



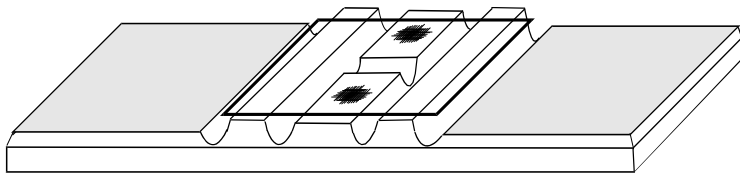
Zählkammer

1) Was ist eine Zählkammer und wo wird sie eingesetzt?

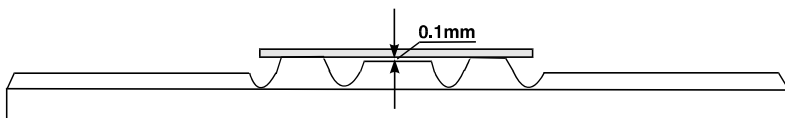
Die Zählkammer ist ein Präzisionsmessgerät aus optischem Spezialglas. Sie wird verwendet, um Zellen oder andere Partikel in Suspensionen unter dem Mikroskop zu zählen. Hauptsächlich werden Zählkammern zur Zählung von Zellen im Blut (z.B. Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, etc...) und zur Zellzählung im Liquor verwendet. Außerdem dienen Zählkammern auch der Zählung von Bakterien, Sperma und Pilzsporen.

2) Bauprinzip:

Alle Zählkammern weisen das gleiche Bauprinzip auf.



In einer rechteckigen Grundplatte aus optischem Spezialglas in der Größe eines Objektträgers, befinden sich im mittleren Drittel vier Längsnuten, die parallel zu den kurzen Seiten verlaufen. Die beiden größeren Außenflächen sind unbearbeitet und dienen der Beschriftung. Der Mittelsteg und die beiden Außenstege sind plangeschliffen und poliert. Die Oberfläche des Mittelsteiges ist etwas tiefer gegenüber den beiden Außenstegen. In den Mittelsteg (Kammerboden) sind die Zählnetze eingraviert.

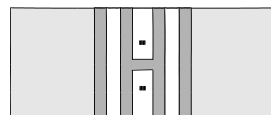


Wird ein Deckglas auf die Außenstege aufgelegt, so entsteht zwischen der Unterseite dieses Deckglases und dem Mittelsteg der Zählkammer ein Kapillarspalt.

3) Ausführung und Kennzeichnung der Zählkammer:



einfache Ausführung - Mittelsteg ungeteilt
(ein Zählnetz)



doppelte Ausführung - Mittelsteg geteilt
(zwei Zählnetze)



Außerdem unterscheidet man:

- Ausführung mit **dunklen** Linien: Bei den Standard Zählkammern wird die Netzteilung in den Kammerboden eingraviert und ist unter dem Mikroskop als Gitter dunkler Linien zu sehen.
- Ausführung mit **hellen** Linien: Bei diesen Zählkammern ist das Zählnetz in eine dünne, durchsichtige Metallschicht strukturiert. Die Linien erscheinen hell und bilden einen guten Kontrast gegenüber dem dunkleren, metallischen Hintergrund, was die Arbeit wesentlich erleichtert.

Kennzeichnung:

Auf die beiden unbearbeiteten Seitenflächen der Zählkammer sind folgende Angaben gedruckt:

- das System des Zählnetzes
- der Name und das Warenzeichen
- die Kammertiefe in mm
- die Fläche des kleinsten Quadrates in mm²

4) Herstellung und Qualitätsaussagen:

Zählkammern sind Präzisionsgeräte und in-vitro Diagnostika, die überwiegend im medizinischen Labor eingesetzt werden. In der Europäischen Gemeinschaft dürfen daher nur zugelassene, CE-markierte Zählkammern verwendet werden. Alle von Marienfeld vertriebenen Zählkammern werden entsprechend der gültigen Eichordnung und DIN-Norm hergestellt.

Herstellung von Blutzählkammern:

Die Fertigung, die mehrere Teilschritte und Zwischenkontrollen umfasst, soll hier in groben Zügen beschrieben werden:

Das Mittelfeld (Kammerboden) und die beiden Außenfelder werden geschliffen und poliert. Hierbei kommt es auf die Ebenheit und die Genauigkeit der Kammertiefe an. Diese Vorgaben sind in der DIN-Norm 12874 festgelegt. Das Mittelfeld wird je nach Teilung (z.B. Neubauer 0,1 mm) abgesenkt. Es werden auch andere Tiefen (0,2 mm / 0,5 mm / sowie Sondertiefen) gefertigt.

