de Neubauer*

Ver Sección 2 en este manual.

*Tinción de las extensiones para evaluación morfológica* Ver sección 5 en este manual

**Equipo y materiales**

El equipo y materiales que se listan aquí son para la recogida del semen y el examen de la preparación en fresco en general. En los siguientes capítulos, el equipo y los materiales para los métodos específicos descritos se mencionan por separado.

- Recipiente para recogida de muestras (p.ej. Sarstedt 100 mL; #75.563; tapa #76.564).
- Preservativo especial para recolección de semen (Miles products Inc. Chicago, Illinois 60631, EEUU; Male Factor Pack®, Hygiene®, Fertipro N.V., Bélgica).
- Microscopio de contraste de fases (objetivo de fases 40x).
- Portaobjetos de microscopio (tamaño estándar); cubreobjetos (18x18 mm, #1 1/2 (grosor); 22x22 mm; #1 1/2).
- Pipetas para realizar la preparación en fresco tipo desplazamiento de aire (no es necesario desplazamiento positivo): 6 µL. Para extensiones morfología: desplazamiento de aire (no es necesario desplazamiento positivo): 8-15 µL. Para extensiones de vitalidad: desplazamiento de aire (no es necesario desplazamiento positivo): 15-50 µL.
- Puntas de pipeta: plástico, para pipetas de desplazamiento de aire, volumen 5-50 µL.
- Centrífuga (1000-3000 *g*). Nota. La fuerza centrífuga relativa (FCR; *g*) se calcula a partir de la fórmula $g = 1118 \cdot 10^{-8} \cdot R \cdot N^2$, donde R = distancia en centímetros desde el centro del rotor al punto en el que se requiere la FCR (p.ej. el fondo del tubo) y N = revoluciones por minuto.
- Balanza de laboratorio de carga superior 150 o 300 g de capacidad; resolución 0,01 g.
- Tubos de ensayo para determinación de células inflamatorias, p.ej. tubos de estireno de 55 mm de longitud, 11 mm diámetro externo.
- Tubos de ensayo con tapón para congelar (bioquímica), p.ej. tubos de estireno de 55 mm de longitud, 11 mm diámetro externo.
- Incubador o cámara termostatizada (37ºC)
- Guantes de plástico para laboratorio.

**Tabla I**. Los pasos del análisis básico de semen

| Tiempo desde la eyaculación | Tarea |
|---|---|
| 0-5 min | • Registrar, pesar[a] y etiquetar el recipiente con la muestra; etiquetar los documentos de laboratorio[b]. Poner la muestra en un agitador orbital dentro de un incubador a 37ºC. |
| 20-25 min | • Comprobar licuefacción, apariencia visual y olor. |
| 30 min | • Evaluar la viscosidad seminal[c]. Examinar la preparación en fresco para: movilidad espermática y agregación/aglutinación, otras células y detritus. Realizar pruebas de anticuerpos. Preparar extensiones para tinción de eosina-nigrosina si hay <40% de espermatozoides móviles y evaluar vitalidad espermática[d]. Hacer diluciones para la determinación de la concentración espermática. Separar 100 $\mu$L de semen para evaluación de células inflamatorias. Preparar extensiones para tinción citomorfológica. Separar y centrifugar semen para estudios bioquímicos posteriores[e]. |
| Más tarde | • Contar espermatozoides en la cámara de Neubauer mejorada. Si $>1x10^6$ células redondas/mL en semen: determinar células inflamatorias[d]. Realizar análisis bioquímicos relacionados con la contribución secretora de la próstata (p.ej. zinc), vesículas seminales (p.ej. fructosa) y epidídimo (p.ej. $\alpha$-glucosidasa)[e]. Teñir la extensión para morfología. Evaluar la morfología (recuento diferencial). |

[a]El volumen seminal también puede ser determinado con una pipeta graduada con una precisión de 0,1 mL; en este caso no es necesario pesar.

[b]Las etiquetas deben contener en general dos identificadores únicos, p.ej. nombre y un número exclusivo.

[c]La pipeta usada para la determinación del volumen seminal puede ser usada para evaluar la viscosidad cuando se deja caer el semen de la pipeta.

[d]Limitaciones acordadas por el grupo de trabajo.

[e]Estos pasos son opcionales.

# 2. Concentración espermática

## Principios básicos

Contar espermatozoides diluidos e inmóviles es fácil usando el microscopio. El problema es asegurar que esos espermatozoides son representativos del total de la muestra y que la alícuota examinada es la adecuada. Por tanto, se debe evitar la pérdida de espermatozoides por sedimentación, agregación o por adhesión a las paredes del contenedor de la muestra, a las puntas de las pipetas o a los tubos, y estar seguros de no cometer errores de dilución. Por esto, se debe mezclar cuidadosamente la muestra antes de tomar el semen para preparar la dilución, y antes de tomar una alícuota de la dilución de espermatozoides para rellenar la cámara de recuento.

Además, la dilución debe ser exacta. Las pipetas de desplazamiento positivo son esenciales para minimizar errores cuando tomamos un volumen determinado de semen bien mezclado para la dilución. La razón de utilizar una pipeta de desplazamiento positivo es que dicha pipeta toma un volumen exacto. Las pipetas rutinarias, las cuales desplazan un volumen de aire, son calibradas para tomar un volumen exacto de agua. Dado que la viscosidad del semen es más alta que la del agua y varía de una muestra a otra, el aire de las pipetas tomará volúmenes de muestra diferentes según el semen.

Finalmente, para conseguir un volumen correcto en la cámara de recuento, el cubreobjetos debe montarse adecuadamente, y las cámaras deben rellenarse correctamente.

La concentración de espermatozoides ($10^6$/mL semen) se calcula dividiendo el número de espermatozoides contados en la cámara de recuento por un factor que depende de la dilución y del número de cuadros contados. El número total de espermatozoides ($10^6$/eyaculado) es el producto del volumen de eyaculado y de la concentración espermática.

**Tabla I**: Dilución del eyaculado

| Esperm. por campo de visión, objetivo de 40x | Dilución | Semen (µL) | Diluyente (µL) |
|---|---|---|---|
| "Swim-up" | 1 + 1 (1:2) | 100 | 100 |
| < 15 | 1 + 4 (1:5) | 100 | 400 |
| 15-40 | 1 + 9 (1:10) | 50 | 450 |
| 40-200 | 1 + 19 (1:20) | 50 | 950 |
| > 200 | 1+ 49 (1:50) | 50 | 2450 |

## Determinación de la dilución adecuada

En una preparación en fresco se estima la concentración y se selecciona la dilución más apropiada. Con el método recomendado para realizar la preparación en fresco (6 µL semen, cubre 18x18 mm, "grosor" # 1.5), la profundidad del volumen de muestra, observada en un campo de visión, es aproximadamente de 20 µm. Teniendo en cuenta que el diámetro estimado del campo de visión es de 500 µm, el número estimado de espermatozoides observados por campo de visión, se puede utilizar para elegir la dilución más apropiada de la muestra, tal como se indica en la Tabla I (4 espermatozoides por campo corresponden a la concentración de ~ $1x10^6$ espermatozoides/mL). El área exacta del campo microscópico se puede calcular con un micrómetro, usando para ello un portaobjetos de microscopio con una escala graduada, normalmente con indica-

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

dores de 0.1 y 0.01 mm. Medir el diámetro del campo y calcular el área del campo con la fórmula: Área = $\pi$ x $r^2$, donde r = diámetro/2.

En los microscopios más antiguos, el diámetro del campo puede ser bastante más pequeño y por ello, se observan menos espermatozoides por campo de visión (por ejemplo, si el diámetro es 250 μm, un espermatozoide por campo de visión corresponde a $1x10^6$ espermatozoides/mL, así el "espermatozoide por campo de visión" observado en el microscopio debe multiplicarse por cuatro antes de acudir a la Tabla I).

Las diluciones estándar son 1 + 19 y 1 + 9; para preparaciones de *swim up* con $<10x10^6$/mL, debería usarse una dilución 1 + 1. Cuando se sospecha azoospermia, se debe examinar el sedimento (después de la centrifugación) para determinar la presencia de espermatozoides móviles e inmóviles en dicho sedimento (ver "Azoospermia..." en el Capítulo 1 de éste Manual, *Preparación en fresco*).

Las diluciones pueden ser conservadas por un máximo de cuatro semanas en viales a 4ºC, pero deberían ser evaluadas preferentemente el mismo día. Los problemas que pueden aparecer por el almacenamiento prolongado son las agregaciones de espermatozoides y la adhesión de los espermatozoides a las paredes del vial.

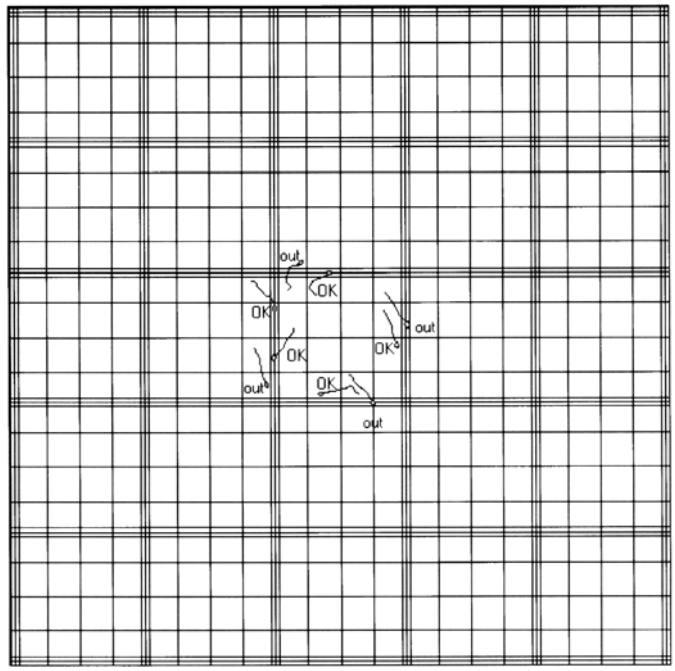


**Figura I**: Una cámara del hemocitómetro de Neubauer mejorado consta de 25 "cuadros grandes" descritos en la Figura. Cada cuadro "grande" está rodeado de líneas triples y contiene 16 cuadros pequeños. Estos cuadros pequeños pueden usarse cuando hay demasiados espermatozoides para contarlos en un cuadro grande. Con un objetivo de 40x, únicamente se puede observar un cuadro grande en el mismo campo de visión. Cada cámara de recuento (25 cuadros grandes) mide 1 x 1 mm y tiene una profundidad de 0,1 mm (100 μm). Así el volumen total en una cámara es 0,1 $mm^3$ = 0,1 μL = 100 nL. (Una cámara de Makler también mide 1 x 1 mm, pero tiene una profundidad de únicamente 0,01 mm. Así el volumen total en una cámara de Makler es un décimo de la Neubauer = 0,01 μL = 10 nL).

## Procedimiento

1. Para todas las muestras de semen, preparar una dilución según la Tabla I. El volumen exacto de semen licuado se toma de la muestra de semen bien mezclada con una pipeta de desplazamiento positivo y se añade al diluyente en un tubo con tapón hermético.

2. Montar el cubreobjetos (éste debe ser un cubreobjetos grueso, especial para hemocitómetros, para conseguir la profundidad correcta) sobre la cámara de recuento (hemocitómetro de Neubauer mejorado). Los patrones de interferencia (>10 anillos de Newton/bordes o líneas iridiscentes) deberían verse entre las superficies de cristal de los dos lados donde el cristal del cubreobjetos se sujeta a la superficie de la cámara de Neubauer. Si se observan pocas líneas, la distancia entre el cristal del cubreobjetos y la superficie de la cámara Neubauer está aumentada, por lo que el volumen de la cámara es mayor y el resultado de la evaluación será incorrecto.

3. Los tubos que contienen la muestra diluida deberán mezclarse, al menos 10 segundos (en un agitador vortex), inmediatamente antes de rellenar cada cámara del hemocitómetro. Después de mezclar, se toma una alícuota de ~ 6-10 μL con una pipeta y se rellena una cámara del hemocitómetro de Neubauer mejorado. El volumen exacto depende del volumen necesario para cubrir adecuadamente el área bajo el

cubreobjetos. Después, se toma una segunda alícuota para la otra cámara del hemocitómetro. Cada cámara deberá rellenarse completamente. Sin embargo, si se llena en exceso se debe descartar y rellenar una nueva. No se debe eliminar el volumen sobrante de la cámara, ya que se puede alterar la concentración de espermatozoides en ella. Posteriormente se comparan los recuentos de las dos alícuotas.

4. Dejar el hemocitómetro reposar durante 10-15 minutos en una cámara húmeda, para permitir a los espermatozoides sedimentar en la cuadrícula.

**Tabla II**:

Factor para dividir el número total de espermatozoides contados

| | **Nº de cuadros contados** | | |
|---|---|---|---|
| **Dilución** | 25 | 10 | 5 |
| 1+1 | 100 | 40 | 20 |
| 1+4 | 40 | 16 | 8 |
| 1+9 | 20 | 8 | 4 |
| 1+19 | 10 | 4 | 2 |
| 1+49 | 4 | 1,6 | 0,8 |

5. Contar los espermatozoides con un objetivo de 20-40x (contraste de fase) según el siguiente criterio: un "cuadro grande" en una cámara de Neubauer está limitado, en todos los lados, por líneas triples (ver Figura 1: apariencia visual de la cuadrícula central de una cámara del hemocitómetro de Neubauer mejorado). Para definir cada cuadro grande, deben usarse como límite las líneas situadas más arriba y más a la izquierda. Hay que tener en cuenta que se necesita un objetivo de 40x con una distancia de trabajo grande cuando usamos una cámara de Neubauer.
   - Determinar el número de cuadros que se deben contar. Primero, contar el número de espermatozoides en el cuadro superior de la esquina izquierda. Si hay < 10 espermatozoides, contar toda la cuadrícula (25 cuadros en cada cámara). Para 10-40 espermatozoides, contar 10 cuadros en cada cámara. Para > 40 espermatozoides, contar 5 cuadros en cada cámara (por ejemplo las cuatro esquinas y el centro). El objetivo es contar 200 espermatozoides en cada cámara y que éste número sea suficiente para comparar los dos recuentos.
   - Si se observa con claridad una cabeza de espermatozoide, se recomienda que sea incluida en el recuento de espermatozoides. Las "cabezas de alfiler" deberán contarse aparte y ser comentadas en el informe. No deben contarse células germinales inmaduras (serán valoradas en el recuento diferencial de la morfología), no obstante las células redondas y las células inflamatorias deberían contarse independientemente en el hemocitómetro.
   - "Células en el borde de línea": únicamente los espermatozoides cuya cabeza esté localizada sobre las líneas limitantes más superiores o izquierdas (marcadas "OK" en la Figura 1) deberán contarse como "pertenecientes" al cuadro. De éste modo, no se contarán los espermatozoides localizados en las líneas limitantes más inferiores o derechas (marcadas "out" en la Figura 1).

