

Conteo Celular con Hematocitómetro

Uso Elemental del Hematocitómetro



Introduction

A pesar del enorme desarrollo tecnológico que ha tenido lugar en los laboratorios científicos, el conteo visual con hematocitómetro sigue siendo el método de conteo más extendido desde el siglo XIX.

El presente artículo se escribe con la intención de ayudar a realizar un conteo celular con un hematocitómetro o cámara de Neubauer a principiantes, y también a técnicos o investigadores experimentados que deseen recordar las bases del mismo.

Primero, describiremos cada una de las partes y los principios de funcionamiento del hematocitómetro.

En una segunda parte, se describe paso a paso cómo realizar un recuento celular con hematocitómetro para obtener unos resultados fiables.

NOTA : Durante

Materiales

Los elementos necesarios para realizar un recuento celular con hematocitómetro son los siguientes:

- a) muestra celular a medir
- b) hematocitómetro, o cámara de Neubauer
- c) microscopio óptico
- d) cubre objetos
- e) pipeta / micropipeta con puntas
- f) buffer para diluciones / PBS, en su caso

LA CÁMARA DE NEUBAUER, O HEMATOCITOMETRO.

Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor.

En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes.



Fig 1. Elementos necesarios para realizar un conteo celular con Hematocitómetro

En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular.

En el caso de cámara dobles, que son las más comunes, existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara.

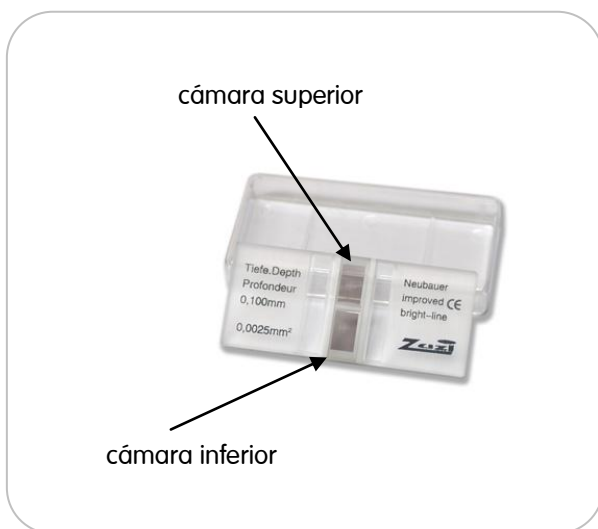


Fig 2. Cámara de Neubauer comercial



Fig 3. Pila de cubreobjetos, y caja.

La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado. Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno. Fig. 4 – 1

En caso de recuento de sangre, los cuadrados de las esquinas son los destinados al recuento de leucocitos. Al existir estos en menor número que los hematíes, se necesitan menos líneas de referencia para realizar el conteo.

El cuadrado central es el destinado al recuento de hematíes y plaquetas. Se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2 mm de lado (Fig.4-2) , y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños. Fig 4-3

El cuadrado central está por tanto formado por 400 cuadrados pequeños.

CUBREOBJETOS.

El cubreobjetos es un cuadrado de cristal de aproximadamente 22 mm x 22 mm. Debe colocarse sobre la cámara de recuento de forma que cubra la parte central de la cámara, delimitando un espacio entre la cámara y el cubreobjetos de 0,1 mm.

Es común que el cubreobjetos quede ligeramente levantado cuando aplicamos más líquido del necesario a la cámara. Para evitar esto, existen algunas cámaras que tienen dos pinzas especiales para evitar que el cubreobjetos se levante, y la distancia sea mayor de 0,1 mm.

PIPETA

Se trata de un instrumento de laboratorio que permite medir alícuota de líquido con bastante precisión. Típicamente han sido principalmente de vidrio, pero en la actualidad se utilizan ampliamente las micropipetas, que tienen puntas esterilizadas desechables. Las más habituales están calibradas para una capacidad máxima de 20, 200 y 1000 uL .

