

SEMINOGRAMA

La realización de un seminograma puede ir asociado o no a la utilización de la muestra para una técnica de reproducción asistida (TRA). Tanto para diagnóstico, como para su utilización en otras técnicas se realizará un análisis de los parámetros principales de un seminograma por lo que el estudio realizado pasará a denominarse: Análisis seminal para TRA.

1. Preparación previa:

Las muestras necesitan ser procesadas en un medio de cultivo atemperado, por lo que en el protocolo de preparación de laboratorio se incluye un tubo de medio IVF que se pondrá en el incubador de trabajo el día anterior a la preparación del seminograma.

2. Recogida:

Antes de proceder a la obtención de la muestra el paciente debe leer y rellenar la hoja de recogida que se incluye en el Anexo III (Plantillas del Laboratorio de Andrología). Después de obtener la muestra debe completar todas las preguntas del cuestionario.

El bote de recogida de muestra será entregado junto con una pegatina en la que el paciente debe anotar su nombre completo y la fecha.

Posteriormente deberá comprobarse que el nombre es claramente legible, que ha contestado el cuestionario por completo y que está firmado.

Cuando el paciente obtiene la muestra fuera del centro es necesario que previamente haya recibido tanto la hoja de recogida donde están las instrucciones de recogida, como el bote con la pegatina. La hoja debe ser revisada para comprobar que esté perfectamente cumplimentada una vez se recibe la muestra.

La muestra seminal se obtiene por masturbación y será siempre recogida en un bote estéril de dimensiones adecuadas para facilitar la obtención.

Una vez obtenida la muestra el personal encargado de recogerla hará las comprobaciones necesarias y dejará la muestra en el baño térmico del laboratorio de andrología junto con la hoja de recogida.

3. Evaluación de la muestra:

El envase está situado sobre un baño térmico que se encuentra a una temperatura de 37° hasta la preparación. Una vez anotados los datos necesarios, la hoja de recogida será archivada en el registro correspondiente.

La muestra se prepara lo antes posible una vez se ha producido la licuefacción, un mínimo de 15 minutos después de la recogida y nunca por encima de una hora.

Se pasa la muestra completa a un tubo Falcon de 15ml previamente rotulado con el nombre completo, fecha y procedimiento a realizar y se realiza primero la evaluación inicial macroscópica y posteriormente la evaluación inicial microscópica anotando todos los valores en la hoja correspondiente:

Evaluación inicial macroscópica:

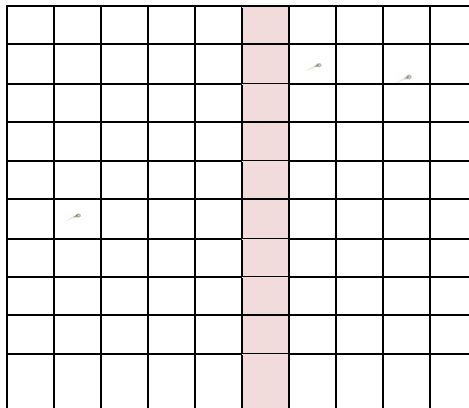
- Licuefacción: el grado de licuefacción se analiza mediante observación visual y se anota como completa o incompleta. Pueden encontrarse grumos, hilos de moco y masas gelatinosas que pueden dificultar el análisis. Se considera anormal una muestra que no se ha licuado pasados 60 minutos, en ese caso se puede intentar diluir la muestra o pasarla por una aguja con un calibre 18-19.
- Viscosidad: Determinación visual. Se considera una viscosidad anormal cuando al dejar caer la muestra gota a gota con una pipeta pasteur aparece un filamento de más de 2cm. La viscosidad elevada puede afectar la determinación de todos los factores a estudiar en la muestra por lo que las muestras serán tratadas de la misma forma que en el caso de las muestras no licuadas.
- pH: para determinar el pH se utilizan tiras reactivas de pH 6.0-10. Hay que comprobar la tira antes de 30 segundos.

