

# Instruções de utilização "faça você mesmo"

## SPERMOGRAMA & CONTRACEPÇÃO TÉRMICA MASCULINA

|                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Apresentação</i>                  | <p>Este é um exame médico para analisar várias características do esperma. Consiste na observação de uma gota de sémen com um microscópio para contar o esperma e anotar as suas características.</p> <p><b>Este teste não-invasivo e indolor</b> é realizado regularmente para verificar se a concentração de esperma está bem abaixo do <b>limiar contraceptivo</b>: concentração de esperma &lt; <b>1 milhão/ml</b>.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <i>Indicações no contexto do CMT</i> | <ul style="list-style-type: none"><li>• O primeiro teste avalia a qualidade do seu esperma. Se a qualidade do seu esperma não cumprir as normas estabelecidas pela OMS<sup>1</sup>, o seu médico encaminhá-lo-á para outros métodos contraceptivos.</li><li>• Os 2 testes seguintes são feitos com 2-3 meses e 3 semanas de intervalo depois de começar a usar o dispositivo. Se a sua concentração for &lt; 1 milhão/ml, é contraceptivo. Caso contrário, repetir o teste no mês seguinte.</li><li>• Durante os primeiros 6 meses, a revisão é mensal, depois trimestral.</li><li>• <b>Cuidado: Se se esquecer de tomar a pílula ou se for irregular, continuar o protocolo e tomar outro contraceptivo durante um mês e depois fazer o teste.</b></li><li>• Quando deixar de utilizar este contraceptivo, utilize outro método de contracepção e faça um check-up após 3 meses para confirmar que a sua fertilidade está a voltar ao normal de acordo com as normas da OMS <b>com o seu médico</b>.</li></ul> |
| <i>Como é que se prepara?</i>        | <p><b>Período de abstinência de 3 dias em geral.</b></p> <p>Beba um litro de água no dia anterior e um grande copo de água no dia seguinte.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

**Este guia é apenas para fins informativos.**

<sup>1</sup> ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Manual de laboratório da OMS para o exame e processamento de sémen humano, Quinta Edição, Genebra, OMS, 2010

Aide mémoire : examen microscopique de l'éjaculat  
pour une concentration inférieure à 50000/ml

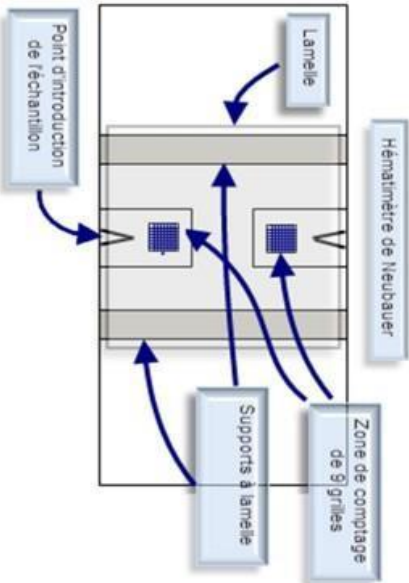
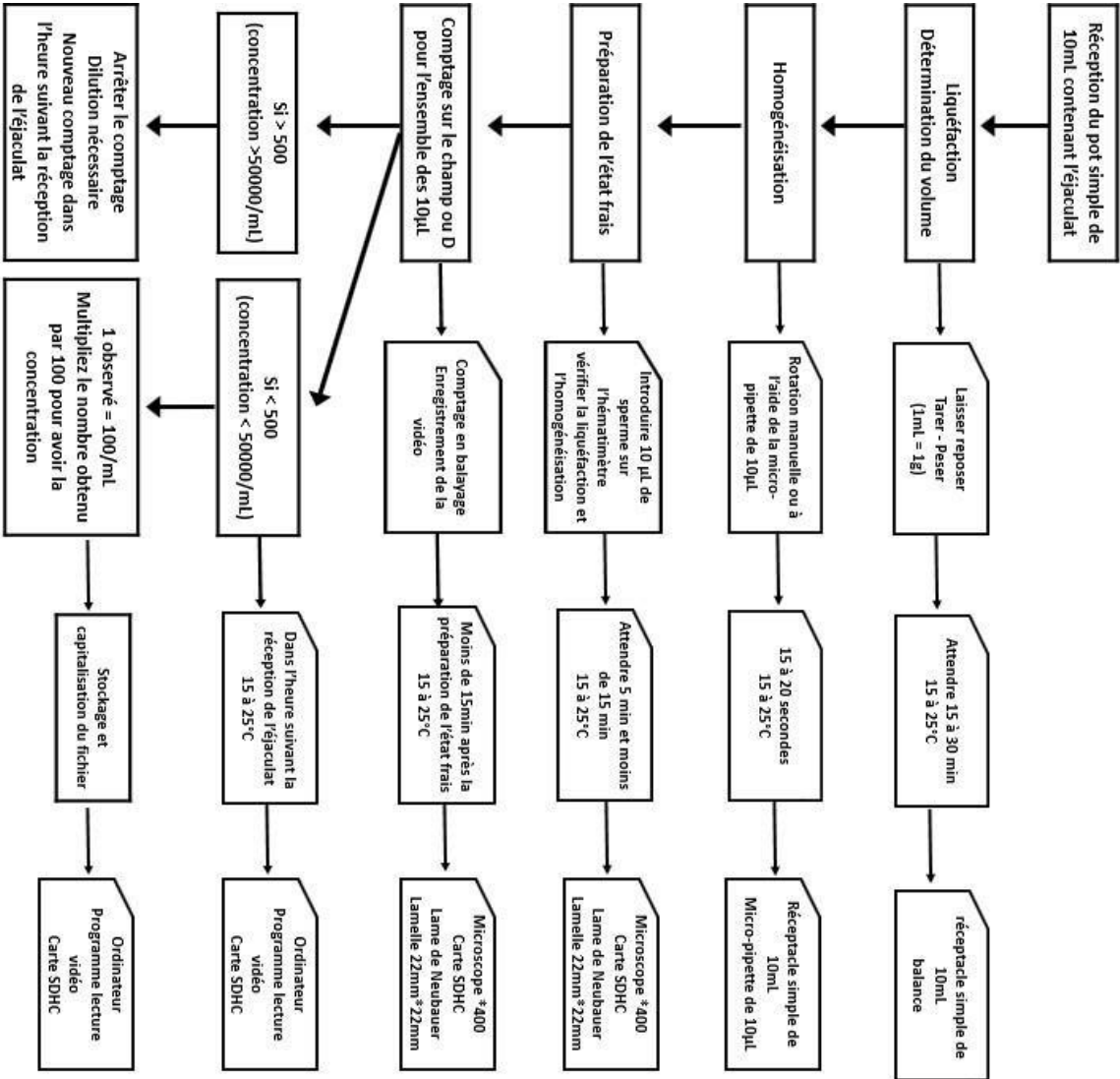


Figure 5: Hémamètre de Neubauer

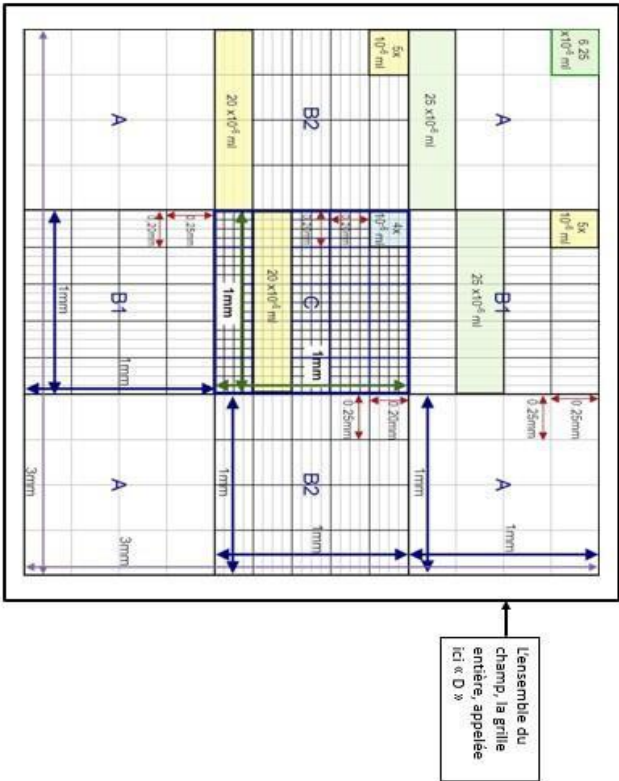


Figure 10 & 11: Zone de comptage de l'hémamètre de Neubauer

Aide memoire: exame microscópico de ejaculação  
para uma concentração superior a  
50,000/ml

