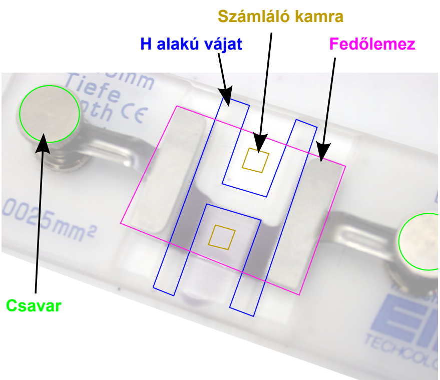
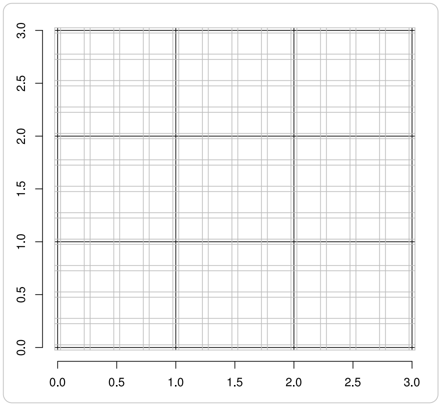
1. Vérsejtszámlálás

Eszközök

- ujjbegy fertőtlenítéshez spray
- steril, egyszer használatos injekciós tű/ ujjbegyszúró
- gumikesztyű
- vatta (vér törlése ujjbegyről)
- keverőpipetta (piros 1:100 és fehér golyós 1:10)
- Hayem oldat (hipertóniás, vvt-k zsugorodnak)
- Türk oldat (vvt-t hemolizálja, fvs magját metilénkékkel festi)
  (Türk-oldat: 0,5 %-os ecetsav metilénkékkel színezve)
- Bürker kamra
- mikroszkóp (40× nagyítás)

Bürker kamra





- két 3x3 mm-es számlálókamra vonalakkal 3x3 részre osztva
- a részeken belül közeli vonalak 1/20 mm távolságra, távoliak 1/5 mm-re
- a fedőlemez alatt 1/10 mm magas hely van

Teendők

Elővigyázatosság: vagy állatvérrel vagy saját vérrel dolgozzunk! Ha vérvételnél, higításnál segíteni kell: gumikesztyű

- Bürker kamra előkészítése
  - mosás csapvízzel, alkohollal, szárítás
  - fedőlemez rögzítése
- bal kéz középső ujj ujjbegy fertőtlenítése
- steril tűvel 2–3 mm mélyen megszúr
- első csepp vér letörlése száraz vattával
- pipetta
  - vvt: 1:100 keverőpipetta, piros golyóval
  - fvs: 1:10 keverőpipetta, fehér golyóval
- vér felszívása az 1-es jelig, buborékmentesen
- higítás
  - vvt: Hayem oldatot szív a 101-es jelig
  - fvs: Türk oldatot szív, a 11-es jelig
- szívócső eltávolítása a pipettáról
- keverés: pipetta végét befogja, pipettát 2 percig rázza
- pipettából néhány cseppet kienged (ami az alsó részén volt)
- oldatot a Bürker kamra felső szélén az üvegcsík és fedőlemez közé, a számlálókamrába szivárogtat
- Bürker kamra a mikroszkóp alá
  - szűk diafragma, süllyesztett kondenzor
  - a kamra vonalkáit élesen lássuk
  - 40× nagyítás
  - vvt számolás: mindkét számlálókamrában 20–20 kis négyzetben
  - fvs számolás: mindkét számlálókamrában 20–20 nagy négyzetben
- pipetta kimosása
- Bürker kamra elmosása

