

mática la plataforma de enfermedades recesivas a pacientes que se sumen a los programas de donación de gametas. Esto permite aumentar la tasa de detección de mutaciones en enfermedades de alto impacto.

Debemos ofrecer otra herramienta en el *matching* donante-receptor para disminuir el riesgo de enfermedades recesivas en niños nacidos a partir de estos tratamientos.

REFERENCIAS

1. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine -a primer. N. Engl. J. Med. 2002; 347:1512-20.
2. Emery A, Rimoin DL. Principles and Practice of Medical Genetics. 5° Ed. Nueva York: Churchill Livingstone; 2007.
3. Kumar P, Radhakrishnan J, Chowdhary MA, Giampietro PF. Prevalence and patterns of presentation of genetic disorders in a pediatric emergency department. Mayo Clin. Proc. 2001; 76:777-83.
4. Costa T, Sriver CR, Childs B. The effect of Mendelian disease on human health: a measurement. Am. J. Med. Genet. 1985; 21:231-42.
5. Edwards JG, Feldman G, Goldberg J, et al. Expanded carrier screening in reproductive medicine-points to consider: a joint statement of the American College of Medical Genetics and Genomics, American College of Obstetricians and Gynecologists, National Society of Genetic Counselors, Perinatal Quality Foundation, and Society for Maternal-Fetal Medicine. Obstet. Gynecol. 2015; 125:653-62.
6. Tayo BO, Teil M, Tong L, et al. Genetic background of patients from a university medical center in Manhattan: implications for personalized medicine. PLoS One. 2011; 6:e19166.
7. Begoña E, Ruano B, Dulín E. Prevalencia de enfermedades recesivas frecuentes en población española mediante análisis de ADN en muestras del cribado neonatal. Med. Clin. 2005; 125(13):493-5.
8. Rivera-García C, Bristow SL, Yarnall S, Kumar N, Rodríguez S, De Veaux N, et al. Validation of a multiplex genotyping platform using a novel genomic database approach. Genet. Med. doi:10.1038/gim.2015.101.
9. Pérez MM, Luna MC, Pivetta OH, Keyeux G. CFTR gene analysis in Latin American CF patients: heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. J. Cyst. Fibros. 2007; 6(3).
10. Oller de Ramírez AM, Ghio A, Melano de Botelli M, Dodelson de Kremer R. Molecular diagnosis of cystic fibrosis in 93 Argentinean patients and detection of heterozygotes in affected families. Impact on health services and therapeutic advances. Arch. Argent. Pediatr. 2008; 106(4):310-9.
11. Nausbaum, McInnes and Willard. Genetics in Medicine. 8° edition. Philadelphia: Thompson & Thompson; 2016.

TRABAJO ORIGINAL

Estudio de semen asistido por computadora, una herramienta superadora. Parte I: estandarización y validación del método CASA

Computer assisted semen analysis, an overcoming tool. Part I: Standardization and validation of CASA system

Julia Ariagno¹, Patricia Chenlo¹, Gabriela Mendeluk¹

¹ Laboratorio de Fertilidad Masculina. Hospital de Clínicas José de San Martín
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina
Contacto de la autora: Julia Ariagno
E-mail: jriagno@gmail.com
Correspondencia: Av. Córdoba 2351 1° piso (C1120AAF), CABA, Argentina

Resumen

La movilidad espermática es un parámetro fundamental en la evaluación de la calidad del semen, ya que provee información importante sobre el estado energético de los espermatozoides, los cuales requieren de movilidad activa para alcanzar el sitio de fertilización en el oviducto. Sin embargo, el método estándar de medida subjetiva es objeto de gran variación interlaboratorios ya que estima las velocidades, contrariamente a la tendencia actual de objetivar todos los estudios bioquímicos.

Abstract

Sperm motility is a key parameter while assessing semen quality. It provides information about sperm energy state, a requisite needed to achieve the active movement that enables the gamete to reach the oviduct site where fertilization takes place. The standard method to assess motility is subjective; it estimates speeds thus having a great inter-laboratory variation. In fact, its use is against the current tendency oriented to objectify all the biochemical studies.

El desarrollo del análisis de semen asistido por computadora (CASA, por sus siglas en inglés) no sólo ha ayudado a aumentar la precisión y fiabilidad de la evaluación, sino que también proporciona mucha más información que la obtenida a través del método subjetivo convencional. Sin embargo, ciertos factores (por ejemplo: el operador, la óptica, la configuración del *software*, entre otros) pueden afectar los resultados obtenidos al usar esta tecnología. Se validó el método CASA-SCA® (Sperm Class Analyzer®) para los módulos de movilidad y concentración, según las normativas vigentes, antes de emplearlo en la evaluación de muestras de pacientes. En la validación se determinaron la precisión, el límite de detección y el intervalo de medición; se realizó un estudio de comparación de métodos y se verificaron los valores de referencia.

