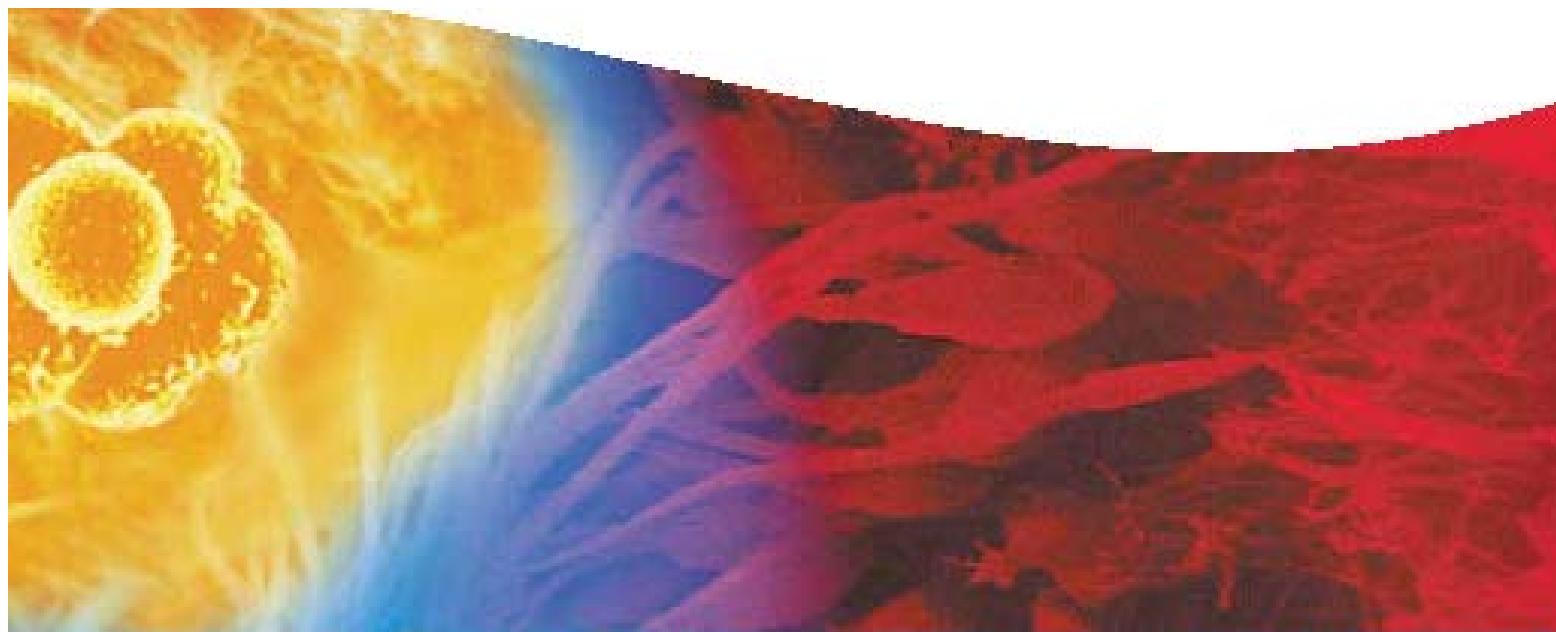




2007



Minitüb

## EVALUACIÓN SEMINAL POR MICROSCOPIA

**Minitüb**

Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG  
Hauptstrasse 41  
84184 Tiefenbach - Germany



Our knowledge - Your success

Phone: +49 (0) 8709 9229 0  
Fax: +49 (0) 8709 9229 39  
E-Mail: [minitube@minitube.de](mailto:minitube@minitube.de)  
Internet: [www.minitube.de](http://www.minitube.de)

## EVALUACIÓN SEMINAL POR MICROSCOPIA

### 1. Introducción

Los requerimientos mínimos del microscopio para la evaluación de semen son:

- Óptica binocular de contraste de fases
- Platina temperada ajustable para temperaturas alrededor de  $+38^{\circ}\text{C}$  a  $+39^{\circ}\text{C}$ .

