



Fundación
J. L. Castaño

Para el desarrollo del Laboratorio clínico

REPRODUCCIÓN HUMANA Y LABORATORIO CLÍNICO

Ed Cont Lab Clín; 32: 22 - 31

SEQC

2016-2017

ESPERMIOGRAMA BÁSICO.

Isabel Sánchez Prieto.

Laboratorio de Bioquímica. Hospital Severo Ochoa. Leganés, Madrid.

INTRODUCCIÓN

El espermiograma es la principal herramienta diagnóstica en el estudio del hombre infértil, proporciona información del estado de los túbulos seminíferos, del epidídimo y de las glándulas accesorias. Además permite el seguimiento de pacientes con otras patologías como infecciones, varicocele; así como evaluar la respuesta a tratamientos hormonales y la eficacia de la vasectomía.

Este capítulo se refiere solo a los procesos manuales, existen métodos automatizados que se trataran en otro capítulo.

La normalización del análisis de semen es difícil debido a la gran subjetividad de las técnicas manuales sin modelos con los que comparar, insuficiente formación técnica y la inercia de los métodos preestablecidos.

Es sumamente importante promover la normalización metodológica que dé lugar a una información más precisa, que conduzca a la mejora de la calidad en los laboratorios de andrología. El consenso de las diferentes sociedades para la estandarización del espermiograma se basa en el último manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2010.

Actualmente existen diferentes manuales (European Society of Human Reproduction and Embryology ESHRE y OMS) de trabajo, programas de calidad externos, cursos de formación y guías para evaluar la calidad; aun así los datos no son comparables entre distintos laboratorios, lo que impide establecer criterios diagnósticos en función de esos resultados. Los laboratorios necesitamos normalizar los protocolos y establecer prácticas universales para mejorar la calidad de nuestros resultados.

LA EYACULACIÓN

La eyaculación es un proceso complejo en el que secuencialmente se mezclan los espermatozoides procedentes del epidídimo con la secreción de las glándulas accesorias, próstata y

vesículas seminales fundamentalmente. La primera fracción eyaculada es la procedente del epidídimo y de la próstata, siendo principalmente su contenido espermatozoides vehiculizados en la secreción prostática. Esta fracción es expelida directamente al orificio cervical, mientras que el contenido de las vesículas seminales permanece en la vagina. El espécimen semen es un artefacto de laboratorio que contiene una mezcla de fluidos no fisiológica. En él, los espermatozoides se encuentran atrapados en el coágulo de proteínas procedentes de las vesículas seminales, que será licuado posteriormente por las proteasas procedentes de la secreción prostática. La primera fracción del eyaculado es rica en espermatozoides con buena movilidad, mientras que en la última los espermatozoides son escasos tienen menos movilidad e inician su proceso de degradación.

Existen muchos factores variables y en gran parte incontrolables que explican la gran variabilidad intraindividual en el análisis de semen, factores como el periodo de abstinencia eyaculatoria, el grado de excitación sexual y el estrés para la recogida de la muestra; influyen en el resultado. La elevada variabilidad en los parámetros que componen el espermiograma hace necesario que se analicen al menos 2 muestras recogidas con un intervalo de tiempo de al menos 4 semanas, especialmente si los resultados son anormales.

PREANALÍTICA DEL ESPERMIOGRAMA BÁSICO

Normas de recogida de muestra

La estandarización del análisis de semen debe realizarse desde el proceso preanalítico. Las normas para la recogida de semen tienen un alto grado de consenso en la comunidad científica. Las instrucciones para el paciente deben explicarse verbalmente y acompañarse de un impreso donde se especifique toda la información necesaria para la correcta obtención de la muestra, el lugar de recogida, la fecha y el lugar donde debe entregarse. El facultativo responsable del Laboratorio de Andrología evaluará la posibilidad de rechazar las muestras que no cumplan dichos requisitos.

La muestra debe recogerse por masturbación en un lugar próximo al laboratorio tras un periodo de abstinencia eyaculatoria no menor de 2 días ni mayor a 7 siendo ideal entre 3-4 días. En un frasco estéril de boca ancha, previamente pesado, se mantendrá a temperatura próxima a la corporal hasta el momento de la entrega, y se guardará inmediatamente después de su recepción en una estufa a 37 °C hasta su análisis.