El límite inferior de referencia es 7,2

- Apariencia: Se observa visualmente. La apariencia de una muestra normal es: homogénea y gris opalescente. Se pueden encontrar distintos colores que podrían ser sintomáticos de alguna patología y por tanto deben ser anotados:
 - Traslúcido: podría indicar una baja concentración de espermatozoides.
 - Marrón pardo: presencia de sangrado en el tracto genital en las horas o días previos.
 - Rojizo: presencia de hematíes que indican un sangrado en el momento de la obtención de la muestra.
 - Amarillento: puede ser indicativo de ictericia, presencia de ciertas vitaminas o una elevada abstinencia (altos niveles de flavonoides oxidados procedentes de las vesículas seminales).
- Volumen: Se mide con una pipeta pasteur de plástico.

Evaluación inicial microscópica:

- La evaluación microscópica se realiza en un microscopio de contraste de fases anotando todos los datos en la hoja correspondiente.
- Antes de empezar es necesario homogeneizar bien la muestra para su correcta visualización.
- Primero se realiza una observación a 100x para evaluar la presencia de:
 - Agregaciones: adherencia de espermatozoides móviles o inmóviles a células no espermáticas o detritos sin significancia clínica. No son específicas.
 - Aglutinaciones: espermatozoides móviles unidos a otros espermatozoides móviles. Sí son específicas por lo que podrían tener significancia clínica. Se anotará en caso de que sea elevada (>50 spz unidos) o muy elevada (todos los spz aglutinados).
 - Células no espermáticas: su identificación puede tener relevancia clínica por lo que es necesario anotar la presencia de estas células



cuando resulta significativa. Se dividen en:

- Células epiteliales
 - Células redondas: células germinales inmaduras y leucocitos.
- VITALIDAD: Se determina mediante tinción con eosina en una preparación seminal en un portaobjetos con 5µl de eosina preparada para la tinción y 5µl de muestra, mezclando y tapando con el cubreobjetos.
El límite inferior de referencia para la vitalidad es del 58%.
- CONCENTRACIÓN: Posteriormente se pone una gota de 10µl muestra en una cámara Makler para medir la concentración mediante el conteo de al menos dos filas de la cuadrícula situada en el centro de la cámara. El número de espermatozoides de una fila corresponde con los millones de espermatozoides de la muestra por mililitro:

El límite inferior de referencia para la concentración es de 15 mill/ml

- MOVILIDAD: En primer lugar se hace una preparación de la muestra de semen en un portaobjetos colocando una gota de 10µl y un cubreobjetos de 22x22 a 400 aumentos (objetivo de 40x).

La movilidad se determina con un contador de células hematopoyéticas contando entre 100 y 200 espermatozoides en varios campos de la muestra.

Siguiendo el Manual de la OMS 2010 se anotan los datos de movilidad diferenciando entre:

- Espermatozoides inmóviles (IM): Espermatozoides que no se mueven
- Espermatozoides con movilidad progresiva (PR): Espermatozoides que se desplazan. Engloba a los espermatozoides de movilidad A+B de los anteriores manuales de la OMS.
- Espermatozoides con movilidad no progresiva (NPR): Espermatozoides que se mueven pero no avanzan.

El límite inferior de referencia para la movilidad total se sitúa en el 40% y para la movilidad progresiva es un 32%

- MORFOLOGÍA: La morfología también se observa a 400 aumentos (objetivo de 40x), contando un número entre 100 y 200 espermatozoides y determinando el porcentaje de espermatozoides sin alteraciones encontrados con un contador de células hematopoyéticas.

