شمارش گلبول سفید – لام نئوبار

هدف : شمارش گلبول سفید در یک میلیمتر مکعب خون

وسایل مورد نیاز:

- لام هموسیتومتر(بهتر است نئوبار باشد)
- لامل سنگین
- پیپت ملانژورسفید
- لوله لاستیکی (مکنده)حدود ۲۵ سانتیمتر
- محلول رقیق کننده ی مارکانو یا تورک (۲ mlاسید استیک + ۹۸ mlآب مقطر)
- محلول کریستال ویوله یا بلودومتیلن٪۱
- میکروسکوپ ، پنبه الکل و لانست

لام نئوبار یا توما:

از دو مستطیل شفاف در وسط تشکیل شده است که دارای درجه بندی برای شمارش گلبول سفید و قرمز است. هر مستطیل در زیر میکروسکوپ به صورت یک مربع ۳ میلیمتری که به ۹ مربع ۱ میلیمتری تقسیم شده است مشاهده می شود. مربع هایی که در چهارگوشه قرار دارند مسئول شمارش گلبول سفید می با شند و مربعی که در وسط قرار دارد دارای تقسیم بندی ریزی است که برای شمارش گلبول قرمز می باشد.

پیپت ملانژورسفید white bead in the bulb :

این پیپت برای رقیق کردن خون بکار میرود که درحباب آن یک مهره سفید وجود دارد، روی پیپت ملانژور سفید سه عدد ۰/۵ و ۱ و ۱۱ قرار دارد.

روش کار:

ابتدا نوک انگشت را توسط پنبه آغشته به الکل ضد عفونی می کنیم . بعد توسط یک ضربه لانست نوک انگشت را سوراخ کرده، خون جریان پیدا می کند و یک ملانژور سفید تمیز وخشک انتخاب می کنیم سپس ملانژور را افقی نگه می داریم و خون را تا علامت ۱ داخل ملانژورمی کشیم (اگر خون به

خوبی بالا نرفت لوله لاستیکی رابه ته ملانژور وصل می کنیم و سر دیگر لوله را دردهان می گذاریم نوک ملانژور را داخل خون می گذاریم و با دهان خون را بالا می کشیم).

نکته : چنانچه خون تا عدد ۰/۵ کشیده شود خون تا ۲۰ بار رقیق خواهد شد .

مهم است که از ورود حباب هوا به داخل ملانژور جلوگیری به عمل بیاوریم به این منظور ملانـژور را بـه طور کامل داخل خون می گذاریم.

خون نوک و اطراف ملانژور را با پنبه خوب پاک می کنیم

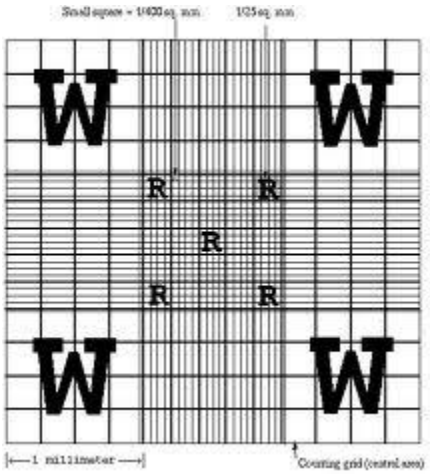
چند سی سی از محلول رقیق کننده (محلول مارکانو) را در یک شیشه ساعت میریزیم. نـوک ملانـژور را داخل محلـول مارکـانو قـرار مـی دهـیم و مـاده رقیـق کننـده را تـا ۱۱ بـه درون ملانـژور مـی کشـیم . لوله لاستیکی را از ملانژور جدا می کنیم. سر و ته ملانژور را بـین دو انگشـت شسـت و سـبابه نگـه مـی داریم. به مدت ده دقیقه محتوی ملانژور را مخلوط می کنیم. سپس ملانـژور را بـه مـدت ۵ دقیقـه روی شیکر(ویبراتور) قرار میدهیم.

توجه ! اگر بعد از این مدت محتوی ملانژو ر بلافاصله برای شمارش مورد اسـتفاده قرارنگیـرد مخلـوط کردن مجدد قبل استفاده ضروری است.

