



Objektträger-Präparate für die Liquorzytologie

Innerhalb der Liquordiagnostik spielt die klassische Liquorzytologie eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Typisierung erregerebedingter entzündlicher Erkrankungen des ZNS, beim Nachweis von Blutungen in die Liquorräume und bei der Erkennung neoplastischer Zellen. Außerdem werden zytologische Präparate für Verlaufsuntersuchungen und zur Therapiekontrolle eingesetzt.¹⁾

Da es sich bei der Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit normalerweise um eine zell- und eiweißarme Flüssigkeit handelt, treten schon wenige Stunden nach der Punktion Zellschädigungen auf. Liquorproben, von denen man Objektträgerpräparate anfertigen möchte, sollten deshalb **nicht älter als 2 Stunden** sein.²⁾

Das Alter der Proben, aber auch die Präparations-technik hat einen ganz entscheidenden Einfluss auf den diagnostischen Aussagewert des zytologischen Präparates. Bei der Präparation des Liquors ist deshalb eine optimale Zellausbeute anzustreben und ein selektiver Zellverlust unbedingt zu vermeiden. Die Morphologie der Zellen muss zur sicheren Identifizierung der unterschiedlichen Zellpopulationen erhalten bleiben.

Vorteile der Hettich Methode

1. Direktes Verarbeiten der Liquorprobe zum zytologischen Präparat

- Anpassen an unterschiedlichen Zellgehalt und verschiedene Volumina bis zu 8 ml
- Verwenden des zellfreien Überstandes für weitere Analysen

2. Erreichen einer guten Präparatequalität

- Optimaler Erhalt der Morphologie
- Optimale Belegungsdichte
- Optimale Ausbeute

Präparation

1. Vorbereitung der Probe

Da bei der Verarbeitung von zell- und eiweißarmen Liquorproben die Präparatequalität oft ungenügend ist, empfiehlt es sich, Humanserum oder Albuminlösung zur Probe hinzuzugeben. Die Eiweißzugabe wird bei Zellzahlen unter 10/µl und Eiweißgehalten unter 3000 mg/l zur Zellstabilisierung als notwendig erachtet. Um eine Eiweißkonzentration über 3000 mg/l zu gewährleisten, wird bei 400 µl Liquorprobe 50 µl Normalserum mit einem Gesamtproteingehalt von etwa 70 g/l zugesetzt. Autologes Serum ist dabei nicht erforderlich.³⁾

Zur Erhöhung der Zellausbeute kann außerdem die Verwendung beschichteter Objektträger vorteilhaft sein. Für die Routine und die konventionelle Färbung empfehlen sich *Polysine*TM-beschichtete Objektträger, für den immunzytologischen Nachweis zellulärer Oberflächenmarker, insbesondere Tumormarker, *Super Frost® Color* Objektträger.⁴⁾ (*Polysine*TM und *Super Frost®* sind eingetragene Warenzeichen der Firma Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG).

2. Auswahl des geeigneten Zubehörs

Die zur Verfügung stehende Menge und der Zellgehalt der Probe bestimmen, welche Kammer einzusetzen ist. Generell sind für Liquorproben die 1 ml und 2 ml Kammern mit Sedimentflächen von 30 mm² bzw. 60 mm² zu empfehlen.

Zellen/Probe	bis zu 2.000	2.000 – 20.000	ab 20.000
Kammergröße	30 mm ²	30 mm ²	60 mm ²
Volumen	100 µl – 1 ml	100 µl – 1 ml	400 µl – 2 ml
Eiweißzusatz	ja	nein	nein

3. Montage des Zyto-Einsatzes

Die Montage des Zyto-Zubehörs kann unserem Schema „Mit einem Dreh perfekte Präparate – das HETTICH-ZYTO-System“ entnommen werden. Bei Objektträger-Präparaten aus Liquor cerebrospinalis ist in der Regel eine Trockenfixierung erforderlich. Deshalb den Zyto-Einsatz **mit** Filterkarte montieren (siehe Schema Punkt B1). Bei infektiösen Proben den Deckel Nr. 1661 aufsetzen (siehe Schema Punkt B2).

¹⁾ Kluge et al., Stellenwert der praktischen (klassischen) Liquorzytologie im Gesamtspektrum der Liquordiagnostik, in Kluge et al. (Hrsg.) Atlas der praktischen Liquorzytologie, Stuttgart 2005, S. 2-3.

