

# Zählkammer

## Allgemeine Anleitung zur Verwendung von Hämacytometer • Zählkammern

### Zählkammer

Zählkammern sind Präzisionsinstrumente zur visuellen mikroskopischen Zählung von lebenden oder toten Zellen verschiedenster Art und/oder zur quantitativen Selektion zwischen lebenden und toten Zellen.

Neben der visuellen Zählung gibt es auch Zählkammern die speziell für automatische Zählungen verwendet werden, sowie Einweg-Zählkammern, die nicht Gegenstand dieser Anleitung sind.

Grundsätzlich wird hier nur auf die allgemeine Verwendung einer Zählkammer Bezug genommen. Für die spezielle Verwendung (Zählung, Berechnung) ist stets die Analysenvorschrift (z. B. Gebrauchsanleitung des Reagenzherstellers) maßgebend.

#### Allgemein

Folgende Angaben sollten auf jeder Zählkammer stehen:

$\frac{1}{1}$  = Zählkammer-Tiefe  
mm<sup>2</sup> = Kleinste Aufteilung

#### Humane in-vitro-Diagnostik

Zählkammern zur in-vitro Diagnostik (IVD) müssen entsprechend der Verordnung (EU) 2017/746 für in-vitro Diagnostika gekennzeichnet sein, für deren Grundlage eine Konformitätserklärung des Herstellers erforderlich ist [1]:

CE = Konformität mit der Verordnung (EU) 2017/746 (IVDR).  
IVD = Für die humane in-vitro Diagnostik zugelassen.  
= Hersteller.

#### Veterinärmedizin

Hierfür können alle Zählkammern verwendet werden, die auch für humane in-vitro-Diagnostik zugelassen sind. Die vorstehenden Symbole müssen hierfür nicht auf der Zählkammer aufgebracht sein.

#### Life Science & Mikrobiologie

Für den Bereich Life Science und non-humandagnostische Mikrobiologie gilt wie für Veterinärmedizin beschrieben.

#### Industrie

Für die Industrie (z.B. Lebensmittel, Getränke) gelten ggf. andere Vorschriften.

### Zählkammer-Typen

#### Linienausführung

Zwei grundsätzliche Unterscheidungsmerkmale gelten für fast alle Zählkammertypen:

- Zählkammern mit dunkel erscheinenden Netzlinien (Standard) und
- sogenannte helllinige Zählkammern, bei denen die Glasoberfläche vor dem Ritzen der Zähllinien mit einer Metallbedampfung (Rhodium) versehen wurde. Diese verdunkelt das Bild und die geritzten Linien erscheinen hell.

Soweit helllinige Zählkammern nicht für spezielle Zählmethoden vorgeschrieben werden, empfehlen wir diese grundsätzlich NICHT zu verwenden!

Nachteile hellliniger Zählkammern sind:

- Geringere Lichtdurchlässigkeit mit der Konsequenz, dass die Mikroskoplampe heller aufgedreht wird. Dies führt zu schnellerer Erwärmung (Eintrocknung, Zellbewegung) des Präparates.
- Höhere Empfindlichkeit der metall-bedampften Oberfläche.
- Höhere Anschaffungskosten.

#### Zählmethoden und Zählnetze

Je nach zu zählender Zellart und der zu erwartenden Zellenzahl per Volumen stehen verschiedene Zählmethoden bzw Zählkammern zur Verfügung. Die Zählmethoden unterscheiden sich i. W. durch die Verdünnung und die Zusammensetzung der Verdünnungslösungen [1]. Die Zählkammern unterscheiden sich durch die Zählnetze und teilweise durch verschiedene Kammertiefen. Im Folgenden werden die Spezifikationen einiger Zählkammer-Typen (unterschiedliche Zählnetze) genannt.

#### Neubauer improved [2]

Standard-Zählkammer für Blutuntersuchungen, z. B. für Erythrozyten-, Leukozyten und Thrombozyten-Zählung.

