Aus der Dermatologischen Klinik der Universität in Bern
(Direktor: Prof. Dr. Jadassohn).

Eine Zählkammer für zytologische und bakteriologische Zwecke.

Von Dr. Emil Liebreich, I. Assistent der Klinik.

Es liegt nicht in meiner Absicht, die jetzt in Gebrauch befindlichen Zählkammern zu kritisieren; sie haben alle, die älteren wie die neueren, mit ihren vielen Abänderungen den einen gemeinschaftlichen Zweck, eine genaue und rasche Zählung zu gestatten.

Um die Zählung möglichst unabhängig von den zufälligen Unregelmäßigkeiten der Verteilung der Zellen zu machen, muß die Kammer eine große Fläche haben.

Nun stoßen alle Versuche, eine „große Kammer“ herzustellen, auf die Schwierigkeit, daß, je größer die Kammer ist, um so mehr „Linien“ nötig werden, wodurch die Orientierung erschwert wird. Der Linien werden dann „zu viel“, die Zählung wird ermüdend und kann nicht mehr rasch ausgeführt werden.

Das ist auch der Grund, weshalb manche sogenannte „große Kammern“ nur für Leukozyten- und nicht auch für Erythro-

zytenzählungen gebraucht werden können. Für diese letzteren müssen die Einteilungen sehr fein sein, wie z. B. in der Thoma-Zeißschen Kammer, und dafür sind so viele „Linien“ erforderlich, daß man auf großen, so eingeteilten Flächen die Orientierung vollkommen verlieren würde. Das ist eben ein Nachteil, der manchen Kammern anhaftet, daß sie für Erythrozytenzählungen, die doch ebenso wichtig sind und ebenso genau ausgeführt werden müssen wie die Leukozytenzählungen, nur eine ganz beschränkte Fläche besitzen, sehr oft nur das Thoma-Zeißsche Quadrat.

Außerdem ist die Einteilung schon für Leukozytenzählungen bei starker Vermehrung viel zu grob. Man ist dann gezwungen, zur Ermöglichung der Zählung stärkere Verdünnungen zu machen, was immer eine große Fehlerquelle bedingt.

Das Prinzip, auf welchem bei manchen Kammern die Vergrößerung beruht — die Verlängerung der Seitenlinien des Thoma-Zeißschen Quadrates —, ist sicherlich nicht elastisch genug, um ohne Erschwerung der Orientierung noch weitere Vergrößerungen vornehmen zu können. Deswegen beschränken sich die meisten nach diesem Prinzip vergrößerten Kammern auf eine Fläche von 9 qmm, und das gilt eben als zu wenig, um genaue Zählungen zu ermöglichen. Um Anhaltspunkte für die Zählung zu bieten, können aber auch diese Kammern der doppelten Linien nicht vollkommen entbehren, und dadurch wird ebenfalls die Orientierung erschwert.

Die Apparate, die das Zählnetz im Okular haben, erfüllen zwar die Forderung der großen Fläche, dafür aber haben sie auch große Nachteile, vor allem den, daß sie von bestimmten Vergrößerungen und Tubuslängen abhängig sind, was ihre praktische Verwendbarkeit beschränkt. Sie erfordern außerdem Zusatzapparate, was sie relativ kostspielig macht.

Es scheint mir sehr vorteilhaft, unter Umständen auch Zählungen mit Immersion leicht vornehmen zu können, was mit groben Einteilungen nicht möglich ist — wegen des verhältnismäßig kleinen Gesichtsfeldes der Immersion — und mit feinen Einteilungen sehr schwierig ist — wegen der vielen Linien, die dazu nötig sind und die, wie erwähnt, die Orientierung sehr stören.

Ich habe daher versucht, eine Zählkammer zu konstruieren, die ohne kostspielige technische Schwierigkeiten folgende Vorteile in sich vereinigen soll:

1. Möglichst genaue und rasche Zählungen der Leukozyten, auch bei starker Vermehrung, und der Erythrozyten zu gestatten. Deswegen muß die Kammer sehr „groß“ sein und auch noch weiter vergrößert werden können, ohne daß die Orientierung irgendwie erschwert wird. Sie soll daher auch keine „doppelte Linie“ enthalten.