**Cálculos**

Los recuentos de las dos alícuotas se comparan como se describe en el Apéndice I. Se calcula el número total de espermatozoides contados (suma) y la diferencia entre los dos recuentos. Se acepta la valoración si la diferencia entre los dos recuentos es menor o igual que el valor obtenido en el Apéndice I. En caso contrario, hay que descartar los recuentos, mezclar bien la dilución de semen, rellenar dos nuevas cámaras del hemocitómetro y realizar nuevas medidas.

La suma de los dos recuentos (número total de espermatozoides en ambas cámaras) se divide por el factor apropiado (Tabla II) para calcular la concentración de espermatozoides en la muestra de semen (expresado en $10^6$ espermatozoides/mL)

Nota. En éste manual, el número total de espermatozoides contados se divide por los factores dados en la Tabla II. En el manual de la OMS, el número total de espermatozoides contados se divide primero por 2, para obtener una media, y

luego ésta media es dividida por otro factor. Por lo tanto, los factores que se dan en el manual de la OMS son la mitad de los valores aportados aquí y con este procedimiento se elimina un paso de división y por ello reduce posibles errores aritméticos. [*Si los dos recuentos son aceptados, hay tres cálculos para obtener la concentración de espermatozoides en $10^6$/mL de semen. Esos pasos pueden ser realizados uno a uno, pero es preferible unificarlos en un cálculo simple.*

1. *En primer lugar, se calcula el número medio de espermatozoides contados, dividiendo la suma de espermatozoides contados por 2 (x1/2).*
2. *En segundo lugar, se calcula la concentración de espermatozoides en el hemocitómetro (por ejemplo en la muestra diluida). Para ello se debe conocer el volumen que se ha examinado. El volumen de un cuadro grande en el hemocitómetro de Neubauer mejorado es de 4 nL [200 x 200 x 100 μm (profundidad)]. Así, 5, 10, y 25 cuadros corresponden a volúmenes de 20, 40, y 100 nL respectivamente.*

   *El número medio de espermatozoides contados se divide por el volumen en el cual han sido contados (x 1/20; 1/40; 1/100).*

   *La concentración de espermatozoides obtenida es el número de espermatozoides por nL, lo que equivale a $10^6$ espermatozoides/mL (espermatozoides/$10^{-9}$L = espermatozoides x $10^6$ / $10^{-3}$L).*
3. *En tercer lugar, como se ha diluido la muestra de semen original, para obtener la concentración de espermatozoides en el semen, se multiplica por el factor de dilución: (x 2; 5; 10; 20; 50). Por esto, diluciones de 1 + 1, 1+ 4, 1 + 9, 1 + 19 y 1 + 49 corresponden a factores de x 2, 5, 10, 20 y 50 respectivamente.*

   *Estos 3 pasos pueden realizarse con una simple división, donde el número total de espermatozoides en las dos cámaras se dividide por un factor combinado simple que es dado en la Tabla II*].

## Resultados

La concentración de espermatozoides se anota en el informe de la muestra, y se calcula el número total de espermatozoides en el eyaculado (multiplicando la concentración por el volumen de eyaculado). Además de la recogida de la muestra incompleta y la variación en los días de abstinencia, hay otros muchos factores externos que influyen en el número total de espermatozoides en el eyaculado, por ejemplo haber tenido fiebre, consumir algún tipo de droga y ciertas situaciones profesionales de estrés. Para evaluar correctamente los aspectos cuantitativos de la producción de espermatozoides, los resultados del laboratorio deben contener datos sobre la concentración de espermatozoides, el volumen de eyaculado (o el número total de espermatozoides), los días de abstinencia, y si la recogida de la muestra fue completa.

Cuando no se encuentra "ningún espermatozoide" en la valoración, es preferible que el resultado no se exprese como 0,0 x $10^6$ espermatozoides/mL, sino que se escriba un asterisco (*) en el lugar de la concentración y del número total de espermatozoides. Como comentario adicional, debe indicarse en el informe si no se ha encontrado ningún espermatozoide, o si se ha encontrado algún espermatozoide inmóvil o de movilidad baja en el eyaculado o en el sedimento obtenido tras la centrifugación. Si no se ha encontrado ningún espermatozoide en 100 μL de sedimento, debe hacerse constar el número máximo de espermatozoides que podrían estar presentes en el eyaculado (los detalles sobre los cálculos vienen recogidos en las últimas secciones de éste capítulo), por ejemplo, si no se ha observado ningún espermatozoide; podemos decir que lo más probable es que haya < 188 espermatozoides en la muestra completa.

## Control de calidad

Se deberá realizar los recuentos duplicados para detectar errores al azar en la toma de la alícuota o en el recuento en el hemocitómetro.

Se deben calibrar regularmente las pipetas de desplazamiento positivo (a veces llamadas pipetas PCR) y las pipetas empleadas rutinariamente para realizar las medidas de los diluyentes. Las pipetas que muestren resultados erróneos se deben recalibrar, según las instrucciones del fabricante, o ser enviadas a reparar y ajustar. Se deben anotar, en una lista separada para cada pipeta, los resultados de los controles de calibración, así como de las reparaciones y de los ajustes.

Se debe ser muy cuidadoso al mezclar y al diluir el semen, al mezclar la muestra diluida y al preparar y ajustar el hemocitómetro. Los hemocitó-

**Tabla III:**

Riesgo de no observar espermatozoides en varias concentraciones de espermatozoides valoradas en cámaras de 100 y 10 nL y en una preparación en fresco (~ 40 nL). El riesgo de no encontrar espermatozoides es < 5% en concentraciones de espermatozoides ≥ 300.000/mL para las cámaras de 10 nL, ≥ 75.000/mL para la preparación en fresco y ≥ 30.000 para las cámaras de 100 nL.

| Concentración espermática real (espermatozoides/mL) de la muestra analizada | 1 Makler Sin dilución (10 nL de muestra analizada) | Preparación en fresco (10 campos ≈ 40 nL) | Neubauer (2 cámaras) Dilución 1 + 1 (100 nL) |
|---|---|---|---|
| | Riesgo de no encontrar ningún espermatozoide | | |
| 1000 | 0,99 | 0,96 | 0,90 |
| 10.000 | 0,90 | 0,67 | 0,37 |
| 30.000 | 0,74 | 0,30 | < 0,05 |
| 70.000 | 0,50 | 0,06 | |
| 75.000 | 0,47 | < 0,05 | |
| 100.000 | 0,37 | | |
| 200.000 | 0,14 | | |
| 300.000 | < 0,05 | | |

metros deben chequearse habitualmente cuando se estrenan y tras un periodo de uso (por riesgo de desgaste y cambios en la profundidad de la cámara).

## Reactivos

Diluyente: 50 g $NaHCO_3$; 10 mL de solución de formaldehído al 36-40% (una solución de formaldehído saturada).

- Disolver los constituyentes en agua destilada (> 10 MΩ/cm) y diluir hasta 1000 mL.
- Filtrar (para eliminar cristales) en un bote limpio.
- Conservar a 4ºC (puede ser almacenado, al menos, 12 meses).
- No debe contener partículas sólidas.

## Equipo y materiales

- Agitador (vortex)
- Microscopio de contraste de fases (objetivos 20x ó 40x, y 10x para enfocar fácilmente).
- Cámara húmeda: cualquier caja con una tapa y una gasa o papel que se mantenga húmedo, algún tipo de soporte para colocar la cámara de recuento por encima del material ligeramente humedecido. Nota: la cámara de recuento debe colocarse horizontalmente.
- Calculadora, contador de células de laboratorio, centrífuga, una hoja de trabajo/ hoja de cálculos.
- Cámara de recuento: Hemocitómetro de Neubauer mejorado con cubreobjetos adecuado.
- Pipeta de desplazamiento positivo: por ejemplo: Finnpipette PCR 20-200 µL; puntas: por ejemplo Labsystems 9403 080.
- Pipeta ajustada, calibrada: por ejemplo Finnpipette Digital 200-1000 µL; puntas: por ejemplo blue Treff o Finntip.
- Tubos test "Trombo-test-tube" o "Stockholm tube" (KEBO 104.112-250).
- Tapones para "Trombo-test-tube o "Stockholm tube" (KEBO 103.811-12) Tubo de análisis con tapón para centrifugar muestras de semen.

**Tabla IV:**

Cuando una muestra contiene espermatozoides siempre existe un riesgo de no observarlos. En ésta tabla se representa el número crítico de espermatozoides, en relación al número de campos examinados, por encima del cual, el riesgo de no observar espermatozoides es < 5%. Así, al examinar 400 campos, el riesgo de no encontrar espermatozoides es < 5% si la muestra contiene 188 espermatozoides. Si la muestra contiene muy pocos espermatozoides, por ejemplo 100, el riesgo de no encontrar ninguno es > 5% (20%). Diámetro de campo de 500 µm, profundidad de preparación de 20 µm.

| | Campos de visión contados | | |
|---|---|---|---|
| | **4** | **40** | **400** |
| **Número crítico de espermatozoides** | 18.750 | 1.875 | 188 |

## Confianza del recuento de espermatozoides

***¿Qué significa no encontrar ningún espermatozoide?***

Teóricamente, cuando se examina una muestra de semen completa y no se encuentra ningún espermatozoide, el resultado es cero espermatozoides. Sin embargo, cuando se examina una preparación en fresco o en un hemocitómetro, sólo se analiza una pequeña parte de dicha muestra. Por ello, no encontrar "ningún espermatozoide" significa que la muestra, con una cierta probabilidad, contiene menos de una determinada concentración de espermatozoides. La precisión de una valoración depende de la concentración real de espermatozoides y de la proporción de la muestra original que fue examinada bajo el microscopio. A mayor proporción, mayor será la precisión. Por ejemplo: si se examina una muestra de semen diluida 1+1, utilizando el hemocitómetro de Neubauer mejorado (dos cámaras), se ha examinado 100 nL de la muestra original. Si la misma muestra se examina sin diluir en una cámara Makler, se examinan 10 nL. En la preparación en fresco se pueden examinar unos 10 campos, los cuales corresponden a un volumen de 40 nL. La Tabla III muestra el riesgo de no encontrar espermatozoides en varias concentraciones de espermatozoides reales. El riesgo de no encontrar espermatozoides es < 5% en concentraciones de espermatozoides ¸≥300.000/mL para las cámaras de 10 nL, ¸≥75.000/mL para las preparaciones en fresco (40 nL), y ¸≥30.000/mL para las cámaras de 100 nL.

Estos números también reflejan que cuando no se encuentra ningún espermatozoide en una cámara de 10 nL, hay un riesgo del 5% de ignorar una concentración de espermatozoides de 290.000/mL y del 50% de ignorar 70.000/mL. Esto resalta la necesidad de examinar el sedimento de los espermatozoides tras centrifugar, cuando no hemos encontrado ningún espermatozoide en la preparación en fresco.

***Confianza en la valoración de una gota de 10 µL del sedimento de espermatozoides obtenido tras la centrifugación.***

Bajo el objetivo de 40x, un campo microscópico corresponde a 4 nL. Si la abertura tiene un diámetro de 500 µm se corresponde con un área de 196.427 $\mu m^2$ y con una gota de 10 µL bajo un cubreobjetos de 22x22, la profundidad es de 20,7 µm, lo que se corresponde con la observación de un volumen de 4.058.442 $\mu m^3 \approx 4$ nL.

Cada vez que se analiza al microscopio un cubreobjetos de arriba a abajo, se observan aproximadamente unos 40 campos. Realizando esta operación 10 veces, se analizan 400 campos. Cuando se examinan 400 campos, se valora un volumen total de unos 1.600 nL (4 x 400), por ejemplo ≈ 1/62 del volumen total del sedimento de 100 µL (100.000 nL). Si hay >188 espermatozoides en el sedimento obtenido tras la centrifugación, el riesgo de no encontrar espermatozoides es <5%. Sin embargo, con concentraciones más bajas, la probabilidad de no encontrar espermatozoides es >5%. Por esto, si no encontramos ningún espermatozoide después de examinar un volumen total de 1.600 nL, podemos afirmar que los 100 µL de sedimento, y por tanto la muestra completa, contienen < 188 espermatozoides (Tabla IV).

***Recuento de espermatozoides seleccionados para reproducción asistida.***

Los espermatozoides seleccionados por centrifugación en gradientes o *swim up* son valorados tras preparar una dilución 1+1 (para inmovilizar los espermatozoides) en el hemocitómetro de Neubauer mejorado. A continuación se cuentan ambas cámaras.