لام هموسیتومترتمیز را روی میز صاف و تراز قرار می دهـیم، لامـل سـنگین تمیـز را روی لام قـرار مـی دهیم، ملانژور را عمودی می گیریم، ۳ قطره اول محتوی ملانژور را دور می ریزیم. دلیل دور ریختن سه قطره اول این است که قسمت ابتدایی پیپت (زیر حبـاب) حـاوی سـلول خـونی نمـی باشـد. بـا گذاشـتن انگشت سبابه در ته ملانژور ریختن محتوی ملانژور را در اختیار می گیریم. یک قطره کوچک از محتوی ملانژور را توسط قراردادن نوک ملانژور در بین لام و لامل هدایت می کنیم بطوریکه مخلوط خون و ماده رقیق کننده به منطقه شمارش نفوذ کند، اگر ماده به درون شیارها نفـوذ کنـد بایـد لام را شسـته خشـک کرده مجدداً مورد استفاده قرار دهیم .

چند دقیقه لام را ثابت می گذاریم تا سلولها بی حرکت شوند. لام را زیر میکروسکوپ قرار میدهیم دیافراگم میکروسکوپ را کاملا بسته و با عدسی X۱۰ مورد مطالعه قرار می دهیم و چهار مربع بزرگ واقع در چهار گوشه صفحه مدرج را شمارش می کنیم.

گلبول های سفید به صورت سلول هایی گرد و کوچک در خانه ها پخش شده اند. تعداد گلبول ها را در هر چهار خانه یک میلی متری ۱۶ تایی شمارش کرده میانگین آنها را محاسبه می نماییم.



محاسبه تعداد گلبولهای سفید:

هر ضلع مربع بزرگ ۱ میلیمتر است .لام و لامل را چنان دقیق وماهرانه ساخته اند بطوریکه وقتی لامل روی لام قرار می گیرد دقیقا ارتفاع (فاصله) لام تا لامل ۰/۱ میلی متر می شود بنابراین حجم واقع دریک مربع بزرگ می شود یک دهم میلی مترمکعب .

چون گلبولها را در چهار مکعب مستطیل شمارش کرده ایم حجم چهارمکعب مستطیل می شود چهاردهم میلی متر مکعب. ضریب رقت بوسیله ملانژور ۱/۱۰ یا ۱/۲۰ است یعنی خون به نسبت یک به ده یا یک به بیست رقیق می شود .به عبارت دیگر ما گلبول های سفید خون رادرحجمی برابر با یک

بیست و پنجم (اگر خون تا عدد یک کشیده شده باشد) یا یک پنجاهم میلی متر مکعب (اگر خون تا عدد ۰/۵ کشیده شود)حساب می کنیم.

محاسبه کلی به صورت زیر می باشد:

(اگر خون تا عدد ۱ کشیده شود) تعداد گلبول های سفید در یک میلی متر مکعب خون = ۱۰ × ۱۰ × $\frac{W}{4}$

(اگر خون تا عدد ۰/۵ کشیده شود) تعداد گلبول های سفید در یک میلی متر مکعب خون = ۲۰ × ۱۰ × $\frac{W}{4}$

$\frac{W}{4}$: میانگین تعداد سلول ها در چهار خانه یک میلی متری ۱۶ تایی

عدد ۱۰ اولی ضریب تصحیح فاصله ۰/۱ میلی متری بین لام و لامل بوده و اعداد ۱۰ و ۲۰ بعدی ضرایب رقت می باشد.

- ✓ در نتیجه واضح است باید تعداد کل گلبولهای شمارش شده در چهار مربع (اگر خون تا عدد یک کشیده شده باشد) در عدد ۲۵ ضرب شود .
- ✓ تعداد کل گلبولهای شمارش شده در چهار مربع (اگر خون تا عدد ۰/۵ کشیده شده باشد) در عدد ۵۰ ضرب شود .

مثال: تعداد گلبولهای شمارش شده درچهار مربع بزرگ (که خون تا نیم کشیده شده است) واقع در چهارگوشه ۱۸۵ عدد می باشد بنابراین تعداد کل گلبولهای سفید خون ۹۲۵۰ عدد در میلی مترمکعب می شود.

