



## Instructivo para el procesamiento de espermatobioscopias

Código: I-FQUI-LAC-08

Revisión:16

Página: 1 de 9

Fecha de emisión:5/enero/2009

Fecha de modificación: 14 de marzo de 2024

### 1.-OBJETIVO

Analizar muestras biológicas de espermatozoides obtenidas de usuarios que acuden al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Química UADY recolectadas en condiciones adecuadas para su procesamiento.

### 2.- ALCANCE

Aplica a muestras biológicas de semen, que cumplan con las condiciones para el procesamiento de la espermatobioscopia.

### 3.- DESCRIPCIÓN DE LA OPERACIÓN

Para el procesamiento de Espermatobioscopías, el químico responsable de realizar el análisis deberá:

1. Portar la bata de laboratorio, así como material de protección y guantes.
2. Registrar los datos del usuario (nombre, edad), número de orden de la muestra, fecha y hora de recolección y motivo del análisis en el formato para Espermatobioscopia código F-FQUI-LAC-06

Para el procesamiento de Espermatobioscopías, el usuario deberá cumplir los siguientes criterios de aceptación:

1. Cumplir como mínimo, con tres a cuatro días de abstinencia sexual previos al estudio.
2. Realizar un aseo del área genital previo a la recolección de la muestra biológica.
3. Recolectar la muestra mediante masturbación en un frasco limpio y estéril, debidamente identificado con el nombre del usuario, fecha y hora de recolección de la muestra.

Se rechazará la muestra para el análisis cuando el usuario tenga:

1. Abstinencia menor a 3 días y mayor a 4 días.
2. Muestras recolectadas con coito interrumpido o en condones comerciales.

En caso de que la muestra no pueda ser recolectada en el laboratorio deberá ser transportada y recepcionada en un tiempo no mayor a 30 minutos.

- En caso de requerir análisis microbiológicos (espermocultivo), la muestra puede ser derivada al área de microbiología hasta 3 horas después de ser obtenida.

## PASOS PARA EL ANÁLISIS DE ESPERMATOBIOSCOPIAS

### EXAMEN MACROSCÓPICO

**Se recomienda realizar dentro de los 5 minutos posteriores a la recolección:  
Medir volumen y permitir el inicio de licuefacción.**





### Instructivo para el procesamiento de espermotobioscopias

Código: I-FQUI-LAC-08

Revisión:16

Página: 2 de 9

Fecha de emisión:5/enero/2009

Fecha de modificación: 14 de marzo de 2024

**Volumen.** - Se refiere a la cantidad de muestra y se obtiene pesando un frasco desechable que le será proporcionado al paciente para recolectar la muestra. Una vez que el paciente ha recolectado la muestra, el frasco se vuelve a pesar, el volumen de la muestra se calcula con la diferencia entre ambos pesajes. El volumen se reporta en mL. (se asume que la densidad del semen es de 1 g/mL).

**Entre 30 y 60 minutos posteriores a la recolección se recomienda:**

**Evaluar el tiempo de licuefacción, viscosidad, color, olor y el pH, realizar las preparaciones en fresco para evaluar movilidad, vitalidad y la dilución para el cálculo de la concentración espermática. Así mismo, se realizan los extendidos para evaluar morfología.**

1. **Tiempo de licuefacción.** Tiempo normal alrededor de 30 minutos a 37 °C. Si la licuefacción no está completa a los 30 minutos se debe anotar y se mantiene la muestra por 30 minutos más a 37°C.

NOTA: La muestra de esperma normal puede contener cuerpos gelatinosos que no se licuan. La presencia de moco puede interferir en el análisis. Una vez licuada la muestra, se debe mezclar suavemente con un movimiento rotatorio para reducir el error en la determinación de la concentración espermática.

2. **Color** - Las muestras deben ser evaluadas a temperatura ambiente. Una muestra normal tiene una apariencia homogénea, un color blanco opalescente a gris amarillento. En el caso en los que existe leucocitos, se observa un color amarillo intenso. El rojo indica hemospermia (sangre) y puede ser consecuencia de neoplasia o un traumatismo en los conductos seminales. Un color verdoso está relacionado con infección de *Pseudomonas*.
3. **pH.** - Medir el pH de la muestra con tiras indicadoras del pH.
4. **Viscosidad.** – Este se realiza con una pipeta de transferencia desechable aspirando una pequeña cantidad de muestra dejando caer gota a gota por gravedad. La viscosidad se reporta como normal cuando se da un goteo libre de la muestra, una viscosidad anormal se reporta cuando las gotas forman un filamento mayor a 2cm.

## ANÁLISIS MACROSCÓPICO

### Movilidad

Para el análisis de la movilidad espermática, se dispensan 50 uL de semen en un portaobjetos, se le coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio óptico a 40x para evaluar la motilidad de los espermatozoides.