Hinweis/Empfehlung: Bei Nachbestellungen auf "Neubauer improved" bestehen (verbessertes Modell).

CC-NEUI Zählnetz = 9 mm<sup>2</sup> Gesamtfläche. Kammertiefe 0,100 mm. Unterteilt in 9 Quadratgruppen von je 1 mm<sup>2</sup> Fläche.  
Im Mittelquadrat 5x5 = 25 Quadrate mit je 16 Kleinstquadraten von 0,05 mm Seitenlänge (= 0,0025 mm<sup>2</sup>). Inkl. 2 Deckgläser.

CC-NEUI-B Wie vorstehend, jedoch helllinig (brightline, metallisierte Oberfläche).

#### Neubauer (konventionell) [2]

Herkömmliche Zählkammer für Blutuntersuchungen, z. B. für Erythrozyten-, Leukozyten und Thrombozyten-Zählung.

Hinweis/Empfehlung: Bei Nachbestellungen auf "Neubauer improved" bestehen (verbessertes Modell).

CC-NEUI Zählnetz = 9 mm<sup>2</sup> Gesamtfläche. Kammertiefe 0,1 mm. Unterteilt in 9 Quadratgruppen von je 1 mm<sup>2</sup> Fläche.  
Im Mittelquadrat 4x4 = 16 Quadrate mit je 16 Kleinstquadraten von 0,05 mm Seitenlänge (= 0,0025 mm<sup>2</sup>). Inkl. 2 Deckgläser.

#### Thoma neu

Zählkammer für Blutuntersuchungen, z. B. für Erythrozyten- und Thrombozyten-Zählung.

Hinweis/Empfehlung: Das Zählfeld entspricht dem Innenbereich der Neubauer improved Zählkammer. Kaufen Sie daher diese, da Sie damit auch Leukozyten zählen können.

Achtung! Entgegen mancher Literatur/Lehrbüchern dürfen in der Thoma-Zählkammer prinzipiell keine Leukozyten gezählt werden!

#### Thoma (konventionell) [2]

Zählkammer für Blutuntersuchungen, z. B. für Erythrozyten- und Thrombozyten-Zählung.

Hinweis/Empfehlung: Das Zählfeld entspricht dem Innenbereich der Neubauer Zählkammer. Aber auch diese ist überholt. Bestehen Sie beim Neukauf auf einer Neubauer improved.

Achtung! Entgegen mancher Literatur/Lehrbüchern dürfen in der Thoma-Zählkammer prinzipiell keine Leukozyten gezählt werden!

### Fuchs-Rosenthal [2]

Zählkammer für geringe Zellzahlen, z. B. für die Zellenzählung im Liquor cerebrospinalis.

CC-FURO Fuchs Rosenthal - Zählkammer  
Zählnetz = 16 mm<sup>2</sup> Gesamtfläche. Kammertiefe 0,2 mm. Unterteilt in 16 Quadratgruppen von je 1 mm<sup>2</sup> Fläche.  
Je 1 mm<sup>2</sup> 16 Kleinquadrate von 0,25 mm Seitenlänge (= 0,0625 mm<sup>2</sup>).  
Inkl. 2 Deckgläser.

### Nageotte [2]

Verwendung z. B. zur Zählung der Restzellen bei Blut- und Plasmakonserven.

CC-NAGE Nageotte-Zählkammer mit horizontalen Linien (üblich in der westlichen Welt).  
Zählnetz = 100 mm<sup>2</sup> Gesamtfläche. Kammertiefe 0,5 mm. Volumen = 50 µl.  
Unterteilt in 40 Streifenfelder (Rechtecke) mit je 10 x 0,25 mm Seitenlänge (= 2,5 mm<sup>2</sup>) Fläche. Die Mittellinie ist durch eine zusätzliche Doppellinie markiert. Inkl. 2 Deckgläser.

CC-NAGV Nageotte-Zählkammer mit Linien in vertikaler Anordnung, sonst wie vorstehend.

