

Instrucciones de uso

ESPERMOGRAMA & ANTICONCEPCIÓN TÉRMICA MASCULINA

<i>Presentación</i>	<p>Se trata de un examen médico para analizar diversas características de los espermatozoides. Consiste en observar una gota de semen con un microscopio para contar los espermatozoides y anotar sus características.</p> <p>Esta prueba no invasiva e indolora se realiza periódicamente para comprobar que su concentración de espermatozoides está muy por debajo del umbral anticonceptivo: concentración de espermatozoides < 1 millón/ml.</p>
<i>Indicaciones en el contexto del CMT</i>	<ul style="list-style-type: none">• La primera prueba evalúa la calidad de su esperma. Si la calidad de su esperma no cumple las normas establecidas por la OMS¹, su médico le remitirá a otros métodos anticonceptivos.• Las dos pruebas siguientes se realizan con 2-3 meses y 3 semanas de diferencia después de empezar a llevar el dispositivo. Si su concentración es < 1 millón/ml, está anticonceptada. Si no es así, repita la prueba al mes siguiente.• Durante los 6 primeros meses, la revisión es mensual, y después trimestral.• Precaución: Si olvida tomar la píldora o si es irregular, continúe con el protocolo y tome otro anticonceptivo durante un mes y luego realice la prueba.• Cuando deje de utilizar este anticonceptivo, utilice otro método anticonceptivo y hágase una revisión al cabo de 3 meses para confirmar con su médico que su fertilidad está volviendo a la normalidad según las normas de la OMS.
<i>¿Cómo se prepara?</i>	<p>Periodo de abstinencia de 3 días en general.</p> <p>Bebe un litro de agua el día anterior y un gran vaso de agua el día de la prueba.</p>

Esta guía es meramente informativa.

¹ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Manual de laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento del semen humano, Quinta edición, Ginebra, OMS, 2010.

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

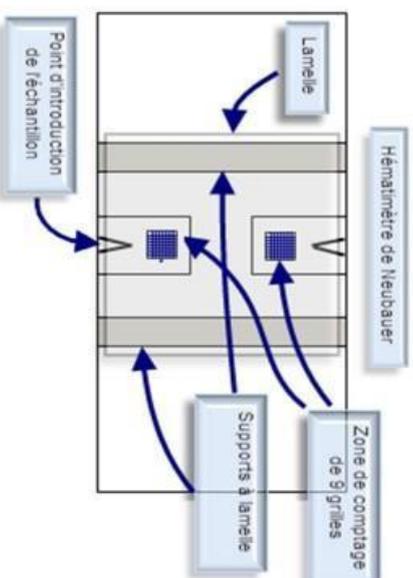
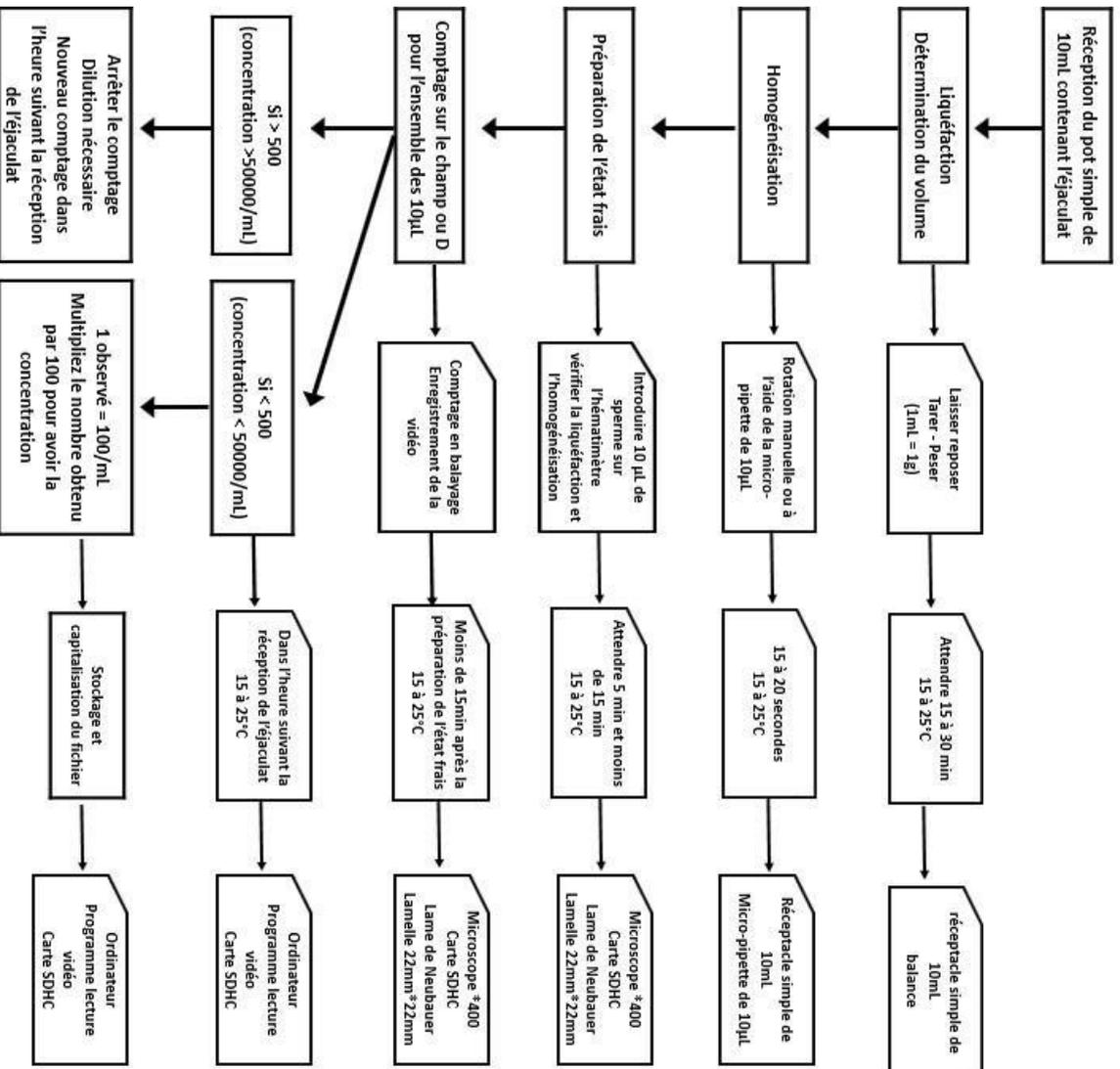


Figure 5: Hémamètre de Neubauer

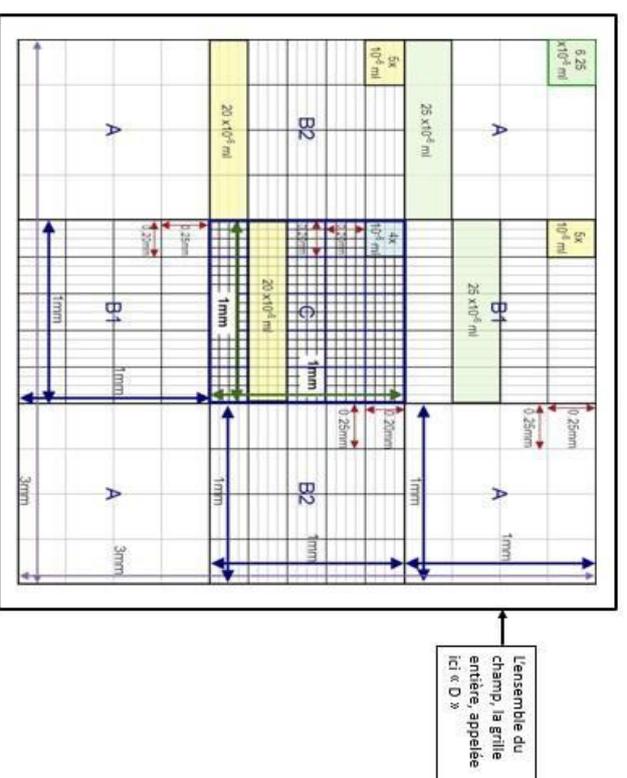


Figure 10 & 11: Zone de comptage de l'hémamètre de Neubauer

Ayuda memoria: examen microscópico del eyaculado para detectar una concentración superior a 50.000/ml.