**Instructivo para el procesamiento de espermotobioscopias**

Código: **I-FQUI-LAC-08**

Revisión: **16**

Página: **3 de 9**

Fecha de emisión: **5/enero/2009**

Fecha de modificación: **14 de marzo de 2024**

Se realiza un conteo de 200 células en un área de la preparación montada que estén al menos 5 mm del borde del cubreobjeto. Los espermatozoides se clasifican en 4 categorías:

- Movilidad progresiva rápida: movimiento activo (>25  $\mu\text{m/s}$ ) en línea recta o grandes círculos, cubriendo una distancia de 25  $\mu\text{m}$  ( o 1/2 de la longitud de la cola) en un segundo.
- Movilidad progresiva lenta: movimiento activo (engre 5 y 25  $\mu\text{m/s}$ ) en línea recta o grandes círculos cubriendo una distancia de entre 5 y 25  $\mu\text{m}$  (menos de 1/2 de la longitud de la cola o el tamaño de la cabeza).
- No progresiva: (< 5  $\mu\text{m/s}$ ) se presentan con movimientos de cola con ausencia de progresión o con movimientos circulares pequeños o lineales con una distancia menor a 5  $\mu\text{m/s}$  (longitud de una cabeza).
- Inmóviles: sin movimiento de cola.

Este conteo se realiza por duplicado utilizando dos preparaciones.

Se calculan los porcentajes y con el grupo dominante (inmóviles o móviles) se calcula el promedio entre ambos conteos para determinar si el conteo es aceptable comparando la diferencia entre los conteos. (ver tabla 1).

Average (%)	1	2-3	4-6	7-9	10-13	14-19	20-27	28-44	45-55	56-72	73-80	81-86	87-90	91-93	94-96	97-98	99
Acceptable difference	2	3	4	5	6	7	8	9	10	9	8	7	6	5	4	3	2

**Tabla 1:** Diferencias aceptables entre los dos porcentajes para el promedio obtenido de dos conteos de 200 espermatozoides

**NOTA:** Si en el conteo de 200 espermatozoides no se obtiene alguno de los tipos de movimiento se debe continuar hasta obtener un valor de todos los tipos de movimientos.

**Prueba de Vitalidad**

Esta prueba se realiza utilizando eosina, ya que este colorante tiñe solo células muertas.

En un portaobjetos colocar 10  $\mu\text{L}$  de la muestra y 10  $\mu\text{L}$  de colorante eosina (puede ser preparado o usar el reactivo spermavit) Se mezcla con un aplicador de madera y se coloca un cubreobjetos.

Se observa al microscopio óptico en aumento de 40X y se realiza un conteo de 200 espermatozoides clasificándolos como vivos (no teñidos) y muertos (teñidos). Se reporta en porcentaje en el formato





**Instructivo para el procesamiento de espermotobioscopias**

Código: **I-FQUI-LAC-08**

Revisión: **16**

Página: **4 de 9**

Fecha de emisión: **5/enero/2009**

Fecha de modificación: **14 de marzo de 2024**

**Recuento de espermatozoides**

Se recomienda realizar un conteo de todos los espermatozoides presentes en un campo observado a 40x. Esto se realiza en 3 campos. Se obtiene un promedio de los conteos realizados y se realizan dos diluciones de acuerdo con la tabla 2

Spermatozoa per x400 field	Spermatozoa per x200 field	Dilution	Ejaculate (µl)	Fixative (µl)
> 200	> 800	1 : 50 (1 + 49)	50	2 450
40-200	160-800	1 : 20 (1 + 19)	50	950
16-40	64-160	1 : 10 (1+ 9)	50	450
2-15	8-64	1 : 5 (1 + 4)	50	200
< 2	< 8	1 : 2 (1 + 1)	100	100

**Tabla 2.-** Volúmenes finales de las diluciones para realizar el conteo.

El conteo se realiza en cámara de Neubauer utilizando ambas cámaras (cada cámara se llena con una dilución). Una vez que se carga la muestra, se deja reposar por 10 minutos en una cámara húmeda (se recomienda que sea en cámara de Petri con papel o gasa humedecido).

Se busca realizar un conteo de 200 espermatozoides por cámara.

Se realiza un primer conteo en el cuadro superior izquierdo del cuadrante central de la cámara de Neubauer para decidir cuantos cuadros se van a contar de acuerdo a lo siguiente:

- < 10 espermatozoides en el primer cuadro: contar todo el cuadrante central (25 cuadros grandes)
- 10 -40 espermatozoides en el primer cuadro: contar 10 cuadros grandes
- 40 espermatozoides en el primer cuadro: contar 5 cuadros (las esquinas y el centro).

