



Cámara de recuento:

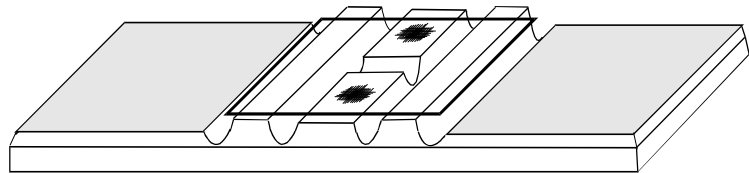
1) Qué es una cámara de recuento y dónde se utiliza?

La cámara de recuento es un aparato de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de recuento se utilizan principalmente para el análisis de sangre (recuento de leucocitos, eritrocitos, trombocitos) y recuento de células en el liquor. Además las cámaras de recuento sirven para contar bacterias, espermatozoides y esporas de hongo.

2) El principio de construcción:

Todas las cámaras de recuento muestran el mismo principio de construcción.

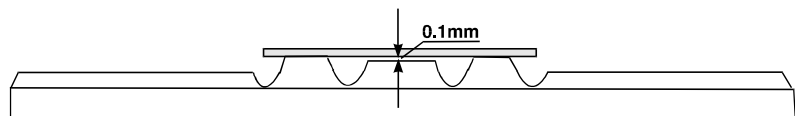
Dentro de una rectangular placa de vidrio óptico especial del tamaño de un portaobjetos se encuentran en el tercio medio cuatro ranuras longitudinales, que son paralelas a los laterales cortos.



Las dos grandes superficies laterales no están tratadas y sirven para la rotulación.

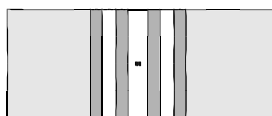
El soporte central y los dos soportes exteriores están planamente esmerilados y pulidos. La superficie del soporte central es un poquito más baja que la de los dos soportes exteriores. Los retículos de recuento están grabadas en el soporte central (fondo de la cámara).

Cuando se coloca un cubreobjetos sobre los soportes exteriores, se crea un espacio capilar entre la cara inferior del cubreobjetos y el soporte central de la cámara de recuento.

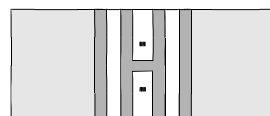


3) Modelo e identificación de las cámaras de recuento:

Modelo:



Modelo **simple** - soporte central sin división (un retículo de recuento)



Modelo **doble** - soporte central dividido (dos retículos de recuento)

Además, se diferencia:

- El modelo **normal**: el retículo de recuento está grabado directamente en el vidrio.



- El modelo de **líneas claras**: primero se recubre el fondo de la cámara con metal y luego el retículo de recuento está grabado en esta capa de metal.

Identificación:

En las dos superficies laterales, no tratadas, están indicadas las siguientes informaciones:

- El sistema del retículo
- El nombre y la marca registrada de Marienfeld Superior
- La profundidad de la cámara en milímetros
- La superficie del cuadrado más pequeño en mm²

4) Fabricación y explicaciones de calidad:

Las cámaras de recuento son aparatos de precisión e instrumentos in-vitro diagnosticos. Se utilizan principalmente en laboratorios médicos. Por eso un cámara recuento que es aplicada o distribuida en la Union Europea tiene que ser aprobada y marcada con el símbolo CE.

Todas las cámaras de recuento vendidas por la empresa Marienfeld se fabrican de acuerdo a los requisitos de la Ordenanza de Verificación alemana y la norma DIN.

Fabricación de cámaras de recuento de sangre:

La fabricación sólo se describe brevemente. Se compone de diferentes pasos parciales, controles intermediarios y un final control de calidad.

El campo central (el fondo de la cámara) y los dos campos exteriores son esmerilados y pulidos. Hay que prestar especial atención que estas superficies quedan absolutamente planas y la profundidad exacta. Los requerimientos están fijados en la norma DIN 12874. El campo central está bajado según la división del respectivo sistema (por ejemplo Neubauer 0,1 mm). Se fabrican varias profundidades estandar y especiales (p.ej. 0,2; 0,5; 0,01 y 0,02 mm).