Nach diesen Arbeitsgängen wird die Teilung des entsprechenden Zählnetzes auf das Mittelfeld aufgebracht und anschließend folgt der Beschriftungs- und Einbrennvorgang. Eine strenge Endkontrolle, die sich nach den Anforderungen der gültigen DIN-Norm und Eichvorschrift richtet, beendet die Herstellung.

Anforderungen an die Qualitätskontrolle:

Die Grenzabweichungen betragen laut DIN-Norm 12874:

- für die Kammertiefe im Bereich eines Zählnetzes $\pm 2\%$ des Sollbestandes
- für Abstände von weniger als 0,4 mm zwischen beliebigen Netzlinien $\pm 2\mu\text{m}$
- für Abstände von 0,4 mm oder mehr zwischen beliebigen Netzlinien $\pm 0,5\%$ des Sollabstandes
- für die Winkel der Netzeinteilung $\pm 1^\circ$
- die Breite der Teilstriche darf nicht größer als 5 μm sein.

Die Ebenheitstoleranz nach DIN 7184 Teil 1 beträgt:

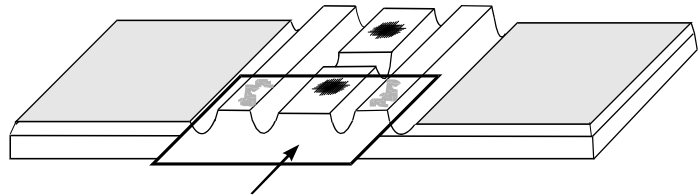
- für den Kammerboden im Bereich des Zählnetzes 2 μm
- für die Auflageflächen 2 μm
- für die Deckgläser 3 μm (Anforderungen siehe auch DIN 58 884)



5) Füllen der Zählkammer:

Aufschieben des Deckglases:

Die Außenstege werden mit destilliertem Wasser befeuchtet und das Deckglas dann mit sanftem Druck von vorn auf die Zählkammer aufgeschoben.



Vorsicht: Bruchgefahr des Deckglases!

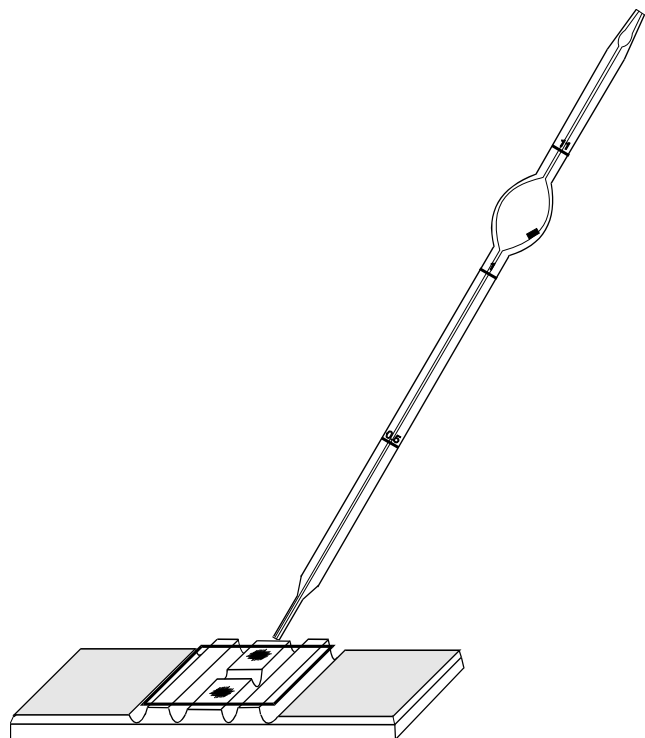
Die Ausbildung von Interferenz-Linien (Newton'sche Ringe) zwischen Außenstegen und Deckglas zeigt, dass das Deckglas richtig aufgesetzt ist.

Beschicken:

Die gut gemischte Pipette wird vom Schüttler genommen und die ersten Tropfen verworfen.

