

26. KUPPER, H., TYPLT, H., GRIMMECKE, H. D., FIEBIG, H.: Objektträgertest zur immunfluoreszenzmikroskopischen und enzymimmunologischen Erfassung von Zellmembranantigenen. *Allergie u. Immunol.* 29, 223-228 (1983).
27. LEHMITZ, R.: Verwendung von Polykationen-beschichteten Objektträgern für Zellanreicherungsverfahren. *Z. med. Lab.diagn.* 28, 222-224 (1987).
28. LEHMITZ, R., MÜLLER, H., KRETSCHMER, G.: Liquorzellanreicherung mit der Sedimentkammer unter Verwendung von Polykationen-beschichteten Objektträgern. *Psychiat. Neurol. med. Psychol.* 41, 751-754 (1989).
29. LEHMITZ, R., JOHN, H., KRETSCHMER, G.: Liquorzellanreicherung mit der Sedimentkammer und der Sorptionskammer unter Verwendung von Polykationen-beschichteten Objektträgern. *Z. med. Lab.diagn.* 30, 403-405 (1989).
30. LEHMITZ, R.: Untersuchungen zur Verwendbarkeitsdauer von Polykationen-beschichteten Objektträgern. *Z. med. Lab.diagn.* 29, 408-410 (1988).
31. SAYK, J.: Ergebnisse neuer liquor-cytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentkammer-Verfahren. *Ärztl. Wschr.* 9, 1042-1046 (1954).
32. KLEINE, T. O.: Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York (1990).
33. KÖLMEL, H. W.: Liquorzytologie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1978).
34. BOTS, G. T. A. M., WENT, L. N., SCHABERG, A.: Results of a sedimentation technique for cytology of cerebrospinal fluid. *Acta Cytol.* 8, 234-241 (1964).
35. KOLAR, O., ZEMAN, W.: Spinal fluid cytomorphology. Description of apparatus, technique and findings. *Arch. Neurol.* 18, 44-51 (1968).
36. LEHMITZ, R.: Liquorzellanreicherung mit der Sedimentkammer. Vergleichende methodische Untersuchungen. *Psychiat. Neurol. med. Psychol.* 40, 228-231 (1988).
37. WIETHÖLTER, H., OEHMICHEN, M., SAYER, H.: Qualitative Liquorzell Diagnostik. Methode und Aussagekraft. *Münch. med. Wschr.* 121, 631-636 (1979).
38. LEHMITZ, R., SAYK, J., KRETSCHMER, G.: Zellsedimentation mit der Sorptionskammer. Vergleichende liquorzytologische Untersuchungen. *Z. med. Labor.diagn.* 22, 224-228 (1981).
39. DEN HARTOG JAGER, W. A.: Cytopathology of the cerebrospinal fluid examined with the sedimentation technique after Sayk. *J. Neurol. Sci.* 9, 155-177 (1969).
40. SAYK, J., LEHMITZ, R.: Die Sorptionskammer. Eine neue Methode der spontanen Zellsedimentation. *Dt. Gesundh.-Wesen* 34, 2561-2565 (1979).
41. LEHMITZ, R., SAYK, J., KRETSCHMER, G.: Sorptions-Sedimentation. Ein Verfahren zur Anreicherung von Zellen. *Biol. Rdsch.* 17, 379-382 (1979).
42. MOUBARAK, E.: Sorptions-Sedimentation. Ein neues Verfahren zur Anreicherung von Zellen auf Objektträgern. Dissertation A, Rostock (1981).
43. OLISCHER, R. M., LEHMITZ, R., ZELE, J.: Zur Zellanreicherung und ihren Ergebnissen in der Zytodiagnostik des Liquor cerebrospinalis. *Dt. Gesundh.-Wesen* 36, 1027-1030 (1981).
44. WURSTER, U., STARK, E., ENGELHARDT, P.: Liquorzytologie nach kombinierter Zentrifugation und Zytozentrifugation im Vergleich zu Sedimentation und Membranfiltration. *Ärztl. Lab.* 30, 184-188 (1984).
45. BEUCHE, W.: Liquorzytologie. *Lab.med.* 11, 451-452 (1987).
46. REIBER, H.: Aktuelle Methoden der Liquoranalytik. *Lab.med.* 12, 101-109 (1988).
47. LEHMITZ, R.: Liquorzellanreicherung auf Objektträgern mit einem kombinierten Zentrifugations-Sorptionskammer-Verfahren. *Z. Klin. Med.* 44, 1375-1376 (1989).

Anschrift des Verfassers:

Dr. rer. nat. Reinhard Lehmitz
 Universität Rostock
 Nervenklinik
 Labor für Klinische Chemie und Liquorforschung
 Gehlsheimer Straße 20
 O-2540 Rostock 40

Zellmorphologie und Zellausbeute bei einer neuen Zytozentrifugentechnik mit gleichzeitiger Gewinnung von zellfreiem Überstand

Cytomorphology and Cell Yield in a New Cytocentrifugal Technique Allowing the Collection of the Cell-free Supernatant

G. Schwarz
 Hettich-Zentrifugen, Forschungs- und Entwicklungsabteilung, Tuttlingen

Zusammenfassung:

Es wird eine neue Zytozentrifugentechnik für die Herstellung von mikroskopischen Liquorzell-Präparaten vorgestellt. Mit Hilfe einer Zyto-Kammer, die eine Dichtung zwischen der Zyto-Kammer und dem Objektträger besitzt, werden die Zellen direkt auf den Objektträger aufzentrifugiert. Der zellfreie Überstand bleibt nach der Zentrifugation erhalten und kann für chemische Analysen benutzt werden. Die feuchte Einzelzell-Schicht wird durch eine zentrifugale Trocknung für die Romanowsky-Giemsa-Färbung präpariert. Dies geschieht unmittelbar nach der Zellsedimentation und dem Entfernen des größten Teils der Überstandsflüssigkeit mittels einer Pipette. Auf diesem Weg können viele der üblichen Zellschädigungen und Trocknungsartefakte vermieden werden. Die Zellen liegen gut ausgebreitet auf dem Objektträger vor. Bei niedriger Zellkonzentration fand sich eine verstärkte Zellausbreitung der Lymphozyten. Proben mit einer höheren Zellzahl ergeben meist sehr gute Präparate. Schwieriger ist es, zell- und eiweißarme Proben zu guten zytologischen Präparaten zu verarbeiten. In solchen Fällen hilft die Zugabe von Albumin. Diese zweistufige Methode ergibt Zellausbeuten bis zu 90%.

