



Preparación alternativa de muestras del eyaculado de verraco para el análisis con AndroVision®

Julia Pable, Minitüb GmbH

La preparación correcta de la muestra es esencial para obtener mediciones de concentración y análisis de motilidad precisos y exactos. Uno de los pasos de la preparación de la muestra es la predilución del eyaculado, en la que se mezcla una muestra del eyaculado con diluyente en una proporción definida.

AndroVision® calcula la concentración de espermatozoides basándose en el factor de dilución introducido en el software. Por lo tanto, es fundamental que esta configuración refleje con precisión la dilución real, que se ve afectada por cualquier desviación en los volúmenes pipeteados.

Además, las lecturas de concentración se ven influidas por el número de células por campo. Un número demasiado reducido de células reduce la fiabilidad estadística, mientras que un número excesivo puede provocar solapamientos, dificultar el recuento preciso y afectar negativamente a la evaluación de la motilidad. Por lo tanto, el recuento de espermatozoides recomendado por campo es de 200 a 500 células.

Este informe presenta un método alternativo para la preparación de muestras en un laboratorio de producción de semen de verraco para su uso con el sistema AndroVision® con cámaras de recuento de 20 µm. El método se basa en el uso de viales de muestras eFlow. En comparación con la preparación tradicional, la preparación alternativa ofrece varias ventajas prácticas y analíticas:

- Mayor volumen de muestra
 - Menores errores de pipeteo gracias a una mayor exactitud y precisión (véase el ejemplo)
 - Menor sensibilidad a las fluctuaciones de temperatura durante el manejo
- Diseño del vial eFlow
 - La geometría optimizada garantiza una mezcla más eficiente de la muestra

Comparación de métodos de preparación de muestras

A continuación se describen los procedimientos para los métodos convencionales y alternativos.

Flujo de trabajo paso a paso, ejemplo con una dilución 1+9:

	Preparación tradicional	Preparación alternativa
Precalentamiento	Precalentar todos los materiales, el diluyente y la platina del microscopio a 38°C	
Mezcla de la eyaculación	Invertir 5 veces	
Pipetear el diluyente	810 µl con pipeta electrónica	6300 µl con Multipette®
Pipetear el eyaculado	90 µl con pipeta electrónica	700 µl con pipeta electrónica
Burbuja de aire	Extraer la burbuja de aire	
Limpieza de la punta	Limpiar la punta de la pipeta	
Mezcla	Mezclar de la muestra prediluida en el vial con la función de pipeta	Eyaculado y diluyente mezclados en un vial eFlow con la función de pipeta
Mezcla	Mezclar el vial 5 veces por inversión (sin agitar)	Mezclar el vial 5 veces por inversión con tapón (sin agitar)
Cargar la cámara	Pipetear ~3 µl en la cámara de recuento	
Medición	Realizar el análisis con AndroVision® en un plazo de 60 segundos	



Imagen 1: Multipette® con Combipip® 50 ml



Imagen 2: Pipeta electrónica

Dilución

Tasas y volúmenes de dilución recomendados para obtener entre 200 y 500 espermatozoides por campo:

Tasa de dilución	Concentración del eyaculado Mín. - Máx. (millones/ml)	Volumen del eyaculado (μl)	Volumen del diluyente (μl)
1+4	120 – 300	1500	6000
1+6	165 – 420	1000	6000
1+9	240 – 600	700	6300
1+12	320 – 780	500	6000
1+19	500 – 1200	350	6650

Precisión de pipeteo

Al preparar muestras de un eyaculado, la exactitud y precisión de las pipetas son fundamentales, especialmente para volúmenes pequeños.

La calidad de una pipeta se define por dos parámetros: la exactitud y la precisión. La exactitud describe la proximidad del volumen suministrado por la pipeta al volumen real o deseado. Una pipeta de alta exactitud suministra un volumen muy cercano al volumen establecido.

La precisión describe la consistencia de la pipeta cuando se utiliza repetidamente en las mismas condiciones. Una pipeta de alta precisión suministra casi el mismo volumen cada vez, incluso si se desvía ligeramente del valor real.

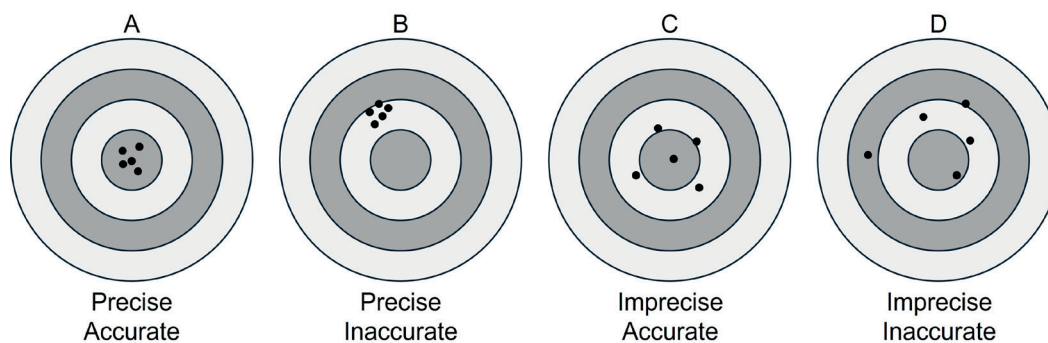


Imagen 3: Ilustración de la exactitud y la precisión en el pipeteo. (A) Las mediciones precisas y exactas se agrupan estrechamente alrededor del objetivo real. (B) Las mediciones precisas pero inexactas son consistentes, pero se desvían sistemáticamente. (C) Las mediciones imprecisas pero exactas varían mucho, pero su promedio se aproxima al valor real. (D) Las mediciones imprecisas e inexactas están dispersas y lejos del objetivo.