Recepción de la muestra y normas de seguridad del paciente

El personal de laboratorio que recibe la muestra debe ser debidamente instruido de las normas de recepción. Se recogerán los datos demográficos del paciente y un cuestionario donde debe constar el periodo de abstinencia eyaculatoria, si la muestra es completa, la hora de la eyaculación y la de entrega, el motivo de la solicitud, si padece alguna enfermedad, qué tratamientos tiene, si consume drogas, tabaco, alcohol.

La muestra debe entregarse identificada con los datos demográficos del paciente. En el mo-

mento de la recepción se etiquetará con el número de identificación del laboratorio el frasco en la tapa y en el contenedor, el cuestionario y el volante de petición. Esto debe hacerse en presencia del paciente. El paciente o la persona que entrega la muestra se identificará y firmará el cuestionario, también debe identificarse y firmar el técnico de laboratorio que recepciona la muestra.

PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

El eyaculado debe mantenerse a 37°C desde los primeros 5 min. de la eyaculación, entre 30-60 min. se comprobará que se ha completado la licuefacción. Siempre antes de obtener una alícuota para su análisis el semen debe ser debidamente homogenizado.

Los parámetros que se valoran en el espermiograma básico son: la recogida de la muestra; el análisis macroscópico y microscópico inicial, la determinación de la movilidad, vitalidad, concentración y morfología de los espermatozoides; anticuerpos antiespermatozoides y cuantificación de leucocitos. En los primeros 30 min. de la recepción de la muestra debemos realizar la medida del volumen, el pH, la valoración microscópica inicial, la movilidad y la tinción de vitalidad.

1. Aspectos Macroscópicos:

El eyaculado una vez completada la licuefacción tiene un aspecto homogéneo de color blanco-grisáceo opalescente. Ocasionalmente puede estar teñido de sangre y ser hemático o de color chocolate (hemospermia), o anaranjado en pacientes ictericos o consumidores de ciertas vitaminas o drogas. Si el periodo de abstinencia sexual es prolongado puede ser amarillento debido a la presencia de flavoproteínas procedentes de las vesículas seminales.

- **Viscosidad**

La viscosidad del semen se valora aspirando una alícuota con pipeta Pasteur y dejándolo caer gota a gota; si la viscosidad está aumentada caerá formando un filamento mayor a 2 cm. La viscosidad aumentada no tiene significado clínico, pero sí puede interferir en el manejo de la muestra y en la valoración de la movilidad, de la concentración y de los anticuerpos antiespermatozoide. Debe reseñarse en la hoja de trabajo. La presencia de gránulos gelatinosos no tiene significado clínico. Si la viscosidad está muy aumentada se puede diluir con PBS, previamente atemperado a 37°C, mezclando con una pipeta de calibre ancho hasta su homogenización, generalmente con una dilución 1:1 es suficiente, debe anotarse en la hoja de trabajo.

- **Volumen eyaculado**

El 70% del volumen eyaculado procede de las vesículas seminales, el 20% de la próstata, mientras que el epidídimo y las glándulas bulbouretrales solo representan una fracción mínima. Debe medirse por pesada, en un bote previamente tarado, la medida del volumen por aspiración o en un tubo graduado es inadecuada, ya que puede existir una variación

entre 0.3 y 0.9 mL. Un volumen menor a 1 mL puede tener significado diagnóstico; debido a una obstrucción, agenesia, mal funcionamiento de vesículas seminales o a una disfunción eyaculatoria. Debe descartarse la posibilidad de una recogida de muestra inadecuada por pérdida o insuficiente estímulo sexual.

- **pH**

Refleja el balance entre las vesículas seminales (alcalino) y la próstata (ácido). Debe medirse inmediatamente después de la licuefacción con indicadores de pH de papel con un rango de 6-10. Para su medición se coge una alícuota de semen, previamente homogenizado, se deposita una gota en el indicador de pH y se espera unos 30 s. para que se estabilice. Valores de pH <7.2 junto con un volumen de muestra disminuido (<1 mL) pueden orientarnos hacia una obstrucción/agenesia de las vesículas seminales o de los conductos deferentes. El pH se incrementa debido a la pérdida de CO₂ con el paso del tiempo desde la eyaculación.

2. Valoración Microscópica inicial:

Se realiza en un microscopio en contraste de fase, haciendo un barrido de al menos 10 campos en la zona central del cubreobjetos, con el objetivo de 10X para valorar si la licuefacción es completa. Cuando es incompleta, la preparación no es homogénea y se observan zonas con filamentos y espermatozoides inmóviles, frente a otras con mayor movilidad. Si este fuera el caso debemos esperar a que se complete la licuefacción manteniendo la muestra a 37°C. Nunca debemos esperar más de 1 hora.