El límite inferior de referencia para la morfología es del 4%

PRINCIPALES PARÁMETROS DIAGNÓSTICOS DEL SEMINOGRAMA	
Parámetro	Límites inferiores de referencia OMS 2010
Volumen (ml)	1.5
Concentración (mill/ml)	15
Número spz (mill/eyaculado)	39
Motilidad (% spz móviles)	40 (a+b+c)
Movilidad progresiva	32 (a+b)
Morfología (% spz normales)	4
Vitalidad (% spz vivos)	58
Leucocitos (mill/ml)	<1.0

4. Diagnóstico:

- Aspermia: ausencia de semen. Valorar la posibilidad de eyaculación retrógrada.
- Astenozoospermia: porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite de referencia.
- Azoospermia: No aparece ningún espermatozoide en el eyaculado ni en la muestra procesada y resuspendida. Puede ser de dos tipos: secretora o excretora. En cualquiera de los casos la indicación es realizar una biopsia de testículo. En los casos en los que el volumen seminal es muy bajo hay que valorar la posibilidad de que exista una eyaculación retrógrada.
- Criptoospermia: No se observan espermatozoides en el eyaculado pero sí en la muestra resuspendida por lo que la concentración de espermatozoides es muy baja.
- Hemospermia: presencia de eritrocitos en el eyaculado.
- Leucospermia: presencia de leucocitos en el eyaculado por encima del valor umbral.
- Necrozoospermia: Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.
- Normozoospermia: número total de espermatozoides (o concentración), porcentaje de espermatozoides móviles y espermatozoides con morfología normal igual o por encima del límite inferior de referencia.
- Oligozoospermia: número total de espermatozoides (o concentración) por debajo del límite de referencia.
- Teratozoospermia: porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite de referencia.

También podemos encontrar distintas combinaciones dependiendo de la patología observada:

- Astenoteratozoospermia
- Oligoastenozoospermia
- Oligoteratozoospermia
- Oligoastenoteratozoospermia

5. Capacitación espermática y REM (recuento de espermatozoides móviles):

La capacitación espermática es la preparación del semen para ser utilizado en las distintas TRA. Tiene como objetivo seleccionar los espermatozoides de mejor movilidad en un medio de cultivo. Puede realizarse mediante Swin Up (Anexo I. Protocolos de Andrología) como por gradientes de concentración (WHO, 2012).

El REM es el recuento de espermatozoides móviles que se realiza sobre la muestra capacitada.

Procedimiento:

- a. Poner 1 ml de muestra en un tubo Falcon previamente rotulado para realizar el análisis. En muestras frescas se diluye con medio IVF en una proporción 1:1, y en muestras congeladas se diluye en una proporción 2:1 (IVF:Muestra) para eliminar con mayor seguridad la presencia del crioprotector.
- b. Se mezcla todo en el tubo Falcon con una pipeta pasteur de plástico comprobando que la muestra queda completamente homogeneizada.
- c. Centrifugar la muestra 10 minutos a 1.200 rpm.
- d. Retirar el sobrenadante con una pipeta pasteur de cristal.
- e. Se añade una cantidad determinada de medio IVF dejándolo caer por la pared del tubo cuidadosamente. El volumen de medio que se añade varía en función del objetivo de la capacitación:
 - Valoración del REM para seminograma e inseminación artificial: Se añade 350 µl de IVF.
 - Fecundación in vitro (FIV) o microinyección espermática (ICSI): Se añade una cantidad variable entre 150µl y 350µl dependiendo de la concentración de la muestra en fresco.
- f. Se deja la muestra durante un tiempo mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente sobre el baño térmico para que los espermatozoides móviles puedan migrar hacia la fase de medio IVF.
- g. Después del periodo de incubación se recoge el sobrenadante, donde se sitúan los espermatozoides móviles, que se visualiza como una fase intermedia de color blanquecino cuando hay bastante concentración. En caso de no visualizarse una nube de espermatozoides se recoge la fase más cercana al pellet. Es importante que en este proceso el pellet quede intacto