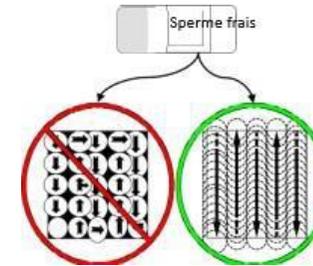
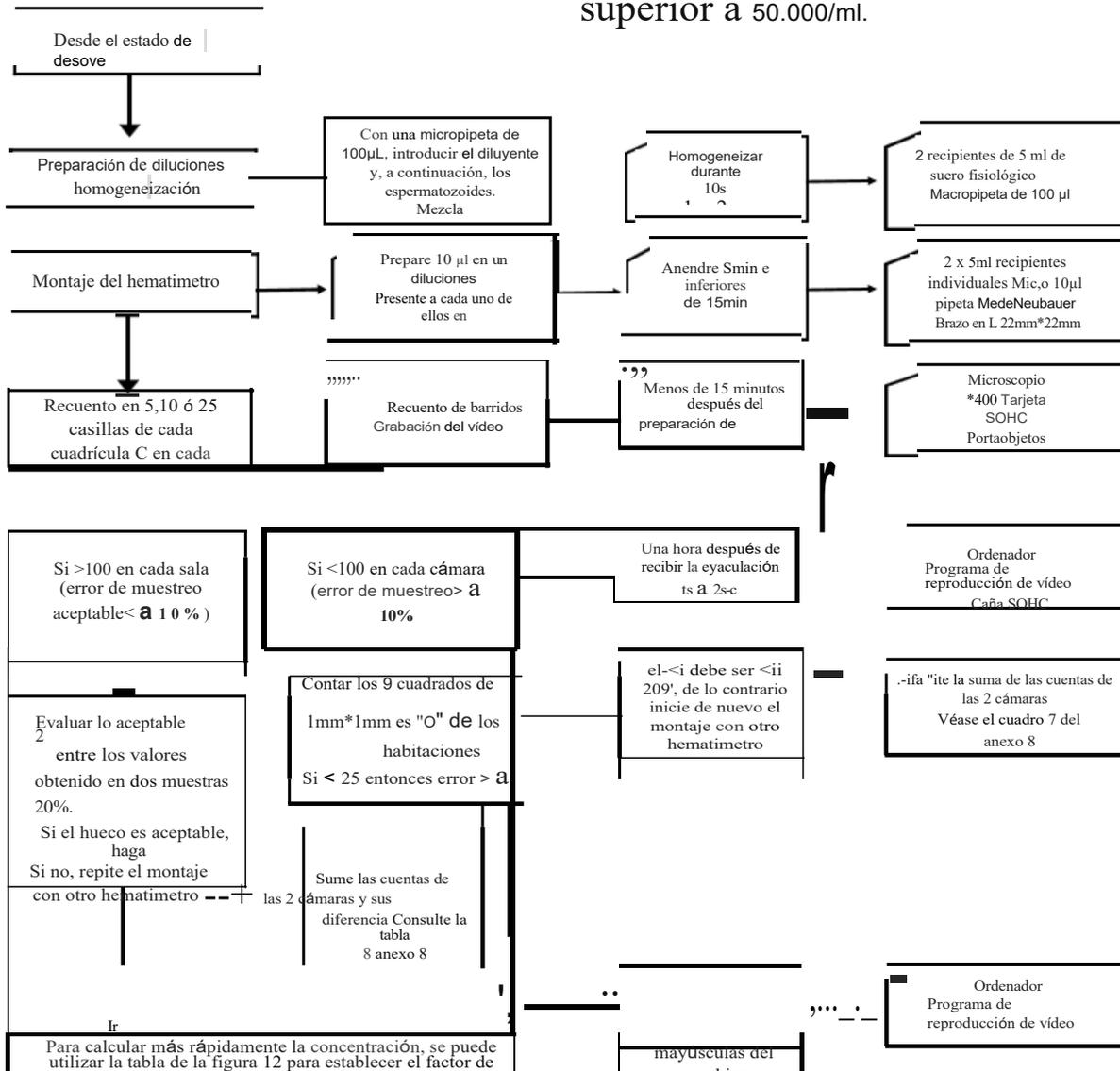


Figura 3: Campo de visión (exploración) para examinar toda la superficie del portaobjetos que cubre un volumen conocido de semen.

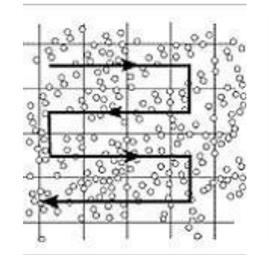


Figura 14 Recuento con concentración de células e/vee.

Número de espermatozoides por campo, factor de aumento 400	Dilución	Semen (µl)	Oiluant (µl)
Raro	1:2	100	100
Menos del 15	1:5	100	400
De 15 a 40	1: 10	50	450
De 41 a 200	1: 20	50	950
Más de 200	1: 50	50	2450

Figura 8: Diluciones adecuadas al-evaluación de la concentración en el hematimetro de Neubauer

Dilución	Nb., de cartCs en la rejilla C (de la sala ehaqllle) comoris en el comotae:c			todo el campo, toda la cuadrícula llamada • D>
	5	'10	25	
Di, factor de isión				
I : 2	20	40	100	900
1 : 5	8	16	40	360
I: 10	4	8	20	180
I: 20	2	4	10	90

Figura 12: Factores de división que deben aplicarse al número total de espermatozoides contados en las dos cámaras para calcular la concentración de fa (en x 10⁶/ml)

Índice

Material	5
Primeros pasos con el microscopio	6
Componentes del microscopio & Primera utilización del microscopio.....	6
Preparación del microscopio, enfoque, observación, almacenamiento del microscopio	8
Higiene y prevención de riesgos de exposición a fluidos biológicos.....	9
Esterilización con agua hirviendo.....	9
La entrevista	9
Lavado de manos con solución hidroalcohólica	10
Curso de acción	10
Datos teóricos sobre el espermiograma	11
Espermiograma.....	11
Datos que deben recuperarse	11
A título informativo	12
Valores de referencia según la guía OMS 2010.....	12
Variabilidad de la concentración dentro del mismo sujeto	13
Variabilidad de las características espermáticas en función del tiempo de abstinencia	14
Morfología del espermatozoide	15
Manipulación del semen y técnicas de preparación	16
Configuración estándar del hematímetro o de la célula de recuento de Neubauer.....	16
Licuefacción del eyaculado	17
Homogeneización del eyaculado	17
Preparación del estado fresco	17
Hematómetro Neubauer	18
Selección de la dilución adecuada para la evaluación de la concentración en el hematizador Neubauer	20
Evaluación de la concentración de esperma	21
Homogeneización y dilución del eyaculado	21
Montaje del hematímetro y sedimentación espermática.....	22
Evaluación de la concentración.....	22
Recuento de espermatozoides en cada una de las muestras preparadas.....	23
Comprobación de la aceptabilidad de las diferencias de medición entre muestras.....	26
Cálculo de la concentración.....	26
Límite de detección.....	27
Anexos	28
Tablas de diferencias aceptables entre muestras	28
Tablas de diferencias aceptables entre muestras.....	29
Bibliografía.....	30

Material

Tipo	Cantidad	Utilice	Coste total	Higiene
Toallita antiséptica	1 caja de 100	Un solo uso Material	4 €	No es estéril. Guardar en un lugar limpio, resguardado de la luz
Botella de agua estéril fisiológica	1 caja de 30 monodosis		8 €	
Compresas estériles	1 caja de 20 bolsas		4€	
Guantes de examen sin polvo	1 caja de 100		4€	
Lentes	1 caja de 30		8€	
Puntas estériles desechables	1 caja	Material reutilizable	10€	Esterilizar antes de usar y entre cada nuevo muestreo
Botella de alcohol de 70° modificada	1 botella de 200 ml		3€	
Hidroalcohólica solución	1 botella de 75 ml		3€	
Toma única para la colección de todo lo que la eyaculación	1 caja de plástico de 10 mL con tapa		5€	
Báscula digital con gramo precisión	1 nuevo		20€	
Recipientes sencillos para hacer los 2 diluidos muestras y el diluyente frasco salino	3 cajas de plástico de 5 ml		5€	
Laboratorio micro-pipeta que pueda contener 10 µl	1 de segunda mano		35€	
Laboratorio micro-pipeta que puede contienen 100 µl	1 de segunda mano		35€	
Cuchillas Profundidad de campo 0,1 mm Plus superficie cuadrados pequeños 0,0025 mm ²	2 células de recuento Neubauer con 100 cubreobjetos		22€	
Tarjeta SDHC	1 de 8 GB		7€	
	1 utilizado con SDHC			

Ordenador	lector de tarjetas y Reproducción de vídeo del programa VLC	50€
Microscopio	1 CEPILLO LCD de 8,9 cm (3,5") enseñanza microscopio, 50-500x, 2000 (digital)	189€
	Total	416€

El coste de la realización de un espermiograma no es despreciable. Es aconsejable poner en común la recogida de material para amortizar el coste económico. La recogida de todo el material puede servir a varios usuarios durante varios años.

Primeros pasos con el microscopio

Los componentes del microscopio & Primera manipulación del microscopio



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

Ten cuidado con tu microscopio sujetándolo con cuidado. Procura no poner los dedos en el ocular, que es muy sensible. Lo mismo se aplica al objetivo y a las preparaciones que vayas a observar para evitar que se ensucien e interfieran en la observación.