مقادیر طبیعی گلبول های سفید

تعداد طبیعی گلبول های سفید ۴۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰در میلی متر مکعب خون می باشد. حالت کمتر از ۴۰۰۰ را لکوپنی و بیش از ۱۰۰۰۰۰ را لکوسیتوز می نامند.

حالات لکوپنی در بعضی از بیماری ها مانند حصبه، آنفلوانزا، مالاریا و یا در هنگام درمان با بعضی از داروها مثل کلرامفنیکل که تولید آنها را از مغز استخوان تضعیف می کنند ، دیده می شود.

لکوسیتوز در بچه های تازه متولد شده و تا سن یک سالگی امری طبیعی است . لوسمی حالت افزایش بسیار زیاد تعداد گلبول های سفید که ممکن است به ۱۰۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰۰ در میلی متر مکعب خون بالغ شود. در این حالت تعداد گلبول های نابالغ در خون محیطی زیاد است و به دو حالت میلوئید (افزایش نوتروفیل ها) و لنفوئید (افزایش لنفوسیت ها) دیده می شود. اشعه های رادیواکتیو یونیزه کننده مواد شیمیایی سرطان زا و عوامل ارثی ممکن است علت آن باشد.

منبع:

مجله اینترنتی آزمایشگاه آمثبت

روش کار آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

شمارش گلبول قرمز – لام نئوبار

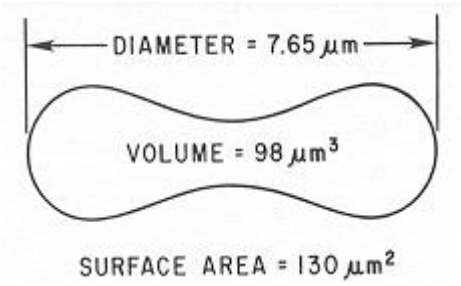
هدف آزمایش : **شمارش گلبول های قرمز**

مقدمه :

هدف از شمارش گویچه های خون، شمردن و تعیین تعداد گلبولهای قرمز در یک میلیمتر مکعب خون است.

گلبولهای قرمز (گویچه های سرخ) اریتروسیت و Red Blood-Cell (R.B.C) نیز نامیده می شوند. گلبولهای قرمز سلولهائی بدون هسته و به شکل صفحات مقعر الطرفین (دیسک مانند) می باشند. اندازه آنها ۷×۲ میکرون (شکل ۵-۱) و محل ساخته شدن آنها در افراد بالغ مغز استخوان می باشد. گلبولهای قرمز در زیر میکروسکوپ به رنگ زرد نارنجی دیده می شوند تعداد گلبولهای قرمز در تعداد گلبول های قرمز در نوزاد تازه متولد شده به ۶ تا ۷/۵ میلیون در میلی مترمکعب می رسد که ۲٪ تا ۳٪ آنها را رتیکولوسیت ها تشکیل می دهد که در مدت ۳-۲ ماه به حد بالغین کاهش می یابد .

در مردان جوان حدود ۴/۷ تا ۵/۵ میلیون و در زنان جوان ۵ تا ۵/۱ میلیون در میلی متر مکعب خون می باشد. شمارش بالاتر در مردان به علت اثر مثبت هورمون تستوسترون در تولید گلبول های قرمز می باشد.



شکل ۵-۱: گلبول قرمز

کار اصلی گلبولهای قرمز انتقال اکسیژن از ریه به بافت ها جهت متابولیسم است. همچنین انتقال بخشی از گازکربنیک بافت ها به ریه بوسیله گلبول های قرمز انجام می شود . گلبولهای قرمز یکی از عوامل تعیین کننده ویسکوزیته خون می باشند .