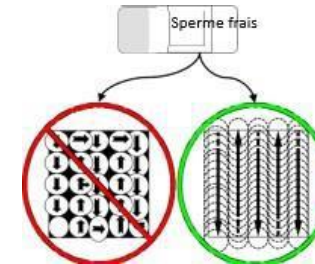
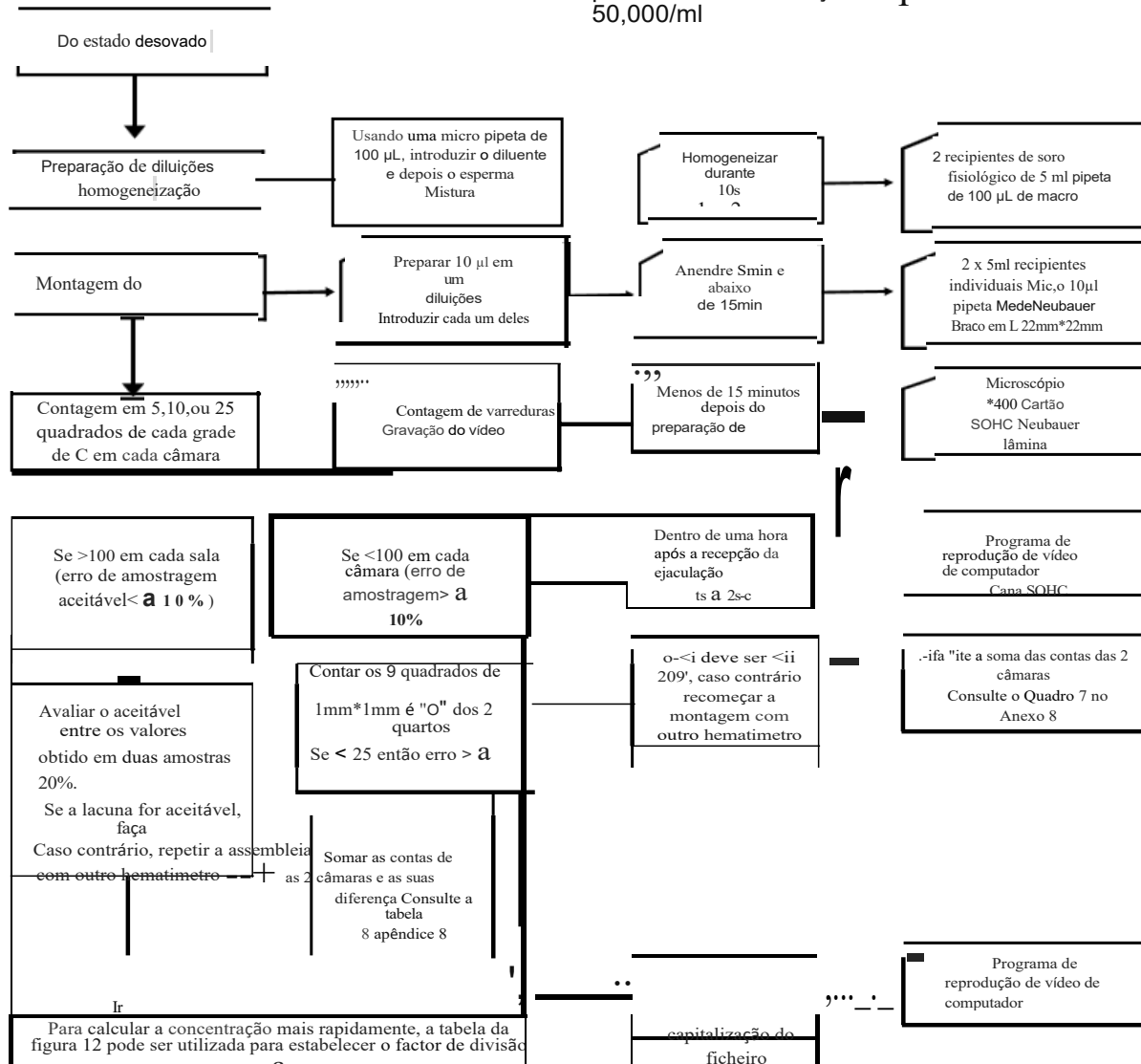


Figura 3: Campo de visão (varrimento) para examinar toda a superfície da lâmina cobrindo um volume conhecido de sémen.

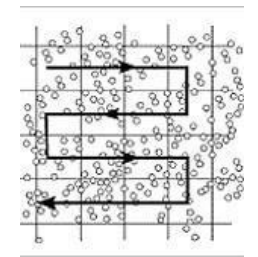


Figura 14 Contagem com concentração de células e levee.

| Nº de espermatozoides por campo, factor de ampliação 400 | Diluição | Sémen (µl) | Óleo ou ant (µl) |
|----------------------------------------------------------|----------|------------|------------------|
| Raro                                                     | 1:2      | 100        | 100              |
| Menos de 15                                              | 1:5      | 100        | 400              |
| De 15 a 40                                               | 1: 10    | 50         | 450              |
| De 41 a 200                                              | 1: 20    | 50         | 950              |
| Mais de 200                                              | 1: 50    | 50         | 2450             |

Figura 8: Diluições adequadas a avaliação da concentração no hematimetro de Neubauer

| Diluição | Nb.,de cartCs na grelha C<br>(de ehaqlle room)<br>comoris nò comotae:c |     |    | todo o campo, toda<br>a grelha chamada<br>• D> |
|----------|------------------------------------------------------------------------|-----|----|------------------------------------------------|
|          | 5                                                                      | '10 | 25 |                                                |
|          | Di, factor ision                                                       |     |    |                                                |
|          | 1 : 2                                                                  | 20  | 40 |                                                |
| 1 : 5    | 8                                                                      | 16  | 40 | 360                                            |
| I: 10    | 4                                                                      | 8   | 20 | 180                                            |
| I: 20    | 2                                                                      | 4   | 10 | 90                                             |
| 1 : 50   | 08                                                                     | 16  | 4  | 36                                             |

Figura 12: Factores de divisão a aplicar ao número total de espermatozoides contados nas duas câmaras para calcular concentração fa (em x 10-6/ml)

## Índice

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Material .....                                                                              | 5  |
| Começar com o microscópio .....                                                             | 6  |
| Componentes do microscópio & Primeira utilização do microscópio .....                       | 6  |
| Preparação do microscópio, focalização, observação, armazenamento do microscópio .....      | 8  |
| Higiene e prevenção de riscos de exposição a fluidos biológicos .....                       | 9  |
| Esterilização da água a ferver .....                                                        | 9  |
| A entrevista .....                                                                          | 9  |
| Lavagem manual com solução hidroalcoólica .....                                             | 10 |
| Curso de acção.....                                                                         | 10 |
| Dados teóricos sobre o espermograma .....                                                   | 11 |
| Espermograma .....                                                                          | 11 |
| Dados a recuperar .....                                                                     | 11 |
| Para informação .....                                                                       | 12 |
| Valores de referência de acordo com o guia da OMS 2010.....                                 | 12 |
| Variabilidade na concentração dentro do mesmo assunto .....                                 | 13 |
| Variabilidade nas características espermáticas em função do tempo até à abstinência.....    | 14 |
| Morfologia do espermatozóide .....                                                          | 15 |
| Técnicas de manipulação e preparação do sémen.....                                          | 16 |
| Configuração padrão da célula de contagem hematimétrica ou Neubauer .....                   | 16 |
| Liquefacção da ejaculação .....                                                             | 17 |
| Homogeneização da ejaculação.....                                                           | 17 |
| Preparação do estado fresco .....                                                           | 17 |
| Hematímetro de Neubauer .....                                                               | 18 |
| Seleção da diluição apropriada para avaliação da concentração no hematizador Neubauer ..... | 20 |
| Avaliação da concentração de esperma .....                                                  | 21 |
| Homogeneização e diluição da ejaculação.....                                                | 21 |
| Montagem da                      hematímetro e sedimentação de esperma .....                | 22 |
| Avaliação da concentração.....                                                              | 22 |
| Contagem de espermatozóides em cada uma das amostras preparadas .....                       | 23 |
| Verificação da aceitabilidade das diferenças de medição entre amostras .....                | 26 |
| Cálculo da concentração .....                                                               | 26 |
| Limite de detecção.....                                                                     | 27 |
| Anexos .....                                                                                | 28 |
| Tabelas de diferenças aceitáveis entre amostras .....                                       | 28 |
| Tabelas de diferenças aceitáveis entre amostras .....                                       | 29 |
| Bibliografia.....                                                                           | 30 |

# Material

| Tipo                                                                                           | Quantidade                                                  | Utilização                | Custo total | Higiene                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------|----------------------------------------------------------|
| Toalhetes anti-sépticos                                                                        | 1 caixa de 100                                              | Utilização única Material | 4 €         | Não estéril. Armazenar num local limpo e abrigado de luz |
| Garrafa de água fisiológica estéril                                                            | 1 caixa de 30 doses únicas                                  |                           | 8 €         |                                                          |
| Almofadas esterilizadas                                                                        | 1 caixa de 20 sacos                                         |                           | 4€          |                                                          |
| Luvras de exame não em pó                                                                      | 1 caixa de 100                                              |                           | 4€          |                                                          |
| Papéis de lente                                                                                | 1 caixa de 30                                               |                           | 8€          |                                                          |
| Pontas esterilizadas descartáveis                                                              | 1 caixa                                                     | Material reutilizável     | 10€         | Esterilizar antes de usar e entre cada novo amostragem   |
| Garrafa de álcool a 70° modificado                                                             | 1 frasco de 200 ml                                          |                           | 3€          |                                                          |
| Hidroalcoólico solução                                                                         | 1 garrafa de 75mL                                           |                           | 3€          |                                                          |
| Recipiente único para a colecção de tudo o que a ejaculação                                    | 1 caixa de plástico de 10 mL com cobertura                  |                           | 5€          |                                                          |
| Balança digital com grama precisão                                                             | 1 novo                                                      |                           | 20€         |                                                          |
| Recipientes simples para fazer os 2 diluídos amostras e o diluente para frasco salino          | Caixas plásticas de 3 x 5 mL                                |                           | 5€          |                                                          |
| Microfibras de laboratório pipeta que pode segurar 10 µl                                       | 1 em segunda mão                                            |                           | 35€         |                                                          |
| Microfibras de laboratório pipeta que pode contém 100 µl                                       | 1 em segunda mão                                            |                           | 35€         |                                                          |
| Lâminas Profundidade de campo 0,1 mm mais superfície pequenos quadrados 0,0025 mm <sup>2</sup> | 2 células de contagem Neubauer com 100 lamelas de cobertura |                           | 22€         |                                                          |
| Cartão SDHC                                                                                    | 1 de 8 GB                                                   |                           | 7€          |                                                          |
|                                                                                                | 1 utilizado com SDHC                                        |                           |             |                                                          |

|             |                                                                                        |       |      |  |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|--|
| Computador  | leitor de cartões e<br>Reprodução de<br>vídeo do<br>programa VLC                       |       | 50€  |  |
| Microscópio | 1 BRUXELAS<br>8,9cm (3,5") LCD<br>ensino<br>microscópio,<br>50-500x, 2000<br>(digital) |       | 189€ |  |
|             |                                                                                        | Total | 416€ |  |

O custo da execução de um espermograma não é negligenciável. É aconselhável reunir a recolha de materiais para amortizar o custo financeiro. A recolha de todo o material pode servir vários utilizadores ao longo de vários anos.