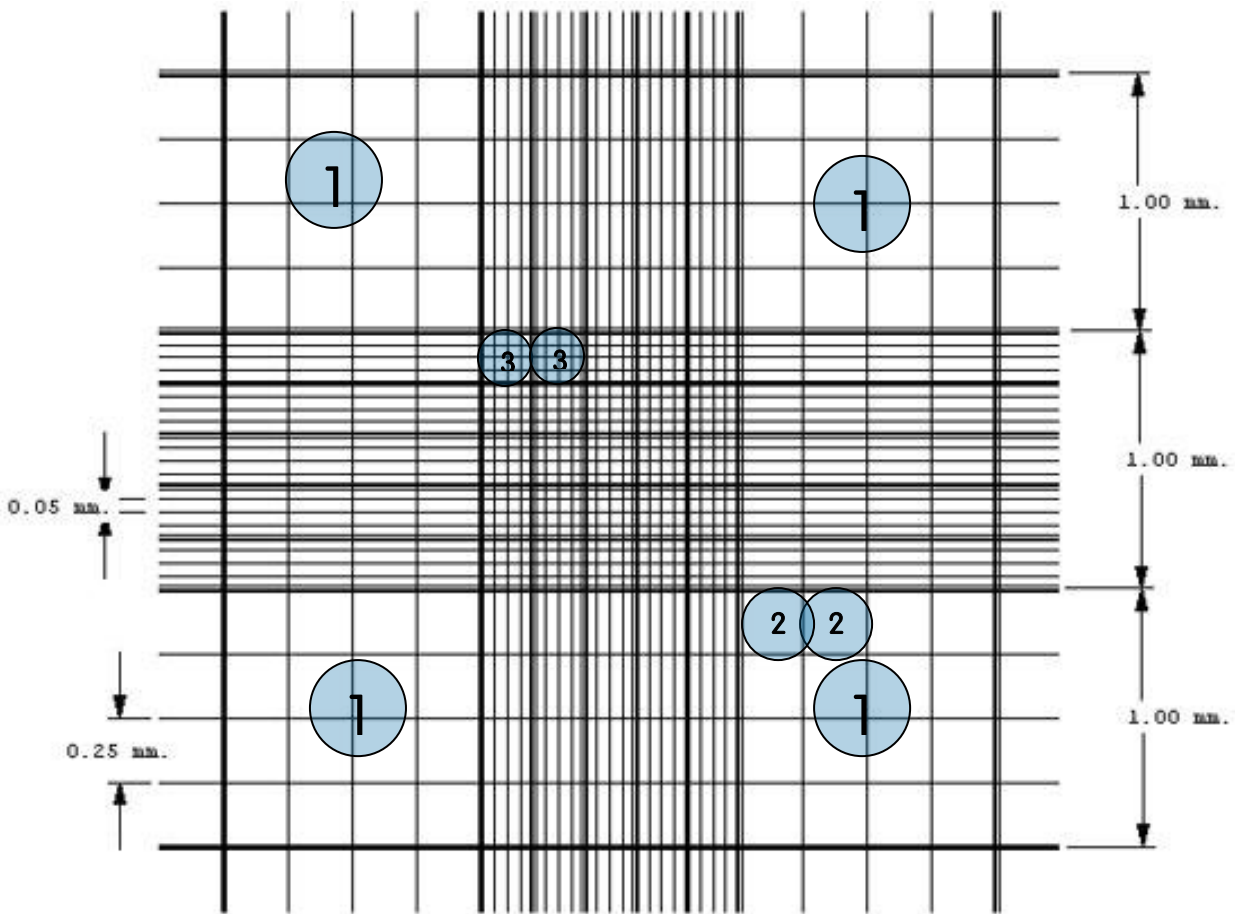


Fig 4. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer Improved.

Conteo Celular, paso a paso

PASO 1. Preparación de la muestra.

Dependiendo del tipo de muestra a medir, se ha de haber de preparar una muestra con una concentración apta para su recuento.

Típicamente, el rango de concentraciones que permite contar el hematocitómetro está entre 250.000 células y 2,5 millones de células por ml.

Intentaremos que la muestra tenga una concentración en torno a 10^6 (1 millón) aplicando las diluciones correspondientes.

Por debajo de 250.000 células / ml ($2,5 * 10^5$) la cantidad de células contadas no es suficiente para poder dar una estimación lo suficientemente fiable de la concentración celular¹

.....
 La concentración óptima para conteo en hematocitómetro es de 1 millón de células por ml = 10^6 células /ml

¹ Ver <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/conteo-celular-con-concentraciones-bajas.htm>, para una demostración estadística de por qué ocurre esto.