Los espermatozoides seleccionados por *swim up* o por centrifugación en gradientes se emplean para reproducción asistida y para diversos estudios experimentales. Cuando los resultados se relacionan o se evalúan en función del número de espermatozoides (por ejemplo en publicaciones), es necesario aplicar buenas prácticas de laboratorio (BPL) para garantizar una certeza de ± 10% en la valoración de la concentración espermática. Una concentración de 4,0 x $10^6$/mL debe ser expresada como 4,0 x $10^6$/mL ± 10%, es decir, 3,6-4,4 x $10^6$/mL con una confianza del 95%. Ésta certeza es fácil de obtener; es simplemente cuestión de contar al menos 400 espermatozoides. Un hemocitómetro de Neubauer mejorado (ambas cámaras) toma 2x100 nL de una suspensión de espermatozoides diluida al 1+1 (para inmovilizar los espermatozoides). La cámara de Makler toma 10 nL de muestras no diluidas. Por ello, en el hemocitómetro de Neubauer se encuentran 10 veces más espermato-

zoides para contar que en la cámara de 10 nL. Esto tiene una especial importancia cuando obtenemos concentraciones de espermatozoides bajas después de la selección espermática. Con las recomendaciones de rutina para valorar la concentración espermática, contando todos los espermatozoides en ambos lados de un hemocitómetro de Neubauer mejorado, se obtienen unos resultados precisos desde ≥ 4 x $10^6$/mL. Por el contrario, si contamos todos los espermatozoides que hay en una cámara de 10 nL, obtenemos unos resultados precisos dentro del ± 10%, únicamente cuando la concentración espermática es ≥ 40 x $10^6$/mL. Para obtener un resultado dentro del 10% en las muestras que se encuentren en el rango de concentración de 4 x $10^6$/mL, se necesitan evaluar 10 cámaras de 10 nL.

La Tabla V proporciona el intervalo de confianza al 95% para aquellas concentraciones de espermatozoides que han sido obtenidas después de contar todos los espermatozoides presentes en un hemocitómetro de Neubauer mejorado y en una cámara de 10 nL. Cuando la variación excede de ± 10%, se recogerá el rango de incertidumbre en el informe. Por ejemplo, si se obtiene 2 x $10^6$/mL en una valoración en un hemocitómetro de Neubauer mejorado se expresa como 2 x $10^6$/mL (rango 1,7-2,3) o ± 14%. Si aplicamos buenas prácticas de laboratorio, y buscamos, por ejemplo, una incertidumbre menor del ± 10%, se necesitan realizar valoraciones de dos hemocitómetros de Neubauer. Si el mismo resultado se obtiene tras su valoración en una cámara de 10 nL, el resultado debería ser expresado como 2 x $10^6$/mL (rango 1,1-2,9) o ± 44%. Para conseguir el resultado de 2 x $10^6$/mL ± 10% con la cámara de 10 nL, se necesitan realizar 20 valoraciones. Si en un protocolo de FIV, el objetivo es inseminar, por ejemplo, con 50.000 espermatozoides todos los ovocitos y en la valoración obtenida en una cámara de 10 nL propociona el resultado de 1 x $10^6$/mL (rango 0,4-1,6) ± 62%, contamos realmente con 20.000-80.000 espermatozoides en una gota de 50 $\mu$L. Únicamente en el 24% de las veces, se adicionan 50.000 ± 10%, es decir, 45.000-55.000 espermatozoides. Por tanto, en la mayoría de los casos (76%), se adicionan >55.000 o <45.000 espermatozoides.

**Tabla V:**

Expresión de los resultados de concentración espermática en el intervalo de confianza del 95% según el número de espermatozoides evaluados en una cámara de 10 nL (cámara de Makler por ejemplo) y en un hemocitómetro de Neubauer (2 cámaras).

| Una cámara de 10 nL (suspensión espermática no diluida) | | | | | Una hemocitométrica de Neubauer (2 cámaras, muestra diluida 1+1 para inmovilizar espermatozoides) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Número de espermatozoides contados | Concentración espermática ($x10^6$/mL) | 95% de todas las medidas incluidas en el intervalo ($x10^6$/mL) | | | Número de espermatozoides contados | Concentración espermática ($x10^6$/mL) | 95% de todas las medidas incluidas en el intervalo ($x10^6$/mL) | | |
| | | Bajo | Alto | ±% | | | Bajo | Alto | ±% |
| 1 | 0,1 | 0,0 | 0,3 | 148 | 10 | 0,1 | 0,0 | 0,2 | 62 |
| 2 | 0,2 | 0,0 | 0,5 | 119 | 20 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 44 |
| 3 | 0,3 | 0,0 | 0,6 | 107 | 30 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 36 |
| 4 | 0,4 | 0,0 | 0,8 | 98 | 40 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 31 |
| 5 | 0,5 | 0,1 | 0,9 | 88 | 50 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 28 |
| 6 | 0,6 | 0,1 | 1,1 | 80 | 60 | 0,6 | 0,4 | 0,8 | 25 |
| 7 | 0,7 | 0,2 | 1,2 | 74 | 70 | 0,7 | 0,5 | 0,9 | 23 |
| 8 | 0,8 | 0,2 | 1,4 | 69 | 80 | 0,8 | 0,6 | 1,0 | 22 |
| 9 | 0,9 | 0,3 | 1,5 | 65 | 90 | 0,9 | 0,7 | 1,1 | 21 |
| 10 | 1,0 | 0,4 | 1,6 | 62 | 100 | 1,0 | 0,8 | 1,2 | 20 |
| 11 | 1,1 | 0,4 | 1,8 | 59 | 110 | 1,1 | 0,9 | 1,3 | 19 |
| 12 | 1,2 | 0,5 | 1,9 | 57 | 120 | 1,2 | 1,0 | 1,4 | 18 |
| 13 | 1,3 | 0,6 | 2,0 | 54 | 130 | 1,3 | 1,1 | 1,5 | 17 |
| 14 | 1,4 | 0,7 | 2,1 | 52 | 140 | 1,4 | 1,2 | 1,6 | 17 |
| 15 | 1,5 | 0,7 | 2,3 | 51 | 150 | 1,5 | 1,3 | 1,7 | 16 |
| 16 | 1,6 | 0,8 | 2,4 | 49 | 160 | 1,6 | 1,4 | 1,8 | 16 |
| 17 | 1,7 | 0,9 | 2,5 | 48 | 170 | 1,7 | 1,4 | 2,0 | 15 |
| 18 | 1,8 | 1,0 | 2,6 | 46 | 180 | 1,8 | 1,5 | 2,1 | 15 |
| 19 | 1,9 | 1,0 | 2,8 | 45 | 190 | 1,9 | 1,6 | 2,2 | 14 |
| 20 | 2,0 | 1,1 | 2,9 | 44 | 200 | 2,0 | 1,7 | 2,3 | 14 |
| 25 | 2,5 | 1,5 | 3,5 | 39 | 250 | 2,5 | 2,2 | 2,8 | 12 |
| 30 | 3,0 | 1,9 | 4,1 | 36 | 300 | 3,0 | 2,7 | 3,3 | 11 |
| 35 | 3,5 | 2,3 | 4,7 | 33 | 350 | 3,5 | 3,1 | 3,9 | 11 |
| 40 | 4,0 | 2,8 | 5,2 | 31 | 400 | 4,0 | 3,6 | 4,4 | 10 |
| 45 | 4,5 | 3,2 | 5,8 | 29 | >400 | | | | <10 |
| 50 | 5,0 | 3,6 | 6,4 | 28 | | | | | |
| 55 | 5,5 | 4,0 | 7,0 | 26 | | | | | |
| 60 | 6,0 | 4,5 | 7,5 | 25 | | | | | |
| 65 | 6,5 | 4,9 | 8,1 | 24 | | | | | |
| 70 | 7,0 | 5,4 | 8,6 | 23 | | | | | |
| 75 | 7,5 | 5,8 | 9,2 | 23 | | | | | |
| 80 | 8,0 | 6,2 | 9,8 | 22 | | | | | |
| 85 | 8,5 | 6,7 | 10,3 | 21 | | | | | |
| 90 | 9,0 | 7,1 | 10,9 | 21 | | | | | |
| 95 | 9,5 | 7,6 | 11,4 | 20 | | | | | |
| 100 | 10,0 | 8,0 | 12,0 | 20 | | | | | |
| 150 | 15,0 | 12,6 | 17,4 | 16 | | | | | |
| 200 | 20,0 | 17,2 | 22,8 | 14 | | | | | |
| 250 | 25,0 | 21,9 | 28,1 | 12 | | | | | |
| 300 | 30,0 | 26,6 | 33,4 | 11 | | | | | |
| 350 | 35,0 | 31,3 | 38,7 | 11 | | | | | |
| 400 | 40,0 | 36,1 | 43,9 | 10 | | | | | |
| >400 | | | | <10 | | | | | |

# 3. Movilidad espermática

**Principios básicos**

Idealmente, y con objeto de minimizar las diferencias en la observación, tanto en los videos del control de calidad como en las preparaciones de las muestras de rutina con semen fresco, todas las valoraciones de la movilidad espermática, se realizarán en un monitor de vídeo (ver procedimiento a continuación). Si no disponemos de equipo de vídeo, dicha observación se realizará con el microscopio, utilizándose el objetivo de contraste de fase de 40x.

La valoración se debe empezar lo antes posible, para evitar artefactos causados por un descenso de la temperatura o por deshidratación de la preparación.

La movilidad espermática se determinará contando todos los espermatozoides móviles e inmóviles en varios campos, elegidos de forma aleatoria, evitando los campos cercanos a los extremos del cubreobjetos, utilizando un objetivo de 40x. Si más del 25% de los espermatozoides se encuentran agregados, la valoración de la movilidad se realizará sólo con espermatozoides libres, haciendo constar en el informe este inconveniente. Las cabezas sueltas, "sin flagelo" no deben contarse.

**Procedimiento**

***Preparación en fresco***

Disponer 6 μL de semen mezclado sin diluir a 37ºC en un portaobjetos limpio y atemperado, (37ºC), y cubrir con un cubreobjetos de 18x18 mm y # 1,5 de grosor. Esto proporciona una profundidad a la preparación de ~20 μm. El examen de esta "preparación en fresco" debe realizarse tan pronto como haya cesado el desplazamiento de los espermatozoides. Si éste permanece tras 60 s debe prepararse y examinarse una nueva alícuota.

Si el cubreobjetos es de 22x22 mm, el volumen debe ser de 10μL para obtener una profundidad de ~20 μm.

***Recuento***

Se clasificarán al menos 200 espermatozoides por duplicado, es decir al menos 400 espermatozoides en total (criterios y método detallado de la valoración de la movilidad: ver apartado de valoración de la movilidad espermática). Se han de contar en al menos cinco campos para cada valoración.

En cada campo se deben contar todos los espermatozoides progresivos rápidos, (clase a de la OMS) y los espermatozoides progresivos lentos, (clase b de la OMS). Se debe ser cuidadoso en contar todas, y solamente, las células que están presentes en el mismo campo al mismo tiempo. Nota: Si el número de espermatozoides móviles progresivos en el campo es muy elevado, debe utilizarse una parte más pequeña del mismo; es de gran ayuda una retícula en el ocular.

Cuando se han contado todos los espermatozoides progresivos, contar en el mismo campo los espermatozoides no progresivos, (clase c de la OMS) y los espermatozoides inmóviles, (clase d de la OMS).

Las cuatro categorías se expresan como porcentajes (rápido, lento, no progresivo e inmóviles).

Es importante el recuento por duplicado para detectar y minimizar los errores aleatorios debidos a la variación obtenida al realizar alícuotas de la muestra de semen y a la valoración de la

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

movilidad en la preparación en fresco. Por tanto, la observación de la movilidad espermática debe repetirse en una segunda alícuota preparada de la misma forma. Deben calcularse las medias de los dos recuentos y dar ésta como resultado. Si las diferencias entre los dos recuentos de movilidad son demasiado elevadas, se ha detectado un error al azar y se deben realizar dos nuevas valoraciones (para detalles ver método y comparación de recuentos duplicados).

## Movilidad espermática en monitor de vídeo

En la pantalla del monitor debe sobreponerse o bien un recuadro negro con una apertura circular o una transparencia de acetato con un campo circular dibujado. En el campo circular así definido, una cuadrícula con recuadros de 25x25 µm facilitará la valoración de la movilidad.

Utilizar el objetivo de 10x de contraste de fase y el anillo de fase correspondiente del condensador. Comprobar en los oculares que la muestra está enfocada correctamente. Ajustar el foco mientras se examinan las imágenes en la pantalla.

## Valoración de la movilidad espermática

La movilidad espermática se valora por categorización en cuatro grupos de movilidad a 37ºC, como se indica en la Tabla I.

1. Elegir un campo de visión aleatorio (si la concentración espermática es muy elevada, solamente contar aquellos espermatozoides situados en un campo más pequeño, p. ej. en los cuatro cuadros centrales). En primer lugar, contar todos los espermatozoides progresivos rápidos y lentos. Después contar en el mismo campo los espermatozoides no progresivos e inmóviles.
2. Contar al menos cinco campos diferentes. En cada preparación deben contarse al menos 200 espermatozoides.
3. Repetir la valoración de la movilidad espermática, como mínimo en 200 espermatozoides en una nueva preparación de la misma muestra de semen.

**Tabla I.** Categorías de movilidad espermática

| Categoría OMS | Denominación | Velocidad correspondiente |
|---|---|---|
| Rápida progresiva | a | ≥ 25µm/s (≥ 1 cuadro del monitor,o cinco veces la longitud de la cabeza) |
| Progresiva lenta | b | 5-24µm/s |
| No progresiva | c | <5µm/s(<1 de la longitud de la cabeza) |
| Inmóviles | d | - |

## Cálculos

Para obtener el porcentaje de los cuatro grupos (a-d), en cada una de las preparaciones se divide el número total de espermatozoides de cada grupo de movilidad por el número total de espermatozoides observado.