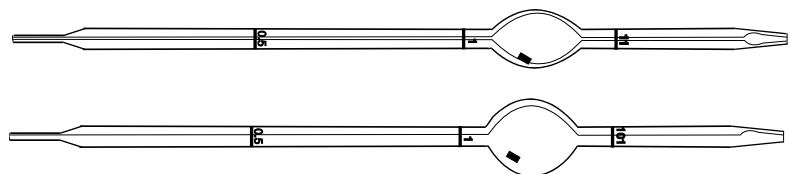
Die Pipette von außen trockenwischen und dann schräghalten, bis sich ein kleiner Tropfen an der Pipettenspitze gebildet hat. Diesen Tropfen bringt man an die Stelle zwischen Deckglas und Zählkammer.

Durch Kapillarwirkung füllt sich der Spalt zwischen Deckglas und Kammerboden. Noch bevor die verdünnte Blutlösung an den Rändern des Kammerteils überquellen kann, muss die Pipettenspitze bereits wieder beiseite gezogen werden. Sind Luftblasen sichtbar oder ist die Flüssigkeit über die Ränder in die Rinnen übergequollen, so muss die Kammer gereinigt und erneut beschickt werden.



Verwendete Blutmischpipetten:

- Leukozytenpipette (weiße Perle)
- Erythrozytenpipette (rote Perle)





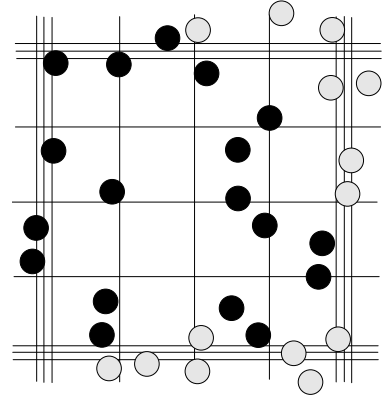
6) Auszählen der Teilchen:

Zähltechnik:

Das Auszählen setzt genaue Kenntnis über die Grenzlinien der verwendeten Zählkammern voraus. Die Abbildung zeigt die 3-fach Linien des Neubauer improved Systems.

Damit Zellen, die auf oder an Begrenzungslinien liegen, nicht doppelt gezählt oder bei der Zählung übergangen werden, halte man sich an bestimmte Regeln (z.B. siehe Abbildung rechts).

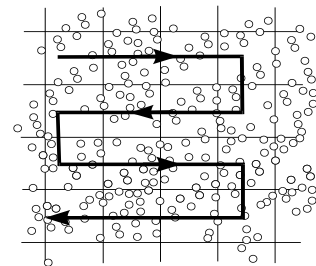
Gezählt werden alle Zellen innerhalb des definierten Messbereiches.



Mitgezählt werden die an 2 (!) Seiten, z.B. an der linken und oberen Maßlinie, an- oder aufliegenden Zellen (schwarz markiert). Dies gilt auch für die Art

des eigentlichen Zählvorganges, der mäanderförmig erfolgen soll.

Dies gilt auch für die Art



Bemerkungen zum Auszählen:

- Bei allen Kammerzählungen muss die Blende des Kondensators am Mikroskop weitgehend geschlossen sein.
- Die Differenz der gezählten Zellen in den Großquadraten und Gruppenquadraten darf nicht mehr als 10 Zellen betragen.
- Bei allen Zellzählungen müssen Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Nach dem Auszählen des oberen Zählnetzes wird als Kontrolle in gleicher Weise noch das untere Zählnetz ausgezählt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension nicht bereits eingetrocknet ist. Dies kann vermieden werden, wenn die untere Kammer erst kurz vor der Auszählung gefüllt und nach der Sedimentationszeit ausgezählt wird.
- Die Differenz zwischen den Summen der Auszählung beider Zählnetze darf nicht mehr als 10 Zellen betragen. Der Mittelwert der Zählungen wird dann in die Berechnungsformel eingesetzt bzw. mit dem entsprechenden Faktor multipliziert.