# Começar com o microscópio

Os componentes do microscópio e o primeiro manuseamento do microscópio





**Liste complète des divers éléments (graph. 1-5) :**

- 1 Module d'écran
- 2 Écran LCD
- 3 Tube
- 4 Revolver porte-objectifs
- 5 Objectif
- 6 Lamelle porte-objet (ici : échantillon préparé)
- 7 Platine de microscope
- 8 Lentille collectrice
- 9 Éclairage LED (éclairage diascopique)
- 10 Pied du microscope
- 11 Témoin lumineux
- 12 Interrupteur marche-arrêt pour module d'écran
- 13 Éclairage LED pour éclairage épiscopique  
(utiliser uniquement avec l'objectif 4x)
- 14 Table à mouvements croisés
- 15 Disque à filtre chromatique
- 16 Molette de mise au point
- 17 Raccordement électrique
- 18 Variateur
- 19 Sélecteur d'éclairage
- 20 Touches d'entrée
- 21 Touche de prise de vues
- 22 Touche de menu
- 23 commutateur
- 24 Échelles verniers
- 25 Vis de serrage
- 26 Molette avant/arrière de la table à mouvements croisés
- 27 Molette droite/gauche de la table à mouvements croisés
- 28 Levier pour dispositif de fixation par serrage
- 29 Dispositif de fixation par serrage
- 30 Diaphragme libre (sans filtre chromatique)
- 31 Filtre chromatique
- 32 Câble USB
- 33 Boîte de 10 lamelles porte-objet, 10 lamelles couvre-objet  
et 5 préparations permanentes
- 34 A) Instruments de microscopie; B) Pipette; C) Pincette
- 35 Écloserie de crevettes
- 36 Microtome
- 37 Préparations: A) Levure; B) «Gum-media»; C) Sel de mer;  
D) Œufs de crevettes



Tenha cuidado com o seu microscópio, segurando-o cuidadosamente. Tenha cuidado para não colocar os dedos sobre a ocular, que é muito sensível. O mesmo se aplica ao objectivo e às preparações que irá observar para evitar que se sujem e interfiram com a observação.

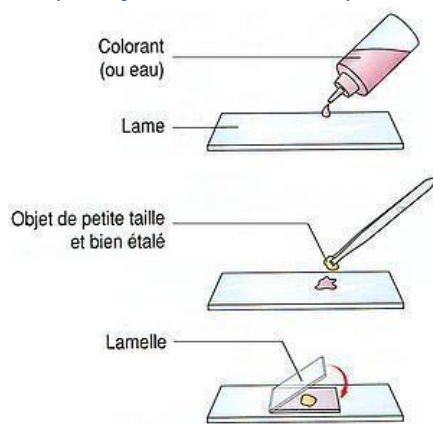
Evitar movimentos bruscos e, em vez disso, apanhar cuidadosamente o microscópio pela haste, pela pega ou levantando a base. Ligue agora a iluminação e coloque-a no máximo primeiro.

A seguir, abrir completamente o diafragma para ajustar a intensidade da luz. Naturalmente, estes ajustes podem ser reajustados de acordo com a observação a ser feita.

O tubo óptico também pode ser rebaixado utilizando os parafusos macrómetros. Cuidado:

Usar sempre primeiro a lente mais pequena.

### Preparação do microscópio, focalização, observação, armazenamento do microscópio



A preparação consiste num deslizamento de um objecto, um deslizamento da tampa do objecto e o pequeno objecto a ser observado. Colocar a preparação no palco e proceder à observação.

O objecto a ser observado está no centro do palco, depois elevar o palco o mais próximo possível dos objectivos. Tenha cuidado para que a lâmina não se parta.

Para focar a baixa ampliação, enquanto se olha através da ocular, baixar cuidadosamente a fase com o parafuso macrómetro até que o objecto a ser observado seja afiado. Para melhorar o foco, fazer um ajuste com o parafuso macrómetro. Pode então ajustar a iluminação, fechando ou abrindo o diafragma pouco a pouco.

Consertar a preparação com os macacos.

Usar parafusos para andar para trás e para a frente e para a direita e para a esquerda.

Pode então olhar para o seu objecto através da ocular e mudar a lente, se necessário. Por exemplo, se a ampliação não for suficiente, escolher o objectivo de ampliação superior. Em seguida, reorientar com o pequeno parafuso.

Para calcular a ampliação, multiplicar a ampliação da ocular pela ampliação objectiva.

Voltar a colocar o microscópio na mais pequena objectiva e reabrir ao máximo o diafragma. Limpar bem o microscópio, especialmente a fase, e remover qualquer poeira que possa ter assentado nas lentes. Para o fazer,

usar o papel de lente previamente embebido em álcool. Finalmente, baixar o tubo óptico e colocar cuidadosamente o microscópio na sua tampa ou caixa.

Para saber mais, vá a:

<https://fr.wikihow.com/utiliser-un-microscope>

<https://www.bresser.de/fr/Microscopie/BRESSER-Microscope-d-enseignement-LCD-8-9cm-3-5.htm>

A utilização do microscópio requer tempo para se adaptar, a fim de fazer observações de qualidade.

## Higiene e prevenção de riscos de exposição a fluidos biológicos

O equipamento utilizado para recolher o sémen deve ser esterilizado ou mantido conforme indicado:

- 1 Recipiente único
- 1 x 3 ml de micropipeta
- 1 célula de contagem Neubauer com 1 lamela

### Esterilização da água a ferver

Este é o sistema mais antigo e mais simples:

- Tomar uma panela de pressão ou uma panela grande.
- Encher três quartos de água e fervê-la durante pelo menos um quarto de hora, ou encher um recipiente com 1/3 de água da torneira e 2/3 com água previamente aquecida numa chaleira eléctrica.
- Mergulhar o material nele durante 5 minutos (pode ficar deformado depois disso).
- Retirá-la da água com um alicate.
- Deixar secar em compressas esterilizadas.

### Manutenção

- Limpar suavemente com papel de lente para remover qualquer esperma ou detritos.
- Desinfectar com álcool a 70° para limitar o risco de contaminação.
- Lavar com água para remover o desinfectante.

Lavagem manual com solução hidroalcoólica:



**N.B. Se precisar de realizar um espermograma em alguém que não seja você, tenha cuidado para não entrar em contacto com a pele. Usar luvas quando trabalhar com o esperma de outra pessoa.**

### Curso de acção

#### Etapa 1: Preparação do material

Lavar as mãos após a instalação e esterilização do equipamento, Passo 2: Ejaculação da recolha

Urinar antes de recolher.

Lavar as mãos com solução hidroalcoólica.

Desinfectar o pénis com um toalhete anti-séptico.

Lavar o pénis com o frasco de água fisiológica esterilizada para remover quaisquer vestígios de desinfectante. Secar o pénis com uma compressa estéril.

Lave as suas mãos com a solução hidroalcoólica. Abra o recipiente

Efectuar a recolha de sémen por masturbação no recipiente esterilizado fornecido.

**N.B. É muito importante recolher todos os ejaculados, especialmente os primeiros jactos, pois estes contêm uma maior quantidade de esperma do que o fim da ejaculação. Se parte da ejaculação não for recolhida, é melhor recomençar com um período de abstinência de 3 dias.**

**Selar bem o receptáculo**

Lavar as mãos com água e sabão ou solução hidroalcoólica. Etapa 3: Amostragem

& observações microscópicas & gravação de vídeo

Calce as suas luvas para a amostragem da micropipeta, colocando uma gota na lâmina de Neubauer, colocar a lamela, ler ao microscópio e gravar no cartão SDHC. Passo 4:

Limpeza do equipamento

Mantenha as suas luvas calçadas quando limpar equipamento não esterilizado e equipamento esterilizador que tenha estado em contacto com o sémen.

Passo 5: Contagem e capitalização de dados

Lave as suas mãos. Já não há qualquer risco de exposição ao líquido biológico (sémen). Pegar no cartão SDHC e inseri-lo no computador. Faça uma primeira leitura com vlc, depois comece a contar. Uma vez feito isto, guardar o ficheiro no computador ou outro, nomeando-o do seguinte modo: ano\_mês\_mês\_dia\_nome ou apelido\_D número de dias desde D0\_número de espermatozóides\_M\_ml, acrescentando as seguintes informações, se necessário: patologia nos 3 meses anteriores, episódios febris, tratamento actual, idade.

Siga o protocolo e repita-o, é praticando que irá adquirir os gestos e a técnica. Para além do risco de exposição ao líquido biológico, é necessária uma higiene impecável para evitar a contaminação da amostra e para ter uma leitura da melhor qualidade.

## Dados teóricos sobre o espermograma

### Espermograma

#### Dados a recuperar

Volume: Quantidade de sémen libertado, varia de 1,5 ml a 5 ml. Aparência (cor, viscosidade) e Ph são dados de laboratório. Utilizando uma escala de gramas, pesar previamente o frasco antes de introduzir o sémen recolhido. 1 ml de sémen corresponde a 1 grama, pelo que é fácil determinar o volume recolhido.

Contagem: Isto implica a contagem dos vários elementos presentes no sémen:

- Spermatozoa (milhões/mL), a concentração de esperma,
- Esperma em toda a ejaculação (milhões), ou seja, a contagem de espermatozóides,
- Células redondas (espermatids),
- Leucócitos,
- Eritrócitos,

A concentração de esperma é obtida dividindo a contagem pelo volume da ejaculação.

Actualmente, o único indicador do estado contraceptivo de um homem é a contagem de espermatozoides (milhões/mL). A contagem é realizada com a ajuda da grelha de leitura de lâminas Neubauer, contando todos os espermatozoides presentes, independentemente da sua mobilidade. Uma vez concluída a contagem, um simples cálculo será explicado abaixo para lhe dar uma estimativa da sua contagem diária.

