

dass kein Potentialwert ausserhalb des abgeschlossenen Intervalls  $(-9, +9)$  liegen kann.

Nach dem Einlesen der Datenkarten werden zunächst die Funktionswerte der 4 Polynome errechnet, die eine Verbindung der jeweils 4 untereinanderstehenden Messpunkte ergeben, und die so erhaltenen Matrizen mit je 58 Werten abgespeichert. Im nächsten Schritt werden zeilenweise die horizontalen Polynomwerte ermittelt, wobei die Funktionswerte der vertikalen Polynome als «Stützwerte» verwendet werden. Die so errechneten Zeilenwerte werden ganzzahlig gerundet und dann nur jene Werte ausgedruckt, die bei einem Sprung von einer ganzen Zahl zu einer anderen stehen. Jene Stellen, an denen ein Sprung von  $+0$  nach  $-0$  (oder umgekehrt)

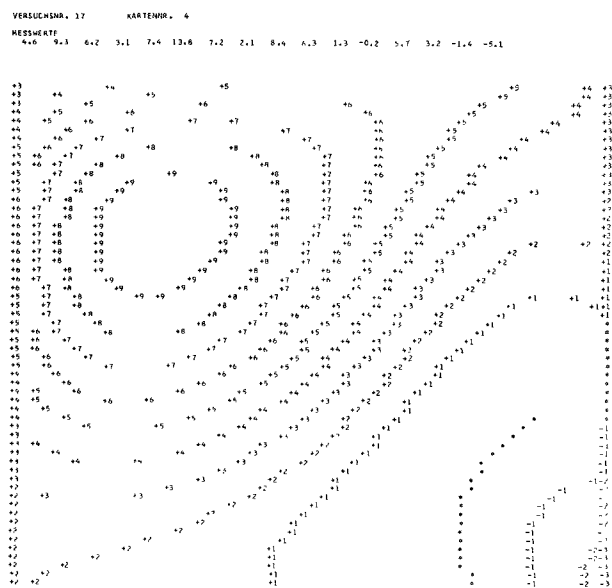


Fig. 2. Beispiel eines Ausdruckes.

stattfindet, werden mit \* (Asterisk) gekennzeichnet; desgleichen werden zur Randbegrenzung der 1. und der 58. Wert gedruckt. Dieses Verfahren wird für alle 58 Zeilen nacheinander durchgeführt und dann die nächste Datenkarte verarbeitet (Beispiel in Figur 2).

**Diskussion.** Der zeilenweise Ausdruck wurde gewählt, weil 1) dadurch während des Drucks der Computer bereits die Werte der nächsten Zeile errechnen kann und 2) durch den Wegfall der Notwendigkeit, die gesamte Wertematrix speichern zu müssen, der Speicherplatzbedarf ausserordentlich verringert wird. Der Umstand, dass aufgrund dieser Vorgangsweise Verbindungslücken innerhalb von Potentiallinien auftreten können, scheint dadurch mehr als kompensiert.

Das Verfahren wurde in einer Arbeit von PETSCHÉ, RAPPELSBERGER und TRAPPL<sup>3</sup> angewandt; es ist geplant, durch Speicherung des Spannungsverlaufes auf einem Magnetbandspeicher und unmittelbare Digitalisierung mittels eines Analog-Digitalwandlers die Datenaufbereitung zu vereinfachen. Eine gleichzeitige Verarbeitung («real-time processing») erweist sich wegen des ungünstigen Verhältnisses von Registrierintervallzeit und Rechenzeit mit den zugänglichen Anlagen als noch nicht möglich<sup>4</sup>.

**Summary.** A computer program is presented which transforms simultaneous recordings of multiple electrodes into graphical approximate representations of isopotential lines.

R. TRAPPL

*Institut für allgemeine und vergleichende Physiologie der Universität, A-1090 Wien (Österreich),  
10. September 1969.*

<sup>3</sup> H. PETSCHÉ, P. RAPPELSBERGER and R. TRAPPL, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, in press.

<sup>4</sup> Das Computer-Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Wien ermöglichte in dankenswerter Weise die Benutzung seiner elektronischen Rechenanlage IBM/360, Modell 30.