Schlüsselwörter:

Liquor cerebrospinalis - Zytozentrifugation - Zentrifugale Trocknung - Lymphozyten - Monozyten

Summary:

A new cytocentrifugal technique is presented for the preparation of microscopical slides of cerebrospinal fluid cells. With the help of a cyto-chamber having a sealing between the cyto-chamber and the slide the cells are sedimented directly onto the slide via centrifugation. The cell free supernatant is still present after the centrifugation and can be used for chemical analysis. After the sedimentation and removing of the most supernatant fluid by a pipette the wet cell monolayer is prepared for Romanowsky-Giemsa-staining by a drying centrifugation step. In this way many of the injurious changes of the cells and drying artefacts may be avoided. The cells are well flattened on the slide. With lower cell concentration it was found an enlargement of the lymphocytes. Samples having a higher cell count can be prepared with high quality. Some difficulties may occur with samples showing a low cell count and a low protein content. In this cases we could improve the results by the adding of albumin. This two step procedure leads to a cell yield of up to 90%.

Keywords:

Cerebrospinal fluid - cytocentrifugation - centrifugal drying - lymphocytes - monocytes

Einleitung

Seit ihren Anfängen vor rund 100 Jahren bis heute ist die Liquorzytologie auf das engste mit der Entwicklung der Präparations- und Färbetechnik verbunden (1–15). Trotz einiger Durchbrüche bei der Methodik der Probenvorbereitung befriedigen auch die heute üblichen Verfahren bei steigenden Anforderungen noch nicht in jeder Hinsicht (10–13, 16).

Die *Filtermethode* besteht durch eine hohe Zellausbeute (bis zu 90 %) und erhält den Liquor für weitere chemische Untersuchungen. Nachteilig ist jedoch die dreidimensionale, wenig ausgetragene Darstellung der Zellen. Abhängig vom Filtermaterial können alle nicht sonst üblichen Fixier- und Färbemethoden angewendet werden (5, 13).

Die *Zytozentrifugation* mit eingelegter Filterkarte ist eine weit verbreitete Methode, die dem Sayk-Sedimentierkammer-Prinzip nachempfunden wurde (2, 4, 17). Die Zelldarstellung ist – mit Einschränkungen – gut (5, 11–14). Leider tritt ein hoher Zellverlust durch seitliches Abwandern der Zellen in die Filterkarte auf. Es werden Ausbeuten von 11–54,1 % angegeben (5, 12).

Die *Sedimentierkammer* nach Sayk zeigt die besten morphologischen Resultate und wird in neurologischen und neurochirurgischen Kliniken als die Standardmethode verwendet (2, 10, 13, 17). Der große Nachteil besteht im hohen Zellverlust zwischen 40 und 67 % und mehr. Vor allem die weniger auf der Unterlage haftenden Lymphozyten gehen verloren (8, 13, 18).

Sowohl bei der obigen Form der Zytozentrifugation als auch bei der Sayk-Sedimentierkammer-Methode wird der Liquor von der Filterkarte aufgesaugt und steht somit nicht mehr für weitere Laboruntersuchungen zur Verfügung.

Um die Nachteile der oben beschriebenen Methoden zu überwinden, bedarf es einer verbesserten Präparationstechnik. Wir haben uns deshalb das Ziel gestellt, auf der Grundlage der Zytozentrifugation eine neue Zytopräparationsmethode zu entwickeln, die eine gute Zellmorphologie mit einer hohen Zellausbeute verbindet und die Gewinnung des zellfreien Liquors für weitere chemische Untersuchungen gestattet.

Material und Methoden

Die Methodik zur Präparation empfindlicher Zellen wurde von uns in den letzten Jahren entwickelt und speziell für die Verhältnisse bei Liquor cerebrospinalis vertieft (19, 20, Hettich-Firmenschriften, unveröffentlichte Ergebnisse)*.

Für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten wir ein *mononukleäres Zellkonzentrat* (Lymphozyten, Monozyten) als Liquor-Modell. Die Lymphozyten und Monozyten wurden mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aus heparinisiertem Vollblut isoliert. Einen ml Blut aus der Fingerkuppe verdünnten wir mit gleicher Menge PBS (Dulbeccos PBS ohne Ca^{++} , Mg^{++} , PM 16, Serva, Heidelberg). Die Probe wurde auf 3 ml Ficoll-Trennlösung (Biochrom, Berlin) gegeben und 15 min bei $RZB^{**} = 400 \times g$ zentrifugiert. Die die Lymphozyten und Monozyten enthaltene Interphase wurde abgehoben und 3 \times mit PBS gewaschen (6 min, $RZB = 400 \times g$). In dieser Stamm-Zellsuspension wurde mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer die Zellzahl ermittelt. Durch Verdünnen stellten wir die Arbeits-Zellsuspensionen mit Konzentrationen zwischen 200 und 2 Leukozyten her. Die *Albuminkonzentration* (RSA, Sigma, St. Louis, USA) betrug, wenn nicht anders vermerkt, 200 mg/l, entsprechend der Eiweißkonzentration von gesundem Liquor (19, 20). Für die modellhafte Erforschung der Verhältnisse bei pathologischem Liquor mit erhöhtem Eiweißgehalt verwendeten wir eine Albuminkonzentration von 6 000 mg/l.

