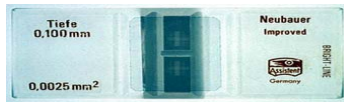




Leistungsdokument Nr. 3 Manuelle Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer.

Die Genauigkeit der Resultate bei der hämatologischen Zellzählung hängt von der korrekten Handhabung der betreffenden Zählkammer ab.



Nach dem Durchlesen dieses Dokuments sind Sie fähig :

- die geeigneten Reaktionsgefässe oder Pipetten, sowie die Reagenzien für die betreffenden Zellen zu wählen,
- ein Resultat, welches mit dem richtigen Multiplikationsfaktor berechnet wurde, zu erhalten,
- die wichtigsten Fehlerquellen zu identifizieren und zu korrigieren,
- die Zählkammer richtig zu pflegen.

ACHTUNG: Der Gebrauch von Glaspipetten sollte im Labor aus Sicherheitsgründen untersagt bleiben. Falls Sie trotzdem noch mit einer Thoma-Pipette arbeiten, sind zusätzliche Schritte *in Blau und Schrägschrift* beschrieben.

1. Welche Zählkammer?

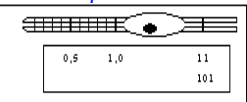
Es gibt verschiedene Zählkammern. Sie unterscheiden sich durch ihre Quadrierung, erlauben aber alle eine Zellzählung in einem bekannten und präzisen Volumen. Die Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten werden mit einem 40er oder 50er Objektiv ausgezählt (ideale Vergrösserung 400x). Dieses Dokument beschreibt nur die Verwendung der NEUBAUER-Zählkammer.

2. Material

- Das Blut kann direkt verdünnt werden: verstellbare Kolbenhubpipette / Reaktionsgefäss für die Verdünnung
- Neubauer-Zählkammer (oder neueres Model Neubauer improved) / Dickes Deckglas für Zählkammer
- Verdünnungslösung: Türk oder Plaxan für Leukozyten und Thrombozyten / Reagenz nach Dacie und Lewis für Erythrozyten (Hayem sollte wegen seiner Giftigkeit nicht mehr gebraucht werden)
- Röhrchenmischer für die Vollblutproben (*+ Pipettenmischer für Thoma-Mischpipette*)
- Mikroskop mit 10x Okulare und 40er oder 50er Objektiv ohne Ölimmersion.

3. Verdünnung der Probe, Vorbereitung der Zählkammer

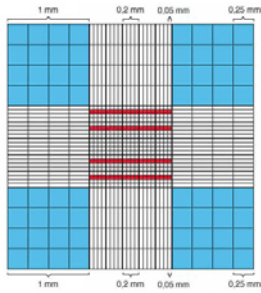
- a) Das EDTA-Vollblut 5-10 Minuten auf dem Rollenmischer mischen, Qualitätskontrollen vorzugsweise 10 Minuten.
- b) Gut gemischtes Vollblut oder Kapillarblut folgenderweise verdünnen.
(Mit der Thoma-Mischpipette, das Blut ca. 1 mm über die 0,5 Marke aufziehen. Die Aussenseite der Pipettenspitze mit einem feuchten Tupfer abwischen. Das Blut genau auf die Marke 0,5 justieren.)

	Leukozyten	Thrombozyten (bei Kapillarblut, den ersten Bluttröpfen verwenden!)	Erythrozyten
Geeignetes Reaktionsgefäss	Verdünnung 1:20 950 µL Türk oder Plaxan + 50 µL EDTA- oder Kapillarblut	Verdünnung 1:20 950 µL Türk oder Plaxan + 50 µL EDTA- oder Kapillarblut	Verdünnung 1:200 1990 µL Reagenz nach Dacie / Lewis + 10 µL EDTA- oder Kapillarblut
<i>Thoma-Pipette</i> 	<i>mit weisser Kugel Türk- oder Plaxan, genau ohne Nachjustierung bis Marke 11 aufziehen</i>	<i>mit weisser Kugel Türk- oder Plaxan, genau ohne Nachjustierung bis Marke 11 aufziehen</i>	<i>mit roter Kugel Reagenz nach Dacie / Lewis, genau ohne Nachjustierung bis Marke 101 aufziehen</i>

Die beiden Enden der Thoma-Mischpipette mit zwei Fingern schliessen und 5-10 Mal stark mischen, dann noch 5 Minuten auf den Pipettenmischer legen.