NOTA: Si al finalizar el conteo en los cuadros sugeridos no se obtiene los 200 espermatozoides se debe extender el conteo a los cuadrantes siguientes.

Una vez finalizado el conteo de las 200 células se anota el número de cuadros en los que se hizo el conteo y se realiza el conteo en la segunda cámara con el mismo número de cuadros con los que se hizo el primer conteo (no importa si no se llega a los 200 espermatozoides).

Para asegurar que el conteo es aceptable se debe: sumar y realizar la diferencia entre ambos conteos y se compara con los datos obtenidos en la tabla 2.3 del manual de OMS (ver tabla 4). Si la diferencia es mayor que la permitida se realizan nuevas alícuotas y se repiten los conteos.

Una vez que se han aceptado los valores se procede a calcular **concentración espermática** utilizando la siguiente formula





**Instructivo para el procesamiento de espermotobioscopias**

Código: **I-FQUI-LAC-08**

Revisión: **16**

Página: **5 de 9**

Fecha de emisión: **5/enero/2009**

Fecha de modificación: **14 de marzo de 2024**

$C = N / F$  donde C: concentración espermática (en millones/mL), N: Sumatoria de los dos conteos y F: factor de corrección de acuerdo a la tabla 3

Se calcula también el total de **espermatozoides por eyaculación**. Esto se obtiene multiplicando la concentración espermática por el volumen del eyaculado. Se reporta en millones por eyaculación.

Dilution	Number of large squares counted in each chamber			Number of grids counted in each chamber							
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9
	Correction factor values										
1 : 2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800	900
1 : 5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360
1 : 10	4	8	20	40	60	80	100	120	140	160	180
1 : 20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1 : 50	0.8	1.6	4	8	12	16	20	24	28	32	36

Tabla 3 para el cálculo de la concentración espermática a partir del cálculo espermático.

**Morfología espermática**

Se debe evaluar la morfología espermática para conocer los posibles defectos cabeza, porción media y cola que pudieran presentar los espermatozoides. Para realizar esto se debe: Preparar el frotis colocando una gota del semen (10 uL para conteos de >20 millones o 15 uL si son conteos de < 20 millones) y dejar secar al aire.

Teñir la muestra siguiendo las indicaciones de los colorantes a utilizar (por ejemplo espermaform)

Una vez teñida la muestra se observa a 100x y se realiza un conteo de 200 espermatozoides señalando los normales, los defectos de cabeza, cuello y pieza media, defectos de flagelo y los que tiene exceso de residuo citoplasmico. Los espermatozoides normales y los defectos se reportan en porcentaje.

**\* Se recomienda verificar el manual de OMS en su 6 edición para evaluar la morfología de los espermatozoides**

PARA UNA MAYOR DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS SE RECOMIENDA REVISAR EL MANUAL DE LA OMS





**Instructivo para el procesamiento de espermatobioscopias**

Código: **I-FQUI-LAC-08**

Revisión: **16**

Página: **6 de 9**

Fecha de emisión: **5/enero/2009**

Fecha de modificación: **14 de marzo de 2024**

Table 2.3 Comparison of difference between replicate counts and relation to uncertainty of result

Range of sums	Limit difference	Error of final result based on number of observations
969-1000	61	3.2%
938-968	60	3.3%
907-937	59	3.3%
876-906	58	3.4%
846-875	57	3.4%
817-845	56	3.5%
788-816	55	3.6%
760-787	54	3.6%
732-759	53	3.7%
704-731	52	3.8%
678-703	51	3.8%
651-677	50	3.9%
625-650	49	4.0%
600-624	48	4.1%
576-599	47	4.2%
551-575	46	4.3%
528-550	45	4.4%
504-527	44	4.5%
482-503	43	4.6%
460-481	42	4.7%
438-459	41	4.8%
417-437	40	4.9%
396-416	39	5.0%
376-395	38	5.2%
357-375	37	5.3%
338-356	36	5.4%
319-337	35	5.6%

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition

Range of sums	Limit difference	Error of final result based on number of observations
301-318	34	5.8%
284-300	33	5.9%
267-283	32	6.1%
251-266	31	6.3%
235-250	30	6.5%
219-234	29	6.8%
206-218	28	7.0%
190-205	27	7.3%
176-189	26	7.5%
163-175	25	7.8%
150-162	24	8.2%
138-149	23	8.5%
126-137	22	8.9%
115-125	21	9.3%
105-114	20	9.8%
94-104	19	10.3%
85-93	18	10.8%
76-84	17	11.5%
67-75	16	12.2%
59-66	15	13.0%
52-58	14	13.9%
44-51	13	15.1%
38-43	12	16.2%
32-37	11	17.7%
27-31	10	19.2%
22-36	9	21.3%
17-21	8	24.3%
13-16	7	27.7%
10-12	6	31.6%
7-9	5	37.8%
5-6	4	44.7%
3-4	3	57.7%
2	2	70.7%
1	1	100.0%

Tabla 4. Tabla de comparación de diferencias aceptables para el conteo celular.