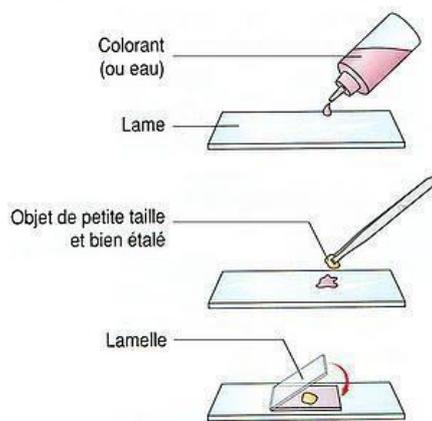
Evite los movimientos bruscos y, en su lugar, coja con cuidado el microscopio por el vástago, el mango o levantando la base. Encienda ahora la iluminación y póngala primero al máximo.

A continuación, abra completamente el diafragma para ajustar la intensidad de la luz. Por supuesto, estos ajustes pueden reajustarse en función de la observación que se vaya a realizar.

El tubo óptico también puede bajarse utilizando los tornillos macrométricos. Precaución:

Utiliza siempre primero el objetivo más pequeño.

Preparación del microscopio, enfoque, observación, almacenamiento del microscopio



La preparación consiste en un portaobjetos, un cubreobjetos y el pequeño objeto que se va a observar.

Coloque la preparación en la platina y proceda a la observación.

El objeto a observar se encuentra en el centro de la platina, a continuación, levante la platina lo más cerca posible de los objetivos. Tenga cuidado de que la hoja no se rompa.

Para enfocar a bajo aumento, mientras mira por el ocular, baje cuidadosamente la platina con el tornillo macrométrico hasta que el objeto a observar sea nítido. Para mejorar el enfoque, realice un ajuste con el tornillo micrométrico. A continuación, puede ajustar la iluminación cerrando o abriendo el diafragma poco a poco.

Fije la preparación con los gatos.

Utiliza los tornillos para moverte hacia delante y hacia atrás y hacia la derecha y la izquierda.

A continuación, puedes mirar tu objeto a través del ocular y cambiar la lente si es necesario. Por ejemplo, si el aumento no es suficiente, elija el objetivo de mayor aumento. A continuación, vuelva a enfocar con el tornillo pequeño.

Para calcular el aumento, multiplique el aumento del ocular por el aumento del objetivo.

Vuelva a colocar el microscopio en el objetivo más pequeño y abra de nuevo el diafragma al máximo. Limpie a fondo el microscopio, especialmente la platina, y elimine el polvo que pueda haberse depositado en las lentes. Para ello

utilice el papel para lentes previamente empapado en alcohol. Por último, baje el tubo óptico y coloque con cuidado el microscopio en su funda o estuche.

Para más información, visite:

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

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

El uso del microscopio requiere tiempo de adaptación para realizar observaciones de calidad.

Higiene y prevención de riesgos de exposición a fluidos biológicos

El equipo que utilice para recoger el semen debe esterilizarse o mantenerse como se indica:

- 1 Receptáculo individual
- 1 micropipeta de 3 ml
- 1 cubeta de recuento Neubauer con 1 cubreobjetos

Esterilización con agua hirviendo

Es el sistema más antiguo y sencillo:

- Coger una olla a presión o una cacerola grande.
- Llénalo tres cuartas partes de agua y hiévelo durante al menos un cuarto de hora, o llena un recipiente con 1/3 de agua del grifo y 2/3 de agua previamente calentada en un hervidor eléctrico.
- Sumerja el material en ella durante 5 minutos (puede deformarse después).
- Sácalo del agua con unas pinzas.
- Dejar secar sobre compresas estériles.

Mantenimiento

- Limpie suavemente con papel para lentes para eliminar cualquier resto de esperma o suciedad.
- Desinfectar con alcohol de 70° para limitar el riesgo de contaminación.
- Aclarar con agua para eliminar el desinfectante.

Lavado de manos con solución hidroalcohólica:



N.B. Si tiene que realizar un espermiograma a otra persona, tenga cuidado de no entrar en contacto con la piel. Utilice guantes cuando trabaje con esperma ajeno.

Curso de acción

Etapa 1: Preparación del material

Lávese las manos una vez preparado y esterilizado el equipo, Paso 2: Recogida de la eyaculación

Orinar antes de recoger.

Lavarse las manos con una solución hidroalcohólica. Desinfectar el pene con una toallita antiséptica.

Aclara el pene con la botella de agua fisiológica estéril para eliminar cualquier resto de desinfectante.

Seque el pene con una compresa estéril.

Lávese las manos con la solución hidroalcohólica. Abrir el recipiente

Realice la recogida de semen mediante masturbación en el recipiente estéril suministrado.

N.B. Es muy importante recoger todo el eyaculado, especialmente los primeros chorros, ya que contienen una mayor cantidad de esperma que el final del eyaculado. Si no se recoge parte del eyaculado, es mejor empezar de nuevo con un periodo de abstinencia de 3 días.

Sellar bien el recipiente

Lavarse las manos con agua y jabón o solución hidroalcohólica. Paso 3: Toma de muestras

y observaciones microscópicas y grabación en vídeo

Póngase los guantes para el muestreo con micropipeta, colocando una gota en el portaobjetos de Neubauer, colocación del cubreobjetos, lectura al microscopio y grabación en la tarjeta SDHC. Paso 4:

Limpieza del equipo

Mantén los guantes puestos cuando limpies material no estéril y esterilices material que haya estado en contacto con semen.

Paso 5: Recuento y capitalización de datos

Lávate las manos. Ya no hay riesgo de exposición al fluido biológico (semen). Coge la tarjeta SDHC e introdúcela en el ordenador. Realiza una primera lectura con vlc, luego comienza a contar. Una vez hecho esto, guarde el archivo en el ordenador u otro, nombrándolo de la siguiente manera: año_mes_día_nombre o apodo_D número de días desde DO_número de espermatozoides_M_ml, añadiendo la siguiente información si es necesario: patología en los 3 meses anteriores, episodios febriles, tratamiento actual, edad.

Sigue el protocolo y repítelo, es practicando como adquirirás los gestos y la técnica. Más allá del riesgo de exposición al líquido biológico, una higiene impecable es necesaria para evitar contaminar la muestra y tener una lectura de la mejor calidad.

Datos teóricos sobre el espermograma

Espermograma

Datos que deben recuperarse

Volumen: Cantidad de semen liberado, varía de 1,5 ml a 5 ml. El aspecto (color, viscosidad) y el Ph son datos de laboratorio. Utilizando una balanza de gramos, pese previamente el frasco antes de introducir el semen recogido. 1 ml de semen corresponde a 1 gramo, por lo que es fácil determinar el volumen recogido.

Recuento: Consiste en contar los distintos elementos presentes en el semen:

- Espermatozoides (millones/mL), la concentración de espermatozoides,
- Espermatozoides en todo el eyaculado (millones), es decir, el recuento de espermatozoides,
- Células redondas (espermátidas),
- Leucocitos,
- Glóbulos rojos,

La concentración espermática se obtiene dividiendo el recuento por el volumen del eyaculado.

En la actualidad, el único indicador del estado anticonceptivo de un hombre es el recuento de espermatozoides (millones/mL). El recuento se realiza con ayuda de la rejilla de lectura de portaobjetos de Neubauer contando todos los espermatozoides presentes, independientemente de su movilidad. Una vez realizado el recuento, a continuación se le explicará un sencillo cálculo que le dará una estimación de su recuento diario.

Es importante realizar al menos 2 recuentos en portaobjetos de Neubauer a partir de 2 gotas diferentes extraídas con la micropipeta, para comprobar la aceptabilidad de las diferencias de medición entre los distintos recuentos.

Para más información:

Movilidad: Incluye 4 categorías según el tipo de desplazamiento observado:

- Tipo A: progresivo, rápido, recto - Progresivo
- Tipo B: progresivo lento o en zigzag - Progresivo
- Tipo C: Movilidad in situ - No progresiva
- Tipo D: inmóvil

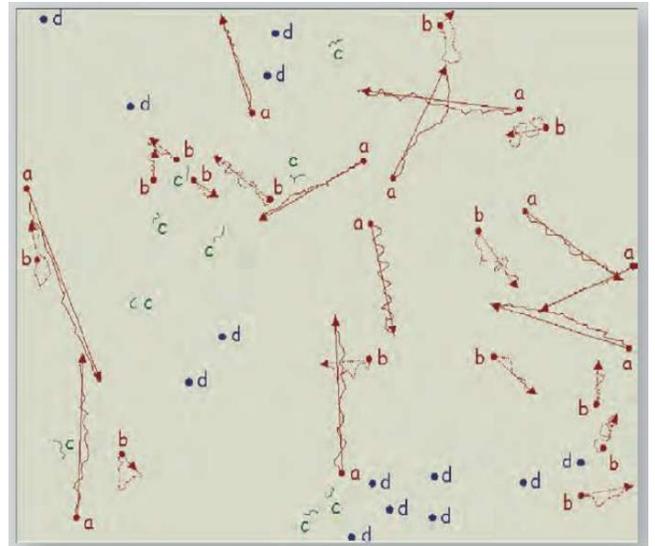
Según el número de espermatozoides contados, es interesante evaluar el porcentaje de los que son progresivos (A+B). No es imprescindible, pero recuerda que los progresivos tienen muchas posibilidades de fecundar el óvulo.