Die *Zytopräparation* erfolgte mit einer laborüblichen Tischzentrifuge mit Zytobehör (UNIVERSAL 1200, Andreas Hettich, Tuttingen). Die Zellen wurden aus jeweils 200 μ l der Arbeits-Suspensionen in einer *Zyto-Kammer* mit 30 mm² Sedimentierfläche (Nr. 1275) auf einen sauberen und fettfreien Objektträger aufzentrifugiert (3 min, $RZB = 270 \times g$). Diese Zytozentrifugation entspricht einer Reagenzglas-Zentrifugation, da aufgrund einer Dichtung am unteren Rand der fest auf dem Objektträger aufsit-

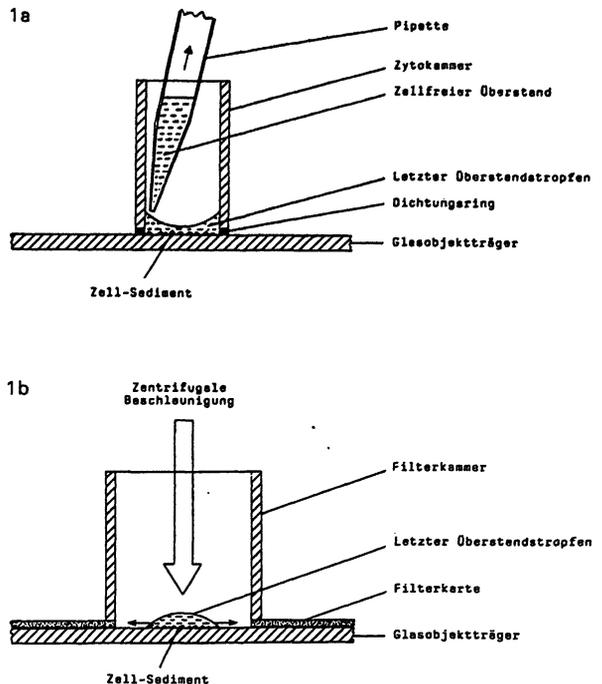


Abb. 1: Gewinnung der Überstandsflüssigkeit und zentrifugale Sedimenttrocknung:

1 a) Abpipettieren der zellfreien Überstandsflüssigkeit bis auf einen Resttropfen, der das weitgehend ungestörte Zellsediment bedeckt.

1 b) Prinzip der zentrifugalen Sedimenttrocknung. Der letzte Überstandstropfen bzw. die Restfeuchte wird seitlich abzentrifugiert und von einer kreisförmig ausgestanzten Filterkarte aufgenommen.

zenden Zyto-Kammer kein Material verlorengehen kann (Abb. 1a). Die zellfreie Überstandsflüssigkeit wurde vorsichtig bis auf eine Restmenge abgesaugt, die das ungestörte Zellsediment bedeckt hält (Abb. 1b). Um das Zellsediment nicht zu stören, wurde mit einer Pasteurpipette unter Sichtkontrolle an der Oberfläche der Überstandssäule abgesaugt. Am Ende muß noch soviel Flüssigkeit über dem Sediment stehen (ca. 40 μ l), daß auch der untere Rand des Flüssigkeitsmeniskus noch nicht das Zellsediment berührt. Die Zyto-Kammer wurde nun vorsichtig entfernt, so daß der Objektträger mit dem Zellsediment und einem gewölbten Tropfen Überstand zurückbleibt. Die zentrifugale Sedimenttrocknung erfolgte mit Filterkammer (Nr. 1281) und eingelegter Filterkarte für eine Minute bei $RZB = 1 100 \times g$ (Abb. 1b). Der trockene Objektträger wurde zur weiteren Bearbeitung entnommen und die feuchte Filterkarte verworfen.

Das trockene Zellsediment färbten wir in der Zytokammer (Durchmesser = 17,5 mm; Nr. 1272) nach Romanowsky-Giemsa (Standard-Färbung nach Wittekind, Fa. Heyl, Berlin).

Zur schnellen und sauberen *Trocknung der Objektträger* nach der Färbung dienen speziell für diesen Zweck konstruierte Zentrifugiergestelle (1s-Gestell für 6 Objektträger, Nr. 1285, 1 min, $RZB = 270 \times g$). Die spülfeuchten Objektträger waren so in kürzester Frist trocken und wurden mit Eukitt (Riedel-de-Haen) und einem 24 \times 24 mm Deckglas eingedeckt.

Die *Zell- und Kerndurchmesser* wurden mittels eines Okularmikrometers vermessen: Ausgehend von einem vorbestimmten zentralen Koordinatenpunkt wurden jeweils alle Lymphozyten bzw. Monozyten erfaßt, die bei der Objektträger-Tischbewegung zufällig in das Beobachtungsfeld (eingespiegelter Leuchtraum beim Photomikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen) gelangten. Es wurde bei 1 000facher Vergrößerung (Öl) gemessen.

Für die *Zellzählungen* (Anteil gut beurteilbarer Zellen, Ausbeute) wurden immer 5 Orte im Sediment ausgewertet: Zentrum und jeweils die Mitte zwischen Zentrum und Sedimentrand in den 4

* Unter wissenschaftlicher Mitarbeit von Frau Dr. Daniela Klar und Frau Dipl.-Biol. Anke Lenz

** RZB = Relative Zentrifugalbeschleunigung, x Erdbeschleunigung (g)

Koordinatenrichtungen anhand vorgegebener Koordinaten. Pro Koordinatenpunkt kam, je nach Zellbelegungsichte, eine Fläche von 0,04 bis 0,80 mm² (1/2 bis 10 Flächen des eingespiegelten Leuchtrahmens, Messungen mit Objekt- und Okularmikrometer) bei 400facher Vergrößerung zur Auszählung. Bei 100 Leukozyten/ μ l wurden 5 Leuchtrahmenfelder pro Sediment (= 1,3%) ausgewertet; bei niedriger Belegungsichte, bei z. B. 5 Leukozyten/ μ l waren es 50 Felder pro Sediment (= 13,4% der Sedimentfläche). Für statistische Signifikanz-Prüfungen der Unterschiede in den Tabellen 1–3 wurde der Student t-Test angewendet.