تعداد گلبولهای قرمز ممکن است افزایش یابد که به آن پلی سیتمی یا اریترمی می گویند که دو نوع است:

- **پلی سیتمی فیزیولوژیک که در اثر نیاز بدن به اکسیژن ایجاد می شود مثل زندگی در ارتفاعات.**
- **پلی سیتمی ورا (حقیقی) که در اثر سرطانی شدن سلولهای ایجاد کننده گلبولهای قرمز ایجاد می شود.**

اگر تعداد گلبولهای قرمز کم شود آنمی نام دارد. آنمی ممکن است بعلل گوناگون ایجاد شود که بطور خلاصه بشرح زیر است:

- **آنمی ناشی از خونریزی**
- **آنمی ناشی از آپلازی (از کار افتادن) مغز استخوان**
- **آنمی بعلت نارس بودن گویچه ها مثل آنمی پرنیسیوز که در اثر عدم جذب ویتامین B_{12} و اسید فولیک ایجاد می شود.**
- **آنمی ناشی از همولیز گویچه ها، انواع مختلف آنمی همولیتیک عبارتند از: آنمی میکروسیت(اسفروسیتوز) – آنمی داسی شکل (sickle cell) – تالاسمی (Cooley a)– اریتروبلاستوز جنینی**

اساس آزمایش :

رقیق کردن خون با محلول رقیق کننده و شمارش گلبول های قرمز در حجم مشخص خون

وسایل لازم برای انجام آزمایش

۱- لام هموسیتومتر(بهتر است نئوبار باشد)

۲- لامل سنگین

۳- پیپت ملانژور مخصوص گلبول های قرمز : این پیپت برای رقیق کردن خون به کار می رود . به طوری که خون را ۱۰۰ و یا ۲۰۰ بار می تواند رقیق نماید. بر روی ساقه باریک پیپت اعداد ۰/۵ و ۱ و پس از رسیدن به یک حباب بر روی ساقه بالایی عدد ۱۰۱ حک شده است . خون را می توان تا عدد ۰/۵ یا ۱ و به دنبال آن محلول رقیق کننده را تا عدد ۱۰۱ کشید. چنانچه خون تا عدد ۰/۵ کشیده شود خون تا ۲۰۰ بار و اگر تا عدد ۱ کشیده شود خون تا ۱۰۰ بار رقیق خواهد شد.

۴- لوله لاستیکی (مکنده) حدود ۲۵ سانتیمتر

۵- محلول هایم A

از این محلول برای رقیق کردن خون استفاده می شود که با گلبول های قرمز ایزوتونیک می باشد. مواد تشکیل دهنده آن عبارتند از :

بی کلرور جیوه – ۰/۵ گرم

کلرور سدیم – ۱ گرم

سولفات سدیم – ۵ گرم

آب مقطر – ۲۰۰ گرم

۶- میکروسکوپ ، پنبه الکل و لانست

روش انجام آزمایش :

ابتدا نوک انگشت را توسط پنبه آغشته به الکل ضد عفونی می کنیم . بعد توسط یک ضربه لانست نوک انگشت را سوراخ کرده، خون جریان پیدا می کند و یک ملانژور قرمز تمیز وخشک انتخاب می کنیم سپس ملانژور را افقی نگه می داریم و خون را تا علامت۰/۵ داخل ملانژورمی کشیم (اگر خون به خوبی بالا نرفت لوله لاستیکی رابه ته ملانژور وصل می کنیم و سر دیگر لوله را دردهان می گذاریم نوک ملانژور را داخل خون می گذاریم و با دهان خون را بالا می کشیم).

نکته : چنانچه خون تا عدد ۱ کشیده شود خون تا ۱۰۰ بار رقیق خواهد شد .

مهم است که از ورود حباب هوا به داخل ملانژور جلوگیری به عمل بیاوریم به این منظور ملانژور را به طور کامل داخل خون می گذاریم.

خون نوک و اطراف ملانژور را با پنبه خوب پاک می کنیم

چند سی سی از محلول رقیق کننده (محلول هایم) را در یک شیشه ساعت می ریزیم. نوک ملانژور را داخل محلول هایم قرار می دهیم و ماده رقیق کننده را تا ۱۰۱ به درون ملانژور می کشیم . لوله لاستیکی را از ملانژور جدا می کنیم. سر و ته ملانژور را بین دو انگشت شست و سبابه نگه می داریم. به مدت پنج دقیقه محتوی ملانژور را مخلوط می کنیم. سپس ملانژور را به مدت ۵ دقیقه روی شیکر(ویبراتور) قرار میدهیم.