### Deckgläser für Zählkammern

Einfache Deckgläser können nicht verwendet werden. Verwenden Sie ausschließlich Deckgläser, die für die Zählkammer zugelassen sind.

CC-CS.20x26 Zählkammer Deckgläser (Ersatz) in Präzisionsausführung mit beidseitigem optisch planem Flächenschliff. 10er Pack.  
Stärke = 0,4 mm; Größe = 20 x 26 mm (Standardgröße, andere auf Anfrage).

### Sicherheit

Beachten Sie die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen im Gebrauch von Laborreagenzien und Körperflüssigkeiten, sowie mikrobiologischer Proben. Der Umgang sollte durch sachkundiges Personal erfolgen. Nationale und interne Labor-Richtlinien für Arbeitssicherheit und Infektionsschutz sind zu befolgen. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung und Einmalhandschuhe während der Arbeit.

Es ist auf wirksamen Infektionsschutz entsprechend der Laborrichtlinien zu achten.

Benutzen Sie einen Kapillaren-Halter für Kapillaren.

### Aufbau der Zählkammer

Zählkammern bestehen aus einem Glasblock aus optischem Spezialglas. Die Grundplatte teilt sich in zwei breite Felder (außen), die der Beschriftung dienen und drei schmale Stege (innen) auf. Die drei schmalen Stege teilen sich wie folgt auf:

- Einen Mittelsteg (Kammerboden), auf dem ein Liniennetz (Zählnetz) eingraviert ist, das sich je nach Kammertyp unterscheidet. In der Regel sind zwei Zählnetze eingraviert, die durch eine Nut voneinander getrennt sind.
- Die Trägerstege, die sich rechts und links des Mittelsteges befinden und auf die das Deckglas aufgeschoben wird. Diese Trägerstege haben zu der Ebene der Zählnetze eine exakt definierte Höhe und geben so den Abstand zwischen Deckglas und Zählnetz vor (= Kammertiefe; z. B. 0,100 mm).

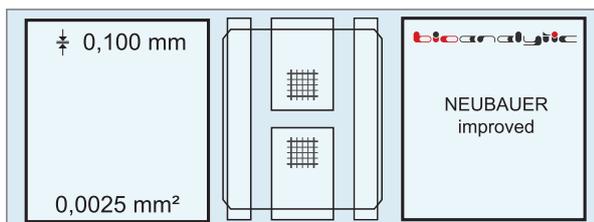


Abbildung 1:

Aufbau der Zählkammer: Aufsicht (oben) und Seitenansicht (unten).

Die Deckgläser für Zählkammern unterscheiden sich von Deckgläsern für normale Lichtmikroskopie durch die plangeschliffenen und polierten Oberflächen. Außerdem sind sie etwas dicker als normale Deckgläser, damit sie nicht durch Kapillarkräfte durchgebogen werden.

Deckgläser MÜSSEN zur Zählkammer passen! Diese sind rechteckig und nicht quadratisch. Die 4 Ecken sind abgeschrägt und nicht 90°-winklig. Beschädigte Zählkammern müssen ersetzt werden. Ebenso dürfen beschädigte Deckgläser nicht weiter verwendet werden.

### Vorbereitung

Vor der Verwendung der Zählkammer muss diese für die Verwendung vorbereitet werden. Hierzu muss das geschliffene Deckglas auf die Trägerstege "aufgeschoben" werden. Damit kein Abstand zwischen den plangeschliffenen Auflagebalken und dem Deckglas entsteht ist hierfür eine besondere Technik erforderlich. Gehen Sie daher wie folgt vor:

- Prüfen Sie Zählkammer und Deckglas auf Sauberkeit! Keine Flusen, keine Fingerabdrücke im Zählnetzbereich oder auf dem Deckglas!