Ergebnisse

Zellmorphologie und Präparatequalität

Die Ergebnisse der Zytopräparation erwiesen sich als stark abhängig von der Probenbeschaffenheit (Zellzahl, Eiweißgehalt) und den Präparationsbedingungen, z. B. der Trocknungsgeschwindigkeit (Abb. 2, Tab. 1–3). Um den Einfluß der Präparation auf die Zellausbreitung zu bestimmen, wurden die Zell- und Kerndurchmesser der Lymphozyten und Monozyten als einfachste morphometrische Parameter bestimmt. Die Lymphozyten

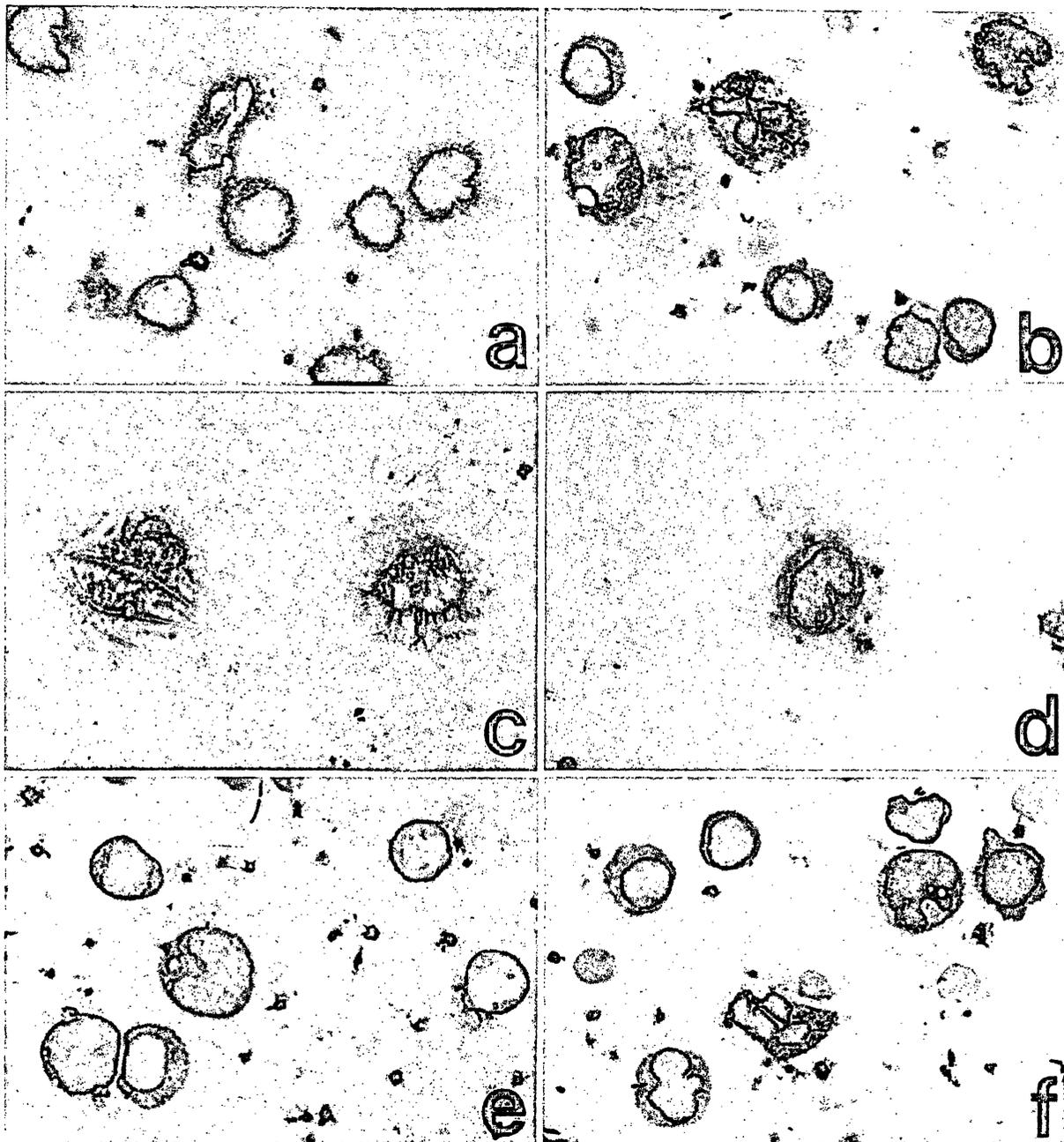


Abb. 2: Zytologisches Ergebnis der Zyto-Präparation und Einfluß verschiedener Parameter auf die Präparatequalität: a und b) Verbesserte Zellmorphologie bei erhöhter Trocknungsgeschwindigkeit; a) RZB = 50 (xg), b) RZB = 800 (xg), c und d) Stabilisierung der Zellen durch Albumin bei zellarmen Proben (5 Leukozyten/ μ l); c) Geplatze Zellen bei niedrigem Albumingehalt (200 mg/l), d) intakte Zellen bei erhöhtem Albumingehalt (6000 mg/l). Geringer Einfluß von Albumin bei zellreichen Proben (100 Leukozyten/ μ l), die gegenüber zellarmen Proben eine deutlich verbesserte Morphologie aufweisen; e) niedriger Albumingehalt (200 mg/l), f) Zugabe von 20 μ l Albuminlösung (18000 mg/l) zu Resttropfen vor zentrifugaler Trocknung. Mikroskopische Vergrößerung: 1000fach; Zytokammer: 30 mm²; Einfüllmenge: 200 μ l.

zeigten einen großen Zelldurchmesser zwischen 12 und 15 μm (Tab. 1). Die Lymphozyten lagen bei 6 Leukozyten/ μl ausgebreiteter vor als bei 100 bis 200 Leukozyten/ μl ($p < 0,001$). Für die Kerndurchmesser der Lymphozyten ergab sich eine stärkere Ausbreitung mit geringerer Zellkonzentration ($p < 0,001$ bzw. $< 0,01$: großer Kerndurchmesser bei 6 und 100 Leukozyten/ μl). Im Gegensatz zu den Lymphozyten zeigten die Monozyten eine geringere Abhängigkeit der Zellausbreitung von der Zellkonzentration. Lediglich beim Zelldurchmesser fand sich eine stärkere Spreitung bei geringer Zellkonzentration von 6 Leukozyten/ μl gegenüber den hohen Zellkonzentrationen ($p < 0,01$ beim großen und $p < 0,001$ beim kleinen Zelldurchmesser). Die Kernaussbreitung bei den Monozyten ließ keine statistisch absicherbaren Unterschiede erkennen ($p > 0,05$). Die Monozyten hatten einen Durchmesser von 15–18 μm .

Bei Einhaltung optimaler Bedingungen konnten gute Präparationsergebnisse erzielt werden (Abb. 2b, e, f; Tab. 1–3). Die Zellen waren überwiegend gleichmäßig im kreisförmigen 30 mm^2 -Sediment verteilt.