توجه ! اگر بعد از این مدت محتوی ملانژو ر بلافاصله برای شمارش مورد استفاده قرارنگیرد مخلوط کردن مجدد قبل استفاده ضروری است.

لام هموسیتومترتمیز را روی میز صاف و تراز قرار می دهیم، لامل سنگین تمیز را روی لام قرار می دهیم، ملانژور را عمودی می گیریم، ۳ قطره اول محتوی ملانژور را دور می ریزیم. دلیل دور ریختن سه

قطره اول این است که قسمت ابتدایی پیپت (زیر حباب) حاوی سلول خونی نمی باشد. با گذاشتن انگشت سبابه در ته ملانژور ریختن محتوی ملانژور را در اختیار می گیریم. یک قطره کوچک از محتوی ملانژور را توسط قراردادن نوک ملانژور در بین لام و لامل هدایت می کنیم بطوریکه مخلوط خون و ماده رقیق کننده به منطقه شمارش نفوذ کند، اگر ماده به درون شیارها نفوذ کند باید لام را شسته خشک کرده مجدداً مورد استفاده قرار می دهیم .نوک ملانژور را به شیار بین لام و لامل نزدیک می کنیم ، خون رقیق شده به زیر لامل کشیده می شود . بعد لامل را کمی از دو طرف فشار میدهیم تا اگر مایع اضافی زیر لامل باشد ، به شیارهای دو طرف بریزد .

نکته : بعد از این مرحله ، لامل روی لام جابجا نشود .

نکته : در موقع پرکردن ملانژور توجه شود حباب یا فاصله بوجود نیاید .

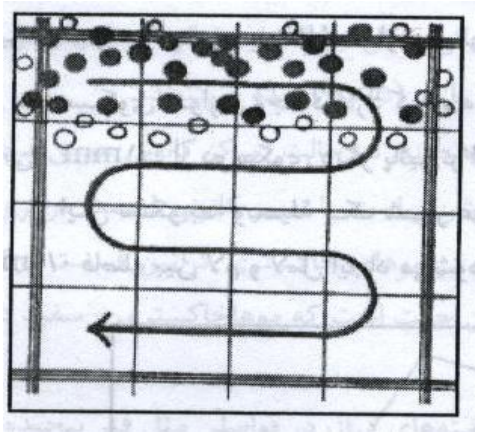
نکته : در زمان استفاده ، ملانژور و شیلنگ آن خشک باشند .

چون حدود ۴۵٪ حجم خون از سلولها تشکیل می شود که قسمت اعظم آنها گلبولهای قرمز هستند اگر خون را بطور مستقیم زیر میکروسکوپ نگاه کنیم گلبولها بهم فشرده هستند و شمارش آن غیر ممکن است . بدین جهت ابتدا خون را بوسیله مایع رقیق کننده مخصوص ۲۰۰ بار رقیق کرده سپس روی لام مخصوص شمارش گلبولی، بوسیله میکروسکوپ ، شمارش گلبولهای قرمز را انجام میدهیم .

برای شمارش گلبول های قرمز از مربع یک میلی متری وسط که ۴۰۰ بار تقسیم شده استفاده می نماییم . از آنجا که تعداد گلبول های قرمز خیلی زیاد است نمی توان در همه خانه های موجود در مربع یک میلی متری شمارش کرد و به جای آن از ۵ خانه ۱۶ تایی واقع در گوشه ها و مرکز مربع استفاده می کنیم و مجموع آنها را در عدد ۵ ضرب می نماییم.

لام را زیر میکرسکوپ گذاشته و با ابژکتیو ×۴۰ میزان می کنیم و با استفاده از پیچ های حرکت دهنده میکروسکوپ یک مجموعه ۱۶ تایی از مربع های کوچک موجود در یکی از گوشه های مربع اصلی را در

زیر میکروسکوپ تنظیم کرده و گلبولهای قرمز آن را بترتیب از راست به چپ و از بالا به پـائین بطـور زیگزاگی می شماریم (شکل ۶-۱) و یاداشت می کنیم .