Számolás

- Becslés: adatok a négyzetekbeli sejtszámok $x_1, \dots, x_{40}$
  - vvt:
    - $\overline{x}$ az $x_1, \dots, x_{40}$ átlaga.
    - Ez egy négyzetre vonatkozik, azaz $\frac{1}{20} \cdot \frac{1}{20} \cdot \frac{1}{10} = \frac{1}{4000}$ mm^3 oldatra
    - 1 mm^3 $= \frac{1}{10^6}$ liter
    - 100-szoros higítás volt
    - $\overline{x} \cdot 4000 \cdot 10^6 \cdot 100 = \overline{x} \cdot 0{,}4 \cdot 10^{12}$ a literenkénti szám
    - nő: $4{,}5$–$4{,}8 \times 10^{12}$ a normál
    - férfi: $4{,}5$–$5{,}5 \times 10^{12}$ a normál
  - fvs:
    - $\overline{x}$ az egy négyzetbeli térfogatra vonatkozó átlag
    - ez $\frac{1}{5} \cdot \frac{1}{5} \cdot \frac{1}{10} = \frac{1}{250}$ mm^3 oldatban volt
    - 1 mm^3 $= \frac{1}{10^6}$ liter
    - 10-szeres higítás volt
    - $\overline{x} \cdot 250 \cdot 10^6 \cdot 10 = \overline{x} \cdot 2{,}5 \cdot 10^9$ a literenkénti szám
    - 4–11×10^9 a normál

- Az egy-egy négyzetben talált sejtszámok szórásnégyzete: $s^2 = \frac{\sum (x_i - \overline{x})^2}{n-1}$
- Poisson eloszlás esetén $s^2 = \lambda = \overline{x}$ kellene hogy legyen.
  Hasonlítsa össze az s^2 és $\overline{x}$ értékeket (vvt-re és fvs-re is)
  - Ha a sejtek csoportosulnak (például összeragadnak), akkor $s^2 > \overline{x}$ lehet.
  - Ha a sejtek „taszítják egymást”, akkor $s^2 < \overline{x}$ lehet. Ebbe az irányba hat ha túl sok sejt van, ezért nem elhanyagolható a méretük.

2. Statisztikai háttér

Több, azonos térfogatban számoljuk majd az egyes térfogatokba eső sejtek számát. Ha a sejtek egymástól függetlenül helyezkednek el az oldatban, azaz (1) elég ritkák ahhoz, hogy egymás helyét a térfogatban ne befolyásolják lényegesen, és (2) az oldatot elég jó felráztuk és (3) a sejtek nem ragadnak össze és nem is taszítják egymást akkor az egy-egy térfogatban talált sejtek száma Poisson eloszlást követ.

2.1. Poisson eloszlás

Mit ír le: Sok független, ritka esemény közül hány következik be egy adott időintervalumban, vagy hány kerül egy adott téri intervallumba.

Annak a valószínűsége, hogy k következik be:

$$f(k, \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

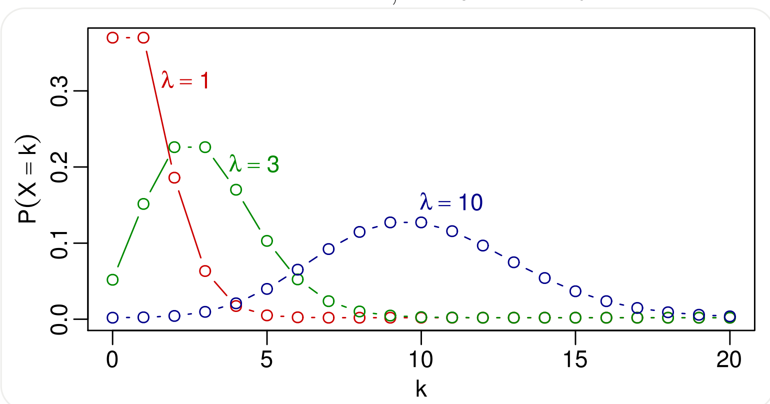
Itt

- $\lambda > 0$ az eloszlás paramétere
- $k = 0, 1, 2, 3, \ldots$ a bekövetkezések száma.
- $e = 2{,}718\,28\ldots$ a természetes alapú logaritmus alapja, Euler-szám.
- $k! = k$ faktoriális

