



Objektträger-Präparate im Einschritt-Verfahren mit der Winkelkammer

Diese Methode wurde im Liquorlabor des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik (Prof. Kluge, Dr. Roskos) des Klinikums für FSU in Jena entwickelt und verfasst.

Ziel der Arbeitsgruppe war es, ein in der Handhabung einfaches und dennoch für unterschiedliche Zelltypen schonendes Verfahren zur Herstellung von Objektträger-Präparaten zu entwickeln. In umfangreichen und vergleichenden Tests mit Originalproben wurden geeignete Maßnahmen zur Probenvorbereitung erarbeitet und die optimalen Zentrifugationsbedingungen ermittelt.

Mit der nachfolgend beschriebenen Methode lassen sich Differentialzellbilder von Liquor, Pleura-/Aszites-Punktaten und Dialysaten anfertigen.

Vorteile der Hettich Methode

Zeitdruck, Rund-um-die-Uhr-Verfügbarkeit der Zytodiagnostik, die deutlich gestiegene Anzahl angeforderter diagnostischer Parameter bei höchstens gleicher verfügbarer Menge an Untersuchungsmaterial, ökonomisch-organisatorische und damit entsprechende personelle Aspekte (Integration von Spezial- in Zentrallabors) fordern die Entwicklung und Durchführung vereinfachter zentrifugativer Verfahren, die trotzdem schonend arbeiten und zuverlässige sowie reproduzierbare zytodiagnostische Ergebnisse der betreffenden Körperflüssigkeit liefern.

Diese Erfordernisse erfüllt nachfolgende Methode zur Herstellung zytologischer Objektträger-Präparate aus Zellsuspensionen im Einschnitt-Verfahren mit dem Winkelkammer-System in Hettich Zentrifugen.

Präparation

A) Liquor cerebrospinalis

Es sollten mindestens 200 Zellen auf der Sedimentfläche nachweisbar und eine ausreichende prozentuale Differenzierung möglich sein. Vor der Zentrifugation ist deshalb die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer (z.B. Fuchs-Rosenthal) zu ermitteln. Bei den unter 4. gewählten Zentrifugationsbedingungen kann von einer Wiederfindungsrate von mindestens 25 % ausgegangen werden. Demnach sind beispielsweise bei einem Liquor mit einem Zellgehalt von 2 Zellen/ μl mindestens 400 μl einzusetzen.

Liegt die Zellzahl bei 1 Zelle/ μl /1/3 bis 3/3 in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer), sind Liquormengen von mindestens 600 μl , besser jedoch von 800 μl , notwendig. Als unteres Einsatzvolumen sollten 200 μl wegen der sonst herabgesetzten Homogenität nicht unterschritten werden.

Bei den normalerweise stark eiweißhaltigen Pleura- und Aszites-Punktaten ist ein Eiweißzusatz nur bei großer Verdünnung auf Grund hoher Zellzahlen notwendig (siehe 2.3.):

1. Vorbereitung der Proben

Zur Pufferung des Milieus und zur Stabilisierung der Zellen sind bei Suspensionen mit Zellzahlen unter 10/ μl und Eiweißgehalten unter 3000 mg/l (Mehrzahl der Liquores) Eiweißzusätze erforderlich, für die praktisch keine Obergrenze zu beachten ist. Für diesen Zweck kann im Labor anfallendes Normalserum verwendet werden (Kälberserum bzw. Albumin-Lösungen sind ebenfalls möglich, aber nicht nötig).

Um eine Eiweißkonzentration von über 3000 mg/l bei *nicht blutigen, unverdünnten* Liquores zu gewährleisten, gibt man zu 400 μl Einsatzvolumen 50 μl Serum. Gleiches gilt für Dialysate. Erweist sich bei zellreichen nicht blutigen und blutigen Liquores eine Verdünnung als notwendig, ist diese entweder mit täglich frisch angesetzter, kühl gelagerter und vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebrachter physiologischer **NaCl-Lösung/Serum** im Verhältnis **9/1** (im Folgenden als „9/1“ Mischung bezeichnet) vorzunehmen (siehe 2.1.) *oder*

bei ausreichend vorhandenem homologen Liquor mit dessen **zellfreien Überstand**, der durch Zentrifugation gewonnen werden kann. Die Zentrifugationsparameter sind dabei dieselben wie in der Serumgewinnung aus Blut.

