

# LEITZ *Mitteilungen*

FÜR WISSENSCHAFT UND TECHNIK



# Eine Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung für die Routinediagnose\*

Von Friedrich Walter, Wetzlar

DK 535.822.5:535.822.8

Die mikroskopische Diagnose der Lues wird heute in vielen Laboratorien auf dem Wege der Fluoreszenz-Antikörpermarkierung vorgenommen. Die markierten Präparate zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop im Falle eines positiven Befundes leuchtend apfelgrüne Treponemen, die sich gut von den nur sehr schwach fluoreszierenden negativen Spirochäten unterscheiden lassen. Da die Intensität des von der Struktur emittierten Fluoreszenzlichtes in direkter Beziehung zur Menge der absorbierten Erregerstrahlung steht, ist der Wunsch des Diagnostikers verständlich, möglichst viel Erregerlicht auf das Präparat zu konzentrieren und damit die Sicherheit der Diagnose auch von dieser Seite her zu gewährleisten. Somit wäre die Verwendung eines hochaperturigen Durchlicht-Hellfeldkondensors hier wohl die mikroskopisch-instrumentell günstige Lösung. Ihr steht aber entgegen, daß die Beobachtung der fluoreszenzmarkierten Bakterien einen absolut dunklen Präparathintergrund erfordert, damit die Treponemen sich gut leuchtend von diesem abheben. Normalerweise wird daher Durchlichtbeleuchtung mit Ölimmersions-Dunkelfeldkondensator n. A. 1,20 durchgeführt. Dabei ist aber auf der Beobachtungsseite auch schon die maximale numerische Apertur des Ölimmersions-Objektivs festgelegt; nämlich um etwa 1,10. Auf der Bedienungsseite kommt hinzu, daß der Dunkelfeldkondensator eben ein Immersionskondensator sein muß, um die gewünschten beleuchtungsseitigen Aperturen zu erreichen — ein für die tägliche Routineuntersuchung einer Vielzahl von Präparaten oft lästiger Begleitzustand beim Mikroskopieren (Verschmieren des Objektisches mit Öl, jedesmal beim Präparatwechsel neu aufzubringendes Immersionsöl etc.).

Diese für die zeitgebundene Serienarbeit ins Gewicht fallenden Nachteile vermeidet die Fluoreszenzmikroskopie mit auffallendem Licht (GREHN und KORNMANN 1965). Hier herrschen insbesondere bei den starken Mikroskopvergrößerungen beleuchtungsseitig und beobachtungsseitig optimale Verhältnisse: Das Mikroskopobjektiv dient gleichzeitig als Kondensator, so daß die Präparate auch mit der vollen Apertur des Objektivs durch das auffallende Erregerlicht beleuchtet werden. Dabei erzielt man außerdem einen dunklen Präparathintergrund wie bei Dunkelfeld-Durchlichtbeleuchtung, da alle nicht für die Fluoreszenzanregung absorbierten Strahlungsanteile durch die Leerstellen im Präparat und durch das Glas des Objektträgers hindurchtreten und nicht mehr in den mikroskopischen Abbildungsstrahlengang gelangen. Durch den Einsatz eines speziellen Fluoreszenz-Auflichtilluminators (PLOEM 1967, EICHLER und WALTER 1968, WAL-

\* Aus dem Laboratorium für Angewandte Mikroskopie der ERNST LEITZ GMBH

TER und EICHLER 1968), des sogenannten Fluoreszenzopak (nach Ploem), werden die Beleuchtungs- und Beobachtungsverhältnisse noch wesentlich verbessert (siehe Abb. 1): durch Verwendung einer dichromatischen Schicht auf dem Teilerplättchen des Opak-Illuminators erreicht man für bestimmte Wellenlängen der auffallenden Anregungsstrahlung erhöhte Reflexion, und zwar ca. 95% gegenüber 50% beim unbeschichteten neutralen Tei-

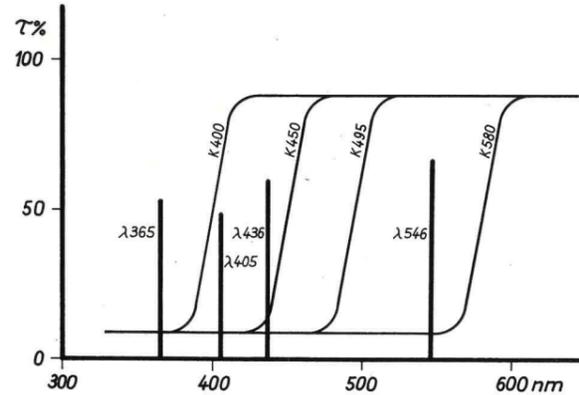


Abb. 1: Schematische Darstellung des Reflexions- und Durchlaßbereichs der dichromatischen Teilerschichten im LEITZ-Fluoreszenzopak: Senkrechte Linien-Anregungswellenlängen; links der Kurven liegt der Reflexionsbereich, rechts der Kurven der Durchlaßbereich.