## Verbesserte Methode zur Gewinnung und Verarbeitung von freien Zellen aus kleinsten Volumina von Körperflüssigkeiten mittels Membranfiltration

Die zytologische Untersuchung der in Körperflüssigkeiten unter normalen und pathologischen Bedingungen vorkommenden Zellen (= exfoliative Zytologie) hat sich, vor allem seit Einführung der sogenannten *Membranfilter-Technik*<sup>1-3</sup>, zu einem Routine-Verfahren der klinischen Medizin<sup>4-9</sup> entwickelt. Bei der «Membranfiltration» werden die Zellen einer Körperflüssigkeit (Kammerwasser, Liquor cerebrospinalis, Punkate aus Körperhöhlen und Organen, Rachen-, Magen- und Colon-Spülungen, Urin usw.) auf einem Filter mit genau definierter Porengrösse aufgefangen und auf diesem direkt bis zur mikroskopischen Analyse weiterverarbeitet. Hinsichtlich Reproduzierbarkeit der Resultate, des Arbeitsaufwandes und der Einfachheit in der praktischen Ausführung, ist dieses Verfahren zur Zell-Anreicherung den früher ausschliesslich angewandten Methoden der Zell-Zentrifugation und Zell-Sedimentierung<sup>10,11</sup> eindeutig überlegen.

Sind für eine exfoliativ-zytologische Untersuchung grössere Mengen einer Körperflüssigkeit verfügbar, oder weist letztere eine hohe Konzentration an geformten

Elementen auf, so bietet die Durchführung einer Zell-Filtration mittels der handelsüblichen Geräte keine Pro-

<sup>1</sup> Techniques for exfoliative Cytology. Application Data Manual ADM 50, 1964. Millipore Filter Corporation, Bedford (Mass. USA).

<sup>2</sup> Cytology with the Gelman Membrane Filter sample screening technique. Tech. Bulletin Nr. 301, May 1965. Gelman Instrument Company, Ann Arbor (Mich. USA).

<sup>3</sup> General Electric Nucleopore Filters, Application Handbook: Techniques for exfoliative Cytology, 1969 (Arthur Thomas Company, Philadelphia, PA., USA).

<sup>4</sup> K. JUNIPER und C. L. CHESTER, *Cancer* 12, 278 (1959).

<sup>5</sup> J. W. MERRITT, W. B. HENDERSON und T. A. SLATE, *J. Urology* 82, 396 (1959).

<sup>6</sup> R. J. THABET und H. E. KNOERNSCHILD, *Am. J. clin. Path.* 34, 185 (1960).

<sup>7</sup> W. A. BLANC und R. GAETZ, *Pediatrics* 29, 61 (1962).

<sup>8</sup> G. S. KISTLER und A. BISCHOFF, *Schweiz. med. Wschr.* 92, 863 (1962).

<sup>9</sup> E. METZEL, *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 204, 222 (1963).

<sup>10</sup> J. SAYK, *Ärztl. Wschr.* 1024 (1954).

<sup>11</sup> A. BISCHOFF, *Schweiz. med. Wschr.* 90, 479 (1960).

bleme. Bei der Fixation und Färbung der Präparate ist lediglich zu berücksichtigen, dass eine Anzahl von Färbemethoden der klassischen Haematologie, Histologie und Zytologie bei verschiedenen Filter-Fabrikaten nicht anwendbar ist, da die Membranen in den Farbstoff-Lösungen zerfallen. So ist beispielsweise die bei Blut-Untersuchungen übliche May-Grünwald-Giemsa-Färbung auf Millipore-Filtern<sup>1</sup> nicht durchführbar.

Können für eine zytologische Untersuchung nur *kleine Volumina* einer Körperflüssigkeit (zum Beispiel Kammerwasser, Liquor cerebrospinalis, Punktate aus Körperhöhlen kleiner Experimentaltiere usw.) eingesetzt werden, oder enthält diese nur wenig Zellen, so sind die normalerweise zur Zell-Anreicherung verwendeten Filtrier-Geräte ungeeignet. Ihre wirksame Filterfläche (abhängig von der freien Öffnung im Trichtergefäß) ist in der Regel viel zu gross, die Zelldichte auf der Membran-Oberfläche entsprechend klein und die lichtmikroskopische Beobachtung der Präparate zeitraubend. Für eine elektronenmikroskopische Untersuchung sind solche Objekte praktisch unbrauchbar.

Um eine Zellanreicherung auch *aus kleinen bis kleinsten Volumina* von Körperflüssigkeiten *routinemässig* und ohne grösseren Zeitaufwand durchführen zu können, wurde das Membranfilter-Verfahren von der apparativen und methodischen Seite her modifiziert. Dabei wurden die praktischen Erfahrungen mit einem früher beschriebenen «Zellfiltrations-Gerät»<sup>8</sup> ausgewertet. Die verbesserte Apparatur, im folgenden «Zellkollektor» genannt, sollte folgende Anforderungen erfüllen: a) Möglichkeit der Verarbeitung von Flüssigkeitsvolumina bis hinunter zu 0,05 ml, b) der am Filter wirksame Unterdruck sollte von ca. 10 bis 100 cm Wassersäule kontinuierlich einstellbar sein, c) einfachste Handhabung und wartungsfreier Betrieb sollten besonders für Reihen-Untersuchungen gewährleistet sein.