Vitalidad: Es el porcentaje de espermatozoides vivos 1 hora después de la emisión. Este examen se realiza con la ayuda de un medio de contraste.

Morfología espermática normal:

Existen diferentes categorías de anomalías:

- Anomalía de la cabeza (alargada, adelgazada, micro o macrocefálica, múltiple, irregular, acrosoma anormal o ausente).
- Anomalías citoplasmáticas (resto citoplasmático, pieza intermedia pequeña o engrosada, angulación)
- Anomalía del flagelo (ausente, acortado, de tamaño irregular, enrollado, múltiple, aislado).



Hay muchos más parámetros. Recuerde que sólo es necesaria la concentración (millones/mL). Ciertamente, la evaluación de la movilidad y la vitalidad pueden ser elementos interesantes de calcular, pero actualmente no son esenciales en la evaluación de su práctica de la LMC.

CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN	VALORES ESTÁNDAR	VALORES ESTÁNDAR EN ANTICONCEPCIÓN MASCULINA TÉRMICO (tras 3 meses de uso)
VOLUMEN	> 1,5 ml	> 1,5 ml
CONCENTRACIÓN	>15 millones/ml (umbral de infertilidad)	< 1 millón/ml (anticonceptivo umbral)
MÓVILES PROGRESIVOS (A+B)	> 32%	< 10%
VITALIDAD (MOVILIDAD UNA HORA DESPUÉS DE LA EYACULACIÓN)	> 58%	< 40%
MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA NORMAL	> 4%	< 4%

Variabilidad de la concentración dentro del mismo sujeto

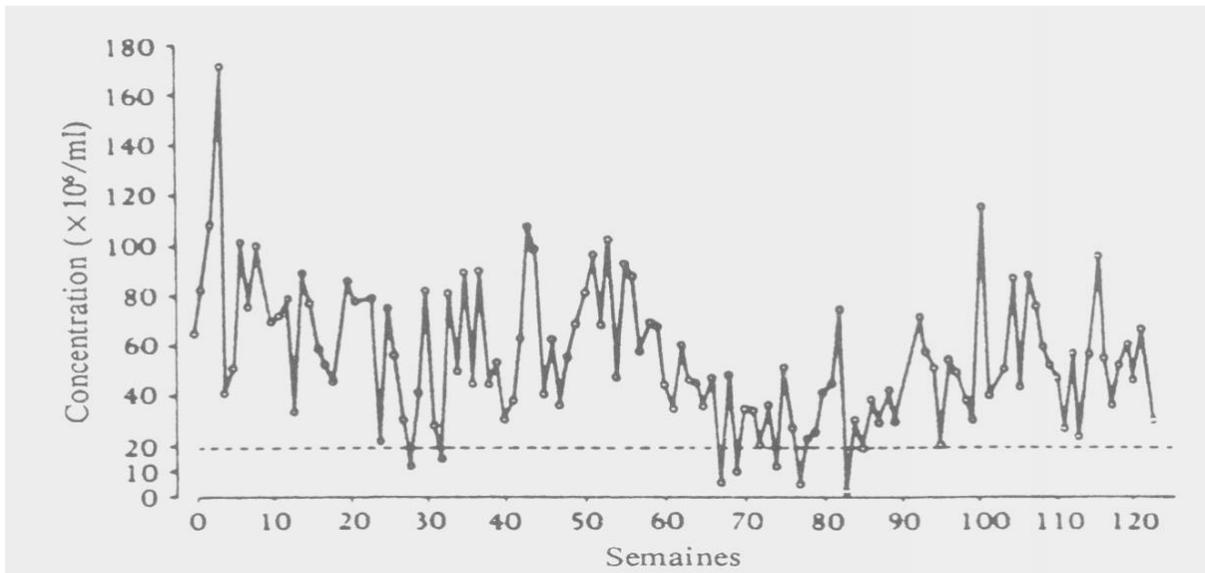


Figura 1 Concentración quincenal de espermatozoides en el mismo sujeto durante un período de 120 semanas. Durante este periodo, el sujeto no recibió ningún tratamiento y no se observaron episodios febriles (según Paulsen, OMS, 1992, datos inéditos).

Tenga en cuenta que su concentración puede variar mucho a lo largo de unos meses. Parámetros como la edad (especialmente por encima de los 50 años), una afección médica ocurrida en los 3 meses anteriores, un episodio febril, un tratamiento o el consumo de drogas pueden reducir la cantidad y la calidad de los espermatozoides. En todos los exámenes realizados a los hombres que practican el CMT, no se observaron

indicios de

tales variaciones. A saber, que un hombre por debajo de 1 millón/mL nunca ha estado por encima de Este umbral se alcanza si se sigue el protocolo CMT. Es probable que la espermatogénesis en reposo por CMT también conduzca a una reducción de la cantidad de variabilidad en la concentración.

Variabilidad de las características del espermatozoides en función del tiempo de abstinencia

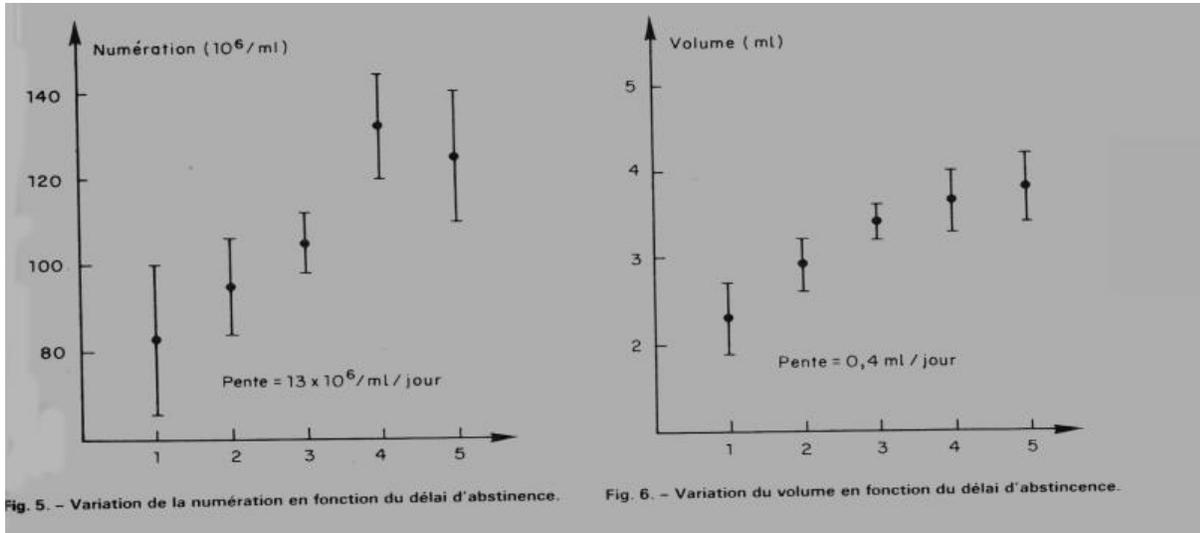
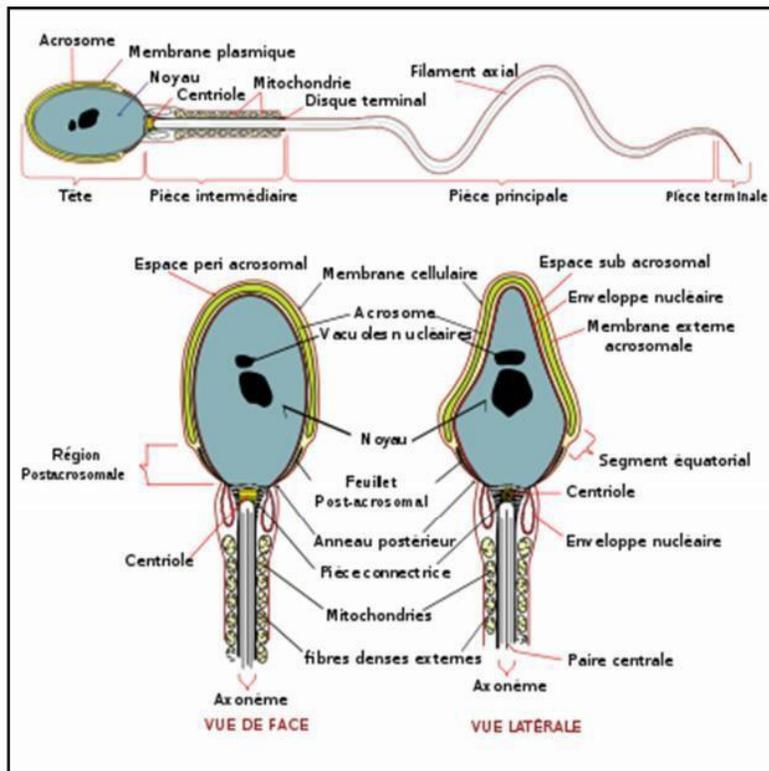


Figura 2 Variabilidad de las características del espermatozoides en función del tiempo de abstinencia, Paulsen, datos no publicados.