Los CASA no suplantán el trabajo del experto, quien debe editar las imágenes y validar los resultados para la correcta elaboración del informe; tampoco pueden predecir la "fertilidad" de una muestra de semen. Sin embargo, correctamente validados, estos métodos ofrecen información detallada y precisa que permite caracterizar al eyaculado y superar la calidad de la información que hasta el momento ha proporcionado el método subjetivo.

Palabras clave: laboratorio de andrología, CASA, validación y estandarización de métodos, Norma ISO 15189.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva Vol. XXIII N° 1 Junio de 2016: 09-17

Development of Assisted Computer Semen Analysis (CASA) has not only helped to increase the assessment accuracy and reliability, but has also provided much more information than that obtained by the conventional subjective method. However, certain factors (the operator, optics, software configuration, etc.) can affect the results obtained by the use of this technology. In accordance with current regulations, the CASA-SCA modules were validated for mobility and concentration before its use in the andrology clinic for evaluation of patient's samples. Accuracy, method detection limit and reportable range were determined; a study on method comparison was done and the reference values were verified.

It must be highlighted the fact that CASA does not supplant the work of the expert, who necessarily has to edit the images and who finally has to validate the clinical report. They cannot predict semen sample "fertility". However, properly validated, they provide detailed and accurate data useful for ejaculate characterization, exceeding the information that has so far been given by the subjective method.

Key words: andrology laboratory, CASA, methods validation and standardization, ISO 15189.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva Vol. XXIII N° 1 Junio de 2016: 09-17

INTRODUCCIÓN

Los parámetros básicos del estudio del semen, la movilidad, la morfología y la concentración son mediciones realizadas en toda la población de espermatozoides (Ez) eyaculados. Por esta razón, dichos parámetros no son capaces de garantizar la capacidad fertilizante de los pocos gametos que lleguen al sitio de la fecundación; sin embargo, proporcionan información esencial sobre el estado clínico de un individuo y constituyen una herramienta útil para inferir la función reproductiva del varón.

El estudio del semen se encuentra estandarizado por normativas de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ y debe garantizarse mediante el uso de controles internos² y programas de evaluación externa de la calidad³, cumplimentando con los requisitos de calidad establecidos.

La movilidad espermática es uno de los parámetros en la evaluación de la calidad del semen y provee información importante sobre el estado energético de los Ez que requieren de movilidad activa para alcanzar el sitio de fertilización en el oviducto.

Sin embargo, el método estándar de medida subjetiva es objeto de gran variación interlaboratorios, ya que estima las velocidades, al contrario de la tenden-

cia actual de objetivar todos los estudios bioquímicos.

La última edición del Manual OMS recomienda simplificar la clasificación de movilidad y diferenciar sólo entre espermatozoides con movilidad progresiva, no progresiva e inmóvil. Esta recomendación, si bien compensa la imprecisión derivada de la limitación humana para caracterizar a los espermatozoides según su velocidad como establecían versiones anteriores del manual OMS va, en nuestra opinión, en detrimento del valor clínico.

Diversas empresas producen sistemas computarizados de análisis de semen conocidos como CASA (*Computer Aided Sperm Analysis* o *Computer Assisted Semen Analysis*). Se trata de equipos capaces de establecer simultáneamente la concentración, el porcentaje de móviles y la cinética de los Ez analizados. Las ventajas que aportan estos sistemas objetivos son su alta precisión y la posibilidad de proveer datos cuantitativos⁴. Esta evaluación objetiva permite caracterizar el movimiento de las células espermáticas, por lo que resulta un instrumento interesante para los laboratorios de andrología.

Si bien diferentes factores pueden afectar el rendimiento de los instrumentos CASA, como la preparación de la muestra, el número de fotogramas

por segundo, la concentración espermática y la profundidad de la cámara empleada, pueden obtenerse resultados confiables y reproducibles si se siguen los procedimientos apropiados referidos por las empresas proveedoras de los equipos y las recomendaciones que se encuentran disponibles en la literatura.

OBJETIVOS

Muchos laboratorios de reproducción tienen un sistema CASA, pero el grado de aceptación y empleo de los mismos es variable. Los intentos de utilizar sistemas CASA para el análisis del semen humano se han cumplido, en general, con poco éxito debido a las dificultades inherentes que presentan muchas muestras de semen humano, como ser la aglutinación de los Ez y la presencia de *debris* de fondo que, hasta ahora, dificultan el correcto análisis de las imágenes digitales. Más allá de esto, la información que brindan es tan vasta que puede llegar a confundir al médico si no se trabaja desde la clínica y la investigación para atribuir un valor clínico superador a esta nueva herramienta.