Im weiteren wurde die in der ursprünglichen Publikation<sup>8</sup> angegebene, hinsichtlich Differenzierungsvermögen nicht restlos befriedigende Methylenblau-Fuchsin-Farbstoffkombination durch die in der Haematologie routinemässig angewandte May-Grünwald-Giemsa-Färbung ersetzt. Damit sollten Unsicherheiten in der Interpretation mikroskopischer Befunde möglichst ausgeschlossen werden. Das für die Gewinnung der Zellen verwendete Filter sollte darüber hinaus auch andere Färbungen erlauben und für elektronen- und fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen geeignet sein.

Im folgenden werden der Zellkollektor, seine praktische Anwendung sowie entsprechende Verarbeitungs-Methoden für die licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von auf Membranfiltern angereicherten Zellen beschrieben.

**Apparatur und Methodik.** A) *Zellkollektor für kleine Volumina.* Das eine elektrische Membranpumpe enthaltende Gerät (Figur 1) nimmt eine der drei, aus Glas bestehenden Filtrier-Einheiten auf, welche jeweils einen 3 ml-Trichter für die zu untersuchende Flüssigkeit sowie einen Filterhalter für Membranen von 13 mm Durchmesser umfassen. Auf Grund zahlreicher Untersuchungen an menschlichen und tierischen Punktaten wurde an diesen Filtrier-Einheiten die wirksame Öffnung (innerhalb welcher die Zellen auf der Filteroberfläche abgelagert werden) auf 3,5 beziehungsweise 8 mm Durchmesser festgelegt. Die beiden durch Stahlfedern verbundenen Elemente einer Einheit lassen sich über einen Gummistopfen auf ein Filtrier-Röhrchen aufstecken, das seinerseits über eine Schnellkupplung an ein Sicherheitsgefäß angeschlossen wird. Dieses dient dem Schutze der Pumpe bei einem allfälligen Überlaufen des Filtrier-Röhrchens. Das

eingesetzte Filter überspannt die Öffnung zwischen Trichter und Filterhalter ohne Unterlage. Der am Filter wirksame Unterdruck lässt sich im Bereiche zwischen ca. 10 und 100 cm Wassersäule kontinuierlich einstellen. Das Gerät wird über einen Netzschalter in Betrieb genommen. Bei Bedarf kann eine Filtrier-Einheit mit eingelegtem Filter und angeschlossenem Filtrier-Röhrchen autoklaviert werden.

B) *Durchführung einer Zell-Anreicherung.* Die hier folgende Arbeitsvorschrift ermöglicht eine routinemässige Zell-Anreicherung aus kleinen Volumina von Körperflüssigkeiten. Das Verfahren kann je nach Fragestellung entsprechend modifiziert werden. Die in Klammern angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Bezeichnungen in Figur 1. 1) Je nach Flüssigkeitsmenge und Zellkonzentration (ev. vorherige Bestimmung in einer Zählkammer) wird eine der drei Filtrier-Einheiten (2, 4) mit 3, 5 oder 8 mm Durchmesser der wirksamen Öffnung in das Filtrier-Röhrchen (5) eingesetzt und dieses über die Schnellkupplung (6) an das Sicherheits-Gefäß (7) angeschlossen. Um eine regelmässige Verteilung der Zellen auf dem Filter zu gewährleisten, müssen Trichter und Filterhalter vollkommen trocken sein. Für das Einhängen der Federn zwischen diesen beiden Elementen leistet eine Uhrmacher-Pinzette gute Dienste. Schnellkupplung (6) und Gummistopfen an Filtriereinheit und Sicherheitsgefäß werden auf festen Sitz überprüft.

2) Trichter (2) durchleichten Zug nach oben vom Filterhalter abheben und Membranfilter (3) mittels Pinzette einlegen. Zeigerknopf des Vakuum-Reglers (1) auf Stellung 2 drehen (Unterdruck am Filter ca. 10 cm Wassersäule, Figur 2).

3) Filter mittels physiologischer Kochsalz- oder Puffer-Lösung (ca. 0,1 ml) benetzen. Durch kurzes Betätigen des Netzschalters (9) kleine Menge dieses Vorlaufes durch das Filter saugen. Auf der freien Filterfläche dürfen sich keine Luftblasen bilden.