Para comprobar que la diferencia entre los dos recuentos se encuentra dentro del rango de error aceptable, se deben realizar los siguientes cálculos:

1. Calcular el porcentaje de espermatozoides de cada grupo de movilidad (a-d).
2. Calcular la media de las dos observaciones para cada grupo.
3. Seleccionar el grupo de espermatozoides móviles que presente un porcentaje más elevado (es decir, uno de los grupos a,b,c,d) y calcular la diferencia existente entre los porcentajes de cada uno de los recuentos de este grupo de movilidad.
4. Se aceptan las valoraciones si la diferencia entre los dos porcentajes de movilidad es igual o menor que el valor obtenido en el Apéndice II. Si no, debe rechazarse la medida y valorarse de nuevo en otras dos preparaciones. Cuando se han realizado dos recuentos aceptados, las proporciones medias (a-d) se redondean, sin números decimales. El 0,5% se redondea al número entero siguiente más alto. Finalmente, la suma de los porcentajes a-d debe ser 100%. Si es necesario, el grupo con mayor proporción se ajusta (aumentando o disminuyendo) para obtener la suma de 100%.

## Resultados

En la hoja de trabajo se detallan los porcentajes de las cuatro categorías de movilidad espermática, los porcentajes de espermatozoides móviles (a+b+c) y

(opcionalmente) los porcentajes de espermatozoides progresivos (a+b).

**Control de calidad**

Se utilizan recuentos duplicados para disminuir el riesgo de errores aleatorios.

En las muestras de semen grabadas en vídeos, la velocidad de cada espermatozoide individual puede medirse fotograma a fotograma para clasificar los espermatozoides en los diferentes grupos (a-d) de movilidad más objetivamente.

Algunos aspectos del control de calidad interno pueden efectuarse mediante exámenes repetidos de vídeos con valores conocidos de movilidad por todos los técnicos de cada laboratorio.

La base del control de calidad externo, es la valoración de los vídeos enviados a los laboratorios participantes por uno de los técnicos de cada laboratorio.

**Equipo**

- Microscopio de contraste de fases (objetivo de 10x) con platina termostatizada a 37ºC. Tubo triocular (oculares y tubo para cámara con magnificación adicional 10x).
- Cámara de vídeo blanco y negro (o color), p.ej. Panasonic: ( 1/2 pulgada; WV-BL200); conectada a un generador de texto).
- Monitor de 13 cm [en blanco y negro, p.ej. Panasonic WV5340 o WV5370 (tamaño normal)]. Un recuadro negro con una apertura circular, (~13 cm de diámetro). Conexiones: "In": conexión a un grabador de vídeo; interuptor:75Ω
- Magnificación total sobre el monitor: 100 µm=75-88 mm (frecuentemente es necesaria una magnificación adicional, "superior" a la magnificación 10x en el objetivo; lo más usual es otra 10x en el foto tubo).
- Comprobar la magnificación total en pantalla con una escala micrométrica.
- Escala micrométrica montada en un portaobjetos de microscopio (para calibración).
- Portaobjetos para microscopio; cubreobjetos 18x18 mm.# 1.5.
- Contador de células con cuatro teclas.

**Grabador de vídeo**

Es necesario equipo extra para grabar vídeo:

- Generador de texto conectado al grabador de vídeo, p.ej. Hama Video Script 550) Entrada: cámara de vídeo. Salida: al grabador de vídeo. Conexión "In": conector tipo SCART multipin.
- Grabador de cinta de vídeo (VHS) con posibilidad de movimiento fotograma a fotograma (1/25 s). Vídeo doméstico con 2 conectores tipo SCART multipin para "In" y "Out". Entrada desde el generador de texto. Salida al monitor.
- Cintas de vídeo (30-60 min de duración; alta calidad).

***Procedimiento***

1. Encender la cámara, monitor, grabador de vídeo y generador de texto. Este último se enciende para realizar una demostración - apagar presionando tres veces MODE.
2. Colocar la cinta en el grabador de vídeo. Rebobinarla desde el principio hasta el final antes de empezar.
3. Colocar el contador de tiempo a cero. Comprobar que el grabador de vídeo indica el "tiempo usado" en el panel.
4. En primer lugar, grabar la imagen de una escala micrométrica que permita la "calibración". Grabar ~10 s, después pulsar "pausa".
5. Colocar el mando controlador del haz de luz de forma que ésta no llegue a la cámara, es decir con el fondo del campo oscuro. Ir al generador de texto e identificar la muestra (p.ej "laboratorio de andrología, hospital XXXXX, control de calidad"). Cuando el texto esté visible en el monitor pulsar grabar durante ~10 s. Grabar 5 s más sin el texto pero con el fondo del campo oscuro.
6. Colocar una alícuota de la muestra en el portaobjetos (atemperado a 37ºC) y enfocar el microscopio. Colocar el mando controlador del haz de luz de forma que ésta llegue a la cámara y ajustar el foco. Desactivar la entrada de luz a la cámara.
7. Anotar el tiempo de inicio y el número de la muestra que se va a grabar (p.ej. "Muestra 1").
8. Con la muestra identificada por el texto en pantalla, grabar durante 5 s.
9. Apagar el texto de identificación de la muestra y reiniciar la entrada de luz a la cámara.
10. Comprobar el enfoque. Grabar durante 10-15 s. Valorar el número de espermatozoides que pue-

den contarse por cada campo. Repetir los pasos 10-12 hasta que se cuenten >200 espermatozoides.

11. Cambiar el campo de observación del microscopio y colocar el controlador del haz de luz de forma que le entre luz a la cámara.
12. Grabar 5 s con el campo oscuro después de haber grabado cada campo de observación.
13. Después de haber completado la grabación de una muestra, grabar un periodo de tiempo más largo, 10 s, de campo oscuro.
14. Repetir desde el paso 7 hasta que la cinta se termine (en una cinta de 60 min podrían grabarse ~10-12 muestras, en el caso que éstas tengan una concentración de espermatozoides razonable).
15. Después de la última muestra grabar el mensaje "fin".

# 4. Vitalidad espermática

**Principios básicos**

Una célula con la membrana celular intacta no se tiñe con eosina Y, mientras que una célula muerta, p.ej. con la membrana celular dañada, absorbe el colorante rojo. La nigrosina se utiliza como tinción de fondo para contrastar las células vivas sin teñir, blancas.

**Procedimiento**

1. Mezclar una gota, 50 µL, de semen licuado, bien mezclado y sin diluir con una gota, 50 µL, de eosina-nigrosina, p.ej. en un platillo de porcelana, e incubar durante 30 segundos.
2. Poner 12-15 µL de la solución en un portaobjetos limpio y hacer la extensión. La gota se extiende deslizando un cubreobjetos delante de la gota. Pueden prepararse dos extensiones simultáneamente colocando 20-30 µL entre dos portaobjetos y separándolos a continuación. No deben realizarse las extensiones demasiado gruesas porque el color de fondo podría ser demasiado oscuro y cubrir los espermatozoides.
3. Dejar secar al aire y examinar directamente, o montar el mismo día y examinar cuando la preparación montada se haya secado, p.ej. dejándola durante la noche. Los portaobjetos montados se conservan a temperatura ambiente.
4. Valorar al menos 200 espermatozoides a una magnificación de 1000x, o 1250x, usando un objetivo de alta calidad 100x sin contraste de fases en aceite de inmersión y con un correcto ajuste de campo claro, iluminación Köhler. Dado que este método diluye a la mitad la muestra de semen, es necesario tener paciencia para encontrar 200 espermatozoides en muestras con baja concentración. Los espermatozoides blancos, sin teñir, se clasifican como "vivos", y los que poseen alguna coloración rosa o roja se clasifican como "muertos".
5. La OMS no especifica recuento duplicado para la valoración de la vitalidad, pero si se hace, la comparación se deberá realizar igual que en la movilidad o la morfología (comparación de proporciones; Apéndice II).

**Cálculos y resultados**

El resultado es la proporción de espermatozoides vitales, "vivos", expresado como porcentaje sin decimales.

La proporción de espermatozoides vivos suele ser algo mayor que la proporción de espermatozoides móviles en la misma muestra.

**Reactivos**

Reactivos: 0,67 g de eosina Y (C.I. 45380, Europa M 15935), 10 g nigrosina (C.I. 50420, Europa M 15924), y 0,9 g de cloruro sódico en 100 mL de agua destilada.

1. Disolver 0,67 g de eosina Y y 0,9 g de coluro sódico en 100 mL de agua destilada calentando suavemente, y añadir 10 g de nigrosina.
2. Llevar la solución a ebullición y dejar que se enfríe a temperatura ambiente.
3. Filtrar la solución con papel de filtro, p.ej. Munktell clase II.
4. Almacenar en botella de cristal cerrada herméticamente.

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

La tintura debe estar a temperatura ambiente cuando se utilice.
Montaje: usar medio de Merck Entellan u otro medio equivalente para montaje rápido y permanente.

## Equipo y material

- Microscopio con objetivo de 100x para inmersión en aceite.
- Portaobjetos de tamaño estándar, y cubreobjetos, p.ej 24x60 mm.

# 5. Morfología espermática

## Principios básicos

La morfología vista con el microscopio no es la verdadera morfología del espermatozoide vivo, sino una imagen creada por nosotros. Esta imagen abarca una serie de factores: espermiogénesis, transporte espermático, maduración y envejecimiento, tiempo en el plasma seminal, técnica de extensión, fijación, tinción, montaje y la óptica e iluminación usadas (calidad del microscopio). Los criterios de clasificación son solo el paso final por el cual describimos la imagen creada durante la preparación. Usando métodos estandarizados y controlados, podemos minimizar las fuentes de error dependientes de la técnica y centrar nuestros esfuerzos en la clasificación de las variaciones de la morfología espermática.

Es de gran importancia que las preparaciones (extensión y tinción) sean de alta calidad ya que, incluso pequeños artefactos dependientes de la técnica influyen en el aspecto del espermatozoide.

Aunque el espermatozoide humano muestra grandes variaciones en su morfología, las observaciones de espermatozoides obtenidos de moco cervical post coital han ayudado a definir la morfología del espermatozoide ideal. Presumiblemente, el espermatozoide que fecundará es seleccionado entre estos espermatozoides ideales.

La tinción de Papanicolau (hematoxilina, naranja G6 (OG6 ) y EA50) proporciona una clara diferencia entre constituyentes celulares basófilos y acidófilos, permitiendo así, un examen detallado del patrón de cromatina lo cual es de utilidad para el estudio de la presencia de formas inmaduras. La tinción del citoplasma puede variar entre rojo y verde dependiendo de la fuerza iónica, el pH y la composición del espacio celular y del colorante (OG6 y EA50).

### *Tinción nuclear*

Hay muchas hematoxilinas dependiendo del grado de oxidación de la hematoxilina y del tipo de mordiente utilizado (el reactivo que facilita la unión del colorante a las estructuras celulares). La hematoxilina por sí sola es incolora. Es la forma oxidada, hematina, la que da el color. El color de la hematina depende del pH. En medio ácido es roja mientras que en medio alcalino es azul. Consecuentemente, el pH durante la tinción afecta al resultado final. La oxidación espontánea de la hematoxilina a hematina tarda semanas en producirse. Por ello la hematoxilina es oxidada artificialmente añadiendo un agente oxidante; normalmente yodato sódico u óxido mercúrico. La mayoría de las hematoxilinas comercialmente disponibles están oxidadas artificialmente y contienen una mezcla de hematoxilina y hematina. Puede producirse una sobreoxidación transformandose la hematina en oxihematina incolora. Esto explica la atenuación espontánea del color que se observa en tinciones almacenadas durante largos períodos de tiempo (años).

La hematoxilina y la hematina tienen una carga positiva débil por lo que es necesario el uso de mordientes que se comportan como reactivos de unión, ligando la hematoxilina a la célula. El tipo de mordiente tiene también efecto sobre el color de la célula teñida. Los mordientes son compuestos metálicos que se unen simultáneamente a la hematoxilina y a los componentes tisulares cargados negativamente, normalmente residuos de ácido fosfórico del DNA, aunque también a grupos carboxilo. El sulfato de amonio-aluminio es el más usado y es un componente de las hematoxilinas de Harris y de Mayer.

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

Las extensiones teñidas con la hematoxilina de Harris (la habitual en la tinción de Papanicolau) se conservan durante años si se guardan en oscuridad. Sin embargo la intensidad del color va disminuyendo después de un almacenamiento prolongado, tal como se ha explicado previamente.

***Tinción citoplasmática***

Se realiza con el naranja G6 (OG6), que es una solución ácida que permite la unión del OG6 a las proteinas citoplasmáticas cargadas negativamente.

***Tinción citoplasmática y nucleolar***

El EA 50 es una mezcla policromática de colorantes: verde claro (SF amarillento), eosina Y y marrón Bismarck Y. El verde claro y la eosina son colorantes ácidos: el verde claro se une a las cadenas laterales de la proteínas básicas. La eosina es una xantina cargada negativamente en soluciones acuosas y que tiñe los componentes citoplasmáticos, los nucleolos (ausentes en el espermatozoide) y los cilios. Su absorción máxima es a 515-520 nm.

**Consideraciones para la evaluación de la morfología espermática**

Cada espermatozoide sin "defectos" morfológicos es definido como ideal. Todas las desviaciones de la morfología ideal son clasificadas como defectos. La presencia de defectos en cada región del espermatozoide se expresa como "defectos por 100 espermatozoides" para esa región. Un espermatozoide con un defecto en la cabeza, en la pieza intermedia y en la cola es registrado como un espermatozoide con tres defectos pero sigue siendo un único espermatozoide defectuoso. Según esto, el número total de defectos será mayor al número de células defectuosas.

Sólo se cuentan los espermatozoides completos, con cabeza y cola. Las cabezas solas se cuentan de forma separada. Si hay muchas formas "cabeza de alfiler" o colas sueltas (>20% de todos los espermatozoides) deberá ser anotado aparte. Las células germinales inmaduras deben ser contadas separadamente, y no como espermatozoides.