En la valoración inicial analizamos unos 10 campos con el objetivo de 40X, un volumen de muestra de aproximadamente 40 nL. Observamos si hay agregaciones o aglutinaciones, la presencia de células redondas y valoramos cual es la dilución adecuada para determinar la concentración de espermatozoides o la ausencia de los mismos.

Para conseguir normalizar la valoración inicial debemos colocar una alícuota de semen previamente mezclado con movimientos suaves para evitar la formación de burbujas, no se debe utilizar vórtex porque puede dañar a los espermatozoides. El volumen de semen debe ser adecuado al tamaño del cubreobjetos: 6 µL 18x18 mm, 10 µL 22x22 mm, 12 µL 24x24 mm; de esta forma la profundidad entre porta y cubre es de 20 µm que es la necesaria para permitir el movimiento rotatorio de los espermatozoides. Colocar el cubre con cuidado de no formar burbujas, sin presionar para mantener la profundidad de cámara.

- **Agregaciones /aglutinaciones:**

La presencia de espermatozoides agregados a detritus celulares y espermatozoides muertos puede ser aislada, y es más frecuente cuando la concentración de espermatozoides es muy elevada. No tiene significado clínico.

La aglutinación de espermatozoides móviles entre sí formado racimos, unidos cabeza /cabeza, cola/cola o cabeza/cola; sugiere la presencia de anticuerpos antiespermatozoide y una posible causa de infertilidad por factor inmunológico. Si la presencia de aglutinaciones es

muy elevada puede llegar a impedir el movimiento de los espermatozoides y dificultar la valoración de la movilidad y la concentración.

- **Células redondas**

La presencia de células epiteliales, prostáticas o detritus celulares no tiene significado clínico, también pueden existir algunos hematíes. Si se observan células redondas debemos diferenciar las células germinales de los leucocitos mediante la tinción de peroxidasa.

3. Determinación de la movilidad de los espermatozoides

Debe valorarse inmediatamente después de que se haya completado la licuefacción, nunca más tarde de una hora desde la eyaculación, ya que los cambios de pH y temperatura pueden afectar a la movilidad.

Colocar el volumen de semen, previamente homogenizado, adecuado al tamaño del cubreobjetos (como se indica en el párrafo anterior) que permita una profundidad de 20 µm, en un porta atemperado a 37°C y cubrir con cubreobjetos. Esperar a que el desplazamiento se haya estabilizado no más de 1 min. Si no se estabiliza repetir la preparación.

- **Clasificación del movimiento**

Movilidad progresiva, los espermatozoides se mueven activamente de forma lineal o formando círculos amplios, independientemente de su velocidad.

Movilidad no progresiva, los espermatozoides se mueven en el mismo sitio, no se desplazan.

Inmóviles, los espermatozoides no se mueven, pueden estar vivos o muertos.

La clasificación del movimiento de los espermatozoides se realiza con el objetivo de 20X ó 40X observando diferentes campos hasta alcanzar 200 células y repitiendo el proceso en otra preparación. Si la diferencia en el porcentaje más elevado de las dos replicas es significativa (tabla 1), se repetirá el proceso de nuevo en otras dos alícuotas. Para facilitar el proceso de clasificación se puede introducir una retícula en el ocular. Para valorar el movimiento es de gran ayuda un contador de células. Primero se cuentan todos los espermatozoides de un recuadro con movilidad progresiva, de forma instantánea, como si fuera una fotografía, para evitar sobrevalorar el movimiento. Después se cuentan los no progresivos y los inmóviles.

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

Tabla 1: Diferencia aceptable entre dos porcentajes contando 200 células (400 total) IC 95 %.

les. Solo se clasifican los espermatozoides completos, las colas solas o con cabezas de alfiler no se valoran.

Se sabe que la movilidad rápida ($>25 \mu\text{m/s}$) tiene gran valor pronóstico en fertilidad. Actualmente existen equipos automatizados que permiten categorizar el movimiento, valorar la trayectoria y la velocidad de los espermatozoides con mayor precisión que el ojo humano.

- **Tinción de vitalidad**

Permite diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos en aquellas preparaciones donde el porcentaje de espermatozoides inmóviles es muy elevado. Se basa en que los espermatozoides muertos tienen alterada su membrana y permiten el paso del colorante. Puede ser útil como control de la valoración de la movilidad ya que el porcentaje de espermatozoides muertos tiene que ser menor que el de móviles, los muertos no se mueven.