4) Vorgesehene Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit mittels Pipette oder direkt aus Injektionsspritze (ohne Nadel) der kleinen Restmenge Puffer-Lösung im Trichterhals überlagern. Pumpe über Netzschalter einschalten. Das Filtrat soll am Filterhalter langsam abtropfen. Unterdruck mittels des Vakuum-Reglers bei Bedarf erhöhen (Figur 2). Die meisten Körperflüssigkeiten

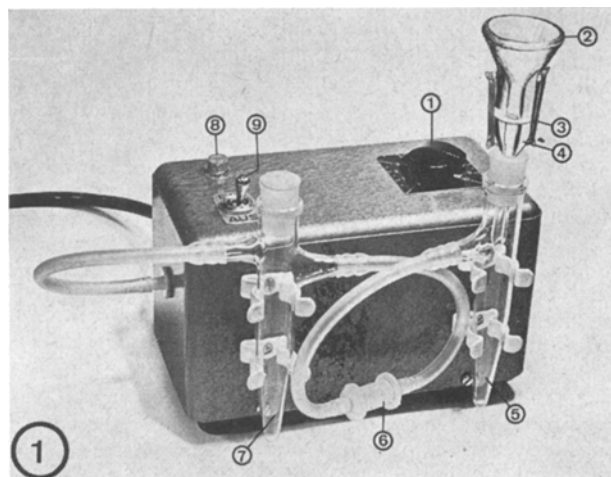


Fig. 1. Zellkollektor für kleine Flüssigkeitsvolumina. 1, Vakuum-regler; 2, Trichter; 3, Membranfilter; 4, Filterhalter; 5, Filtrier-röhrchen; 6, Schnellkupplung; 7, Sicherheitsgefäß; 8, Signallampe; 9, Netzschalter.

lassen sich bei einem Vakuum von ca. 20–30 cm Wassersäule gut filtrieren. Bei einem Unterdruck von mehr als 50 cm Wassersäule können empfindliche Zellen geschädigt werden.

5) Wenn nur noch kleine Restmenge der zellhaltigen Flüssigkeit im Trichterhals vorhanden ist (Kontrolle des Meniskus), ca. 0,2–0,5 ml NaCl- oder Puffer-Lösung sorgfältig der Trichterwand entlang nachgiessen. Dadurch wird vor allem ein Teil der dem Filter anhaftenden Proteine aus der Körperflüssigkeit entfernt und die nachfolgende Färbung der Zellen erleichtert. Spülflüssigkeit bis auf wenige Tropfen absaugen und Gerät ausschalten. Am Ende der Filtration sollte wenn möglich keine Luft durch das Filter gezogen werden.

6) Trichter durch leichten Zug nach oben abheben und Filter mittels Pinzette entfernen. Präparat sofort verarbeiten! Filtrier-Einheit und Filtrier-Röhrchen vom Gerät abtrennen und spülen (ev. desinfizieren). Glaswaren trocknen, Sicherheitsgefäß wenn nötig entleeren.

C) *Lichtmikroskopische Routine-Verarbeitung des Präparates.* Hatten die bisherigen Hinweise Gültigkeit unabhängig vom verwendeten Filter, so basiert das nachstehend angegebene Fixations- und Färbefahren auf der Verwendung von «Metricel»-Filtermembranen Typ GA-1, GA-3 oder GA-4 (Porengrösse 5, beziehungsweise 1,2 oder 0,8  $\mu$ ) der Firma Gelman Instrument Company, Ann Arbor, Mich., USA<sup>3,12</sup>. Diese Membranen sind in den meisten der in Histologie und Zytologie verwendeten Alkohole, Ester und Halogen-Kohlenwasserstoffe sowie in verdünnten Säuren und Laugen beständig. Ihre Oberfläche ist glatt und der Brechungsindex der Membran beträgt  $n_D = 1,48$ .

Die Wahl des Filter-Typs hängt im wesentlichen von der Viskosität (zum Beispiel vom Proteingehalt) der zu untersuchenden Körperflüssigkeit ab und beeinflusst die nachstehend beschriebene Weiterverarbeitung nicht. Prinzipiell soll für eine Zell-Anreicherung das Filter mit der kleinsten, noch verwendbaren Porengrösse eingesetzt werden; bei grösseren Porenweiten (5  $\mu$ ) können Zellen wie zum Beispiel kleine Lymphozyten in das Filtrat verloren gehen. Im weiteren ist bei weiten Poren die mikroskopische Untersuchung unter Umständen dadurch erschwert, dass die Zellen in verschiedenen Ebenen des Filters abgefangen werden.