- Legen Sie die Zählkammer auf eine saubere, glatte und feste Tischfläche auf.
- Verwenden Sie ein leicht feuchtes Wattestäbchen und befeuchten Sie die Trägerstege ganz leicht. Es darf kein Wasser darauf stehen bleiben, das bei Neigung herunter laufen könnte. Zur besseren Benetzung der Glasoberfläche kann man dem Wasser einen Tropfen Glycerin pro 1 ml zusetzen und mischen.
- Das Deckglas wird parallel zur Zählkammer auf die Trägerstege aufgelegt, und zwar nicht mittig sondern 3 mm tiefer.
- Anschließend wird das Deckglas sofort unter leichtem Druck auf die Trägerstege um die 3 mm nach oben geschoben, so dass das Deckglas mittig aufliegt. Durch die Adhäsion des Wassers haftet das Deckglas an den Trägerstegen.

Das Deckglas sitzt korrekt wenn:

- sich das Deckglas nicht mehr verschieben lässt,
- Bei schrägem Lichteinfall sich Newton'sche Ringe (Interferenzlinien) bilden (regenbogenfarbene Ränder)
- das Deckglas beide Zählfelder korrekt überdeckt, also möglichst zentriert auf der Zählkammer aufsitzt.

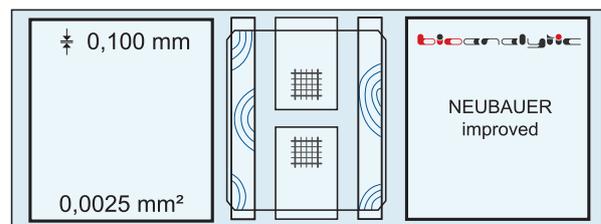
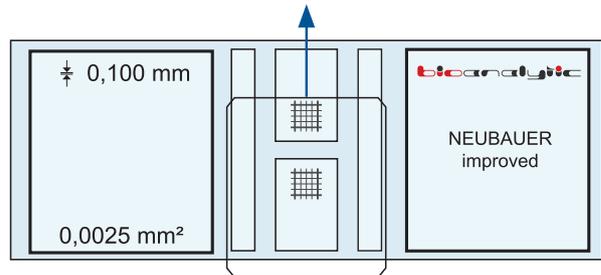


Abbildung 2:

Vorbereitung der Zählkammer. Aufschieben des Deckglases auf die Trägerstege (oben) und Newton'sche Ringe (unten).

### Befüllung der Zählkammer

Beachten Sie hierzu auch die Anleitung Ihrer Test-Methode, insbesondere auch zu Besonderheiten wie der Sedimentierung von Zellen vor der Zählung in einer feuchten Kammer.

Das Wichtigste vor Befüllung der Zählkammer ist, die Probe (Suspension) DIREKT VOR der Befüllung ausreichend zu homogenisieren (mischen/schütteln) um eine repräsentative Zellenzahl zu transferieren. Andernfalls können sowohl zu hohe als auch zu niedrige Ergebnisse resultieren.

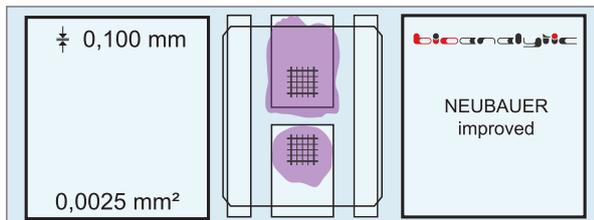
Achtung!

Die Zählkammer darf nicht unter-/überfüllt werden. Die Zählfläche muss exakt gefüllt sein, ohne dass Probe in den abgeschrägten Bereich überläuft oder sich dort Flüssigkeit sammelt. Überschüssige Flüssigkeit darf nicht mit einem Tupfer abgesaugt werden. In diesem Fall muss die Kammer gereinigt und neu befüllt werden.

Die Zählkammer ist richtig befüllt, wenn ausschließlich die komplette Fläche des Zählnetzes unterhalb des Deckglases befüllt ist. Bei gefärbten Verdünnungen ergibt sich an den Kanten nur ein sehr schmaler Farbsaum.