Nos proponemos transmitir nuestra experiencia, fruto de más de cinco años de trabajo, con este sistema desde su incorporación a nuestra práctica en el laboratorio clínico andrológico.

Sistemas CASA

Los sistemas CASA han evolucionado a lo largo de los últimos 40 años acompañando los avances tecnológicos que involucran mejoras en los dispositivos para capturar imágenes del microscopio, nuevos lenguajes de programación y una reducción sorprendente en el tamaño de los equipos y desarrollo de *software*. Sin embargo, resulta sorprendente que los criterios básicos para la identificación de Ez y sus patrones de movimiento hayan cambiado poco.

El desarrollo del análisis de semen asistido por computadora (CASA)^{5,6} basado en la captura de los movimientos de la cabeza del Ez, no sólo ha ayudado a aumentar la precisión y fiabilidad de la evaluación, sino que también proporciona mucha más información que la obtenida a través del método subjetivo convencional.

La posibilidad de acceder a datos registrados por el CASA por videodocumentación de las muestras analizadas facilita la comparación de resultados y hace que sea posible descubrir diferencias sutiles debidas a patologías o tratamientos. Sin embargo, varios factores (el operador, la óptica, la configuración del

software, la configuración de adquisición de imágenes, el número de campos analizados, la concentración de la muestra, la dilución de la muestra en caso de realizarse y la cámara de análisis) pueden afectar los resultados obtenidos al usar esta tecnología⁷⁻⁹.

Para evitar estas variaciones, se han hecho ensayos en diferentes especies para estandarizar los métodos de evaluación de la movilidad utilizando CASA¹⁰⁻¹³. El efecto del tipo de cámara utilizada se ha estudiado tanto en humanos¹⁴ como en algunas especies animales como bovinos⁹, caninos¹⁵ y equinos¹⁶.

Cada sistema comercializado es diferente. Los sistemas CASA más modernos pueden ver automáticamente varios campos mediante cámaras de poca profundidad y capturar imágenes estroboscópicas de 500 a más de 2.000 espermatozoides, a una velocidad de 50 ó 60 cuadros por segundo, en extensiones claras o complejas y, en menos de dos minutos, almacenar información de 30 o más cuadros y proporcionar datos de cada espermatozoide analizado en forma individual y de la población en su totalidad. Unos pocos sistemas son también capaces de evaluar la morfología de los Ez. Por todo lo dicho, no es prudente asumir que los resultados obtenidos a partir del análisis de una muestra por dos sistemas diferentes de CASA serán casi idénticos incluso si se les da los mismos nombres a los parámetros, ya que el *hardware* y los algoritmos serán diferentes. En la actualidad, cada equipo vigente tiene diferentes sistemas de iluminación, de captura de imágenes y posterior análisis de las mismas.

Como ya fue mencionado, los valores generados por cada sistema CASA dependen de muchos factores, entre otros de la optimización de la configuración para el tipo de esperma a analizar y de la cámara donde se evaluará el semen.

Es importante recordar que los Ez de cada especie tienen un tamaño, forma de la cabeza e inserción de la cola diferentes, lo que generará patrones de movimiento distintos. Esto implica que no son compatibles o intercambiables las configuraciones entre especies.

Los CASA no pueden predecir la "fertilidad" de una muestra de semen. Sin embargo, validados cuidadosamente ofrecen información detallada y precisa que permite caracterizar al eyaculado, superando la información que hasta el momento ha brindado el método subjetivo.

El desafío ahora, una vez lograda su estandarización y validación para el empleo en la clínica andrológica, es hallar un valor clínico superador a

estos nuevos parámetros cinéticos para el diagnóstico y seguimiento de pacientes.

Componentes de los sistemas CASA

Hardware. Computadora (PC), cámara de video, microscopio óptico de contraste de fase positivo o negativo según el requerimiento de cada sistema con magnificación de 100x.

Software. Programa informático compuesto por distintos módulos: movilidad, concentración, morfología, base de datos e informes.

Platina termostaticada a 37 °C. Si bien no forma parte de los CASA, su uso es indispensable para asegurar una correcta evaluación de los Ez con movilidad progresiva rápida o grado (a) $\geq 25 \mu\text{m/s}$ a 37 °C.