A λ paraméterű Poisson eloszlás

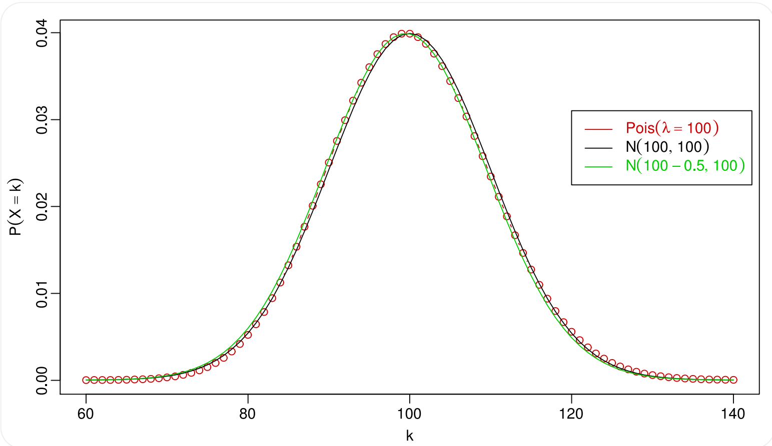
- Jele: $\text{Pois}(\lambda)$
- Várható értéke: λ
- Szórásnégyzete: λ
- Szórása: $\sqrt{\lambda}$

A Poisson eloszlás $\lambda = 1$, $\lambda = 3$ és $\lambda = 10$ esetén



Közelítés normális eloszlással

Nagy λ (kb. $\lambda > 1000$) esetén a Poisson eloszlás jól közelíthető λ várható értékű λ szórásnégyzetű normális eloszlással. Ez a közelítés már $\lambda > 10$ esetén is elég jó, ha folytonossági korrekcióként $N(\lambda, \lambda)$ helyett $N(\lambda - 0.5, \lambda)$.



Kapcsolat a binomiális eloszlással

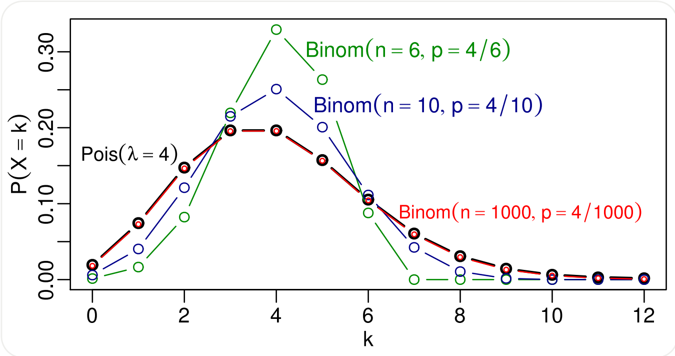
Egy n és p paraméterű binomiális eloszlás azt adja meg, hogy egy p valószínűségű esemény n független próbálkozásból milyen valószínűséggel következik be éppen k-szor:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k (1 - p)^{n-k}$$

Jele: $\text{Binom}(n, p)$

A „ritka események törvénye”: Binomiális eloszlások olyan sorozata ahol a várható érték (np) állandó és $n \to \infty$ a $\lambda = np$ paraméterű Poisson eloszláshoz tart.

A $\lambda = 4$ paraméterű Poisson eloszláshoz közeledő binomiális eloszlások



Ha $n \geq 20$ és $p \leq 0.05$, akkor Binom(n, p) elég jól közelíthető Poisson eloszlással. Ha $n \geq 100$ és $np \leq 10$, akkor nagyon jól.

Konfidenciaintervallum a λ paraméterre

Guerriero és mások (2009): Poisson eloszlás λ paraméterére 95%-os konfidenciaintervallum:

$$\left[\frac{N}{L} \cdot \left(1 - \frac{1.96}{\sqrt{N-1}}\right), \frac{N}{L} \cdot \left(1 + \frac{1.96}{\sqrt{N-1}}\right)\right]$$

ahol N az események száma, L az intervallum hossza, N/L az egységnyi intervallumra jutó események száma. Alkalmazási feltétel: $N \geq 15$

Így ha N sejtet számoltunk, akkor ez szerint a sejtek gyakorisága 95% valószínűséggel a végeredmény $\left(1 - \frac{1.96}{\sqrt{N-1}}\right)$-szerese és $\left(1 + \frac{1.96}{\sqrt{N-1}}\right)$-szerese közé esik.

Például ha 241 sejtet számoltunk, akkor $\pm\frac{1.96}{\sqrt{240}} = \pm 0.1265 \approx \pm 13\%$