1) *Methanol-Fixation.* Filter unmittelbar nach Entnahme aus der Filtrier-Einheit *Zellschicht nach unten* in Fixationsmittel eintauchen: Methanol 95% in aqua destillata, 5 Min; Methanol 100% wasserfrei, 5 Min. Wird das Filtrat nicht weiter verwendet, kann die Fixation der Zellen auch in der Filtrier-Einheit direkt erfolgen. Dazu werden zunächst einige Tropfen Methanol 100% der Spülflüssigkeit überlagert und langsam abgesaugt. Bei abgestellter Pumpe Trichter mit ca. 1 ml Methanol 100% auffüllen und Fixationslösung in 2–3 Schritten innert ca. 10 Min durch das Filter ziehen.

2) *Modifizierte May - Grünwald - Giemsa - Färbung.*

a) May-Grünwald-Lösung, modifiziert (Merck), 0,5 ml; aqua destillata, 1,0 ml. Lösung vor Gebrauch gut durchmischen, Filter mit Zellschicht nach unten eintauchen, ab und zu leicht bewegen. Färbedauer bei 20°C 4–5 Min.

b) Giemsa-Lösung (Merck), 0,25 ml; aqua destillata, 1,0 ml. Lösung gut durchmischen, Filter mit Zellschicht nach unten eintauchen, ab und zu leicht bewegen. Färbedauer bei 20°C ca. 10 Min.

c) Äthanol 100% – Xylol (1:1), Bad I, 20 Sek; Äthanol 100% – Xylol (1:1), Bad II, 40 Sek. Diese beiden Bäder dienen der Spülung, Differenzierung und Dehydrierung des Präparates. Das Filter soll mittels einer Pinzette konstant bewegt werden. Die angegebenen Zeiten

sind einzuhalten, da das Präparat sonst zu stark gebleicht wird.

d) Klärung des Filters bis zur vollständigen Transparenz in 2–3 Bädern von Xylol. Xylol-Bäder häufig wechseln.

e) Präparat nach leichtem Abtupfen der Filterkante mittels «Permout» (oder ähnlichem Einschlussmittel) zwischen Objektträger und Deckglas einbetten.

3) *Beobachtung im Mikroskop.* Präparat unmittelbar nach Einbettung mikroskopisch begutachten. Schlechte Darstellbarkeit der Zellen weist auf verkehrte Einbettung des Filters hin (Zellschicht nach unten). In diesem Falle Einbettung über kurzes Xylol-Bad wiederholen. Köhler'sche Beleuchtung korrekt einstellen; Aperturblende am Kondensor öffnen. Tageslichtfilter in den Strahlengang einschalten.

D) *Prozedere für die elektronenmikroskopische Verarbeitung.* Da für die ultrastrukturelle Untersuchung eine ausreichende Zelldichte auf der Membran von entscheidender Bedeutung ist, sollte die Menge der zu filtrierenden Körperflüssigkeit beziehungsweise die Wahl der Filtrier-Einheit (wirksame Filterfläche) durch Herstellen eines lichtoptischen Kontroll-Präparates im voraus festgelegt werden. Die Fixation der Zellen kann mittels gepuffertem Osmiumtetroxyd allein oder nach vorheriger Aldehyd-Fixation erfolgen. Eine modifizierte «Tripel»-Fixation<sup>13</sup>, die sich bei der Verarbeitung der auf Membranfiltern gewonnenen Zellen gut bewährt hat, sei im folgenden angegeben.

1) *Herstellung der Lösungen:*

Lösung A: 1% beziehungsweise 2% Osmiumtetroxyd in 0,1 M S-Collidin-Puffer, pH 7,2.

Lösung B: 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M S-Collidin-Puffer, pH 7,2. Zusatz von 0,05%  $\text{CaCl}_2$ .

Lösung C: 0,25% Uranyl-Acetat in Na-Veronalacetat-Puffer, pH 6,3, Osmolalität ca. 300–320 mOsm: 0,97 g Na-Acetat, 1,47 g Na-Barbital und 17,0 g Sucrose in ca. 220 ml aqua destillata lösen und pH mittels 0,1 nHCl auf 8,0 einstellen. 0,75 g Uranyl-Acetat zugeben und über Magnetrührer bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle rühren. pH mittels 0,1 nHCl auf 6,3 reduzieren. Destilliertes Wasser ad 300 ml auffüllen.

Lösung A sollte vor Gebrauch frisch hergestellt werden; die Lösungen B und C sind bei 4°C einige Wochen haltbar.

2) *Fixation.* Lösungen A und B mittels Eiswasser auf 0°C kühlen und unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis

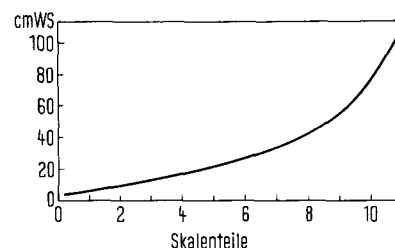


Fig. 2. Arbeitsbereich der im Zellkollektor eingebauten Membranpumpe, Unterdruck in cm Wassersäule.