2. Sie soll auch mit Immersion gebraucht werden können, um Differentialzählungen der Leukozyten wie auch Zählungen von kleineren Elementen (Mikroben etc.) zu ermöglichen.

Diese Bedingungen hoffe ich durch eine einfache Abänderung des Prinzips, das vielen Kammern zugrundeliegt, erreicht zu haben, indem ich die Einteilung statt auf einem Quadrat auf einem langen Rechteck vornehme.

Außerdem habe ich die Kammer auch weniger tief machen lassen.

Aus der Einführung eines langen Rechtecks als Einteilungsfläche ergeben sich zwei wichtige Vorteile:

1. Die Figur kann so viele Male wie gewünscht wiederholt werden, sodaß man der Kammer eine beliebige Größe geben kann, ohne dadurch die Orientierung zu erschweren. Um jedes Rechteck von dem nächstoberen und nächstunteren leicht zu unterscheiden, genügt es nämlich, jedes zweite derselben durch eine Anzahl horizontaler Linien zu durchqueren. Daraus resultiert Folgendes: jedes Rechteck unterscheidet sich stets von den beiden, zwischen welchen es liegt (s. Fig. 1). Aus dieser Horizontalteilung ergibt sich noch ein weiterer Vorteil, auf den ich unten zu sprechen komme.

2. Die Zählung kann in einer einzigen Richtung: horizontal, vorgenommen werden, ungefähr so, wie man es mit einem gewöhnlichen Ausstrich-trockenpräparat zu machen pflegt. Man kann sich leicht überzeugen, daß man auf diese Weise schneller zählt und weniger ermüdet.

Bei dieser Einteilung ergeben sich auch aus der geringeren Tiefe der Kammer (0,025 mm = $\frac{1}{40}$ mm) noch zwei andere Vorteile:

1. Sie gestattet auch Zählungen mit Immersion;
2. jede Flächeneinheit meiner Kammer enthält, infolge ihrer geringen Tiefe, viermal weniger zu zählende Elemente als die gleiche Flächeneinheit der Kammern von 0,1 mm Tiefe. Die neue Kammer kann also, obwohl größer, für den gleichen Zellgehalt eine weitere Einteilung und damit auch die dazu nötigen Linien entbehren. Ist aber eine noch feinere Einteilung nötig, wie z. B. für die Zählungen von ganz kleinen Elementen (Mikroben) und meines Erachtens mit Vorteil auch von Erythrozyten, dann kann

man sie hier leicht vornehmen. Dem kleinsten abgegrenzten Raum z. B. der Thoma-Zeißschen Kammer entspricht in meiner Kammer ein Raum mit viermal so großer Basis. Diese kann also noch weiter eingeteilt werden (in vier z. B.), ohne daß die Linien in der feinsten Einteilung näher zusammenliegen als bei den feinsten Einteilungen bei der Thoma-Zeißschen Kammer, wo sie ja einen Raum von viermal größerem Volumen begrenzen.

Diese feinere Einteilung ist aber hier schon erreicht durch die erwähnten Querlinien, die zur Unterscheidung der langen Rechtecke gebraucht worden sind. Führt man deren drei, gleich weit voneinander abstehende, für jedes zu durchquerende Rechteck ein, dann werden diese letzteren in vier gleiche Teile geteilt (s. Fig. 1 — Reihen B).

Die Höhe jedes Rechtecks beträgt 0,1 mm und die Länge 1 cm; die Oberfläche also 1 qmm.

Führt man nun durch alle Rechtecke Vertikale, die 0,1 mm voneinander abstehen, so zerfällt jedes lange Rechteck in 100 Quadrate von 0,1 mm Seitenlänge (s. Fig. 1). Es entstehen also zweierlei Quadrate, die einen sind nicht mehr eingeteilt und bilden nebeneinander lange, nicht „durchquerte“

Fig. 1.

