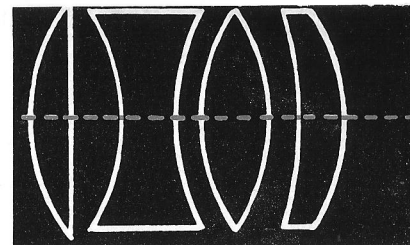
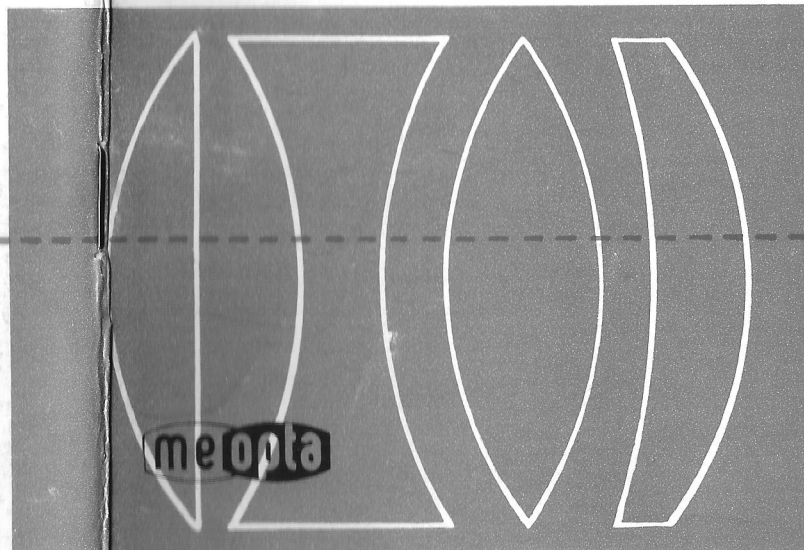


NÁVOD



**ZÁVODY
PRŮMYSLOVÉ
AUTOMATIZACE
KOŠÍŘE**



ZÁVODY PRŮMYSLOVÉ AUTOMATIZACE KOŠÍŘE
NOSITEL ŘÁDU PRÁCE

odbytové oddělení, ul. R. Naskové 1,
150 56 Praha 5 – Košíře.
Telefon: 52 18 41-9, 52 47 51.
Telegram: PRUMAUT KOSIRE.
Dálnopis: 121 454

POČÍTAČÍ KOMŮRKA

PODLE BŮRKERA

Obchodně technické služby

**ZÁVODY
PRŮMYSLOVÉ
AUTOMATIZACE
KOŠÍŘE**

OBSAH

1. Použití	3
2. Technické údaje	3
3. Potřebné pomůcky	5
4. Přípravné práce	6
5. Pozorování a počítání	7
6. Výpočet krvinek	9
7. Čištění komůrky	11



1. POUŽITÍ

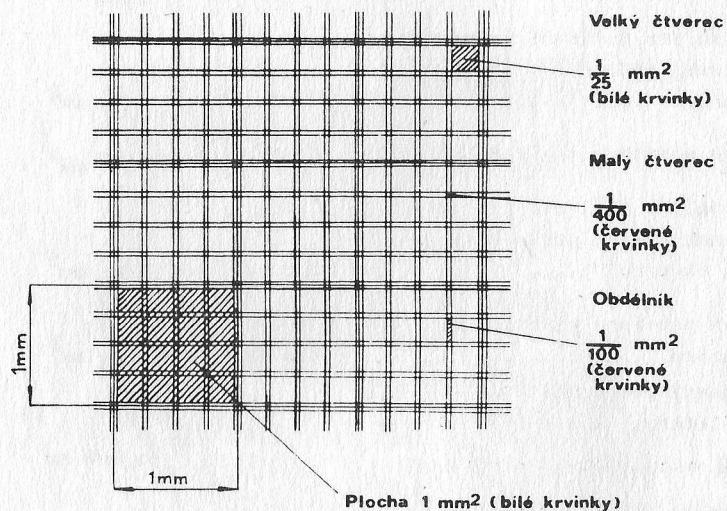
Počítací komůrky M E O P T A s dělením počítacích sítí podle Bürkera se používá k počítání červených a bílých krvinek a k počítání krevních destiček.