- para que los espermatozoides inmóviles no se mezclen con los espermatozoides de buena movilidad.
- h. Este medio con espermatozoides móviles se deposita en un tubo de 5ml previamente rotulado con los mismos datos anotados en el tubo Falcon donde se sitúa la muestra.
 - i. Se prepara la cámara Makler con una gota de esta muestra recuperada para determinar la concentración de espermatozoides con buena movilidad.
 - j. Se determina el valor del REM que se puede dar de dos formas:
 - a. $\text{Concentración del REM (mill/ml)} = \text{Movilidad} \times \text{concentración de espermatozoides (mill/ml)}$
 - b. $\text{REM (millones)}: \text{REM (mill/ml)} \times \text{volumen de la muestra (ml)}$
 - k. Se anotan los datos del REM en los formularios indicados para cada caso.
 - l. En caso de que la muestra vaya a ser utilizada en alguna TRA se mantiene a temperatura ambiente sobre el baño térmico hasta que sea utilizada.
 - m. Al finalizar la valoración del seminograma + REM debemos anotar los resultados obtenidos en la Hoja de análisis seminal y en la historia clínica del paciente.

6. Registros

- a. Documento “Hoja de recogida de muestra”: Se archiva en la carpeta que se encuentra en el área de gestión.
- b. Documento “Hoja de análisis seminal para TRA”: Se anotan todos los datos del análisis y se archiva en la carpeta “Seminograma” que se encuentra en el área de gestión.
- c. Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en su historia clínica.

7. Anexos

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del Laboratorio de Andrología.

CONGELACIÓN DE SEMEN

1. Preparación del material:

1. Antes de la preparación de la muestra es necesario atemperar el crioprotector al menos durante 30 minutos en la cabina a temperatura ambiente.
2. La muestra se recoge según el mismo procedimiento utilizado para los seminogramas.
3. Si el objetivo de la congelación es preservar la fertilidad se congelarán mínimo 3 pajuelas. Si la muestra congelada será utilizada en el ciclo en curso se congelarán 1 ó 2 pajuelas para utilizar en el ciclo próximo en función de la calidad seminal. Además de las pajuelas para congelar, se utilizará una pajuela extra para realizar la prueba de descongelación.
4. Antes de comenzar con la congelación, las pajuelas deben ser convenientemente rotuladas con el nombre completo del paciente y la fecha.

2. Procesado de la muestra:

1. Realizar un análisis de la muestra en fresco y anotar en la hoja de congelación de muestra seminal los datos del paciente, la fecha de la congelación y las características de la muestra (volumen, concentración, vitalidad, morfología...).
2. Poner el volumen de semen necesario en un tubo Falcon de 15 ml y diluirlo con el crioprotector en una proporción 3:1.
3. Homogeneizar la dilución antes de cargar las pajuelas.
4. Para cargar las pajuelas se utiliza una jeringa y una aguja de insulina. Se introduce la aguja por el extremo cerrado de la pajuela y una vez enganchada la jeringa se introduce el otro extremo de la pajuela en la muestra. Se absorbe la mayor cantidad de muestra posible dejando siempre un margen de aire de aproximadamente 2cm en el extremo inferior para que el semen no se desborde al expandirse por el frío.
5. Las pajuelas cargadas se guardan a en la nevera 4°C durante 30 min.
6. Después se depositan en vapores de nitrógeno líquido durante otros 30 min.
7. Posteriormente se introducen en nitrógeno líquido y se guardan en su ubicación final.
8. Los datos del análisis seminal además de ser anotados en la hoja de congelación, se apuntan en la base de datos informatizada (Sara).
9. La ubicación en donde se han guardado las pajuelas se apunta junto con el diagnóstico y el número de pajuelas en la hoja Excel de semen congelado, en la hoja de congelación en papel y en la base de datos.

3. Prueba de descongelación:

1. Se descongela la pajuela cargada para realizar la prueba de descongelación como se describe en el Anexo I (Protocolos de Andrología).
2. En caso de mala supervivencia espermática se comunicará al médico correspondiente para informar al paciente.

4. Registros:

1. Documento “Hoja de congelación de muestra seminal”: Se archiva en la carpeta “Semen congelado” que está en el área de gestión.
2. Documento Excel “Semen Congelado”: Se anota en el Excel que se encuentra en: carpeta Laboratorio de andrología/ Registros/Congelación de semen.
3. Historia clínica informatizada: Se anota la congelación, la calidad de la muestra y la prueba de descongelación

5. Anexos

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del Laboratorio de Andrología.