É importante realizar pelo menos 2 contagens de lâminas Neubauer de 2 gotas diferentes extraídas com a micro pipeta, para verificar a aceitabilidade das diferenças de medição entre as diferentes contagens.

Para informação:

Mobilidade: Inclui 4 categorias, de acordo com o tipo de viagem observada:

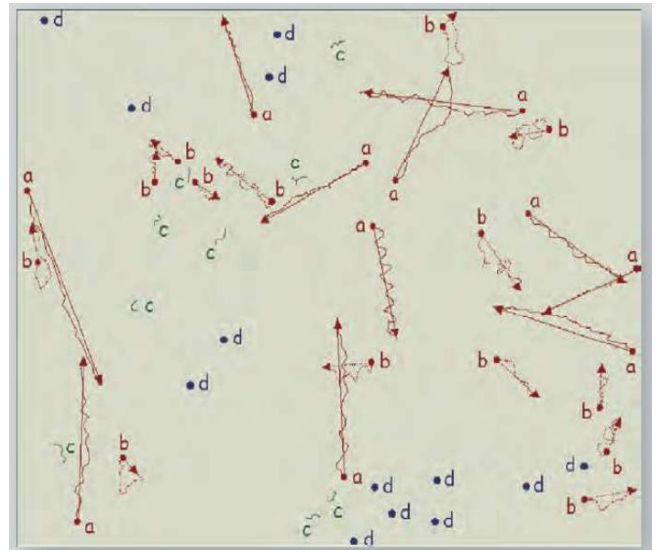
- Tipo A: progressivo, rápido, direito - Progressivo
- Tipo B: progressivo lento ou ziguezague - Progressivo
- Tipo C: Mobilidade no local - Não progressivo
- Tipo D: imóvel

Em função do número de espermatozoides contados, é interessante avaliar a percentagem das que são progressivas (A+B). Isto não é essencial, mas lembre-se que os progressistas têm uma grande probabilidade de poderem fertilizar o ovo.

Vitalidade: Esta é a percentagem de espermatozoides vivos 1 hora após a emissão. Este exame é realizado com a ajuda de um meio de contraste.

Morfologia normal dos espermatozoides: Existem diferentes categorias de anomalias:

- Anormalidade da cabeça (alongada, afinada, micro ou macrocefálica, múltipla, irregular, anormal ou acrosoma ausente)
- Anomalias citoplasmáticas (resto citoplasmático, peça intermédia pequena ou espessa, angulação)
- Anormalidade de flagelo (ausente, encurtado, de tamanho irregular, enroscado, múltiplo, isolado)



Há muitos mais parâmetros. Lembre-se de que apenas a concentração (milhões/mL) é necessária. Certamente, a avaliação da mobilidade e vitalidade podem ser elementos interessantes de calcular, mas não são actualmente essenciais na avaliação da sua prática de WCL.

| CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN                           | VALORES PADRÃO                              | VALORES PADRÃO SOB CONTRACEPÇÃO MASCULINA THERMAL (após 3 meses de desgaste) |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| VOLUME                                             | > 1,5 ml                                    | > 1,5 ml                                                                     |
| CONCENTRAÇÃO                                       | >15 milhões/ml<br>(limiar de infertilidade) | < 1 milhão/ml<br>(contraceptivo limiar)                                      |
| TELEMÓVEIS PROGRESSIVOS (A+B)                      | > 32%                                       | < 10%                                                                        |
| VITALIDADE (MOBILIDADE UMA HORA APÓS A EJACULAÇÃO) | > 58%                                       | < 40%                                                                        |
| MORFOLOGIA NORMAL DOS ESPERMATOZÓIDES              | > 4%                                        | < 4%                                                                         |

Variabilidade na concentração dentro do mesmo assunto

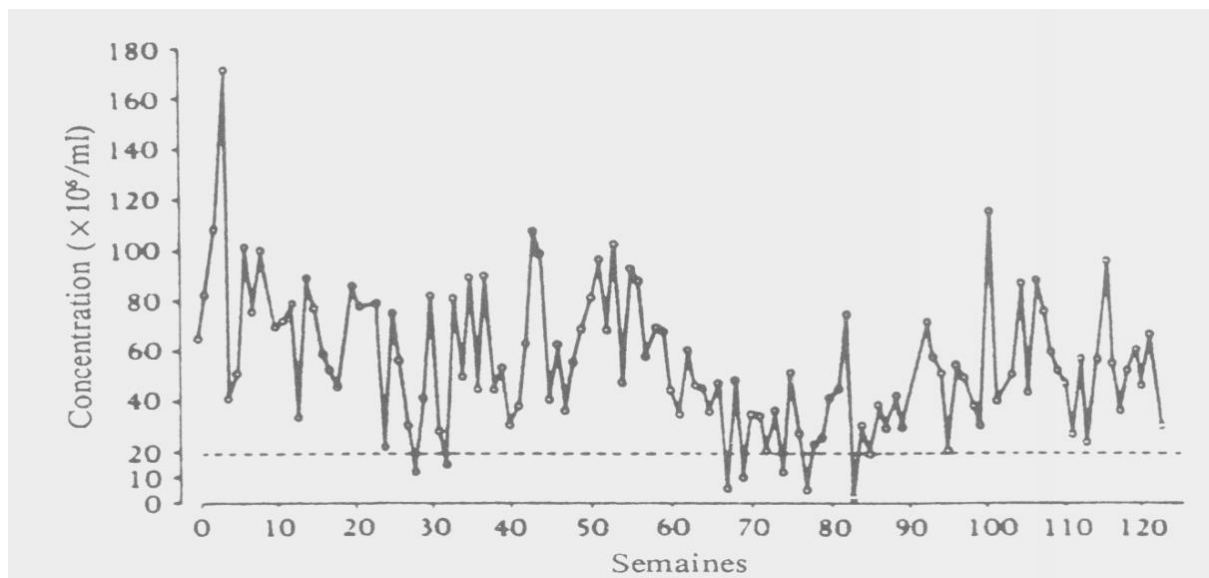


Figura 1 Concentração bissetanal de esperma no mesmo assunto durante um período de 120 semanas. Durante este período, o sujeito não recebeu tratamento e não foram registados episódios febris (após Paulsen, OMS, 1992, dados não publicados).

Tenha em mente que a sua concentração pode variar muito ao longo de alguns meses. Parâmetros como a idade (especialmente mais de 50 anos), uma condição médica que ocorreu nos 3 meses anteriores, um episódio febril, tratamento ou uso de drogas podem reduzir a quantidade e a qualidade dos espermatozoides. Em todos os exames realizados em homens que praticam CMT, não houve provas de

tais variações. Nomeadamente, que um homem com menos de 1 milhão/mL nunca tenha estado acima Este limiar é atingido se o protocolo WCL for seguido. É provável que a espermatogénese de repouso por CMT também conduza a uma redução da quantidade de variabilidade na concentração.

### Variabilidade nas características do espermatozóide de acordo com o tempo de abstinência

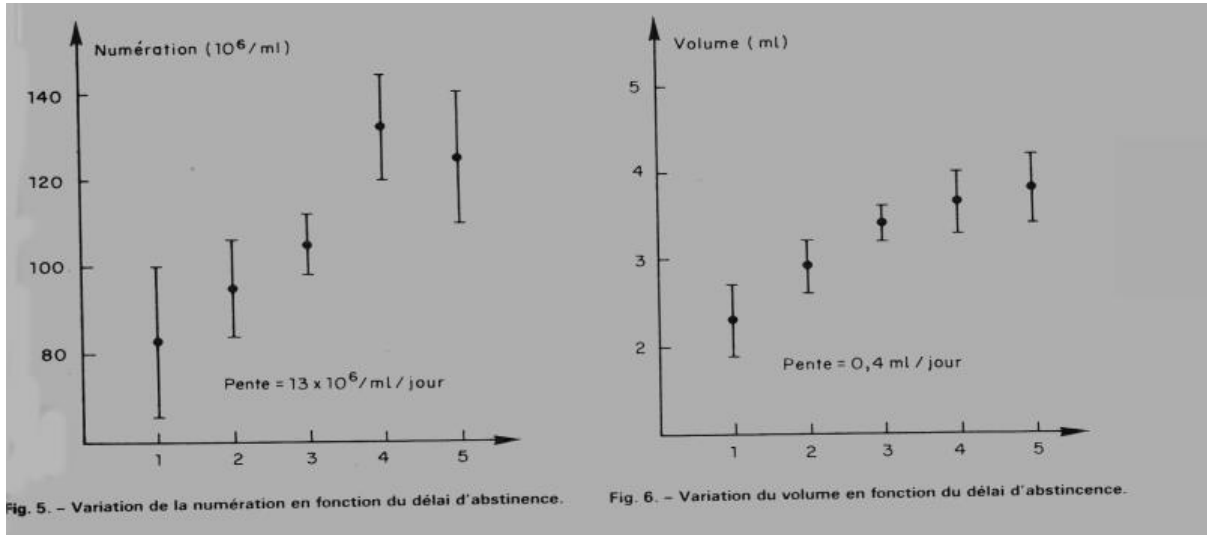


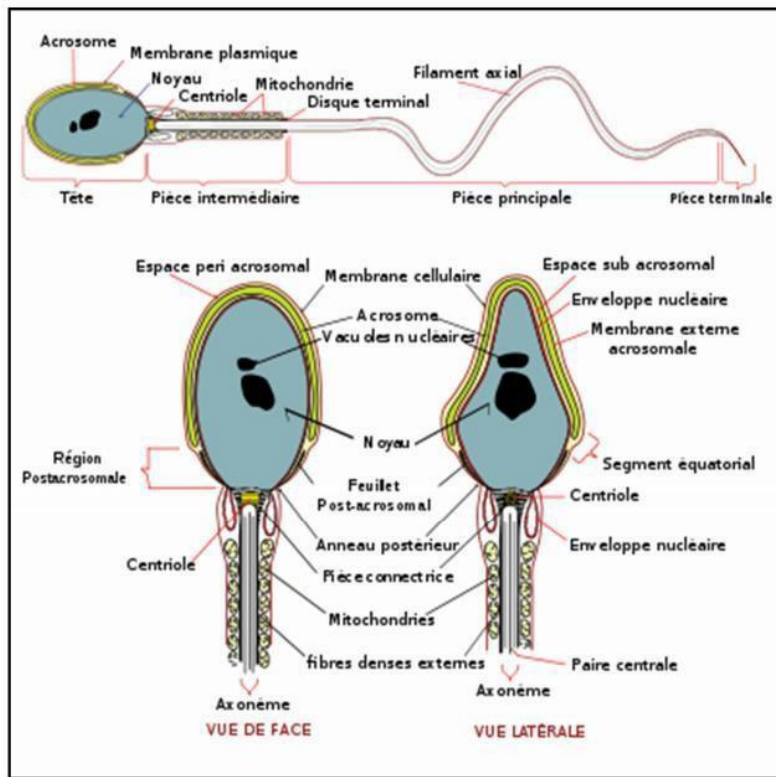
Figura 2 Variabilidade nas características do espermatozóide em função do tempo de abstinência, Paulsen, dados não publicados.