Trocknungsgeschwindigkeit

Die Trocknungsgeschwindigkeit läßt sich durch die eingestellte RZB bei der zentrifugalen Trocknung beeinflussen. Eine zu niedrige Trocknungsgeschwindigkeit produziert die bekannten Trocknungsartefakte, wie geschrumpfte und intensiv gefärbte Zellen. Im Hintergrund finden sich Kristallniederschläge. Dieser Bereich geht von RZB = 0 bis ca. 120 xg . Mit Erhöhung der Trocknungsgeschwindigkeit zeigen sich die Zellen besser ausgebreitet und lassen das typische Färbemuster der Romanowsky-Giemsa-Färbung erkennen. Die Kristallbildung wird verhindert. Neben der Schrumpfung von Zellen treten bei geringer Trocknungsgeschwindigkeit auch geplatze Zellen auf, bei denen stellenweise Chromatin austritt, und es finden sich verwaschene Zellstrukturen (RZB = 50 xg ; Abb. 2a). Mit deutlich erhöhter Trocknungsgeschwindigkeit gelang eine weit bessere Zelldarstellung (RZB = 800 xg ; Abb. 2b).

Zell- und Eiweißgehalt

Mit hohem Zellgehalt (z. B. 100–200 Leukozyten/ μl) lassen sich meist gute Präparate herstellen. Schwieriger ist die Situation bei Proben mit geringerem Zell- und Eiweißgehalt, was für Liquoruntersuchungen im Normbereich typisch ist.

Im Bereich von 2–13 Zellen/ μl und bei niedrigem Eiweißgehalt (200 mg Albumin/l) waren nur 25–36 % aller mononukleären

Tab. 1: Zell- und Kerndurchmesser bei Lymphozyten und Monozyten zentrifugal getrockneter Präparate bei drei Zellkonzentrationen. Sedimentation: RZB = 270, 3 min; zentrifugale Trocknung: RZB = 1 100, 1 min; Romanowsky-Giemsa-Färbung; Zyto-Kammer: 30 mm^2 ; Einfüllmenge: 200 μl ; Mittelwert mit Standardabweichung von jeweils 30 Zellen von 6 Präparaten.

Zelltyp	Parameter	Konzentration an Lymphozyten und Monozyten *		
		6/ μl	100/ μl	200/ μl
Lymphozyten **	Zelldurchmesser, groß	14,5 ± 1,8	12,6 ± 1,2	11,9 ± 1,9
	Zelldurchmesser, klein	12,8 ± 1,5	10,9 ± 2,3	9,9 ± 1,5
	Kerndurchm., groß	11,3 ± 1,5	10,5 ± 0,9	9,1 ± 0,9
	Kerndurchm., klein	9,2 ± 1,2	8,0 ± 1,1	7,1 ± 0,9
Monozyten **	Zelldurchmesser, groß	17,5 ± 2,4	16,1 ± 1,5	16,4 ± 1,8
	Zelldurchmesser, klein	15,2 ± 2,0	13,6 ± 1,4	13,3 ± 1,5
	Kerndurchm., groß	14,4 ± 1,3	13,9 ± 1,1	13,9 ± 1,8
	Kerndurchm., klein	4,5 ± 1,3	4,7 ± 1,5	4,9 ± 1,9

* Summe der Lympho- und Monozyten
** Angaben der Durchmesser in μm

Tab. 2: Einfluß der Konzentration an Lymphozyten und Monozyten auf die Qualität der zentrifugal getrockneten Präparate. Präparationsbedingungen: siehe Tab. 1. In der Ausbeuteberechnung sind alle Verluste während der gesamten Präparation enthalten, da auf die Zellzählung in der Stamm-Zellsuspension (Fuchs-Rosenthal-Kammer) bezogen wurde. Mittelwert mit Standardabweichung von je 6 Objektträgern.

Qualitäts-Parameter	Konzentration an Lymphozyten und Monozyten*			
	2/ μl	13/ μl	100/ μl	200/ μl
Morphologisch gut auswertbare Lymphozyten und Monozyten* (Anteil in %)	25,3 ± 18,0	25,6 ± 9,7	84,6 ± 1,4	88,5 ± 4,4
Ausbeute an Lymphozyten und Monozyten* (%)**	108,0 ± 22,8	89,3 ± 9,0	86,6 ± 6,8	72,5 ± 10,3

* Summe der Lympho- und Monozyten;
** Bezogen auf Fuchs-Rosenthal-Kammer

Zellen gut auswertbar. Demgegenüber stieg die Zahl gut auswertbarer Zellen auf Werte zwischen 85 und 88 %, wenn die Zellzahl auf 100–200 erhöht wurde ($p < 0,001$; Tab. 2, 3). Die Zellmorphologie zeigte sich wesentlich verbessert (Abb. 2c, e). Bei geringer Zellzahl in der Probe wirkte sich eine Erhöhung der Albuminkonzentration von 200 auf 6 000 mg/l stabilisierend auf die Zellen beim Trocknungsprozeß aus (Abb. 3c, d). Der Anteil gut auswertbarer Lymphozyten und Monozyten stieg von 36 % bei niedrigem Albumingehalt auf 60 bis 67 % bei erhöhtem Albumingehalt in der Zellprobe bzw. nach Zugabe von 20 μl Albuminlösung (18 000 mg/l) zum letzten Überstandstropfen vor dem zentrifugalen Trocknen ($p < 0,01$, Tab. 3).

Bei hoher Zellkonzentration (100 Leukozyten/ μl) verbesserte sich die Erhöhung der Albuminkonzentration dagegen die Zellqualität nicht. Der Anteil gut differenzierbarer Lymphozyten und Monozyten nahm mit 77 % gegenüber 85 % nicht zu, sondern eher ab ($p < 0,05$; Tab. 3).

Tab. 3: Einfluß der Albuminkonzentration auf die Qualität der zentrifugal getrockneten Präparate sowie ihre Wechselwirkung mit der Konzentration an Lymphozyten und Monozyten. Präparationsbedingungen: siehe Tab. 1. Die Zellausbeute bezieht sich auf parallel präparierte und luftgetrocknete Zellsedimente (100 %-Wert). Dazu wurden die Zellen in der Zyto-Kammer auf den Objektträger zentrifugiert. Der obere Teil des Überstandes wurde vorsichtig abgesaugt, ohne das Sediment zu stören und das Sediment luftgetrocknet. Somit erfaßt die angegebene Zellausbeute allein die Verluste während der zentrifugalen Trocknung. Mittelwert mit Standardabweichung von je 6 Objektträgern.