7) Berechnung

Formel:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}} = \text{Zellen pro } 1\mu\text{l Blut}$$

Beispiel: Kammer: Neubauer improved

a) Leukozyten:

1. Ausgezählte Zellen 161 Leukozyten
2. Ausgezählte Fläche 4 Quadrate (= $4 \times 1 \text{ mm}^2$) = 4 mm^2
3. Kammertiefe 0,1 mm
4. Verdünnung 1 : 20

$$\frac{163}{4 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \times 1/20} = \frac{163 \times 20}{4 \times 0,1 \times 1 \mu\text{l}} = \boxed{8150 \text{ Leukozyten / } 1\mu\text{l Blut}}$$

b) Erythrozyten:

1. Ausgezählte Zellen 507 Erythrozyten
2. Ausgezählte Fläche 5 Quadrate (= $5 \times 0,04 \text{ mm}^2$) = $0,2 \text{ mm}^2$
3. Kammertiefe 0,1 mm
4. Verdünnung 1 : 200

$$\frac{512}{0,2 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \times 1/200} = \frac{512 \times 200}{0,2 \times 0,1 \mu\text{l}} = \boxed{5,12 \times 10^6 / 1\mu\text{l} = 5,12 \text{ Mio. Ery. / } 1\mu\text{l Blut}}$$

8) Reinigung von Zählkammern:

Sofort nach durchgeführter Zählung wird das Deckglas abgenommen und die Zählkammer mit Wasser oder, falls erforderlich, mit einer milden Reinigungslösung gereinigt. Anschließend wird die Kammer mit einem weichen Tuch abgetrocknet oder mit Aceton abgespült.



9) Kurzbeschreibung verschiedener Zählkammern:

Die verschiedenen Systeme von Zählkammern unterscheiden sich in der Ausführung des Zählnetzes und der Kammertiefe. Das Zählnetz besteht aus einer quadratischen Netzteilung, die erst unter dem Mikroskop (ca. 100fache Vergrößerung) sichtbar wird. Nachfolgend werden die am meisten verwendeten Zählkammern beschrieben:

Neubauer-improved:

Dies ist die heute bevorzugte Zählkammer.

Großquadrat: 1 mm²

Gruppenquadrat: 0,04 mm²

Kleinstquadrat: 0,025 mm²

Die **Kammertiefe beträgt 0,100 mm**. Die Netzteilung dieser Kammer weist 3 mal 3 große Quadrate von je 1 mm² Fläche auf.

Die 4 Eckquadrate werden für die Leukozytenzählung verwendet.

Das große Quadrat in der Mitte ist zusätzlich unterteilt in 5 mal 5 Gruppenquadrate mit einer Seitenlänge von je 0,2 mm und einem Flächeninhalt von je 0,04 mm². Die Gruppenquadrate sind wiederum in 16 kleinste Quadrate von je 0,0025 mm² unterteilt.

Fünf dieser Gruppenquadrate werden für die Erythrozytenzählung verwendet.

Besondere Beachtung verdient, dass die Kammer allseitig dreifache Grenzlinien aufweist, von denen die mittlere Linie als die eigentliche Maßlinie anzusehen ist. Dies ist wichtig für die Beurteilung, ob Zellen, die im Grenzbereich liegen, mitzuzählen sind oder nicht.

Fuchs-Rosenthal:

Für die Zellzählung im Liquor wird am häufigsten die Fuchs-Rosenthal-Kammer, helllinige Ausführung, verwendet. Es wird die gesamte Fläche, die 4 x 4 Großquadrate aufweist, ausgezählt. Diese Zählkammer unterscheidet sich von den üblichen Kammern zur Blutzellenzählung nicht nur durch den größeren Flächeninhalt (16 mm²) sondern auch durch die **größere Kammertiefe (0,2 mm)** und damit durch den größeren Rauminhalt (3,2 µl).

Gesamtfläche: 16 mm²

Tiefe: 0,2 mm

Rauminhalt: 3,2 µl

Neubauer:

Im Gegensatz zu der moderneren „Neubauer improved“ ist das Großquadrat der Neubauer-Kammer in nur 4 x 4 Gruppenquadrate aufgeteilt. Die **Kammertiefe beträgt 0,1 mm**.

Großquadrat: 1 mm²

Gruppenquadrat: 0,04 mm²

Kleinstquadrat: 0,0025 mm²



Bürker:

Das Zählnetz ist in 9 große Quadrate von je 1 mm Seitenlänge und je 1 mm² Fläche geteilt. Diese werden für die Leukozytenzählung verwendet. Jedes Großquadrat ist in 16 Quadrate von je 0,2 mm Seitenlänge und je 0,04 mm² Fläche geteilt. Diese Quadrate entsprechen also größtmäßig den Gruppenquadraten (und dienen der Erythrozytenzählung), sind aber nicht weiter unterteilt.