²⁾ Ebenda, S. 7.

³⁾ Ebenda, S. 8.

⁴⁾ Empfehlung des Liquorlabors des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik (Prof. Dr. Kluge, Dr. Roskos) des Klinikums der FSU in Jena.

4. Zentrifugation

a) Sedimentation

Die Zytokammern werden **3 Minuten** lang bei **275 x g** zentrifugiert (das entspricht 1.500 min⁻¹ mit dem 6-fach-Rotor, 1.700 min⁻¹ mit dem 4-fach-Rotor). Während dieses ersten Zentrifugationsschrittes erfolgt die Sedimentation aller Zellen auf den Objekträger.

b) Entfernen des zellfreien Überstandes

Der zellfreie Überstand befindet sich nach der Zentrifugation noch in der Kammer und wird durch vorsichtiges Absaugen bis auf einen kleinen Flüssigkeitsrest entfernt. Es ist wichtig, dass das Sediment beim Absaugen nicht aufgewirbelt wird, da sonst Qualitätseinbußen und Zellverlust drohen. Es empfiehlt sich deshalb den Überstand von oben nach unten, dem Flüssigkeitsspiegel folgend, mit einer Pasteurpipette absaugen. Die Pipette nicht bis ganz unten auf den Objekträger führen, sondern einen kleinen Tropfen Restflüssigkeit auf dem Sediment belassen! Falls keine Eiweißlösung zugesetzt wurde, steht der gewonnene Überstand für biochemische Analysen zur Verfügung.

c) Trocknen des Sediments

Für die häufig angewendeten Giemsa-Färbungen muss das Sediment getrocknet werden. Dies geschieht durch einen zweiten Zentrifugationsschritt. Nach dem Entfernen des Überstandes den Spannring lösen und diesen zusammen mit der Kammer abnehmen (siehe Schema, Punkt B4). Die Spannplatte mit dem Objekträger und der Filterkarte zusammen mit dem Gehänge wieder in die Zentrifuge stellen und **1 Minute** lang bei **1.100 x g** (das entspricht 3.000 min⁻¹ mit dem 6-fach-Rotor, 3.400 min⁻¹ mit dem 4-fach-Rotor) zentrifugieren. Die Restflüssigkeit wird durch die Zentrifugalkraft weggeschleudert und von der Filterkarte aufgefangen. Die Zellen bleiben als Sediment auf dem Objekträger. Sie sind gut erhalten und ideal ausgebreitet. Verdunstungsartefakte, wie geschrumpfte Leukozyten und Kristallbildung, werden durch das Trockenzentrifugieren vermieden.

d) Fixieren und Färben

Das trockene Präparat kann sofort fixiert und gefärbt werden.

Tipps

Bei der Giemsa- oder May-Grünwald-Giemsa-Färbung werden die Objekträger zum Schluss mit Puffer (Weise, Sörensen) gespült. Danach müssen sie getrocknet werden.

Mit dem Labora-System-Gestell für 6 Objekträger (Best.-Nr. 1285) geschieht dies schnell und einfach:

- Die mit Weise-Puffer gespülten Objekträger in die Gestelle einlegen und in die Zentrifuge einsetzen.
- **1 Minute** lang bei **275 x g** (das entspricht 1.500 min⁻¹ im 6-fach Rotor, 1.700 min⁻¹ im 4-fach Rotor).
- Gestelle mit den trockenen Objekträgern aus der Zentrifuge nehmen.
- Die Präparate sind fertig zum Mikroskopieren und/oder Eindecken.
- Die Gehänge trocken wischen.

Im 6-fach Rotor können bis zu **36 Objekträger** gleichzeitig getrocknet werden.

Bestellinformationen

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

Zubehöerauswahl ⁵⁾	Bestell-Nr.
4-fach-Rotor	1624
6-fach-Rotor	1626
Zytogehänge	1660
Deckel passend für 1660	1661
Spannplatte mit Spannring	1662
Zytokammern 1 x 1 ml (30 mm ²)	1663
Zytokammer 1 x 2 ml (60 mm ²)	1664
Filterkarten für 1663 und 1664, 1 VE: 200 St.	1675
Labora-System-Gestell für 6 Objekträger	1285

⁵⁾ Unser komplettes Zubehör für die Zytologie finden Sie in unserem Zyto-Prospekt, den Sie kostenlos anfordern können.