Debe realizarse inmediatamente después de la licuefacción. Mezclar una gota de semen previamente homogenizado con una gota de reactivo (anexo1), hacer una extensión en porta y dejar secar al aire. Colocar una gota de aceite de inmersión y un cubreobjetos valorar con el objetivo de 40X en campo claro. Los espermatozoides muertos se tiñen de rosa, hacer un recuento diferencial entre vivos y muertos de al menos 100 espermatozoides. Un elevado nº de espermatozoides muertos necrozoospermia, puede ser debido a una mala recogida de la muestra (sometida a T^a elevadas) o a patología epididimaria, un elevado nº de espermatozoides vivos inmóviles tiene relación con alteraciones del flagelo.

4. Determinación de la concentración de espermatozoides.

La concentración de espermatozoides en el eyaculado está relacionada con la función testicular y es un factor predictor de la concepción y de la tasa de gestación. El número de espermatozoides en el eyaculado se calcula multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen eyaculado que a su vez depende de la secreción glandular y del periodo de abstinencia.

La dificultad de la determinación de la concentración es obtener una alícuota que sea representativa del total, y está en relación con la concentración real de espermatozoides y con volumen de muestra analizado. La precisión del conteo depende del número de células contadas, debemos admitir un error $<5 \%$. En la preparación inicial valoramos la dilución adecuada para contar con precisión el número de espermatozoides. Antes de coger la alícuota se debe mezclar cuidadosamente el semen y cogerla con una pipeta de desplazamiento positivo. El semen es más viscoso que el agua, las pipetas de desplazamiento aspiran un volumen de muestra exacto, las normales desplazan un volumen de aire y se calibran con agua, con una densidad muy diferente al semen. El diluyente debe contener bicarbonato y formol para inmovilizar a los espermatozoides. Para garantizar la profundidad de la cámara el cubreobjetos debe montarse correctamente, humidificar los bordes del hemocitómetro y colocar el cubre presionando hasta que se formen líneas iridiscentes. El volumen con el que rellenamos la cámara debe ser el exacto para cubrir la superficie, si el volumen es mayor

rebosará por los lados y si es menor los bordes de la cámara quedarán incompletos. En este caso debe montarse de nuevo, no se debe retirar el exceso de volumen porque se puede alterar la concentración.

Se deben realizar dos diluciones y montar cada una en una de las cámaras del hemocitómetro, se dejará en una cámara húmeda (placa de petri con gasa húmeda) para que los espermatozoides se depositen en el mismo plano. Se deben contar al menos 200 células en cada cámara y siempre debe contarse cámara completa y el mismo nº de cámaras en las dos diluciones, la diferencia entre los dos contajes debe ser menor al error admitido (tabla 2). Si la diferencia es mayor se debe repetir el proceso con dos diluciones nuevas.

La cámara de contaje debe tener un volumen de 100 nL y debemos contar al menos 400 células para cometer un error < 5 %. La recomendada por la OMS y la ESHRE es el hemocitómetro *Neubauer Improved*. Fig 1

Suma de contajes	Diferencia aceptable	Suma de contajes	Diferencia aceptable
259-274	32	367-385	38
275-292	33	386-406	39
293-309	34	407-426	40
310-328	35	427-448	41
329-346	36	449-470	42
347-366	37	471-492	43

Tabla 2: Diferencia aceptable entre dos contajes IC 95 %.