Die korrekte Befüllung einer Zählkammer bedarf gewisser Übung. Zählen Sie die Zellen nur bei korrekter Befüllung.

## ⊗ FALSCH



## ✔ RICHTIG

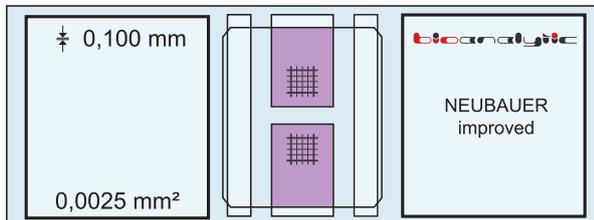


Abbildung 3:  
Befüllung der Zählkammer. Über- und Unterfüllte Zählkammer (oben) und korrekt befüllte Zählkammer (unten).

Für die korrekte Befüllung der Zählkammer gibt es unterschiedliche Instrumente und Verfahren:

### Kammerfüllkapillaren

Kammerfüllkapillaren sind der Standard in den gebrauchsfertigen TIC-Systemen von Bioanalytic GmbH.

Die Kammerfüllkapillare wird durch Kapillarwirkung etwa halb bis 2/3 mit frisch resuspendierter Probenverdünnung gefüllt. Das obere Ende wird mit dem Finger verschlossen. Außen anhängende Tropfen am unteren Ende kurz abwischen. Das offene untere Ende sodann schräg an den Deckglasspalt/Deckglaskante heranführen. Durch leichtes Öffnen des oberen Endes lässt man die Probe bis zur korrekten Befüllung zwischen Zählnetz und Deckglas laufen.

### Kolbenhub-Pipette

Auch lässt sich eine Zählkammer mit einer Kolbenhub-Pipette befüllen. Das exakte Volumen ist von der Zählkammer und der Überdeckung des Deckglases abhängig. Daher kann kein exaktes Volumen genannt werden. Entweder die Zählkammer wird visuell nach Füllstand gefüllt, oder das Füllvolumen wird empirisch ermittelt. I. d. R. liegt dieses zwischen 15 und 50 µl.

### Blutmischpipette

Blutmischpipetten sind bereits 1988 von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) als Obsolet (ungenau, gefährlich) deklariert worden. Daher wird auf die Kammerbefüllung hier nicht mehr eingegangen.

## Mikroskop

Zur Zellenzählung wird ein gutes Labormikroskop mit Kreuztisch erwartet. Es muss i. d. R. über die Vergrößerungen 100× und 400× verfügen.

Die Vergrößerung ergibt sich durch Multiplikation des Objektivs und des Okkulars. 40er Objektiv × 10er Okkular = 400× Vergrößerung).

Bitte beachten Sie grundsätzlich die Gebrauchsanweisung des Mikroskop-Herstellers, da hier nur allgemeine Angaben gemacht werden können.

Das Mikroskop soll sauber und gepflegt sein und einer regelmäßigen Wartung/Überprüfung unterzogen werden. Hierzu wenden Sie sich an Ihren Mikroskop-Hersteller oder -Lieferanten.

### Vorgehensweise

Werden schwach gefärbte oder ungefärbte Präparationen verwendet, so ist zur Zählkammerzählung die Blende am Kondensor des Mikroskops auf eng zu stellen (abgeblendet). Alternativ oder falls keine Kondensorblende vorhanden ist, muss der Kondensor ganz nach unten gestellt werden.

Die Zählkammer wird auf dem Kreuztisch befestigt und das Objektiv 10× in den optischen Gang geschwenkt. Mit der grob-/fein-Schärfeneinstellung wird der Abstand des Kreuztisches zum Objektiv so eingestellt, dass das Zählnetz abgebildet wird.

Diese Voreinstellung kann auch mit einer ungefüllten (leeren) Zählkammer vorbereitet werden.

