



Objektträger-Präparate für die Urin-Zytologie
Präparation von Nativ-Urin

Um aus Urin ein gutes Zyto-Präparat herzustellen, genügt es nicht, Nativ-Urin auf handelsübliche Objekträger zu zentrifugieren. Urin enthält wenige Zellen, die obendrein noch schlecht auf dem Objekträger haften. Ein sehr zellarmes, nicht ausreichendes Präparat wäre die Folge. Will man die Zellausbeute erhöhen, muss man die Objekträger beschichten oder eine geeignete Fixierflüssigkeit einsetzen. Bewährt hat sich als Beschichtungsmedium Poly-L-Lysin (PLL, Fa. Sigma, Kat.Nr. P8920), als Fixiermedium die Saccomano's Flüssigkeit.

Vorteile der Hettich Methode

1. Hohe Zellausbeute

- durch die Beschichtung der Objekträger
- durch Aufnahme der Zellen in eine Fixierflüssigkeit, welche die Haftfähigkeit der Zellen verbessert

2. Gute Zelldarstellung

- Mit der Saccomano's Lösung erhält man Sedimente mit sehr sauberem Hintergrund.
- Die Urothelzellen liegen in einer Ebene.
- Die PLL-Beschichtung bewirkt, dass neben den Zellen auch kleinere Partikel wie Bakterien dargestellt werden.

Präparation

A) Herstellung eines Zyto-Präparates mit beschichteten Objekträgern

1. Vorbereitung der Objekträger

Für die Beschichtung der Objekträger mit Poly-L-Lysin stehen zwei Verfahren zur Auswahl, das Tauchverfahren oder die Beschichtung in der Zentrifuge. Die Tauchbeschichtung ist einfach und schnell durchzuführen, die Beschichtung ist aber gelegentlich ungleichmäßig. Dagegen ist die Beschichtung in der Zentrifuge etwas zeitaufwendiger, führt aber stets zu sehr guten Ergebnissen.

a) Tauchverfahren

- PLL 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und in eine Küvette füllen.
- Handelsübliche Objekträger ohne weitere Vorbehandlung 5 Min. in diese Lösung tauchen. Das PLL sollte Zimmertemperatur haben.

- Objekträger herausnehmen und im Wärmeschrank bei ca. 60°C liegend trocknen (Dauer ca. 15 Min.). Lufttrocknung dauert entsprechend länger. Der Objekträger ist einsatzbereit, sobald die PLL-Schicht angetrocknet ist.

b) Beschichtung in der Zentrifuge

- PLL 1:10 verdünnen.
- Ungereinigte Objekträger auf die Spannplatte (Best.-Nr. 1662) legen und eine 8 ml-Kammer (Best.-Nr. 1666) darauf befestigen.
- 100 µl verdünntes PLL in die Zyto-Kammer einfüllen.
- Den Zyto-Einsatz bei **1100 x g eine Stunde** lang zentrifugieren (das entspricht mit dem 6-fach-Rotor 3.000 min⁻¹, mit dem 4-fach-Rotor 3.200 min⁻¹). Danach kann die Probe direkt in diesen Zyto-Einsatz gefüllt werden.

2. Auswahl des geeigneten Zubehörs

Zur Zentrifugation von Urin empfiehlt sich unsere größte Zytokammer mit einem Volumen von 8 ml und einer Sedimentgröße von 240 mm². Diese erspart in vielen Fällen die Vorzentrifugation im Röhrchen.

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 Objekträger-Präparaten aus Urin ist in der Regel eine Feuchtfixierung erforderlich. Deshalb den Zyto-Einsatz ohne Filterkarte montieren (siehe Schema Punkt A1). Bei infektiösen Proben empfehlen wir den Deckel Nr. 1661 aufzusetzen (siehe Schema Punkt A2).

4. Zentrifugation

a) Sedimentation

Die Zytokammern werden **5 Minuten** lang bei **1100 x g** zentrifugiert (das entspricht mit dem 6-fach-Rotor 3.000 min⁻¹, mit dem 4-fach-Rotor 3.200 min⁻¹).

b) Entfernen des zellfreien Überstandes

Der zellfreie Überstand befindet sich nach der Zentrifugation noch in der Kammer und wird durch vorsichtiges Abkippen oder Absaugen entfernt. Es ist wichtig, dass das Sediment beim Absaugen nicht aufgewirbelt wird, da sonst Qualitätseinbußen und Zellverlust drohen.

c) Fixieren und Färben

Nach Entfernen des Überstandes kann das feuchte Präparat sofort fixiert (z.B. in 99%igem Äthanol) und anschließend gefärbt werden.

B) Herstellung eines Zyto-Präparates unter Verwendung von Saccomano's Lösung

1. Vorbereitende Arbeiten

a) Vorbereitung der Urinprobe

- Die Urinprobe in einem Röhrchen **10 Minuten** lang bei 1700 x g (das entspricht 3.600 min⁻¹ mit dem 6-fach-Rotor und 4.000 min⁻¹ mit dem 4-fach-Rotor) zentrifugieren.

- Überstand abkippen.

Wichtig: Den Bodensatz im Zentrifugen-Röhrchen vor der Zugabe der Saccomano's Lösung auflockern (am besten, durch vorsichtiges Klopfen des Röhrchenbodens auf eine feste Unterlage).

- Saccomano's Lösung zugeben und 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen.

b) Herstellen der Saccomano's Lösung

Zur Herstellung von 100 ml Saccomano's Lösung werden 43 ml Aqua dest., 53 ml 95 % Äthanol und 4 ml Polyethylenglycol-Stammlösung miteinander vermischt.

c) Herstellen der Polyethylenglycol-Stammlösung:

- Polyethylenglycol 1500 (Merck Darmstadt, Best.-Nr. 807489) und Aqua dest. auf 60°C erhitzen.
- Jeweils gleiche Volumina (z. B. 50 ml Polyethylenglycol und 50 ml Aqua dest.) im erwärmten Zustand mischen.
- Vor dem Ansetzen der Saccomano's Lösung die Stammlösung auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.

2. Auswahl des geeigneten Zubehörs

Siehe Seite 2.

3. Montage des Zyto-Einsatzes

Siehe Seite 2.

4. Zentrifugation

a) Sedimentation

Die Zytokammern werden **5 Minuten** lang bei **1100 x g** zentrifugiert (das entspricht mit dem 6-fach-Rotor 3.000 min⁻¹, mit dem 4-fach-Rotor 3.200 min⁻¹).

b) Entfernen des zellfreien Überstandes

Der zellfreie Überstand befindet sich nach der Zentrifugation noch in der Kammer und wird durch vollständiges Abkippen entfernt.

c) Fixieren und Färben

Nach Entfernen des Überstandes die Zytokammer abnehmen und das Sediment an der Luft trocknen lassen bis sich ein wachsartiger Belag gebildet hat. Das Präparat ist in diesem Zustand versandfähig. Vor der Färbung muss der wachsartige Belag auf dem Sediment durch Eintauchen (ca. 10 Minuten) in 50%igem Äthanol entfernt 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
Zytokammern 1 x 4 ml (120 mm ²)	1665
Zytokammer 1 x 8 ml (240 mm ²)	1666

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