Validación de los CASA

Antes de introducir un método nuevo para reportar resultados de pruebas de pacientes, los laboratorios requieren varios pasos. Primero, se debe especificar el desempeño requerido para el método. Las especificaciones de desempeño deben definirse a través de requerimientos regulatorios y/o médicamente útiles. En segundo lugar, el laboratorio podrá emplear el nuevo método si sus especificaciones cumplen con las especificaciones de desempeño requeridas. Por último, el laboratorio debe realizar experimentos para verificar que la imprecisión y sesgo definido por el fabricante se logren en el laboratorio. Si estos pasos son exitosos, se introduce el método para su uso rutinario en las pruebas de pacientes. La mayoría de los sistemas CASA que se comercializa no define estas especificaciones de calidad, pero para asegurar la calidad de las mediciones, al igual que todos los métodos empleados por los laboratorios, los CASA deben ser validados y estandarizados para su empleo en la práctica clínica siguiendo normativas internacionales. La Norma IRAM-ISO 15189¹⁷ establece que los métodos analíticos empleados por el laboratorio deben estar perfectamente validados y toda la información referida a su desempeño (exactitud, imprecisión, linealidad) debe estar registrada de forma adecuada.

Se entiende por validación a "todas las acciones destinadas a probar que un determinado proceso, sistema, equipamiento o método trabaja de la manera esperada y logra los resultados propuestos" (CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*).

En el presente trabajo se hace referencia al empleo de un sistema CASA en particular, el Sperm

Class Analyzer® (SCA) de MICROPTIC S.L®, Barcelona, España, ya que es con el que se cuenta en el laboratorio. Este equipo permite evaluar, en forma simultánea, la concentración y la movilidad mediante la captura de un mínimo de 400 espermatozoides y el análisis de 25 imágenes digitalizadas por segundo mediante el *software* del SCA.

Los CASA informan, por medición y/o cálculo para cada espermatozoide, los siguientes parámetros (Figura 1):

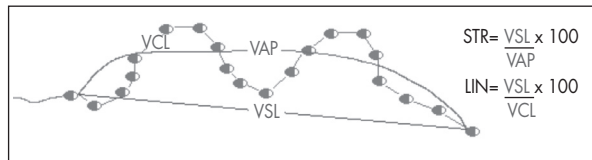


Figura 1: Terminología estándar de las diferentes velocidades por los sistemas CASA.

VCL: velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria curvilínea real; VSL: velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria rectilínea entre su posición inicial y final; VAP: velocidad promedio de una cabeza espermática a lo largo de su trayectoria promedio.

- Velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$): velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria curvilínea real.
- Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria rectilínea entre sus posiciones inicial y final.
- Velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$): velocidad promedio de una cabeza espermática a lo largo de su trayectoria promedio.

Se calculan los índices de progresión mediante la relación entre la VSL y la VCL y la VAP:

- Linealidad (LIN): linealidad de la trayectoria curvilínea, VSL/VCL .
- Rectitud (STR): linealidad de la trayectoria promedio, VSL/VAP .

Otros parámetros cinéticos aportados por los sistemas CASA son:

- Porcentaje de oscilación (WOB): medida de la oscilación de la trayectoria real sobre el camino promedio, VAP/VCL .
- Amplitud lateral de la cabeza (ALH, μm).
- Frecuencia de batido del flagelo (BCF, Hz).

Se debe establecer el tipo de velocidad (VCL o VAP) a considerar para la clasificación de categorías de movilidad espermática y la profundidad adecuada de la cámara a emplear.

El sistema SCA, al igual que otros equipos como el *Integrated Semen Analysis System*® (ISAS), permite al

operador eliminar las partículas reconocidas que no sean espermatozoides tras el análisis; es decir, verificar que la imagen registrada corresponda a una célula espermática. Este procedimiento debe llevarse a cabo por un operador altamente entrenado, ya que puede alterar la veracidad de los resultados.

En base a las velocidades y progresiones, el *software* cataloga a los espermatozoides, según la configuración adoptada por el usuario, en categorías, por lo que puede informar igual que el método subjetivo según la OMS (2010):

- Móviles progresivos (PR, %): porcentaje de Ez con movilidad traslativa, lineal o no lineal, sin tener en cuenta la velocidad.
- Móviles no progresivos (NP, %): porcentaje de Ez móviles pero no traslativos (móviles *in situ*, que sólo mueven la cabeza o la cola, etc.)
- Inmóviles (IM, %): porcentaje de Ez inmóviles.
- Móviles totales (MT = PR + NP, %): porcentaje de Ez móviles.

En base a los parámetros cinéticos, los CASA permiten clasificar a los Ez según sus características de movilidad, por ejemplo: hiperactivos, grado (a), etc.

En nuestro equipo, consideramos Ez con movilidad progresiva lineal rápida [grado (a)] a los que cumplen con las siguientes restricciones: VCL, >35/s; LIN, >50%; STR, >80%.

Validación del CASA-SCA®

Como se mencionó, los CASA deben ser validados según las normativas vigentes, por eso en nuestro laboratorio se valida el CASA-SCA® para los módulos de movilidad y concentración¹⁸, que son los que se utilizan antes de emplearlos en la evaluación de muestras de pacientes.