Después de estos pasos se graba la división (del retículo en cuestión) en el campo central y seguido se realizan los procesos de impresión y secado al horno. Un control final muy rígido que cumple con las exigencias de las normas DIN y la Oficina alemana de Contraste termina la fabricación.

Exigencias al control de calidad:

Las diferencias límites según la norma DIN 12847:

- la profundidad de la cámara en la zona del retículo ± 2 % del valor nominal
- las distancias inferiores a 0,4 mm entre las líneas del retículo ± 2 μm
- las distancias superiores a 0,4 mm entre las líneas del retículo $\pm 0,5$ % del valor nominal
- los ángulos de la división del retículo ± 1 grado
- la anchura de las líneas de división no debe de ser superior a 5 μm

La tolerancia de planeidad, según DIN 7184, parte 1:

- el fondo de la cámara en la zona del retículo de recuento 2 μm
- la superficie de apoyo 2 μm
- las láminas cubreobjetos 3 μm (según DIN 58884)



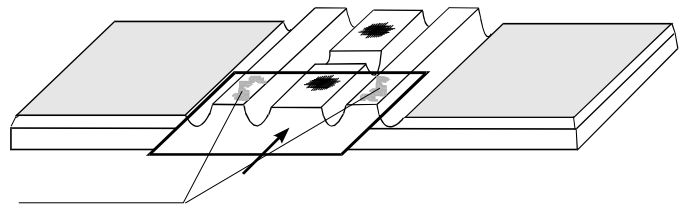
5) Llenado de la cámara de recuento:

Posicionamiento del cubre-objeto:

Los soportes exteriores se humedecen con agua destilada. Luego se coloca el cubre-objeto a suave presión desde delante sobre la cámara de recuento.

¡Atención: Peligro de rotura del cubre-objeto!

La creación de líneas de interferencia (anillos de Newton) entre los soportes exteriores y el cubre-objeto indica que el cubre-objeto está colocado correctamente.



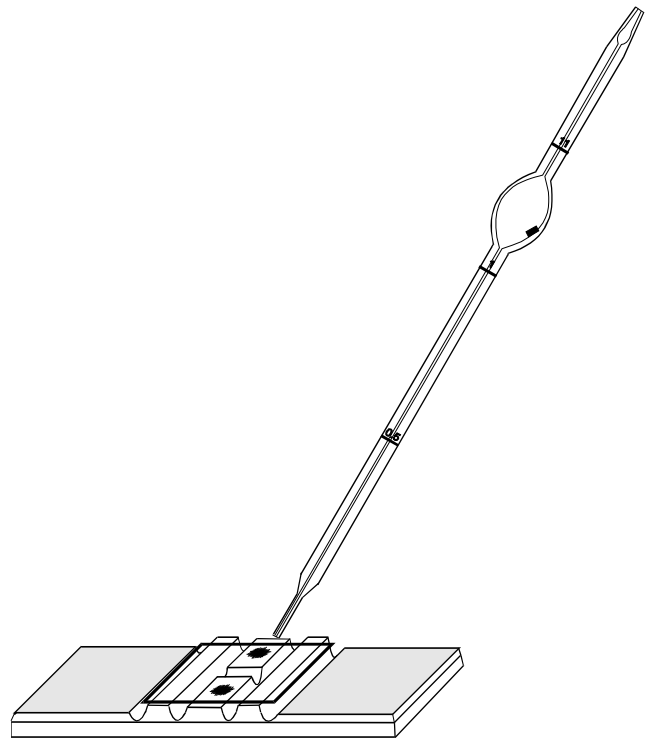
Cargar:

La pipeta bien mezclada se quita del agitador y se tiran las primeras gotas.

Limpia y secar la pipeta por fuera y mantenerla inclinada hasta que se haya formado una pequeña gota en la punta.

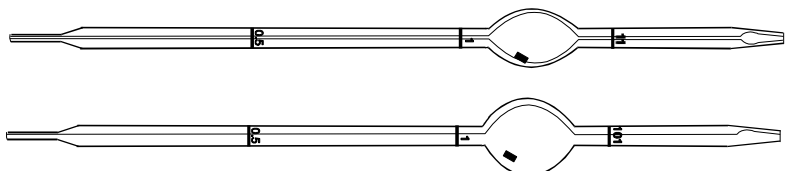
Esta gota se sitúa en el punto entre el cubre-objeto y la cámara de conteo.