Abb. 2: *Treponema pallida*, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines FITC-markierten Präparates; positive Antikörperreaktion. Mikroskopische Ausrüstung: Siehe Texterläuterungen.

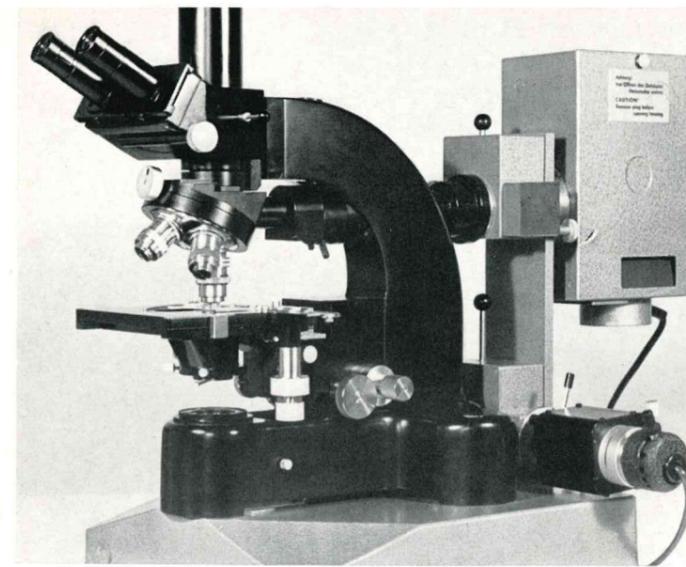
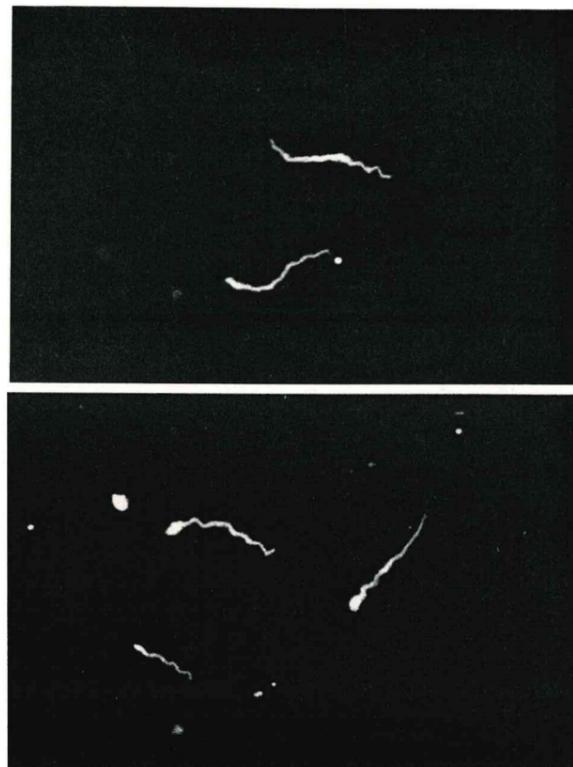


Abb. 3: LEITZ-Auflicht-Fluoreszenzmikroskop ORTHOLUX mit Fluoreszenzopak nach PLOEM.

wegfällt. Dies bedeutet für den Mikroskopierenden eine große Zeitersparnis. Die mikroskopische Apparatur besitzt zweckmäßigerweise als Grundstativ ein Mikroskop ORTHOPLAN oder ORTHOLUX (vgl. Abb. 3). An diese Stativ kann man dann unter Vermeidung sämtlicher Umlenk-Spiegelsysteme direkt für geraden Durchgang ein Lampenhaus 250 mit der 200 W-Quecksilberhöchstdrucklampe für die Fluoreszenzmikroskopie ansetzen.