O período de abstinência tem um impacto sobre a concentração e o volume emitido. O período de 3 dias é, portanto, importante a respeitar.

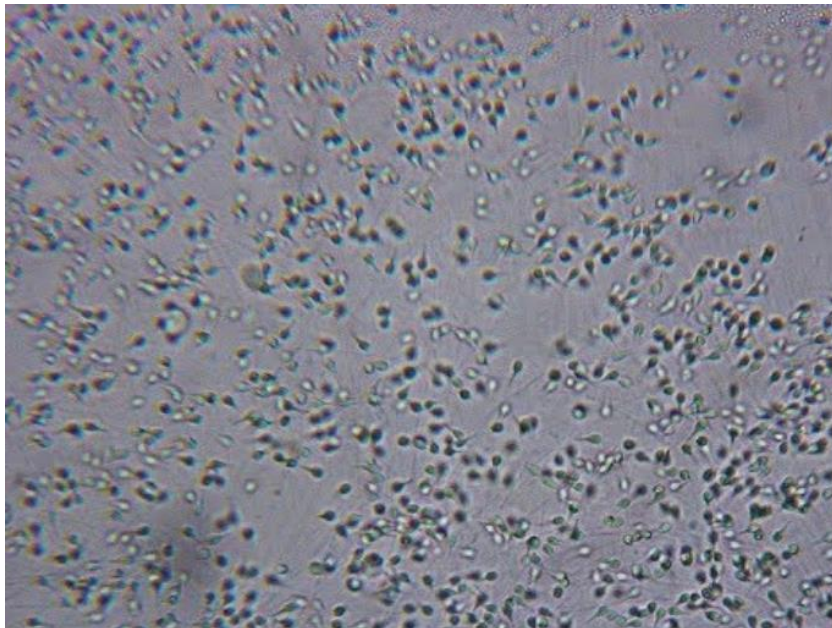
Além disso, certas moléculas, tratamentos, patologias, febre e idade (especialmente mais de 50 anos) podem reduzir a quantidade e a qualidade dos espermatozóides. É importante tomar nota desta informação ao recolher a amostra e respeitar o período de abstinência de 3 dias.



## Morfologia do espermatozóide



O que verá sob o microscópio sem a grelha de contagem:



O que verá no microscópio LCD BRESSER de 8,9 cm com \*400 de ampliação com parte de uma quadrícula de contagem em C Neubauer:



A identificação do esperma é bastante simples, uma vez que se conhece a sua forma característica.

## Técnicas de manipulação e preparação do sémen

Trabalhar para esta parte com a micropipeta de laboratório que pode conter 10 µl.

Idealmente, o sémen deve ser mantido a 15°C & 25°C, que pode ser à temperatura ambiente.

Configuração padrão do hematimetro ou da célula de contagem Neubauer :

- Colocar a tampa no hematizador Neubauer, e colocá-lo numa posição horizontal sobre a mesa, onde é fácil de manusear a micro-pipeta.
- Inserir uma ponta descartável no fim da roseta.
- Ajustar a micropipeta (que contém 10 µl) para extrair 10 µl de líquido. Normalmente este ajuste é feito guiando o botão do êmbolo para seleccionar o volume desejado.
- Inserir a ponta da roseta na amostra.
- Pressionar o êmbolo suavemente até chegar ao fim da sua viagem.

- Retirar a ponta da roseta da amostra e mantê-la em posição vertical para a levar ao hematímetro Neubauer.
- Colocar a ponta da pipeta na extremidade do deslizamento da tampa no final do hematizador Neubauer. A ideia é deixar o líquido penetrar entre a placa e a tampa pelo lado por acção capilar:
- Solte o êmbolo do documento enquanto verifica se o líquido está a entrar no hematímetro de forma correcta e uniforme.
- Se aparecerem bolhas, ou se a tampa se tiver deslocado, ou qualquer outra anomalia, repetir a operação.

O hematizador Neubauer é então montado e pronto para a leitura microscópica.

Este procedimento é válido cada vez que se monta o hematímetro Neubauer de uma amostra.

### Liquefacção da ejaculação

15 a 30 minutos após a ejaculação, o ideal é esperar 30 minutos mas pode demorar até 1 hora. Desde que se a ejaculação não for liquefeita, o movimento do esperma, a homogeneidade da amostra e a capacidade de fazer boas observações microscópicas são limitados. Um método simples para validar a liquefacção é a utilização de uma pipeta. Se o sémen recolhido na pipeta fluir no sentido da queda, a liquefacção é completa, mas se o fluxo for fibroso, viscoso, a liquefacção é incompleta.

### Homogeneização da ejaculação

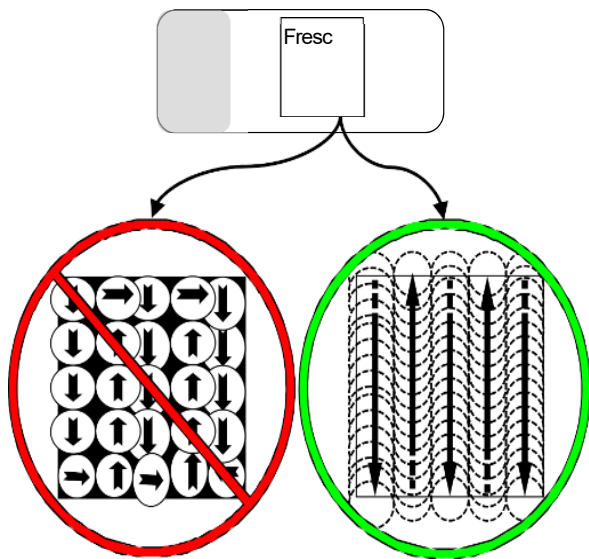
Ou rodando o recipiente: Rodar o recipiente em círculos com o pulso durante 15 a 20 segundos.

Ou com uma micropipeta: Aspirar e expelir suavemente a amostra (cerca de dez vezes) com a pipeta, tendo o cuidado de evitar a formação de bolhas.

### Preparação do estado fresco

Introdução da amostra de 10 µl no prato Neubauer

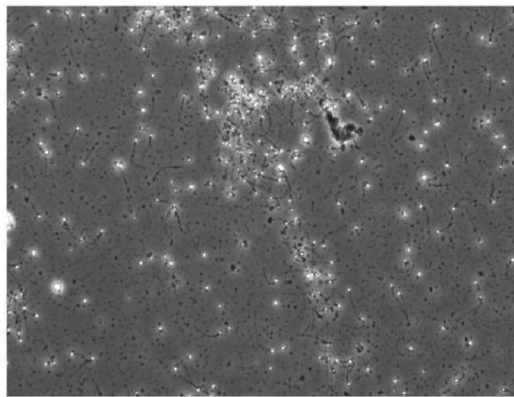
Sob o microscópio, a ejaculação fresca deve ser examinada rápida e sistematicamente (movimento de varrimento) para evitar que a preparação seque.



*Figura 3 Deslocamento do campo de visão (digitalização) para examinar toda a superfície da lâmina cobrindo um volume conhecido de esperma.*

Se o número de espermatozóides por campo variar consideravelmente, a amostra não é homogênea. A preparação deve ser descartada e deve ser feita uma nova preparação, prestando especial atenção à homogeneização. O exame do sémen fresco deve começar assim que os elementos celulares do os espermatozóides deixaram de andar à deriva entre a lâmina e a lamela.

Microscopicamente, a liquefacção da preparação do sémen fresco é também validada. A presença de correntes viscosas indica que a liquefacção está incompleta e pode comprometer a contagem. A observação de correntes viscosas, como se pode ver na fotografia, é delicada. Utilizar a técnica de gotejamento para verificar a liquefacção.



*Figura 4 Correntes viscosas visíveis sob o microscópio mostrando liquefacção incompleta do sémen*

### Hematímetro de Neubauer

O Hematímetro Neubauer continua a ser a câmara de contagem de referência para a avaliação manual. Este é o único método de concentração de esperma que será descrito neste guia.

O Hematímetro Neubauer consiste em duas câmaras de contagem separadas, cada uma compreendendo uma área de contagem de 3 mm x 3 mm subdividida em 9 quadrados de 1 mm x 1 mm, cada um composto por quadrados de tamanho conhecido (ver figuras 5 e 10). É utilizado com

uma lamela colocada sobre

um suporte incorporado para obter um espalhamento de espessura constante de 0,1 mm. Multiplicando a área de um quadrado pela espessura do espalhamento, é possível obter o volume de esperma nesse quadrado e a concentração calculada dividindo o número de espermatozoides contados num volume conhecido (concentração = número/volume).

Nota:  $1 \text{ mm}^3 = 0,001 \text{ ml} = 1 \mu\text{l}$ .