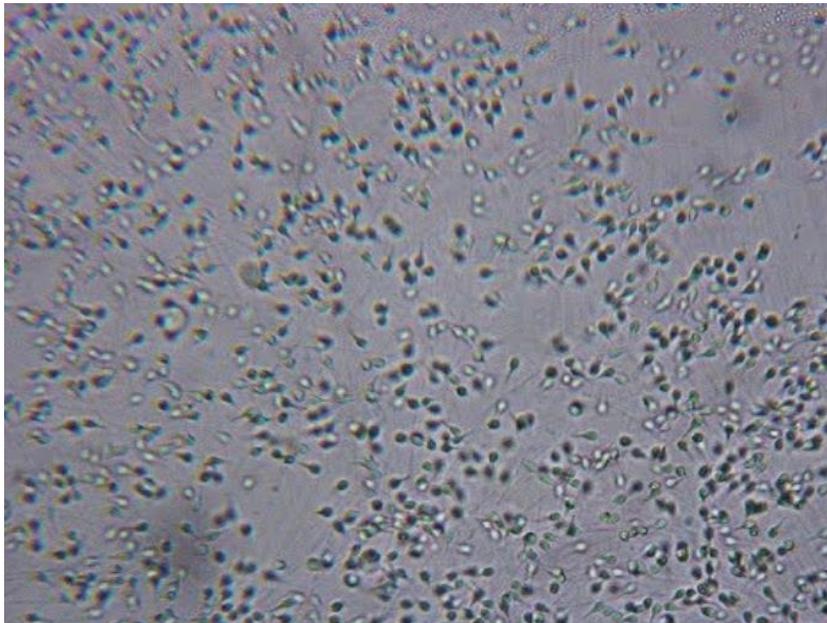
El periodo de abstinencia influye en la concentración y el volumen emitido. Por lo tanto, es importante respetar el periodo de 3 días.

Además, ciertas moléculas, tratamientos, patologías, la fiebre y la edad (sobre todo a partir de los 50 años) pueden reducir la cantidad y la calidad de los espermatozoides. Es importante tener en cuenta esta información al tomar la muestra y respetar el periodo de abstinencia de 3 días.

Morfología del espermatozoide



Lo que verá al microscopio sin la rejilla de recuento:



Lo que verá en el microscopio BRESSER LCD de 8,9 cm a *400 aumentos con parte de un cuadrado de rejilla de recuento Neubauer C-:

Ceci est un spermatozoïde



La identificación de los espermatozoides es bastante sencilla una vez que se conoce su forma característica.

Manipulación del semen y técnicas de preparación

Trabaje para esta parte con la micropipeta de laboratorio que puede contener 10 μ l.

Lo ideal es que el semen se conserve entre 15°C y 25°C, que puede ser la temperatura ambiente.

Puesta a punto estándar del hematímetro o de la célula de recuento de Neubauer :

- Coloque el cubreobjetos sobre el hematizador Neubauer y sitúelo en posición horizontal sobre la mesa, donde sea fácil manipular la micropipeta.
- Inserte una punta desechable en el extremo de la roseta.
- Ajuste la micropipeta (con capacidad para 10 μ l) para aspirar 10 μ l de líquido. Normalmente este ajuste se realiza guiando la perilla del émbolo para seleccionar el volumen deseado.
- Introduzca la punta de la propette en la muestra.
- Presione suavemente el émbolo hasta que llegue al final de su recorrido.

- Retire la punta de la pipeta de la muestra y manténgala en posición vertical para llevarla al hematímetro Neubauer.
- Coloque la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos situado en el extremo del hematizador Neubauer. La idea es dejar que el líquido penetre entre la placa y la tapa desde el lateral por capilaridad:
- Suelte el émbolo del documento mientras comprueba que el líquido entra correcta y uniformemente en el hematímetro.
- Si aparecen burbujas, o la tapa se ha movido, o cualquier otra anomalía, repita la operación.

A continuación, el hematizador Neubauer se monta y queda listo para la lectura microscópica.

Este procedimiento es válido cada vez que monte el hematímetro Neubauer de una muestra.

Licuefacción del eyaculado

De 15 a 30 minutos después de la eyaculación, lo ideal es esperar 30 minutos, pero puede tardar hasta 1 hora. Mientras

Si el eyaculado no está licuado, el movimiento de los espermatozoides, la homogeneidad de la muestra y la posibilidad de realizar buenas observaciones microscópicas se ven limitados. Un método sencillo para validar la licuefacción es utilizar una pipeta. Si el semen recogido en la pipeta fluye gota a gota, la licuefacción es completa, pero si el flujo es fibroso, viscoso, la licuefacción es incompleta.

Homogeneización del eyaculado

O bien girando el recipiente: Gire el recipiente en círculos con la muñeca durante 15 a 20 segundos.

O con una micropipeta: Aspirar y expulsar suavemente la muestra (unas diez veces) con la pipeta teniendo cuidado de evitar la formación de burbujas.

Preparación del estado fresco

Introducción de la muestra de 10 μ l en la placa Neubauer

Bajo el microscopio, el eyaculado fresco debe examinarse rápida y sistemáticamente (movimiento de barrido) para evitar que la preparación se seque.

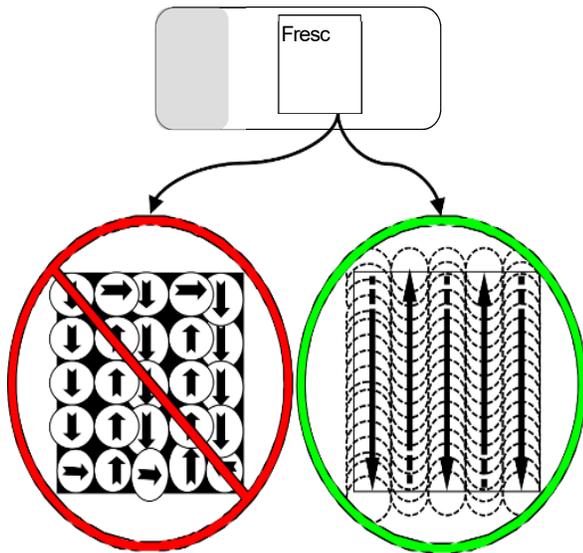


Figura 3 Desplazamiento del campo de visión (barrido) para examinar toda la superficie del portaobjetos cubriendo un volumen conocido de esperma.

Si el número de espermatozoides por campo varía considerablemente, la muestra no es homogénea. Debe desecharse la preparación y hacerse una nueva, prestando especial atención a la homogeneización. El examen del semen fresco deberá iniciarse tan pronto como los elementos celulares del Los espermatozoides han dejado de desplazarse entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

Microscópicamente, también se valida la licuefacción de la preparación de semen fresco. La presencia de corrientes viscosas indica que la licuefacción es incompleta y puede comprometer el recuento. La observación de corrientes viscosas, como se muestra en la fotografía, es delicada. Utilice la técnica del goteo para verificar la licuefacción.

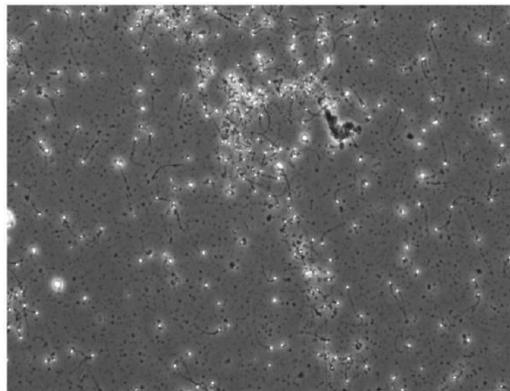


Figura 4 Corrientes viscosas visibles al microscopio que muestran una licuefacción incompleta del semen.

Hematómetro de Neubauer

El hematímetro de Neubauer sigue siendo la cámara de recuento de referencia para evaluar manualmente la Este es el único método de concentración espermática que se describirá en esta guía.

El hematímetro de Neubauer consta de dos cámaras de recuento separadas, cada una de las cuales comprende un área de recuento de 3 mm x 3 mm subdividida en 9 cuadrados de 1 mm x 1 mm, cada

uno de los cuales consta de cuadrados de tamaño conocido (véanse las figuras 5 y 10). Se utiliza con un cubreobjetos colocado sobre

un soporte incorporado para obtener una extensión de espesor constante de 0,1 mm. Multiplicando el área de un cuadrado por el grosor de la extensión, puede obtenerse el volumen de espermatozoides en ese cuadrado y calcularse la concentración dividiendo el número de espermatozoides contados en un volumen conocido (concentración = número/volumen).