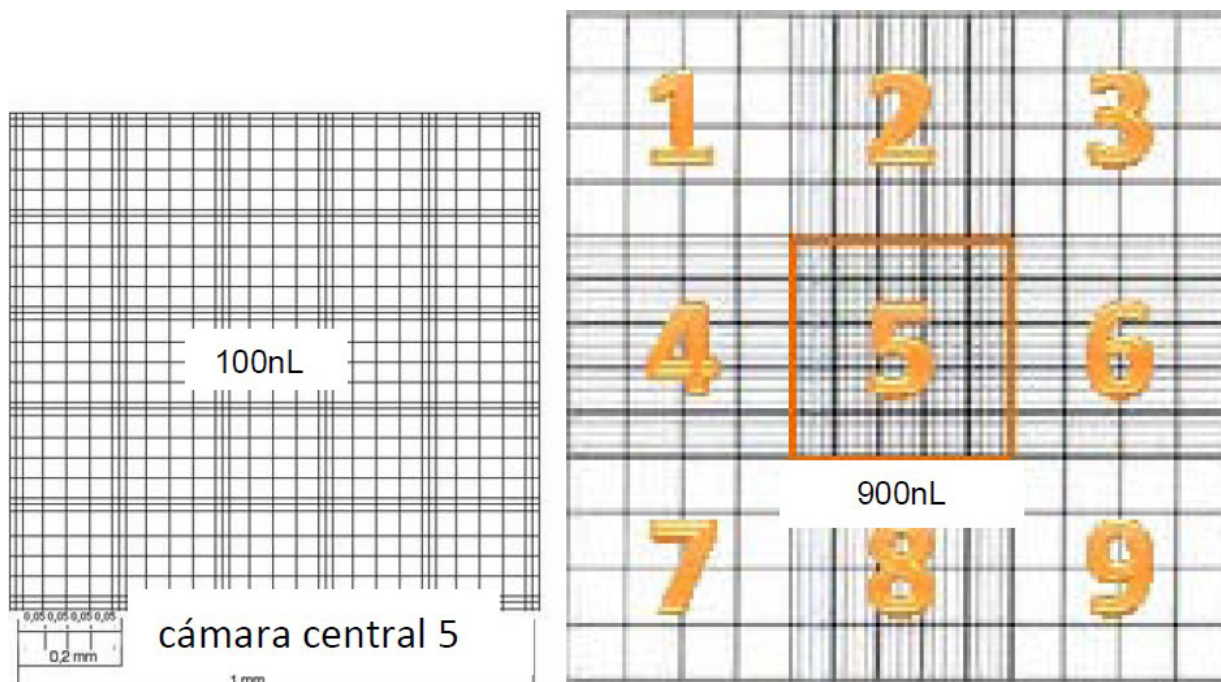


Figura 1: Cámara de Neubauer improved.

• Resultados

Los cálculos de la concentración se harán sumando el nº de espermatozoides contados en cada dilución, dividiendo por el volumen de las cámaras contadas y multiplicando por la dilución (N° de espermatozoides contados / volumen de las cámaras contadas(100nL)] x dilución = Millones/mL). EL valor obtenido son los millones de espermatozoides que hay en 1 mL, para obtener la concentración de espermatozoides eyaculados debemos multiplicar por el volumen eyaculado.

Si la concentración de espermatozoides en la preparación inicial es menor a 2 espermatozoides/C 40X la dilución de la muestra 1:1 no nos permite contar los 400 espermatozoides. En este caso, se puede informar la presencia de espermatozoides en fresco el tipo de movilidad que presentan y que el número de espermatozoides es insuficiente para hacer un recuento preciso de la concentración.

5. Determinación de la morfología.

La morfología del espermatozoide es un artefacto del laboratorio, ya que depende de la calidad de la preparación, de la tinción y del microscopio pero sobretodo depende de la pericia de la persona que la valora. Por eso debemos normalizar la técnica de montaje, mejorar la calidad de las tinciones, e intentar disminuir el error de apreciación mejorando la formación.

EL concepto de espermatozoide normal se ha obtenido de la selección de espermatozoides que realiza el moco cervical periovulatorio tras el coito. El espermatozoide ideal es el que tiene una cabeza oval, con contorno regular, sin vacuolas (especialmente en el núcleo), de 4-5 μm de largo y 2-3 μm de ancho, con un acrosoma bien definido que ocupe 40-70 %. La base de la cabeza debe ser ancha y no terminar en punta y unirse axialmente a la pieza intermedia, que debe ser <1 μm de ancho y aproximadamente una cabeza y media de largo, los restos citoplasmáticos deben ser menores que media cabeza. La cola debe ser uniforme, lineal no estar enrollada, y con una longitud de unos 45 μm

Para realizar las extensiones se utiliza un volumen de semen, previamente mezclado, de 5-10 μL dependiendo de la concentración. Para concentrar las muestras con <5 mill/mL se pueden centrifugar 10min/600g, debe evitarse que la extensión sea muy gruesa puede desprenderse al hacer la tinción. Se recomienda hacer más de una extensión por si falla la tinción. Se deposita el semen en un porta limpio de grasa para que la muestra se fije, la gota se arrastra ayudándonos de otro porta y no debemos empujar porque podemos romper las colas. Cuando se evapore la humedad se fija para evitar desecaciones. Una vez teñidas y montadas con cubre las extensiones pueden contarse después de varios días.