1.1. Unblutige Liquores:

Orientierende Verdünnungsangaben bei Einsatz von 400 μl pro Präparat mit Zellzahlen von

< 50 Zellen/ μl : **400 μl** Liquor plus **50 μl** Serum

50 – 150 Zellen/ μl : **100 μl** Liquor plus **300 μl** „9/1“ Mischung oder homologer Überstand

150 – 500 Zellen/ μl : **50 μl** Liquor plus **350 μl** „9/1“ Mischung oder homologer Überstand

> 500 Zellen/ μl : **50 μl** Liquor plus **1000 μl** „9/1“ Mischung.

Davon nur 200 μl in die Winkelkammer einfüllen. Bei extrem hohen Zellzahlen sind stärkere Verdünnungen anzusetzen.

1.2. Blutige Liquores:

Die für unblutige Liquores angegebenen Verdünnungswerte können für blutige Liquores nur bedingt übernommen werden, da neben der Zellzahl weißer Zellen auch noch die Erythrozytenanteile berücksichtigt werden müssen. Bei der Wahl der Verdünnungsverhältnisse und Einsatzmengen der verdünnten Zellsuspensionen ist neben der Vermeidung einer Erythrozytenüberlagerung zu beachten, dass die für die diagnostische Fragestellung entscheidenden Erythrophagen und Hämösiderophagen nicht „herausverdünnt“ werden. Gegebenenfalls ist es notwendig, mehrere Präparate mit unterschiedlichen Verdünnungen anzufertigen, um gut auswertbare Präparate zu erhalten.

2. Auswahl des geeigneten Zubehörs

Bei Einsatz von 400 – 800 µl Zellsuspension eignet sich die Winkelkammer Best.-Nr. 1672 mit einer Sedimentgröße von 60 mm² und einem Durchmesser von 8,7 mm mit der dazugehörigen Filterkarte Best.-Nr. 1697.

Für die Routine und die konventionelle Pappenheim-Färbung empfehlen sich *Polysine*TM¹⁾-beschichtete Objektträger, für den immunzytologischen Nachweis zellulärer Oberflächenmarker, insbesondere Tumormarker, *Super Frost*[®]¹⁾ Color Objektträger.

3. Montage des Zyto-Einsatzes

Objektträger, Zytokammern und Filterkarte mit dem Spannring auf der Spannplatte (Best.-Nr. 1662) befestigen. Dabei den Ring bis zum Anschlag festdrehen und unter Spannungserhalt leicht zurückdrehen, damit nach der Zentrifugation möglichst die gesamte Überstandsflüssigkeit in die Filterkarte gesaugt wird und sich keine Restflüssigkeit mehr auf dem Sediment befindet.

4. Zentrifugation

a) Probe einfüllen

Zum Einfüllen der Probe den Zyto-Einsatz senkrecht hinstellen oder gleich in den Zytobecher (Best.-Nr. 1680) geben und die vorbereitete Probe in die Kammersenke pipettieren.

b) Sedimentation

Es kann zwischen zwei Zentrifugenprogrammen gewählt werden:

Programm 1: 3 Minuten bei 100 x g

Programm 2: 4 Minuten bei 50 x g

Für den Routinebetrieb sollte Programm 1 favorisiert werden.

c) Auseinanderbauen des Zyto-Einsatzes

Vergewissern Sie sich vor dem Auseinanderbauen des Zyto-Einsatzes, ob die gesamte Flüssigkeit von der Filterkarte aufgenommen wurde. Ist dies der Fall, den Zyto-Einsatz aus der Zentrifuge nehmen, den Spannring lösen, die Kammer abnehmen und den Objektträger zusammen mit der Filterkarte entnehmen. Nun die Filterkarte vorsichtig abnehmen, ohne dabei das Sediment zu verwischen. Das noch feuchte Sediment an der Luft trocknen lassen.