Danach kann ggf. eine höhere Vergrößerung (größeres Objektiv) eingestellt werden. Sodann ist nur noch eine leichte Korrektur in der Schärfenebene vorzunehmen.

## Zählmethode

Je nach Zelltyp der auszählenden Zellen werden jeweils unterschiedliche Gruppen von Quadraten ausgezählt und daraus ein Mittelwert gebildet. Das Auszählen der Zellen setzt genaue Kenntnisse zur Zählmethode und im Umgang mit den Grenzlinien voraus. Die Regeln werden im Folgenden erläutert.

### Mäanderförmige Zählung

Um Fehlzählungen zu vermeiden erfolgt die Zählung der Quadrate mäanderförmig.

### Grenzlinienregel (L-Regel)

Bei der Zählung müssen die Begrenzungslinien genau beachtet werden. Bei Zählkammern, die über dreifache Begrenzungslinien verfügen, wie z. B. die Neubauer improved Zählkammer, stellt die mittlere Linie die tatsächliche Grenzlinie dar.

Bei der Zählung ist zu beachten, dass zwei nicht gegenüberliegende Grenzlinien eines Zählfeldes diskriminiert werden. Gezählt werden also alle Zellen innerhalb des Feldes, sowie die Zellen, die auf dem sogenannten "L" liegen. Die gegenüber dem "L" liegenden Zellen werden nicht gezählt. Dadurch wird vermieden, dass Zellen, die auf den Linien des Zählnetzes liegen nicht doppelt gezählt werden und nur so wird die ausgezählte Fläche exakt eingehalten.

Vor der Zählung ist daher zu überlegen, welche Grenzlinien von der Zählung ausgeschlossen werden sollen. Das können z. B. die oberen und rechten Grenzlinien sein oder die Kombination unten und links (s. Abbildung). Von dieser Zähltechnik darf innerhalb der Zählung nicht abgewichen werden.

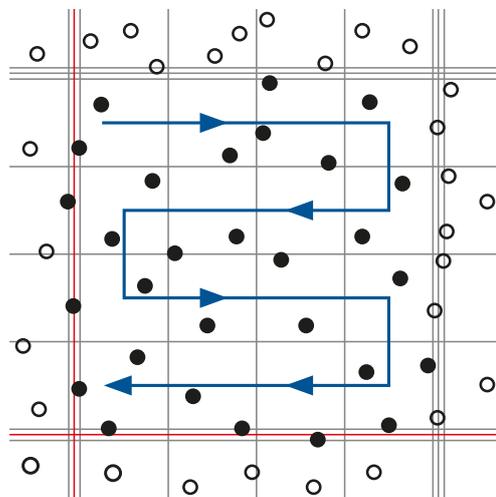


Abbildung 4:  
Schematische Darstellung der Zellen eines Feldes nach der "L-Regel" (rote Linien) und mäanderförmigen Zählung (blau).

### Doppelbestimmung

Für die in-vitro-Diagnostik (IVD) sind grundsätzlich Doppelbestimmungen vorgeschrieben. Für andere Anwendung beachten Sie bitte die anzuwendenden Vorschriften.

Zur Doppelbestimmung werden beide Kammerfelder (oberes und unteres Zählnetz) mit der gleichen Probe gefüllt und beide Kammerfelder ausgezählt. Das Ergebnis beider Zählungen darf maximal um 10 % abweichen, sodann wird der Mittelwert aus beiden Kammerfeldern als Ergebnis eingesetzt. Bei größeren Abweichungen ist die Zählung ggf. mit frisch angefertigter Verdünnungslösung zu wiederholen.

## Mikroskopische Auszählung der Zellen

Die Auszählung der Zellen und die Berechnung erfolgt analog der gewohnten Vorschrift bzw. der Gebrauchsanleitung des Herstellers (Verdünnungslösung, Testkit).

Verwenden Sie die dort angegebene Vergrößerung, Zählfläche und Berechnung.