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

Los espermatozoides deben contarse en diferentes secciones de la zona de recuento, en función de la dilución realizada y del número de espermatozoides que deban contarse por muestra.

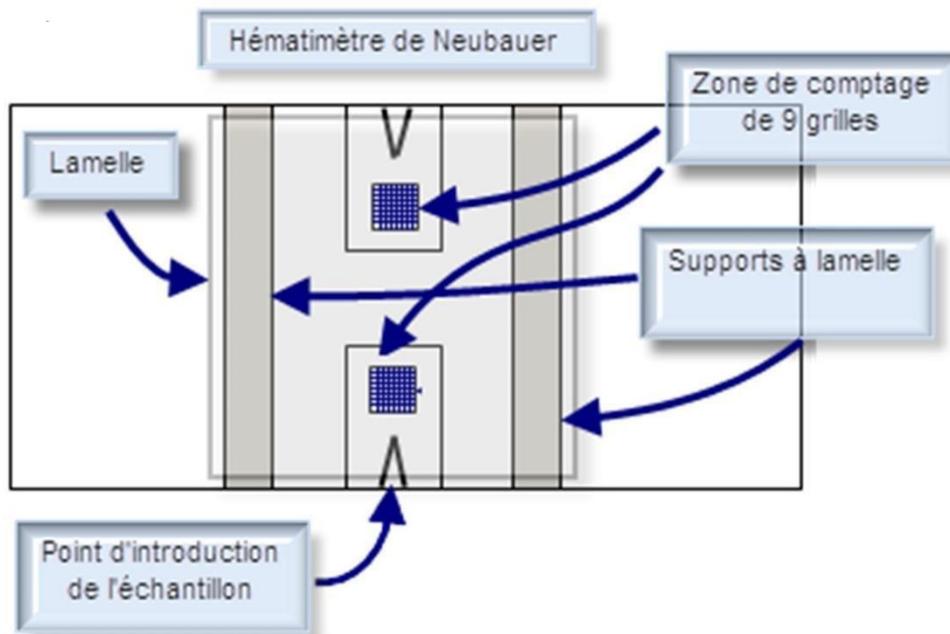


Figura 5 Hematómetro Neubauer, vista

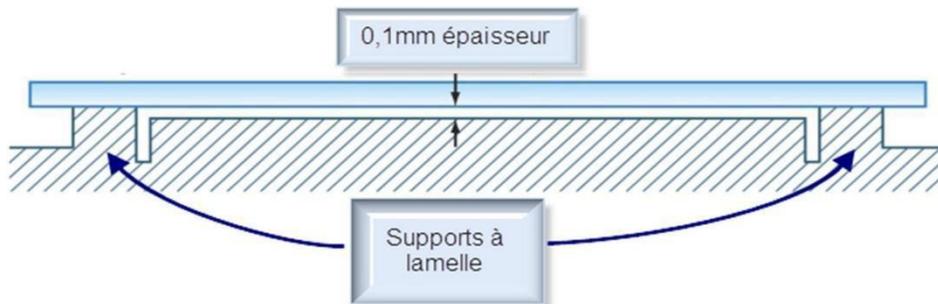


Figura 7 Hematómetro de Neubauer, vista lateral.

Selección de la dilución adecuada para la evaluación de la concentración en el Neubauer

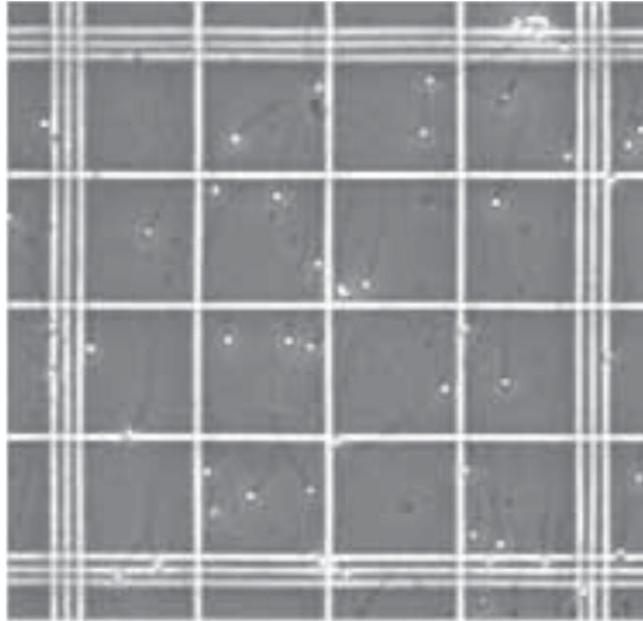


Figura 8 Una de las 25 casillas de la zona central de recuento de la cuadrícula C, subdividida en otras 16 casillas y delimitada por 3 líneas paralelas.

El semen examinado en el hematizador Neubauer debe diluirse por las siguientes razones:

- Inmovilizar los espermatozoides,
- Favorecer el esparcimiento por capilaridad bajo el cubreobjetos haciendo que el semen sea menos viscoso,
- Facilitan el recuento cuando los espermatozoides son muy numerosos y se superponen,
- Facilitan la enumeración cuando la muestra contiene muchos residuos.

El número de espermatozoides por campo, evaluado en 10 μ l de semen fresco extendido bajo un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm, guía la elección de la dilución adecuada para el montaje del hematizador Neubauer (tabla de la figura 9) con el objetivo de contar al menos 100 espermatozoides por muestra. La dilución se realiza con solución salina.

Nbre de spermatozoides par champ, facteur de grossissement de 400	Dilution	Sperme (μ l)	Diluant (μ 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 Diluciones adecuadas para la evaluación de la concentración en el hematizador Neubauer.

Evaluación de la concentración de esperma

Trabaje para esta parte con la micropipeta de laboratorio que puede contener 100 μ l.

La concentración se refiere al número de espermatozoides, expresado en millones, en un mililitro ($n^{\text{bre}} \times 10^6$ /ml) de eyaculado.

Cabe señalar que si la concentración de espermatozoides es inferior a $1,0 \times 10^6$ /ml, la pertinencia de puede cuestionarse la evaluación de la vitalidad y la morfología. Se considera aceptable una precisión del 20% para límites inferiores a $1,0 \times 10^6$ /ml. Errores entre 20% y 30% son comunes con este método de recuento debido al manejo de la micropipeta, errores estadísticos por tener una muestra no representativa, errores en el volumen de la muestra realmente introducida en la placa, etc.

Homogeneización y dilución del eyaculado

Debido a la naturaleza viscosa del semen y al volumen relativamente pequeño de las muestras diluidas, es esencial homogeneizar bien el semen antes de tomar el volumen deseado para la dilución. Las dos cámaras de recuento del hematizador Neubauer permiten el recuento de dos muestras separadas del eyaculado. Para reducir el riesgo de error, las dos muestras se diluyen por separado, en dos tubos diferentes (es decir, las dos cámaras de recuento no se llenan con muestras de la misma dilución, ni se realiza el recuento dos veces en la misma cámara, de lo contrario no se detectarían los errores de muestreo, homogeneización o dilución).

Las diluciones pueden realizarse en tubos limpios de 5 ml (vidrio o plástico). Coloque primero el diluyente y luego el semen en el tubo de dilución. Antes de transferir el líquido o el semen al tubo de dilución, limpie el exterior de la propette, teniendo cuidado de no tocar la abertura de la punta para no absorber ningún líquido con el papel. Para recoger todo el semen, enjuagar la punta de la pipeta en el diluyente (solución salina) aspirando y expulsando varias veces.

Si hay un retraso entre la preparación de la dilución y el montaje del hematizador, deben tomarse precauciones para evitar la evaporación.

Montaje del hematímetro y sedimentación de espermatozoides

Mezclar bien la primera dilución agitando durante unos 10 segundos o con una pipeta. Tomar inmediatamente 10 µl de la dilución y llevar la punta de la propette hasta el punto de introducción del hematímetro sin tocar el portaobjetos. Tenga cuidado de no sobrecargar ni levantar el cubreobjetos, de lo contrario cambiará el grosor de la extensión.

Retirar con la segunda dilución en la segunda cámara. Manipule suavemente el hematímetro para evitar que se mueva el portaobjetos y déjelo en posición horizontal.

Deje que el esperma se asiente a temperatura ambiente durante al menos 4 minutos, pero no más de 15 minutos, ya que de lo contrario la preparación se secará y la concentración de esperma será mayor.

Evaluación de la concentración

Recuerde que deben realizarse al menos 2 recuentos en 2 cámaras a partir de dos gotas diferentes de la muestra.

Ausencia de espermatozoides en el semen fresco

Si no se observan espermatozoides tras el examen del portaobjetos completo.