***¿Qué es un espermatozoide ideal?***

Un espermatozoide maduro ideal, tal como fue adoptado por la OMS en 1999, tiene una cabeza con forma oval y contorno regular (4,0-5,0 μm de largo y 2,5-3,5 μm de ancho) con una parte pálida anterior (acrosoma: 40-70% del área de la cabeza) y una región más oscura posterior. La relación largo/ancho de la cabeza debe ser entre 1,5-1,75. La cola debe estar simétricamente unida a la base de la cabeza. La base de la cabeza debe ser ancha y no similar a una flecha. Solo debe haber una cola unida, de aproximadamente 45 μm de largo, no enrollada, rota ni doblada sobre sí misma. Inmediatamente tras la cabeza, la primera parte de la cola, la pieza intermedia deberá ser algo más ancha (1 μm aprox.) y de 7-8 μm de largo. Una gota citoplasmática normal tiene un contorno liso (no irregular), aparece en la base de la cabeza y su tamaño es inferior a un tercio de una cabeza normal.

Todas las formas límite o dudosas deben clasificarse como defectuosas. Estos criterios se ajustan a los "criterios" estrictos para formas morfológicamente normales *(Menkveld et al, 1990)*.

En la página 19 del manual de la OMS (1999) el tamaño de una gota citoplasmática normal debe ser inferior a un medio del área de una cabeza normal. En la página 21 el límite es un tercio. La recomendación del presente manual es la de un tercio del área de una cabeza normal.

En el manual de la OMS las leyendas de las figuras 2.9-2.10 no son congruentes con el texto de las páginas 19-21. Este manual recomienda que se apliquen los criterios dados en el presente texto.

**Recuento de formas defectuosas**

Esta valoración está relacionada con las partes principales del espermatozoide (cabeza, pieza intermedia y cola). No se realiza diferenciación entre las diferentes anormalidades. Si predomina una anormalidad concreta, deberá comentarse en el informe. Se valoran las siguientes cuatro categorías principales.

*Defectos de cabeza*

Incluyen formas grandes, pequeñas, alargadas (cociente largo/ancho>2), con forma de pera (piriformes), redondas, amorfas, vacuoladas (>20% del área de la cabeza ocupada por vacuolas no teñidas), acrosomas pequeños (<40% del área de la cabeza) o dobles cabezas, o combinaciones de estos defectos. Los espermatozoides "cabeza de alfiler" no se cuentan.

*Defectos de cuello y de pieza intermedia*
Incluyen cola doblada (cuando la pieza intermedia y la cola forman un ángulo >90º con el eje longitudinal de la cabeza espermática = originada a partir de un centríolo anormal), con inserción asimétrica, pieza intermedia ancha, irregular o estrecha (ausencia o desplazamiento de la vaina mitocondrial) o la combinación de estas anormalidades.

*Defectos de cola*
Incluyen cola corta, doble, horquilla ("hairpin"), rota, doblada (ángulo >90º), irregular o enrollada, o las combinaciones de estas anomalías. Las colas sueltas no se cuentan. Una frecuencia alta de colas enrolladas puede indicar que el espermatozoide ha estado sometido a estrés hipoosmótico. La cola enrollada está también relacionada con el envejecimiento del espermatozoide. Una frecuencia >20% de formas enrolladas deberá comentarse en el informe.

*Gotas citoplasmáticas*
Pueden permanecer restos citoplasmáticos sobresaliendo de la base de la cabeza en el cuello-pieza intermedia. Las gotas con contorno liso, y un tamaño no superior a la tercera parte de la cabeza del espermatozoide son clasificadas como normales. Si el tamaño de la gota es mayor o el contorno es irregular (teñida verde o roja), se trata de un residuo citoplasmático anormal y se clasifica como gota citoplasmática. Algunos espermatozoides inmaduros pueden tener gotas citoplasmáticas en otras posiciones a lo largo de la cola.

***Defectos específicos***
Entre los animales domésticos se han descrito diferentes defectos esterilizantes en los que prácticamente todos los espermatozoides producidos por un determinado animal tienen un defecto estructural específico que perjudica la función espermática. En los hombres se han descrito pocos casos equivalentes; el más conocido es probablemente el denominado "defecto de cabeza redonda" o "globozoospermia". Este defecto se ha visto en algunos hombres y afecta a todos los espermatozoides en sus eyaculados.

## Preparación de las extensiónes

Los portaobjetos para las extensiones de morfología deben estar totalmente libres de grasa para asegurar que la extensión se adhiere al cristal. Si la extensión se desprende durante la fijación y la tinción, los portaobjetos que van a usarse deberán ser prelavados con etanol 95% (o absoluto) para permitir que la extensión quede firmemente unida al portaobjetos.

Si una extensión se hace a partir de espermatozoides lavados procedentes de un *swim-up*, resulta muy difícil que quede firmemente adherida al portaobjetos si la solución no contiene proteínas. En esos casos deben usarse portaobjetos recubiertos con albúmina o poli-L-lisina, o bien añadir albúmina a la solución (concentración final 1% p/v).

***Realización de la extensión***
Para realizar una extensión, se coloca una alícuota de 6 µL en el portaobjetos. A continuación se arrastra a lo largo del portaobjetos con la ayuda de otro portaobjetos o un cubreobjetos. Esto debe hacerse con mínima fuerza para evitar la posible ruptura de las colas de los espermatozoides. De cada muestra deben prepararse dos extensiones. Si la concentración estimada de espermatozoides es < 20 millones/mL se utilizarán 10-20 µL de semen. Con muestras muy viscosas pueden usarse otros métodos. Se puede diluir la muestra con una solución de NaCl 170 mmol/L y preparar la extensión como se ha comentado o bien depositar una gota de semen sobre el portaobjetos, colocando a continuación otro portaobjetos sobre el primero y posteriormente separarlos por deslizamiento.

Dejar las extensiones secar al aire. En diagnóstico citológico se utiliza una preparación húmeda para la mayoría de las extensiones de modo que la preparación húmeda se sumerge en el fijador o se le añade éste mediante aerosol. De este modo se evita la contracción de las células. Este método puede usarse también para extensiones seminales (pero debe tenerse en cuenta como complicación que las células pueden quedar flotando sobre el portaobjetos y perderse).

Las extensiones seminales pueden secarse completamente al aire antes de ser fijadas, pero si se dejan secar durante demasiado tiempo pueden producirse cambios morfológicos en el espermatozoide. (por ejemplo, discontinuidad entre la cola y la cabeza, o pérdida de acrosoma por excesiva retracción). Por lo tanto, las extensiones deberían

ser transferidas al fijador inmediatamente después de que la humedad de la extensión se haya evaporado. Este "incompleto" secado al aire normalmente permite un mejor anclaje de la extensión al portaobjetos.

Tan pronto como la humedad se evapora, la extensión debe ser fijada.

**Tabla I.** Esquema para la tinción de las extensiones

| Reactivo | Exposición | Explicaciones y comentarios |
|---|---|---|
| Etanol 50% | 10 inmersiones o 10 s | Extensiones transferidas directamente desde una solución fijadora de etanol 95% (sin secar) deben ser transferidas a través de al menos un contenedor con etanol 50%. La rehidratación de extensiones secadas al aire necesita más tiempo, 2-3 min en etanol 50% si el tiempo de secado ha sido largo (días o semanas). |
| Agua destilada | 10 inmersiones | |
| Hem. de Harris | 3 minutos exactamente | Las extensiones fijadas y secas pueden ser transferidas directamente a la hematoxilina pero el tiempo de incubación debe aumentarse. La hematoxilina es un colorante nuclear, y se consume con el uso. Si la tinción nuclear es débil, el tiempo de exposición debe aumentarse o, preferiblemente, usar una solución fresca. |
| Agua corriente | 5 min | Eliminación de la hematoxilina no unida. |
| Etanol ácido (HCl 0.25% en etanol 70%) | 2 inmersiones[a] | Después de la tinción la hematoxilina se une a toda la célula. El tratamiento ácido elimina la tinción inespecífica gracias a que el color unido a componentes citoplasmáticos es desplazado por iones $H^+$. Sin embargo, un tiempo excesivo de exposición al ácido disminuye el color en el núcleo. Tras el tratamiento ácido, los portaobjetoss deben ponerse en agua corriente inmediatamente para aumentar el pH y prevenir la desaparición de toda la hematoxilina. (La intensidad de la tinción puede ser verificada aquí, antes de continuar la tinción. Si el núcleo aparece demasiado oscuro este paso –etanol ácido– puede repetirse). Las tinciones muy débiles indican que la exposición a la hematoxilina fue insuficiente. |
| Agua corriente (o agua alcalina) | 5 min | El color de la hematoxilina depende del pH. Después del tratamiento ácido es rojiza. Al lavar los portaobjetos en agua corriente el pH aumenta y la hematoxilina unida al núcleo recobra el color azulado[b]. |
| Agua destilada | 1 inmersión | Preparación para la tinción citoplasmática |
| Etanol 50% | 10 inmersiones | Para teñir los componentes citoplasmáticos (ver más abajo) es necesaria la deshidratación de las células usando una solución de alcohol de fuerza creciente debido a que los colorantes (Naranja G6 y EA-50) son solo solubles en alcohol. |
| Etanol 70% | 10 inmersiones | |
| Etanol 80% | 10 inmersiones | |
| Etanol 95% | 10 inmersiones | |
| Naranja G6 | 2 min | Tinción citoplasmática |
| Etanol 95% | 10 inmersiones | Estos pasos son para eliminar el exceso de Naranja G6. Si el Naranja G6 citoplasmático se expone durante demasiado tiempo al etanol, puede quedar eliminado. |
| Etanol 95% | 10 inmersiones | |
| EA-50 | 5 min | Tinción citoplasmática y nucleolar: una pequeña cantidad de ácido, por ejemplo ácido acético, en la mezcla de tinción aumenta la presencia de componentes tisulares cargados positivamente que se unirán así mejor a la eosina. La tinción excesiva se evita con el etanol (EA 50 se disuelve en etanol-metanol 95%) |

(a) Puede probarse el tiempo adecuado de tratamiento ácido pero normalmente 2 inmersiones son suficientes para eliminar tinciones inespecíficas (esto puede comprobarse directamente en el microscopio)

(b) A veces el agua del grifo es demasiado ácida (pH 4-5) por lo que este cambio de color (a azulado) no se produce. En esos casos las extensiones se introducen en solución de Scott (contiene 3,5 g de bicarbonato sódico, 20 g de sulfato de magnesio, 1000 mL de agua corriente y 1 pequeño cristal de Tymol para evitar crecimiento microbiano). Otro método para alcalinizar el agua es sumergir el portaobjetos una vez en una solución preparada añadiendo 2-3 gotas de amonio líquido ($NH_4OH$) en 200 mL de agua corriente. Esto desarrolla rápidamente el color azul y acorta el procedimiento.

### *Fijación de la extensión*

*Fijación*: 15 min. en etanol 95%. La extensión podría mantenerse en etanol durante días hasta la tinción. El etanol (94-96%) es un fijador líquido satisfactorio para las extensiones seminales. Las extensiones pueden teñirse después de 15 minutos de fijación. También pueden permanecer en etanol durante varios días o incluso semanas (preferentemente en etanol 70% para largos períodos de almacenaje). La fijación en etanol provoca deshidratación en las células. Por lo tanto, las células en una extensión seca y fijada deben ser rehidratadas antes de teñirse.

El uso de etanol-éter como fijador no proporciona ningún beneficio para el análisis de la morfología espermática, el éter es relativamente caro, y mucho más inflamable y peligroso para la salud. El ácido acético, que es un componente del fijador recomendado por la OMS, causa un aumento del contenido de agua en la célula y puede mejorar la tinción del núcleo pero provoca una tinción más tenue del citoplasma. Los aerosoles fijadores se usan normalmente sobre preparaciones húmedas. Contienen etanol al 50% o isopropanol, y polietilenglicol ("Carbovax"), el cual forma una película protectora sobre las células, que protege la extensión, p.ej. durante el transporte después de un secado intenso. Si se usa polietilenglicol, debe eliminarse lavando la extensión antes de sumergirla en la hematoxilina: el primer contenedor con etanol 50% debe ser cambiado después del paso de cada cestilla de portaobjetos para asegurarse de que el polietilenglicol ha sido excluido.

Una de las dos extensiones de cada muestra se guarda como reserva y la otra se tiñe y se valora.

### *Tinción de la extensión*

Llenar los recipientes con las diferentes soluciones (ver la secuencia en la Tabla I). Usar una campana extractora de vapores como medida de seguridad.

Colocar los portaobjetos en cada solución de acuerdo con el esquema de la Tabla I. (una inmersión supone aproximadamente 1 segundo).