## Berechnung

Die Berechnung der Zellenzahl ist abhängig von der Verdünnung und dem Kammervolumen.

Die Angaben hierzu entnehmen Sie üblicherweise der Gebrauchsvorschrift Ihrer Zählmethode bzw. des Herstellers der Verdünnungslösung bzw. Testkits.

### Berechnungen

$$\text{gez. Kammervolumen } [\mu\text{l}] = \text{gezählte Kammerfläche } [\text{mm}^2] \times \text{Kammertiefe } [\text{mm}]$$

$$\text{Zellenzahl} / \mu\text{L} = \text{gezählte Zellen} \times (1 / \text{gezähltes Kammervolumen}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

## Reinigung und Desinfektion

Hierzu beachten Sie bitte die Literatur [3].

Verwenden Sie ausschließlich unbeschädigte und saubere Zählkammern und Deckgläser!

## Fehlermöglichkeiten

Bei Auftreten der nachstehenden Fehler muss die Zählkammer gereinigt, neu vorbereitet und neu befüllt werden.

### Zu hohe Zellzahlen

- Verdünnung nicht unmittelbar vor Kammerbefüllung resuspendiert.  
⇒ Achtung! Neue Verdünnung herstellen. Durch die Entnahme wurde die bestehende Verdünnung verfälscht und kann nicht mehr zu einer weiteren Zählung verwendet werden.
- Deckglas nicht fest oder schwimmt auf, lässt sich verschieben.  
Keine Newtonschen Ringe sichtbar.
- Zählkammerbefüllung nicht korrekt.
- Falsche Felder wurden gezählt.
- L-Regel nicht beachtet.
- Begrenzungslinien nicht korrekt beachtet.

### Zu niedrige Zellzahlen

- Verdünnung nicht unmittelbar vor Kammerbefüllung resuspendiert.  
⇒ Achtung! Neue Verdünnung herstellen. Durch die Entnahme wurde die bestehende Verdünnung verfälscht und kann nicht mehr zu einer weiteren Zählung verwendet werden.
- Zählkammerbefüllung nicht korrekt.
- Falsche Felder wurden gezählt.
- L-Regel nicht beachtet bzw. nur Zellen innerhalb gezählt.
- Begrenzungslinien nicht korrekt beachtet.

### Unplausible Ergebnisse

- Falsche Berechnung  
⇒ Prüfen und korrigieren.
- Falsche Verdünnung.  
⇒ Achtung! Neue Verdünnung herstellen!
- Falsche Zählkammer, falsche Zählkammertiefe (Sondertiefen existent).

## Hinweise

## Entsorgung

Zur Entsorgung beachten Sie bitte die Bestimmungen Ihres Landes. Die Zählkammern sind aus Glas hergestellt.

## Literatur & Fußnoten

Beachten Sie unbedingt die Gebrauchsanleitung des Reagenz-/Kit-Herstellers. Insbesondere bei der in-vitro-Diagnostik (IVD) darf von dieser nicht abgewichen werden.

[1] Verordnung (EU) 2017/746 (IVDR).

[2] Produktinformationen Bioanalytic GmbH, Zählkammerbeschreibungen mit farbigen Abbildungen und Rechenbeispielen.  
Über Download erhältlich bei der jeweiligen Zählkammer unter [www.bioanalytic.de](http://www.bioanalytic.de).

[3] Produktinformation Bioanalytic GmbH, Zählkammern - Reinigung und Desinfektion von Hämacytometern.  
Über Download erhältlich bei der jeweiligen Zählkammer unter [www.bioanalytic.de](http://www.bioanalytic.de).

(1) Verdünnungslösungen und Testkits stehen für verschiedene Untersuchungsmethoden zu Verfügung: [www.bioanalytic.de](http://www.bioanalytic.de) oder Informationen auf Anfrage: [support@bioanalytic.de](mailto:support@bioanalytic.de).