Albumin-Konz. (mg/l)	Zellausbeute (%)				
	200	6 000	200	200	6 000
Zugabe von 20 μl Albumin (18 000 mg/l) vor Trocknen	–	–	+	–	–
Zellkonz. (Zellen/ μl)	5	5	5	100	100
Morphologisch gut auswertbare Lymphozyten und Monozyten* (Anteil in %)	35,6 ± 13,8	59,8 ± 11,0	67,1 ± 20,5	85,0 ± 3,2	76,7 ± 5,9
Ausbeute an Lymphozyten und Monozyten* (%)**	92,4 ± 10,5	57,1 ± 11,5	84,1 ± 12,7	102,0 ± 8,7	97,0 ± 7,2

* Summe der Lympho- und Monozyten;
** Bezogen auf 11 luftgetrocknete Objektträger nach Sedimentation; keine zentrifugale Trocknung

Zellausbeute

Die Ausbeute an mononukleären Zellen bewegte sich bei 7 von 9 Gruppen im Mittel zwischen 84 und 108 %. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p > 0,05$; Tab. 2, 3).

Zwei Gruppen zeigten demgegenüber deutlich verringerte Werte. So wurde bei 5 Leukozyten/ μl und einem erhöhten Eiweißgehalt (6000 mg/l) eine signifikant erniedrigte Ausbeute mit 57 % gefunden ($p < 0,001$; Tab. 3). Bei diesen Präparaten wurden relativ viele Zellen bei der zentrifugalen Trocknung aus dem ursprünglichen Sediment seitlich in Richtung des Filterkartensandes geschwemmt und fehlten somit im Auszählbereich. Ein anderer, allerdings weniger erniedrigter Ausbeutewert fand sich bei der hohen Zellkonzentration von 200 Leukozyten/ μl mit 72 % ($p < 0,05$; Tab. 2). Dennoch zeigten diese Präparate eine sehr hohe Belegdichte von 970 Leukozyten/ mm^2 .

Diskussion

Die vorgestellte Präparationstechnik erweist sich aufgrund der durchgeführten Experimente mit dem Liquor-Modellsystem als gut geeignet für die zytologische Liquoraufarbeitung.

Da die Zyto-Kammer einen Dichtungsring besitzt, entsteht beim Zusammenbau mit dem Objektträger ein geschlossenes System, so daß während der zentrifugalen Zellsedimentation keine Zellen verlorengehen können, es sei denn, daß die sich an den Kammerwänden festsetzen.

Beim Absaugen der Überstandsflüssigkeit oder bei der Weiterverarbeitung der Zellsedimente, z. B. der zentrifugalen Trocknung, können Zellverluste auftreten. Mit einer Ausbeute von durchschnittlich 94 % bei den 7 nicht signifikant unterschiedlichen Versuchsgruppen kommt dieses System an die Grenzen des überhaupt erreichbaren Zellertrages und übertrifft deutlich die Angaben für die Sedimentierkammer bzw. der Zytocentrifuge mit eingelegter Filterkarte. Lediglich die Millipore-Filter-Methode erbringt eine vergleichbar hohe Zellausbeute (5, 8, 9, 11-15, 18, 21-30). Unter ungünstigen Bedingungen (geringe Zellhaftung, Überbelegung) kann es jedoch zu deutlich verringerten Ausbeuten kommen, wie in zwei Versuchsgruppen mit 57 und 72 % aufgetreten.

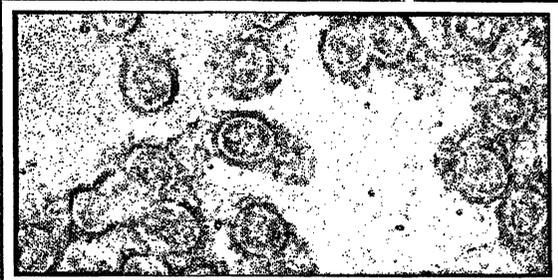
Die Rückgewinnung des zellfreien Liquors für Laboruntersuchungen ist ebenfalls durch die abgedichtete Zyto-Kammer gewährleistet. Damit entspricht dieses System der immer wieder gestellten Forderung nach Erhalt des zellfreien Überstandes, insbesondere bei geringem Probenvolumen, z. B. bei Kinderliquor (9, 15, 23, 24, 31).

Für die Beurteilung der Zellmorphologie ist die Sayk-Sedimentierkammer als Referenz anzusehen (13). In vielen Präparaten entspricht die Qualität der Zellen, die mit unserer Zytocentrifugationsmethode präpariert wurden, dem Sayk-Sedimentierkammer-Standard, insbesondere bei zellreicheren Präparaten (Abb. 2c, d, e). Der Anteil der gut differenzierbaren Zellen lag dort mit 85-88 % bei hohen Werten. Der Grund für die Abhängigkeit der Zellmorphologie von der Zellbelegdichte auf dem Objektträger ist noch nicht genau bekannt, dürfte aber in einem veränderten Trocknungsverhalten bei vereinzelt Zellen gegenüber einer relativ dichten Zellschicht zu suchen sein.

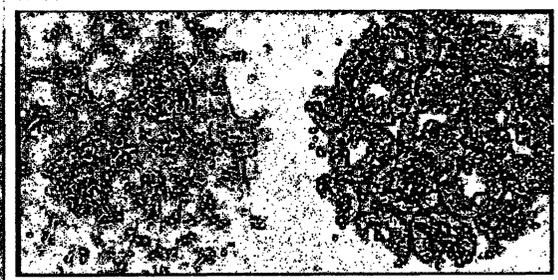
Ähnliche Untersuchungen wurden von Tutuarima et al. (15) mit unserem Zyto-System an klinischen Liquor-Proben durchgeführt. Etwa 500 μl (oder weniger) Liquor wurde für 1 min bei $\text{RZB} = 240 \text{ xg}$ in der Zyto-Kammer zentrifugiert und danach etwa 400 μl (oder weniger) vom Überstand abpipettiert. Es blieb eine dünne Flüssigkeitsschicht über dem Zellsediment stehen. Mit einer Pipettenspitze, die mit Sephadex G10 Partikeln gefüllt war, wurde die Restflüssigkeit abgesaugt. Die Zellausbeute betrug 90 % und die Zellmorphologie entsprach den Ergebnissen der Sedimentierkammer-Technik (15).