Cambiar los reactivos si comienza a palidecer el color en los portaobjetos o tras 25-30 series de portaobjetos. La intensidad de la tinción disminuye gradualmente con cada serie de portaobjetos. Esto supone que, después de 8-10 grupos de por-

**Tabla II**. Montaje de extensiones teñidas

| Paso | Exposición | Explicaciones y comentarios |
|---|---|---|
| Etanol 95%<br>Etanol 95%<br>Etanol 95%<br>Etanol 98-99.5%<br>(etanol absoluto) | 5 inmersiones<br>5 inmersiones<br>5 inmersiones<br><br>2 minutos | Pasos de deshidratación para preparar el montaje con el disolvente inorgánico |
| Medio de montaje[a] 2-3 gotitas | Mountex<br>Eukitt<br>DePex<br>Pertex | Cuando el medio de montaje es soluble en etanol (Mountex, Eukitt), puede colocarse directamente sobre la extensión, que estará todavía húmeda de etanol.<br>Si el medio es insoluble en etanol (DePex, Pertex Permount) dejar la extensión secar al aire (el etanol se evapora), añadir el medio y montar. Si las extensiones no están totalmente secas el etanol debe ser eliminado sumergiendo primero el portaobjetos en solución etanol-xileno (v/v) y después en dos cambios en xileno 100%. Puede usarse "Bioclear" en lugar de xileno para eliminar el etanol. El etanol debe eliminarse totalmente. Comprobar colocando el portaobjetos contra la luz que no hay fase líquida debida a la presencia de etanol. Si hay gotas de etanol en el portaobjetos que se va a montar con un medio insoluble en etanol, se forma un fondo con áreas ricas en eosina. Sin embargo, cuando las extensiones se secan al aire, no hay necesidad de xileno ni "Bioclear". |
| Cubreobjetos de 24x60 mm | | • Un cubreobjetos de 24x60 mm es lo más conveniente, y puede colocarse directamente sobre la extensión después de añadir 2 o 3 gotitas de medio de montaje.<br>• Colocar el cubreobjetos de tal modo que el primer contacto con el medio de montaje empiece por uno de los extremos del cubreobjetos. De este modo se evita la formación de burbujas.<br>Las burbujas pueden evitarse también presionando fuertemente sobre el cubreobjetos y retirando el medio sobrante. Dejar secar el portaobjetos antes de mirarlo al microscopio, como norma habitual, durante toda la noche. Si se necesitan urgentemente los resultados de la morfología espermática, se puede estudiar al microscopio tras 30 minutos de secado. Pero debe evitarse cualquier presión o deslizamiento del cubreobjetos. |

[a] El último paso del proceso de tinción es el montaje de la extensión, esto es, cubrir el portaobjetos con un cubreobjetos que se pega con un medio de montaje.

taobjetos, por ejemplo, podría aumentarse el tiempo de tinción o añadir una cantidad de colorante fresco al recipiente. En las tres soluciones de colorantes (hematoxilina, OG6 y EA50) suele aparecer material sedimentado; cuando esto ocurra deben filtrarse las soluciones para evitar que estos sedimentos se depositen en los portaobjetos.

### *Montaje de la extensión teñida*

El montaje permite el almacenamiento de las extensiones durante largos períodos de tiempo manteniéndose una aceptable calidad. Las extensiones deberán ser montadas directamente usando un medio de montaje permanente. La extensión montada debe dejarse secar durante al menos toda la noche antes de ser examinada. Puede guardarse durante muchos meses a temperatura ambiente. Las extensiones que no se montan pueden examinarse tan pronto como se secan al aire. Se recomienda el uso de medios solubles en alcohol como medios de montaje en lugar de xileno, que supone peligro para la salud. Los detalles de la técnica de montaje se dan en la Tabla II.

## Evaluación de la morfología espermática

Deben estudiarse al menos 200 espermatozoides. Cada extensión es valorada usando un microscopio con un aumento total de 1000x usando un objetivo de alta calidad 100x sin contraste de fases con aceite de inmersión y con un correcto ajuste de campo claro (iluminación Köhler). El objetivo deberá ser de óptica plana. Los objetivos de contraste de fases no proporcionan suficiente resolución para el estudio de la morfología espermática debido a la presencia de anillos de fase en la cara posterior de las lentes. Solo se consideran los espermatozoides completos, con cabeza y cola. Esto incluye situaciones en las que la cantidad de citoplasma y la corta longitud de la cola indican que el espermatozoide es inmaduro (por ejemplo cuando está en un estadío de espermátide elongada).

### *Células germinales inmaduras y espermatozoides maduros*

Debe anotarse la presencia de células inmaduras. Una célula inmadura es una célula redonda. Las espermátides en el eyaculado pueden tener entre uno y cuatro núcleos azules-rojizos localizados periféricamente en la célula. Los espermatocitos tienen un solo núcleo centralmente localizado.

Las formas inmaduras pueden expresarse por 100 espermatozoides y puede calcularse su concentración en la muestra de semen a partir de la concentración de espermatozoides. La fórmula para este cálculo es:

concentración de células germinales inmaduras = número de células inmaduras contadas por 100 espermatozoides(%)/100*concentración de espermatozoides.

## Control de calidad

El manual de la OMS recomienda que se cuenten 200 espermatozoides por duplicado (2x200) si el diagnóstico y tratamiento del paciente dependen crucialmente de este análisis. La ESHRE/NAFA recomienda realizar también el recuento duplicado cuando los datos derivados vayan a usarse en publicaciones científicas. En la práctica de rutina se estudian sólo 200 espermatozoides y no por duplicado. Cuando se hacen recuentos por duplicado, los cálculos se realizan como sigue:

1. Calcular el porcentaje de formas normales y anormales y seleccionar el mayor de estos dos grupos para la comparación de los duplicados.
2. Calcular las diferencias entre las dos valoraciones en el grupo seleccionado.
3. Si la diferencia es menor al valor obtenido en el Apéndice II, el resultado puede ser aceptado. Si la diferencia es mayor a ese valor, deben realizarse dos nuevas valoraciones.

Si la tinción es técnicamente difícil de leer, se deberá teñir la extensión guardada de reserva con soluciones frescas y valorarla.

Si la extensión ha desaparecido durante el proceso de teñido, una razón podría ser que era demasiado gruesa, o bien que los portaobjetos no estaban lo suficientemente limpios. La presencia de pequeños cristales azul oscuros sobre la extensión teñida indica que la hematoxilina no ha sido filtrada antes de su uso.

## Cálculos y resultados

Deben transferirse los siguientes datos al informe impreso:

1. Porcentaje de espermatozoides ideales (corresponde al porcentaje de espermatozoides normales de la OMS).

2. Porcentaje de defectos de cabeza, porcentaje de defectos de cuello/pieza intermedia, porcentaje de defectos de cola, porcentaje de gotas citoplasmáticas.
3. Índice de teratozoospermia ($TZI^{92}$: media del número de defectos por espermatozoide defectuoso); se calcula dividiendo la suma de porcentajes de todos los defectos (defectos de cabeza, defectos de cuello/pieza intermedia, defectos de cola y gotas citoplasmáticas) entre el porcentaje de espermatozoides anormales.
   El manual de la OMS-1999 clasifica el cálculo del TZI como opcional. La recomendación de la ESHRE/NAFA es que debería ser calculado incluyendo todos los grupos de defectos, tal como se define en la OMS-1992. Sin embargo, para evitar confusiones con el índice anterior, que incluía también las gotas citoplasmáticas, la ESHRE/NAFA sugiere que el TZI debería darse con el índice 92, $TZI^{92}$ para referirse claramente a la recomendación anterior de la OMS.

## Reactivos

Nota: El agua destilada significa que ha sido desionizada o bidestilada (la ausencia de iones debe provocar una resistencia de >10 MΩ/cm).

Fijación: etanol, 95% (ver más adelante).

Tinción: se usa etanol con diferentes grados de pureza en solución acuosa: 50, 70, 80, 95, 99.5% v/v. Estas soluciones se preparan por dilución volumétrica de etanol 99.5% con agua destilada y se guardan en botellas de cristal bien cerradas a temperatura ambiente. No guardar refrigeradas por el peligro de explosión. Etanol ácido: 150 mL etanol 70% (v/v); 1 mL de HCl concentrado (36%); 50 mL de agua destilada.

Colorantes: Hematoxilina de Harris, EA50 y naranja G6 que pueden adquirirse listos para su uso y guardarse a temperatura ambiente protegidos de la luz. La hematoxilina debe ser filtrada (papel de filtro Reeve 802) justo antes de usarse. Se puede realizar un máximo de 25-30 series de tinción y después desechar la solución de trabajo. Los reactivos deben cambiarse por soluciones frescas cuando la intensidad de color se vuelve demasiado débil o disminuye rápidamente en los portaobjetos (especialmente el azul). Después de 10 series las soluciones de colorante deben filtrarse para eliminar los residuos (fragmentos que se despegan de las extensiones) y las partículas de colorante sedimentadas.

Montaje: Mountex, Eukitt, DePex, Permount, Pertex (Ver Tabla II).

## Equipo y materiales

- Microscopio: Objetivo de 100x para aceite de inmersión, con corrección de irregularidades de la superficie de la lente, sin contraste de fases.
- Portaobjetos para microscopio (tamaño estándar), cubreobjetos (24x60 mm).
- Equipo citológico convencional para fijación y tinción de extensiones.

### Referencias

Menkveld, R, Stander F.S., Kotze, T.J., Kruger, T.F. y van Zyl, J.A. (1990). The evaluation of morfological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum. Reprod., 5 586-592.

# 6. Anticuerpos anti-espermatozoide

**Principios básicos**

Los espermatozoides desencadenan una respuesta inmune al entrar en contacto con el sistema inmunológico del organismo. Por esto, un trauma, en el aparato genital masculino, como por ejemplo una vasectomía, o reacciones inflamatorias en el tracto genital masculino o femenino pueden provocar la producción de anticuerpos dirigidos contra los espermatozoides. Dependiendo de la naturaleza y de la localización del antígeno espermático y de la concentración de anticuerpos, se pueden observar diferentes efectos:

1. Aglutinación: Se observan en la muestra de semen aglutinaciones de espermatozoides móviles unidos entre sí.
2. Efecto citotóxico: En presencia de suero (con complemento activo) los espermatozoides pueden morir. La existencia de anticuerpos, que ejercen un efecto citotóxico, debe sospecharse si la movilidad y vitalidad disminuyen rápidamente en una muestra de semen. Se trata de un fenómeno raro y probablemente necesita altas concentraciones de anticuerpos.
3. Otros efectos son la dificultad de paso a través del moco cervical y la unión y penetración de la zona pelúcida.

Los anticuerpos detectados en la superficie espermática no siempre van dirigidos hacia los antígenos intrínsecos de los propios espermatozoides, sino que también pueden ir dirigidos contra moléculas adheridas, originadas en las glándulas sexuales accesorias.

**Anticuerpos anti-espermatozoide**

Más adelante se describen los métodos para detectar anticuerpos del tipo IgG e IgA en la superficie espermática. Los anticuerpos de tipo IgG pueden aparecer en los conductos genitales por trasudación desde la sangre. Las células inmunológicas afincadas en las paredes del tracto genital (por ejemplo epidídimo o cérvix) pueden producir anticuerpos del tipo IgA.

Los anticuerpos del tipo IgA tienen una estructura especial (parte secretora) que puede unirse al moco cervical. Si la IgA está presente sobre la superficie espermática significa que el espermatozoide, a través del anticuerpo IgA, puede llegar a anclarse al moco cervical. Esto puede observarse como el fenómeno *shaking* (movimiento rápido no progresivo) del espermatozoide en el moco cervical. Los anticuerpos unidos a la cabeza espermática pueden interferir en la unión a la zona pelúcida y la reacción acrosómica, y por ello alterar la fecundación. Se han descrito gestaciones, tras fecundación *in vitro,* en casos donde más del 80% de cabezas de espermatozoides presentaban anticuerpos adheridos. En otros casos, la microinyección intracitoplasmática se ha aplicado para superar una probable infertilidad inmunológica, donde el 100% de los espermatozoides presentan anticuerpos adheridos a su superficie. En casi todos los casos donde se producen localmente anticuerpos anti-espermatozoide IgA también se secretan anticuerpos IgG. Por ello, para el cribado de anticuerpos espermáticos en el semen se emplea frecuentemente una prueba para anticuerpos anti-espermatozoide IgG. Sin embargo, actualmente hay pruebas disponibles para evaluar directamente en el semen anticuerpos IgA unidos a superficie de los espermatozoides.

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

***Pruebas para anticuerpos anti-espermatozoide sobre la superficie espermática***

La presencia de anticuerpos anti-espermatozoide tipo IgG e IgA sobre espermatozoides puede determinarse directamente en semen con la prueba SpermMAR para IgG e IgA. Estos también se pueden identificar en semen lavado mediante la prueba Immunobead.

Los anticuerpos tipo IgM son muy raros, y se consideran de escasa importancia en infertilidad. Su presencia puede reducir la disponibilidad de espermatozoides por una fuerte aglutinación espermática.

***Pruebas para anticuerpos libres dirigidos contra la superficie espermática***

Para la detección de anticuerpos libres dirigidos contra espermatozoides en semen sin espermatozoides, así como en el suero o en el moco cervical, se utilizan espermatozoides de donante sin anticuerpos para captar cualquier anticuerpo libre en los fluidos examinados. A continuación, los anticuerpos unidos a los espermatozoides de donante serán detectados con las pruebas directas tal como se ha descrito previamente.

El moco cervical se puede solubilizar enzimáticamente (bromelina) o por sonicación.

## Pruebas SpermMAR

***Principios básicos***

*Prueba SpermMAR IgG directa*

La prueba emplea partículas de látex recubiertas con IgG humana. Normalmente cuando los espermatozoides se mezclan con dichas partículas de látex no ocurre nada. Sin embargo, en presencia de anti-Ig humana, hay dos posibilidades. Si el espermatozoide no tiene anticuerpos en su superficie los espermatozoides se moverán sin partículas adheridas, mientras que las partículas (las cuales tienen anticuerpos en su superficie) tenderán a agruparse debido a la presencia del antisuero. Por el contrario, si el espermatozoide tiene anticuerpos en su superficie, la anti Ig-humana se unirá simultáneamente a la IgG localizada sobre las partículas y los espermatozoides. Los espermatozoides móviles se desplazarán con las partículas adheridas.

*Prueba* Sperm*MAR IgA directa*

La prueba Sperm*MAR* IgA contiene partículas de látex que llevan anticuerpos dirigidos contra la IgA humana, es decir, anti IgA humana. Así, después de mezclar espermatozoides con dichas partículas recubiertas de anti-IgA, se unirán las partículas a los espermatozoides en el caso de que éstos últimos presenten IgA en su superficie.

*Prueba* Sperm*MAR indirecta*

Los anticuerpos adheridos a espermatozoides de donante, tras la incubación de éstos con el líquido que va a ser analizado, son detectados como se ha descrito anteriormente para la prueba directa.