Achtung: Zu lange Austrocknung kann Zellschädigungen nach sich ziehen!

Befindet sich nach der Zentrifugation noch Restflüssigkeit in der Winkelkammer, muss diese bei senkrecht stehender Winkelkammer aus der Senke abgesaugt werden. Erst dann wird der Spannring bei waagrechter Stellung der Winkelkammer so gelöst, dass sich noch auf der Sedimentfläche befindliche Flüssigkeitsreste langsam und gleichmäßig in die Filterkarte verteilen und die Homogenität des Sedimentes nicht zerstören können.

d) Färben der Präparate nach Pappenheim

Vor dem Färben hat sich das Markieren der Sedimentfläche als hilfreich erwiesen.

Auf das trockene Zellsediment

3–5 Minuten May-Grünwald-Lösung

(original Merck) einwirken lassen, danach mit Aqua des. abspülen und

10–15 Minuten mit verdünnter Giemsa-Lösung

(1ml Stammlösung von Merck plus 10 ml Aqua dest.) weiterfärben.

Die Färbungen mit May-Grünwald-Lösung sind nach 3 Minuten ausreichend intensiv, nach 5 Minuten meist noch verwertbar. Nach 5 Minuten können Überfärbungen auftreten, wenn die Zellen nach Therapie oder bei ventrikulären Liquores bereits alteriert sind.

Auch Spezialfärbungen und immunzytologische Zelloberflächenmarkierungen (z.B. Lymphozyten- und Tumormarkierungen) können mit getrockneten und unfixierten Zellsedimenten nach einschlägigen Arbeitsvorschriften durchgeführt werden.

¹⁾ Eingetragenes Warenzeichen der Firma Gerhard Menzel Glasverarbeitungswerk GmbH & Co. KG

B) Dialysate

Dialysate brauchen in der Regel nicht verdünnt zu werden. Pro 400 µl Einsatzvolumen werden 50 µl Serum dazu gegeben.

C) Pleura- und Aszites-Punktate

Bei diesen Punktaten variiert die Zellzahl normalerweise zwischen 50 und 5.000 Zellen/µl, so dass bei Einsatz von 400 µl pro Präparat die bei unblutigen Liquores angegebenen Verdünnungsverhältnisse angewandt werden können.

Da die Eiweißgehalte von beiden Punktaten mit 20 bis 40 g/l sehr hoch sind, können bis zu 1:10-Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung ohne Eiweißzusatz erfolgen. Da von den Punktaten meist ausreichende Mengen verfügbar sind, ist für Verdünnungen auch genügend zellfreier Überstand gewinnbar.

Bestellinformationen

Zentrifuge	Bestell-Nr.
ROTOFIX 32 A	1206
UNIVERSAL 320 / UNIVERSAL 320 R	1401 / 1406

Zubehöerauswahl ²⁾	Bestell-Nr.
4-fach-Rotor	1624
6-fach-Rotor	1626
Zytogehänge	1680
Spannplatte mit Spannring	1662
Winkelkammer (30 mm ²)	1671
Winkelkammer (60 mm ²)	1672
Winkelkammer (120 mm ²)	1673
Filterkarten für 1671	1696
Filterkarten für 1672	1697
Filterkarten für 1673	1698

²⁾ Unser komplettes Zubehör für die Zytologie finden Sie in unserem Zyto-Prospekt, den Sie kostenlos anfordern können.



LAB TECHNOLOGY

Andreas Hettich GmbH & Co. KG

Föhrenstr. 12
D - 78532 Tuttlingen
Deutschland

www.hettichlab.com
info@hettichlab.com
service@hettichlab.com

Tel. +49 (0)7461 / 705 -0
Fax +49 (0)7461 / 705 -1125

Verkauf Inland: -12 00
International Sales: -12 01
Service Inland: -12 02
International Service: -12 03