En la validación se determinaron la precisión¹⁹, el límite de detección y el intervalo de medición; se realizó un estudio de comparación de métodos y se verificaron los valores de referencia.

En primer lugar, se estandarizó el tipo de velocidad (VCL o VAP) a considerar para la clasificación de categorías de movilidad espermática y la profundidad adecuada de la cámara a emplear. Se halló una alta correlación lineal en la clasificación del movimiento empleando ya sea VCL como VAP ($r=0,99$; $p < 0,001$), por lo que se estableció el uso de la primera para obtener resultados comparables con otros sistemas, ya que la VCL es medida por el equipo a diferencia de la VAP que se calcula mediante diferentes algoritmos matemáticos según el *software* de cada CASA¹.

En cuanto a las cámaras a emplear, se testeó el uso de porta y cubreobjetos y cámaras comerciales. Finalmente se normalizó el uso de cámaras Leja® de 10 µm de profundidad, que son las que permiten mejores imágenes para el análisis.

Para los cálculos de precisión se trabajó con tres muestras de semen de diferentes niveles de concentración y movilidad, que fueron analizadas entre 10 y 20 veces con cámaras Leja 10® (altura 10 µm). La repetibilidad y reproducibilidad se determinaron calculando el coeficiente de variación (CV%) intracámara y entre cámaras respectivamente. La imprecisión media hallada para Ez móviles progresivos fue semejante a la reportada en la bibliografía²⁰ y la del recuento espermático resultó aceptable por variabilidad biológica (Tabla 1).

Cámara	CV% Concentración	CV% Móviles progresivos
Porta-cubreobjeto	25,05	21,24
Leja 10®	13,29	14,26
Requisito de calidad (VB)	13,4 ^a	11,4 ^b

Tabla 1: Precisión entre ensayos para concentración y movilidad.

CV: coeficiente de variación; VB: variabilidad biológica. Requisito de calidad obtenido de la base de datos de Westgard (<http://www.Westgard.com/biodatabase1.htm>).

^a nivel deseable.

^b nivel mínimo.

El límite de detección (LD) del sistema computarizado se estableció empleando 13 muestras azoospermicas y fue de $7,83 \times 10^6$ elementos/mL. El límite de cuantificación (LQ) fue de 23,49 elementos/mL. Sin embargo, al realizar la validación y edición de imágenes con la intervención del operador, requisito indispensable según nuestra experiencia para la emisión de un resultado veraz, el LD y LQ se redujeron a cero a pesar de perder objetividad el análisis.

El intervalo de medición del método fue lineal ($r = 0,99$, $p < 0,001$) en el rango de concentraciones estudiadas (0,98 a 125×10^6 /mL) (Figura 2). Para su determinación se emplearon muestras de alta concentración diluidas con plasma seminal autólogo, la movilidad no se vio afectada y se halló un CV% para Ez móviles progresivos semejante al obtenido en el estudio de la precisión del método.

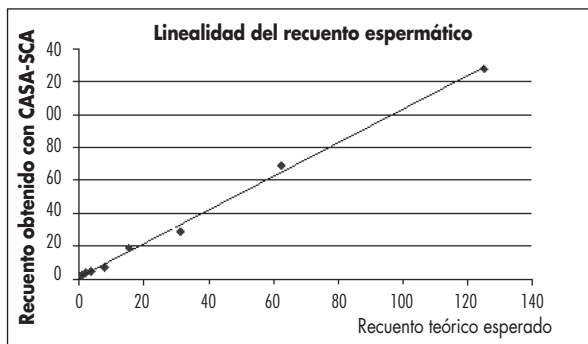


Figura 2: Intervalo de medición.

Recuento espermático con SCA, empleando cámara Leja 10®, en rango de concentración teórico entre 120 a 0,98 millones/mL.

Los estudios de correlación del recuento y la movilidad obtenida con el SCA y el método tradicional (cámara de Neubauer para recuento y método subjetivo para movilidad) demostraron alta correlación tanto para la determinación de concentración ($r=0,97$, $p<0,0001$) como para la valoración de móviles progresivos ($r=0,84$; ($p<0,001$)). En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos en la recta de regresión de Passing-Bablok. En el recuento espermático se observa una diferencia de tipo constante entre ambos métodos, lo que pone de manifiesto que el SCA® proporciona mayores valores de recuento que el método de referencia con cámara de Neubauer. Sin embargo, el error máximo tolerable de medida (EMT: 55%) satisfizo el requisito mínimo de variabilidad biológica.