Türk:

Die Netzteilung dieser Kammer entspricht maßstabmäßig der früheren Neubauer-Kammer, d.h. die Kammer ist in 9 große Quadrate von je 1 mm² Fläche unterteilt. Das Quadrat in der Mitte entspricht der alten Thoma-Netzteilung, d.h. es weist 4 x 4 Gruppenquadrate mit einem Flächeninhalt von je 0,04 mm² auf. Unterschiedlich bei der Türk'schen Kammer ist, dass auch die Außenquadrate noch zusätzlich durch Doppellinien unterteilt sind, wodurch weitere Kleinstquadrate mit je 0,05 mm Seitenlänge entstehen.

Thoma und Thoma-neu:

Die Netzeinteilung nach Thoma-neu entspricht in ihrem mittleren (Zähl-) Feld der Netzeinteilung nach Neubauer-improved. Der Unterschied besteht darin, dass bei dem Zählnetz nach Thoma-neu die vier Eckfelder nicht ausgeführt sind. Deshalb ist diese Netzeinteilung nur zum Auszählen von Erythrozyten, nicht aber für Leukozyten geeignet.

Nageotte:

Die Kammertiefe beträgt 0,5 mm. Die quadratische Grundfläche von 100 mm² ist in 40 Rechtecke mit Flächen von je 0,25 x 10 = 2,5 mm² unterteilt.

Die Zählkammer wird u.a. für die Zellzählung in Liquor (Lumbalflüssigkeit) oder zur Zählung von Nematoden eingesetzt.

Schilling:

a) Kreuznetz: Es besteht aus 3x3 großen Quadraten mit je 1 mm² Fläche. Jedes dieser Großquadrate ist weiterhin unterteilt in Quadrate, die flächenmäßig den Gruppenquadraten entsprechen, also eine Fläche von je 0,04 mm² aufweisen, aber unterschiedlich unterteilt sind.

b) Einheitsnetz: Hier besteht die gesamte Einteilung aus 9 Quadraten entsprechend dem großen Quadrat in der Mitte des „Kreuznetzes“.



10) Warum haben Zählkammern trotz elektrischer Zählgeräte ihren festen Platz im Labor?

- Für ein kleines Labor lohnt oft die Investition teurer elektronischer Geräte nicht.
- Bei besonderen Fragestellungen, z.B. Liquor- oder Erguss-Zellzählung, Zählung von Wurmeiern, Bakterien und Pilzsporen, muss auf Zählkammern zurückgegriffen werden.
- Bei sehr niedrigen Thrombozyten ist die elektronische Zählung ungenauer als mit der Zählkammer.

Mögliche Fehlerquellen:

- die Zählkammer ist unsauber
- das Deckglas ist nicht richtig aufgesetzt (keine Interferenzringe)
- die Kammer ist nicht luftblasenfrei gefüllt
- die Kammer ist überfüllt
- die Sedimentationszeit ist zu kurz
- ein falsches Deckglas wird verwendet. Standard-Deckgläser für die Mikroskopie sind zu dünn und verbiegen sich aufgrund der Kapillarkräfte.

Elektrische Zählgeräte:

- Werden in größeren Laboratorien eingesetzt (hohe Investitionskosten).
- **Nachteil:** Die Unterscheidung der Zelltypen geschieht nur nach der Größe. Dadurch ergeben sich oft Störungen durch Staubkörnchen oder Flusen.
- **Vorteil:** durch die schnelle Zählung und Auswertung vieler Teilchen entstehen weniger statistische Fehler.

Bei Zählverfahren wird der statistische Fehler zugrunde gelegt:

Formel: statistischer Fehler = 1 : n

Dies ergibt bei $n = 100$ gezählten Zellen $1 : 100 = 0,01 = 1\%$
 und bei $n = 10.000$ gezählten Zellen $1 : 10.000 = 0,0001 = 0,01\%$

11) Literaturhinweise:

- Klinische Chemie und Mikroskopie 11. Auflage von Lothar Hallmann, Georg Thieme Verl. Stuttgart, New York 1980
- Laborkunde 1983 von Petra Heim, Kiehl Verlag
- Kompendium der praktischen Hämatologie, Ernst Giebler, GIT Verlag
- DIN 12847 Teil 1
- DIN 12847 Teil 2
- Eichordnung

Alle Angaben in dieser Unterlage entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und mögliche Anwendungen informieren. Änderungen oder Druckfehler vorbehalten. Für Irrtümer wird keine Gewähr übernommen.