2. TECHNICKÉ ÚDAJE

Výška počítacího prostoru (hloubka komůrky) ..	0,10 ±0,002 mm
Počet počítacích sítí	2
Plocha jedné počítací sítě	9 mm ²
Plocha pro počítání červených krvinek (malý čtverec)	0,0025 mm ² = $\frac{1}{400}$ mm ²
Obsah prostoru nad malým čtvercem	0,00025 mm ³ = $\frac{1}{4000}$ mm ³
Plocha pro počítání červených krvinek (obdélník = 4 malé čtverce)	0,01 mm ² = $\frac{1}{100}$ mm ²
Obsah prostoru nad obdélníkem	0,001 mm ³ = $\frac{1}{1000}$ mm ³
Plocha pro počítání bílých krvinek (velký čtverec=16 malých čtverců)	0,04 mm ² = $\frac{1}{25}$ mm ²
Obsah prostoru nad velkým čtvercem	0,004 mm ³ = $\frac{1}{250}$ mm ³
Vzájemný poměr malého čtverce, obdélníku a velkého čtverce ...	1 : 4 : 16
Síla rytí počítacích sítí	0,003 mm ³
Nejvyšší numerická apertura objektivu mikroskopu pro počítání krvinek	0,65
Vhodné celkové zvětšení mikroskopu pro počítání krvinek	300 x až 400 x

Celkové zvětšení o průměr zorného pole mikroskopu (v mm)
s optikou MEOPTA:

Okulár		H 6x	H 8x	H 10x	O 10x	O 15x	O 20x
Achromat. objektiv	č.výr.	1-0702	1-0703	1-0704	1-0740	1-0741	1-0742
10x0,30	1-1022	60x	80x	100x	100x	150x	200x
		1,8	1,6	1,3	1,6	1,3	0,8
20x0,45	1-1023	120x	160x	200x	200x	300x	400x
		0,9	0,8	0,6	0,8	0,6	0,4
45x0,65	1-1030	270x	360x	450x	450x	675x	900x
		0,4	0,35	0,3	0,35	0,3	0,2



POČÍTAČÍ SÍŤ KOMŮRKY

2.1 Složení komůrky

Počítací komůrka M E O P T A (podle Bürkera) má tyto části:

- základní skleněná deska s dvěma počítacími sítěmi
- krycí sklo (současně se dodává jedno náhradní krycí sklo)
- dva držáky krycího skla
- pouzdro na počítací komůrku

3. POTŘEBNÉ POMŮCKY

K pozorování a počítání krvinek dále potřebujeme:

- Jakýkoliv dobrý přesný mikroskop s křížovým vodičem preparátu. Výhodný je mikroskop s binokulární hlavicí, ježto umožňuje mikroskopické pozorování a počítání krvinek současně oběma očima.

Pro počítání krvinek lze použít všech typů mikroskopů MEOPTA, jež se popřip. doplní křížovým vodičem preparátu MEOPTA (č.výr. 1-0947) pokud není mikroskop vybaven křížovým kulatým nebo čtvercovým stolem s vodičem preparátu. Vhodné jsou zejména tyto typy:

- D 716 SV (č.výrobku 1-0158)
- DN 716 Bi (č.výrobku 1-0170)
- D 712 SV (č.výrobku 1-0156) po doplnění křížovým vodičem
- DN 712 Bi (č.výrobku 1-0168) preparátu MEOPTA (č.v.1-0947)

Pro počítání krvinek se doporučuje toto optické vybavení:

- achromatický objektiv MEOPTA 20x0,45 (č.výr.1-0605)
- okulár ortoskopický O 10x (č.výr. 1-0740)
- okulár ortoskopický O 15x (č.výr. 1-0741)

- Mísicí pipety pro červené a bílé krvinky nebo mísicí baňky s odměrnými pipetami.

- Roztoky zředování krve:

- Hayemův roztok k zředování krve pro počítání červených krvinek tohoto složení:
 - sublimát 0,5 g
 - síran sodný 5,0 g

chlorid sodný 1,0 g
doplňeno destilovanou vodou
na 200 cm³.

cb) Tůrkův roztok k zředování krve pro počítání bílých krvinek tohoto složení

ledová kyselina octová 3 cm³
1%ní vodní roztok gentianové violeti 3 cm³
doplňeno destilovanou vodou na 300 cm³.

d) Pinsety, zkumavky, hodinková sklička a jiné.