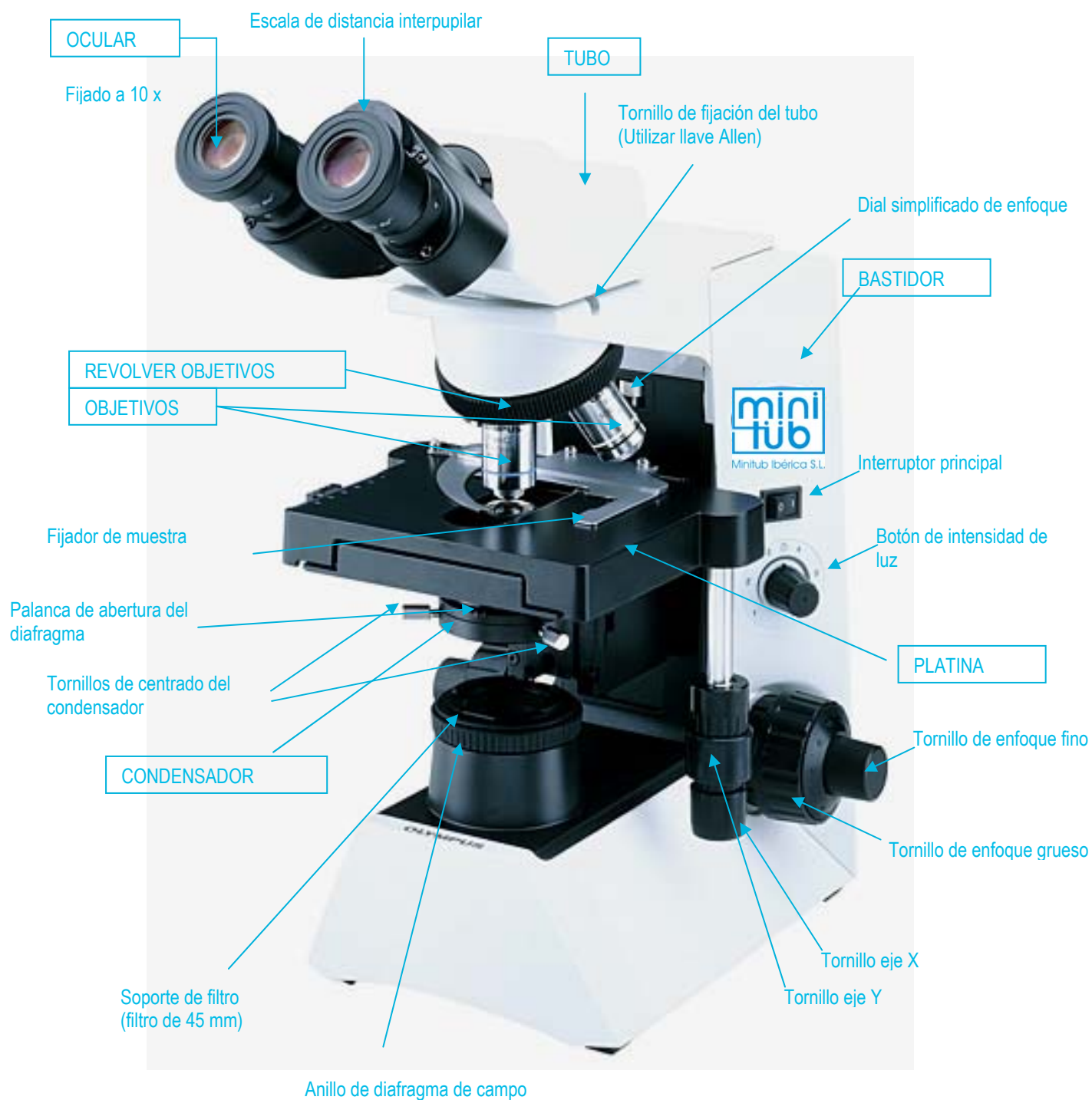
Para la evaluación del semen vivo, no hay que olvidar:

1. Conectar la platina térmica de su microscopio, con el tiempo suficiente para calentar sobre ella los porta- y cubreobjetos a  $+39^{\circ}\text{C}$
2. Asegurarse de que la temperatura de su platina térmica esté correctamente ajustada a  $+38^{\circ}\text{C}$  hasta  $+39^{\circ}\text{C}$ . El proceso de calentamiento requiere de 10 – 20 minutos. Los portaobjetos y cubreobjetos insuficientemente templados darán imágenes bajo el estándar.
3. Sólo utilizar portaobjetos y cubreobjetos limpios. En algunos casos, aunque el empaque de fabricación sellado, pueden requerir de limpieza adicional, debido a impurezas o sustancias tóxicas en sus superficies, provenientes del proceso de fabricación. Los portaobjetos pueden limpiarse antes del uso mediante un paño libre de pelusas humedecido con alcohol (utilizar alcohol isopropílico 70-90%). Usar portaobjetos de 0,9 a 1,4 mm de grosor. El uso de portaobjetos más gruesos puede causar una imagen imprecisa de la muestra. Los cubreobjetos de máximo 0,17 mm de grosor para lograr el rendimiento óptimo de los objetivos del microscopio.



## 2. El microscopio

### 2.1. Partes del microscopio



### – Sistema óptico

- OCULAR. Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo
- OBJETIVO. Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.
- CONDENSADOR. Lente o sistema de lentes situado debajo de la platina. Concentra los rayos luminosos sobre la preparación.
- DIAFRAGMA. Situado debajo de la platina y del condensador. Regula la cantidad de luz que entra en el condensador
- FOCO. Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.
- FUENTE DE LUZ. Muy importante para la correcta iluminación de la preparación y poder realizar una buena observación. Se obtiene a través de un espejo situado debajo de la platina, que recoge tanto la luz natural como la luz eléctrica, o a través de lámparas incorporadas a la base del microscopio.

### – Sistema mecánico

- SOPORTE. Está formado por el pie o base y el brazo. Mantiene el sistema óptico del microscopio.
- PLATINA. Lugar donde se coloca la preparación.
- CABEZAL. Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular y trilocular.
- REVÓLVER. Contiene los sistemas de lentes objetivos y está dotado de movimiento giratorio.
- TORNILLOS DE ENFOQUE. Son dos, el Macrométrico que aproxima el enfoque y Micrométrico que consigue el enfoque correcto.