- c) Das Deckglas auf die Zählkammer befestigen, indem man die beiden Seitenflächen mit einem leicht feuchten Tupfer benetzt. Das Deckglas über die Breite der Zählkammer gleiten lassen und die Haftung überprüfen. Newton-Ringe (Regenbogenfarben) müssen erscheinen.
- d) Die Sauberkeit des Zählnetzes unter dem Mikroskop überprüfen.
- e) Die verdünnte Probe mit einer Kolbenhubpipette oder mit einer Kapillare durch Kapillarität in die Zählkammer einfüllen. *(Die 2-3 ersten Tropfen aus der Thoma-Mischpipette verwerfen, dann die verdünnte Probe in die Zählkammer einfüllen.)* Dabei muss die ganze Netzfläche auf einmal überdeckt werden, ohne dass die Rinnen der Zählkammer überflutet werden. **Ein Überschuss darf nie abgesaugt werden, Luftblasen müssen vermieden werden.**
- f) Die Zählkammer in einer feuchten Kammer (Petri-Schale mit feuchtem Tupfer) während 10 Minuten flach ruhen lassen damit sich die Zellen setzen können (Thrombozyten 20 Minuten). **Die Zellen dürfen nie in einer angetrockneten Zählkammer ausgezählt werden!**
- g) Die gewünschten Zellen in den Quadraten nach einer festgelegten Methode auszählen (siehe Punkt 4).
- h) Das Resultat errechnen, indem die Anzahl ausgezählter Zellen mit dem entsprechenden Faktor multipliziert wird (siehe Punkt 5).

4. Auszählung der Zellen



Die Leukozyten werden in den 4 äusseren, grossen blauen Quadraten, welche je aus 16 kleinen Quadrat bestehen, ausgezählt.

Die Erythrozyten & Thrombozyten werden in den 4 roten Linien im Zentralquadrat, welche je aus 20 sehr kleinen Quadraten bestehen (=80), ausgezählt.

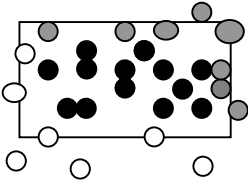
Die Höhe zwischen der Kammer und dem Deckglas ist 0,1mm.

Das Volumen für ein Quadrat ist:

Grosses $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 0,1\text{ mm} = 0,1\text{ mm}^3 = 0,1\text{ }\mu\text{L}$

Sehr kleines $0,05\text{ mm} \times 0,05\text{ mm} \times 0,1\text{ mm} = 0,00025\text{ mm}^3 = 0,00025\text{ }\mu\text{L}$

Es werden immer alle Zellen **innerhalb** der Linien einer Fläche gezählt. Die Zellen, welche die Linien berühren, werden nach der Grenzlinien-Regel ausgezählt : Zellen, welche die obere und die rechte Linie berühren, werden gezählt. Jene auf der linken oder unteren Linie nicht.



Alle Zellen innerhalb des Quadrates

+

alle Zellen welche die obere und die rechte Linie berühren, zählen.