Se analiza la morfología de 100 espermatozoides con objetivo de inmersión 100x en campo claro y con una intensidad de luz adecuada. Se valora la morfología y el tamaño de la cabeza, cola y pieza intermedia. Se repite el proceso en otra zona del porta y se compara el resultado, si la diferencia entre las dos extensiones se encuentra dentro de la aceptada,

se informa la media de los dos porcentajes. Se considera un espermatozoide normal el que cumple todos los requisitos de espermatozoide ideal, todas las desviaciones se consideran anormales. Solo se tienen en cuenta los espermatozoides completos con cabeza y cola, y si el porcentaje de colas sueltas es mayor al 20 % se informará. En esta preparación también valoramos la presencia de otras células redondas: germinales, inflamatorias, bacilos, hematíes, prostáticas. La presencia de células germinales puede indicar daño testicular, generalmente su número es escaso, también pueden observarse células procedentes de epitelios de las glándulas accesorias.

Se informa el porcentaje de espermatozoides normales, si hay predominio de una anomalía y la presencia de otras células redondas. El número total de espermatozoides normales tiene significado biológico por lo que debe informarse y se calcula multiplicando el porcentaje de espermatozoides normales por la concentración de espermatozoides eyaculados. Los espermatozoides anormales tienen disminuida su capacidad de fecundar y la alteración de la morfología se asocia con el aumento de la fragmentación de ADN y con la presencia de anomalías cromosómicas.

Parámetro	Límite inferior de referencia
Volumen	1.5 mL
Espermatozoides eyaculados	>39 millones
Espermatozoides mL	>15 millones/mL
Movilidad progresiva	>32
Movilidad total	>40
Porcentaje de espermatozoides vivos	>58
Espermatozoides normales	>4
Leucocitos peroxidasa positivos	<1 millón

Tabla 3: Valores de referencia basados en el manual OMS 2010.

6. Anticuerpos antiespermatozoides

Los espermatozoides desencadenan una respuesta inmune al entrar en contacto con el sistema inmunológico del organismo, como por ejemplo en un traumatismo, inflamación de las vías seminales ó vasectomía. Los anticuerpos pueden ser positivos en ausencia de aglutinaciones. La presencia de anticuerpos antiespermatozoides no necesariamente es causa de infertilidad por factor inmunológico.

Para el cribado de anticuerpos espermáticos en el semen se utilizan anticuerpos tipo IgG. El test se basa en la movilidad de los espermatozoides, cuando el porcentaje de espermatozoides inmóviles es elevado no se debe realizar, pueden dar lugar a falsos positivos.

7. Valoración de leucocitospermia.

La presencia de leucocitos en semen debe cuantificarse ya que puede significar un proceso inflamatorio de las vías seminales. El aumento de leucocitos puede asociarse a una infección de las vías seminales. Es un factor de mal pronóstico ya que implica un aumento de agentes oxidantes que pueden causar la fragmentación de ADN de los espermatozoides

La tinción con peroxidasa es un método fácil y accesible para diferenciar leucocitos polimorfonucleares (PMN) de las células redondas. Permite contar el número de células redondas teñidas y no teñidas presentes en el eyaculado. No detecta los PMN activados que han liberado sus gránulos de peroxidasa, ni otras células inflamatorias como linfocitos o macrófagos que no tienen gránulos de peroxidasa.

LECTURAS RECOMENDADAS Y REFERENCIAS PARA EL TEXTO

WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization Press, Switzerland, 2010.

Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. Hum Reprod. 2011 Dec; 26(12):3207-12.

Carlsen E, Petersen JH, Andersson A-M, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. Fertil Steril 2004;82(2):358-366

Björndahl L, Barratt CL, Mortimer D, Jouannet P. 'How to count sperm properly': checklist for acceptability of studies based on human semen analysis. Hum Reprod. 2016 Feb;31(2):227-32.

Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U, Alvarez JG, Haugen TB. A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology, 1st edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

COMISIÓN DE ANDROLOGÍA Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Presidenta: Inmaculada García Cobaleda (2013)

Miembros: Guadalupe Bueno Rodríguez, Jose Antonio Castilla Alcalá, Maria Isabel Jiménez García, María Dolores Lozano Arana, Joan de Monserrat Vallvé, José Manuel Moreno Cebeira, Cristina Sánchez Pozo (*Coordinadora*), Isabel Sánchez Prieto

Residentes: Covadonga de Miguel Fernández-Miranda, Tamara Rodríguez Pérez

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi (*Residente*), R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, A. Peña (*Residente*), N. Rico, M. Rodríguez (*Presidente*), MC. Villà.

ISSN 1887-6463 – Diciembre 2016 (recibido para publicación Marzo 2016).