## 2.2. Magnificación del microscopio

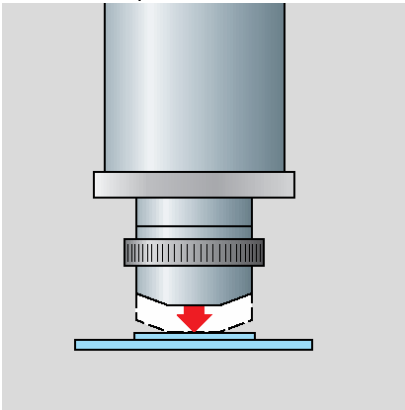
- El aumento o magnificación total recomendado para la evaluación de muestras de motilidad, está entre 100x y 250x.
- La magnificación total resulta de la combinación de la magnificación del objetivo y del ocular. El factor de magnificación está indicado en cada ocular (la mayoría de ellos de 10x) y en los objetivos (10x, 20x, 25x, 40x, 100x oil). Multiplicando los factores de magnificación del ocular por objetivo, se obtendrá la magnificación total, con la cual trabaja.

$$\text{Magnificación total} = \text{Magnificación objetivo} \times \text{magnificación ocular}$$

- Las preparaciones debieran enfocarse primero con un bajo aumento para tener una perspectiva general y enfocar el campo visual sobre la parte más central de la preparación. Si se está evaluando muestras de semen, hay que enfocar al centro del cubreobjeto posicionando el objetivo exactamente sobre él, y ajustar la profundidad de foco moviendo la platina lentamente hacia arriba o abajo hasta alcanzar una imagen nítida.
- Inmediatamente, hay que utilizar el aumento para la evaluación de la muestra (tal como 200x con el objetivo 20x), y que se puede obtener rotando el objetivo deseado hasta enfocar sobre la muestra. Con microscopios buenos se obtendrá, después del cambio de magnificación, una imagen nítida, sin necesidad de enfoque adicional.
- Si no se obtiene una imagen nítida, hay que levantar la platina al máximo, observando desde un lado para evitar el contacto directo del objetivo con el cubreobjetos. Una vez que el espacio entre objetivo y cubreobjetos sea mínimo, hay que bajar lentamente la platina, mientras se trata de enfocar la muestra a través del ocular del microscopio. Hay que mover la platina hasta obtener una imagen nítida.
- El objetivo de inmersión 100x oil sólo trabaja con aceite de inmersión, el cual debe colocarse como una pequeña gota entre un frotis sin cubreobjetos y el objetivo de inmersión. Este método de examen no es apropiado para muestras de semen cubiertas por un cubreobjetos, sino sólo para frotis fijados y teñidos para evaluación morfológica. Mediante este método, es posible una magnificación de 1.000x. La evaluación de preparaciones teñidas se hace en campo claro, sin contraste de fase. Es decir, la posición del condensador debe estar en 0 o campo claro para este tipo de examen.



### 2.3. Funcionamiento

- **Paso 1.** Colocar el objetivo de menor aumento en posición y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones
  - **Paso 2.** Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
  - **Paso 3.** Comenzar la observación con el objetivo de 10x.
  - **Paso 4.** Realizar el enfoque de la preparación:
    - Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo de enfoque Macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
    - A continuación, mirando a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el Macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el Micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
- 
- **Paso 5.** Pasar al siguiente objetivo 40x. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3.
    - El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de accidentes
      1. Incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores
      2. Mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión
  - **Uso del diafragma de abertura:**
    - El diafragma de abertura es parte del condensador. Es utilizado para limitar la imagen de un haz de luz. Con el diafragma se pueden regular la resolución, el contraste y la profundidad de campo. Sin embargo, **nunca debe utilizarse para regular la luminosidad.**
  - **Empleo del objetivo de inmersión:**
    - Bajar totalmente la platina
    - Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite (debe quedar a una distancia entre 1-3mm de la muestra)
    - Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de x40
    - Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz. Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión
    - Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente
    - Enfocar cuidadosamente con el Micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.

- Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3
- Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación
- Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

### – Cómo ajustar el contraste de fases:

- La imagen de un objeto en contraste de fases puede ajustarse cambiando el retardo del foco luminoso principal. Dependiendo del retardo elegido, los objetos pueden aparecer más brillantes (contraste de fases negativo) o más oscuros (contraste de fases positivo) que su alrededor o su fondo.
- El contraste de fases positivo es el método estándar para la evaluación de semen. El contraste de fases negativo debe utilizarse para el sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) SpermVision®. Aquí el objeto será brillante y el fondo será oscuro.
- La motilidad de semen debiera evaluarse siempre utilizando contraste de fases. El contraste de fases requiere de objetivos especiales, que vienen rotulados como Ph1, Ph2, o Ph3. El condensador para contraste de fases requiere de 1, 2, o 3 posiciones de anillos de fase, dependiendo del objetivo correspondiente elegido. La fase debe centrarse de tal manera, que el anillo de fase al interior del objetivo se superponga exactamente a la posición del anillo de fase del condensador, dentro del paso del haz luminoso. Por esto es necesario que en la primera instalación de un microscopio, se centre el contraste de fase para cada objetivo. Este ajuste debe controlarse regularmente.
- El ajuste se efectúa normalmente con dos pequeños tornillos de centrado en el condensador. El condensador debe estar posicionado cerca de la platina, en posición de enfoque de una muestra. Objetivo y anillo de fase del condensador deben corresponder uno al otro. Utilice un telescopio de centrado para posicionar correctamente los anillos de fase.
- Este accesorio se parece a un ocular y puede insertarse en uno de los tubos de observación, en lugar de un ocular. Al enfocar a la pupila del objetivo, se pueden controlar la abertura del diafragma y centrar los anillos de fase. El enfoque con el telescopio se efectúa normalmente subiendo o bajando el ocular de ajuste.
- Cada tipo de microscopio requiere de procedimientos de ajuste algo diferentes. Si es necesario se debe consultar el manual del microscopio para mayores detalles.
- Pasos a seguir:

#### 1. Centrado del condensador

- Girar la torreta hasta la posición de la marca "0" y abrir completamente el diafragma de apertura.
- Colocar la muestra. Intercalar el objetivo 10X y enfocar la muestra.
- Con el control del diafragma de campo de la base del microscopio, bajar el diafragma de campo.
- Mientras se mira por los oculares, girar el regulador de altura del condensador para enfocar la imagen del diafragma de campo.
- Girar los dos tornillos de centrado de la lente de compensación (Fig. 1y2) para desplazar la imagen del diafragma de campo al centro del campo de visión.
- Para comprobar el centrado, abrir gradualmente el diafragma de campo. El condensador está correctamente centrado siempre que la imagen del diafragma de campo se encuentre circunscrita exactamente en el campo de visión.
- Al abrir el diafragma de campo, la imagen del diafragma puede desenfocarse. En tal caso, volver a enfocarla utilizando el regulador de altura del condensador.

Figura 1. Estructura de la torreta de condensador para contraste de fases

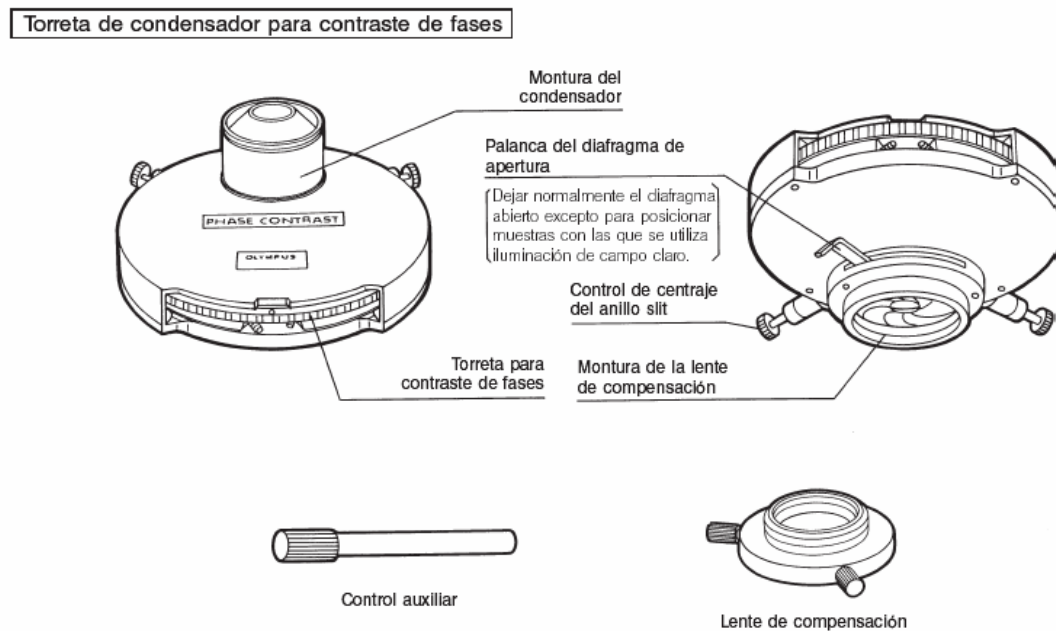
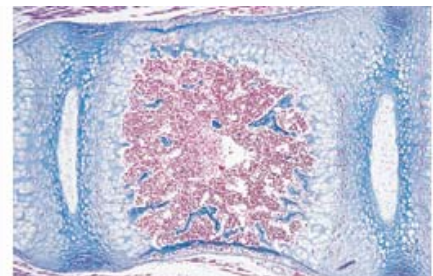
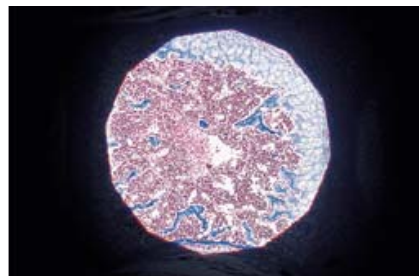
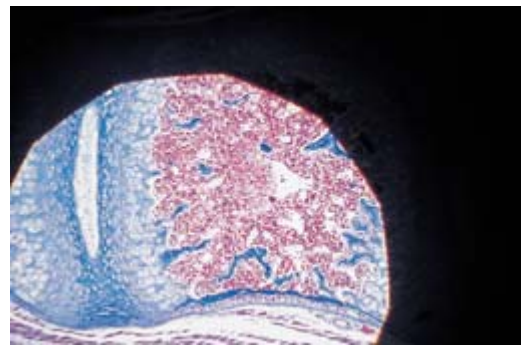


Fig. 2 Durante el uso práctico, abrir ligeramente el diafragma de campo hasta que la imagen circunscriba exactamente el campo de visión.