***Procedimientos***

*Prueba* Sperm*MAR IgG directa*

1. Poner por separado, gotas de igual tamaño sobre un portaobjetos: una gota de semen fresco sin lavar, una gota de partículas de látex recubiertas de IgG y una gota de antisuero para IgG humana. Para un volumen de gota de 3,5 $\mu$L (semen, partículas y antisuero) se debe usar un cubreobjetos de 22x22 mm #1.5 de grosor. Si el volumen de gota empleado es de 10 $\mu$L, como recomiendan los fabricantes, deberá emplearse un cubreobjetos de mayor tamaño (por ejemplo, 24x40 mm #1.5 de grosor) ya que de otra manera la profundidad de la preparación será demasiado grande y obliga al observador a estar enfocando continuamente.
2. Usando una punta de pipeta amarilla, mezclar primero las dos gotas que contienen el semen y las partículas recubiertas de IgG. Luego mezclar con la tercera gota que contiene el antisuero. Poner el cubreobjetos encima y evaluar después de 3 y de 10 minutos, bajo un objetivo de 40x de contraste de fases, examinando, al menos, 200 espermatozoides móviles (con colas móviles) y clasificándolos en el caso de llevar partículas unidas.

*Prueba* Sperm *IgA directa*

1. Poner por separado gotas de igual tamaño sobre un portaobjetos: una gota de semen fresco no lavado y una gota de las partículas de látex recubiertas con anti-IgA.
2. Mezclar usando una punta de pipeta amarilla y colocar el cubreobjetos encima. Evaluar des-

pués de 3 y de 10 minutos bajo objetivo de 40x de contraste de fases y examinar, al menos, 200 espermatozoides móviles (con colas móviles); determinar cuántos tienen partículas adheridas.

*Prueba* Sperm*MAR indirecta*

1. La prueba Sperm*MAR* indirecta se emplea para detectar anticuerpos anti-espermatozoides en líquidos libres de espermatozoides (el suero debe ser previamente inactivado con calor: 56ºC, 45 minutos en un tubo de plástico).
2. Preparar el semen de donante mediante swim-up o centrifugación en gradientes de densidad. Ajustar la concentración de espermatozoides móviles finales a 20 x $10^6$/mL.
3. Diluir la muestra que se va a analizar de forma seriada, por ejemplo, a 1/16 para la prueba de IgG y un cuarto para la prueba de IgA. Diluir con el medio utilizado en el *swim-up*, como por ejemplo, medio de Earle (pH 7.4) sin albúmina ni suero.
4. Mezclar 100 $\mu$L de la suspensión espermática con 100 $\mu$L del espécimen a estudiar diluido e incubar durante 60 minutos a 37ºC.
5. Añadir 2 mL de medio, mezclar bien y centrifugar a 400 *g* durante 10 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento espermático con 50 $\mu$L de medio.
7. Proceder como se describió anteriormente en la prueba SpermMAR directa, pasos 1 y 2, pero empleando una gota de la suspensión de espermatozoides preparada en lugar del semen fresco.

## Cálculos y resultados

Contar al menos 200 espermatozoides móviles (con colas en movimiento). El resultado se expresa como el porcentaje de espermatozoides móviles que llevan partículas unidas. Si ≥ 50% de espermatozoides tienen partículas de látex unidas, se debe considerar que existe un factor inmunológico.

## Reactivos

Los reactivos para la prueba SpermMAR IgG e IgA se pueden obtener de FertiPro N. V., Beernem, Bélgica (Grupo Equipos Médico-Biológicos, España; Quermed, España). Los *kits* contienen todos los materiales necesarios. Para un laboratorio de andrología a gran escala, los frasos que contienen 0,7 mL de las soluciones de partículas de látex con IgG o anti-IgA y 0,7 mL de soluciones de antisuero (anti-IgG humana) se pueden conseguir de forma independiente.

## Prueba Immunobead

### Principios básicos

Los anticuerpos unidos a la superficie de los espermatozoides humanos pueden ser detectados por otros anticuerpos que han sido producidos contra moléculas de inmunoglobulinas humanas: IgG, IgA o IgM. Las *immunobeads* son microesferas de plástico con anticuerpos anti-Ig humana unidas. Así, *immunobeads* anti-IgG, IgA o IgM detectan espermatozoides con anticuerpos anti-espermatozoide de los isotipos IgG, IgA e IgM, respectivamente. Para el cribado, se pueden utilizar *immunobeads* diseñados para marcaje de células B (GAM *beads*) puesto que están recubiertos con anticuerpos dirigidos contra los tres isotipos de inmunoglobulinas.

*Prueba indirecta*

Los anticuerpos unidos a espermatozoides de donante, tras su incubación con el fluido a analizar, se pueden detectar como se describió anteriormente para la prueba directa.

### Procedimientos

*Prueba Immunobead directa*

1. Para cada tipo de *Immunobead*, añadir 0,2 mL de la suspensión de microesferas a 10 mL de tampón I en tubos separados de centrífuga de base cónica.
2. Determinar la cantidad de semen a usar según la Tabla I, y depositar el volumen determinado en un tubo y completar hasta 10 mL de tampón I.
3. Centrifugar todos los tubos a 500 *g* durante 6 minutos a temperatura ambiente.
4. Tubos con semen: decantar los sobrenadantes. Resuspender los sedimentos espermáticos en 10 mL de tampón I fresco y centrifugar de nuevo como antes. Decantar los sobrenadantes y resuspender los sedimentos espermáticos en 200 $\mu$L de tampón II.
5. Tubos con microesferas: decantar los sobrenadantes y resuspender las microesferas en 200 $\mu$L de tampón II.
6. Poner gotas de 5 $\mu$L de cada tipo de *Immunobead* sobre portaobjetos limpios. Añadir 5 $\mu$L de la suspensión de espermatozoides lavados a cada gota y mezclar bien usando

una punta de pipeta amarilla. Poner un cubreobjetos de 22x22 mm #1.5 de grosor sobre cada una de las mezclas.

7. Dejar los portaobjetos 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda y luego evaluar bajo un objetivo 20x de contraste de fases.

Tabla I: Volumen de semen necesario para el análisis de anticuerpos anti-espermatozoide

| Concentración espermática ($10^6$/mL) | Movilidad grados a + b (%) | Cantidad de semen para a usar ($\mu$L) |
|---|---|---|
| > 50 | | 200 |
| 20-50 | > 40 | 400 |
| 20-50 | < 40 | 800 |
| < 20 | > 40 | 1000 |
| < 20 | < 40 | 2000 |
| < 10 | | > 2000 |

*Prueba Immunobead indirecta*

Lavar el semen de donante dos veces en Tampón I como se describió anteriormente, pasos 2-4, o prepararlos de entrada mediante *swim-up* o centrifugación en gradientes de densidad y lavarlos a continuación. Ajustar las suspensiones de espermatozoides lavados a una concentración final de espermatozoides móviles de 50 x $10^6$/mL en tampón II.

Diluir 10 $\mu$L del fluido a analizar con 40 $\mu$L de tampón II y mezclar con 50$\mu$L de la suspensión de espermatozoides lavados de donante. Incubar a 37ºC durante 60 minutos.

Lavar los espermatozoides dos veces como describimos anteriormente (pasos 2-4) y realizar la prueba según las indicaciones dadas en el paso 6.

## Cálculos y resultados

Evaluar únicamente los espermatozoides móviles y valorar el porcentaje de espermatozoides que tienen dos o más microesferas unidas (ignorar uniones a la punta de la cola). Contar al menos 200 espematozoides móviles por duplicado para cada preparación. Anotar el porcentaje de espematozoides que llevan microesferas unidas, la clase de Ig (IgG o IgA) y el sitio de unión (cabeza, pieza intermedia, cola).

Tabla II: Soluciones de Tyrode y Dulbecco

| Constituyentes | Solución de Tyrode (g/L) | PBS de Dulbecco (g/L) |
|---|---|---|
| $CaCl_2$ | 0,2 | 0,1 |
| KCl | 0,2 | 0,2 |
| NaCl | 8,0 | 8,0 |
| $NaH_2PO_4$ | 0,05 | - |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,2 | 0,1 |
| $NaHCO_3$ | 1,0 | - |
| $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ | - | 2,2 |
| $KH_2PO_4$ | - | 0,2 |
| Glucosa | 1,0 | - |

## Reactivos

- *Immunobeads*: microesferas anti-IgG, IgA e IgM (Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA; Izasa, España).
- Para el cribado, se pueden emplear microesferas con anti-IgGAM.
- Reconstituir las microesferas según las instrucciones del fabricante. Las microesferas pueden ser almacenadas durante varios meses a 4ºC en el tampón original el cual contiene conservantes (azida).
- Tampón de *stock*: puede usarse solución de Tyrode o solución tamponada de fosfato (PBS) de Dulbecco (Tabla II).
- Tampón I (0,3% BSA): tampón para el lavado de *Immunobeads* (10 mL) y lavado de espermatozoides (2 x 10 mL para cada muestra de semen). Añadir 0.6 g de albúmina sérica bovina (BSA; fracción V Cohn) a 200 mL de tampón *stock*. Son suficientes 200 mL de tampón I para lavar y analizar la presencia de IgA e IgG en 6 muestras, un control positivo y uno negativo.
- Tampón II (5% BSA): tampón para resuspender las *Immunobeads* y los sedimentos de espermatozoides, 200 $\mu$L para cada espécimen. Adicionar 250 mg de BSA a 5 mL del stock de tampón. Se necesitan un total de 2 mL de tampón II para analizar la presencia de IgA e IgG en 6 muestras y 2 controles.
- Filtrar todas las soluciones con filtros de 0,22 ó 0,45$\mu$m y calentar a 25-35ºC antes de su uso.

## Control de calidad para las pruebas *SpermMAR* e *Immunobead*

Todos los métodos dependen de la movilidad espermática. Como ya comentamos anteriormente, se deben evaluar al menos 200 espermatozoides móviles para cada prueba. Debe incluirse un control positivo y uno negativo en cada ensayo.

Un control positivo significa suero de un donante con títulos altos de anticuerpos anti-espermatozoide detectados mediante la prueba SpermMAR o Immunobead indirecta. Este suero se prepara y evalúa en cada ensayo.

### *Limitaciones*

Los resultados están basados en el análisis de la movilidad espermática. Consecuentemente, en muestras con pobre movilidad, pueden obtenerse falsos positivos.

Los resultados de las pruebas SpermMAR e Immunobead no concuerdan completamente. Se considera que el resultado tiene significación clínica cuando se observan más del 50% de espermatozoides móviles con microesferas adheridas.

## Equipo y materiales

Microscopio con objetivo de 40x de contraste de fases.

Portaobjetos (tamaño estándar) y cubreobjetos (22x22 mm #1.5 de grosor).

# 7. Control de calidad y garantía de calidad

Durante la última década se ha hecho más evidente la importancia de una política diferenciada para la garantía de la calidad (GC). Este capítulo tratará algunos aspectos de la GC y procedimientos importantes relacionados con la técnica subyacente de control de calidad (CC).

El CC es solo una parte de la GC. La descripción detallada de la GC escapa a los objetivos de este manual, por lo que nos centraremos sólo en algunos aspectos básicos del CC en relación con el manual de la OMS.

La cuarta edición del Manual del Laboratorio para el Examen del Semen Humano y la Interacción entre el Semen y el Moco Cervical (1999) tiene un capítulo nuevo que revisa principalmente los aspectos técnicos del CC.

## CC

Pueden distinguirse dos partes principales del CC: interno (CCI) y externo (CCE). Todos los laboratorios deben tener un CCI para ser capaces de emitir resultados fiables. El CCE es necesario para permitir la comparación de resultados entre diferentes laboratorios. Sin embargo, el CCE sólo es útil y válido si el laboratorio dispone también de un programa efectivo de CCI. Si el control interno básico no funciona adecuadamente, los resultados del CCE serán erráticos. Por lo tanto, la participación en un programa de CCE no puede sustituir al componente de CCI en un laboratorio concreto.

## CCI

El CCI tiene niveles muy diferentes:

- Control a nivel del intra-análisis.
- Programa básico de CCI
- Medias mensuales de los resultados.
- Control del equipamiento (calibración de pipetas, mantenimiento regular de los instrumentos y otros materiales como las cámaras de recuento).

### Control a nivel intra-análisis

Un aspecto básico del CCI es hacer mediciones por duplicado y verificar que los duplicados no difieren demasiado. Una diferencia importante incrementa el riesgo de que se haya producido un error aleatorio en algún paso del proceso. Con el método recomendado para la comparación, el factor más importante es el número de células valoradas. En el Apéndice II se muestra el intervalo de confianza al 95% (IC) para proporciones en relación con el número de espermatozoides valorados. Es obvio que el intervalo –y la incertidumbre de los resultados– es grande cuando se valoran <200-400 espermatozoides. En el apéndice I se muestra el IC 95% relativo (%) para la concentración espermática. La incertidumbre de las mediciones es grande cuando se han contado <200-400 espermatozoides.

Otro aspecto igualmente importante del CCI a nivel analítico es el conocimiento de las fuentes de error, las debilidades de los métodos y el equipamiento usado, y también la comprensión del contexto clínico y biológico del análisis.

### Programa básico de CCI

Un programa básico de funcionamiento de CCI debe incluir mediciones duplicadas de las principales variables seminales realizadas por diferentes técnicos. Esto podría organizarse de diferentes maneras en función de la estructura del laboratorio

© European Society Human Reproduction and Embryology 2002

particular. Es importante cumplir con los siguientes puntos:

- Deben incluirse la concentración espermática, movilidad, morfología y vitalidad.
- Deben incluirse todos los técnicos que participan en la ejecución de los análisis.
- Deben realizarse todas las mediciones del CCI con los mismos –o equivalentes– métodos y equipos usados para el análisis de rutina. Para el análisis de movilidad esto requerirá que (i) las imágenes microscópicas de las muestras de CCI se graben, y que (ii) las mediciones de las muestras de rutina se realicen con el mismo equipo que el usado para ver las grabaciones del CCI (por ejemplo en un monitor de vídeo, pero téngase en cuenta que ello no implica que deban grabarse también las muestras de rutina).