4. PŘÍPRAVNÉ PRÁCE

a) Především si obvyklým způsobem připravíme mikroskop podle návodu, přiloženého k mikroskopu. Do výměnné objektivové hlavičky zašroubujeme potřebné objektivy a do okulárového tubusu vložíme vhodný okulár.

Většinou pozorujeme a počítáme červené krvinky achromatickým objektivem MEOPTA 25x0,45 a ortoskopickým okulářem MEOPTA O 10x nebo O 15x.

Můžeme použít i Huygensových okulárů, s nimiž má mikroskop poněkud menší zorné pole. Zorné pole ortoskopických okulárů je asi o třetinu větší než okulárů Huygensových.

Bílé krvinky obvykle pozorujeme a počítáme achromatickým objektivem MEOPTA 20x0,45 a ortoskopickým okulářem MEOPTA O 10x nebo O 15x.

b) Na dokonale čistou počítací komůrku položíme krycí sklo, jež opatrně silněji přitlačíme na postranní vyvýšené opěrné plochy, až vzniknou Newtonovy barevné pruhy. Krycí sklo přidržíme dvěma pérovými držáky.

c) V příslušných mísicích pipetách nebo mísicích baňkách přesně zředíme odebranou krev a to pro počítání červených krvinek Hayemovým roztokem v poměru 1:200 (při chudokrevnosti vyjimečně v poměru 1:100); pro počítání bílých krvinek Tůrkovým roztokem v poměru 1:20.

d) Mísicí pipetou nebo baňkou dobře protřepáváme po dobu dvou až tří minut, aby nastalo dokonalé promísení krve se zředující

tekutinou. V pipetách však nesmí poklesnout výška hladiny krve.

e) Z mísicí pipety (z kapiláry) odstříkneme trochu tekutiny, jež neobsahuje krev.

f) Kapičku směsi vytlačíme mírným fouknutím z pipety a necháme ji volně ulpět na hrotu pipety; pipetu přiložíme ze strany ke skulině mezi plochou počítací sítě a krycího skla komůrky.

Přenášená kapka nesmí být příliš velká, aby nebylo zaplaveno též druhé počítací pole za střední rýhou.

g) Naplněnou počítací komůrku necháme ve vodorovné poloze asi tři minuty v klidu, aby se mohly krvinky usadit.

h) Počítací komůrku položíme na stůl mikroskopu mezi raménka vodiče. Otevřeme úplně aperturní clonu kondenzoru a osvětlíme zesponu počítací pole komůrky. Pohledem ze strany pouhým okem pozorujeme zakalení naplněné komůrky. Nejeví-li počítací pole stejnoměrné zakalení, vyčistíme počítací komůrku a provedeme znovu její naplnění.

5. VLASTNÍ POZOROVÁNÍ A POČÍTÁNÍ

a) Pozorování krvinek mikroskopem.

Aperturní clonu kondenzoru poněkud přivřeme a zaostříme mikroskopem na krvinky, přičemž podle potřeby kondenzor snížíme tak, aby byly zřetelné krvinky i rytí sítě.

b) Červené krvinky počítáme v malých čtvercích ($\frac{1}{400}$ mm²) nebo v obdélnících ($\frac{1}{100}$ mm²), a to celkem v 80 malých čtvercích nebo ve 20 obdélnících, tedy na ploše $\frac{1}{5}$ mm².

Pro přesnější určení počtu červených krvinek v krvi naplníme obě počítací pole komůrky příslušně zředěnou krví a v každém počítacím poli spočítáme krvinky v 80 malých čtvercích, tj. celkem v obou počítacích polích ve 160 malých čtvercích. Zjištěný počet krvinek dělíme dvěma, abychom dostali průměrný počet krvinek v 80 malých čtvercích, potřebný pro vlastní výpočet krvinek.

c) Bílé krvinky počítáme ve 125 velkých čtvercích, tj. na ploše 5 mm^2 .

Bílé krvinky můžeme počítat též na ploše 6 nebo 9 mm^2 , a to tak, že sčítáme krvinky v 6 nebo 9 velkých čtvercových plochách, ohraničených trojitými čarami. (Každá tato plocha má výměru 1 mm^2 , při čemž jako hraniční čáru považujeme střední ze tří přímek.)