شکل ۶-۱: نشست گلبولها و روش شمارش آنها

نکته : برای شمارش گویچه های موجود بر روی چهار ضلع اطـراف ایـن مجموعـه ، گویچـه هـای سرخ موجود بر روی یک ضلع افقی و عمودی را می شماریم و به عدد بدست آمده اضافه می کنیم . راه دقیق تر آن است که گلبول های موجود بـر روی هـر چهـار ضـلع را شـمرده و حاصـل را بـه دو تقسیم کنیم . دلیل این امر آن است که هر گلبول قرمزی که بر روی یک خط قرار گیرد نصـف آن متعلق به داخل مربع است .تعداد گویچه های سرخ مجموعه های ۱۶ خانه ای کوچک موجود در سه گوشه دیگر مربع اصلی و یک مجموعه ۱۶ تائی از وسط مربع بزرگ را به طریق فوق می شـماریم و یادداشت می کنیم . به این ترتیب تعداد گویچه های موجود در ۸۰=۱۶×۵ مربع کوچک را شمرده ایم .

روش محاسبه:

برای محاسبه، مجموع تعداد گلبول های قرمز موجود در ۵ خانه متوسط را ضربدر عدد ۵ می کنیم تا تعداد کل گلبول ها را در یک مربع بزرگ (یک میلی متری) بدست آوریم سپس عدد بدست آمده را در عدد ۱۰ (تصحیح ۰/۱ فاصله بین لام نئوبار و لامل) و سپس در عدد ۱۰۰ (اگر خون را تا ۱ بالا کشیده باشیم) و یا ۲۰۰ (اگر که خون را تا عدد ۰/۵ بالا کشیده باشیم) ضرب می کنیم .

(در صورتی که خون را تا عدد ۱ بالا بکشیم) تعداد سلول ها در یک میلی متر مکعب خون = ۱۰۰×۱۰×۵×R

(در صورتی که خون را تا عدد ۰/۵ بالا بکشیم) تعداد سلول ها در یک میلی متر مکعب خون = ۲۰۰×۱۰×۵×R

منبع :

سایت پارسیان لب

گزارش کار آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Cell Counting with Neubauer Chamber
Basic Hemocytometer Usage

Introduction

Despite the fact of the recent technical development of scientific laboratories, the Neubauer chamber remains the most common method used for cell counting around the world.
This article has been written in order to help newbies and experimented researchers to perform a proper cell counting using a Neubauer chamber or Hemocytometer.
The principles described in this article apply to any cell counting chamber, although the dimensions and volumes of each chamber may differ.
First, the parts and basic principle of the Neubauer chamber are described
Second, the article describes how to perform a cell count step by step, in order to achieve reliable and reproducible results. The article describes best practices and recommendations when performing a cell count.

Materials

The necessary elements to perform a cell count with Neubauer chamber are as follows:
a) cellular dilution to measure
b) hemocytometer, or Neubabuer chamber
c) optical microscope
d) cover glass
e) pippette / micropippete with disposable tips.
f) Dilution buffer / PBS (if needed)

THE NEUBABUER CHAMBER, OR HEMOCYTOMETER

The Neubauer chamber is a thick crystal slide with the size of a glass slide. (30 x 70 mm and 4 mm thickness)
In a simple counting chamber, the central area is where cell counts are performed. The chamber has three parts.

The central part, where the counting grid has been set on the glass.
Double chambers are most common than simple chamber. In this case, the chamber has two counting areas than can be loaded independently.

Cell count, step by step

STEP 1. Sample preparation.

Depending on the type of sample, a preparation of a dilution with a suitable concentration should be prepared for cell counting.
Typically, the concentration range for a cell count with Neubauer chamber is between 250.000 cells / ml and 2,5 million cells / ml.
It is recommended for the dillution concentration to be around 106 cells / ml (1 millón cells / ml) applying the required dilutions.

With concentrations below 250.000 cells per ml, (2,5 * 105 cells / ml) the amount of cells counted will not be enough to obtain a fair estimation of the original concentration. 1
Above 2,5 million cells / ml (2,5 * 106), the probability of counting errors increases as well as the time and effort required to achieve a reliable cell count.
Above 2,5 million, it is preferable diluting the sample to obtain a final concentration closer to the optimum 1 million per ml. It is important to write down the dilution performed to the original sample.