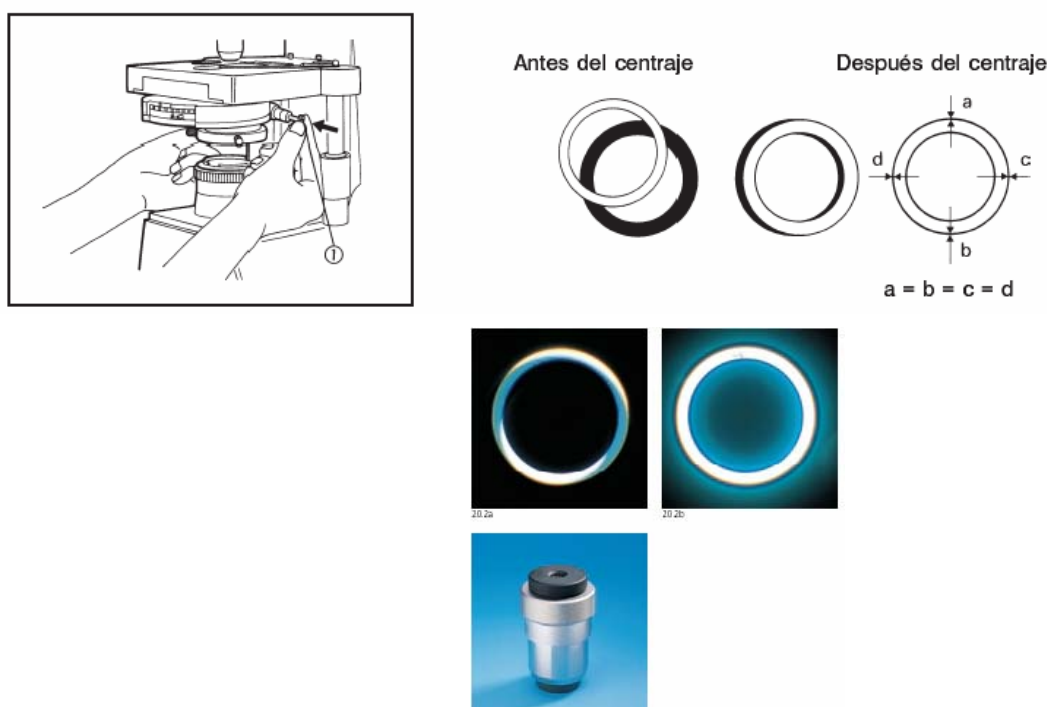




## 2. Centrado del anillo slit (Observación de contraste de fase)

- Intercalar el objetivo de contraste de fases a usar.
- Girar la torreta de contraste de fases para hacer coincidir su indicador de Ph con el indicador de Ph del objetivo de contraste de fases. Por ejemplo: Si está intercalado un objetivo con Ph2, en la ventana de la torreta también debe aparecer indicado Ph2.
- Colocar la muestra y enfocarla aproximadamente.
- Desmontar uno de los oculares e insertar el telescopio de enfoque (U-CT30) en el casquillo del ocular.
- Girar el control del anillo del U-CT30 para enfocar el aro brillante (apertura del anillo del condensador) y el aro oscuro (anillo de fases del objetivo).
- Empujando suavemente hacia dentro, girar los dos controles de centrado del anillo en la torreta del condensador hasta que el aro brillante y el aro oscuro queden concéntricos y superpuestos. (Fig. 3).
- El anillo correspondiente a los otros objetivos debe centrarse de forma similar. Si los objetivos 10X y 20X indican Ph1, a efectos prácticos de observación, una vez centrado el anillo para el objetivo 10X, no es necesario volver a centrarlo para el 20X.
- Extraer el U-CT30 y volver a colocar los oculares en su lugar. Ahora puede comenzar la observación de contraste de fases interponiendo cualquier objetivo de contraste de fases con su correspondiente anillo.

Fig. 3. Centrado de los anillos de fases



## 2.4. Problemas más frecuentes

- La iluminación no es satisfactoria, controlar el centrado y el ajuste vertical del condensador, y si la parte superior del condensador está desviada, en relación con el objetivo utilizado
- Falta de contraste de la imagen, normalmente se debe a suciedad de los lentes del objetivo y la de los oculares. El polvo debe limpiarse con una brocha suave, no sólo de los lentes frontales, sino de todas las superficies externas o lentes de objetivos. La suciedad rebelde debe removerse con agua destilada, una mezcla de alcohol y éter o bencina. Los lentes de los oculares debieran limpiarse ocasionalmente. Estas se encuentran frecuentemente cubiertas por una fina película depositada por las pestañas

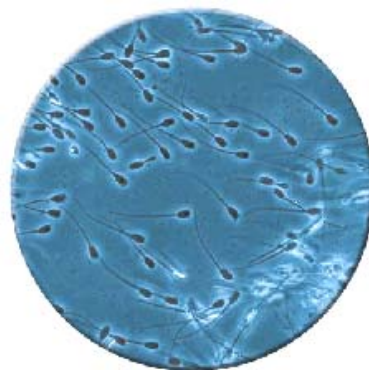
- Al cambiar los objetivos, frecuentemente se olvida el ajuste de la abertura del diafragma. De esto resultan imágenes de bajo contraste. La abertura y los diafragmas de campo deben ser siempre correctamente fijados. Nunca ajustar la intensidad de luz con la abertura del diafragma
- Enfoque pobre de la muestra, o simplemente no puede ser enfocada, puede que el portaobjetos haya sido colocado invertido sobre la platina, con la muestra dirigida hacia abajo. Esto puede suceder fácilmente, cuando la superficie que contiene el frotis de la muestra no se encuentra marcada.

### 2.5. Mantenimiento

- Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda
- Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo
- Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica
- No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio
- Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción
- No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador). El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo sujetándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular
- Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol
- Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión. Cada año se debe encargar a un técnico un ajuste y revisión general

### 3. Evaluación de la motilidad del semen al microscopio

- La motilidad se evalúa colocando una pequeña gota de semen (aprox. 5  $\mu$ l) sobre un portaobjetos, tapándola cuidadosamente con un cubreobjetos. Muchas personas tienden a utilizar una gota demasiado grande para una buena evaluación. La capa de semen entre portaobjetos y cubreobjetos debe ser lo más delgada posible y la gota de semen fluir fácilmente bajo el cubreobjetos, hasta alcanzar sus bordes. Si la gota no se extiende por sí misma, generalmente se debe a la presencia de polvo y material graso sobre el vidrio. La muestra debe evaluarse inmediatamente después de su preparación. En cada campo microscópico se deben poder visualizar los espermatozoides individuales, y la cantidad de células debe permitir que se muevan relativamente libres. Si el número de espermatozoides es demasiado alto, se debe diluir la muestra de semen para asegurar una evaluación correcta.