Im beiliegendem Beispiel, sind die zu zählenden Zellen : **13 + 8 = 21 Zellen.**

5. Beispiel einer Berechnung der Zellen

Formel zur Berechnung: Zellzahl x Vedünnungsfaktor x Umrechnungsfaktor

Ausgezählte Quadrate x Volumen eines Quadrates

LEUKOZYTEN - Auszählung	THROMBOZYTEN - Auszählung	ERYTHROZYTEN - Auszählung
Gezählte Leukozyten (Lc) pro Quadrat: 28 ; 25 ; 27 ; 26 = 106 Leukozyten	Gezählte Thrombozyten (Tc) pro Quadrat: 35 ; 45 ; 50 ; 50 = 180 Thrombozyten	Gezählte Erythrozyten (Ec) pro Quadrat: 85 ; 95 ; 80 ; 100 = 360 Erythrozyten
Anzahl gezählter Leukozyten: 106 Anzahl gezählter Quadrate: 4 grosse Volumen eines blauen Quadrats: 0,1 μL Verdünnungsfaktor : 1/20 Umrechnungsfaktor μL in L: 1L =1 $\times 10^6$ μL	Anzahl gezählt Thrombozyten: 180 Anzahl gezählter Quadrate : 80 kleine Volumen eines kleinen roten Quadrats: 0,00025 μL Verdünnungsfaktor: 1/20 Umrechnungsfaktor μL in L: 1L =1 $\times 10^6$ μL	Anzahl gezählt Erythrozyten: 380 Anzahl gezählten Quadraten: 80 kleine Volumen eines kleinen roten Quadrats: 0,00025 μL Verdünnungsfaktor: 1/200 Umrechnungsfaktor μL in L: 1L =1 $\times 10^6$ μL
$\frac{106\text{ Lc} \times 20 \times 10^6}{4 \times 0,1\text{ }\mu\text{L}}$ $\rightarrow 106\text{ Lc} \times 50 \times 10^6 / \text{L}$ $= 5\,300 \times 10^6\text{ Lc} / \text{L} = 5,3 \times 10^9\text{ Lc} / \text{L}$ oder 5,3 Lc G / L (Giga / L)	$\frac{180\text{ Tc} \cdot x\ 20 \times 10^6}{80 \times 0,00025\text{ }\mu\text{L}}$ $\rightarrow 180\text{ Tc} \times 1000 \times 10^6 / \text{L}$ $= 180\,000 \times 10^6\text{ Tc} / \text{L} = 180 \times 10^9\text{ Tc} / \text{L}$ oder 180 Tc G / L (Giga / L)	$\frac{360\text{ Ec} \times 200 \times 10^6}{80 \times 0,00025\text{ }\mu\text{L}}$ $\rightarrow 360\text{ Ec} \times 10\,000 \times 10^6 / \text{L}$ $= 3\,600\,000\text{ Ec} / \text{L} = 3,60\text{ Ec} \times 10^{12} / \text{L}$ oder 3,60 Ec T / L (Tera / L)

Bei der Zellzählung der Erythrozyten in der Kammer, muss sich der Anwender bewusst sein, dass der Variationskoeffizient bei dieser Bestimmung sehr gross sein kann.

6. Pflege der Zählkammer

- Die Zählkammer und das Deckglas mit fließendem Wasser und anschliessend mit 70%-Alkohol (v/v) spülen.
- Beides mit einem trockenen, weichen und faserfreien Tuch trocknen (Kratzer vermeiden!)

Pflege der Thoma-Pipette

- Sofort nach Gebrauch die Pipette leeren, um ein Eintrocknen zu vermeiden. oder die Pipette in einen Wasserbehälter tauchen.
- Die Pipette mit fließendem Wasser spülen, dann mit destilliertem Wasser und anschliessend mit 70%-Alkohol nachspülen.
- Mit Azeton oder in einem Heißluftofen trocknen.
Vorsichtsmassnahme : vor erneutem Gebrauch der Pipette muss die Kugel frei beweglich sein und die Pipette darf nicht beschädigt sein.

7. Häufigste Fehlerquellen :

Nicht gereinigte und/oder nicht entfettete Zählkammer / Fingerabdrücke auf dem Deckglas / ungenügende Homogenisierung / Pipettierfehler / Zeitvorgaben nicht eingehalten / Zellzählung in einer angetrockneten Zählkammer / Luftblasen in der Zählkammer / Aufsaugen der verdünnten Probe im Fall des Überfließen / inkorrekte Einstellung des Mikroskopes / Verdünnungsfehler / Rechnungsfehler / Einheitsfehler / *Schmutzige Thoma-Mischpipette / falsche Pipette*