STEP 2. Introducing the sample into the Neubauer chamber

Take 10 µl of dilution prepare in STEP 1 with the micropipette.

1) Put the glass cover on the Neubauer chamber central area. Use a flat surface to place the chamber, like a table or a workbench.
2) Put a disposable tip at the end of the micropipette.
3) Adjust the micropipette to suck 10 µl. You can adjust it by turning the upper plunger roulette to select the required pipetting volume.
4) Introduce the micropipette tip on the dilution previously prepared (STEP 1)
5) Push the pipette plunger slowly until you feel it has arrived to the end of its travel.
6) Remove the pipette tip from the dilution, and bring it to the Neubauer chamber. When the pipette is loaded, it must always be held in vertical position.
7) Place pipette tip close to the glass cover edge, right at the centre of the Neubauer chamber.
8) Release the plunger slowly watching how the liquid enters the chamber uniformly, being absorbed by capillarity. See Fig. 5
9) In case of the appearance of bubbles, or that the glass cover has moved, repeat the operation
Congratulations!. The Neubabuer chamber has been loaded, and it is ready to perform the cell count.

STEP 3. Microscope set up and focus.

1. Place the Neubauer chamber on the microscope stage. If the microscope has a fixing clamp, fix the Neubauer chamber.
2. Turn on the microscope light.
3. Focus the microscope until you can see a sharp image of the cells looking through the eyepiece and adjusting the stage.
4. Look for the first counting grid square where the cell count will start. In this example, 5 big squares from a Neubauer-Improved chamber will be counted. See Fig. 6

5. Start counting the cells in the first square.

Different laboratories have different counting protocols, but there is a popular unwritten rule that states:
"Cells touching the upper and left limits should be counted, unlike cells touching the lower and right limits which should not be taken into account"

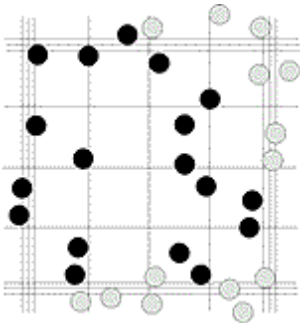


Fig. 6. Count in a Neubauer chamber big square.

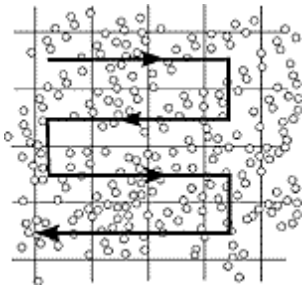


Fig. 7. High cell concentration cell count

In case of high cell concentration, it will become very easy to get lost when counting cells. In this case, a counting technique in zig-zag is used.
6. Write down the amount of cells counted in the first square.

7. Repeat the process for the remaining squares, writing down the counting results from all of them. The higher the number of cells counted, the higher the accuracy of the measurement

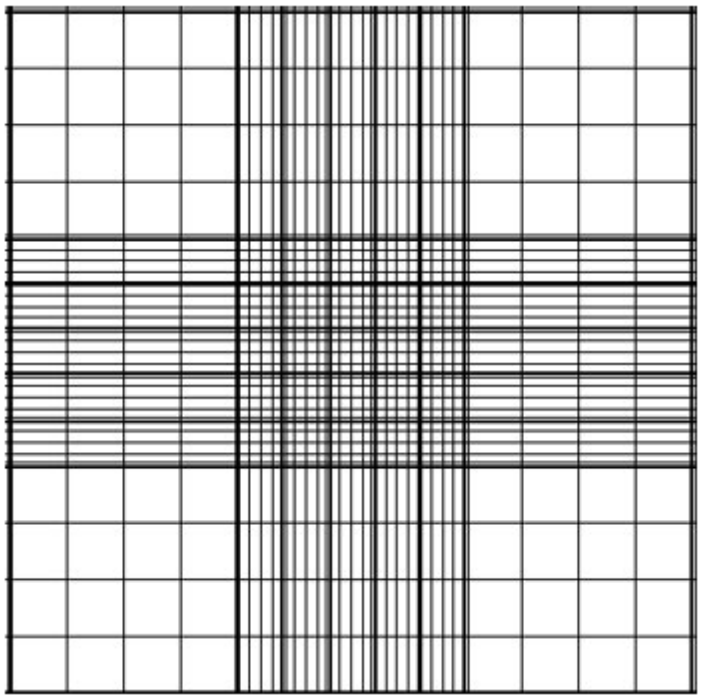


Fig. 6. Example of cell count in one of the 9 big squares of a Neubauer chamber

STEP 4: Concentration calculation

We apply the formula for the calculation of the concentration

$$\text{Concentration (cel / ml)} = \frac{\text{Number of cells}}{\text{Volume (in ml)}}$$

