



Objektträger-Präparate für die Zytologie von Pleuraerguss oder Aszites

Pleuraerguss und Aszites enthalten neben Mesothelzellen Lymphozyten sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten. Der Eiweißgehalt beträgt häufig um die 30 g/l. Der Zellgehalt variiert oft sehr stark. In beiden Flüssigkeiten kann Blut, bei Aszites zusätzlich Fett beigemischt sein.

Vorteile der Hettich Methode

1. **Passende Zytokammern für unterschiedliche Zellgehalte und Volumina**
2. **Hohe Zellausbeute**
3. **Gute Zelldarstellung**
4. **Optimale Belegungsdichte**

Präparation

1. Vorbereitung von Proben mit hohem Erythrozyten-Anteil

Da sich ein hoher Erythrozyten-Anteil nachteilig auf die Präparatequalität auswirkt, empfiehlt es sich, diese vor der Herstellung eines Zyto-Präparates mit Hilfe eines Lysepuffers zu entfernen.

a) Herstellen des Lysepuffers

8,29 g Ammoniumchlorid (NH_4Cl)
1,0 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) und
0,037 g Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA) werden mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Zur besseren Haltbarkeit empfiehlt es sich, den Lysepuffer zu autoklavieren.

b) Lysieren der Erythrozyten

- Die Probe 10 Minuten bei 350 x g zentrifugieren (das entspricht 1.700 min^{-1} im 6-fach Rotor, 1.900 min^{-1} im 4-fach Rotor).
- Den Überstand abpipettieren und aufbewahren.
- Das Sediment in Lysepuffer aufnehmen (1 Volumenanteil Sediment zu 10 Volumenanteilen Puffer).
- Gut mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehenlassen. Der frei werdende Hämoglobinfarbstoff bewirkt eine durchsichtige Rotfärbung.
- Die Reaktion mit der 10-fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung (0,9%-ige NaCl) oder phosphatgepufferter Kochsalzlösung abstoppen.
- 10 Minuten bei 350 x g zentrifugieren
- Den Überstand mit den lysierten Erythrozyten abkippen und verwerfen.
- Das Sediment in 10 ml 0,9%-iger NaCl (bzw. PBS) aufnehmen, gut vermischen und nochmals 10 Minuten bei 350 x g zentrifugieren.
- Den Überstand verwerfen und das Sediment in dem aufbewahrten Original-Probenüberstand aufnehmen und gut mischen. Aus dem Probenmaterial kann nun ein Zytopräparat hergestellt werden.

Wichtig: Die Zellen nicht zu lange in Lysepuffer stehen lassen, weil diese dann ebenfalls aufgelöst werden.

2. Auswahl des geeigneten Zubehörs

Zur Zentrifugation von Pleuraerguss und Aszites empfehlen sich die 2 ml Kammer (Best.-Nr. 1664) mit einer Sedimentfläche von 60 mm^2 und die 4 ml Kammer (Best.-Nr. 1665) mit einer Sedimentfläche von 120 mm^2 . Die 2 ml Kammer ist für Proben bis max. 100.000 Zellen geeignet, die 4 ml Kammer für zellreichere Proben bis max. 200.000 Zellen.

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 Pleuraerguss und Aszites ist in der Regel eine Trockenfixierung erforderlich. Deshalb den Zyto-Einsatz mit Filterkarte montieren (siehe Schema Punkt B1). Bei infektiösen Proben empfehlen wir, den Deckel Nr. 1661 aufzusetzen (siehe Schema Punkt B2).

4. Zentrifugation

a) Sedimentation

Die Proben einfüllen und **10 Minuten** lang bei **490 x g** zentrifugieren (das entspricht mit dem 6-fach Rotor 2.000 min^{-1} , mit dem 4-fach Rotor 2.200 min^{-1}).

b) Entfernen des zellfreien Überstandes

Der zellfreie Überstand befindet sich nach der Zentrifugation noch in der Kammer und wird durch vorsichtiges Absaugen 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 abzusaugen. Die Pipette nicht bis ganz unten auf den Objektträger führen, sondern einen kleinen Tropfen Restflüssigkeit auf dem Sediment belassen!

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 Objektträger 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 Objektträger. Sie sind gut erhalten und ideal ausgebreitet. Verdunstungsartefakte, wie geschrunpft Leukozyten oder Kristallbildung, werden durch das Trockenzentrifugieren vermieden.

d) Fixieren und Färben

Das trockene Präparat kann sofort fixiert und anschließend gefärbt werden.

Tipp

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

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

- Die mit Weise-Puffer gespülten Objektträger 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 Objektträgern 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 Objektträger** gleichzeitig getrocknet werden.

Bestellinformationen

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

Zubehöerauswahl ¹⁾	Bestell-Nr.
4-fach-Rotor	1624
6-fach-Rotor	1626
Zytogehänge	1660
Deckel passend für 1660	1661
Spannplatte mit Spannring	1662
Zytkammer 1 x 2 ml (60 mm ²)	1664
Zytkammer 1 x 4 ml (120 mm ²)	1665
Labora-System-Gestell für 6 Objektträger	1285

¹⁾ Unser komplettes Zubehör für die Zytologie finden Sie in unserem Zyto-Prospekt, den Sie kostenlos anfordern können.