**Instructivo para el procesamiento de espermotobioscopias**

Código: **I-FQUI-LAC-08**

Revisión: **16**

Página: **7 de 9**

Fecha de emisión: **5/enero/2009**

Fecha de modificación: **14 de marzo de 2024**

**4.- DOCUMENTOS DE REFERENCIA**

Código	Nombre del documento	Lugar de almacenamiento
MGC-FQUI-01	Manual de Gestión de la Calidad	Sharepoint
N/A	NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 Protección ambiental- Salud ambiental – Residuos Peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo	En línea
N/A	Manual de laboratorio para la examinación y procesamiento del semen humano de la OMS 6ª edición 2021.(en inglés).	En línea.

**5.- CONTROL DE REGISTROS**

Identificación	Nombre del registro	Lugar de almacenamiento	Responsable de su protección	Tiempo de retención	Disposición de los registros
F-FQUI-LAC-06	Espermotobioscopía	Uroanálisis y Coproanálisis	Responsable de área	1 año	Archivo muerto
F-FQUI-LAC-24	Formato para el registro diario de la temperatura del refrigerador	LACSC	Responsable de área	1 año	Impreso
F-FQUI-LAC-52.	Control y preservación de reactivos	Uroanálisis y Coproanálisis	Responsable de área	1 año	Electrónico
F-FQUI-LAC-98	Bitácora de mantenimiento y uso diario de contadores celulares	Uroanálisis y coproanálisis	Responsable de área	1 año	electrónico
F-FQUI-LAC-103	Bitácora de uso y mantenimiento de microscopios	Uroanálisis y Coproanálisis	Responsable de área	1 año	Electrónico
F-FQUI-LAC-107	Bitácora de uso y mantenimiento de micropipetas	Uroanálisis y Coproanálisis	Responsable de área	1 año	Electrónico





**Instructivo para el procesamiento de espermatobioscopias**

Código: **I-FQUI-LAC-08**

Revisión: **16**

Página: **8 de 9**

Fecha de emisión: **5/enero/2009**

Fecha de modificación: **14 de marzo de 2024**

**6.- GLOSARIO**

**6.1 .- SIGLAS**

**UADY.** Universidad Autónoma de Yucatán.

**LACSC.** Laboratorio de Análisis Clínicos de Servicio a la Comunidad.

**g.** Fuerza Centrifuga Relativa también llamada Gravedades.

**rpm** Revoluciones por minuto

**6.2 .- DEFINICIONES**

**Muestra biológica.** Parte anatómica o fracción órganos o tejido, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano o animal vivo o muerto para su análisis.





**Instructivo para el procesamiento de espermotobioscopias**

Código: I-FQUI-LAC-08

Revisión:16

Página: 9 de 9

Fecha de emisión:5/enero/2009

Fecha de modificación: 14 de marzo de 2024

**7.- CONTROL DE REVISIONES**

Nivel de revisión	Sección y/o página	Descripción de la modificación y mejora	Fecha de modificación
<b>11</b>	Pág. 9	Cambio de responsable sanitario.	9 de mayo de 2018
<b>12</b>	Todo el documento	Cambio de redacción en todo el documento Cambio de fecha de caducidad de la solución de resorcina de 3 a 6 meses.	06 de junio 019
<b>13</b>	Todo el documento	Revisión ortográfica. Cambio de responsable sanitario Cambio de director	27 de enero 2022
<b>14</b>	Pág. 2	Se actualizo la medición del volumen de muestra	28 de noviembre 2022
<b>15</b>	Pág. 1,5	Se actualizó la referencia del manual OMS, se modificó las condiciones de abstinencia para la realización del estudio	16 de marzo 2023
<b>16</b>	Sección 3	Se actualizó la descripción de la operación de acuerdo a la 6 edición del manual de la OMS	14 de marzo de 2024

**Nota: Ésta sección será utilizada a partir de la primera modificación a este documento. La revisión 00, se mantendrá en blanco.**

**Elaboró**

\_\_\_\_\_  
QFB Giovanni J. Xool Castellanos  
Responsable del área de Uroanálisis  
y Coproanálisis

**Revisó**

\_\_\_\_\_  
EBC Ricardo May Castillo  
Responsable sanitario

**Aprobó**

\_\_\_\_\_  
M en C. Amilcar Aguilar González  
Director de la Facultad de Química