	Recuento espermático	Móviles progresivos
Ecuación de la recta	$y = 6,008833 + 0,940119 x$	$y = -7,275000 + 1,199000 x$
r (p)	0,9734 ($p < 0,0001$)	0,8355 ($p < 0,0001$)
N	100	100
Pendiente (IC 95%)	0,940119 (0,8361; 1,0184)	1,199000 (1,0735; 1,3562)
Ordenada al origen (IC 95%)	6,008833 (2,0386; 12,6371)	-7,275000 (-12,8625; -2,0176)

Tabla 2: Comparación de métodos: resumen de los resultados de la recta de regresión de Passing-Bablok.

Ecuación de la recta: $y = b + m x$; m: pendiente; b: ordenada al origen; IC: intervalo de confianza del 95%.

Verificación de los valores de referencia

La Norma 15.189 establece que los laboratorios deben verificar los valores de referencia reportados en sus protocolos. Por este motivo, se cumplimentó con este requisito mediante el empleo de la guía C28-A2 CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

En el laboratorio, el proceso de verificación de estos valores se llevó a cabo mediante la convocatoria a 20 hombres argentinos residentes en Buenos Aires, con fertilidad probada en los últimos 12 meses, sin patología andrológica²¹.

Los valores de referencia publicados por la OMS en 2010 se validaron para la concentración espermática y el número total de espermatozoides por eyaculado con el empleo del SCA®. Sin embargo, los PR y MT no pudieron ser validados con estos 20 varones de referencia, ya que el 15% de ellos mostró un valor inferior al establecido por la OMS, con un máximo de 10% el permitido por la norma.

Los parámetros cinéticos calculados por los sistemas CASA han sido relacionados con resultados de los procedimientos de fertilización instrumental²² pero, a pesar de que diversos autores han publicado sus experiencias^{20,23,24}, no hay estudios de estimación de valores de referencia en la bibliografía. La mayoría de los laboratorios que utiliza sistemas CASA refiere un valor límite inferior promedio para la población de Ez de 45 $\mu\text{m/s}$ para la VCL, 25 $\mu\text{m/s}$ para la VSL, 35 $\mu\text{m/s}$ para la VAP, 60% para la LIN, 80% para la SRT y 2 μm para el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)²⁵.

En las Tablas 3 y 4 se muestran los resultados de la verificación de los valores.

Parámetro	Límite inferior según OMS	N° de casos con resultados menores a los establecidos
CC. espermática (Ez/mL)	15	1, se verifica
N° total de Ez (Ez/eyac)	39	1, se verifica
MT (%)	40	4, no se verifica
PR (%)	32	3, no se verifica
NP (%)	1	1, se verifica
IM (%)	22	0, se verifica

Tabla 3: Parámetros de recuento y movilidad por CASA-SCA, datos correspondientes a 20 hombres sanos con fertilidad en los últimos 12 meses.

Ez: espermatozoides; CC: concentración; MT: móviles totales; PR: móviles progresivos; NP: móviles no progresivos; IM: inmóviles; OMS: Organización Mundial de la Salud.

Parámetro	Mediana	Rango	Límite inferior según bibliografía	N° de casos con resultados menores a los establecidos
VCL (µm/s)	78,83	46,4-106,66	45	0, se verifica
VSL (µm/s)	51,94	29,34-90,39	25	0, se verifica
VAP (µm/s)	63,24	34,93-95,28	35	1, se verifica
LIN (%)	67,48	44,39- 84,74	59	7
SRT (%)	84,47	72,36-94,87	80	7
ALH (µm)	2,2	1,73-3,44	2	5
WOB (%)	79,48	60,53-89,33	No hay publicados	-
BCF (Hz)	8,87	4,73-10,80	No hay publicados	-

Tabla 4: Parámetros cinéticos por CASA-SCA®.

VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad rectilínea, VAP: velocidad promedio, LIN: linealidad, STR: rectitud, WOB: porcentaje de oscilación, ALH: amplitud lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido del flagelo.

Estudios multicéntricos futuros podrán establecer los valores de referencia para movilidad y parámetros cinéticos.

Por todo lo expuesto, se concluye que el sistema CASA-SCA® demostró cumplir con los requisitos de calidad necesarios para su empleo en la clínica, siendo indispensable la edición de las imágenes por parte de un operador calificado.

Validación de los resultados reportados

El método CASA presenta la ventaja de aumentar la precisión y reproducibilidad de las mediciones de movilidad espermática. Sin embargo, en ciertas situaciones puede no reflejar con exactitud lo que ocurre en la totalidad de la muestra de semen debido a factores inherentes a la metodología y/o a la calidad de la muestra. Por este motivo, en nuestro laboratorio implementamos la doble observación de la muestra por el CASA y por un observador entrenado que evalúa la movilidad por el método subjetivo clásico.

Las muestras de semen son evaluadas en simultáneo por el método subjetivo, según OMS 2010, con portaobjetos y cubreobjetos y con el CASA-SCA® con cámara Leja 10®, en ambos casos con platina termostatazada.