O esperma deve ser contado em diferentes secções da área de contagem, dependendo da diluição realizada e do número de espermatozoides a contar por amostra

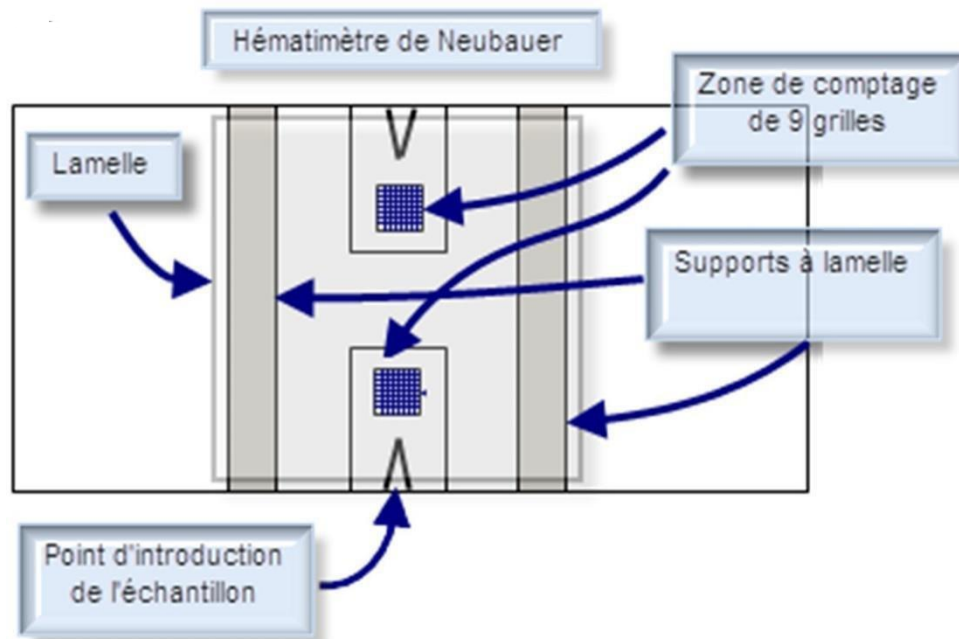


Figura 5 Hematímetro Neubauer, vista de

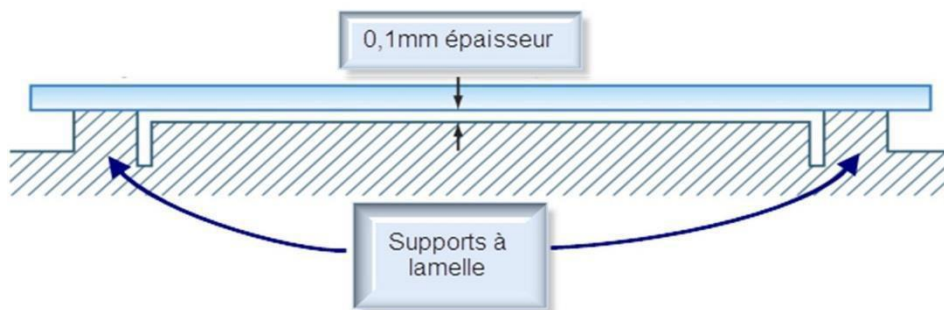
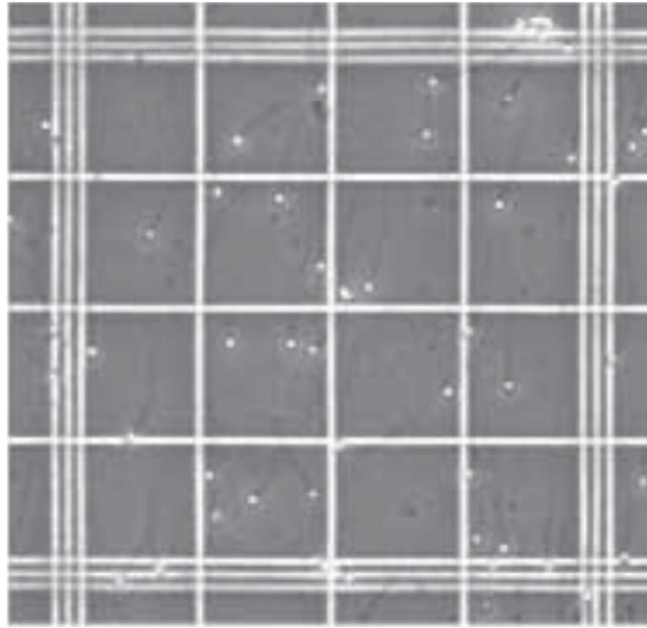


Figura 7 Hematímetro de Neubauer, vista lateral.

## Seleccção da diluição adequada para a avaliação da concentração no Neubauer



*Figura 8 Um dos 25 quadrados na área central de contagem da grelha C, subdividido em 16 outros quadrados e delimitado por 3 linhas paralelas.*

O sémen examinado no hematizador Neubauer deve ser diluído pelas seguintes razões:

- Imobilizar os espermatozóides,
- Promover a disseminação por acção capilar sob a lamela, tornando o sémen menos viscoso,
- Facilitar a contagem quando os espermatozóides são muito numerosos e se sobrepõem,
- Facilitar a enumeração quando a amostra contém muitos detritos.

O número de espermatozóides por campo, avaliado em 10  $\mu$ l de sémen fresco espalhado sob uma lamela de 22 mm x 22 mm, orienta a escolha da diluição apropriada para a instalação do hematizador Neubauer (tabela na Figura 9) com o objectivo de contar pelo menos 100 espermatozóides por amostra. A diluição é feita com soro fisiológico.



| Nbre de spermatozoides<br>par champ, facteur de<br>grossissement de 400 | Dilution | Sperme<br>( $\mu$ l) | Diluant<br>( $\mu$ l) |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|----------------------|-----------------------|
| Rare                                                                    | 1 : 2    | 100                  | 100                   |
| Moins de 15                                                             | 1 : 5    | 100                  | 400                   |
| De 15 à 40                                                              | 1 : 10   | 50                   | 450                   |
| De 41 à 200                                                             | 1 : 20   | 50                   | 950                   |
| Plus de 200                                                             | 1 : 50   | 50                   | 2450                  |

*Figura 9 Diluições adequadas para avaliação da concentração no hematizador Neubauer.*

## Avaliação da concentração de esperma

Trabalhar para esta parte com a micropipeta de laboratório que pode conter 100  $\mu$ l.

A concentração refere-se ao número de esperma, expresso em milhões, em um mililitro ( $n^{\text{bre}} \times 10^6$  /ml) de ejaculação.

De notar que se a concentração de esperma for inferior a  $1,0 \times 10^6$  /ml, a relevância de a avaliação da vitalidade e da morfologia pode ser questionada. Uma precisão de 20% é considerada aceitável para limites inferiores a  $1,0 \times 10^6$  /ml. Erros entre 20% e 30% são comuns com este método de contagem devido ao manuseamento da micropipeta, erros estatísticos por ter uma amostra não representativa, erros no volume da amostra efectivamente introduzida na placa, etc.

### Homogeneização e diluição da ejaculação

Devido à natureza viscosa do sémen e ao volume relativamente pequeno de amostras diluídas, é essencial que o sémen seja completamente homogeneizado antes de o volume desejado ser tomado para diluição.

As duas câmaras de contagem do hematizador Neubauer permitem a contagem de duas amostras separadas da ejaculação. Para reduzir o risco de erro, as duas amostras são diluídas separadamente, em dois tubos diferentes (ou seja, as duas câmaras de contagem não são preenchidas com amostras da mesma diluição, nem a contagem é realizada duas vezes na mesma câmara, caso contrário, não seriam detectados erros de amostragem, homogeneização ou diluição).

As diluições podem ser feitas em tubos limpos de 5 ml (vidro ou plástico). Primeiro colocar o diluente e depois o sémen no tubo de diluição. Antes de transferir o líquido ou o sémen para o tubo de diluição, limpar o exterior da roseta, tendo o cuidado de não tocar na abertura da ponta de modo a não absorver qualquer líquido com o papel. Para recolher todo o sémen, enxaguar a ponta da roseta no diluente (salino) aspirando e expelindo algumas vezes.

Se houver um atraso entre a preparação da diluição e a montagem do hematizador, devem ser tomadas precauções para evitar a evaporação.

### Montagem do hematímetro e sedimentação dos espermatozóides

Misturar bem a primeira diluição sacudindo durante cerca de 10 segundos ou com uma roseta. Tomar de imediato 10 µl da diluição e levar a ponta da roseta até ao ponto de introdução do hematímetro sem tocar na lâmina. Tenha cuidado para não sobrecarregar ou levantar a lamela, caso contrário, a espessura do espalhamento mudará.

Repetir com a segunda diluição na segunda câmara. Manusear suavemente o hematímetro para evitar mover a lâmina e deixá-la na horizontal.

Deixar o esperma assentar à temperatura ambiente durante pelo menos 4 minutos, mas não mais do que 15 minutos, caso contrário a preparação secará e a concentração de esperma será mais elevada.

### Avaliação da concentração

Lembre-se que pelo menos 2 contagens devem ser feitas em 2 câmaras a partir de duas gotas diferentes da amostra.

#### *Ausência de esperma no sémen fresco*

Se nenhum esperma for observado após exame da lâmina completa.

#### *Menos de 500 espermatozóides em sémen fresco*

Se menos de 500 espermatozóides forem contados no exame de toda a lâmina ou nos 9 quadrados C, registar o número de espermatozóides observados em 10 µl de sémen fresco (não diluído).