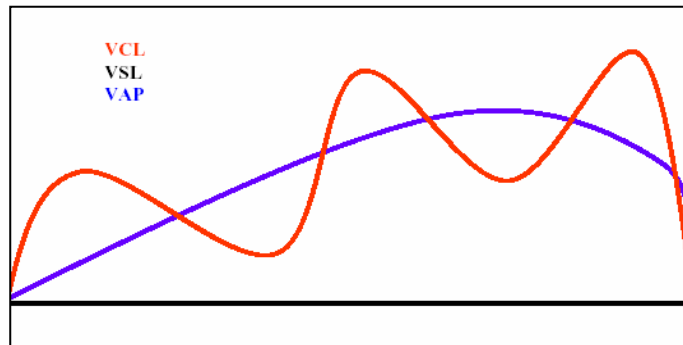
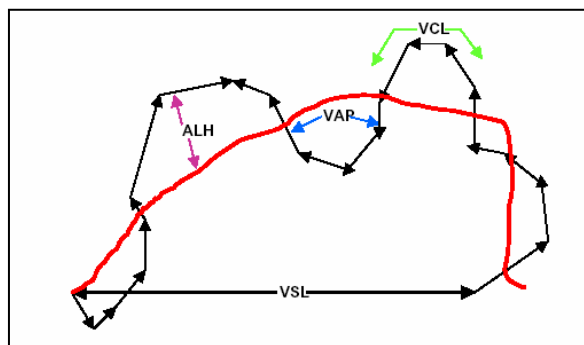


- Es importante seleccionar para la evaluación campos que muestren buena motilidad y no estén ubicados en los bordes del cubreobjeto. Debieran evaluarse al menos 5 campos diferentes. El porcentaje de espermatozoides motiles de un eyaculado debe evaluarse dentro de un rango de 0% (ningún espermatozoide móvil) hasta 100% (todos los espermatozoides en movimiento). En cada uno de los campos, debiera estimarse el porcentaje de células con movimiento, asignando preferentemente cada uno de ellos a 1 de las 3 categorías, inmóvil, movimiento local, o movimiento progresivo.
- Durante la evaluación de motilidad, hay que estar atento también a alteraciones morfológicas visibles, tales como gotas citoplasmáticas o colas torcidas. Las células espermáticas no debieran presentar más de 20% de las formas alteradas. En caso de dudas, se aconseja utilizar un procedimiento de tinción especial, como la tinción de Farelly, que es fácil de utilizar.
- Eyaculados con una baja motilidad (por ejemplo bajo 70%), con más de 20% de las alteraciones morfológicas, y un número alto de células espermáticas aglutinadas, no debieran diluirse, sino descartarse por esa razón. Los valores umbrales dependen de la especie y difieren bastante.
- Las aglutinaciones se producen particularmente en presencia de contaminación bacteriana, o por enfermedad febril del macho. Si se observa aglutinación en un alto porcentaje de las muestras, hay que revisar las condiciones higiénicas y aspectos de salud, manejo y técnica de colección en los reproductores.
- La evaluación de motilidad de semen fresco o de semen descongelado requiere de un cierto entrenamiento y práctica. Como primer paso, recomendamos comparar la proporción de espermatozoides móviles de la de inmóviles, y decidir cuál predomina (más de 50%). Si predominan las células motiles, entonces hay que estimar cuánto más de 50% son: 60% ó 70% ó 80%. Es necesario repetir esta estimación en por lo menos 4 campos adicionales. Es muy importante recordar que la evaluación debe terminarse en pocos minutos debido a que la calidad del semen se deteriora rápidamente bajo el microscopio.
- En algunos casos, particularmente con semen diluido con diluyentes de larga duración, como Androhep® para semen porcino, las células espermáticas necesitan equilibrarse a aprox. +37°C en un vial pequeño, durante al menos 20 minutos, antes de mostrar completamente su motilidad. Después de completar su tiempo de incubación, las muestras pueden extenderse sobre un portaobjeto.



### Parámetros de medición de la velocidad del espermatozoide

PARAMETRO	SIMBOLO	DEFINICIÓN
Velocidad curvilínea	VCL	Velocidad del spz a lo largo de su trayectoria
Velocidad rectilínea	VSL	Distancia recorrida por el spz entre el primer punto y el último de su trayectoria
Velocidad media	VAP	Velocidad media del spz en su trayectoria
Movimiento lineal	LIN	VCL/ VSL
Movimiento lineal marcado	STR	VSL/ VAP
Movimiento de oscilación	WOB	VAP/ VCL
Recorrido curvilíneo	DCL	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del spz en su trayectoria curvilínea
Recorrido medio	DAP	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del spz en su trayectoria recta
Recorrido en línea recta	DSL	Desplazamiento efectuado por la cabeza del spz en su trayectoria recta
Desvío promedio de la cabeza	ALH	
Desvío promedio de orientación	AOC	
Radio del trayecto de la célula	RADIUS	
Frecuencia de batido de la cabeza	BCF	Frecuencia de movimiento de la cabeza