Se comparan los datos de movilidad PR obteni-

dos por ambos métodos con el empleo de la tabla de comparación de porcentajes del Manual de la OMS¹, que corresponde a la ecuación:

$$d = |p_1 - p_2| < 1.96 (\sqrt{2 P (100-P) / N})$$

donde: $P = (p_1 + p_2) / 2$
 p_1 y p_2 son los % MP de cada método (SCA y subjetivo)

Se validan los resultados del CASA si la diferencia (d) entre porcentajes es menor a la permitida por la tabla. En caso contrario, se rechazan los datos y se repite la observación por ambos métodos.

La tasa de rechazos en nuestro laboratorio es de 6,5% y se debe a las características propias del semen y a las limitaciones de estos sistemas²⁶.

La evaluación en simultáneo por los dos métodos permite validar cada muestra a modo de control de calidad interno (CCI) y en caso de discordancia de resultados, realizar la inmediata re-evaluación de la muestra y la consecuente toma de decisión.

Algunos factores considerados como causales de discrepancias son:

- Volumen de semen examinado: las cámaras Leja® cargan un volumen muy pequeño de semen (4-5 µL) a diferencia del portaobjetos/cubreobjetos (porta + cubre 24 × 24:12 µL o porta + cubre 22 × 22:10 µL).

- Semen hiperviscoso: se dificulta el cargado de las cámaras Leja® por capilaridad. Esto se debe al efecto Segre-Silberberg, (*SS-effect*, en inglés) fenómeno físico que ocurre cuando las partículas en una solución son transportadas por flujo laminar, lo que ocasiona una subestimación del contenido de partículas dependiente de la viscosidad^{27, 28}.

- Polispermias: estos sémenes deben diluirse con plasma seminal homólogo para ser evaluados por el CASA, lo que altera las características originales del semen.

- Oligozoospermias severas: proporcionan imágenes muy dispares debido al bajo número de Ez presentes por campo.

- Muestras muy heterogéneas: al igual que en las oligozoospermias, la divergencia entre las imágenes obtenidas induce a error.

- Muestras con *debris*: los equipos no son capaces de distinguir entre Ez inmóviles y elementos de tamaño similar, por lo que se requiere gran trabajo de edición.

- Presencia de Ez aglutinados: producen imágenes confusas difíciles de analizar.

Limitaciones o desventajas de los CASA

En los instrumentos CASA, la imagen del campo microscópico se convierte en una imagen digital y el *software* establece valores de la cinética de cada espermatozoide a partir de un número de imágenes tomadas en un segundo (*frames* en inglés; en castellano, cuadros o figuras) del movimiento de la cabeza. Cuando la computadora detecta un espermatozoide en el microscopio es capaz de dibujar una imagen digitalizada de cada Ez individualmente, incluyendo su velocidad y trayectoria mientras se mueve bajo el microscopio.

Mucho se ha aprendido acerca de las “microcaracterísticas” normales y anormales de los Ez mediante el empleo de este método que sin embargo no es infalible. El equipo sólo es tan inteligente como el programador que lo seteó. Pequeños cambios en el programa pueden alterar los cálculos de manera significativa y los equipos requieren monitorización y actualización constantes.

En la actualidad, los factores más importantes que limitan el uso de los CASA en la práctica clínica son:

- La tendencia de estos sistemas a sobreestimar la concentración espermática debido a que el *software* puede contabilizar el mismo espermatozoide dos veces por las colisiones espermáticas. Esta sobrestimación se produce en menor medida cuanto más diluida esté la muestra, ya que disminuyen las colisiones.

- Algunos equipos como el SCA permiten al operador cambiar las condiciones de medida y otorgar validez a las imágenes digitales, pero este procedimiento también puede alterar los resultados.

- No existe una estandarización y optimización de los equipos y de los procedimientos utilizados en los análisis.

- Cada laboratorio utiliza un equipo diferente, con diferentes características técnicas que dan lugar a resultados muy dispares entre centros.

- Los resultados son afectados por diferentes factores como la temperatura de la muestra, volumen, tipo de cámara, concentración de la muestra. Influyen también cuestiones vinculadas al suministro eléctrico que condicionan la tensión que llega al equipo.

- No existen hasta el momento muestras o soluciones para realizar el CCI ni Programas de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC), que sí están disponibles para el método clásico.

Para minimizar estos inconvenientes en nuestro laboratorio, todos los resultados siempre se verifican tanto por un análisis de repetición, así como por una segunda opinión humana-validación de resultados, descripto anteriormente.

Por todo lo expuesto, es necesario que cada laboratorio estandarice un protocolo, sabiendo que los resultados sólo serán aplicables a muestras evaluadas con el equipo en cuestión hasta tanto se creen PEEC y métodos accesibles y confiables de CCI para estos sistemas.