<sup>12</sup> Vertretungen für die Schweiz und die Bundesrepublik Deutschland: Camag, Homburgerstrasse 24, CH-4132 Muttenz (Schweiz) und Camag, Baselerstrasse 65, D-1000 Berlin 45.

<sup>13</sup> J. G. HIRSCH und M. E. FEDORKO, J. Cell Biol. 38, 615 (1968).

von 2:1 mischen. Filter sofort nach Filtration der Flüssigkeit, Zellschicht nach unten, in Fixationslösung tauchen. Fixationsdauer 20 Min bei 0°C. Filter kurz in Lösung C (Uranyl-Acetat) spülen und in frischer Lösung C während 20–30 Min bei 0°C «nachfixieren». Anschliessend kurzes Spülen des Präparates in 0,9% NaCl oder ähnlichem Puffer.

3) *Dehydrierung und Einbettung*. Entwässerung der Präparate in 70%, 80% und 96% Äthanol je 5 Min bei 4°C, in 100% Äthanol (wasserfrei) 2 × 10 Min (Temperatur unkritisch). Für die Dehydrierung der auf Metrical-Filtermembranen angereicherten Zellen darf kein Aceton verwendet werden, da dieses das Filter auflöst. Aus dem gleichen Grunde ist auch das üblicherweise als Zwischenbad zwischen Alkohol und Kunstharz eingesetzte Propylenoxyd zu vermeiden. Die Einbettung der Präparate in Kunstharz (Epikote 812 der Firma Shell = «Epon») erfolgt nach folgendem Schema:

Äthanol 100% (oder Xylol): Epon (1:1)	2–3 h (20°C)
Epon + Katalysator	1. Bad 2–3 h (20°C)
Epon + Katalysator	2. Bad 6–8 h (40–50°C)
	dann ca. 24 h (60–80°C)

Die angegebenen Zeiten sind nicht kritisch, sollten jedoch nicht unterschritten werden.

Für die Einbettung der Filterpräparate werden mit Vorteil kleine Polyäthylen-Schalen eingesetzt. Das zelltragende Zentrum der Membran kann jedoch auch ausgeschnitten und in einer umgekehrten «Beem»-Kapsel in das Kunstharz eingeschlossen werden.

*Diskussion und Anwendungsbeispiele.* Das Membranfilter-Verfahren zur Anreicherung von Zellen aus Körperflüssigkeiten stellt eine quantitative zytologische Arbeitsmethode dar, die sich durch Einfachheit in der praktischen Anwendung und durch gute Reproduzierbarkeit der Befunde auszeichnet. Da die geformten Elemente eines Punktates oder einer Spülflüssigkeit verlustfrei auf der Membranoberfläche zurückgehalten werden, wenn ihr Durchmesser denjenigen der Filterporen übersteigt, lassen sich, vor allem bei sehr kleinen Probevolumina, Gesamtzahl und prozentuale Verteilung der in einer Population vorkommenden Zellen genau bestimmen. Figur 3a zeigt einen Ausschnitt aus einem menschlichen Liquor-Präparat bei Meningitis. Das Probevolumen betrug 0,1 ml. Bei der Differenzierung des Zellbildes wurden 70% Neutrophile, 1% Eosinophile, 6% monocytoide Elemente, 11% kleine Lymphocyten sowie 12% Retikulumzellen ausgezählt.

Der hier beschriebene Zellkollektor<sup>14</sup> erzielt durch die Verwendung von Filtrier-Einheiten mit kleinen wirksamen Öffnungen einen «Konzentrations-Effekt», welcher eine Anreicherung selbst vereinzelter Zellen aus wenigen Tropfen einer Körperflüssigkeit – oder eines Kulturmediums – gestattet. Figur 3b zeigt eine Gruppe von Zellen aus einem Blasenpunktat eines neugeborenen Kaninchens nach experimentellem Virus-Infekt des Muttertieres. In den untersuchten 0,1 ml Urin wurden 26 Zellen nachgewiesen, darunter 12% Elemente aus den oberen Harnwegen.