### Media mensual de los resultados

Este método se utiliza ampliamente en otras disciplinas del laboratorio clínico pero su uso en el laboratorio clínico de andrología debe ser estudiado más profundamente debido a las previsibles variaciones estacionales en la producción de semen (Vierula et al., 1996). Con un CCI adecuado, las medias mensuales deberían mostrar exclusivamente los cambios estacionales u otros cambios verdaderos en la población estudiada.

### Control de equipo e instrumentos

La documentación de los métodos debe incluir las especificaciones de calibración y mantenimiento. Además, deberá existir un registro para documentar los resultados de calibración de cada instrumento y todas las reparaciones y modificaciones realizadas.

## CCE

El alcance del CCE está limitado principalmente por razones prácticas, como el coste en tiempo y dinero que supone la producción de material de alta calidad y su transporte a los distintos laboratorios. Debe estar basado en un buen programa de CCI porque el CCE, con unas pocas mediciones, puede centrarse en la exactitud (p.ej. cuán correcto es el resultado). Un laboratorio con mucha precisión (poca variación) controlado con un buen CCI podrá proporcionar resultados estables al programa de CCE, mientras que un laboratorio con baja precisión tendrá más probabilidades de producir resultados variables al programa de CCE.

El material usado en el programa de CCE, para ser válido, deberá ser analizado con métodos y equipo equivalentes a los usados en análisis rutinarios. Ello demanda un nivel de estandarización internacional mucho más exigente que el disponible actualmente para los métodos básicos y para los programas de CC. Por esta razón, los objetivos de la ESHRE (cursos sobre análisis básico de semen y desarrollo e iniciación de programas de CCE) y la NAFA (con los cursos compartidos sobre análisis básico de semen y la red nórdica de CCE) y, por supuesto, este manual son de gran importancia para el desarrollo cualitativo del análisis de semen.

Es necesario un pleno funcionamiento del CCE, incluyendo medidas de acción correctoras para los laboratorios que envían resultados pobres para desarrollar un verdadero programa externo de garantía de la calidad.

## GC

El concepto moderno de GC abarca todos los esfuerzos para asegurar una alta calidad del servicio o del producto que se proporciona. Esto incluye aspectos muy diferentes:

- La organización en su conjunto con responsabilidades claramente identificables para cada una de las personas que la integra.
- Requisitos relacionados con la capacidad de todo el personal.
- Educación continuada de todo el personal.
- Documentación de los procedimientos de todos los servicios que se ofrecen. (incluyendo métodos técnicos de análisis y equipamiento, protocolos para contactar con pacientes y con clínicos solicitantes).
- Protocolos documentados de manejo de errores en todos los procedimientos: acciones correctoras ante un error y acciones preventivas para evitar la repetición del error.
- Control de calidad interno y externo para disminuir los errores en los resultados debidos a variabilidad en el método y a baja exactitud, y para permitir comparaciones con otros laboratorios.

**Bibliografía**

Vieruela, M., Niemi, M., Keiski, A., Saarenen, M., Saarikoski, S. y Snominen, J. (1996) High and unchanged sperm counts of Finnish men. *Int. J. Androl.*, **19**, 11-17.

# Apéndice I

La Tabla I de este Apéndice sirve para ayudar a comprobar si las dos valoraciones de la concentración espermática son lo suficientemente próximas para poder ser aceptadas.

Buscar el número total de espermatozoides contados en la columna de la izquierda (suma). Si la diferencia entre las dos valoraciones es menor o igual al valor reflejado en la columna de la derecha (valor), las mediciones pueden ser aceptadas (son correctas).

Si la diferencia entre los duplicados está por encima del valor, las mediciones deberán ser descartadas, y se prepararán y evaluarán en dos nuevas cámaras. Cuando se han contado pocos espermatozoides, las dos columnas de la derecha de la tabla representan los intervalos de confianza del resultado final ($x10^6$/mL), los cuales empiezan a ser más amplios que el intervalo ± 10% (Tabla V, Sección 2).

Esta tabla se calcula en base a la fórmula dada en el manual de la OMS, página 37, y la Figura 2.4 de la página 117 del Manual de Laboratorio de la OMS para la evaluación del semen humano y la interacción semen-moco cervical (1999).

**Tabla I** : Si la diferencia entre 2 mediciones es menor o igual que el valor de la tabla, las mediciones son aceptadas.

| SUMA | VALOR | SUMA | VALOR | SUMA | VALOR | SUMA | VALOR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 67-75 | 16 | 267-283 | 32 | 600-624 | 48 |
| 1 | 1 | 76-84 | 17 | 284-300 | 33 | 625-650 | 49 |
| 2 | 2 | 85-93 | 18 | 301-318 | 34 | 651-677 | 50 |
| 3-4 | 3 | 94-104 | 19 | 319-337 | 35 | 678-703 | 51 |
| 5-6 | 4 | 105-114 | 20 | 338-356 | 36 | 704-731 | 52 |
| 7-9 | 5 | 115-125 | 21 | 357-375 | 37 | 732-759 | 53 |
| 10-12 | 6 | 126-137 | 22 | 376-395 | 38 | 760-787 | 54 |
| 13-16 | 7 | 138-149 | 23 | 396-416 | 39 | 788-816 | 55 |
| 17-21 | 8 | 150-162 | 24 | 417-437 | 40 | 817-845 | 56 |
| 22-26 | 9 | 163-175 | 25 | 438-459 | 41 | 846-875 | 57 |
| 27-31 | 10 | 176-189 | 26 | 460-481 | 42 | 876-906 | 58 |
| 32-37 | 11 | 190-205 | 27 | 482-503 | 43 | 907-937 | 59 |
| 38-43 | 12 | 206-218 | 28 | 504-527 | 44 | 938-968 | 60 |
| 44-51 | 13 | 219-234 | 29 | 528-550 | 45 | 969-1000 | 61 |
| 52-58 | 14 | 235-250 | 30 | 551-575 | 46 | | |
| 59-66 | 15 | 251-266 | 31 | 576-599 | 47 | | |

**Tabla II**: Intervalo de confianza del 95% para resultados obtenidos al evaluar diferentes números de espermatozoides.

| Contados | ± (%) |
|---|---|
| 1 | 196 |
| 5 | 88 |
| 10 | 62 |
| 20 | 44 |
| 30 | 36 |
| 40 | 31 |
| 50 | 28 |
| 60 | 25 |
| 70 | 23 |
| 80 | 22 |
| 90 | 21 |
| 100 | 20 |
| 150 | 16 |
| 200 | 14 |
| 250 | 12 |
| 300 | 11 |
| 400 | 10 |
| 500 | 9 |
| 600 | 8 |
| 700 | 7 |
| 1000 | 6 |
| 1300 | 5 |
| 1900 | 4 |
| 3200 | 3 |

### Confianza en el resultado en base al número de espermatozoides contados

¿ Hasta qué punto un resultado de la concentración espermática depende en gran parte, del número de espermatozoides realmente contados?. La Tabla II proporciona los intervalos de confianza de aquellos resultados que han sido obtenidos al evaluar muestras con diferentes números de espermatozoides.

Si se han contado 10 espermatozoides dando un resultado de $1x10^6$/mL en una cámara de Makler, la confianza del resultado se encuentra entre 0,4 y $1,6x10^6$/mL ($1x10^6$ ±62% según la tabla). Así, el resultado puede variar hasta cuatro veces. Si se han contado 100 espermatozoides en un hemocitómetro de Neubauer mejorado, la confianza del resultado está entre 0,8 y $1,2x10^6$/mL ($1x10^6$ ±20%). Para obtener confianza ±10% ($0,9\text{-}1,1x10^6$) de confianza, se deben evaluar cuatro hemocitómetros de Neubauer mejorado o 40 cámaras de Makler.

# Apéndice II

Este apéndice es una ayuda para conocer si se aceptan las valoraciones de los duplicados de los porcentajes, p.ej. porcentaje de espermatozoides móviles, porcentaje de espermatozoides normales o porcentaje de espermatozoides vivos (opcional).

Ya que se recomienda que deberían contarse 200 espermatozoides por duplicado (2x200), los valores indicados son solamente válidos para este tamaño de muestra. Esto significa que la Tabla 1 no es válida para recuentos por duplicado de 100 espermatozoides (2x100).

Calcular la media (redondeando a un número entero) de los dos porcentajes y la diferencia entre ellos. Mirar la fila correspondiente a la media de los porcentajes (columna de la izquierda). La diferencia entre las dos debe ser menor o igual a la diferencia límite dada en la columna de la derecha. Si la diferencia es superior al límite, la medida debe ser desestimada y se deben realizar dos nuevas valoraciones.

Esta tabla se ha calculado a partir de una fórmula (Motulsky, 1996) basada en la distribución binomial necesaria para determinar intervalos de confianza asimétricos para proporciones (el cual tiene un mínimo y un máximo absoluto comprendido entre 0 y 100%). La fórmula dada en el manual de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical (OMS, 1999), pág 40, no es adecuada, especialmente para proporciones próximas a los extremos.

La Tabla II muestra el intervalo de confianza de los resultados con respecto al número de espermatozoides que se han valorado para obtener el resultado.

**Confianza de los resultados según el número de espermatozoides valorado**

Cuando se valora una proporción (porcentaje de espermatozoides móviles o porcentaje de espermatozoides normales) el número total de espermatozoides examinados influye en la confianza de la proporción obtenida. Cuanto mayor número de espermatozoides se observen mayor será la fiabilidad del resultado obtenido. Esto puede describirse como el intervalo de confianza IC 95% de la proporción obtenida. El IC 95% significa que hay un 95% de probabilidad de que el valor real de la proporción esté dentro del intervalo. Este intervalo no puede estar por debajo de 0% o por encima del 100%.

La Tabla II nos da una idea de la confianza de las diferentes proporciones en relación al número total de espermatozoides observados.

Las recomendación es que se cuenten al menos 400 espermatozoides (2x200 recuentos duplicados). En la Tabla, también se muestran los datos en los que se valoren 100 y 200 espermatozoides para comparaciones en aquellos casos en los que se encuentren <400 espermatozoides disponibles.

***Ejemplo***

Obtenemos un resultado del 6% de espermatozoides normales después de valorar los recomendados (2x200). La proporción real está comprendida en el rango 4-9%. Si hubiéramos examinado solo 100 espermatozoides el rango se encontraría entre 2-13%. Por tanto, la fiabilidad de los resultados aumenta si contamos 400 en lugar de 100.

De igual forma, el resultado del 50% de espermatozoides móviles progresivos tiene un intervalo de confianza de 45-55% si se han contado 400 espermatozoides y de 40-60% si sólo se cuentan 100.

**Referencia**

Motulsky, H (1996) *Intuitive biostatistic.* Oxford University Press. Oxford.UK

**Tabla I.** Se acepta la valoración si la diferencia entre las dos observaciones es menor o igual a la diferencia límite.

| Media % | Diferencia límite |
|---|---|
| 0 | 1 |
| 1 | 2 |
| 02-03 | 3 |
| 04-06 | 4 |
| 07-09 | 5 |
| 10-13 | 6 |
| 14-19 | 7 |
| 20-27 | 8 |
| 28-44 | 9 |
| 45-55 | 10 |
| 56-72 | 9 |
| 73-80 | 8 |
| 82-86 | 7 |
| 87-90 | 6 |
| 91-93 | 5 |
| 94-96 | 4 |
| 97-98 | 3 |
| 99 | 2 |
| 100 | 1 |

**Tabla II.** Intervalo de confianza del 95% con relación al número de espermatozoides observados

| Porcentaje medio encontrado | Número total de espermatozoides valorado | | |
|---|---|---|---|
| | 400 (2x200) | 100 | 200 |
| 0 | 0-1 | 0-4 | 0-2 |
| 1 | 0-3 | 0-5 | 0-4 |
| 2 | 1-4 | 0-7 | 1-5 |
| 3 | 2-5 | 1-9 | 1-6 |
| 4 | 2-6 | 1-10 | 2-8 |
| 5 | 3-8 | 2-11 | 2-9 |
| 6 | 4-9 | 2-13 | 3-10 |
| 7 | 5-10 | 3-14 | 4-11 |
| 8 | 6-11 | 4-15 | 5-13 |
| 9 | 6-12 | 4-16 | 5-14 |
| 10 | 7-13 | 5-18 | 6-15 |
| 11 | 8-14 | 6-19 | 7-16 |
| 12 | 9-16 | 6-20 | 8-17 |
| 13 | 10-17 | 7-21 | 9-18 |
| 14 | 11-18 | 8-22 | 10-20 |
| 15 | 12-19 | 9-24 | 10-21 |
| 20 | 16-24 | 13-29 | 15-26 |
| 25 | 21-30 | 17-35 | 19-32 |
| 30 | 26-35 | 21-40 | 24-37 |
| 35 | 30-40 | 26-45 | 28-42 |
| 40 | 35-45 | 30-50 | 33-47 |
| 45 | 40-50 | 35-55 | 38-52 |
| 50 | 45-55 | 40-60 | 43-67 |
| 55 | 50-60 | 45-65 | 48-62 |
| 60 | 55-65 | 50-70 | 53-67 |
| 65 | 60-70 | 55-74 | 58-72 |
| 70 | 65-74 | 60-79 | 63-76 |
| 75 | 70-79 | 65-83 | 68-81 |
| 80 | 76-84 | 71-87 | 74-85 |
| 85 | 81-88 | 76-91 | 79-90 |
| 90 | 87-93 | 82-95 | 85-94 |
| 91 | 88-94 | 84-96 | 86-95 |
| 92 | 89-94 | 85-96 | 87-95 |
| 93 | 90-95 | 86-97 | 89-96 |
| 94 | 91-96 | 87-98 | 90-97 |
| 95 | 92-97 | 89-98 | 91-98 |
| 96 | 94-98 | 90-99 | 92-98 |
| 97 | 95-98 | 91-99 | 94-99 |
| 98 | 96-99 | 93-100 | 95-99 |
| 99 | 97-100 | 95-100 | 96-100 |
| 100 | 99-100 | 96-100 | 98-100 |