Se o sémen fresco for espalhado na lâmina de acordo com as instruções e a

Se a lâmina estiver completa, a concentração por ml pode ser estimada da

seguinte forma: Um esperma observado = 100 espermatozóides/ml = 0,0001 x

Exemplo: 120 espermatozóides em 10 µl de sémen fresco  

$$120 \text{ espermatozóides} \times 10 = 1200 \text{ espermatozóides/ml}$$

O limiar de 500 espermatozóides foi estabelecido da seguinte forma: como a presença de 1 espermatozóide numa lâmina de 10 µl é equivalente a aproximadamente 100 espermatozóides por ml, a presença de 500 espermatozóides na mesma lâmina corresponde a uma concentração de 50.000 espermatozóides por ml. O método hematológico apresentado tem um limite de detecção de 56.000 espermatozóides por ml. O limiar de 500 espermatozóides em 10 µl permite assim avaliar a concentração, mesmo abaixo do limite de detecção do hematímetro.

#### *Pelo menos 500 espermatozóides em sémen fresco*

Assim que 500 espermatozóides forem alcançados na lâmina de 10 µl, a contagem de espermatozóides deve ser interrompida. Não comunicar o número de espermatozóides nesta lâmina e proceder imediatamente à contagem hematimétrica. Apenas o resultado da contagem hematológica será relatado.

## Contagem de espermatozóides em cada uma das amostras preparadas

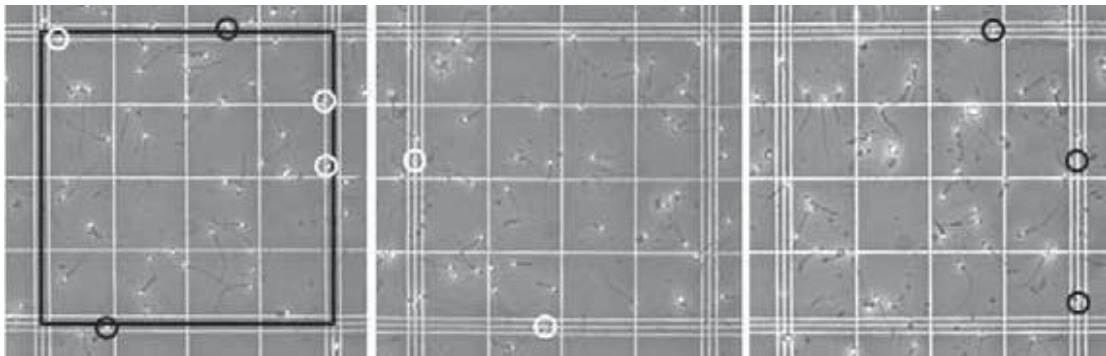
Proceder à contagem sem demora ou interrupção assim que o prazo de 4 minutos tenha passado e não para além de 15 minutos de espera.

É aceite que a avaliação de 100 espermatozóides por amostra e, portanto, um erro de 7,1% são suficientes para garantir a qualidade da análise.

A contagem é feita com uma ampliação total de 200 ou 400.

A decisão de contar ou não um espermatozóide depende da posição da sua cabeça, independentemente da orientação do flagelo. O limite de um quadrado é a linha central das três linhas paralelas ao longo dos seus lados. O esperma é contado se a maior parte da sua cabeça estiver entre as duas linhas interiores da borda das três linhas. Não é contado se a maior parte da sua cabeça estiver entre as duas linhas exteriores da borda das três linhas.

Se a maior parte da cabeça do esperma estiver na linha central, apenas os espermatozóides que tocam as extremidades de dois lados do quadrado devem ser contados, por convenção os lados esquerdo e inferior (Figura 9), para evitar a contagem do mesmo esperma duas vezes nos quadrados adjacentes.



*Figura 10 Esperma a ser contado num quadrado na grelha C (delimitado por uma margem de 3 linhas).*

Para contar o esperma que toca as bordas da grelha, ver as explicações acima. O esperma circulado a preto não é contado, enquanto que o esperma circulado a branco é contado.

Contar o esperma em 5, 10 ou 25 quadrados de grade C (ver Figura 10 e 11) até pelo menos 100 espermatozóides serem contados (máximo de 25 quadrados, quer 100 espermatozóides sejam alcançados ou não). Passar para a segunda câmara de contagem do hematizador e contar o esperma no mesmo número de quadrados de grade C (ou seja, o mesmo volume) que para a primeira amostra, mesmo que o número final de espermatozóides contados seja inferior a 100. Cada quadrado de grade C tem um volume de  $4 \times 10^{-6}$  ml.

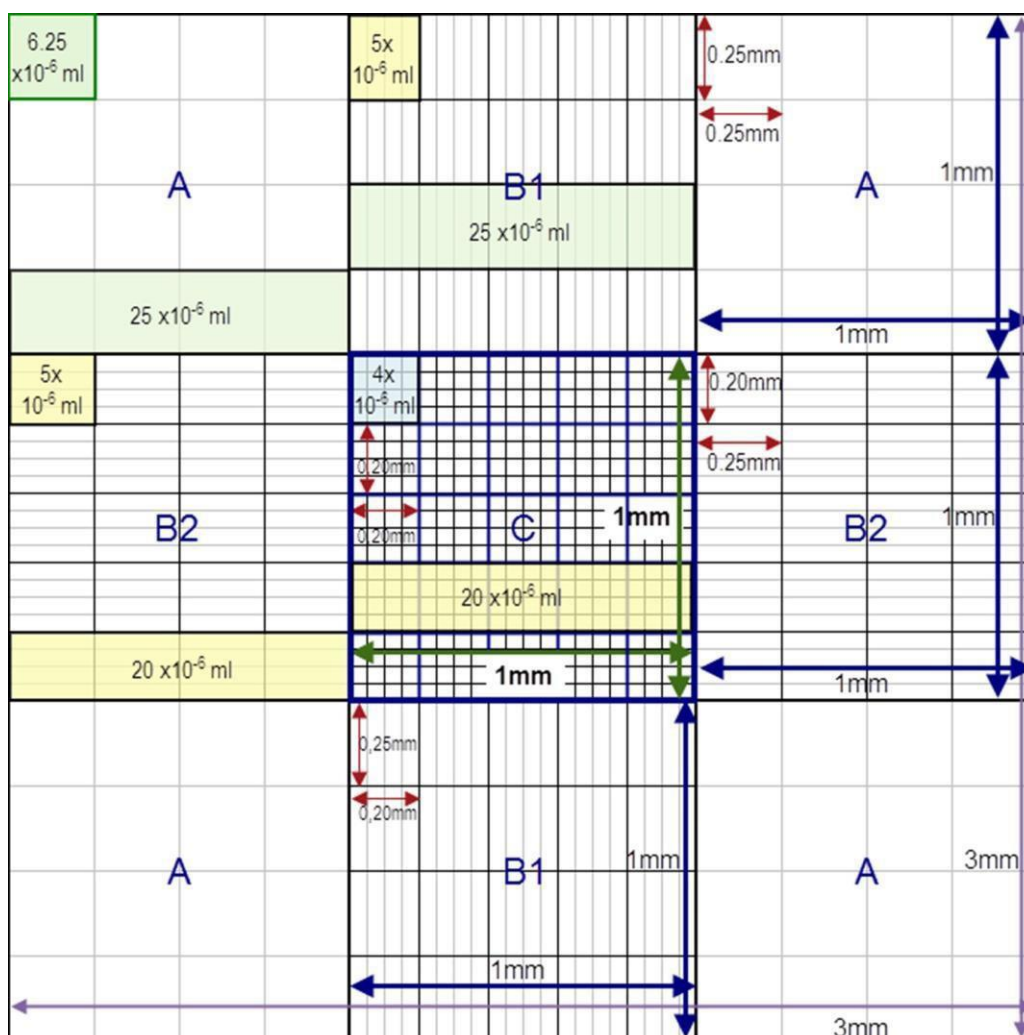


Figura 11 Área de contagem da câmara do hematómetro Neubauer.

Se a concentração de células for muito elevada, é fácil perder-se na contagem, é utilizada uma sequência de contagem em ziguezague como descrito na Fig. 7 e 12.

- Anotar numa folha os resultados do número de células contadas no primeiro quadro.
- Repita o processo para os outros quadros que deseja contar, anotando o resultado para cada um deles. Quanto mais molduras contar, mais exacta será a medição.

Isto representa  
todo o campo  
ou grelha a  
que  
chamaremos  
" D "

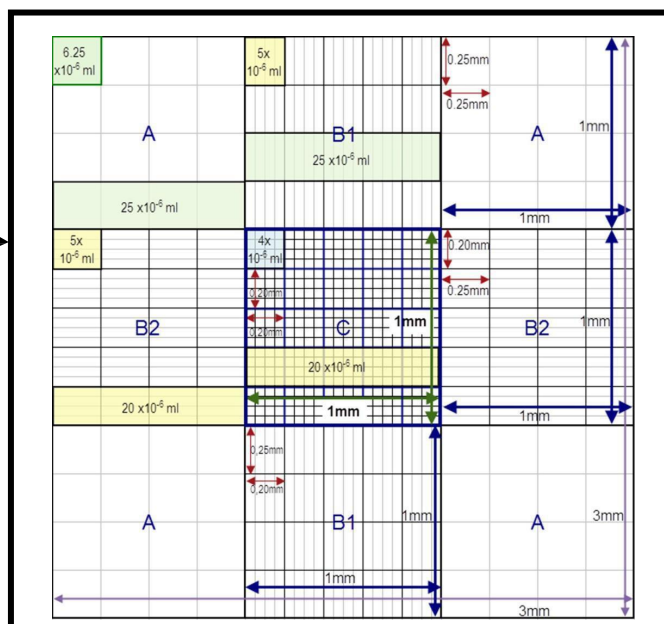


Figura 12 Área de contagem  
do

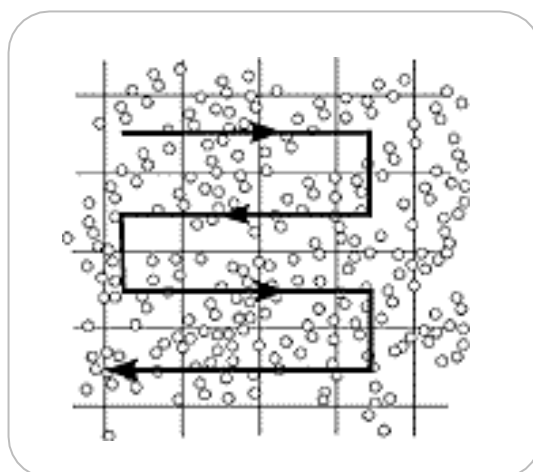


Figura 13 Contagem com alta concentração de células.