Por efecto de capilaridad el espacio entre el cubre-objeto y el fondo de la cámara se llena. Antes de que la solución de sangre pueda desbordar esta parte de la cámara, se debe retirarla. Si hay burbujas de aire o si se ha desbordado líquido a las ranuras, la cámara tiene que ser limpiada y nuevamente cargada.



Pipetas mezcla-sangre utilizadas:

- Pipeta de leucocitos (perla blanca)
- Pipeta de eritrocitos (perla roja)





6) Recuento de las partículas:

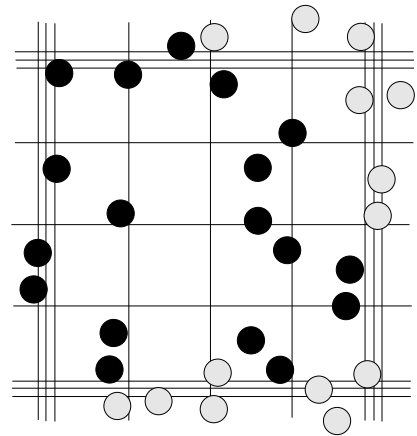
Técnica de recuento:

El recuento requiere un exacto conocimiento de las líneas del retículo de la respectiva cámara de recuento. En la ilustración se ve las líneas triples del sistema Neubauer mejorado.

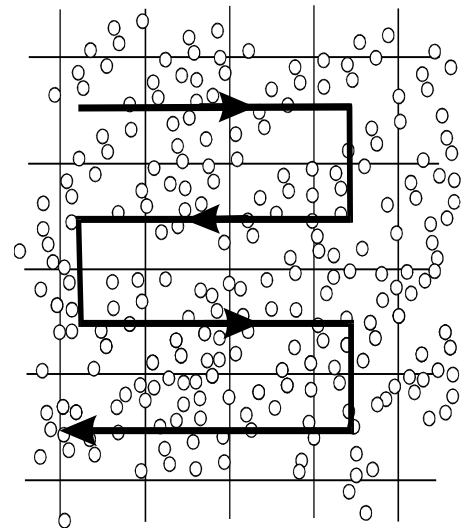
Para que las células, que están **encima** o **cerca** de las líneas de limitación, no se cuenten dos veces o se olvidan en el recuento, hay que cumplir determinadas reglas (p.ej., véase la ilustración derecha).

Se cuentan todas las células que se encuentran dentro de una definida zona de medición.

También se cuentan las células (marcadas en negro) que tocan o están encima de 2(!) líneas en un lado, p.ej. en la línea de medida izquierda y superior.



Esto también es válido para el tipo de operación de recuento que debe realizarse en forma de meandro. El recuento empieza en el ángulo superior izquierdo en dirección de la flecha.



Comentarios acerca del recuento:

a) En todos los recuentos con cámaras, el diagrama del condensador en el microscopio deberá estar cerrado en gran parte.

b) La diferencia de las células contadas entre los cuadrados grandes y los cuadrados de grupos no deberá ser superior a 10 células.

c) En todos los recuentos de células, hay que realizar dobles determinaciones. Después del recuento del retículo superior, se recuenta como control también el retículo inferior. Hay que tener en cuenta que la cámara no esté reseca. Esto se puede evitar si se llena la cámara inferior justo poco antes del recuento y se recuenta después del tiempo de sedimentación.



d) La diferencia entre las sumas de los recuentos de ambos retículos de recuento no debe ser superior a 10 células. El valor intermedio de los recuentos se aplica luego en la fórmula de cálculo o se multiplica con el factor correspondiente.