The number of cells will be the sum of all the counted cells in all squares counted.

The volume will be the total volume of all the squares counted.

Since the volume of 1 big square is:

0,1 cm x 0,1 cm = 0,01 cm2 of area counted.
Since the depth of the chamber is 0,1mm
0,1 mm = 0,01 cm
0,01 cm2*0,01 cm = 0,0001 cm2 = 0,0001ml = 0,1 µl
So, for the Neubauer chamber, the formula used when counting in the big squares

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Number of cells} \times 10.000}{\text{Number of squares}}$$

In case a dilution was applied, the concentration obtained should be converted to the original concentration before the dilution.
In this case, the concentration should be divided by the dilution applied

The formula will be:

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Number of Cells} \times 10.000}{\text{Number of square} \times \text{dilution}}$$

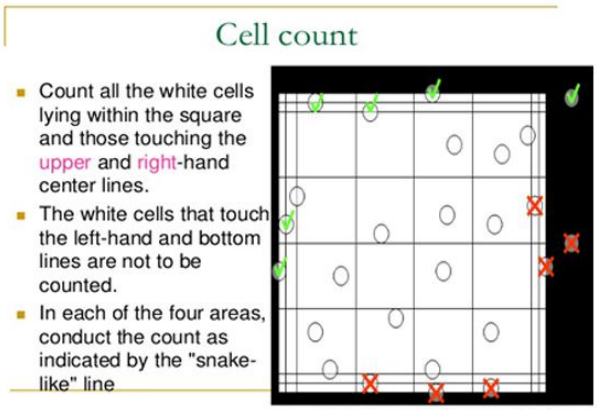
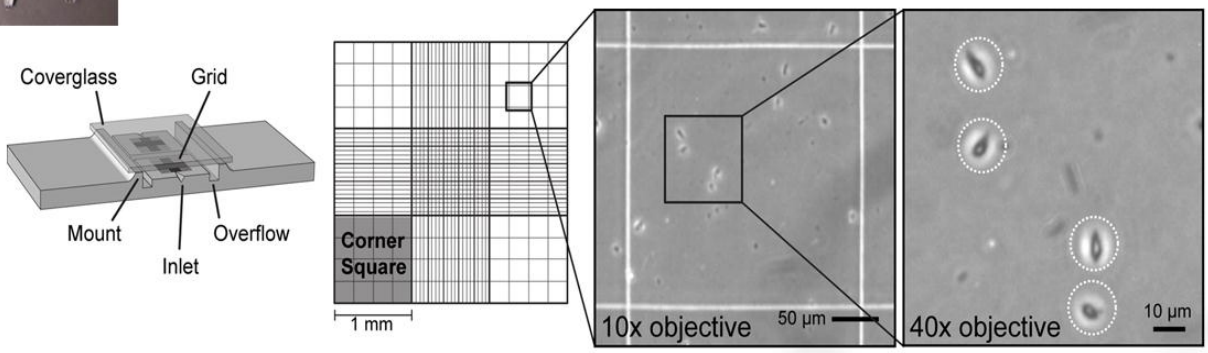
Example:

For a 1 : 10 dilution. Dilution = 0,1
For a 1 : 100. Dilution = 0,01

Error

Errors in the range of 20%-30% are common in this method due to pipetting errors, statistical errors, chamber volume errors, and errors from volume of simple introduced into the chamber.

Even though, the Neubauer chamber remains the most widely used cell counting method in the world.

To obtain a detailed analysis of the error introduced in a cell count, go to:

http://www.celeromics.com/cell-count-error.htm