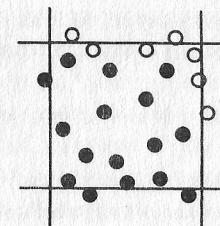
d) Pozorování a počítání krvinek v jednotlivých čtvercích (obdélnících) provádíme postupně pomocí křížového vodiče preparátu (nebo křížového stolu s vodičem preparátu):

ca) Po spočtení krvinek v jednom čtverci (obdélníku) posuneme podélným posuvem vodiče počítací komůrku tak, aby další čtverec (obdélník) byl ve středu zorného pole mikroskopu. Tento postup opakujeme, až spočítáme krvinky v jedné řadě počítacího pole komůrky.

cb) Příčným posuvem vodiče (nebo příčným posuvem horní desky stolu) najedeme na další řadu, v níž opět postupně prohlížíme a počítáme krvinky způsobem uvedeným výše pod a), avšak posouváme podélným posuvem opačným směrem.

cc) Po spočítání krvinek v celé řadě příčným posuvem posuneme komůrku na další řadu a celý postup opakujeme, až spočítáme krvinky v potřebném počtu čtverců (obdélníků).

e) Pro počítání krvinek platí toto pravidlo (podle Bürkera): Krvinky, které se dotýkají nebo leží na hraničních čarách čtverců nebo obdélníků, se počítají pouze tehdy, jde-li o horní pravou stranu čtverce (obdélníků), kdežto krvinky, které leží nebo se dotýkají dolní nebo levé strany, se nepočítají. Krvinka se však nepočítá, leží-li sice na horní straně, ale současně se dotýká levé hraniční čáry. Rovněž se nepočítá krvinka, která sice leží na pravé hraniční čáře, ale dotýká se současně dolní strany.



Vzorový propoččet krvinek

f) Krvinky se uchycují též na spodní straně krycího skla komůrky a proto při počítání krvinek pohybujeme nepatrně mikrometrickým posuvem mikroskopu (nejdříve snižujeme a potom zvyšujeme tubus), abychom nepřehlédli žádnou krvinku.

6. VÝPOČET KRVINEK

Pro stanovení počtu krvinek v 1 mm^3 nezředěné krve platí tento obecný vzorec:

$$P = \frac{p \cdot v \cdot h \cdot z}{y}$$

kde: P = celkový počet krvinek v 1 mm^3 krve
p = počet spočítaných krvinek
v = převratná hodnota plochy jednoho políčka, v němž jsou počítány krvinky
h = převratná hodnota hloubky komůrky
z = zředění krve
y = počet políček, v nichž jsou počítány krvinky.

Červené krvinky v 1 mm^3 nezředěné krve vypočítáme při zředění krve v poměru 1:200 a spočítání červených krvinek v 80 malých čtvercích (nebo ve 20 obdélnících) tak, že počet zjištěných červených krvinek násobíme číslem 10.000 (při zředění krve 1:100 násobíme číslem 5.000).

Bílé krvinky v 1 mm³ nezředěné krve vypočítáme při zředění krve v poměru 1:20 a spočítání bílých krvinek ve 125 velkých čtvercích tak, že počet zjištěných bílých krvinek násobíme číslem 40 (při zředění 1:10 násobíme číslem 20).

6.1 Chyby v počtu krvinek

Při počítání krvinek provádíme všechny úkony pečlivě a přesně, zvláštní pečlivost věnujeme zejména těmto úkonům:

1. správnému a přesnému zředění krve,
2. dokonalému promísení krve zřeďující tekutinou,
3. bezvadnému přiložení krycího skla,
4. zjištění rovnoměrného rozdělení krvinek v komůrce,
5. správnému sečtení krvinek v předepsaném počtu čtverců nebo obdélníků.

Při méně pečlivém provádění těchto úkonů se může stát, že totiž základní počet krvinek v komůrce neodpovídá skutečnosti. Tato chyba se značně zvětšuje při propočtu krvinek v nezředěné krvi vynásobením příslušným koeficientem.

V důležitých případech omezíme celkovou chybu v počtu krvinek též tím, že sčítáme krvinky ve větším počtu čtverců, případně spočítáme krvinky též v druhém počítacím poli a z obou počtů krvinek zjistíme průměrnou hodnotu, které použijeme pro další výpočet krvinek v nezředěné krvi.

Při počítání červených krvinek je podle E. Pondera (viz knihu Netoušek: Nauka o krvi) možno omezit chyby, zaviněné zřeďováním krve a počítáním buněk v počítací komůrce až na ± 1 %.