CONCLUSIONES

Los sistemas CASA tienen un enorme potencial como herramienta de investigación, en toxicología reproductiva, en producción animal y en la evaluación del semen humano con fines clínicos.

No hay duda que los sistemas CASA del futuro tendrán que ser rigurosamente estandarizados, validados y verificados para responder a las diferentes necesidades tanto de los laboratorios de andrología clínica como a los de producción animal, de toxicología reproductiva y de investigación. También deberán proponer nuevas pruebas funcionales que evalúen la calidad del semen y su potencial fértil, en lugar de limitarse a medir los parámetros descriptivos del semen *per se*.

Hoy en día debemos centrarnos en lo que sabemos que los sistemas CASA pueden hacer con exactitud, la cuantificación y caracterización de las subpoblaciones de Ez. Mejoras urgentes en la tecnología de los CASA deberán abordar el análisis de la morfología de los Ez con precisión.

Por sobre todo quisiéramos dejar en claro que esta tecnología no suplanta el trabajo del experto quien necesariamente debe editar las imágenes y validar los resultados para la correcta elaboración del informe.

REFERENCIAS

1. World Health Organization (WHO). WHO laboratory manual for the examination of human semen. Geneva: WHO; 2010.
2. Ariagno J, Curi S, Pugliese M, Chenlo P, Blanco AB. Control de calidad en el Laboratorio Andrológico. Faba Informa. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires; 2007(420). Disponible en: <http://www.faba.org.ar/fabainforma/420/FBA02.html>
3. Curi S, Ariagno J, Chenlo P, Pugliese M, Sardi Segovia ML, Repetto H, et al. Control de calidad externo en el estudio del semen. Act. Bioquím. Clin. Latinoam. 2008; 42,183-7.
4. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. Hum. Reprod. 1998; 13,142-5.

5. Katz DF, Dott HM. Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1975; 45:263-72.
6. Amann RP, Hammerstedt RH. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.* 1980; 23:647-56.
7. Holt W, Watson P, Curry M, Holt C. Reproducibility of computer aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil. Steril.* 1994; 8: 219-230.
8. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology.* 2003; 60:1553-68.
9. Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology.* 2010; 74:424-35.
10. Davis RO, Katz DF. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 1993; 14:385-94.
11. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update.* 1997; 3:403-39.
12. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002; 57:149-79.
13. Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 2004; 25:317-25.
14. Le Lannou D, Griveau JF, Lepichon JP, Quero JC. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Hum. Reprod.* 1992; 7:1417-21.
15. Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology.* 2001; 55:733-49.
16. Hoogewijs MK, De Vlieghe SP, Govaere JL, De Schauwer C, De Kruif A, Van Soom A. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine. Vet. J.* 2012; 44:542-9.
17. Norma IRAM-ISO 15189. Laboratorio de Análisis Clínicos. Requisitos Particulares para la Calidad y la Competencia; 2005.
18. Chenlo PH, Ariagno JI, Pugliese MN, Repetto HE, Sardi ML, Mendeluk GR, et al. Study of human semen: implementation of an objective method. *Act. Bioquim. Clin. Latinoam.* 2013; 47:61-9.
19. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, Krouwer JS, Meier K. NCCLS Document EP5-A2. En: Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline. Wayne, EEUU: Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004; 24(25).
20. Aulesa C, Cabrera M, Alonso R, Benitez M, Martinez M. Evaluación del sistema automatizado Sperm Class Analyzers (SCA) para análisis del semen. *Rev. Lab. Clin.* 2009; 2:8-16.
21. Curi SM, Chenlo P, Pugliese M, Ariagno J, Repetto H, Vazquez J, et al. Verificación de los valores de referencia del estudio del semen según OMS 2010 en Buenos Aires. *Act. Bioquim. Clin. Latinoam.* 2014; 48:429-35.
22. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2001; 18:213-8.
23. Agarwal A, Ozturk E, Loughlin KR. Comparison of semen analysis between the two Hamilton-Thorn semen analysers. *Andrology.* 1992; 24:327-9.
24. Tomlinson MJ, Pooley K, Simpson T, Newton T, Hopkisson J, Jayaprakasan K, et al. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. *Fertil. and Steril.* 2010; 93:1911-20.
25. Munuce MJ. El laboratorio andrológico en la evaluación del factor masculino. *Reproducción.* 2008; 23:120-8.
26. Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology.* 2015; 17:545-53.
27. Douglas Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Particle distribution in low volume capillary loaded chambers. *J. Androl.* 2005a; 26:107-14.
28. Douglas Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Capillary loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J. Androl.* 2005b; 26:115-22.