Der zehnte Teil der Kammer. Der obere Kreis stellt ein „durchquertes“ Quadrat bei Okular 3 — Trockensystem 7 dar. Der untere Kreis ein nicht durchquertes bei der gleichen Vergrößerung. Tubuslänge: 170 (Leitz).

Rechtecke (Fig. 1 — A); die anderen sind noch in vier Teile geteilt und bilden lange „durchquerte“ Rechtecke (s. Fig. 1 — B).

In meiner Kammer wird also 1 qmm in 100 Quadrate geteilt, bei der Thoma-Zeißschen Kammer die gleiche Fläche in 400. Dabei ist aber der Kubikinhalt der kleinen Quadrate der gleiche und damit auch die Zahl von Zellen. Die Oberfläche der

feinsten Einteilung eines „durchquerten“ Quadrats ($= \frac{1}{4}$ eines undurchquerten Quadrats und $\frac{1}{400}$ eines langen Rechtecks) ist also gleich der feinsten Einteilung des Thoma-Zeißschen Quadrats, enthält aber viermal weniger Elemente als letzteres, was sich für Zählungen von Mikroben und auch von Erythrozyten als sehr praktisch erwiesen hat.

Aus dieser Einteilung ergibt sich noch ein Vorteil, der die Orientierung sehr erleichtert: bei bestimmten starken Vergrößerungen (Ok. 3—5; Trockensystem 7) und insbesondere bei Anwendung der Immersion

Fig. 2.

Ein nicht „durchquertes“ Quadrat bei Immersion ($\frac{1}{12}$) — Okular 3.

Fig. 3.

Ein durchquertes Quadrat bei Immersion ($\frac{1}{12}$) — Okular 3.

nimmt ein Quadrat genau oder fast genau das ganze Gesichtsfeld ein, sodaß man keine anderen Linien zu sehen bekommt als diejenigen, die die zu zählende Fläche umschreiben (s. Fig. 2, 3).

Wie schon erwähnt, kann die Kammer ohne Erschwerung der Orientierung leicht vergrößert werden, indem man entweder die Rechtecke in größerer Zahl

wiederholt, oder sie verlängert, oder beides vornimmt. — Die jetzt von der Firma E. Leitz-Wetzlar hergestellte Kammer besteht aus 60 Rechtecken, jedes von 1 qmm Oberfläche. 30 dieser Rechtecke sind noch horizontal geteilt, 30 nicht. Insgesamt umfaßt also die Kammer eine Oberfläche von 60 qmm mit einem Inhalt von $1\frac{1}{2}$ cmm. Die Kammer besitzt zwei Lateralrinnen, um den eventuellen „Druckfehler“ zu vermeiden. Sie füllt sich entweder wie die Bürkersche Kammer durch Kapillarität oder wie die anderen Kammern. Zum ersteren Zweck bringt man das Deckglas auf den Ring der Kammer, sodaß beinahe die ganze Zählfläche außer einem kleinen Raume bedeckt wird. Mit zwei Fingern fixiert man zwei entgegengesetzte Ränder des Deckglases und läßt die Flüssigkeit in den frei gebliebenen Raum zufließen. Besondere Sorgfalt bei der Verteilung der Flüssigkeit ist überflüssig, da, bei der großen Fläche der Kammer, eventuelle Fehler sich von selbst kompensieren.

Durch die geringe Tiefe der Kammer wird auch das Absetzen der Elemente beschleunigt, was sich besonders bei Mikrobenzählungen als sehr vorteilhaft (zeitersparend) erwiesen hat.

Als Pipetten und Verdünnungsflüssigkeiten dienen die üblichen.

Um Zählungen vorzunehmen, verfährt man folgendermaßen:

a) Leukozytenzählung. Sie ist möglich auch bei Okular 3, Okular 3, besonders wenn man sich eines Kreutisches bedient. Es genügt dafür eine einzige Reihe (ein Rechteck), z. B. diejenige, die in der Mitte des Gesichtsfeldes liegt, von einem Ende bis zum anderen zu ver-

folgen. Bei Trockensystem 7, Okular 3, stellt man sich ebenfalls ein Ende eines Rechtecks ein. Eventuell kann man noch durch Ausziehen des Tubus (wenn man nicht genügende Vergrößerungen besitzt) die Figur so einstellen, daß ein Quadrat ganz oder fast ganz vom Kreise des Gesichtsfeldes umschrieben ist (s. Fig. 1 — Okular 3, Objektiv 6).