Wir konnten mit unseren Ergebnissen bestätigen, daß der Trocknungsprozeß der Zellen der wichtigste Faktor für die Morphologie der Romanowsky-Giemsa-gefärbten Zellen ist. Die Zellen müssen schnell trocknen, wobei osmotische Effekte vermieden werden müssen, die mit einem Verdunsten von Überstandsflüssigkeit in Beziehung stehen (1-3, 8-10, 15, 32). Ebenfalls bestätigen konnten wir die Literaturangabe, wonach die Zellzahl einen bedeutenden Einfluß auf die Präparatequalität hat (1, 3, 10, 33, 34). Zum Einfluß von zugegebenem Eiweiß als Schutzfaktor für die Zellen beim Trocknen gibt es unterschiedliche Erfahrungen

ImmuCare Diagnostika



Immunologie
Serologie
Virologie
Bakteriologie
Allergologie



Ihr zuverlässiger Partner für höchste Qualitätsansprüche. Der hohe und zuverlässige IC-Qualitätsstandard ist die Grundlage für eine gute Partnerschaft. Unterstützt wird unser technisches Know-how durch ständige innovative Forschungs- und Entwicklungsarbeit. Unsere Mitarbeiter im Außendienst vermitteln Ihnen gerne unser Know-how.

IC ImmuCare GmbH & Co. KG
Holtmeinsstraße 15 · 4650 Gelsenkirchen · Telefon 0209 44100-0 · Telefax 0209 4496901
Immunologie · Serologie · Virologie · Bakteriologie · Allergologie

(3, 5, 8, 15, 33, 34). Auch in unseren Experimenten war die Auswirkung einer Erhöhung der Albuminkonzentration nicht einheitlich. Bei zellarmen Proben konnte eine deutliche Stabilisierung der Zellen beobachtet werden. Demgegenüber war bei zellreichen Proben kein positiver Eiweißeffekt zu bemerken. Die gemessenen Zell- und Kerndurchmesser der Lymphozyten und Monozyten entsprechen den Normwerten aus der zytologischen und hämatologischen Literatur (5, 11, 20, 27, 35, 36). Die Tendenz, daß die Lymphozyten mit höherer Zelldichte etwas weniger ausgebreitet und kompakter sind, wird auf die Wechselwirkung der Zellen untereinander zurückgeführt, die auch den Trocknungsprozeß beeinflussen (34). Die teilweise unterschiedliche Reaktion von Lymphozyten und Monozyten könnte durch die unterschiedliche Zellform, Kern- und Plasmakonsistenz und die unterschiedliche Fähigkeit der Ausbreitung auf der Glasoberfläche verursacht sein. Monozyten breiten sich im Gegensatz zu Lymphozyten sehr schnell auf Oberflächen aus, wie man im Phasenkontrastmikroskop beobachten kann. Methodenabhängige Unterschiede in der Zellgröße von Liquorzellen fand auch Kleine (11) für zytoplasma-arme und -reiche Zellen.

Mit unserer Zyto-Technik kann parallel eine Reihe gleichwertiger Präparate für die Romanowsky-Giemsa-Färbung hergestellt werden. Es ist zu vermuten, daß dies auch für die Anwendung anderer Färbungen, zytochemischer und immunzytochemischer Untersuchungen gilt, was den Forderungen der modernen Liquorzytologie (37–39) entgegenkommen würde. Für die Feuchtfixierung, z. B. mit Alkohol, müßte man die feuchten Sedimente unmittelbar nach der Sedimentation und nach dem Absaugen der Überstandsflüssigkeit weiterverarbeiten, d. h. nicht zentrifugal trocknen.

Das verwendete Liquor-Modell hat sich bisher für die methodischen Untersuchungen gut bewährt. Weitere Studien, in Zusammenarbeit mit klinischen Liquor-Laboratorien, werden zur Ergänzung der Modelluntersuchungen durchgeführt.

Schrifttum:

- SCHÖNENBERG, H.: Eine einfache Methode zur Herstellung gut differenzierbarer Liquorzellpräparate. Dtsch. Med. Wschr. 74, 881 (1949).
- SAYK, J.: Ergebnisse neuer liquor-zytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentierkammer-Verfahren. Ärztl. Wschr. 9, 1042–1046 (1954).
- LUMSDEN, C. E.: Problems in the cytology of cerebrospinal fluid. Arch. de Vecchi Anat. pat. 31, 318–338 (1960).
- WATSON, P.: A slide centrifuge: An apparatus for concentrating cells in suspension onto a microscope slide. J. Lab. Clin. Med. 68, 494–501 (1966).
- BARRETT, D. L., KING, E. B.: Comparison of cellular recovery rates and morphologic detail obtained using membrane filter and cytocentrifuge techniques. Acta Cytol. 20, 174–180 (1976).
- KÖLMEL, H. W.: Atlas of cerebrospinal fluid cells. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2–5 (1976).
- KLEINE, T. O., FLURY, R., TRITSCHLER, W.: Liquorzytologie mit vorgefärbten Objektträgern. Dtsch. Med. Wschr. 102, 1216–1221 (1977).
- SAYK, J., LEHMITZ, R.: Die Sorptionskammer. Eine neue Methode der spontanen Zellsedimentation. Dt. Gesundheitswesen 34, 2561–2565 (1979).
- TUTUARIMA, J. A., HISCHE, E. A. H., VAN DER HELM, H. J.: An improved method for the concentration of cerebrospinal fluid cells by suction tip and sedimentation chamber. J. Neurol. Sci. 44, 61–67 (1979).
- GRUNZE, H., SPRIGGS, A. J.: History of clinical cytology. GIT-Verlag, Darmstadt, 80–84 (1980).
- KLEINE, T. O.: Liquorzytologie mit farbbeschichteten Objektträgern. Vergleich mit Sedimentierkammerverfahren und Zytozentrifuge. Dtsch. Med. Wschr. 106, 865–870 (1981).
- WURSTER, U., STARK, E., ENGELHARDT, P.: Liquorzytologie nach kombinierter Zentrifugation und Zytozentrifugation im Vergleich zu Sedimentation und Membranfiltration. Ärztl. Lab. 30, 184–188 (1984).
- KÖLMEL, H. W.: Methoden der Konservierung und Konzentrierung von Liquorzellen. In: Zytologie des Liquor cerebrospinalis (hrsg. von H. W. Kölmel), Edition Medizin, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 15–20 (1986).
- KRANZ, B. R., THIEL, E., THIERFELDER, S.: ZNS-Befall bei lymphohämatopoetischen Neoplasien: Inzidenz und immunologischer Nachweis im Liquor. In: Zytologie des Liquor cerebrospinalis (hrsg. von H. W. Kölmel), Edition Medizin, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 101–124 (1986).
- TUTUARIMA, J. A., HISCHE, E. A. H., SYLVA-STEENLAND, R. M. R., VAN DER HELM, H. J.: A cytopreparatory method for cerebrospinal fluid in which the cell yield is high and the fluid is saved for chemical analysis. Acta Cytol. 32, 425–427 (1988).
- BIGNER, S. H., JOHNSTON, W. W.: The cytopathology of cerebrospinal fluid. Acta Cytol. 25, 335–353 (1981).
- PEIFFER, J.: Liquorzytologie – Rückblick und Zukunftsperspektiven aus den Erfahrungen des Tübinger Instituts für Hirnforschung. In: Zytologie des Liquor cerebrospinalis (hrsg. von H. W. Kölmel), Edition Medizin, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 3–13 (1986).
- LEHMITS, R., SAYK, J., KRETSCHMER, G.: Zellsedimentation mit der Sorptionskammer. Vergleichende liquorzytologische Untersuchungen. Z. med. Labor-Diagn. 22, 224–228 (1981).
- DUFRESNE, J.-J.: Praktische Zytologie des Liquor. Documenta Geigy, Basel (1973).
- HALLMANN, L.: Klinische Chemie und Mikroskopie: Ausgewählte Untersuchungsmethoden für das medizinisch-klinische Laboratorium, 11., neubearbeitete Aufl., Thieme, Stuttgart-New York (1980).
- POWELL, M. E. A.: Cytological preparations from protein-free fluids. J. clin. Path. 12, 561–564 (1959).
- ERIKSSON, O.: Method for cytological detection of cancer cells in blood. Cancer (Philad.), 15, 171–175 (1962).
- ENESTRÖM, S.: Suction technique for sedimentation of body fluid cells. Acta Path. Microbiol. Scand. 59, 473–480 (1963).
- WESEMANN, W.: Methodischer Beitrag zur Liquorcytodiagnostik. Dtsch. Z. Nervenheilkunde 191, 360–366 (1967).
- ENGELHARDT, P., AVENARIUS, H. J., HEIDELBERG, P.: Zur Methodik der Liquorzellgewinnung. Kritik der Verfahren. Ärztl. Lab. 22, 366–370 (1976).
- SCHEDIFKA, R., WAGNER, G.: Die Zytozentrifuge in der Liquorzytodiagnostik. Psychiat. Neurol. med. Psychol., Leipzig 30, 620–623 (1978).
- BOON, M. E., SMID, L., VAN OLPHEM, K., KREBBER, R.: An improved cytocentrifuge technique for cerebrospinal fluid cytology. Clin. Neurol. Neurosurg. 82, 203–207 (1980).
- DYKEN, P. R., SHIRLEY, S., GAMMAL, T. E.: Comparison of cytocentrifugation and sedimentation techniques for CSF cytology. Acta Cytol. 24, 167–170 (1980).
- DUCOS, R., DONOSO, J., WEICKHARDT, U., VIETTI, T. J.: Sedimentation versus cytocentrifugation in the cytologic study of craniospinal fluid. Cancer 43, 1479–1482 (1979).
- KÖLMEL, H. W. (Hrsg.): Zytologie des Liquor cerebrospinalis. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1986).
- ENESTRÖM, S.: Some aspects on technique and clinical evaluation of CSF cytology. Acta Neurol. Scand. 41 (Suppl. 13), 153–159 (1965).
- SCHWARZ, G.: Slide preparation by cytocentrifugation: Influence of different cell drying procedures on the cellular morphology and the quality of cytologic specimen. XVth Europ. Congr. Cytol., Baden-Baden, 21.–24. September 1987, Abstr., 63–64.
- PHILIPSEN, H. P., HUNT, A. C.: Cytological preparations from protein-free fluids. J. clin. Path. 13, 533 (1960).
- DORÉ, C. F., BALFOUR, B. M.: A device for preparing cell spreads. Immunology 9, 403–405 (1965).
- BEGEMANN, H., RASTETTER, J.: Atlas der klinischen Hämatologie. Dritte, völlig neu bearbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1978).
- ENGELHARDT, A., WEITBRECHT, W.-U., DAHL, P.: Zytomorphometrische Untersuchungen lymphozytärer und monozytärer Zellreaktionen im Liquor. In: Zytologie des Liquor cerebrospinalis (hrsg. von H. W. Kölmel), Edition Medizin, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 29–34 (1986).
- WHITMORE, E. L., HOCHBERG, F., WOLFSON, L., ROYALTY, J., TAFT, P. D.: Quantitative cytocentrifugation in the evaluation of cerebrospinal fluid. Acta Cytol. 26, 847–850 (1982).
- KATZ, R. L., ALAPPATTU, C., GLASS, J. P., BRUNNER, J. M.: Cerebrospinal fluid manifestations of the neurologic complications of human immunodeficiency virus infection. Acta Cytol. 33, 233–244 (1989).
- LI, C.-Y., ZIESMER, S. C., WONG, Y.-C., YAM, L. T.: Diagnostic accuracy of the immunocytochemical study of body fluids. Acta Cytol. 33, 667–673 (1989).
- SCHWARZ, G.: Cytocentrifugation: Future-oriented preparation of specimens for microscopic diagnosis. medical focus 5, 30–32 (1989).

Anschrift des Verfassers:

Dr. Gerd Schwarz
 Fa. Andreas Hettich
 Forschungs- und Entwicklungsabteilung
 Gartenstraße 100
 7200 Tuttlingen