Por encima de 2,5 millones ($2,5 * 10^6$) la probabilidad de cometer errores de conteo crece demasiado, y también el tiempo y esfuerzo necesario para realizar un recuento con fiabilidad. Por encima de esta concentración es conveniente diluir la muestra para acercar la concentración al rango óptimo.

PASO 2. Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer

Se toman 10 uL de la mezcla preparada en el paso 1 con la micropipeta.

- 1) Se coloca un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, y se coloca en posición horizontal sobre la mesa, en un lugar donde nos sea cómodo pipetear.
- 2) se introduce una punta desechable en el extremo de la micropipeta,
- 3) se ajusta la micropipeta para succionar 10 uL de líquido. Generalmente este ajuste se realiza girando el botón del embolo para seleccionar el volumen deseado.
- 4) se introduce la punta de la micropipeta en la muestra
- 5) Se pulsa el pistón o embolo superior de la pipeta suavemente hasta que se siente como el pistón llega al final de su recorrido.
- 6) Se saca la punta de la pipeta de la muestra, y siempre manteniéndola en posición vertical se lleva hasta la cámara de Neubauer.
- 7) Se coloca la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer. Se trata de dejar que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad.
- 8) Se suelta el pistón suavemente mientras se supervisa que el líquido está entrando correctamente y de forma uniforme en la cámara. (ver Fig.5)
- 9) En caso de que aparezcan burbujas, el cubreobjetos se haya movido o algo no haya salido bien, repetir la operación

Ya tenemos la cámara de Neubauer cargada, lista para el recuento celular.

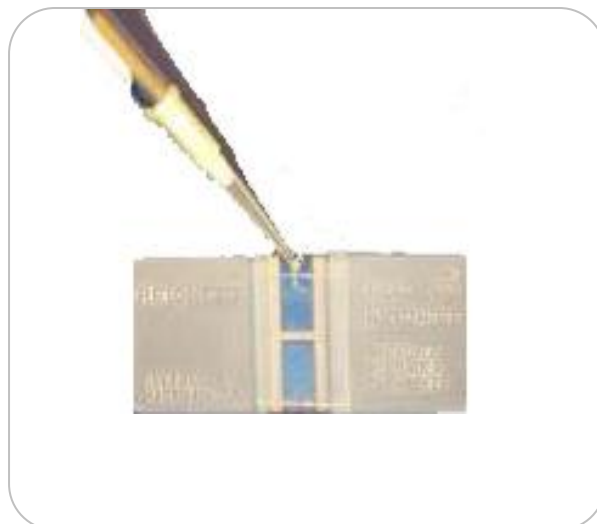


Fig 5. Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer

PASO 3. Preparación y enfoque del microscopio.

1. Colocar la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio. Si el microscopio dispone de pinza de sujeción, fijar la cámara con ella.
2. Encender la luz del microscopio.
3. Enfocar el microscopio hasta que pueden verse nítidas las células mirando por el binocular.
4. Buscar el primer cuadro donde vaya a realizarse el recuento. En este ejemplo vamos a contar 5 cuadros grandes de una cámara de Neubauer Improved de 0,1mm de profundidad. Ver Fig. 8

Ver

<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/easy-formula-for-manual-cell-counting.htm>, para ver las fórmulas a aplicar en cada una de las cámaras de recuento más comunes.

5. Realizar el recuento de células en el primer cuadro.

Existe una convención por la cual si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho.

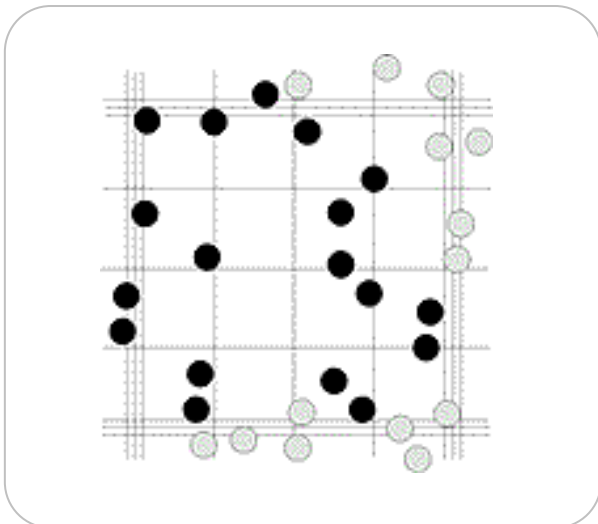


Fig. 6. Conteo de un cuadro grande de cámara de Neubauer.