Man hat dann nur das Präparat horizontal zu verschieben, bis man ans andere Ende des Rechtecks gelangt. Das erfolgt sehr rasch. Bei einem normalen Menschen, mit 7000—8000 Leukozyten pro cmm, findet man auf einer ganzen Reihe (d. h. in einem Rechteck) 16—18 Zellen, d. h. 84—82 Quadrate sind ganz leer. Damit hat man also die Leukozytenzahl auf 1 qmm bei einer Schicht von 0,025 mm ($= \frac{1}{40}$ mm) Tiefe bestimmt. Um die Zahl auf 1 cmm zu berechnen, hat man die gefundene Zahl mit der Tiefe und mit der Verdünnung zu multiplizieren, d. h. für eine Verdünnung von 1:10 mit 400. Auch hier wird selbstverständlich das Resultat um so zuverlässiger, je mehr Reihen man durchzählt. Die gesamte Zahl hat man dann durch diejenige der gezählten Rechtecke zu dividieren und das Resultat wie oben mit 400 zu multiplizieren. Es ist leicht zu verstehen, daß, wenn man z. B. 40 Reihen gezählt hat, was genau 1 cmm ausmacht (und damit auch strengsten Anforderungen entspricht), man eigentlich nur die gefundene Gesamtzahl mit der Verdünnung (10 z. B.) zu multiplizieren hat, um die Zahl der in 1 cmm enthaltenen Zellen zu bekommen.

Man kann selbstverständlich auch von einem Rechteck in ein anderes überspringen und dann in dem letzteren weiterzählen, wie man ja auch, wenn man am Ende eines Rechtecks angelangt ist, auf ein anderes übergehen muß.

Die Quadrateinteilung kommt also in gewöhnlichen Fällen für die Rechnung nicht in Betracht. Sie gibt vielmehr nur Anhaltspunkte, um z. B. die gleiche Zelle nicht zweimal zu zählen, etc.

Sie kann aber auch sehr vorteilhaft werden, wenn man bei sehr starker Leukozytenvermehrung zählt. Dann gibt sie die Möglichkeit, auf stärkere Verdünnungen, die in solchen Fällen bei anderen Kammern unumgänglich sind, zu verzichten. Ist die Leukozytenvermehrung außerordentlich stark, dann kann man sich der „durchquerten“ Quadrate bedienen, so, wie es bald für die Erythrozytenzählungen zu besprechen sein wird. Eine Leukozytenvermehrung von 200 000 pro cmm gibt 5 Zellen pro nicht durchquertes Quadrat, also ungefähr 1 Zelle in jeder feinsten Einteilung der „durchquerten“ Quadrate.

b) Erythrozyten- und Blutplättchenzählung. Man kann sich ebenso gut der nicht „durchquerten“ wie auch der „durchquerten“ Rechtecke bedienen. In beiden Fällen hat man in jedem Quadrat die gleiche Zahl wie im kleinsten Quadrat der Thoma-Zeißschen Kammer: bei einem normalen Menschen 13—15 Zellen. Zur genaueren Zählung bedient man sich besser der „durchquerten“ Reihen. Die feineren Einteilungen verhindern ein zweimaliges Zählen der gleichen Zelle.

Man stellt sich auch hier, wie für Leukozytenzählung, das Ende eines Rechtecks ein, und das Präparat wird, wie oben, bis zum anderen Ende verschoben. Damit hat man die Erythrozytenzahl eines Raumes, dessen Basis 1 qmm und dessen Tiefe 0,025 mm, d. h. $\frac{1}{40}$ cmm beträgt. Es muß dann mit der Tiefe (40) und mit der Verdünnung (gewöhnlich 100), d. h. mit 4000 multipliziert werden.