7) Cálculo:

Fórmula:

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{Superficie recontada (mm}^2\text{) x profundidad de la cámara (mm) x dilución}} = \text{células por 1 } \mu\text{l de sangre}$$

Ejemplo: Cámara: Neubauer improved

a) Leucocitos

1. Células recontadas 161 leucocitos
2. Superficie recontada 4 cuadrados (= 4 x 1 mm²) = 4 mm²
3. Profundidad de la cámara 0,1 mm
4. Dilución 1 : 20

$$\frac{161}{4 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times 1/20} = \frac{161 \times 20}{4 \times 0.1 \times 1 \mu\text{l}} = 8050 \text{ leucocytes per } 1 \mu\text{l of blood}$$

b) Eritrocitos:

1. Células recontadas 507 eritrocitos
2. Superficie recontada 5 cuadrados (= 5 x 0,04 mm²) = 0,2 mm²
3. Profundidad de la cámara 0,1 mm
4. Dilución 1 : 200

$$\frac{507}{0.2 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times 1/200} = \frac{507 \times 200}{0.2 \times 0.1 \mu\text{l}} = 5.07 \times 10^6 / 1 \mu\text{l}$$



8) Limpieza de las cámaras de recuento:

Inmediatamente después del recuento realizado, se retira el cubre-objeto y se limpia la cámara con agua o - en caso de necesidad - con un suave detergente. A continuación, la cámara se seca con un paño blando o se lava con acetona.

9) Breve descripción de la cámara de recuento:

Los diferentes sistemas de cámaras de recuento se diferencian por el modelo del retículo de recuento y la profundidad de la cámara. El retículo está compuesto de una división cuadrada que sólo se puede ver debajo del microscopio (aprox. 100 aumentos). A continuación se describe la cámara de recuento más utilizada:

Neubauer-improved:

Cuadrado grande: 1 mm²
Cuadrado de grupo: 0,04 mm²
Cuadrado pequeño: 0,025 mm²

Esta es la cámara preferida hoy en día. La **profundidad de la cámara = 0,100 mm**. La división del retículo de esta cámara muestra 3x3 cuadrados grandes de una superficie de 1 mm² cada uno.

Los 4 cuadrados en las esquinas se utilizan para el recuento de los leucocitos.

El gran cuadrado en el centro está adicionalmente dividido en 5x5 cuadrados de grupo con una longitud lateral de 0,2 mm cada uno y una superficie de 0,04 mm² cada uno. A su vez, los cuadrados de grupo están subdivididos en 16 cuadrados pequeños de 0,0025 mm² cada uno.

Cinco de estos cuadrados de grupo se utilizan para el recuento de eritrocitos.

Merece especial atención el hecho de que la cámara muestre triples líneas de límite por todos los lados. De ellos la línea central (!) ha de considerarse la mayor línea de medida. Esto es importante para decidir si las células que están en la zona límite, tienen que ser contadas o no.



10) Por qué las cámaras de recuento mantienen su importancia en el laboratorio a pesar de contadores eléctricos:

- Para un laboratorio pequeño no vale la pena comprar caros aparatos electrónicos.
- Las cámaras de recuento son imprescindibles para p.ej. el recuento de células de liquor ó de efusiones, recuento de huevos de gusanos, bacterias o esporas del moho.
- En caso de pocos trombocitos los instrumentos electrónicos son menos exactos que las cámaras de recuento.

Posibles fuentes de errores:

- la cámara de recuento no está limpia
- el cubre-objeto no está correctamente puesto (no hay anillos de interferencia)
- hay burbujas de aire en la cámara
- la cámara está demasiado llena
- el tiempo de sedimentación es demasiado corto
- el cubreobjetos no es correcto. Laminillas para la microscopía standard son demasiado delgadas y tuercen debido a las fuerzas capilares

Contadores eléctricos:

- son usados en laboratorios mayores (altos gastos de inversión)
- **Desventaja:** Los tipos de células solamente se diferencian por tamaño. Por eso puede haber errores a causa de partículas de polvo ó pelusas.
- **Ventaja:** Por el rápido recuento y la evaluación de muchas partículas hay menos errores estadísticos. En procesos de recuento se tiene en cuenta el error estadístico:

Fórmula: error estadístico = $1 : n$

con $n = 100$ de células contadas $1:100 = 0,1 = 10 \%$
con $n = 10.000$ células contadas $1:10.000 = 0,01 = 1 \%$

All information on this document reflects our current state of knowledge and is intended to inform customers about our products and possible applications for them (errors and printing errors excepted).