Menos de 500 espermatozoides en semen fresco

Si se cuentan menos de 500 espermatozoides en el examen de todo el portaobjetos o en los 9 cuadrados C, anotar el número de espermatozoides observados en 10 µl de semen fresco (sin diluir).

Si el semen fresco se extiende sobre el portaobjetos siguiendo las instrucciones y el

Si el portaobjetos está completo, la concentración por ml puede estimarse de la

siguiente manera: Un espermatozoide observado = 100 espermatozoides/ml =

0,0001 x 10⁶/ml = 100 espermatozoides/ml. Ejemplo: si se observan 2 espermatozoides en 10 µl de semen, la concentración es de 200 espermatozoides/ml.

El umbral de 500 espermatozoides se estableció del siguiente modo: como la presencia de 1 espermatozoide en un portaobjetos de 10 µl equivale aproximadamente a 100 espermatozoides por ml, la presencia de 500 espermatozoides en el mismo portaobjetos corresponde a una concentración de 50.000 espermatozoides por ml. El método hematológico presentado tiene un límite de detección de 56.000 espermatozoides por ml. Por lo tanto, el umbral de 500 espermatozoides en 10 µl permite evaluar la concentración, incluso por debajo del límite de detección del hematómetro.

Al menos 500 espermatozoides en semen fresco

En cuanto se alcancen los 500 espermatozoides en el portaobjetos de 10 µl, debe detenerse el recuento de espermatozoides. No informe el número de espermatozoides en este portaobjetos y proceda inmediatamente al recuento hematológico. Sólo se informará el resultado del recuento hematológico.

Recuento de espermatozoides en cada una de las muestras preparadas

Proceda al recuento sin demora ni interrupción en cuanto haya transcurrido el tiempo límite de 4 minutos y no más allá de 15 minutos de espera.

Se acepta que la evaluación de 100 espermatozoides por muestra y, por tanto, un error del 7,1% son suficientes para garantizar la calidad del análisis.

El recuento se realiza con un aumento total de 200 o 400.

La decisión de contar o no un espermatozoide depende de la posición de su cabeza, independientemente de la orientación del flagelo. El límite de un cuadrado es la línea central de las tres líneas paralelas a lo largo de sus lados. El espermatozoide se cuenta si la mayor parte de su cabeza se encuentra entre las dos líneas interiores del borde de tres líneas. No se cuenta si la mayor parte de su cabeza se encuentra entre las dos líneas exteriores del borde de tres líneas.

Si la mayor parte de la cabeza del espermatozoide se encuentra en la línea central, sólo se contarán los espermatozoides que toquen los bordes de dos lados del cuadrado, por convención los lados izquierdo e inferior (figura 9), para evitar contar dos veces el mismo espermatozoide en cuadrados adyacentes.

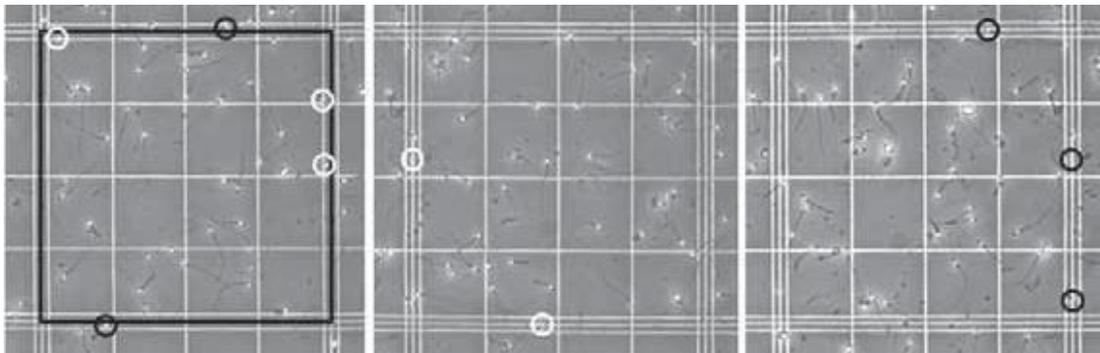


Figura 10 Espermatozoides que deben contarse en un cuadrado de la cuadrícula C (delimitado por un borde de 3 líneas).

Para contar los espermatozoides que tocan los bordes de la cuadrícula, véanse las explicaciones anteriores. Los espermatozoides marcados en negro no se cuentan, mientras que los marcados en blanco sí se cuentan.

Contar los espermatozoides en 5, 10 ó 25 cuadrículas C (véanse las figuras 10 y 11) hasta contar al menos 100 espermatozoides (máximo de 25 cuadrículas, se alcancen o no los 100 espermatozoides). Pasar a la segunda cámara de recuento del hematizador y contar los espermatozoides en el mismo número de cuadrículas C (es decir, el mismo volumen) que para la primera muestra, aunque el número final de espermatozoides contados sea inferior a 100. Cada cuadrícula C tiene un volumen de al menos 100 espermatozoides. Cada cuadrícula C tiene un volumen de 4×10^{-6} ml.

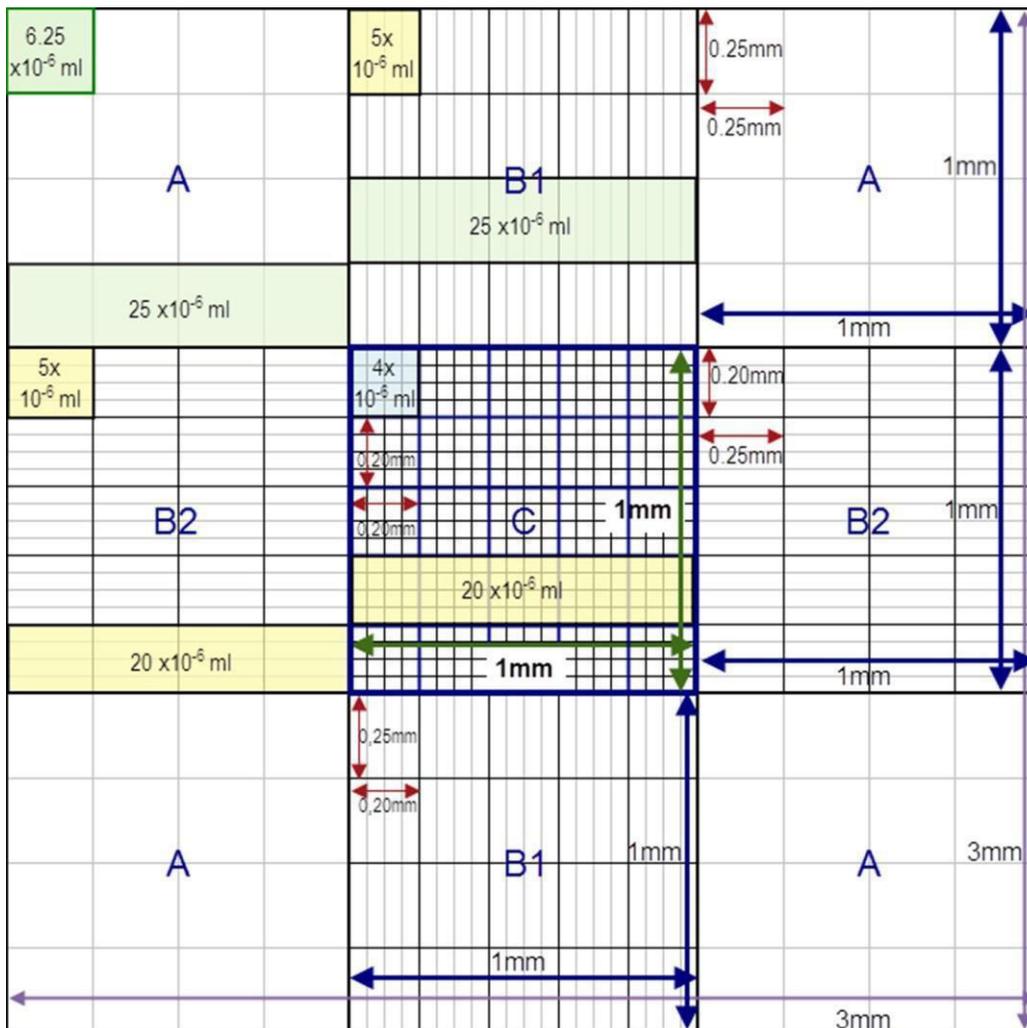


Figura 11 Zona de recuento de la cámara del hematómetro Neubauer.

Si la concentración de células es muy alta, es fácil perderse en el recuento, por lo que se utiliza una secuencia de recuento en zigzag, como se describe en las figuras 7 y 12.

- Anota en una hoja los resultados del número de células contadas en el primer recuadro.
- Repita el proceso para los demás fotogramas que desee contar, anotando el resultado de cada uno. Cuantos más fotogramas cuentes, más precisa será la medición.