Eine solche Zählung, die sicher sehr genau ist, wird aber dadurch überflüssig, daß man sich hier, ohne Eintrag an Genauigkeit, auf eine Anzahl beliebig gewählter Quadrate beschränken kann. Man stellt sich z. B. irgendein Quadrat, wie gesagt, vorteilhafter eines der „durchquerten“ Reihen, ein. Dann zählt man irgendein anderes, bis man die gewünschte Anzahl auf die ganze Oberfläche verteilter Quadrate durchgemustert hat. Zählt man z. B. nur 30 Quadrate, absolut berechnet also weniger als ein Viertel der Thoma-Zeißschen Kammer, so erhält man doch genauere Resultate. Die gefundene Zahl wird durch die Zahl der gezählten Quadrate dividiert und das Resultat mit 400 000 (40 — Tiefe; 100 — Zahl der Quadrate auf einer Reihe; 100 — Verdünnung) multipliziert. Selbstverständlich ist es ratsam, mehr Quadrate zu zählen, eventuell 100.

Dem Befund von 5 200 000 Zellen pro cmm entsprechen 13 Zellen auf ein nicht durchquertes Quadrat, d. h. ungefähr 3 Zellen für die feinste Einteilung der durchquerten.

c) Lumbalpunkate. Zellreiche Flüssigkeiten werden so gezählt wie die Leukozyten des Blutes. Bei zellarmen gibt der einfache Ueberblick über die Kammer, die eine Schicht von $1\frac{1}{2}$ cmm enthält, eine genügende Schätzung.

Bei Zählungen mit Immersion bedient man sich selbstverständlich eines feineren Deckgläschens, das jedem Apparat zugefügt ist. Es ist vorteilhaft, sich solcher Vergrößerungen zu bedienen, bei denen nur ein einziges Quadrat im ganzen Gesichtsfeld erscheinen kann. Besitzt man nicht die dazu nötigen Objektive und Okulare, dann kann man die gewünschte Vergrößerung durch Ausziehen des Tubus bekommen (s. Fig. 1, 2, 3).

d) Für die Spezialzählung der Zellen mit α Granula, die in meiner vor kurzem in „Zieglers Beiträgen“ erschienenen Arbeit beschrieben

sind, kann man sich mit großem Vorteil der dort angegebenen Türkischen Färbung bedienen.

e) Bei Mikrobenzählung, zur Herstellung von Vakzinen, benutzt man selbstverständlich nur die Immersion. Man verdünnt die Mikrobensuspension so stark, bis man in einem eingestellten Quadrat eine Zahl von Mikroben sieht, die klein genug ist, um gezählt werden zu können. Dann verfährt man so wie bei Erythrozytenzählungen (s. o.). Man stellt sich ein „durchquertes“ Quadrat ein, das man mit Hilfe der feineren Einteilungen leicht durchzählen kann. Man zählt eine größere Anzahl solcher Quadrate, die man auf der ganzen Fläche beliebig wählt, und dividiert die Gesamtzahl durch die der gezählten Quadrate. Das Resultat wird mit 4000 und mit der Verdünnung multipliziert. Die gefundene Zahl stellt also die in 1 cmm der Originalsuspension vorhandenen Mikroben dar. Daraus läßt sich dann mit Leichtigkeit berechnen, wie stark die Originalsuspension verdünnt oder konzentriert werden muß, um in 1 ccm der Vakzine die gewünschte Zahl Mikroben zu erhalten.

Als Verdünnungsflüssigkeit für die Zählung kann man sich vorteilhaft solcher Flüssigkeiten bedienen, welche, wie das Karbol-fuchsin, Antiseptikum und Farbstoff enthalten. Das Karbol wirkt auch als Beizmittel für die Farbe, was nicht zu unterschätzen ist, da man gezwungen ist, nur ganz schwache Farblösungen zu gebrauchen, um die Suspension nicht undurchsichtig zu machen. Die Zählung erfolgt am besten bei künstlichem Licht.