Die an Metrical-Filtermembranen<sup>2,12</sup> unter anderem anwendbare May-Grünwald-Giemsa-Färbung liefert Zellpräparate, die in ihrem färberischen Aspekt mit einem üblichen, hämatologischen Objektträger-Ausstrich vergleichbar sind (Figuren 3, c und d). Bei der Interpretation eines durch Membranfiltration gewonnenen Präparates kann daher meistens auf eine an normalen Ausstrichen gewonnene Erfahrung zurückgegriffen werden. Unsicherheiten in der Befunderhebung, wie sie bei modifizierten und nicht allgemein bekannten Färbungen auftreten können, lassen sich so weitgehend vermeiden. Die an membranfiltrierten Zellen in Erscheinung tretende, im Ver-

gleich zu einem Ausstrich grössere Polymorphie von Kern und Zytoplasma wird in der Regel kaum als Nachteil empfunden. Sie ist übrigens durch die Wahl des kleinstmöglichen Porendurchmessers am Filter (zum Beispiel 0,8 oder 1,2  $\mu$ ) innerhalb gewisser Grenzen korrigierbar (flachere Ausbreitung der Zellen).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an membranfiltrierten Zellen sind durch geringfügige Modifikationen der üblichen ultrastrukturellen Methodik leicht durchzuführen, wenn durch entsprechende Wahl der Flüssigkeitsmenge, oder – bei kleinen Zellzahlen – durch Einsatz entsprechender Filtrier-Einheiten mit kleinster wirksamer Filterfläche eine genügend grosse Zelldichte auf dem Filter erreicht werden kann (Figur 4). Da die im Kunstharz eingeschlossenen Filter völlig durchsichtig sind, lassen sich sehr leicht jene Regionen des Präparates

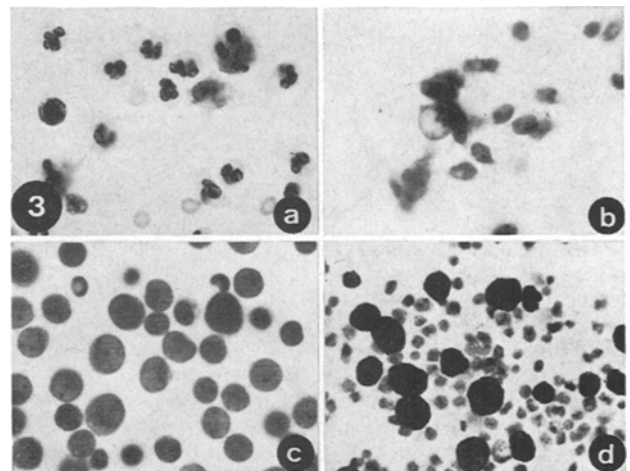


Fig. 3. Exfoliative Zytologie aus kleinen Flüssigkeitsvolumina: a) Liquorzellbild bei Meningitis; 0,1 ml Liquor, wirksame Filterfläche 5 mm. b) Blasenpunktat neugeborenes Kaninchen; Probevolumen 0,1 ml, 3-mm-Filterfläche. c) Myeloische Leukämie, Zellanreicherung; Probevolumen 0,02 ml, 5-mm-Filterfläche. d) Spülflüssigkeit aus der Peritonealhöhle der Ratte mit Mastzellen (schwarz), Mesothelzellen und Lymphocyten; Probevolumen 0,05 ml. Färbung: modifizierte May-Grünwald-Giemsa.

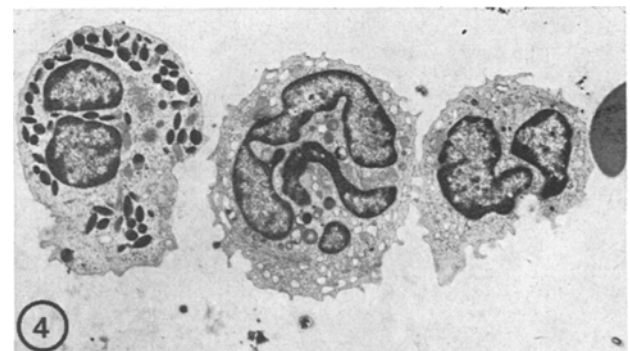


Fig. 4. Eosinophiler (links) und neutrophile Granulozyten aus der Peritonealhöhle der Ratte. Das von Epon durchtränkte Filter (unten) ist knapp zu erkennen.  $\times 5800$ .

<sup>14</sup> Die technischen Unterlagen über das Gerät können bei den Autoren angefordert werden.

lichtoptisch aussuchen, die elektronenoptisch von besonderem Interesse sind.

Die Autoklavierbarkeit der meisten Membranfilter erlaubt im weiteren die Ablagerung von Zellen unter sterilen Bedingungen. Verschiedene Zellformen können somit auf der Membran direkt in vitro gezüchtet werden<sup>15,16</sup>. Über die Untersuchung von Körperflüssigkeiten hinaus gestattet das Membranfilter-Verfahren damit auch seine fast unbeschränkte Anwendung in der experimentellen Zytologie.