Esto representa todo el campo o cuadrícula que llamaremos

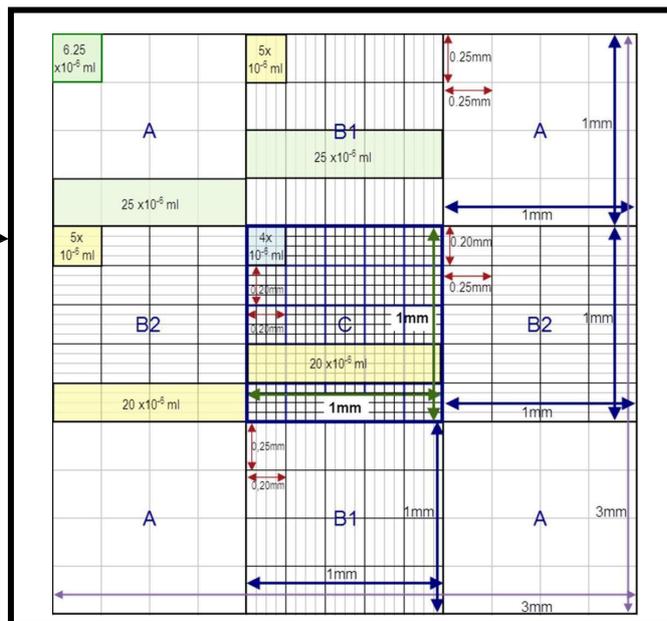


Figura 12 Zona de recuento del

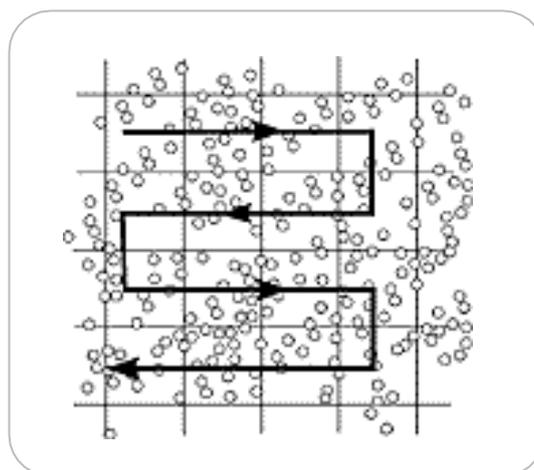


Figura 13 Recuento con alta concentración de células.

Sin embargo, si se cuentan menos de 100 espermatozoides por muestra 1:2, el error de muestreo será mayor y el grado de certeza menor. En este caso, deberán examinarse los 9 cuadrados de 1 mm x 1 mm de las 2 cámaras de recuento (véase la figura 11) para intentar alcanzar un error de muestreo aceptable (20%).

Calcular la suma de los dos recuentos (por ejemplo, 1ª muestra: 75 espermatozoides en los 9 cuadrados de 1 mm x 1 mm; 2ª muestra 70 espermatozoides en 9 cuadrados de 1 mm x 1 mm de la segunda cámara, total 145).

Véase el Cuadro 1 del Apéndice para obtener información sobre el porcentaje de error de muestreo en función del número de espermatozoides contados; si es inferior al 20%, el error de muestreo se considera aceptable.

Comprobación de la aceptabilidad de las diferencias de medición entre muestras

Calcular la suma y la diferencia de los dos recuentos (por ejemplo, 1ª muestra: 126 espermatozoides en 10 cuadrículas C; 2ª muestra 134 espermatozoides en 10 cuadrículas C de la segunda cámara, total 260. Diferencia entre los dos recuentos: 8).

Establezca la aceptabilidad de la diferencia entre las cifras consultando la Tabla 2 del Apéndice.

Ejemplo. Para 260 espermatozoides, la diferencia aceptable es de 32; la diferencia obtenida aquí, 8, al ser inferior a 32, es aceptable y podemos proceder al cálculo de la concentración.

Si la diferencia es demasiado grande para ser aceptada, se recomienda repetir ambas diluciones, teniendo cuidado de homogeneizar el semen en cada etapa, y repetir el recuento. Repetir este procedimiento hasta dos veces (tres series de dos muestras). Si la diferencia sigue siendo demasiado grande después de tres tandas (el eyaculado es particularmente viscoso y heterogéneo), hacer una media de las seis cifras obtenidas.

Cálculo de la concentración

La concentración de espermatozoides (C) es igual al número (N) de espermatozoides dividido por el volumen (V) de semen en el que se han contado, multiplicado por el factor de dilución (D).

Por ejemplo:

- D = 20 (dilución 1:20).
- N = 260 (1ª cámara = 126, 2ª cámara = 134).
- V = 10 cuadrados (x 2 muestras) de 4×10^{-6} ml cada uno, con un total de 80×10^{-6} ml.
- C = $(N/V) \times D$ ($260/80 \times 10^{-6}$) $\times 20 = 65 \times 10^{-6}$ por ml.

Dilution	N ^b re de carrés de la grille C (de chaque chambre) compris dans le comptage			En todo campo, todo el cuadrícula llamada "
	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 división que deben aplicarse al número total de espermatozoides contados en ambas cámaras para calcular la concentración (en $\times 10^{-6}/ml$).

Para calcular más rápidamente la concentración, puede consultarse la tabla de la figura 12 para establecer el factor de división que debe aplicarse en función del número de cuadrados incluidos en el recuento y de la dilución efectuada.

Volvamos al ejemplo anterior:

- $N = 260$ (2 salas)
- Factor de división = 4 (intersección de la columna de 10 cuadrados y la fila de dilución 1:20)
- $N/\text{Factor de división} = C$
- $260/4 = 65$
- $C = 65 \times 10^6/\text{ml}$

Límite de detección

El método propuesto tiene un límite de detección de 56.000 espermatozoides por ml (para que el error de muestreo no supere el 20%). Por lo tanto, este método es inexacto si hay menos de 25 espermatozoides por cámara de recuento (total de 50 espermatozoides).

Anexos

Tablas de diferencias aceptables entre muestras

El cuadro 1 sirve para calcular el error de muestreo en función del número de espermatozoides contados en el hematómetro.

Tabla 1. Error de redondeo (%) por recuento total de espermatozoides

(núTmot bael r)	Smp(%) error	(núTmot bael r)	Smp(%) error	(núTmot bael r)	Smp(%) error
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

¹ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Manual de laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento del semen humano, Quinta edición, Ginebra, OMS, 2010.

Ejemplo: se cuentan 100 espermatozoides en cada cámara del hematizador. Según la Tabla 7, el error de muestreo es del 7,1% por cada 200 espermatozoides.

Tablas de diferencias aceptables entre muestras

El cuadro 2 sirve para establecer la aceptabilidad de la diferencia en el número de espermatozoides contados en dos muestras de hematología.

Tabla 2. Diferencia aceptable entre los valores obtenidos en dos muestras, teniendo en cuenta el número total de espermatozoides

Total	Diferencia	Total	Diferencia	Total	Diferencia
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

*Basado en un intervalo de confianza redondeado del 95%.

¹ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Manual de laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento del semen humano, Quinta edición, Ginebra, OMS, 2010.

Ejemplo : Primera muestra : 126 espermatozoides; segunda muestra: 134 espermatozoides, con un total de 260. Diferencia de 8.

Según el cuadro 8, para un total de 260 espermatozoides, la diferencia debe ser igual o inferior a 32. Por tanto, la diferencia de 8 es aceptable.

Bibliografía

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, Quinta edición, Ginebra, OMS, 2010.

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE NORMALIZACIÓN *ISO15189:2012(E) Laboratorios para Biología médica - Requisitos de calidad y competencia*, tercera edición (versión corregida 2014-08-15), Ginebra, ISO, 2012.

MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX. *Conformidad de los laboratorios médicos con la norma CAN/CSA-15189 "Laboratoire d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence"*. 2005-03-21.

ORDEN PROFESIONAL DE TECNÓLOGOS MÉDICOS DE QUEBEC. *Calidad en la laboratorios de biología médica: Règles de pratique*, segunda edición, Montreal, OPTMQ, 2009.

ASOCIACIÓN CANADIENSE DE NORMALIZACIÓN. *CAN/CSA-Z15190 Laboratorios médicos - Requisitos de seguridad*. Mississauga: Asociación Canadiense de Normalización, 2005.

GRUPO CSA. *Z316.7-12 Instalaciones de recogida de muestras primarias y laboratorios médicos - Seguridad del paciente y calidad de la atención - Requisitos para la recogida, el transporte y el almacenamiento de muestras*, Mississauga, CSA Group, Actualización n.º 1 de marzo de 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*, septiembre de 1994, Vol. 77, nº 9.

CHRISTENSEN, P., et al. "Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers", *Theriogenology*, marzo de 2005, Vol. 63, nº 4.

HAMAMAH, S. y BARTHELEMY, C. Espermograma y pruebas de fertilidad: Interés y limitaciones.

JTA Capítulo V- Fertilidad e infertilidad masculina.

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

Cooper, T.G., et al. "Azoospermia: ¿Realidad virtual o posible de cuantificar?". *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*,