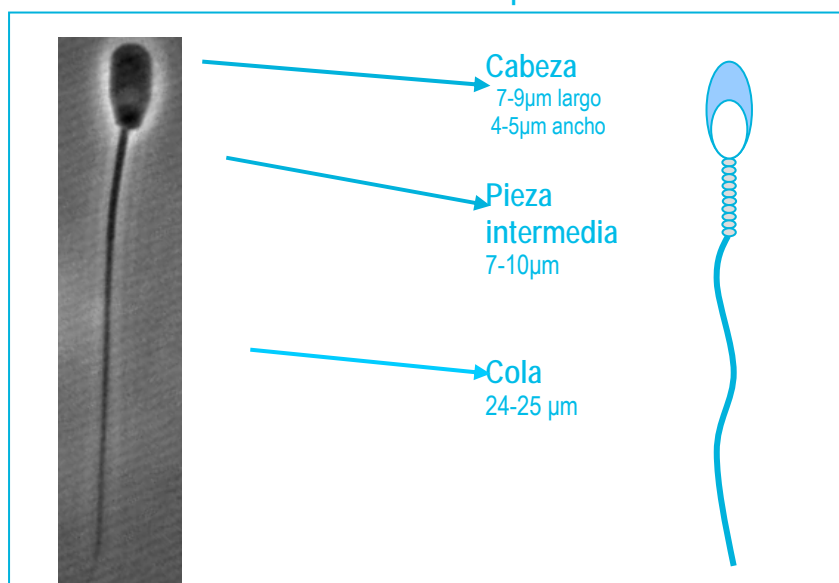


#### 4. La célula espermática

##### 4.1. Estructura

- El espermatozoide está formado por

Foto 1. Estructura del espermatozoide



1. **CABEZA.** Contiene el núcleo con la mitad de los cromosomas del futuro embrión. Entre el núcleo y la membrana del espermatozoide se encuentra el acrosoma, que tiene forma de saco fino y que contiene las enzimas necesarias para la fertilización del ovocito
  2. **PIEZA INTERMEDIA.** Localizada debajo de la cabeza espermática, formada por las mitocondrias que se encargan de proporcionar la energía al espermatozoide
  3. **COLA.** Permite que el espermatozoide se mueva, es muy importante para que pueda llegar al ovocito y penetrarlo
- Cuando aparecen anomalías en la estructura de la célula espermática, ésta no es viable. Si el porcentaje de anomalías es elevado, el verraco será infértil o estéril.



Foto 2. Morfoanomalías del espermatozoide de verraco

Cabeza suelta

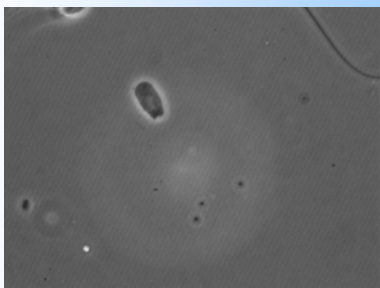


Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Acrosoma dañado

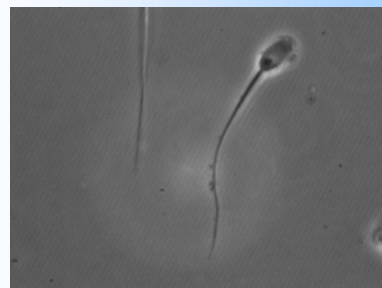


Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Cola en látigo

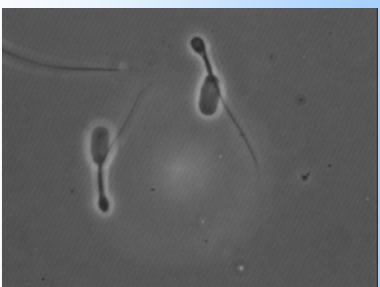


Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Gota citoplasmática proximal



Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Gota citoplasmática distal

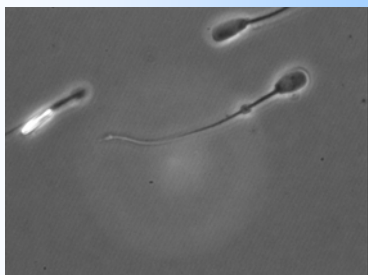


Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Contaminación y Aglutinación