Tomando como ejemplo la pipeta electrónica y la Multipipette®, las especificaciones del fabricante en cuanto a exactitud y precisión varían en función del volumen objetivo.

Pipeta electrónica, 1 ml	Exactitud (%)	Precisión (%)
90 μl	> ±3 %	> ±0,6 %
700 μl	±0,8 %	±0,18 %
810 μl	±0,8 %	±0,17 %

Pipeta electrónica, 2 ml	Exactitud (%)	Precisión (%)
90 μl	> ±3 %	> ±0,6 %
700 μl	±1,6 %	±0,35 %
810 μl	±1,3 %	±0,3 %

Multipipette® con punta de 50 ml	Exactitud (%)	Precisión (%)
6000 μl	±0,3 %	±0,5 %

Multipipette® con punta de 10 ml	Exactitud (%)	Precisión (%)
6000 μl	±0,4 %	±0,25 %

Esto demuestra que pipetear volúmenes más pequeños introduce un error relativo mayor, lo que debe tenerse en cuenta al diseñar protocolos de preparación de muestras. El uso de volúmenes mayores para la dilución inicial reduce los errores de pipeteo, lo que mejora la fiabilidad de las mediciones con AndroVision®.

Ejemplo de cálculo del efecto de los errores de pipeteo

Un eyaculado con una concentración de 421 millones/ml corresponde a 350 espermatozoides por campo, suponiendo una precisión de pipeteo ideal en una dilución 1+9.

El impacto potencial en la medición de la concentración final puede demostrarse suponiendo que todas las pipetas funcionan con su error máximo en términos de exactitud. Para introducir el máximo error posible, las dos pipetas se desvían del volumen objetivo en direcciones opuestas, es decir, la pipeta para el eyaculado pipetea más, y la pipeta para el diluyente pipetea menos.

En la preparación convencional, los volúmenes objetivo son 90 µl de eyaculado y 810 µl de diluyente. Con errores máximos de pipeteo de +3 % y -0,8 %, respectivamente, esto corresponde a 92,7 µl de eyaculado y 803,52 µl de diluyente, lo que da lugar a una sobreestimación de la concentración del +3,71 %.

Cuando se utilizan volúmenes de pipeteo mayores, como se sugiere en la preparación alternativa con viales de muestras eFlow, esta sobreestimación se reduce. Por ejemplo, en lugar de 700 µl de eyaculado, el volumen pipeteado puede ser de 705,6 µl, y en lugar de 6300 µl de diluyente, el volumen real puede ser de 6281,1 µl. En este caso, la concentración se sobreestima solo en un +1,1 %, lo que representa el error máximo posible debido a la exactitud de la pipeta.

Preparación de la muestra	90 + 810	700 + 6300
Error máximo del eyaculado	90 µl + 3 % = 92,7 µl	700 µl + 0,8 % = 705,6 µl
Error máximo del diluyente	810 µl - 0,8 % = 803,52 µl	6300 µl - 0,3 % = 6281,1 µl
En lugar de 350 espermatozoides/campo	363 espermatozoides/campo	354 espermatozoides/campo
En lugar de 420,84 millones/ml	436,47 millones/ml	425,65 millones/ml
Sobreestimación de la concentración	+ 3,71 %	+ 1,10 %

Si los errores máximos posibles se producen en la otra dirección (la pipeta para el eyaculado pipetea menos, la pipeta para el diluyente pipetea más), la concentración medida se subestima en un 3,86 % para la preparación tradicional de la muestra y en un 1,16 % para el método alternativo.

Conclusión

El método alternativo de preparación de muestras utilizando viales eFlow presenta claras ventajas con respecto a la preparación tradicional. Al emplear volúmenes de pipeteo mayores y una geometría de vial mejorada, este método reduce significativamente los errores de pipeteo y garantiza mediciones de concentración más fiables con AndroVision®, lo que lo convierte en el método recomendado para los centros de inseminación artificial porcina.

Materiales necesarios para el método alternativo

- 12510/0200 - Soporte para 5 viales de muestras eFlow para placa calefactora
- 12510/0100 - Vial eFlow para muestras de semen
- 12510/0101 - Tapón para vial de muestras (reutilizable)
- 12427/5065 - Multipette® E3
- Combitip® para Multipette®, 2 opciones:
 - 12427/5067 - Combitip® para Multipette®, 10 ml
 - 12427/5066 - Combitip® para Multipette®, 50 ml
- Pipeta mezcladora electrónica, 2 opciones:
 - 12050/0516 - Pipeta electrónica, 0,1-1 ml
 - 12050/0512 - Punta de pipeta 0,1-1 ml, 1000/bolsa
 - 12050/0513 - Punta de pipeta 0,1-1 ml, 96/rack
 - 12050/0517 - Pipeta electrónica, 0,2-2 ml
 - 12050/0554 - Punta de pipeta de 0,2-2 ml, 1000/bolsa
 - 12050/0555 - Punta de pipeta 0,2-2 ml, 60/rack



Imagen 4: Vial eFlow para muestras de semen