An Stelle des üblichen Objektivrevolvers für Durchlichtbeobachtung nimmt das Mikroskopstativ den Fluoreszenzopak mit Tubuslinse für 170 mm Durch-

lichtoptik auf. Am Opak-Revolver werden die Ölimmersionsobjektive FI ÖI 95/0—1.30\*\* und ggf. noch der Achromat Iris ÖI 100/1.10—1.30 angebracht. Die freien Öffnungen des Revolvers werden durch Einschraubkappen verschlossen, falls man sie nicht für Alternativuntersuchungen im Durchlicht z. B. für Phasenkontrast mit anderen Objektiven bestückt. Aus Gründen einer weiteren Steigerung der Bildhelligkeit sollten schwach vergrößernde Okulare benutzt werden; also z. B. Okular 6.3 x. Die für diese Untersuchungen notwendigen Beleuchtungseinrichtungen (Glühlampe, Durchlichtkondensator) werden auf die gewohnte Weise am Stativ angebracht. Die Fluoreszenz-Sperrfilter befinden sich in dem üblichen Filterschieber im Opak-Revolver (ORTHOLUX) bzw. im Stativ (ORTHOPLAN).

Es sei hier darauf hingewiesen, daß die beschriebene Mikroskop-Ausrüstung ganz allgemein für die Fluoreszenzmikroskopie von markierten Proteinen besonders geeignet ist. Entsprechende instrumentelle Ausbaumöglichkeiten bestehen im Rahmen des LEITZ-Bausteinsystems.

\*) K = Kantenlage; Zahlenwert =  $\lambda$  [nm] bei  $\tau$  45%

\*\*) Der Autor hat bisher keine störende Eigenfluoreszenz dieser Fluorit-Objektive beobachten können.

Anschrift des Verfassers: Dr. phil. Friedrich Walter, Labor ANWENDUNG MIKRO — ERNST LEITZ GMBH, Wetzlar

## Literatur

GREHN, J. und H. KORNMANN: Kontrastfluoreszenz mit OPAK-Illuminator, LEITZ-Mitteilungen, Wiss. u. Techn. III (1959), 108

PLOEM, J. S.: The Use of a Vertical Illuminator with Interchangeable Dichroic Mirrors for Fluorescence Microscopy with Incident Light. Z. wiss. Mikrosk. 68, 4 (1967), 129 (dort weitere Literatur)

EICHLER, J. und F. WALTER: Ein Beitrag zur Fluoreszenzmikroskopie des Knochengewebes. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. IV (1968), 110

WALTER, F. und J. EICHLER: A new fluorescence microscope technique applied for bone tissues. Vortrag anl. Tagung der „Royal Microscopical Society and Anatomical Society of Great Britain and Ireland“ in Sheffield (England), April 1968

lerplättchen im normalen Hellfeld-Opakilluminator. Weiterhin hat die dichromatische Teilerschicht für das von der Objektstruktur abgestrahlte und zur Beobachtung gelangende Fluoreszenzlicht eine erhöhte Durchlässigkeit (80 bis 90%) gegenüber dem Normalfall. Im ganzen enthält der LEITZ-Fluoreszenzopak 4 dichromatische Teiler, deren Reflexionsschwerpunkte und Durchlaßbereiche gemäß Abb. 1 im UV, im Violett, im Blau und im Grün liegen. Entsprechend dieser Reihenfolge werden sie verwendet für die Fluoreszenzmikroskopie von Diaminonaphthylsulfonsäure-Markierungen (UV), Catecholamin-Reaktionsprodukte/Falk-Methode (violett), Fluoreszeinisothiocyanat-Markierungen (blau), Tetramethylrhodamin- bzw. Lissamin-Rhodaminpräparate und Fuchsinfärbungen/Feulgen (grün).

Man wird Fluoreszenz-Antikörperpräparate von Spirochäten und ähnliche Objekte mit Blaulicht zur Fluoreszenz anregen und mit einem Sperrfilter K 530\*) oder aber K 510\*) beobachten. Der Beobachter sieht also bei Benutzung der Ölimmersion sehr helle Fluoreszenz der antikörpermarkierten Bakterien auf dunklem Untergrund (Abb. 2).

Bedienungstechnisch — und daher für den Routinebetrieb im Diagnoselaboratorium von Interesse — hat die beschriebene Auflicht-Fluoreszenzmethode zwei Hauptvorteile:

1. Es entfällt die Benutzung eines Ölimmersionskondensators und die damit zusammenhängende leidige „Olschmiererei“ auf der Präparatunterseite und den angrenzenden Mikroskopteilen, Präparatetästen usw.
2. Man braucht kein schwach vergrößerndes „Suchobjektiv“ mehr wie bei Durchlicht-Dunkelfeld, sondern kann direkt mit dem Ölimmersionsobjektiv das Präparat einstellen. Man findet dabei garantiert die fluoreszierenden Treponemen ohne Schwierigkeit, da hier im Auflicht eine Kondensatorjustierung, wie sie im Durchlicht oftmals für jedes neue Präparat notwendig sein kann, völlig