Chybu způsobenou nestejným rozdělením červených krvinek v komůrce lze obtížně vyloučit. Střední hodnota (δ) této chyby je podle E. Pondera dána vzorcem.

$$\delta = \frac{\sqrt{p}}{p} \cdot 100 \quad (\text{v } \%)$$

v němž "p" znamená počet krvinek napočtený v komůrce.

Při spočítání 1000 krvinek je střední chyba $\pm 3,2$ %, při spočítání 2000 krvinek je střední chyba $\pm 2,3$ % - tedy chyba je tím větší, čím sečteme méně krvinek. Spočítáme-li pouze 500 krvinek, je střední chyba $\pm 4,5$ %, a při počteme-li k tomu chybu, jež je způsobována zřeďováním a počítáním buněk v komůrce a kterou jen pečlivou prací snížíme na ± 1 %, činí celková chyba asi ± 6 %, tedy celkem 12 % čili 600000 červených krvinek při úhrnném počtu 5,000,000 červených krvinek.

Chybu při počítání bílých krvinek odhaduje prof. Netoušek při sečtení 100 velkých čtverců (tj. plochy 4 mm²) na ± 500 bílých krvinek, tedy celkem 1000 bílých krvinek. Vzhledem k tomu se doporučuje v důležitých případech spočítat krvinky na ploše 6 mm² nebo dokonce na ploše 9 mm², tj. na ploše celé počítací sítě komůrky.

6.2 Počítání krevních destiček

V počítací komůrce MEOPTA s dělením podle Bürkera je možno počítat též krevní destičky. Krev pro tento účel se mísí v poměru 1:200 s 3,6procentním roztokem citronanu sodného (Beránek). Krevní destičky se sčítají v 50 velkých čtvercích. Pro stanovení počtu krevních destiček v 1 mm³ krve se zjištěný počet krevních destiček násobí tisícem.

7. ČISTĚNÍ POČÍTACÍ KOMŮRKY

Počítací komůrku s krycím sklem po použití ihned očistíme, a to nejprve vodou, potom lihem a nakonec éterem. Rovněž všechny příslušné potřeby, zvláště pipety, udržujeme v bezvadné čistotě. Po každém použití ihned řádně očistíme vodou, lihem a éterem. Záschne-li náhodou krev v pipetách, odstraníme ji tím způsobem, že pipetu ponoříme na několik hodin do louhu nebo čpavku. Kapiláru pipet vyčistíme protažením koňskou žíní. Nikdy nesmíme používat drátku nebo injekčních jehel.

ODBORNÁ LITERATURA

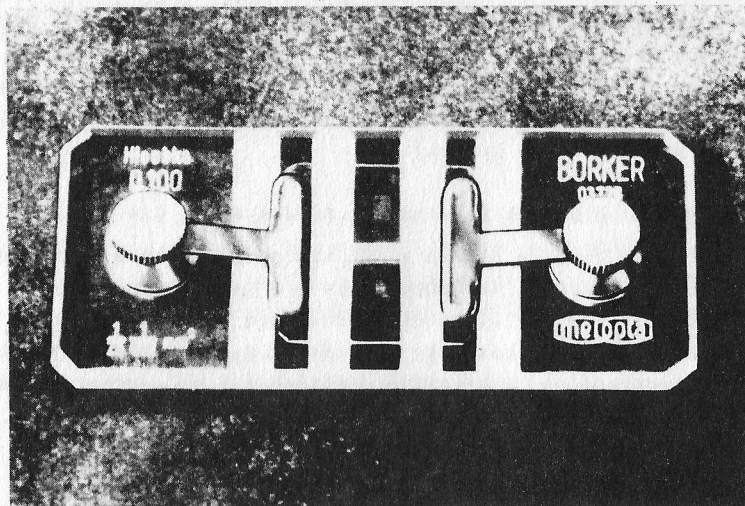
O počítání krvinek pojednávají zejména tyto knihy:

Wolf, Mikroskopická technika

Jírovec, Zoologická technika

Netoušek, Nauka o krvi

Foltýn, Laboratorní metody



Popis a vyobrazení v tomto návodu jsou nezávazné a výrobní závod si vyhrazuje v duchu technického rozvoje a v zájmu uživatelů přístrojů provádět změny sloužící zlepšení funkce a vzhledu přístroje. Z toho důvodu se nemusí všechny údaje v textu a všechna vyobrazení vždy zcela shodovat s dodávaným přístrojem.