**Summary.** A cell collector for concentrating small numbers of exfoliated cells on membrane filters from minute volumes (0.05–3 ml) of body fluids and culture media is described. The apparatus incorporates a membrane pump, delivering a vacuum of 10–100 mm Hg. Filtration units (funnels and filter holders) with filtering areas of 3, 5 and 8 mm diameter are used depending on the volume and the cell content of the fluid to be investigated.

A rapid staining procedure based on the classical May-Grünwald-Giemsa technique for light microscopic observations and a modified technique for processing the cell-coated filters for electron microscopy are presented in some detail.

G. KISTLER<sup>17</sup>, W. SCHERLE  
und A. HAUSWIRTH

*Elektronenmikroskopische Abteilung des  
Anatomischen Institutes der Universität,  
CH-8006 Zürich (Schweiz), 29. September 1969.*

<sup>15</sup> R. M. McCOMBS, M. BENYESH-MELNICK und J. P. BRUNSWIG, J. Cell Biol. 36, 231 (1968).

<sup>16</sup> H. DALEN und T. J. NEVALAINEN, Stain Technol. 43, 217 (1968).

<sup>17</sup> Mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

## Eine einfache Aufbewahrungsweise von Erythrozyten mit gebundenen Antigenen für den Hämagglutinationstest

Unter die Aufbewahrungsweisen der sensibilisierten Testerythrozyten gehört zum Beispiel die Gefrier-trocknung sowie auch die Konservierung mittels Chemikalien. Unsere Untersuchungen gingen von den Erfahrungen einiger Verfasser<sup>1–4</sup> aus, die mit Formalin eine bedeutende Verlängerung der Wirkungs-dauer erzielt hatten.

**Material und Methodik.** Ingredienzien: 1. Schaf- oder Humanerythrozyten (Gruppe O, Rh neg.) formolisiert nach FEELEY<sup>5</sup>; 2. zweimal rekristallisiertes Ovalbumin, der Polysaccharidantigen O 901 *Salmonella typhi abdominalis*; 3. Kaninchenantiseren (bei 56°C inaktiviert); 4. redestilliertes Formalin; 5. Acidum tannicum (Scheering); 6. Pufferlösungen – Phosphat puffer nach STAVIT-

SKY<sup>6</sup>, pH 7,2 und 5,8. Bei Eiweissantigen war der Arbeitsgang in der ersten Phase (Tanninbehandlung, quantitative Verhältnisse) derselbe wie bei der Methode nach STAVITSKY; nach 18-stündiger Inkubation wurde zu den Erythrozyten mit Antigen für weitere 2 Stunden 5% Formalin zugesetzt.

Tabelle I. Wirksamkeit der durch Ovalbumin sensibilisierten Schaferythrozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung

Lagerungsdauer	n
0	4
1 Woche	5
2 Wochen	3
4 Wochen	3
2 Monate	3
4 Monate	4
6 Monate	5

Der Titer wird durch die Beziehung  $T = 2^{-n} \times 10^{-3}$  gegeben.

<sup>1</sup> A. W. FRISCH und R. PERSELLIN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 124, 344 (1967).

<sup>2</sup> A. J. FULTHORPE, J. Hyg. 55, 382 (1957).

<sup>3</sup> J. S. INGRAHAM, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 99, 452 (1958).

<sup>4</sup> YU. G. SUCHKOV und YU. V. KANATOV, J. Microbiol. Epidem. Immunobiol., Moskva 8, 63 (1965).

<sup>5</sup> J. C. FEELEY, C. SWORD, CH. MANCLARK und M. PICKETT, Am. J. clin. Path. 30, 77 (1958).

<sup>6</sup> A. B. STAVITSKY, J. Immunol. 72, 360 (1954).

Tabelle II. Die Wirksamkeit der mit Salmonellen-Polysaccharidantigen sensibilisierten Erythrozyten; charakteristische Werte in den einzelnen Lagerungsmonaten

Erythrozyten	Sensibilisierungsmethode	Lagerung in 1% Formalin	n-Werte.						
			Lagerungsdauer in Monaten						
			0	1	2	4	6	8	
Widder	üblich	—	9	s	s	s	—	—	
	üblich	+	9	—	9	—	9	—	
	üblich + nach-träglicher Formalinzusatz	+	9	9	9	9	9	8	
	Sensibilisierung in Gegenwart von Formalin	+	9	9	9	9	9	9	
	üblich	—	9	—	10	—	s	—	
Mensch	üblich	+	9	—	9	—	10	—	
	üblich + nach-träglicher Formalinzusatz	+	9	—	10	—	10	—	
	Sensibilisierung in Gegenwart von Formalin	+	9	—	10	—	10	—	
	üblich	—	9	—	10	—	s	—	

Der Titer wird durch die Beziehung  $T = 2^{-n} \times 10^{-1}$  bestimmt. s = spontane Agglutination.