No entanto, se menos de 100 espermatozoides forem contados por amostra 1:2, o erro de amostragem será maior e o grau de certeza menor. Neste caso, os 9 quadrados de 1 mm x 1 mm das 2 câmaras de contagem (ver Figura 11) devem ser examinados para tentar alcançar um erro de amostragem aceitável (20%).

Calcular a soma das duas contagens (por exemplo, 1ª amostra: 75 espermatozoides nos quadrados de 9 1 mm x 1 mm; 2ª amostra 70 espermatozoides nos quadrados de 9 1 mm x 1 mm da segunda câmara, num total de 145).

Ver Quadro 1 no Apêndice para informações sobre a percentagem de erro de amostragem em função do número de espermatozoides contados, se este for inferior a 20%, o erro de amostragem é considerado aceitável.

## Verificação da aceitabilidade das diferenças de medição entre amostras

Calcular a soma e a diferença das duas contagens (por exemplo, 1ª amostra: 126 espermatozoides em 10 quadrados de grelha C; 2ª amostra 134 espermatozoides em 10 quadrados de grelha C da segunda câmara, totalizando 260. Diferença entre as duas contagens: 8).

Estabelecer a aceitabilidade da diferença entre os números, consultando o Quadro 2 do Apêndice.

Exemplo. Para 260 espermatozoides, a diferença aceitável é 32; a diferença aqui obtida, 8, sendo inferior a 32, é aceitável e podemos prosseguir com o cálculo da concentração.

Se a diferença for demasiado grande para ser aceite, recomenda-se que ambas as diluições sejam repetidas, tendo o cuidado de homogeneizar o sêmen em cada fase, e que a contagem seja repetida. Repetir este procedimento até duas vezes (três conjuntos de duas amostras). Se a diferença ainda for demasiado grande depois de três rodadas (a ejaculação é particularmente viscosa e heterogênea), faça uma média dos seis números obtidos.

## Cálculo da concentração

A concentração de esperma (C) é igual ao número (N) de esperma dividido pelo volume (V) de sêmen em que foram contados, multiplicado pelo factor de diluição (D).

Exemplo:

- $D = 20$  (diluição 1:20).
- $N = 260$  (1ª câmara = 126, 2ª câmara = 134).
- $V = 10$  quadrados (x 2 amostras) de  $4 \times 10^{-6}$  ml cada, num total de  $80 \times 10^{-6}$  ml.
- $C = (N/V) \times D$  ( $260/80 \times 10^{-6}$ )  $\times 20 = 65 \times 10^{-6}$  por ml.

| Dilution | N <sup>bre</sup> de carrés de la grille C<br>(de chaque chambre)<br>compris dans le comptage |     |     | O            todo<br>campo, o todo<br>grelha<br>chamada " |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----------------------------------------------------------|
|          | 5                                                                                            | 10  | 25  |                                                           |
|          | Facteur de division                                                                          |     |     |                                                           |
| 1 : 2    | 20                                                                                           | 40  | 100 | 900                                                       |
| 1 : 5    | 8                                                                                            | 16  | 40  | 360                                                       |
| 1 : 10   | 4                                                                                            | 8   | 20  | 180                                                       |
| 1 : 20   | 2                                                                                            | 4   | 10  | 90                                                        |
| 1 : 50   | 0,8                                                                                          | 1,6 | 4   | 36                                                        |

Figura 14 Factores de divisão a aplicar ao número total de espermatozoides contados em ambas as câmaras para calcular a concentração (em  $\times 10^{-6}/\text{ml}$ ).

Para calcular a concentração mais rapidamente, a tabela da Figura 12 pode ser consultada para estabelecer o factor de divisão a aplicar de acordo com o número de quadrados incluídos na contagem e a diluição feita.

Voltemos ao exemplo anterior:

- $N = 260$  (2 quartos)
- Factor de divisão = 4 (intersecção da coluna de 10 quadrados e da linha de diluição 1:20)
- Factor  $N/\text{Divisão} = C$
- $260/4 = 65$
- $C = 65 \times 10^6/\text{ml}$

#### Limite de detecção

O método proposto tem um limite de detecção de 56.000 espermatozoides por ml (para que o erro de amostragem não exceda 20%). Portanto, este método é impreciso se houver menos de 25 espermatozoides por câmara de contagem (total de 50 espermatozoides).



# Anexos

## Tabelas de diferenças aceitáveis entre amostras

O quadro 1 é utilizado para calcular o erro de amostragem de acordo com o número de espermatozóides contados no hematímetro.

Quadro 1. Erro de arredondamento (%) por contagem total de espermatozóides

| $\frac{n_{\text{total}}}{n_{\text{amostra}}}$ | Erro Smp (%) | $\frac{n_{\text{total}}}{n_{\text{amostra}}}$ | Erro Smp (%) | $\frac{n_{\text{total}}}{n_{\text{amostra}}}$ | Erro Smp (%) |
|-----------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------|--------------|
| 1                                             | 100          | 25                                            | 20           | 88                                            | 10,8         |
| 2                                             | 70,7         | 30                                            | 18,3         | 90                                            | 10,5         |
| 3                                             | 57,7         | 35                                            | 16,9         | 95                                            | 10,3         |
| 4                                             | 50           | 40                                            | 15,8         | 100                                           | 10           |
| 5                                             | 44,7         | 45                                            | 14,9         | 150                                           | 8,2          |
| 6                                             | 40,8         | 50                                            | 14,1         | 200                                           | 7,1          |
| 7                                             | 37,8         | 55                                            | 13,5         | 250                                           | 6,3          |
| 8                                             | 35,4         | 60                                            | 12,9         | 300                                           | 5,8          |
| 9                                             | 33,3         | 65                                            | 12,4         | 350                                           | 5,3          |
| 10                                            | 31,6         | 70                                            | 12           | 400                                           | 5            |
| 15                                            | 25,8         | 75                                            | 11,5         | 450                                           | 4,7          |
| 20                                            | 22,4         | 80                                            | 11,2         | 500                                           | 4,5          |

<sup>1</sup> ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Manual de laboratório da OMS para o exame e processamento de sêmen humano, Quinta Edição, Genebra, OMS, 2010

Exemplo: 100 espermatozóides são contados em cada câmara do hematizador. De acordo com a tabela 7, o erro de amostragem é de 7,1% por cada 200 espermatozóides.

## Tabelas de diferenças aceitáveis entre amostras

O quadro 2 é utilizado para estabelecer a aceitabilidade da diferença no número de espermatozóides contados em duas amostras hematológicas.

Quadro 2. Diferença aceitável entre os valores obtidos em duas amostras, tendo em conta o número total de espermatozóides

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

\*Baseado num intervalo de confiança arredondado de 95%.

<sup>1</sup> ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Manual de laboratório da OMS para o exame e processamento de sêmen humano, Quinta Edição, Genebra, OMS, 2010

Exemplo : Primeiro amostra : 126 espermatozóides; segundo amostra: 134 espermatozóides, num total de 260. Diferença de 8.

De acordo com o Quadro 8, para um total de 260 espermatozóides, a diferença deve ser igual ou inferior a

32. A diferença de 8 é, portanto, aceitável.

# Bibliografia

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Manual de laboratório da OMS para o exame e processamento de sémen humano*, Quinta Edição, Genebra, OMS, 2010.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL PARA A PADRONIZAÇÃO. *ISO15189:2012(E) Laboratórios para Biologia médica - Requisitos de qualidade e competência*, terceira edição (versão corrigida 2014-08-15), Genebra, ISO, 2012.

MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX. *Conformidade dos laboratórios médicos com a norma CAN/CSA-15189 "Laboratoire d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence"*. 2005-03-21.

ORDEM PROFISSIONAL DOS TECNOLOGISTAS MÉDICOS DO QUEBEC. *Qualidade na laboratoires de biologie médicale: Règles de pratique*, segunda edição, Montréal, OPTMQ, 2009.

ASSOCIAÇÃO CANADIANA DE NORMALIZAÇÃO. *CAN/CSA-Z15190 Laboratórios médicos - Requisitos de segurança*. Mississauga: Associação Canadana de Normas, 2005.

CSA GROUP. *Z316.7-12 Instalações de recolha de espécimes primários e laboratórios médicos - Segurança dos doentes e qualidade dos cuidados - Requisitos para recolha, transporte e armazenamento de espécimes*, Mississauga, CSA Group, Actualização No. 1 Março 2014.

CHROMSRIMEK, Natta, et al. "Effect of Time between Ejaculation and Analysis on Sperm Motility", *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology*, Abril de 2008, Vol. 16, No. 2.

SUCKCHAROEN N., et al. "A comparison of Mackler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement, *J Med Assoc Thai*, Setembro de 1994, Vol. 77, No 9.

CHRISTENSEN, P., et al. "Discrepâncias na determinação da concentração de esperma utilizando câmaras de contagem Bürker-Türk, Thoma e Makler", *Theriogenology*, Março de 2005, Vol. 63, No 4.

HAMAMAH, S. e BARTHELEMY, C. Espermograma e testes de fertilidade: Interesse e limitações. *JTA Capítulo V- Fertilidade e infertilidade masculina*.

KRUGER, Thinus F. e FRANKEN, Daniel R. *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation*, Londres, *Taylor & Francis*, CRC press, 2004, 86.

Cooper, T.G., et al. "Azoospermia: Realidade Virtual ou Possível de Quantificar?" *Journal of Andrology*, 2006, Vol. 27, No. 4.

KORTHORST, Ruben A., et al. "Clearance after vasectomy with a single semen sample containing < than 100 000 immotile sperm/mL: analysis of 1073 patients", *BJU International*, 2009, Vol. 10.