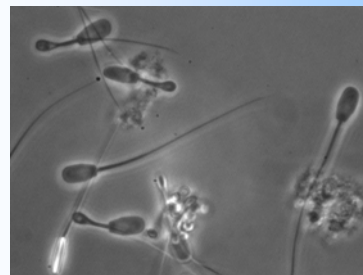


Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

## Análisis de semen de verraco mediante SpermVisión®

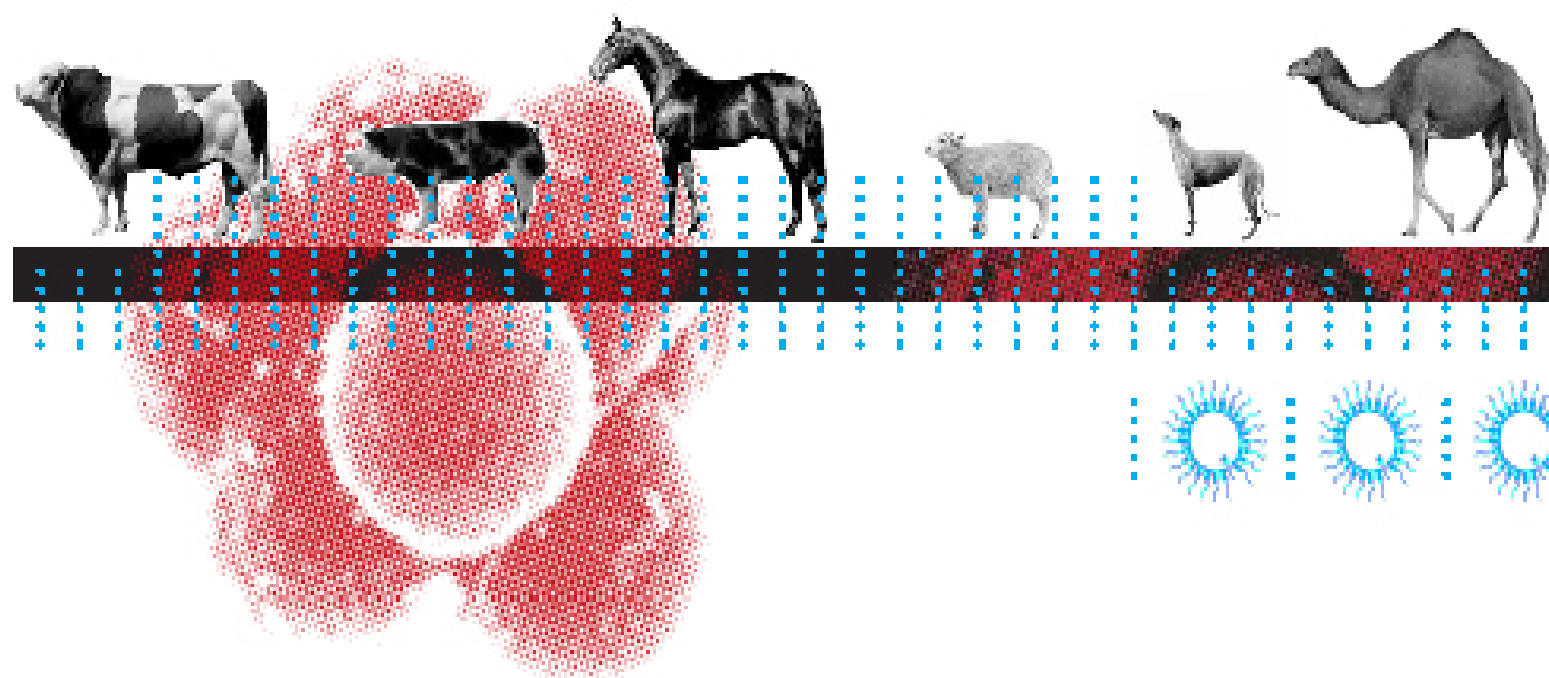
### Preparación de la muestra

#### Preparación general

1. Prepare una cantidad suficiente de diluyente y entíbielo con un agitador magnético temperado o en un baño-maria a +38°C.
2. Controle el correcto funcionamiento y el ajuste de todos los equipos.
3. Lleve todos los materiales que entrarán en contacto con el diluyente y el eyaculado a +38°C.

#### Medición

1. Abra la ventana Análisis Sperm Vision®.
2. Mantenga preparadas las cámaras de recuento sobre la platina temperada.
3. Invierta el eyaculado al menos tres veces para mezclarlo.
4. Aspire 810 µl de diluyente con la pipeta electrónica. Asegúrese de que el diluyente aspirado esté libre de burbujas de aire en el extremo de la punta.
5. Aspire con la pipeta electrónica 90 µl de semen desde el centro del eyaculado. Asegúrese de que la pipeta no se contamine con semen y que la punta no haya aspirado espuma del semen.
6. Aspire una burbuja de aire al interior del extremo de la punta. Limpie la punta a su alrededor con un papel absorbente.
7. Posicione el extremo de la punta cerca del fondo del tubo de muestra. Oprima un botón de la pipeta electrónica y manténgalo oprimido hasta que el semen y el diluyente haya sido expulsado, re-aspirado y re-expulsado por tres veces de la punta de la pipeta. Libere el botón para dar término al proceso de mezclado.
8. Colecte 2,5 µl de la muestra del tubo de examen con una pipeta de 10 µl.
9. Posicione la punta de la pipeta cerca del punto de carga de la cámara, impulse la muestra aspirada fuera del lumen de la punta y coloque la gotita formada en el extremo de la punta en el punto de carga marcado de la cámara. Mantenga la punta apoyada sobre el portaobjetos hasta que la cámara se haya llenado totalmente por capilaridad. El llenado debe ser continuado. Recoja un eventual exceso de líquido en el punto de carga con un papel absorbente.
10. Mida para cada análisis de semen al menos 7 campos localizados a lo largo del eje central de la cámara. No mida en los extremos aguzados anterior y posterior ni en las áreas marginales de la cámara. Inicie la medición en la parte ancha de la parte posterior de la cámara. Finalice la medición dentro de los 60 segundos siguientes a la carga de la muestra. Prepare una nueva cámara, si no ha iniciado la medición dentro de 20 segundos.
11. Invierta el tubo de la muestra por al menos tres veces si ya ha permanecido inmóvil por más de 30 segundos.



**Minitüb**

Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG  
Hauptstrasse 41  
84184 Tiefenbach - Germany



Our knowledge - Your success

Phone: +49 (0) 8709 9229 0  
Fax: +49 (0) 8709 9229 39  
E-Mail: [minitube@minitube.de](mailto:minitube@minitube.de)  
Internet: [www.minitube.de](http://www.minitube.de)