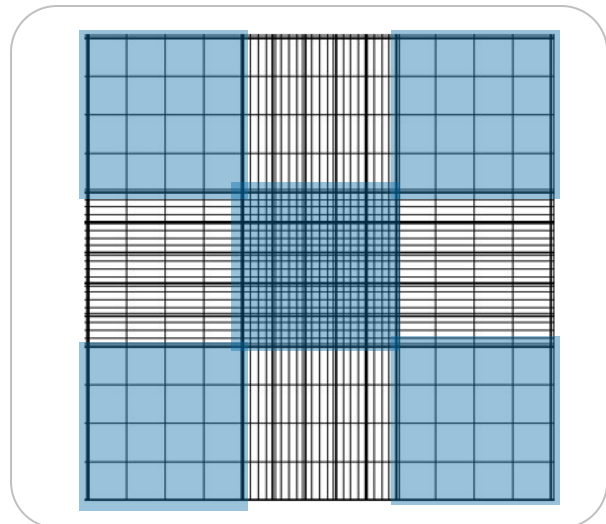


Fig. 8. Recuento de 5 cuadros grandes de cámara de Neubauer Improved.

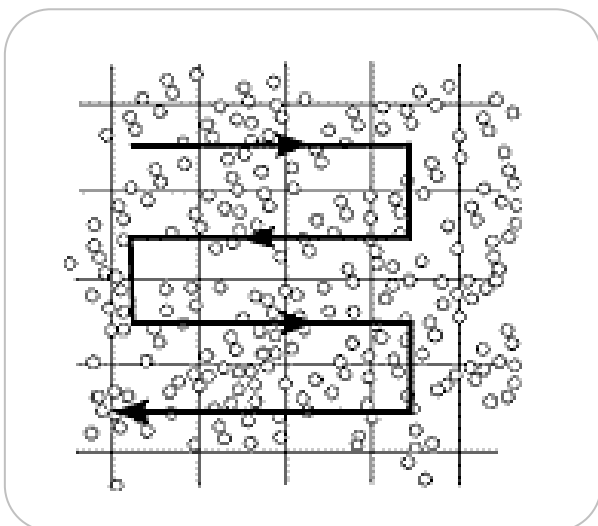


Fig. 7. Recuento con alta concentración celular.

En caso de que la concentración celular sea muy alta, y sea fácil perderse en el recuento, se suele utilizar un orden de conteo en forma de zig-zag, como el descrito en la Fig.7

6. Anotar en una hoja de resultados la cantidad de células contadas en el primer cuadro.
7. Repetir el proceso para el resto de los cuadros que deseamos contar, anotando el resultado de cada uno de ellos. Cuantos más cuadros contemos, más precisión obtendremos en nuestra medida.

PASO 4. Cálculo de la concentración.

Aplicamos la fórmula del cálculo de concentración celular.

$$\text{Concentración (cel / ml)} = \frac{\text{número de células}}{\text{Volumen (en ml)}}$$

El número de células es la suma de todas las células contadas en todos los cuadros.

El volumen es el volumen total de todos los cuadros donde hemos hecho el recuento.

Como el volumen de 1 cuadro grande es :

$$\begin{aligned} 0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} &= 0,01 \text{ cm}^2 \text{ de superficie} \\ 0,01 \text{ cm}^2 \times 0,1 \text{ mm (profundidad)} &= \\ 0,01 \text{ cm}^2 \times 0,01 \text{ cm} &= 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml} \end{aligned}$$

La formula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10.000}{\text{número de cuadros}}$$

En el caso de que hayamos aplicado una dilución, deberemos transformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra

original.

En este caso tendremos que dividir el resultado por la dilución aplicada.

La fórmula quedará :

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10.000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Ejemplo:

Para una dilución de 1 : 10. Dilución = 0,1

Para una dilución de 1 : 100, Dilución = 0,01

Error

Errores de hasta 20% y 30% son comunes con este método de recuento debido al pipeteo, a los errores estadísticos por ser la muestra poco representativa, errores del volumen de muestra realmente introducido en la cámara, etc.

Sin embargo, el hematocitómetro sigue siendo uno de los métodos mas ampliamente utilizados en los laboratorios de todo el mundo.

Para acceder a un análisis detallado del error que se está cometiendo en un recuento determinado acceda a:

<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articulos/cell-count-error.htm>